UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

AGIDE GIMENEZ MARASSI

Aplicação da imagem por Ressonância Magnética para avaliação de
injúrias mecânicas e tecidos deteriorados em sementes

São Carlos
2015

AGIDE GIMENEZ MARASSI

Aplicação da imagem por Ressonância Magnética para avaliação de
injúrias mecânicas e tecidos deteriorados em sementes

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Alberto Tannús

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gimenez Marassi, Agide

Aplicação da imagem por Ressonância Magnética para
avaliação de injúrias mecânicas e tecidos deteriorados
em sementes / Agide Gimenez Marassi; orientador
Alberto Tannús - versão corrigida -- São Carlos,
2015.

129 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2015.

1. Imagem por Ressonância Magnética. 2.
Tomografia. 3. Análise de Imagens. 4. Qualidade de
Sementes. I. Tannús, Alberto, orient. II. Título.

Dedico aos meus pais,
Carlos e Valéria.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Tannús, pela oportunidade conferida, amizade e confiança em mim creditada.

Ao pesquisador Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, pela colaboração e conhecimentos sobre sementes transmitidos ao longo desse projeto de mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva, pela disponibilidade e diversas conversas, transmitindo conhecimentos fundamentais sobre Ressonância Magnética.

Ao Dr. Edson Luís Gea Vidoto, pelo conhecimento e apoio técnico disponibilizado, além das inúmeras conversas, brincadeiras e experiência transmitidas, tornando o ambiente do laboratório um lugar extremamente prazeroso.

A Dra. Jackeline Malheiros, pelo treinamento inicial para operação de nosso equipamento de Ressonância Magnética.

Ao Dr. Rodrigo de Oliveira Silva, por auxiliar na realização dos experimentes de relaxometria que foram essenciais para o desenvolvimento dos protocolos de imagem.

Aos pesquisadores da Embrapa Instrumentação, Dr. Paulo Lasso e Dr. Carlos Vaz, por fornecer o microtomógrafo e realizar as imagens de microtomografia computadorizada.

Ao pessoal da oficina mecânica, especialmente para Ademir Moraes, pela disponibilidade sempre quando necessário e pelo desenvolvimento dos equipamentos de hidratação e danos mecânicos para sementes.

Aos amigos do CIERMag: Dr. Mateus Martins, Gustavo Lourenço, José Teixeira, Daniel Pizetta, Daniel Consalter, Danilo Mendes, André Paschoal, Felipe Coelho, Marcia Marques, Pedro Victor, Antônio Gonçalves, Cristiano, Heitor, João Batista, Roberson Polli, Rafael Freire, Daniel Papoti, José Gazziro, Odir Canevarollo, João Gomes, Ricardo Silva, Maria Martinez e Mariana Rodrigues.

Aos amigos do IFSC: Renata Batista, Cesar Uliana, Carlos Bastos, Diego Paiva, Paulo Eduardo, Tiago Gualberto, Edna Spada, Natália Palivanas e Victor Sanches.

As agências de fomento CNPq, FAPESP e CAPES, pelo suporte financeiro, indispensável para a realização desta pesquisa.

*“Não se pode ensinar coisa alguma a alguém;
pode-se apenas auxiliá-la a descobrir por si mesmo”.*

Galileu Galilei

RESUMO

MARASSI, A. G. **Aplicação da imagem por Ressonância Magnética para avaliação de injúrias mecânicas e tecidos deteriorados em sementes**. 2015. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Os danos mecânicos são considerados um dos principais fatores que afetam negativamente o potencial fisiológico de sementes e seus efeitos podem ser evidenciados após a sua ocorrência ou durante o armazenamento pela deterioração de tecidos causados por fungos. Entretanto, não existe nenhum estudo detalhado em Ressonância Magnética que vise analisar a morfologia interna de sementes. A finalidade desta pesquisa é estudar sementes de Milho e Soja com o objetivo de otimizar os parâmetros de aquisição de Ressonância Magnética para a visualização adequada da morfologia interna de sementes e analisar comparativamente imagens de raios X, micro-CT e RM. A imagem por Ressonância Magnética é uma técnica completamente não invasiva originada a partir da interação de certos núcleos do objeto com um campo magnético externo, devido a codificação espacial das frequências de precessão destes núcleos, permitindo a visualização de estruturas internas com alta resolução e contraste. As técnicas de micro-CT e raios X baseiam-se na densidade e composição química dos tecidos dos objetos, como também na atenuação devido a absorção ou dispersão do feixe incidente. Os dados resultantes mostram a ocorrência de danos mecânicos em sementes de Milho e tecidos internos deteriorados em sementes de Soja com relação à profundidade e extensão. Conclui-se que a imagem por Ressonância Magnética pode ser uma ferramenta auxiliar para a investigação de danos mecânicos e tecidos deteriorados em sementes, devido à técnica ser completamente não destrutiva.

Palavras-chave: Imagem por Ressonância Magnética. Tomografia. Análise de imagens. Qualidade de sementes.

ABSTRACT

MARASSI, A. G. **Aplication of the image by magnetic resonance for evaluation of mechanical injuries and deteriorated tissue in seeds**. 2015. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Mechanical damage is considered one of the main factors that may adversely affect the physiological potential of seeds and its effects can be evidenced after its occurrence or during storage by tissue deterioration caused by fungi. However, there is no detailed study on magnetic resonance aimed to analyze the internal morphology of seeds. The purpose of this research is to study corn and soybean seeds with the objective of optimize the image acquisition parameters through MRI for adequate visualization of the internal seed morphology and to comparatively analyze X-ray, micro-CT and MR images. The magnetic resonance imaging is a completely noninvasive technique originated from the interaction of certain object nuclei with an external magnetic field, based on spacial encoding of the precession frequencies of these nuclei, allowing the visualization of internal structures with high resolution and contrast. The techniques of micro-CT and X-ray are based on the density and chemical composition of the tissue of the object. The resulting data show the occurrence of mechanical damages in corn seeds and internal deteriorated tissues in soybean seeds with relation to the depth and extension. We concludes that the magnetic resonance imaging may be an auxiliary tool for the investigation of mechanical damage and deteriorated tissue in seeds, because the technique is completely non-destructive.

Keywords: Magnetic resonance imaging. Tomography. Image analysis. Seed quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de Sementes para as safras de 2001/2002 e 2012/2013 relativas ao total contabilizado no período considerado (esquerda) e Produção de Grãos de Milho e Soja em 2014 e 2015 (direita).....	27
Figura 2- Momento magnético permanente originado pela distribuição de carga sobre a superfície esférica do núcleo, quando este se encontra em movimento em torno de seu próprio eixo, gerando um pequeno campo magnético.....	33
Figura 3 - Representação dos níveis energéticos de núcleos com spin $\frac{1}{2}$. Na ausência de campo magnético, os spins estão aleatoriamente distribuídos na matéria e os níveis energéticos são degenerados. Com a imposição de um campo magnético externo, ocorrerá o acoplamento dos spins com o campo, resultando no desdobramento dos níveis energéticos dos núcleos, que tenderão a se alinhar paralela ou antiparalelamente em relação a direção do campo.	35
Figura 4 - Espectro eletromagnético com destaque para a região das ondas de rádio, que são utilizadas para promover a transição entre os estados energéticos dos núcleos de hidrogênio, sob um campo de 2T.	36
Figura 5 - Movimento de precessão nuclear na presença de um campo magnético externo. Além do núcleo girar sobre seu próprio eixo, este também precessiona na direção do campo externo devido a energia térmica.	38
Figura 6 - Magnetização macroscópica representada em um sistema de coordenadas. No equilíbrio térmico, a magnetização longitudinal surge devido a uma pequena fração de núcleos que precessionam na direção do campo. A magnetização transversal é nula devido a não coerência de fase entre as suas diversas componentes, que estão precessionando com fases distintas.....	41
Figura 7 - Sistema de coordenadas girante (com linha) em relação ao sistema de coordenadas do laboratório (sem linha) onde, por simplicidade, adotamos que os eixos z e z' apontam na mesma direção.	42
Figura 8 - Decomposição de um campo oscilante e linearmente polarizado em duas componentes circularmente polarizadas que giram em sentidos opostos.	45

Figura 9 - Comportamento do vetor magnetização, no referencial girante de coordenadas, na condição de ressonância. Neste caso, a magnetização somente sente os efeitos do campo B_1 , que precessiona perpendicularmente em relação a sua direção. Podemos controlar o quanto a magnetização gira tanto pela intensidade de B_1 como também pelo tempo de atuação do campo.....	46
Figura 10 – Casos especiais da aplicação dos pulsos de radiofrequência. Na esquerda, é mostrado um pulso de excitação, onde toda a magnetização é levada para o plano transversal. Na direita, temos um pulso de inversão, em que a magnetização inverte seu valor em relação a condição de equilíbrio térmico. Neste caso, nenhuma componente de magnetização transversal é observada.	47
Figura 11 - Sinal característico observado em um experimento de RMN, resultado de uma força eletromotriz induzida na bobina receptora.....	49
Figura 12 – Comportamento das componentes do vetor magnetização quando sujeito a um pulso de radiofrequência de excitação. A componente transversal (esquerda), após um certo tempo, retorna ao seu valor nulo no equilíbrio térmico, enquanto que a componente longitudinal se recupera e volta ao seu valor inicial M_0	51
Figura 13 - Ilustração do fenômeno dos ecos de spins. Em (a) ocorre a excitação através do pulso de RF. Após o termino do pulso, a magnetização começa a sentir os efeitos da inhomogeneidade de campo, perdendo coerência de fase (b). Após um tempo τ é aplicado o pulso de inversão para que ocorra a refocalização das isocromatas (c). As isocromatas continuam a evoluir (d) e simetricamente em relação ao tempo τ , ocorre o surgimento de um eco (e). O sistema continua evoluindo (f), e se nada for feito, este retorna para a condição de equilíbrio térmico.	53
Figura 14 - Exemplo da codificação de frequência em uma dimensão, pela aplicação de um gradiente de campo. (a) Tubos com diferentes quantidades de água são submetidos a um campo magnético externo. (b) Sinal FID dos três tubos separados adquiridos no tempo. (c) Sinal FID composto, e aplicação da transformada de Fourier que retorna a amplitude e frequência que compõem o sinal observado.	55
Figura 15 - Condição de boa resolução para uma imagem de RM, onde a distância entre os centros de cada pixels da imagem, δx , deve ser maior do que sua largura média, Δx	58

Figura 16 – Imagem bidimensional codificada em frequência (eixo x) e fase (eixo y), sem aplicação do gradiente de seleção. (a) Espaço-k dos dados adquiridos no tempo. (b) Transformada de Fourier na direção de frequência. (c) Transformada de Fourier na direção de fase. (d) Intensidade do sinal adquirido em escala de cinza.	62
Figura 17 – Desenho ilustrativo do arranjo e funcionamento de um tomógrafo de raios X, onde é apresentado a fonte de raios X, o arranjo dos detectores e uma base giratória. A imagem tridimensional é obtida através da interpolação das diversas imagens bidimensionais adquiridas da amostra.	66
Figura 18 - Imagem do canhão pneumático, utilizado para simular danos mecânicos nas sementes. (A) Imagem frontal, mostrando o regulador de pressão à esquerda da caixa e a gaveta na parte inferior. (B) Imagem superior, mostrando a entrada das sementes, o bico ejetor e o anteparo metálico.	68
Figura 19 - Imagem do equipamento de hidratação das sementes. (A) Vista frontal, onde o temporizador da esquerda marca o tempo de hidratação e o da direita controla a abertura/fechamento do sistema de água. (B) Imagem superior, mostrando o tambor de acrílico com o motor de passo a esquerda e o reservatório de água a direita.	69
Figura 20 - Bobina tipo Sela Cruzada, dedicada para o estudo de pequenos animais, juntamente com seu suporte e a blindagem de RF, responsável pelo isolamento da região da bobina em relação as bobinas de gradientes e a bobina de shimming.	70
Figura 21 - Bobinas tipo Solenoide, projetadas para a aquisição dedicada de imagens em sementes de Milho e Soja. (A) Visão lateral, destacando o diâmetro interno das bobinas, que são distintos justamente para atender ao tamanho das sementes. (B) Vista superior, destacando o circuito elétrico que foi implementado na construção das bobinas.	71
Figura 22 - Sequência de pulsos utilizada para os experimentos de Relaxometria das sementes, onde a primeira barra vertical à esquerda representa o pulso de excitação e as demais barras subsequentes são os pulsos de refocalização da magnetização no plano transversal, gerando diversos ecos que reduzem sua intensidade devido à atuação dos mecanismos de relaxação.	72

Figura 23 - Microtomógrafo SkyScan, modelo 1172, instalado no laboratório de Técnicas Nucleares e AFM na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Instrumentação, em São Carlos/SP.....	76
Figura 24 - Posicionamento das sementes no interior do microtomógrafo, sob à base giratória do equipamento, juntamente com uma fita para fixação das amostras, evitando artefatos de movimento: (A) Semente de Milho; (B) Semente de Soja.	76
Figura 25 - Equipamento de raios X digital Faxitron X-ray, modelo MX-20 DC12, instalado no Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, em Piracicaba/SP.	77
Figura 26 - Imagem capturada da tela do Network Analyzer, mostrando a Carta de Smith (Amarelo) que fornece a impedância complexa e escala logarítmica (azul) da medida de S_{11} , para todas as bobinas utilizadas, na frequência de 85,2 MHz.	80
Figura 27 - Imagem do phantom esférico obtida com a bobina tipo Sela Cruzada. É possível notar uma granulação na imagem devido à distância entre a bobina e a amostra, resultando uma pequena relação sinal-ruído (RSR).	83
Figura 28 - Imagem do phantom esférico obtida com a bobina tipo Solenoide para as sementes de Milho. Com a diminuição da distância entre bobina e amostra, resultando em um aumento da relação sinal-ruído, temos uma imagem mais nítida do objeto.	83
Figura 29 - Imagem do phantom esférico obtida com a bobina tipo Solenoide para as sementes de Soja. O aumento da relação sinal-ruído também causou uma redução significativa no ruído de fundo, de forma que a imagem mostra somente o sinal proveniente da amostra.	83
Figura 30 - Teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor. O gráfico mostra os valores do teor de água médio para cada intervalo de 8 horas de hidratação. O teor de água inicial é fixado para todas as sementes como sendo o mesmo.	85
Figura 31 - Teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor. É apresentado os valores do teor de água das sementes a cada período de 8 horas de hidratação, sendo o valor inicial fixo para todas as sementes.	86

Figura 32 - Teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel. Cada ponto do gráfico representa o valor médio do teor de água das sementes para cada hora de hidratação.	88
Figura 33 - Teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel, com a apresentação do teor de água médio das sementes para cada hora de hidratação.	89
Figura 34 - Curvas da distribuição dos tempos de relaxação coletadas em intervalos de 8 horas, por um período total de 24 horas, das sementes de Milho hidratadas pelo método do tambor, onde foi acrescentado 1 ml de água a cada hora.	90
Figura 35 - Distribuição dos tempos de relaxação das sementes 1 e 5 de Milho, para cada intervalo de 8 horas e hidratadas pelo método do tambor. Pode-se observar o aumento da intensidade do sinal proveniente da água, como também seu deslocamento para tempos mais longos.	91
Figura 36 - Distribuição dos tempos de relaxação para sementes de Milho após a secagem em estufa por um período de 5 horas (verde) e 65 horas (vermelho) na temperatura de 40° C. Pode-se notar uma diminuição no pico da esquerda, resultado da subtração de água na semente, enquanto que o pico da direita permanece inalterado, que representa o sinal proveniente do óleo da semente.	92
Figura 37 - Curvas da distribuição dos tempos de relaxação coletadas em intervalos de 8 horas, por um período total de 24 horas, das sementes de Soja hidratadas pelo método do tambor, onde foi acrescentado 1 ml de água a cada hora.	93
Figura 38 - Distribuição dos tempos de relaxação para amostras de sementes de Soja após a secagem em estufa por um período de 5 horas (verde) e 65 horas (vermelho) na temperatura de 40° C. Aqui, como ocorre na semente de Milho, a secagem afeta somente o pico da esquerda, devido a diminuição da quantidade de água presente na semente, e o sinal oriundo do óleo permanece constante para todos os tempos de secagem.	94
Figura 39 – Apresentação das estruturas internas encontradas em sementes de Milho e Soja. Notamos que a semente de Milho é mais sensível a danos mecânicos devido à estrutura rígida do endosperma, enquanto que a região do eixo embrionário na	

semente de Soja é mais frágil pois esta se encontra sob uma fina camada de tegumento.....	95
Figura 40 - Imagens da semente 17 de Soja seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	96
Figura 41 - Imagens da semente 19 de Milho seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	96
Figura 42 - Imagens da semente 1 de Soja seca sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Penicillium</i> spp. por um período de 3 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	97
Figura 43 - Imagens da semente 6 de Milho seca sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Penicillium</i> spp. por um período de 3 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	97
Figura 44 - Imagens da semente 17 de Soja seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	99
Figura 45 - Imagens da semente 17 de Soja do grupo controle, hidratada por um período de 3 horas, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	100
Figura 46 - Imagens da semente 19 de Milho seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	100
Figura 47 - Imagens da semente 19 de Milho do grupo controle, hidratada por um período de 4 horas, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	101
Figura 48 - Imagens da semente 10 de Soja seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B)	

Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	102
Figura 49 - Imagens da semente 10 de Soja hidratada por um período de 3 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.....	102
Figura 50 - Imagens da semente 13 de Milho seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.	103
Figura 51 - Imagens da semente 13 de Milho hidratada por um período de 4 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.....	104
Figura 52 - Distribuição dos tempos de relaxação da semente de Milho apresentadas em relação às suas diferentes estruturas, como embrião (verde) e endosperma (vermelho).....	105
Figura 53 - Imagens da semente 17 e 18 de Soja secas do grupo controle, mantidas em condições normais de armazenamento, obtidas pela bobina tipo Sela Cruzada.....	118
Figura 54 - Imagens da semente 19 e 20 de Milho secas do grupo controle, mantidas em condições normais de armazenamento, obtidas pela bobina tipo Sela Cruzada.....	119
Figura 55 - Imagens da semente 10 de Soja seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses, obtida pela bobina tipo solenoide.	120
Figura 56 - Imagens da semente 10 de Soja hidratada por um período de 3 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. obtida pela bobina tipo solenoide.	121
Figura 57 - Imagens da semente 13 de Milho seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses, obtida pela bobina tipo solenoide.	122
Figura 58 - Imagens da semente 13 de Milho hidratada por um período de 4 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. obtida pela bobina tipo solenoide.	123

Figura 59 - Imagens da semente 17 de Soja seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento.	126
Figura 60 - Imagens da semente 1 de Soja seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Penicillium</i> spp. por um período de 6 meses.	127
Figura 61 - Imagens da semente 20 de Milho seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento.	128
Figura 62 - Imagens da semente 13 de Milho seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo <i>Aspergillus</i> spp. por um período de 6 meses.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abundância relativa ao isótopo mais encontrado na matéria e razão giromagnética específica de alguns núcleos comumente utilizados em experimentos de RMN e que apresentam spin igual a $\frac{1}{2}$	33
Tabela 2 - Distribuição das sementes utilizadas nos experimentos de Imagem. As sementes foram organizadas em três grupos, arranjados por danos mecânicos associados com a inoculação do fungo <i>Penicillium</i> spp., danos mecânicos associados com a inoculação do fungo <i>Aspergillus</i> spp. e controle, no qual não foi feito nenhum dano ou a inoculação por fungos.	67
Tabela 3 - Parâmetros utilizados para aquisição das imagens de RM. Para a bobina tipo S. Cruzada o FOV foi ajustado de acordo com o posicionamento das sementes no suporte de isopor, utilizado para posicionar as sementes no centro geométrico da bobina. Para a bobina tipo Solenoide o FOV foi fixado pelo tamanho da maior semente, que no caso é a semente de Milho.	74
Tabela 4 - Coeficiente de reflexão S_{11} e valores da parte real e imaginária da impedância complexa em 85,2 MHz. É esperado que o valor da parte real da impedância complexa fique próximo de 50Ω o que mostra o casamento de impedância da bobina com o restante da eletrônica do sistema de RM, e que a parte imaginária da impedância complexa fique próxima de zero na condição de ressonância.	80
Tabela 5 - Fator de Qualidade das bobinas vazias, isto é, sem nenhuma amostra presente (Q_v), carregadas (bobina mais amostra) com um pequeno <i>phantom</i> esférico preenchido com água com sulfato de cobre (Q_c) e deslocamento em frequência (Δf). É esperado que, quanto maior o acoplamento da amostra com a bobina, exista uma queda no fator de qualidade e um maior deslocamento em frequência.	81
Tabela 6 - Relação sinal-ruído (RSR) e medidas de potência, em dB e W, utilizada em cada bobina para a aplicação dos pulsos de 90° e 180° com a sequência MSME. O aumento da relação sinal-ruído, ou seja, da sensibilidade da bobina, causou uma redução na potência necessária para a geração dos pulsos de RF.	82

Tabela 7 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor, sendo as medidas adquiridas em intervalos de 8 horas.	84
Tabela 8 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor, com medidas realizadas a cada intervalo de 8 horas.	85
Tabela 9 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel. Neste caso, as medidas de massa e teor de água foram obtidas a cada hora de hidratação.	87
Tabela 10 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel, com medidas adquiridas a cada hora de hidratação.	88
Tabela 11 - Percentagem dos constituintes totais indicado nas estruturas físicas específicas da semente de Milho seca.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
IRM.....	Imagem por Ressonância Magnética
RF	Radiofrequência
ppm	partes por milhão
CG.....	Coordenadas girantes
CL.....	Coordenadas do laboratório
FID	Free Induction decay
PSF	<i>Point Spread Function</i>
TE.....	Tempo ao eco
TR	Tempo de repetição
RM.....	Ressonância Magnética
micro-TC.....	Microtomografia Computadorizada
RSR.....	Relação sinal-ruído
MSME	<i>Multi-Slice Multi Echo</i>
TA.....	Tempo de Aquisição
FOV	Campo de visão
RI.....	Região de interesse
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
FLASH.....	<i>Fast-Low Angle Shot</i>
SWIFT	<i>Sweep Imaging with Fourier Transformation</i>
UTE	<i>Ultra-Short Echo-Time</i>
ZTE	<i>Zero Echo Time</i>
IBGE.....	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CIERMag...	Centro de Imagens e Espectroscopia In Vivo por Ressonância Magnética

Sumário

INTRODUÇÃO	27
1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	31
1.1 Acoplamento entre espécies nucleares e campos magnéticos.....	32
1.2 Magnetização de <i>Voxel</i>	39
1.3 Sistema de coordenadas	41
1.4 Excitação de radiofrequência	44
1.5 Resposta de RMN: Free Induction Decay ou FID	48
1.6 Equações de Bloch	49
1.7 Mecanismos de Relaxação	51
1.8 Codificação de Frequência: Imagem Unidimensional	54
1.9 Densidade de Magnetização e Resolução da Imagem	56
1.10 Seletividade.....	59
1.11 Codificação de Fase: Imagem Bidimensional	60
1.12 Sequência Gradiente Eco	62
1.13 Microtomografia Computadorizada	64
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
2.1 Canhão pneumático e tambor de hidratação	68
2.2 Desenvolvimento de bobinas dedicadas	70
2.3 Experimentos de Relaxometria e Ressonância Magnética	71
2.4 Experimentos de microtomografia computadorizada e raios X	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	79
3.1 Resultados preliminares: calibração das bobinas e hidratação das sementes	79
3.2 Relaxometria: hidratação e secagem.....	89
3.3 Imagens de sementes secas.....	95
3.4 Imagens de sementes secas e hidratadas.....	99
4 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE A: Imagens por Ressonância Magnética.....	117
APÊNDICE B: Imagens por Microtomografia Computadorizada	125

INTRODUÇÃO

Com um mercado interno girando em torno de aproximadamente US\$ 4 bilhões, o Brasil tem sido considerado um dos ambientes mais sólidos no contexto mundial da indústria de sementes, consolidando vocação agrícola a um sistema regulatório robusto e seguro, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China. A produção brasileira de sementes saltou de 1,6 milhão de toneladas, em 2001, para mais de 3,5 milhões de toneladas, na safra 2012/2013, destacando-se a produção de sementes de Soja, em 2,3 milhões de toneladas, e a de Milho, que alcançou as 414 mil toneladas, sendo as principais espécies produzidas no País e responsáveis por mais da metade do valor do mercado relacionado.¹

Figura 1 – Produção de Sementes para as safras de 2001/2002 e 2012/2013 relativas ao total contabilizado no período considerado (esquerda) e Produção de Grãos de Milho e Soja em 2014 e 2015 (direita).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dentre os fatores que afetam a qualidade de sementes destacam-se as injúrias mecânicas, principalmente por afetar seus atributos físico, fisiológico e sanitário. Os efeitos das injúrias mecânicas podem ser imediatos ou se manifestarem durante o período de armazenamento podendo, neste último caso, ocorrer em decorrência da deterioração de tecidos das sementes submetidas a impactos com teor de água elevado, no momento da colheita.²

Durante o beneficiamento, toda vez que as sementes passam por elevadores, transportadores, e através de máquinas, ocorrem quedas, impactos e abrasões, os quais causam lesões no tegumento.³ Entre os fatores que influenciam a ocorrência de injúrias mecânicas em sementes destacam-se as características da própria

semente, como o tamanho, forma, espessura do tegumento, tipo de tecido de reserva e posição espacial do eixo embrionário.⁴ A semente de Soja, por exemplo, é muito sensível às injúrias mecânicas, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário encontram-se situadas sob um tegumento relativamente frágil, que praticamente não lhe confere proteção suficiente.⁵

Ainda, as injúrias mecânicas caracterizadas por aberturas no pericarpo ou no tegumento podem se tornar pontos de infecção e em fonte de nutrientes para patógenos.⁶ Os efeitos dessas injúrias são agravados quando as lesões estão localizadas próximas ao eixo embrionário, podendo provocar alterações fisiológicas qualitativas nas sementes pela presença de fungos de armazenamento e, conseqüentemente, prejudicar o desenvolvimento da plântula.⁷

Durante pouco mais de duas décadas, a avaliação da ocorrência de injúrias mecânicas em sementes foi realizada utilizando produtos químicos de contraste que, ao entrarem em contato com as superfícies danificadas das sementes, resultam na formação de colorações específicas dos tecidos ou no intumescimento do tegumento das sementes. Porém, esses métodos têm sido considerados inconvenientes, pois além de não permitirem a germinação posterior das sementes após o tratamento, não identificam com precisão as injúrias diretamente relacionadas com as anormalidades observadas nas plântulas ou com a morte dos embriões.⁸

Assim, a introdução do teste de raios X para a avaliação da ocorrência dessas avarias representou um avanço significativo da pesquisa, inicialmente realizado em sementes de Milho,⁹ sendo posteriormente utilizados sementes de Soja e o Milho doce, com resultados bastante satisfatórios frente àqueles encontrados com agentes químicos.¹⁰⁻¹¹ Resultados de pesquisa também evidenciaram a eficiência das análises radiográficas na identificação de tecidos deteriorados em sementes de Milho,¹²⁻¹³ entretanto, com base em avaliações realizadas no Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, a identificação das avarias somente é possível quando as lesões estão em estágios avançados de deterioração, sem identificar os tecidos danificados na fase inicial do processo.

Além da dificuldade para a identificação de tecidos deteriorados, citada anteriormente, existe também a limitação do teste de raios X não possibilitar a análise da extensão e profundidade das injúrias ou dos tecidos deteriorados e se estes estão atingindo efetivamente regiões vitais das sementes. Na técnica de raios X, um feixe produzido por um gerador de raios X é transmitido através da amostra,

de forma que distintas quantidades da radiação incidente são absorvidas pelo objeto, dependendo de sua composição química e densidade.¹⁴ Por essa razão, existem dificuldades na identificação de tecidos deteriorados em sementes nos seus estágios iniciais, pois muitas vezes as alterações na densidade dos tecidos são pequenas.¹⁵ Desta forma, a aplicação de procedimentos que permitam maior rigor na avaliação da ocorrência de injúrias mecânicas e de tecidos deteriorados, baseados na análise de imagens em escala tridimensional, como a Ressonância Magnética (RM), poderá contribuir para a evolução da pesquisa em tecnologia de sementes.

A Imagem por Ressonância Magnética (IRM) é uma técnica completamente não invasiva originada a partir da interação de certos núcleos da amostra com um campo magnético externo, se baseando na codificação espacial das frequências de precessão desses núcleos, permitindo a visualização de estruturas internas com alta resolução e contraste.¹⁶ Porém, ainda não existe um estudo pormenorizado em Ressonância Magnética que vise à análise da morfologia interna de sementes. A imagem por Ressonância Magnética se baseia, dentre outros parâmetros, na densidade nuclear do objeto,¹⁷ de forma que qualquer pequena alteração na sua composição, ou mesmo a presença de ar no interior das estruturas das sementes, torna-se detectável pelo método. Este tem a vantagem, comparado com a técnica de raios X, da possibilidade de se avaliar seções internas no objeto sem a necessidade de destruí-lo.

Desta forma, os objetivos desta pesquisa foram obter pelo método da Relaxometria as curvas da distribuição dos tempos de relaxação das sementes de Soja e Milho secas e hidratadas, o desenvolvimento de bobinas dedicadas para a aquisição de imagens por Ressonância Magnética e a avaliação comparativa entre imagens obtidas por RM, microtomografia computadorizada e raios X com a discussão dos detalhes obtidos em cada técnica utilizada.

Por isso é esperado que com esta pesquisa seja possível verificar a viabilidade da utilização da imagem por Ressonância Magnética para a avaliação de injúrias mecânicas e tecidos deteriorados em sementes armazenadas, tornando a técnica uma ferramenta auxiliar junto aos demais métodos já bem estabelecidos e que são comumente utilizados. Os resultados obtidos serão apresentados na forma de comparações entre as imagens obtidas por Ressonância Magnética, microtomografia computadorizada e raios X de cada semente. A comprovação da

eficiência dessa técnica poderá contribuir para o monitoramento de lotes de sementes nos programas de controle de qualidade das empresas produtoras de sementes.

1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Após a descoberta das propriedades magnéticas nucleares realizada por Isidor Isaac Rabi,¹⁸ fato que lhe concebeu o prêmio Nobel de Física no ano de 1944, muito esforço foi empenhado para o aprimoramento de técnicas e diversas aplicações envolvendo esse fenômeno foram desenvolvidas, primeiramente no âmbito da espectroscopia. Posteriormente, com trabalhos realizados por dois grupos de forma completamente independente, um coordenado por Edward Mills Purcell¹⁹ que estudava sólidos na Universidade de Harvard e, outro por Felix Bloch²⁰ que estudava líquidos na Universidade de Stanford, novos métodos para medidas precisas do fenômeno de RM foram desenvolvidos e a conexão entre eles foi justificada. Devido a esses trabalhos Purcell e Bloch compartilharam o Prêmio Nobel de Física do ano de 1952.

Ainda no escopo do desenvolvimento desta técnica, dois outros pesquisadores, sendo eles Paul Lauterbur²¹ da Universidade de Illinois e Peter Mansfield²² da Universidade de Nottingham, sugeriram a utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a criação de imagens, culminando com as primeiras imagens geradas por Lauterbur no ano de 1972. Essa vertente da RMN proporcionou um grande interesse da medicina para o diagnóstico clínico e se desenvolveu de forma extremamente rápida devido ao fato da técnica ser completamente não invasiva e não ionizante. O resultado dessa grande contribuição para o conhecimento e desenvolvimento científico foi o Prêmio Nobel de Medicina concedido recentemente a estes pesquisadores no ano de 2003.

A imagem por RMN é um método oriundo de uma pequena magnetização originada a partir de certas espécies nucleares na presença de um campo magnético externo e, sendo esta magnetização proporcional à densidade desses núcleos, a imagem mostrará a distribuição destes núcleos selecionados, com alta resolução e contraste.²³ Apesar de ser menos conhecido nesta área, diversos estudos utilizando IRM têm sido atualmente realizados em espécies vegetais, a fim de se explorar a anatomia e fisiologia de células de plantas,²⁴ além da morfologia de sementes e frutas em suas diversas avarias, como a infestação de fungos em sementes de trigo²⁵ e tecidos deteriorados em peras.²⁶

Neste capítulo apresentaremos os conceitos físicos fundamentais que caracterizam o fenômeno de RMN e como podemos explorá-los para a criação da imagem por Ressonância Magnética, assim como uma breve discussão sobre a técnica de microtomografia computadorizada.

1.1 Acoplamento entre espécies nucleares e campos magnéticos

A imagem por Ressonância Magnética é formada exclusivamente pela interação entre certos núcleos presentes no objeto de estudo e um campo magnético externo, baseando-se na codificação espacial das frequências desses núcleos, onde o campo magnético também varia espacialmente através de gradientes de uma de suas componentes. Os núcleos úteis para RMN, como assim para IRM, devem possuir uma propriedade que é fundamental para a ocorrência do fenômeno de Ressonância Magnética, que é a existência de momento angular intrínseco ou *spin* e, associado a isso, de momento magnético permanente, expressos respectivamente nas equações abaixo:

$$\mathbf{S} = I\hbar \quad (1)$$

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma I\hbar \quad (2)$$

onde I é o operador de spin nuclear,²⁷ $\hbar$ é a constante reduzida de Planck ($\hbar = \frac{h}{2\pi}$) e γ é chamado de razão giromagnética, cujo valor depende exclusivamente da espécie nuclear.

A este *spin* está associado um certo grau de liberdade intrínseco do núcleo que, classicamente, pode ser comparado com uma pequena esfera uniformemente carregada que gira em torno de seu próprio eixo e, devido ao fato do próton possuir massa finita, deve apresentar também um momento angular associado. Então, devido a essa carga uniformemente distribuída pela superfície da esfera, e ao movimento da esfera em torno de seu próprio eixo, surgirá uma corrente elétrica sobre toda a casca da esfera, resultando na criação de um pequeno campo magnético. A este campo magnético gerado pelas condições apresentadas acima se associa o que chamamos de momento magnético permanente do núcleo, ilustrado na Figura 2.

Figura 2- Momento magnético permanente originado pela distribuição de carga sobre a superfície esférica do núcleo, quando este se encontra em movimento em torno de seu próprio eixo, gerando um pequeno campo magnético.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta forma, para uma distribuição assimétrica de prótons e nêutrons no núcleo, isto é, o próton apresentando um número par e o nêutron um número ímpar, ou vice-versa, o núcleo apresentará *spin* nuclear semi-inteiro, distribuição de carga com simetria esférica e propriedades de dipolo magnético. Se o núcleo apresentar número ímpar de ambos os constituintes, apresentará *spin* nuclear com valor inteiro e, caso o núcleo seja formado por número par de prótons e nêutrons ele apresentará *spin* nuclear nulo. Assim, em IRM é comumente utilizado o núcleo de hidrogênio que possui *spin* não nulo pois possui um único próton no núcleo, ilustrado na Tabela 1 e, também, pelo fato dele apresentar somente dois níveis de energia quando submetido a um campo magnético.

Tabela 1 - Abundância relativa ao isótopo mais encontrado na matéria e razão giromagnética específica de alguns núcleos comumente utilizados em experimentos de RMN e que apresentam *spin* igual a $\frac{1}{2}$.

Elemento	Abundância (%)	γ (MHz/T)
^1H	99,98	42,58
^{13}C	1,11	10,71
^{15}N	0,37	4,31
^{19}F	100	40,05
^{31}P	100	17,23

Fonte: Adaptada de HAACKE et al.²⁸

Quando um núcleo com *spin* semi-inteiro, como por exemplo no caso do átomo de hidrogênio que apresenta *spin* igual a $\frac{1}{2}$, é colocado na presença de um campo magnético externo, ocorre o desdobramento dos seus níveis energéticos, devido ao acoplamento de seu momento magnético com o campo externo, chamado de efeito Zeeman. O número de estados acessíveis ao núcleo quando na presença de um campo magnético externo segue a relação $(2s+1)$, onde s é o número do *spin* do núcleo.

Esse acoplamento entre o momento magnético do núcleo e o campo magnético externo resulta na Hamiltoniana de interação Zeeman, dada pela seguinte equação:

$$H = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} \quad (3)$$

Se expressarmos o momento magnético do núcleo de acordo com sua definição apresentada acima, equação (2), e supondo que o campo magnético externo seja constante, dado pelo valor B_0 , e aponte na direção z de um sistema de coordenadas, o Hamiltoniano de interação Zeeman se reduz à seguinte expressão:

$$H = -\gamma \hbar B_0 I_z \quad (4)$$

Disto resulta que os autovalores do operador dado pela equação acima são as respectivas energias que o sistema pode assumir, que pode ser expresso pela seguinte equação:

$$E = -\gamma \hbar B_0 m_I \quad (5)$$

onde m_I são as possíveis orientações do *spin*, correspondentes a uma dada energia e ao valor absoluto de I_z . Desta forma, obtemos o seguinte intervalo de valores possíveis para m_I :

$$m_I = \{-I, -I + 1, \dots, +I\} \quad (6)$$

que no caso do *spin* meio nos dá $m_I = \{-\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}\}$.

Como estamos considerando o núcleo de hidrogênio com *spin* $I = \frac{1}{2}$, existirão dois possíveis níveis de energia, que chamamos de paralelo e antiparalelo em relação ao campo externo, dados por:

$$E_- = -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (7)$$

$$E_+ = +\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (8)$$

Esta situação pode ser observada na Figura 3 onde, na ausência de campo magnético, esses *spins* estão aleatoriamente orientados no espaço e seus níveis de energia são degenerados. Com a imposição de um campo magnético externo,

ocorrerá o acoplamento desses momentos magnéticos nucleares com o campo magnético, resultando no desdobramento dos níveis de energia do núcleo. Apesar da ilustração mostrar um alinhamento completo dos *spins* nucleares com relação ao campo magnético, fato que ocorreria no zero absoluto de temperatura, eles precessionam, paralela ou antiparalelamente em torno da direção do campo externo, devido à energia térmica.

Figura 3 - Representação dos níveis energéticos de núcleos com *spin* $\frac{1}{2}$. Na ausência de campo magnético, os *spins* estão aleatoriamente distribuídos na matéria e os níveis energéticos são degenerados. Com a imposição de um campo magnético externo, ocorrerá o acoplamento dos *spins* com o campo, resultando no desdobramento dos níveis energéticos dos núcleos, que tenderão a se alinhar paralela ou antiparalelamente em relação a direção do campo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta forma, para que haja uma transição entre esses estados energéticos acessíveis aos núcleos, devemos fornecer uma certa quantia de energia, cujo valor é bem determinado. Assim, podemos obter o valor de separação dos níveis energéticos pela seguinte diferença:

$$\Delta E \equiv E_+ - E_- = \gamma\hbar B_0 \quad (9)$$

e, como excitamos o sistema através de ondas eletromagnéticas, para a energia desses fótons, obtemos:

$$\Delta E \equiv \hbar\omega_0 \quad (10)$$

Como supomos que esses fótons devem ter a mesma energia que a separação dos níveis para que sejam capazes de promover a excitação e, conseqüentemente, a transição entre esses estados, obtemos a seguinte relação, a partir da comparação entre as equações (9) e (10):

$$\hbar\omega_0 = \gamma\hbar B_0 \quad (11)$$

ou, de forma equivalente e sem perda de generalidade:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (12)$$

A expressão dada acima é conhecida por frequência de precessão de Larmor, que é de fundamental importância para Ressonância Magnética, pois diz qual deve ser a frequência da radiação que promoverá a transição entre os estados energéticos do núcleo, dependendo somente da razão giromagnética do núcleo e da intensidade do campo. No nosso caso, utilizamos um aparelho de Ressonância Magnética que opera com um campo magnético de valor $B_0 = 2T$, produzido por uma bobina supercondutora. Assim, como estamos interessados na ressonância dos núcleos de hidrogênio presentes na amostra, utilizando o valor da razão giromagnética apresentada na Tabela 1, notamos que a frequência de excitação que promoverá a transição entre os estados energéticos dos núcleos de hidrogênio será de:

$$f_0 \approx 85,2 \text{ MHz} \quad (13)$$

Se olharmos para todo o espectro eletromagnético veremos que essa frequência se encontra na região das ondas de rádio, por isso, falamos em excitação de radiofrequência ou pulsos de radiofrequência (RF), que pode ser verificado na Figura 4.

Figura 4 - Espectro eletromagnético com destaque para a região das ondas de rádio, que são utilizadas para promover a transição entre os estados energéticos dos núcleos de hidrogênio, sob um campo de 2T.

Fonte: Adaptada de HASHIMOTO.²⁹

Vale lembrar que, mesmo em uma pequena amostra, como é o caso das sementes, pode haver uma infinidade de núcleos disponíveis para o processo de formação das imagens por Ressonância Magnética, próximo do número de Avogadro. Após a imposição do campo magnético externo sobre a amostra, esses núcleos estarão alinhados paralela ou antiparalelamente ao campo, de forma que haverá uma diferença entre as populações de *spins* que se encontram no estado de mais alta energia, antiparalelo ao campo, e mais baixa energia, paralelo ao campo. Essa razão pode ser obtida a partir da distribuição estatística de Boltzmann,³⁰ de forma que:

$$\frac{N_-}{N_+} = e^{-\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)} \quad (14)$$

onde N_- representa a fração de *spins* que apontam na direção do campo, N_+ a fração de *spins* que apontam na direção contrária ao campo, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Para valores típicos, por exemplo em um campo de $2T$ e uma temperatura de $T = 300\text{ K}$, o valor dessa diferença da população de *spins* é da ordem de 10^{-6} , isto é, apenas um *spin* dentre um milhão será utilizado para a geração das imagens, ou uma parte por milhão (ppm).

Por outro lado, como observado na definição da frequência de precessão de Larmor, apresentada na equação (12), podemos adotar um tratamento clássico para melhor compreender o comportamento da dinâmica do conjunto de *spins* quando sujeitos a um campo magnético, visto que quantidades quânticas, como a constante de Planck ($\hbar$), desapareceram no resultado. A Figura 5 ilustra a interação do momento magnético do núcleo com o campo magnético.

Figura 5 - Movimento de precessão nuclear na presença de um campo magnético externo. Além do núcleo girar sobre seu próprio eixo, este também precessiona na direção do campo externo devido a energia térmica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como observado na Figura 5, o campo magnético externo produz um torque sobre o momento magnético do núcleo. Sendo esse torque normal tanto ao vetor momento magnético quanto ao vetor campo magnético, resultará na constante mudança de direção do momento magnético do núcleo, fazendo com que este precesse em torno da direção do campo magnético externo.²³ Este resultado pode ser expresso da seguinte maneira:

$$\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B} \quad (15)$$

Da mecânica clássica, sabemos que o torque pode ser expresso como a variação temporal do momentum angular, como apresentado na equação (1), de forma que temos:

$$\boldsymbol{\tau} = \frac{d}{dt} \boldsymbol{S} \quad (16)$$

Assim, igualando as equações (15) e (16), com auxílio da equação (2), podemos reescrever a equação do movimento desse sistema da seguinte maneira:

$$\frac{d}{dt} \boldsymbol{\mu} = -\gamma \boldsymbol{B} \times \boldsymbol{\mu} \quad (17)$$

Supondo que o campo magnético externo exista somente ao longo da direção z e que o momento magnético do núcleo possa ser escrito como um vetor arbitrário no espaço, podemos resolver, de forma simples, o produto vetorial expresso do lado direito da equação, que nada mais é do que o seguinte determinante:

$$\begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ 0 & 0 & B_0 \\ \mu_x & \mu_y & \mu_z \end{vmatrix} = (\mu_y B_0) \hat{i} - (\mu_x B_0) \hat{j} \quad (18)$$

Dado o desenvolvimento do determinante, podemos reescrever a equação (17), explicitando as componentes x, y e z do vetor momento magnético, obtendo o seguinte conjunto de equações:

$$\frac{d}{dt} \mu_x = -\omega_0 \mu_y \quad (19)$$

$$\frac{d}{dt} \mu_y = \omega_0 \mu_x \quad (20)$$

$$\frac{d}{dt} \mu_z = 0 \quad (21)$$

Para resolver este sistema de equações basta tomarmos a primeira delas, equação (19), aplicar novamente a derivada temporal e, substituir na equação (20), de forma que:

$$\frac{d^2}{dt^2} \begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \end{pmatrix} + \omega_0^2 \begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \end{pmatrix} = 0 \quad (22)$$

Agora, no momento inicial, antes de ligarmos de fato o campo magnético externo, podemos considerar que o vetor momento magnético possa ser expresso da seguinte forma:

$$\mu(t=0) = \mu_{x0} \hat{i} + \mu_{y0} \hat{j} + \mu_{z0} \hat{k} \quad (23)$$

Assim, aplicando esta condição inicial e resolvendo a expressão (22), obtemos a seguinte expressão para o vetor momento magnético, para um tempo arbitrário qualquer e diferente de zero:

$$\mu(t) = (\mu_{x0} \cos(\omega_0 t) + \mu_{y0} \sin(\omega_0 t)) \hat{i} + (\mu_{x0} \sin(\omega_0 t) - \mu_{y0} \cos(\omega_0 t)) \hat{j} + (\mu_{z0}) \hat{k} \quad (24)$$

Vemos nesta expressão que a componente do momento magnético nuclear que é perpendicular ao campo externo está precessionando em torno dele com a frequência de Larmor, como na expressão (12) e a componente z (paralela ao campo) permanece constante.

1.2 Magnetização de Voxel

Até aqui descrevemos o efeito causado pela presença do campo magnético sobre um único núcleo isolado. Desta forma, é necessário analisar o efeito causado pelo campo magnético sobre um conjunto de *spins*, presentes em uma amostra macroscópica, pois, na prática, existe um grande número de núcleos úteis em um

pequeno volume do objeto de estudo, devido ao fato de considerarmos naquele elemento de volume o número de Avogadro. Como vimos pela estatística de Boltzmann, dada pela equação (14), estes *spins* se arranjarão paralela ou antiparalelamente ao campo magnético, de forma que apenas uma pequena parcela deles contribuirá de fato para o fenômeno de Ressonância Magnética, e consequentemente para a formação da imagem.

Usaremos o termo *voxel* quando nos referirmos a um elemento de volume sobre o objeto, idealmente homogêneo em sua composição, e cuja densidade de magnetização de prótons representará o brilho do pixel na imagem por Ressonância Magnética. Ele é composto por um grande número de prótons, onde cada um apresenta um momento magnético dado por μ_i . Desta forma, é interessante caracterizá-los através do seu comportamento macroscópico, dado pela resultante da soma vetorial dos momentos magnéticos de todo o conjunto *de spins*, ou magnetização.

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_i \vec{\mu}_i \quad (25)$$

Se nenhum campo magnético é aplicado, esses momentos magnéticos estarão aleatoriamente distribuídos de forma que a magnetização resultante é zero, sobre todo o volume da amostra. Com a aplicação de um campo magnético, de acordo com que foi obtido acima, o conjunto *de spins* tenderá a se alinhar ao campo externo, de forma que a componente transversal de cada momento magnético estará girando em torno do campo com a mesma frequência, porém com fases completamente distintas, no equilíbrio térmico, resultando em uma magnetização transversal líquida nula:

$$M_T = 0 \quad (26)$$

Já, a componente do momento magnético ao longo do campo externo pode ser paralela ou antiparalela a ele. Para uma temperatura T , devido à agitação térmica, ambas as orientações existirão com uma pequena fração excedente da ordem de $\left(\frac{\mu B_0}{k_B T}\right)$ na direção de menor energia, isto é, paralela ao campo. Disto resulta uma magnetização de equilíbrio, longitudinal ao campo, dada por:

$$M_L \equiv M_0 = N\mu \frac{\mu B_0}{k_B T} \quad (27)$$

A Figura 6 ilustra melhor os argumentos apresentados:

Figura 6 - Magnetização macroscópica representada em um sistema de coordenadas. No equilíbrio térmico, a magnetização longitudinal surge devido a uma pequena fração de núcleos que precessionam na direção do campo. A magnetização transversal é nula devido a não coerência de fase entre as suas diversas componentes, que estão precessionando com fases distintas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta forma, esse conjunto de *spins* pode ser excitado, como veremos adiante, levando esse sistema para uma condição fora do equilíbrio, aonde mudamos os valores de M_T e M_L apresentados acima na condição de equilíbrio térmico. Neste caso é observado que essas quantidades retornam exponencialmente para suas condições de equilíbrio, aonde M_T retorna com uma constante de tempo T_2 e, M_L retorna com uma constante de tempo T_1 , conhecidas como tempos de relaxação transversal e longitudinal, respectivamente.

1.3 Sistema de coordenadas

Consideraremos aqui o efeito da combinação de campos magnéticos, um sendo o campo magnético externo e estático e outro um campo de radiofrequência, produzido por um conjunto de bobinas, de forma que o movimento dos momentos magnéticos imersos nesses campos será discutido em termos do referencial do

laboratório e de um referencial girante. Veremos também que esse movimento é mais efetivo na condição de ressonância, quando a frequência do campo magnético oscilante está situada na frequência de Larmor.

Vimos que a interação do momento nuclear com um campo magnético resulta no movimento de precessão daquele com relação ao campo. Aplicando um campo oscilante perpendicular ao campo magnético estático por um período de tempo finito resultará na precessão dos momentos magnéticos, que inicialmente estão alinhados na direção do campo magnético estático, em torno da direção do campo oscilante. Essa rotação fará com que os momentos percorram um ângulo em relação à direção do campo estático e produzam uma componente de magnetização no plano transverso, em relação à direção do campo estático.

Desta forma, adotaremos um sistema de coordenadas girante (SG), com versores dados por (i', j', k') , cuja origem seja idêntica com a origem do sistema de coordenadas fixas do laboratório (SL), cujos versores são dados por (i, j, k) .²⁸ Suporemos também que $z' = z$ e que a frequência de rotação do referencial *linha* em relação ao referencial *sem linha* seja dada por Ω . A Figura 7 ilustra esse comportamento, onde o campo magnético externo e estático aponta para fora da folha de papel.

Figura 7 - Sistema de coordenadas girante (com linha) em relação ao sistema de coordenadas do laboratório (sem linha) onde, por simplicidade, adotamos que os eixos z e z' apontam na mesma direção.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta forma, podemos escrever o vetor momento magnético em ambos os referenciais, dado que as expressões resultantes representam a mesma quantidade. Sendo assim, tanto no referencial do laboratório quanto no referencial girante, o vetor momento magnético é dado, respectivamente, por:

$$\boldsymbol{\mu}(t) = \mu_x(t)\hat{i} + \mu_y(t)\hat{j} + \mu_z(t)\hat{k} \quad (28)$$

$$\boldsymbol{\mu}'(t) = \mu_{x'}(t)\hat{i}'(t) + \mu_{y'}(t)\hat{j}'(t) + \mu_{z'}(t)\hat{k}'(t) \quad (29)$$

Agora, tomando a derivada temporal dos vetores apresentados acima, suprimindo a dependência explícita do tempo, temos:

$$\frac{d}{dt}\boldsymbol{\mu} = \frac{d\mu_x}{dt}\hat{i} + \frac{d\mu_y}{dt}\hat{j} + \frac{d\mu_z}{dt}\hat{k} \quad (30)$$

$$\frac{d}{dt}\boldsymbol{\mu}' = \frac{d\mu_{x'}}{dt}\hat{i}' + \frac{d\mu_{y'}}{dt}\hat{j}' + \frac{d\mu_{z'}}{dt}\hat{k}' + \mu_{x'}\frac{d\hat{i}'}{dt} + \mu_{y'}\frac{d\hat{j}'}{dt} + \mu_{z'}\frac{d\hat{k}'}{dt} \quad (31)$$

Considerando um vetor genérico $\mathbf{V}$ que está no repouso no referencial girante de coordenadas, sabemos que a variação temporal de suas coordenadas com relação às coordenadas do referencial do laboratório, pela frequência de rotação $\boldsymbol{\Omega}$ definida acima, é:

$$\frac{d}{dt}\mathbf{V} = \boldsymbol{\Omega} \times \mathbf{V} \quad (32)$$

Assim, os versores no referencial girante de coordenadas podem ser escritos da forma como apresentada acima, e da nossa imposição de que as equações (28) e (29) representam a mesma quantidade, igualando as equações (30) e (31), obtemos:

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \left(\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt}\right)' + \boldsymbol{\Omega} \times \boldsymbol{\mu} \quad (33)$$

onde definimos a seguinte quantidade:

$$\left(\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt}\right)' = \frac{d\mu_{x'}}{dt}\hat{i}' + \frac{d\mu_{y'}}{dt}\hat{j}' + \frac{d\mu_{z'}}{dt}\hat{k}' \quad (34)$$

Se utilizarmos o resultado encontrado na seção anterior deste texto, a saber, a equação (17), reduzimos a equação (33) para:

$$\left(\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt}\right)' = -\gamma(\mathbf{B}_{ef} \times \boldsymbol{\mu}) \quad (35)$$

que é análoga à equação do movimento do momento magnético nuclear em torno do campo magnético externo, com a diferença que aqui temos um campo magnético efetivo dado por:

$$\mathbf{B}_{ef} = \mathbf{B} + \frac{\boldsymbol{\Omega}}{\gamma} \quad (36)$$

Esse campo magnético efetivo é essencial para a determinação do movimento de precessão nuclear e o conceito chave na análise do momento magnético em geral. Um caso especial que merecem destaque é aquele em que $\frac{\Omega}{\gamma} = -\mathbf{B}$, de forma que teremos $\left(\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt}\right)' = 0$, isto é, o vetor momento magnético visto no referencial girante de coordenadas é um vetor constante. Por outro lado, quando $\mathbf{B} = B_0\hat{z}$, vemos que o vetor momento magnético gira no referencial do laboratório, formando um ângulo fixo com o eixo z , e com uma velocidade angular constante dada por $\boldsymbol{\Omega} = -\gamma B_0\hat{z}$, que é o caso mais comum.

1.4 Excitação de radiofrequência

Para entendermos o efeito dos pulsos de radiofrequência devemos voltar ao conjunto de equações dadas por (26) e (27), que são as componentes de uma magnetização resultante da soma vetorial da distribuição dos momentos magnéticos nucleares com relação à imposição de um campo magnético externo, de forma que esta seja diretamente proporcional aos momentos magnéticos, ponderada pelo volume. Assim, esperamos que o vetor magnetização $\mathbf{M}$ seja regido pelas mesmas equações diferenciais apresentadas para o vetor $\boldsymbol{\mu}$, pois a resultante longitudinal representa a fração de *spins* que apontam na direção do campo e a componente transversal aparece numa condição fora de equilíbrio, devido a uma excitação de RF. Porém essa magnetização se encontra no repouso no equilíbrio térmico, de forma que nenhuma informação a respeito do objeto de estudo possa ser extraída.

Por isso, se faz necessária a aplicação de um segundo campo magnético em uma direção perpendicular à direção adotada pelo campo externo e estático B_0 . Esse campo magnético de radiofrequência é um campo oscilante e linearmente polarizado onde adotamos duas componentes circularmente polarizadas de amplitude B_1 e que giram em sentidos opostos, como pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 - Decomposição de um campo oscilante e linearmente polarizado em duas componentes circularmente polarizadas que giram em sentidos opostos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pela ilustração podemos expressar as componentes do campo magnético oscilante, no referencial do laboratório, da seguinte maneira:

$$\mathbf{B}_1^- = B_1(\cos(\omega t) \hat{i} + \sin(\omega t) \hat{j}) \quad (37)$$

$$\mathbf{B}_1^+ = B_1(\cos(\omega t) \hat{i} - \sin(\omega t) \hat{j}) \quad (38)$$

onde $\mathbf{B}_1^-$ e $\mathbf{B}_1^+$ são as componentes do campo oscilante que giram no sentido anti-horário e horário, respectivamente, e com frequências de valor ω e sentidos opostos. Agora, escrevendo essas componentes no referencial girante de coordenadas, e definindo que $\Omega = -\omega k$, temos:

$$\mathbf{B}_1^- = B_1(\cos(2\omega t) \hat{i}' + \sin(2\omega t) \hat{j}') \quad (39)$$

$$\mathbf{B}_1^+ = B_1 \hat{i}' \quad (40)$$

Portanto, como fizemos com que o campo principal esteja ao longo da direção z e que o campo de radiofrequência fosse aplicado em uma direção perpendicular ao campo principal, vemos que a superposição destes campos resulta em:

$$\mathbf{B} = \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma}\right) \hat{k}' + B_1 \hat{i}' \quad (41)$$

Aqui o índice “+” do campo B_1 foi suprimido devido ao fato de apenas uma das componentes apresentadas acima (B_1^+) ser efetiva no movimento de precessão da magnetização que está em repouso com relação a esta, enquanto a outra (B_1^-) gira no sentido contrário com dobro da frequência, de forma que possa ser desprezada.²⁸

Lembrando que a frequência do referencial girante em relação ao referencial do laboratório é dada por $\Omega = -\omega k$, podemos reescrever a equação (35), da seguinte forma:

$$\left(\frac{d\mu}{dt}\right)' = -\gamma \left[\left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma}\right) \hat{k}' + B_1 \hat{i}' \right] \times \mu \quad (42)$$

Vemos que, na condição de ressonância, quando $\omega = \omega_0 = \gamma B_0$, somente o termo transversal contribui para o campo magnético efetivo, de forma que o momento magnético somente sentirá o efeito do campo B_1 . De uma forma geral, na condição de ressonância, a magnetização vista do referencial girante de coordenadas precessionará perpendicularmente em torno do eixo x' com uma frequência dada por $\omega_1 = \gamma B_1$, como pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 - Comportamento do vetor magnetização, no referencial girante de coordenadas, na condição de ressonância. Neste caso, a magnetização somente sente os efeitos do campo B_1 , que precessiona perpendicularmente em relação a sua direção. Podemos controlar o quanto a magnetização gira tanto pela intensidade de B_1 como também pelo tempo de atuação do campo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos determinar o quanto a magnetização girou em torno deste campo, quantidade essa que leva o nome de *ângulo de flip* e representa a criação de uma componente transversal de magnetização, uma situação que só ocorre numa condição fora de equilíbrio, associada ao aumento da energia interna do conjunto de *spins* devido ao campo de RF. O ângulo criado pela imposição de um campo de radiofrequência perpendicular ao campo magnético externo pode ser dado pela seguinte integral:

$$\theta(t) = \int_0^t \omega_1(t') dt' \quad (43)$$

em que $\omega_1(t') = \gamma B_1(t')$. Se esse campo for aplicado em um pequeno intervalo de tempo τ e com uma intensidade constante ao longo deste período, isso implicará uma rotação em torno de x' de:

$$\Delta\theta = \gamma B_1 \tau \quad (44)$$

e, como foi dito acima, isto implica na criação de uma componente transversal de magnetização dada por $M_T = M_0 \sin(\Delta\theta)$, de forma que esse ângulo pode ser controlado tanto pela intensidade do campo de RF aplicado como também pelo tempo de duração do pulso.

Aqui vale frisar duas situações que são particularmente importantes que são pulsos quando a magnetização é sujeita a um ângulo de flip de $\Delta\theta = 90^\circ$, chamado de pulso de excitação ou pulso $\pi/2$. O segundo caso é quando a magnetização inverte seu valor de equilíbrio, saindo de M_0 e indo até $-M_0$ pela aplicação de um pulso com ângulo de flip de $\Delta\theta = 180^\circ$, conhecido como pulso de inversão ou pulso π . Vemos ambas as situações na Figura 10.

Figura 10 – Casos especiais da aplicação dos pulsos de radiofrequência. Na esquerda, é mostrado um pulso de excitação, onde toda a magnetização é levada para o plano transversal. Na direita, temos um pulso de inversão, em que a magnetização inverte seu valor em relação a condição de equilíbrio térmico. Neste caso, nenhuma componente de magnetização transversal é observada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5 Resposta de RMN: Free Induction Decay ou FID

Depois de termos compreendido o processo de atuação dos pulsos de RF, juntamente com a presença de um campo magnético externo, devemos entender qual é a resposta que os *spins* irão nos fornecer, lembrando que os pulsos de RF levam o sistema para uma condição de não equilíbrio, que naturalmente retorna ao seu estado inicial, com a magnetização apontando na direção do campo externo. Os pulsos de RF podem ser gerados por um conjunto de bobinas capaz de promover a excitação do vetor magnetização, que é alimentada com uma corrente capaz de gerar campos na faixa de RF, principalmente próximo da frequência de ressonância de Larmor.

Imediatamente após a aplicação de um pulso de RF, digamos um pulso $\pi/2$, toda a magnetização normal ao campo externo B_0 e igual à magnetização de equilíbrio M_0 está presente em cada elemento de volume dv , ou *voxel*, e que apresentará um momento dado por $M_T(t)dv$. Após o término do pulso, essa magnetização começará a precessionar no plano transversal na frequência de Larmor, de forma que se definirmos o valor inicial dessa magnetização por $M_T(0)$ e usando notação complexa para representar esse vetor no plano complexo, podemos escrever, após um tempo t que:

$$M_T(t) = M_T(0) \exp(i\omega t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (45)$$

onde o último termo representa a relaxação dos *spins*, que será explicada nas próximas seções.

A magnetização de cada *voxel* se assemelha a um pequeno ímã que gira na frequência de Larmor e cujo movimento de precessão resultará no surgimento de uma força eletromotriz no espaço que circunda a amostra. O fluxo de indução que produz essa força pode ser interceptado por uma distribuição geométrica de condutores que constitui uma bobina de RF. A força eletromotriz, atuando nos elétrons do condutor, produz então uma diferença de potencial (voltagem) induzida nos terminais da bobina de recepção.³¹ Essa voltagem decrescente que surge nos terminais da bobina constitui a resposta de RMN, ou o *Free Induction Decay* (FID), cuja frequência de precessão é a frequência de Larmor e cuja magnitude depende da densidade de magnetização. Um caso geral pode ser observado na Figura 11, que representa um sinal de RMN após um pulso de excitação.

Figura 11 - Sinal característico observado em um experimento de RMN, resultado de uma força eletromotriz induzida na bobina receptora.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora todas as suposições até aqui tenham sido feitas considerando o campo magnético principal como perfeitamente homogêneo, na prática isso não ocorre e temos que considerar aqui as pequenas flutuações que ocorrem com o campo como função da posição. Devido ao fato da frequência de precessão dos momentos magnéticos ser proporcional ao campo magnético externo, como vimos na equação (12), e considerando que este campo não é perfeitamente homogêneo em toda uma região de interesse, o conjunto de *spins* do objeto sentirá diferentes intensidades de campo e com isso precessionará com frequências ligeiramente distintas, fato que afeta a densidade de magnetização total. Para uma determinada parcela de *spins* que estão precessionando com a mesma frequência, isto é, que localmente estão sob a influência da mesma intensidade de campo, dá-se o nome de *isocromata*.

1.6 Equações de Bloch

Antes de entrarmos na discussão dos fenômenos responsáveis por levar o sistema excitado de volta à condição inicial de equilíbrio térmico, faremos uma breve

apresentação das equações de Bloch e suas suposições para justificar o efeito da relaxação que é observado após o término do pulso de radiofrequência.

Assim, se aplicarmos um pulso de excitação, a magnetização originalmente presente exclusivamente na direção paralela ao campo pode ser levada para o plano transversal, onde começará a precessionar e, após um determinado tempo de evolução é observado o retorno exponencial desta para a condição inicial. Por isso, no ano de 1946, Bloch sugeriu um conjunto de termos que deveriam ser acrescentados na equação que descreve a evolução da magnetização, utilizando argumentos fenomenológicos que descrevem a evolução dos momentos magnéticos quando excitados, na presença de um campo magnético externo.³² Assim as equações que descrevem a evolução da magnetização, vista no referencial do laboratório, podem ser expressas na seguinte forma:

$$\left(\frac{dM_{x'}}{dt}\right)' = \Delta\omega M_{y'} - \frac{M_{x'}}{T_2} \quad (46)$$

$$\left(\frac{dM_{y'}}{dt}\right)' = -\Delta\omega M_{x'} + \omega_1 M_z - \frac{M_{y'}}{T_2} \quad (47)$$

$$\left(\frac{dM_z}{dt}\right)' = -\omega_1 M_{y'} + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (48)$$

onde fizemos que $\Delta\omega = (\omega_0 - \omega)$, e termos que levam essas quantidades representam contribuições fora de ressonância, representando desvios da condição ideal devido à não homogeneidade no campo estático ou variações nos pulsos de RF. Já as quantidades constantes e definidas por T_1 e T_2 são conhecidas, respectivamente, por tempos de relaxação longitudinal e transversal.

Por outro lado, essas mesmas equações vistas do referencial girante ganham outra forma, em que é mais fácil visualizar a perda de magnetização da componente transversal e a consequente recuperação da magnetização na direção longitudinal ao campo principal, de forma que:

$$M_T(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (49)$$

$$M_L(t) = M_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right] \quad (50)$$

Na Figura 12 temos os gráficos da evolução dessas componentes de magnetização vistas do referencial girante para um caso geral.

Figura 12 – Comportamento das componentes do vetor magnetização quando sujeito a um pulso de radiofrequência de excitação. A componente transversal (esquerda), após um certo tempo, retorna ao seu valor nulo no equilíbrio térmico, enquanto que a componente longitudinal se recupera e volta ao seu valor inicial M_0 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.7 Mecanismos de Relaxação

Dado um pulso de excitação na magnetização de um determinado objeto de interesse, devido ao aumento da energia interna do sistema e à presença do campo magnético principal, é natural observar que o vetor magnetização retorne à sua condição de equilíbrio inicial, dissipando a energia absorvida pela excitação de RF. Desta forma, para justificarmos esse retorno, devemos considerar que a magnetização irá sofrer certos processos para retornar a sua condição inicial, denominados aqui de relaxação, onde ressaltamos a relaxação longitudinal ou também relaxação *spin-rede*, que ocorre com um tempo característico definido por T_1 e, uma outra relaxação na direção transversal ou relaxação *spin-spin*, com um tempo característico definido por T_2 .

No processo de relaxação na direção longitudinal podemos fazer considerações a respeito da energia do sistema, onde a equação (3), nos mostra que a energia associada ao sistema é dada pelo negativo do produto escalar entre o momento magnético dos núcleos com o campo principal, resultando em que os núcleos tendam a se alinhar com a direção do campo, estabelecendo uma condição de mínimo de energia. Devido a isto, uma vez que a magnetização é levada ao plano transversal pela aplicação do pulso de RF, esta retorna exponencialmente à condição de equilíbrio térmico, devido à dissipação desta energia dos núcleos em seu próprio meio, ou rede.

O outro processo de relaxação que ocorre na direção transversal é devido à interação entre um núcleo e seus vizinhos próximos, considerando o campo dipolar associado com o que cada um deles produz localmente. Disto acarreta que uma vez estando no plano transversal os núcleos começam a perder coerência de fase devido a estas interações e, desta maneira, a magnetização transversal é constantemente reduzida, decaindo para seu valor nulo no equilíbrio térmico.

Esse processo de diminuição da componente da magnetização na direção transversal, resultado da defasagem das *isocromatas* no plano transversal, é uma consequência da combinação dos efeitos da interação entre os núcleos presentes com os efeitos da inhomogeneidade do campo principal, onde cada *isocromata* não experimenta um campo perfeitamente homogêneo, levando a uma distribuição de frequências de precessão $\Delta\omega$. Devido a isto, a perda de magnetização efetivamente observada, resultado da soma desses dois fatores, é caracterizada por uma terceira grandeza definida por T_2^* . Em todos os experimentos de Ressonância Magnética, seja ele realizado em espectroscopia ou imagem é observado que $T_1 > T_2 > T_2^*$.

É importante salientar aqui a diferença entre essas duas defasagens, uma contribuição intrínseca, dada pela relaxação T_2 devido a flutuações internas dos campos magnéticos e associada a interações aleatórias, enquanto que T_2^* resulta da evolução da fase dos *spins* sob condições desconhecidas mas bem definidas, dadas pela variação da intensidade do campo externo sobre a posição individual de cada núcleo. Desta forma, o processo T_2^* é um processo reversível e isso torna possível a realização do seguinte experimento, que leva à observação do fenômeno conhecido como *spin echo*, ou ecos de *spin*.³³

Um experimento desta maneira pode ser conduzido pela aplicação de um pulso de excitação e, após um tempo τ , é aplicado um pulso de inversão, onde observaremos primeiramente um sinal cujo envelope depende da constante de tempo T_2^* . Após a ocorrência desta sequência de pulsos um outro sinal surgirá, em consequência da criação de uma coerência de fase entre os *spins* da amostra, crescendo até atingir um máximo e decrescendo até desaparecer, de forma que este máximo do sinal produzido estará localizado no instante de tempo dado por 2τ .

Figura 13 - Ilustração do fenômeno dos ecos de spins. Em (a) ocorre a excitação através do pulso de RF. Após o término do pulso, a magnetização começa a sentir os efeitos da inhomogeneidade de campo, perdendo coerência de fase (b). Após um tempo τ é aplicado o pulso de inversão para que ocorra a refocalização das *isocromatas* (c). As *isocromatas* continuam a evoluir (d) e simetricamente em relação ao tempo τ , ocorre o surgimento de um eco (e). O sistema continua evoluindo (f), e se nada for feito, este retorna para a condição de equilíbrio térmico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Logo após o término do pulso de excitação (a), todas as *isocromatas* que compõem a componente de magnetização na direção transversal começarão a sofrer as influências da inhomogeneidade do campo externo e começarão a precessionar com frequências distintas, fato que acarreta uma perda de coerência de fase entre elas (b). Com a aplicação do pulso de inversão (c), as *isocromatas* são refletidas no plano transversal e uma nova coerência de fase começa a surgir (d) até atingir um máximo de coerência e, conseqüentemente, máxima amplitude de magnetização transversal após o evento dos pulsos (e), e por fim tem-se novamente a perda de coerência de fase até que a magnetização no plano transversal desapareça devido aos mecanismos de relaxação (f).

1.8 Codificação de Frequência: Imagem Unidimensional

Para a construção de uma imagem gerada por RMN é necessário, no mínimo, de uma projeção bidimensional da densidade nuclear dos núcleos que formam a amostra. E para se obter isso é necessário que se faça uma codificação espacial destes núcleos, fato que é alcançado com o auxílio de campos magnéticos adicionais que variam linearmente no espaço de forma bem definida, chamados de gradientes de campo magnético.

Como foi mostrado no início deste tópico, a equação de Larmor nos mostra uma dependência explícita entre a frequência de precessão do núcleo e o campo magnético que este se encontra. Desta forma, uma determinada variação no campo magnético sentido pela amostra resulta em uma variação local da frequência de precessão daqueles núcleos que foram selecionados.

No caso geral, é feita uma sobreposição de campos magnéticos adicionais ao campo principal por um conjunto de bobinas de gradientes capaz de produzir variação da componente longitudinal de campo nas três direções espaciais, e cujas amplitudes variem linearmente nessas direções.

Se assim for feito, o campo resultante torna-se a superposição do campo magnético principal acrescido do gradiente aplicado em uma determinada direção ou, caso tivermos uma direção arbitrária qualquer, podemos considerar que:

$$\mathbf{B}(r) = \mathbf{B}_0 + \mathbf{G} \cdot \mathbf{r} \quad (51)$$

Desta forma também teremos uma frequência de precessão dos núcleos que compõem o objeto que também variará espacialmente, e que pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\omega(r) = \gamma(\mathbf{B}_0 + \mathbf{G} \cdot \mathbf{r}) \quad (52)$$

Nos experimentos usuais de Ressonância Magnética, uma forma bastante corriqueira de se codificar uma dimensão é através da codificação da frequência de precessão, fato que é alcançado pela utilização de um gradiente, rotineiramente chamado de gradiente de leitura e executado durante a janela de aquisição do sinal proveniente dos núcleos excitados. Assim, os momentos magnéticos presentes em diferentes porções do objeto precessionarão com frequências diferentes, tendo, desta forma, sua posição codificada pela frequência de precessão. A informação proveniente das posições dos núcleos no objeto pode ser obtida através da

aplicação da transformada de Fourier, que basicamente nos dará as amplitudes dos sinais em função das frequências de precessão.

Um exemplo bastante ilustrativo da forma como podemos obter a codificação espacial em frequência em uma dimensão é o caso dos três tubos, separados espacialmente e preenchidos com diferentes quantidades de água, quando na presença do campo magnético externo e submetidos a um gradiente de campo constante na direção em que eles estão posicionados, como podemos visualizar na Figura 14.

Figura 14 - Exemplo da codificação de frequência em uma dimensão, pela aplicação de um gradiente de campo. (a) Tubos com diferentes quantidades de água são submetidos a um campo magnético externo. (b) Sinal FID dos três tubos separados adquiridos no tempo. (c) Sinal FID composto, e aplicação da transformada de Fourier que retorna a amplitude e frequência que compõem o sinal observado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A presença do gradiente de campo na direção x , por exemplo, faz com que a frequência de Larmor dos núcleos excitados em cada tudo dependa da posição, como podemos ver na equação (52). Juntamente com isso temos também cada tudo possuindo quantidades diferentes de água, fato que resulta em um sinal de

Ressonância Magnética composto, tanto em frequência, quanto nas amplitudes de cada sinal.

Deste sinal composto obtido, pode ser feita uma separação das suas frequências de precessão em conjunto com suas respectivas amplitudes, utilizando o formalismo de Fourier, de forma que o resultado será um espectro com três picos distintos, e cujas amplitudes e posições estarão relacionadas com as respectivas quantidades de água que cada tubo possui.

1.9 Densidade de Magnetização e Resolução da Imagem

Podemos considerar agora que em vez de um conjunto de tubos contendo água, temos um objeto contínuo de tamanho finito, no qual a densidade de magnetização de equilíbrio M_0 aponte na direção z , quando o mesmo se encontra somente sob efeito do campo principal. Se considerarmos agora a aplicação de um pulso de RF de excitação, toda a magnetização da amostra é levada ao plano transversal, onde os *spins* de um determinado elemento de volume dx , localizados na posição x , possuirão uma densidade de magnetização dada por:

$$dm(x, t) = M_0(x) \exp(i\omega(x)t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) dx \quad (53)$$

Sabemos que o sinal recebido é a soma de todos os elementos de magnetização $dm(x, t)$ contidos no volume do objeto, de forma que, se tomarmos a integral da expressão acima, teremos:

$$S(t) \propto \int_x M_0(x) \exp[i\gamma(B_0 + G_x \cdot x)t] \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) dx \quad (54)$$

Como fora do objeto de interesse não temos nenhuma magnetização, de forma que $M_0(x) = 0$, podemos fazer a integração do sinal obtido sobre todo o espaço sem nenhuma perda de generalidade e, considerando o referencial de coordenadas girantes, o termo oscilante $\exp(i\gamma B_0 t)$ pode ser desprezado. Fazendo isso podemos escrever a equação acima da seguinte forma:

$$S(t) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) \exp(i\gamma G_x x t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) dx \quad (55)$$

Supondo que T_2 não depende de x e definindo uma nova variável tal que $k(t) = \gamma G_x t$, que representa o espaço do domínio das frequências espaciais, temos:

$$S(k(t)) \propto \exp\left(-\frac{k(t)}{\gamma G_x T_2}\right) \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) \exp(ik(t)x) dx \quad (56)$$

Se desprezarmos os termos de proporcionalidade, a equação (56) pode ser escrita como o produto direto de duas funções $S(k(t))=W(k(t))*G(k(t))$, tal que teremos:

$$W(k(t)) = \exp\left(-\frac{k(t)}{\gamma G_x T_2}\right) \quad (57)$$

$$G(k(t)) = \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) \exp[ik(t)x] dx \quad (58)$$

A equação (58) nada mais é do que a transformada de Fourier inversa de $M_0(x)$, onde está contida a informação que desejamos obter. Porém, o que observamos é o sinal $S(k)$ como o produto das duas funções apresentadas acima. Desta forma, se tomarmos a transformada de Fourier do sinal obtido $S(k)$ teremos o chamado Produto de Convolução entre as funções $W(k)$ e $G(k)$, tal que podemos escrever que:

$$\mathcal{F}\{S(k)\} = \mathcal{F}\{W(k) \cdot G(k)\} = \mathcal{F}\{W(k)\} \otimes \mathcal{F}\{G(k)\} \quad (59)$$

Se definirmos que $P(x)=\mathcal{F}\{W(k)\}$ e sabendo que $M_0(x)=\mathcal{F}\{G(k)\}$, pode-se reescrever a equação acima da seguinte forma:

$$\mathcal{F}\{S(k)\} = P(x) \otimes M_0(x) \quad (60)$$

Sendo assim a transformada de Fourier do sinal de Ressonância Magnética obtido resulta nas funções $P(x)$ e $M_0(x)$, onde $M_0(x)$ representa a imagem da distribuição da magnetização ao longo de todo o objeto. Já a função $P(x)$ recebe o nome de *Point Spread Function (PSF)* que, para o caso de um decaimento exponencial, nos retorna a seguinte função lorentziana:³⁴

$$P(x) \propto \frac{1}{1-(\gamma G_x T_2)^2 x^2} \quad (61)$$

Dessa função lorentziana, sabemos que a largura de linha à meia altura pode ser escrita da seguinte forma:

$$\Delta x = \frac{1}{\gamma G_x T_2} \quad (62)$$

A grandeza Δx definida na equação (62) nos diz qual será o mínimo de tamanho possível dos *pixels* da imagem, nos dando o limite para a resolução da imagem. Existe uma relação, devido às propriedades do formalismo de Fourier, entre a distância dos *pixels* da imagem resultante, definidos aqui por δx , e a máxima frequência espacial contida no sinal amostrado, $k_{máx}$, dado pelo tempo máximo de aquisição, $t_{máx}$, durante o qual temos a atuação do gradiente. Essa relação pode ser expressa como $\delta x=(k_{máx})^{-1}$ e, como definimos que $k=\gamma G_x t$ no domínio das frequências espaciais, podemos escrever:

$$\delta x = \frac{1}{\gamma G_x t_{\text{máx}}} \quad (63)$$

A condição que nos permite distinguir nitidamente dois *pixels* consecutivos é a de que a separação entre eles, δx , seja maior do que sua largura média, Δx , e que pode ser expressa pela seguinte relação dada em (64), de forma que para já considerarmos os efeitos da inhomogeneidade do campo principal, utilizaremos T_2^* ao invés de T_2 :

$$\Delta x < \delta x \Rightarrow \frac{1}{\gamma G_x T_2^*} < \frac{1}{\gamma G_x t_{\text{máx}}} \Rightarrow t_{\text{máx}} < T_2^* \quad (64)$$

Figura 15 - Condição de boa resolução para uma imagem de RM, onde a distância entre os centros de cada pixels da imagem, δx , deve ser maior do que sua largura média, Δx .

Fonte: Adaptada de PAPOTI.³⁵

Podemos notar desta equação que para se minimizar os efeitos da função *PSF* é necessário fazer com que o tempo de aquisição da imagem, $t_{\text{máx}}$, seja menor que o tempo de relaxação da componente transversal, sob a influência da inhomogeneidade do campo externo, T_2^* . Já no caso em que temos $t_{\text{máx}} \ll T_2^*$, podemos fazer a aproximação em que a equação da função *PSF* se torna uma função do tipo delta, e de acordo com o teorema de convolução, podemos reescrever:

$$P(x) \Rightarrow \delta(x) \quad (65)$$

$$M_0(x) \Rightarrow \mathcal{F}\{S(k)\} \quad (66)$$

Assim, notamos que a imagem unidimensional $M_0(x)$ é a transformada de Fourier do sinal de Ressonância Magnética adquirido $S(k)$, tal que:

$$S(k) \cong \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) \exp[ik(t) \cdot x] dx \quad (67)$$

1.10 Seletividade

As técnicas por Ressonância Magnética nos permitem fazer um mapeamento tridimensional da amostra como um todo, porém, em muitos casos de interesse, e em especial em imagens, a região de interesse que contém a informação desejada se limita apenas à aquisição de uma fatia de todo o objeto, de forma que não se faz necessário a excitação de todo o conjunto de *spins* que compõem a amostra.

Somado a isso, como a construção da imagem bidimensional de apenas uma parcela do objeto não requer a excitação de toda a magnetização que o compõe, temos uma diminuição significativa na deposição de potência sobre a amostra, como também uma economia no tempo de aquisição da imagem.

Desta forma, aplica-se os pulsos de RF seletivos em combinação com um gradiente, denominado aqui de gradiente de seleção, e designado por G_S . Os pulsos de RF seletivos são pulsos de radiofrequência modulados por uma função de tal forma que o espectro de frequência contido nele apresenta uma densidade de energia restrita a uma certa banda de frequências. Por outro lado, o gradiente de seleção é aplicado perpendicularmente ao plano que será excitado, causando uma variação linear na frequência de precessão dos *spins* que compõem aquela determinada fatia excitada. Assim, pela aplicação simultânea do pulso de RF seletivo em combinação com o gradiente de seleção, somente os *spins* cujas frequências de ressonância correspondem ao espectro determinado pelo pulso de RF serão excitados, de modo que o perfil de excitação estará diretamente ligado à transformada de Fourier da função de modulação e suas imperfeições estarão relacionadas aos efeitos da não linearidade da resposta dos *spins*.³⁶

A largura do plano selecionado é, por definição, caracterizado pela largura a meia altura do perfil de excitação determinado. Assim, sua espessura Δz , pode ser dada por:

$$\Delta z = \frac{\Delta \omega}{\gamma G_S} \quad (68)$$

Vemos na equação acima que, devido ao fato de γ ser uma constante para cada espécie nuclear, a espessura do plano selecionado é definida pela intensidade do gradiente de seleção aplicado, G_S , em combinação com a largura de banda de excitação do pulso de RF.

1.11 Codificação de Fase: Imagem Bidimensional

A codificação do sinal de Ressonância Magnética no caso bidimensional não pode ser alcançada somente pela variação da frequência de precessão dos núcleos através da aplicação de um gradiente de campo que dependa unicamente da posição nas duas dimensões espaciais, por exemplo, $B(x,y)$, pois desta forma o que teríamos seria uma variação de campos que resultaria novamente em um gradiente unidimensional. A solução para este problema consiste em fazer com que haja um gradiente de campo que atue em diferentes instantes de tempo, fazendo com que o campo magnético efetivo dependa tanto da posição quanto do tempo. Assim, o campo magnético passa a ser função da posição e do tempo, possibilitando a criação de um vetor gradiente que varia em amplitude, como função do tempo, com as componentes dadas por:

$$G_x(t) = \left. \frac{\partial B_0^z}{\partial x} \right|_t, G_y(t) = \left. \frac{\partial B_0^z}{\partial y} \right|_t, G_z(t) = \left. \frac{\partial B_0^z}{\partial z} \right|_t \quad (69)$$

O conjunto de bobinas responsáveis por gerar tais gradientes de campo magnético são as bobinas de gradientes.³⁷ Assim, a expressão que determina o campo magnético, que depende tanto das coordenadas espaciais como do tempo, pode ser escrita da seguinte forma:

$$B(\vec{r}, t) = B_0 + \vec{r} \cdot \vec{G}(t) \quad (70)$$

Isso resulta, de acordo com a equação de Larmor, dada por (12), em uma frequência de precessão dos *spins* que também depende do espaço e do tempo, que pode ser escrita como:

$$\omega(\vec{r}, t) = \omega_0 + \gamma \vec{r} \cdot \vec{G}(t) \quad (71)$$

A fase acumulada para um determinado *voxel* de magnetização em um dado instante de tempo qualquer após a excitação pode ser representada por:

$$\Theta(\vec{r}, t) = \int_0^t \omega(\vec{r}, t') dt' = \omega_0 t + \gamma \vec{r} \cdot \int_0^t \vec{G}(t') dt' \quad (72)$$

Aqui podemos novamente definir o vetor $\mathbf{k}$ no domínio das frequências em uma nova expressão mais geral, tal que:

$$\vec{k}(t) = \gamma \int_0^t \vec{G}(t') dt' \quad (73)$$

Se realizarmos novamente todo o desenvolvimento matemático aplicado ao caso unidimensional, que aqui foge ao escopo deste trabalho, mas que pode ser encontrado em detalhes em Callaghan³² e Tannús,³⁸ chegaremos na seguinte expressão para o sinal resultante, onde a condição $\gamma GT_2^* \gg k_{m\acute{a}x}$ foi utilizada:

$$S(\vec{k}(t)) \cong \int_V M_0(\vec{r}) \exp[i\vec{r} \cdot \vec{k}(t)] dv \quad (74)$$

Com isso, para a obtenção de imagens em mais que uma dimensão por RMN, é necessário que se conheça o sinal $S(k)$, que é apresentado no espaço de fase, ou *espaço-k*, onde toda a informação proveniente da aquisição está contida.

Finalmente, a magnetização resultante no caso bidimensional $M(x,y)$ pode ser obtida tomando a transformada de Fourier em ambas as direções de codificação. Para efeito de exemplo, consideraremos o caso de três tubos, contendo diferentes quantidades de água, analisado em duas dimensões. Na Figura 16 podemos ver o sinal de RMN adquirido no *espaço-k* codificado tanto em frequência como em fase (a). Em (b), vemos o sinal após a aplicação da transformada de Fourier na direção de codificação de frequências e, em (c), o mesmo sinal após a transformada de Fourier na direção de codificação de fase, de forma que recuperamos a distribuição da magnetização bidimensional do objeto, sendo representada pela intensidade dos *pixels*, em escala de cinza, como é apresentado em (d).

Figura 16 – Imagem bidimensional codificada em frequência (eixo x) e fase (eixo y), sem aplicação do gradiente de seleção. (a) *Espaço-k* dos dados adquiridos no tempo. (b) Transformada de Fourier na direção de frequência. (c) Transformada de Fourier na direção de fase. (d) Intensidade do sinal adquirido em escala de cinza.

Fonte: Adaptada de PAIVA.³⁹

1.12 Sequência Gradiente Eco

A construção de uma imagem por Ressonância Magnética necessita da execução de uma série de determinados eventos que, por exemplo, pode ser a aplicação de pulsos de RF para a excitação do conjunto de *spins* de forma a se gerar sinais detectáveis e a codificação do sinal observado através da aplicação de gradientes de campo, cuja duração e o momento em que ocorrem são muito bem determinados. Para esses conjuntos de eventos, damos o nome de sequência de pulsos.

Existe uma grande variedade de sequências de pulsos muito bem estabelecidas para a aplicação em imagens por Ressonância Magnética, cada uma com sua especificidade. Uma delas, que foi usada para a aquisição das imagens desta pesquisa, e que será brevemente discutida nessa seção, é a sequência denominada de gradiente eco.⁴⁰

Diferentemente da sequência de ecos de *spin*, que utiliza dois pulsos de radiofrequência, um de excitação e outro para a refocalização do conjunto de *spins*, a sequência gradiente eco é baseada na aplicação de somente um pulso de RF para a excitação, geralmente em um ângulo muito inferior a 90° , em combinação com um gradiente de leitura reverso, de forma que a área líquida, em relação a intensidade dos gradientes, seja nula no momento da obtenção do sinal, no tempo ao eco (TE). Isso possibilita o uso de tempos de repetição (TR) e tempos ao eco curtos, diminuindo assim o tempo de aquisição das imagens.

Pela aplicação de somente um pulso de RF para a excitação do conjunto de *spins*, a sequência gradiente eco utiliza o sinal diretamente do FID para produzir a imagem. Com isso, efeitos como inomogeneidades de campo e susceptibilidade magnética não podem ser evitados, de forma que influenciarão o sinal adquirido, assim como o contraste na imagem. Como resultado, a intensidade do sinal na sequência gradiente eco decresce rapidamente de forma que é necessária a aplicação de tempos ao eco curtos para se ter sinal suficiente no momento da aquisição.⁴¹

A sequência gradiente eco consiste da saturação progressiva da componente longitudinal da magnetização, de forma a atingir um estado de equilíbrio, denominado de estado estacionário, após a aplicação de alguns pulsos de RF. Tal estado é atingindo na condição em que $TR \gg T_2$, de tal forma que toda a magnetização transversal foi relaxada antes da aplicação de um novo pulso de RF. Entretanto, como a magnetização longitudinal não foi completamente recuperada de seu valor inicial M_0 , após algumas repetições da sequência, uma nova magnetização de equilíbrio é gerada, o estado estacionário.⁴²

A intensidade do sinal na imagem por RM será determinada pela magnetização do estado estacionário M_E atingida que pode ser convertida em sinal detectável, e que pode ser calculada a partir da equação de Ernst:⁴³

$$M_E = M_0 \frac{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)}{1 - \cos \theta \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)} \quad (75)$$

Na expressão acima θ representa o *ângulo de flip*. O sinal pode ser maximizado, para um dado valor de TR e T_1 usando o ângulo de Ernst, que é dado por $\theta = \arccos\left(\exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)\right)$.

1.13 Microtomografia Computadorizada

A microtomografia computadorizada, comumente denominada de micro-TC, é uma técnica que nos permite a criação de imagens com alta resolução, da ordem micrométrica, de seções transversais de um determinado objeto, de forma não destrutiva. O princípio básico que governa o funcionamento do microtomógrafo de raios X baseia-se nas propriedades dos materiais em absorverem essa radiação de forma diferenciada, dependendo principalmente de sua composição química e de sua densidade.⁴⁴⁻⁴⁵

A radiação X pode ser produzida artificialmente por meio da aceleração de um feixe de elétrons que vai de encontro com um material metálico de alto número atômico. Disso resulta uma radiação eletromagnética caracterizada por uma alta frequência, pequeno comprimento de onda e elevado poder de penetração. A quantidade mais elementar que constitui qualquer tipo de radiação eletromagnética é designada por fóton. Desta forma, o feixe de raios X corresponde ao conjunto de fótons que foram gerados com o bombardeamento de elétrons de alta energia cinética sobre o metal. A atenuação está diretamente ligada à redução da intensidade do feixe incidente, conforme ele atravessa a matéria e que, nesse caso, pode ocorrer absorção ou dispersão da radiação pelo meio atenuador.

Para uma análise satisfatória dos resultados que podem ser extraídos pela micro-TC, é necessário que compreendamos os conceitos de atenuação das ondas eletromagnéticas, quando estas atravessam um determinado meio. Tanto a radiografia tradicional, como a microtomografia computadorizada, baseiam-se na equação da atenuação, que estabelece que a intensidade da radiação medida pelo detector é proporcional ao número de fótons presentes na radiação do feixe. Esta intensidade obrigatoriamente diminui quando o feixe atravessa os meios materiais, antes de ser coletada no detector, de forma que a redução na intensidade medida pelo detector ao atravessar o meio material pode ser expressa por:⁴⁶

$$I = I_0 \exp(-\alpha \cdot x) \quad (76)$$

Na expressão (76), I_0 representa a intensidade do feixe medida sem o elemento atenuador, I a intensidade medida após o elemento atenuador, α é o coeficiente de atenuação linear e x determina a espessura do elemento atenuador. Devido a isso, quando os raios X atravessam a amostra, eles são atenuados em

diferentes intensidades, dependendo das diferenças entre os coeficientes de atenuação linear do meio. Já para a absorção do feixe de raios X, os principais responsáveis são a densidade e o número atômico efetivo que compõem o objeto de estudo.

As imagens realizadas pela técnica tradicional de radiografia já foram amplamente usadas nas últimas décadas. Entretanto, sua projeção em um único plano do material analisado gera uma sobreposição de estruturas que, na maioria dos casos, acaba suprimindo determinadas informações de interesse. Na tomografia computadorizada é feita uma reconstrução matemática dos dados adquiridos das várias projeções de raios X que foram coletadas da amostra, através de retroprojeção, para a produção de cortes transversais, perpendiculares à dimensão axial do objeto analisado.

Sendo assim, a tomografia computadorizada torna possível produzir uma imagem que se aproxima do objeto real, por apresentar a atenuação média de cada pequeno elemento de volume, de forma a ordenar a informação proveniente da atenuação do feixe de raios X e traduzindo a informação de forma quantitativa, com uma precisão superior àquelas obtidas pelas técnicas convencionais.

Os tomógrafos convencionais têm como componentes básicos uma fonte de raios X, um arranjo detector e um sistema de rotação. Os equipamentos mais antigos possuíam geometria do feixe de raios X em paralelo, onde a fonte realiza movimentos de rotação e translação. Com a criação da geometria do feixe em leque não existe mais a necessidade do movimento de translação da fonte com a consequente diminuição do tempo de varredura, possibilitando a visualização de pequenos objetos. O advento da geometria cônica do feixe de raios X juntamente com um arranjo de múltiplos detectores permitiu a reconstrução de vários cortes tomográficos em uma única varredura, desde que o objeto reconstruído atinja todo o detector.⁴⁷⁻⁴⁸

Figura 17 – Desenho ilustrativo do arranjo e funcionamento de um tomógrafo de raios X, onde é apresentado a fonte de raios X, o arranjo dos detectores e uma base giratória. A imagem tridimensional é obtida através da interpolação das diversas imagens bidimensionais adquiridas da amostra.

Fonte: <http://www.shimadzu.com.br/>.

Apesar do grande aperfeiçoamento dos equipamentos que são atualmente utilizados para a micro-TC, a técnica ainda não está isenta de artefatos de interferência, sendo o ruído um dos principais problemas que interfere na capacidade do tomógrafo em representar o objeto.⁴⁹⁻⁵⁰ Os diversos coeficientes de atenuação que compõem determinada amostra podem dificultar na diferenciação de certas partes do objeto, o que causa uma limitação na resolução da densidade final. Esse fato representa o ruído que surge na imagem, gerando um aspecto granuloso.

Com relação ao espalhamento dos raios X, o problema surge na dificuldade do detector distinguir entre um fóton primário, originado na fonte, e um fóton disperso. Os artefatos do tipo listras e anéis são principalmente devido a problemas nos detectores. Caso os detectores não estejam intercalibrados com precisão, ou não sejam equivalentes, a projeção posterior de cada anel de dados será diferente, produzindo múltiplos anéis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descreveremos os materiais utilizados nos experimentos realizados durante a execução deste trabalho, equipamentos desenvolvidos e utilizados, assim como os detalhes de seu funcionamento. Em seguida, apresentaremos as curvas de teor de água que levaram aos protocolos finais de Ressonância Magnética e o desenvolvimento de bobinas dedicadas para a aquisição de imagens em sementes.

Para este trabalho foram estudadas sementes de Soja do cultivar RBL8307RR e de Milho do híbrido 2B604PW, que foram fornecidas pelos colaboradores do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ - USP. O processo de inoculação dos fungos foi realizado em dezembro de 2014, por colaboradores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, também da ESALQ - USP, que multiplicaram os fungos em meios de cultura e posteriormente separaram os esporos que foram diretamente aplicados nas sementes.

Na ocasião, foram utilizadas para os experimentos de imagem, que envolveram Ressonância Magnética, microtomografia computadorizada e raios X, 10 sementes de Soja e 10 sementes de Milho, totalizando 20 sementes. Destas, 16 sementes foram inoculadas com fungos típicos de armazenamento, sendo 8 com o fungo *Aspergillus spp.* e 8 com o fungo *Penicillium spp.* As 4 sementes restantes formavam o grupo de controle. A Tabela 2 mostra como foi feita a identificação das sementes.

Tabela 2 - Distribuição das sementes utilizadas nos experimentos de Imagem. As sementes foram organizadas em três grupos, arranjos por danos mecânicos associados com a inoculação do fungo *Penicillium spp.*, danos mecânicos associados com a inoculação do fungo *Aspergillus spp.* e controle, no qual não foi feito nenhum dano ou a inoculação por fungos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Soja	X	X	X	X					X	X	X	X					X	X		
Milho					X	X	X	X					X	X	X	X			X	X
Aspergillus									X	X	X	X	X	X	X	X				
Penicillium	X	X	X	X	X	X	X	X												
Controle																	X	X	X	X

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1 Canhão pneumático e tambor de hidratação

Foi necessário o desenvolvimento de um equipamento que pudesse provocar as injúrias mecânicas nas sementes, para a obtenção de diferentes níveis de danos nas sementes, com relação à posição espacial em que ocorriam no seu interior, como por exemplo, próximo ao eixo embrionário. Essas fraturas também podem ser locais de acesso aos fungos que foram inoculados, fato que pode acelerar o processo de ação e deterioração dos tecidos internos.

O canhão pneumático consiste de uma caixa de madeira fechada, cujas dimensões são 40 x 25 x 37 cm e as paredes internas contém frisas para a fixação do anteparo, que consiste de uma placa metálica onde são arremessadas as sementes. As paredes internas foram forradas com espuma para que se evitassem colisões secundárias das sementes, as quais poderiam causar ruptura do tegumento das sementes de Soja ou fraturas com perda de parte das sementes no Milho, permitindo somente a colisão com o anteparo, posicionado à frente do bico ejeter das sementes. Esse equipamento utilizado é semelhante ao descrito por GOMES JUNIOR, F. G.⁵¹ As sementes são arremessadas contra o anteparo através de um regulador de pressão da marca Arprex, modelo AF1, que opera até a pressão de 8 bar ou 120 psi.

Figura 18 - Imagem do canhão pneumático, utilizado para simular danos mecânicos nas sementes. (A) Imagem frontal, mostrando o regulador de pressão à esquerda da caixa e a gaveta na parte inferior. (B) Imagem superior, mostrando a entrada das sementes, o bico ejeter e o anteparo metálico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As sementes foram arremessadas contra o anteparo, posicionado a 10 cm da saída do bico ejeter, com uma pressão de 40 psi, resultando uma velocidade média

de 30 m/s, com o bico de saída podendo ser trocado de forma a se adequar ao tamanho das sementes utilizadas. No fundo da caixa foi feita uma gaveta para que, após a passagem de todas as sementes, essas pudessem ser coletadas com mais facilidade.

O equipamento para a hidratação das sementes consiste de um suporte de madeira com dimensões de 50 x 30 x 17 cm, um tambor de acrílico cilíndrico de 12 cm de diâmetro por 22 cm de comprimento, dois temporizadores da marca Full Gauge, modelo TEMPUS02-01P-12086, sendo um responsável pelo controle do tempo de hidratação das sementes e o outro para o controle do tempo de abertura da válvula de água, um motor de passo da marca Synchronous, modelo 49TYJ, que opera na faixa de 5 a 6 rotações por minuto e, um reservatório de água acoplado com um ejetor de água adaptado. Um equipamento semelhante é descrito por Warren, J. E. e Bennett, M. A.⁵²

Figura 19 - Imagem do equipamento de hidratação das sementes. (A) Vista frontal, onde o temporizador da esquerda marca o tempo de hidratação e o da direita controla a abertura/fechamento do sistema de água. (B) Imagem superior, mostrando o tambor de acrílico com o motor de passo a esquerda e o reservatório de água a direita.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse equipamento foi utilizado para a obtenção das curvas de hidratação das sementes de Soja e de Milho, discutidos nesse capítulo. As sementes foram hidratadas por um período de 24 horas com a condição de que a cada hora era acrescentado 1 ml de água e as medidas foram feitas nos intervalos de 0, 8, 16 e 24 horas, sendo a medida de hora zero realizada no início do experimento, com as sementes nas suas condições normais.⁵³ Uma das dificuldades da utilização desse equipamento foi a homogeneização do leque de água, quando foi utilizada uma

micro agulha com a ponta amassada em sua extremidade, a fim de se conseguir distribuir a maior quantidade de água possível sobre as sementes.

2.2 Desenvolvimento de bobinas dedicadas

Inicialmente, na primeira etapa, as aquisições deste trabalho foram realizadas com uma bobina já muito bem estabelecida no laboratório, e dedicada para o estudo de pequenos animais, que constitui-se de uma bobina do tipo sela cruzada, instalada sobre um cano PVC, cujas dimensões do volume útil são de 37 mm de diâmetro por 74 mm de comprimento, satisfazendo as dimensões da cabeça de pequenos roedores.⁵⁴ Na figura 20 temos uma imagem da bobina, juntamente com o conjunto de blindagem de RF, que nada mais é do que um condutor recobrindo a bobina com o papel de minimizar as interações entre a bobina de RF, as bobinas de gradientes e a bobina de *shimming*, além de reduzir a captação de ruído proveniente de fontes externas.

Figura 20 - Bobina tipo Sela Cruzada, dedicada para o estudo de pequenos animais, juntamente com seu suporte e a blindagem de RF, responsável pelo isolamento da região da bobina em relação as bobinas de gradientes e a bobina de *shimming*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Posteriormente, na segunda etapa, notou-se a possibilidade de desenvolver uma bobina que melhor atendesse as dimensões das sementes, de forma que pudesse diminuir a distância da bobina ao objeto, ter um ganho na relação sinal-ruído (RSR),⁵⁵ uma diminuição no tempo de aquisição e uma significativa melhora na qualidade das imagens. Assim, foi construída uma bobina do tipo solenoide, que atende perfeitamente às condições desejadas, além de produzir um campo bem

homogêneo no seu interior,⁵⁶ permitindo uma excitação efetiva de toda a amostra, além de ter a vantagem de poder ser inserida no interior do magneto, de forma transversal ao campo externo, sem nenhuma adaptação da blindagem de RF e dos suportes existentes.

Ainda, pelo fato de ser uma bobina de fácil construção e configuração, foram desenvolvidas duas bobinas com diâmetros internos diferentes, uma para as sementes de Soja, com diâmetro interno de 8 mm, e outra para as sementes de Milho, com diâmetro interno de 10 mm. Ambas foram construídas com um fio de cobre AWG 36 com 5 voltas e dois capacitores variáveis para a calibração do *matching* e *tuning*. Na figura 21 apresentamos uma imagem com as bobinas finais utilizadas para a aquisição das imagens das sementes.

Figura 21 - Bobinas tipo Solenoide, projetadas para a aquisição dedicada de imagens em sementes de Milho e Soja. (A) Visão lateral, destacando o diâmetro interno das bobinas, que são distintos justamente para atender ao tamanho das sementes. (B) Vista superior, destacando o circuito elétrico que foi implementado na construção das bobinas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.3 Experimentos de Relaxometria e Ressonância Magnética

As medidas de relaxometria foram realizadas utilizando um magneto minispec da empresa Bruker na frequência de operação de 19,9 MHz, utilizando um espectrômetro LapNMR da empresa Tecmag. O número de médias aplicadas nos experimentos foi de 32, com o tempo de espera de 3 s entre cada média. O tempo de amostragem (também denominado *dwell time*) foi de 8 μ s e a duração dos pulsos de excitação e refocalização (ou pulsos de 90° e 180°, respectivamente) foi de 12 μ s e 24 μ s. O número de ecos utilizados nessas aquisições foi de 8000, com tempo

entre cada eco de 200 μ s. A aquisição dos sinais dos ecos foi centrada entre cada par de pulsos de 180°, com uma duração de 128 μ s. A Figura 22 ilustra o esquema da sequência de pulsos utilizada.

Figura 22 - Sequência de pulsos utilizada para os experimentos de Relaxometria das sementes, onde a primeira barra vertical à esquerda representa o pulso de excitação e as demais barras subsequentes são os pulsos de refocalização da magnetização no plano transversal, gerando diversos ecos que reduzem sua intensidade devido à atuação dos mecanismos de relaxação.

Fonte: Cedida por Rodrigo de Oliveira Silva.

O fenômeno de relaxação envolve decaimentos ou recuperações da magnetização, quando relacionados aos experimentos de RMN. Quando temos mais que uma componente no sinal observado, como no caso das sementes de Milho e Soja que apresentam sinais provenientes de água e do óleo, temos os decaimentos multi-exponenciais, que podem ser descritos através de uma transformada de Laplace:⁵⁷

$$F(t) = \mathcal{L}[g(s)](t) = \int_0^{\infty} g(s) \exp(-ts) ds \quad (77)$$

Na expressão (77), $F(t)$ está associado ao sinal de RMN e $g(s)$ com a distribuição dos tempos de relaxação. A obtenção da distribuição dos tempos de relaxação é alcançada a partir da versão discreta da solução da equação apresentada acima, pois o conjunto de dados da RMN é discreto, de forma que:

$$F(t_i) = \mathcal{L}[f(s)](t_i) = \sum_{j=0}^N g(s_j) k(t_i, s_j) \quad (78)$$

Um conjunto de dados da magnetização adquiridos em um experimento de RMN pode ser expresso na seguinte forma:

$$M(t_i) = \sum_{j=0}^N g(s_j) k(t_i, s_j) + \epsilon_i \quad (79)$$

Aqui, $k(t_i, s_j)$ é denominado núcleo, sendo representado por uma função conhecida e ϵ_i caracteriza um ruído branco, devido à própria eletrônica dos equipamentos utilizados. A partir disso, o procedimento de inversão deste conjunto

de dados consiste na minimização da equação dos mínimos quadrados, que é definida por:

$$\chi^2 = \|M(t) - F(t)\|^2 \quad (80)$$

Devemos nos atentar ao fato que $g(s)$ admite infinitas soluções que minimizam a equação acima e, por isso, é necessário a imposição de penalidades e um vínculo de não negatividade para $g(s)$.⁵⁸

Desta forma, podemos reescrever a equação (79) com base nas componentes de relaxação de interesse, ou seja, para um sinal proveniente de um experimento denominado *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG)⁵⁹⁻⁶⁰ temos:

$$m(t_i) = \sum_{j=1}^N g(T_{2j}) \exp\left(-\frac{t_i}{T_{2j}}\right) + \epsilon_i \quad (81)$$

As imagens de Ressonância Magnética foram adquiridas utilizando um magneto supercondutor horizontal com campo de 2T da Oxford Instruments, modelo 85310HR, que opera em conjunto com um espectrômetro Bruker Avance III (Bruker-BioSpin, Inc., Billerica, MA, EUA), um sistema de banda larga de 2 a 400 MHz com dois canais de transmissão, ¹H e X (outros núcleos que não o hidrogênio), quatro canais de recepção, ¹H, X ou qualquer combinação entre eles, aquisição paralela em quatro canais, fontes de gradientes de 300V/200A, 12 canais de *shimming*, gradientes de 16 Gauss/cm, dois amplificadores de radiofrequência de 1 e 2 kW, respectivamente ¹H e X. Para a operação desta instrumentação o software utilizado foi o Paravision 5.1.

A aquisição das imagens por Ressonância Magnética foi realizada com a sequência *Fast-Low Angle Shot 3D* (FLASH-3D),⁴¹ para as duas geometrias de bobinas. Os parâmetros implementados nesta sequência para cada tipo de receptor são apresentados na Tabela 3. As imagens adquiridas foram tratadas com auxílio do software *ImageJ*, com licença gratuita.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para aquisição das imagens de RM. Para a bobina tipo S. Cruzada o FOV foi ajustado de acordo com o posicionamento das sementes no suporte de isopor, utilizado para posicionar as sementes no centro geométrico da bobina. Para a bobina tipo Solenoide o FOV foi fixado pelo tamanho da maior semente, que no caso é a semente de Milho.

	S. Cruzada (Soja)	S. Cruzada (Milho)	Solenoide
T Eco (ms)	3,3	3,3	3,3
T. Repetição (ms)	100	100	100
Médias	32	32	8
T. Aquisição (min)	60	68	20
Ângulo de flip (°)	45	45	45
FOV (mm³)	20 x 15 x 7,5	25 x 17 x 7,5	12 x 12 x 8
Matriz	100 x 75 x 15	125 x 85 x 15	96 x 96 x 16
Resolução (µm³)	200 x 200 x 500	200 x 200 x 500	125 x 125 x 500

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, na primeira etapa de experimentos, após um período de três meses da inoculação dos fungos nas sementes, foram realizadas as aquisições das imagens por Ressonância Magnética e microtomografia computadorizada nas sementes em condições normais de armazenamento, como também por raios X. Após isso, na segunda etapa de aquisição das imagens, após três meses das primeiras aquisições, repetiu-se novamente o processo com as sementes nas mesmas condições. Também foram selecionadas três sementes de cada espécie, sendo as sementes 1, 10 e 17 para a Soja e as sementes 6, 13 e 19 para o Milho, para cada tipo de fungo e uma controle, para se fazer aquisições com as sementes hidratadas, onde as sementes de Milho foram hidratadas por um período de 4 horas, enquanto as sementes de Soja por um período de 3 horas (tempo suficiente para atingir teor de água próximo de 15 %).

2.4 Experimentos de microtomografia computadorizada e raios X

A técnica de microtomografia computadorizada possibilita a formação de imagens com alta resolução das seções transversais de um objeto, com a característica de ser não destrutiva. O princípio fundamental de funcionamento do microtomógrafo de raios X consiste na propriedade dos materiais em absorverem

esta radiação incidente de forma completamente distinta entre os diversos tecidos do objeto, dependendo de sua composição química e densidade.⁴⁴

Diferentemente do que ocorre com uma simples imagem por raios X, a microtomografia cria virtualmente, através do processamento dos dados obtidos, o objeto de estudo em um conjunto de fatias (ou tomos), que são apresentados na forma de imagens bidimensionais, que ainda podem ser compostas de modo a recriar o objeto de forma tridimensional.⁴⁵ Por exemplo, no caso das sementes de Soja, foi possível observar locais onde existia a ruptura do tegumento, tornando-se locais de acesso ao interior da semente pelos fungos inoculados, como também tecidos internos deteriorados pela presença do patógeno. No Milho, observamos claramente as fraturas nas sementes que foram causadas pelo canhão pneumático, de forma que é possível avaliar toda sua extensão e profundidade, como também a posição em relação ao eixo embrionário.

As imagens de microtomografia computadorizada foram adquiridas com o auxílio do Dr. Paulo Renato Orlandi Lasso, utilizando o microtomógrafo da empresa SkyScan, modelo 1172, instalado no Laboratório de Técnicas Nucleares da Embrapa Instrumentação, em São Carlos, SP. No processo de aquisição das imagens foram implementados os seguintes parâmetros: resolução espacial de 6,68 μm , passo de rotação de 0,2°, rotação total de 180°, 5 *frames* para o número de médias, voltagem e corrente do feixe de raios X de 59 kV e 167 μA , respectivamente. Não foram utilizados filtros para a aquisição das imagens. O processo de reconstrução dos cortes tomográficos foi realizado por meio do *software* NRecon, versão 1.6.9, da SkyScan, onde foram adotados os seguintes parâmetros para as imagens: *smoothing* 2, *ring artifact correction* 15 e *beam hardening correction* de 60 %. Nas Figuras 23 e 24, são apresentados o equipamento utilizado e a forma de posicionamento das sementes dentro do microtomógrafo. As imagens de microtomografia computadorizada adquiridas foram tratadas com auxílio do *software* DataViewer, de licença gratuita.

Figura 23 - Microtomógrafo SkyScan, modelo 1172, instalado no laboratório de Técnicas Nucleares e AFM na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Instrumentação, em São Carlos/SP.

Fonte: Adaptada de LASSO.⁴⁴

Figura 24 - Posicionamento das sementes no interior do microtomógrafo, sob à base giratória do equipamento, juntamente com uma fita para fixação das amostras, evitando artefatos de movimento: (A) Semente de Milho; (B) Semente de Soja.

Fonte: Cedida por Francisco Guilhien Gomes Junior.

Paralelamente à aquisição das imagens por Ressonância Magnética e microtomografia computadorizada, as sementes também foram radiografadas pelo Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, utilizando o equipamento digital Faxitron X-ray, modelo MX-20 DC12, instalado no Laboratório de Análise de Imagens do

Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, campus de Piracicaba, SP.

Na análise radiográfica, cada semente foi posicionada a 11,4 cm da fonte de emissão de raios X, utilizando o equipamento ilustrado na Figura 25. As sementes foram fixadas sobre uma folha de acetato transparente, com dimensões de 210 x 297 mm, utilizando uma fita dupla face. Posteriormente, as sementes foram individualizadas em microtubos de plástico do tipo *Eppendorf* contendo um orifício de 1 mm de diâmetro na tampa. As radiografias foram realizadas em conjunto com as aquisições de Ressonância Magnética e microtomografia computadorizada, após 3 meses da inoculação dos fungos e 3 meses após a primeira aquisição de imagens, em condições normais de armazenamento.

Figura 25 - Equipamento de raios X digital Faxitron X-ray, modelo MX-20 DC12, instalado no Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, em Piracicaba/SP.

Fonte: Cedida por Francisco Guilhien Gomes Junior.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os resultados aqui apresentados foram realizados em quatro etapas. Primeira, foi feita a calibração das bobinas desenvolvidas e testes de absorção e perda de água pelas sementes. Segunda, a realização do experimento de Relaxometria para a avaliação da distribuição dos tempos de relaxação das sementes, em condições seca e hidratada. Terceira, a aquisição de imagens de sementes secas com a bobina tipo Sela Cruzada. Quarta, a aquisição de imagens de sementes secas e hidratadas com a bobina tipo solenoide.

A aquisição das imagens consistiu de sementes intactas e sementes com injúrias mecânicas associadas com inoculação de fungos de armazenamento dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

3.1 Resultados preliminares: calibração das bobinas e hidratação das sementes

A caracterização e sintonia para a frequência de 85,2 MHz, como também o casamento da impedância em 50Ω das bobinas de RF é fundamental para que se evite perdas de potência por reflexão durante a transmissão e para maximizar a relação sinal-ruído durante a recepção do sinal de RMN.⁶¹

A sintonia e o acoplamento é determinado medindo o parâmetro S_{11} de reflexão.⁶² Os resultados são apresentados na Figura 26 (na carta de Smith e em escala logarítmica), que são medidas diretas observadas com o *Network Analyzer* da empresa *Agilent Technologies*, modelo E5061A, ajustado na frequência de 85,2 MHz com *span* de 20 MHz.

Figura 26 - Imagem capturada da tela do Network Analyzer, mostrando a Carta de Smith (Amarelo) que fornece a impedância complexa e escala logarítmica (azul) da medida de S_{11} , para todas as bobinas utilizadas, na frequência de 85,2 MHz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Destas imagens, obtemos os valores do coeficiente de reflexão (S_{11}) expressos em dB para a frequência de 85,2 MHz, como também os valores da parte real e imaginária da impedância complexa para cada bobina, mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Coeficiente de reflexão S_{11} e valores da parte real e imaginária da impedância complexa em 85,2 MHz. É esperado que o valor da parte real da impedância complexa fique próximo de 50Ω o que mostra o casamento de impedância da bobina com o restante da eletrônica do sistema de RM, e que a parte imaginária da impedância complexa fique próxima de zero na condição de ressonância.

	S_{11} (dB)	Re {Z} (Ω)	Im {Z} (Ω)
Milho	-34,2	49,7	1,9
Soja	-34,7	51,7	$-696,7 \times 10^{-3}$
Animais	-55,5	50,1	148×10^{-3}

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro fator adquirido foi o fator de qualidade (Q), que nos permite avaliar as perdas existentes na bobina, como, por exemplo, os tipos de condutores empregados na construção da bobina, que apresentam uma resistência intrínseca, a interação magnética com o campo próximo da bobina, que geram correntes induzidas e representam dissipação da potência transmitida.

Assim, tanto para a medida do fator de qualidade, quanto para a medida da relação sinal-ruído, foi utilizado um *phantom* esférico de vidro com diâmetro de 7 mm, preenchido com água e sulfato de cobre. O fator de qualidade foi medido com a bobina vazia (Q_v), ou seja, sem a presença do *phantom*, e carregada (Q_c), com o *phantom*. Também foi medido o deslocamento da frequência das duas situações consideradas. Os resultados são apresentados na Tabela 5, tendo sido obtidos em bancada.

Tabela 5 - Fator de Qualidade das bobinas vazias, isto é, sem nenhuma amostra presente (Q_v), carregadas (bobina mais amostra) com um pequeno *phantom* esférico preenchido com água com sulfato de cobre (Q_c) e deslocamento em frequência (Δf). É esperado que, quanto maior o acoplamento da amostra com a bobina, exista uma queda no fator de qualidade e um maior deslocamento em frequência.

	Q_v	Q_c	Δf (KHz)
Milho	156	144	70
Soja	146	143	60
Animais	110	110	10

Fonte: Elaborada pelo autor.

Vemos na Tabela 5 que não existe nenhuma mudança no fator de qualidade para a bobina de animais com ou sem a presença do *phantom*, indicando pouco acoplamento entre o objeto e a bobina. Também podemos notar o volume do *phantom* comparado com o volume útil da bobina, de forma que a amostra está muito distante das fontes que captarão o sinal de RMN, acarretando em uma imagem de baixa qualidade e mais granulada.

As medidas da relação sinal-ruído⁶³ foram obtidas utilizando a sequência *Multi-Slice Multi Echo* (MSME) com os seguintes parâmetros: TR = 1000 ms; TE = 14 ms; TA = 4 minutos; FOV (campo de visão) = 3 x 3 cm²; Matriz = 256 x 256 e; Resolução = 117 x 117 μm^2 . Para a obtenção de valores satisfatórios, foi feito uma pequena ROI (região de interesse) no centro do *phantom*, para que se evitasse

artefatos, como de volume parcial, nas bordas no objeto. Os cálculos foram feitos utilizando a expressão (82):

$$RSR = \frac{\bar{S} - \bar{R}}{\sigma_R} \quad (82)$$

Na equação acima, $\bar{S}$ representa a média do sinal da ROI medida na região da imagem que contém o objeto, $\bar{R}$ é a média do ruído obtido em uma posição distante do objeto e sem artefatos e, σ_R é o desvio padrão do ruído obtido na mesma ROI que foi medido a média do ruído. Aqui, também foi observada a quantidade de potência utilizada na sequência MSME para os pulsos de 90° e 180°, medidas em dB e em Watts. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Relação sinal-ruído (RSR) e medidas de potência, em dB e W, utilizada em cada bobina para a aplicação dos pulsos de 90° e 180° com a sequência MSME. O aumento da relação sinal-ruído, ou seja, da sensibilidade da bobina, causou uma redução na potência necessária para a geração dos pulsos de RF.

	RSR	90° (dB)	90° (W)	180° (dB)	180° (W)
Solenoide Milho	428	74,7	$1,02 \times 10^{-5}$	64,7	$1,02 \times 10^{-4}$
Solenoide Soja	648	77,2	$5,72 \times 10^{-6}$	67,2	$5,72 \times 10^{-5}$
Sela Cruzada	29	33,2	$4,79 \times 10^{-1}$	23,2	$4,79 \times 10^0$

Fonte: Elaborada pelo autor.

$$dB = 10 \log \frac{P_0}{P} \quad (83)$$

A transformação da potência de dB para Watts foi feita utilizando a expressão (83), onde P_0 representa o canal de potência utilizado no espectrômetro, de forma que a bobina do tipo sela cruzada utilizou o canal de 1000 W, enquanto as bobinas dedicadas do tipo solenoide utilizaram o canal de 300 W. Abaixo mostramos as imagens da sequência MSME utilizadas para fazer os cálculos da relação sinal e ruído em que: Figura 27 é a bobina Sela Cruzada, Figura 28 é a bobina de Milho e na Figura 29 é a bobina de Soja.

Figura 27 - Imagem do phantom esférico obtida com a bobina tipo Sela Cruzada. É possível notar uma granulação na imagem devido à distância entre a bobina e a amostra, resultando em uma pequena relação sinal-ruído (RSR).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 - Imagem do phantom esférico obtida com a bobina tipo Solenoide para as sementes de Milho. Com a diminuição da distância entre bobina e amostra, resultando em um aumento da relação sinal-ruído, temos uma imagem mais nítida do objeto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 - Imagem do phantom esférico obtida com a bobina tipo Solenoide para as sementes de Soja. O aumento da relação sinal-ruído também causou uma redução significativa no ruído de fundo, de forma que a imagem mostra somente o sinal proveniente da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os experimentos de relaxometria foram realizados em conjunto com o tambor de hidratação, de forma que para a amostragem, foram marcadas 10 sementes, num conjunto de 100 g de cada espécie de semente. Esse conjunto foi colocado no tambor de hidratação, onde as sementes foram hidratadas por um período de 24 horas, sendo feita a medida de relaxometria a cada intervalo de 8 horas. Para cada medida foi feita a pesagem das sementes, a fim de se determinar posteriormente o teor de água em que a semente se encontrava no instante em que as medidas de relaxometria foram feitas, para que se pudesse analisar uma relação entre a quantidade de água presente e os tempos de relaxação obtidos.

Todas as medidas de massas foram realizadas utilizando uma balança da marca Sartorius, de modelo TE214S, com precisão de 0,001 g.

Na Tabela 7 apresentamos os valores de massa e teor de água para as sementes de Milho, lembrado que o valor fixo de 9,3 para o teor de água (base úmida) no início do experimento foi determinado pelo método da estufa a $(105 \pm 3) ^\circ\text{C}$,⁶⁴ e considerado para todas as sementes.

Tabela 7 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor, sendo as medidas adquiridas em intervalos de 8 horas.

Milho	0 Hora	% água	8 Horas	% água	16 Horas	% água	24 Horas	% água
1	0,377	9,3	0,410	16,60	0,425	19,54	0,464	26,31
2	0,438	9,3	0,473	16,01	0,487	18,43	0,525	24,33
3	0,432	9,3	0,470	16,63	0,483	18,88	0,524	25,22
4	0,404	9,3	0,435	15,76	0,451	18,75	0,488	24,91
5	0,433	9,3	0,464	15,36	0,481	18,35	0,519	24,33
6	0,406	9,3	0,437	15,73	0,451	18,35	0,486	24,23
7	0,431	9,3	0,462	15,39	0,477	18,05	0,513	23,80
8	0,390	9,3	0,418	15,38	0,432	18,12	0,464	23,77
9	0,390	9,3	0,418	15,38	0,433	18,31	0,465	23,93
10	0,435	9,3	0,464	14,97	0,479	17,63	0,514	23,24

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 30 é apresentado o teor de água das sementes de Milho em função do tempo de hidratação das sementes. As barras indicam o erro padrão da média.

Figura 30 - Teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor. O gráfico mostra os valores do teor de água médio para cada intervalo de 8 horas de hidratação. O teor de água inicial é fixado para todas as sementes como sendo o mesmo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O próximo passo foi realizar o mesmo procedimento de medida considerando agora as sementes de Soja. Na Tabela 8 são apresentados os valores de massa e teor de água adquiridos ao longo do experimento. O teor de água inicial das sementes era de 7,8 %, também determinado pelo método da estufa.

Tabela 8 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor, com medidas realizadas a cada intervalo de 8 horas.

Soja	0 Hora	% água	8 Horas	% água	16 Horas	% água	24 Horas	% água
1	0,177	7,8	0,194	15,88	0,209	21,92	0,226	27,79
2	0,177	7,8	0,196	16,74	0,217	24,80	0,230	29,05
3	0,195	7,8	0,212	15,19	0,231	22,17	0,247	27,21
4	0,223	7,8	0,243	15,39	0,259	20,62	0,282	27,09
5	0,207	7,8	0,222	14,03	0,242	21,13	0,257	25,74
6	0,175	7,8	0,190	15,08	0,207	22,05	0,221	26,99
7	0,188	7,8	0,205	15,45	0,223	22,27	0,238	27,17
8	0,175	7,8	0,193	16,40	0,208	22,43	0,225	28,29
9	0,215	7,8	0,231	14,19	0,251	21,02	0,266	25,48
10	0,202	7,8	0,221	15,73	0,237	21,42	0,253	26,39

Fonte: Elaborada pelo autor.

O teor de água das sementes de Soja em função do tempo de hidratação é apresentado na Figura 31.

Figura 31 - Teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 24 horas através do método do tambor. É apresentado os valores do teor de água das sementes a cada período de 8 horas de hidratação, sendo o valor inicial fixo para todas as sementes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Destes resultados, foi observado que o teor de água ideal para a realização da aquisição das imagens, considerando a minimização da ocorrência de danos mecânicos, no momento em que as sementes são colhidas, ficou abaixo de 8 horas de hidratação, isto é, para um teor de água de aproximadamente 15 %.

Posteriormente, foi observado que para a hidratação das sementes pelo método do tambor havia a necessidade de se consumir uma grande quantidade de sementes, visto que, para a realização da aquisição das imagens, tanto por microtomografia computadorizada quanto para Ressonância Magnética, seria necessário uma pequena quantidade de sementes. Assim, para efeito de comparação, também foi feito a hidratação das sementes pelo método mais tradicional, o método do papel.

Esse método consiste em hidratar as sementes enroladas em um papel próprio para este fim, onde é pesado o papel numa balança, de forma que dada sua massa, é acrescentado 2,5 vezes a massa de água para a hidratação das sementes. Após isso, o papel contendo as sementes é mantido em um ambiente fechado (caixa

de plástico com tampa), para que se minimize as perdas de água no papel por evaporação. As medidas foram feitas em temperatura ambiente.

Como neste caso a medida da massa, e consequentemente do teor de água, é feita de forma direta das sementes em contato com o papel, podemos aumentar o número de sementes, para cada uma das espécies, de 10 para 20 sementes, refinando assim nossos resultados. Por outro lado, como verificamos que 8 horas de hidratação já nos garantia chegar a um valor satisfatório para a realização das imagens, os experimentos de hidratação, pelo método do papel, tiveram duração máxima de 8 horas, com medidas sendo realizadas a cada hora.

Na tabela 9 são apresentados os resultados obtidos para a massa e o teor de água das sementes de Milho.

Tabela 9 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel. Neste caso, as medidas de massa e teor de água foram obtidas a cada hora de hidratação.

Milho	0	%	1	%	2	%	3	%	4	%	5	%	6	%	7	%	8	%
	Hora	água	Hora	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água
1	0,356	9,30	0,370	12,73	0,375	13,96	0,381	15,16	0,384	15,91	0,389	16,86	0,392	17,54	0,394	18,09	0,395	18,17
2	0,337	9,30	0,349	12,62	0,353	13,59	0,359	14,87	0,362	15,67	0,366	16,56	0,368	17,13	0,371	17,80	0,372	18,02
3	0,323	9,30	0,332	11,73	0,336	12,75	0,340	13,83	0,344	14,63	0,348	15,59	0,350	16,12	0,353	16,83	0,354	17,02
4	0,331	9,30	0,344	12,71	0,348	13,86	0,352	14,81	0,355	15,53	0,359	16,50	0,361	16,98	0,364	17,64	0,366	17,94
5	0,321	9,30	0,334	12,83	0,339	14,01	0,343	14,91	0,346	15,75	0,350	16,78	0,353	17,33	0,356	18,05	0,357	18,28
6	0,320	9,30	0,334	13,13	0,338	14,05	0,342	15,06	0,345	15,80	0,349	16,76	0,351	17,21	0,353	17,75	0,353	17,68
7	0,348	9,30	0,362	12,79	0,365	13,62	0,370	14,65	0,373	15,47	0,377	16,28	0,379	16,88	0,382	17,42	0,383	17,55
8	0,364	9,30	0,378	12,59	0,382	13,48	0,386	14,40	0,389	15,19	0,393	15,99	0,395	16,42	0,398	17,11	0,400	17,40
9	0,310	9,30	0,325	13,35	0,328	14,28	0,332	15,38	0,336	16,22	0,339	17,08	0,341	17,57	0,344	18,21	0,345	18,50
10	0,317	9,30	0,330	12,84	0,335	14,09	0,340	15,23	0,343	16,17	0,348	17,18	0,350	17,72	0,353	18,38	0,354	18,63
11	0,333	9,30	0,348	13,14	0,352	14,15	0,356	15,31	0,360	16,18	0,364	17,12	0,366	17,53	0,369	18,15	0,368	18,00
12	0,336	9,30	0,350	12,80	0,354	13,84	0,358	14,90	0,362	15,74	0,366	16,64	0,368	17,14	0,370	17,70	0,371	17,79
13	0,317	9,30	0,331	13,06	0,334	13,94	0,338	15,06	0,342	16,01	0,346	16,98	0,348	17,43	0,351	18,04	0,352	18,27
14	0,334	9,30	0,347	12,52	0,350	13,49	0,354	14,45	0,358	15,21	0,362	16,15	0,363	16,45	0,365	16,84	0,366	17,25
15	0,336	9,30	0,349	12,68	0,354	13,89	0,358	14,92	0,362	15,75	0,366	16,74	0,368	17,24	0,370	17,73	0,372	18,06
16	0,343	9,30	0,356	12,64	0,359	13,52	0,363	14,52	0,367	15,38	0,371	16,18	0,373	16,60	0,375	17,05	0,374	16,94
17	0,333	9,30	0,346	12,66	0,350	13,60	0,355	14,82	0,358	15,65	0,362	16,40	0,364	16,97	0,367	17,70	0,368	17,81
18	0,342	9,30	0,355	12,52	0,359	13,57	0,363	14,57	0,367	15,43	0,371	16,34	0,374	16,92	0,377	17,56	0,378	17,87
19	0,352	9,30	0,365	12,51	0,369	13,55	0,373	14,48	0,377	15,34	0,381	16,20	0,383	16,68	0,386	17,29	0,388	17,61
20	0,313	9,30	0,324	12,35	0,328	13,45	0,332	14,49	0,335	15,15	0,339	16,18	0,341	16,67	0,344	17,37	0,345	17,73

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir desses dados, foi construído um gráfico que nos mostra a curva de teor de água das sementes de Milho contra o tempo de hidratação, para um período de 8 horas dado pela Figura 32.

Figura 32 - Teor de água (%) das sementes de Milho hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel. Cada ponto do gráfico representa o valor médio do teor de água das sementes para cada hora de hidratação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os mesmos procedimentos foram tomados para a coleta de dados das sementes de Soja. Foi adquirido a massa de cada semente para cada hora de hidratação, apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Massa (g) e teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel, com medidas adquiridas a cada hora de hidratação.

Soja	0	%	1	%	2	%	3	%	4	%	5	%	6	%	7	%	8	%
	Hora	água	Hora	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água	Horas	água
1	0,188	7,80	0,199	12,71	0,206	15,55	0,211	17,71	0,217	19,88	0,222	21,86	0,227	23,31	0,230	24,48	0,233	25,48
2	0,188	7,80	0,198	12,32	0,204	14,82	0,209	16,98	0,214	19,08	0,219	20,85	0,223	22,24	0,226	23,37	0,230	24,60
3	0,197	7,80	0,206	12,18	0,212	14,66	0,218	16,82	0,223	18,76	0,228	20,57	0,232	21,98	0,236	23,07	0,239	24,20
4	0,178	7,80	0,186	11,91	0,192	14,39	0,197	16,73	0,202	18,75	0,207	20,79	0,211	22,15	0,215	23,49	0,218	24,65
5	0,178	7,80	0,186	12,01	0,192	14,54	0,197	16,80	0,202	18,82	0,207	20,86	0,211	22,33	0,214	23,63	0,218	24,83
6	0,187	7,80	0,198	12,79	0,203	15,28	0,209	17,35	0,214	19,29	0,219	21,17	0,222	22,48	0,225	23,51	0,228	24,32
7	0,200	7,80	0,210	11,98	0,215	14,19	0,220	16,25	0,226	18,19	0,230	19,93	0,235	21,39	0,238	22,48	0,241	23,57
8	0,195	7,80	0,204	12,18	0,210	14,73	0,216	16,98	0,221	18,86	0,227	20,83	0,231	22,20	0,235	23,53	0,238	24,75
9	0,198	7,80	0,209	12,27	0,215	14,72	0,220	16,74	0,226	18,88	0,230	20,61	0,235	22,06	0,239	23,33	0,243	24,60
10	0,199	7,80	0,209	12,21	0,215	14,58	0,220	16,63	0,226	18,63	0,231	20,39	0,235	22,02	0,239	23,16	0,243	24,36
11	0,178	7,80	0,187	12,38	0,193	14,88	0,198	17,04	0,203	19,25	0,208	21,03	0,211	22,38	0,214	23,36	0,216	24,21
12	0,191	7,80	0,198	11,42	0,204	13,77	0,209	15,76	0,214	17,73	0,218	19,46	0,222	20,91	0,225	21,97	0,228	23,03
13	0,195	7,80	0,204	12,27	0,211	14,81	0,216	16,90	0,221	18,67	0,225	20,16	0,229	21,69	0,232	22,70	0,235	23,72
14	0,178	7,80	0,190	13,48	0,195	15,70	0,200	17,94	0,205	19,94	0,210	21,66	0,214	23,12	0,217	24,22	0,221	25,53
15	0,188	7,80	0,199	12,63	0,205	15,15	0,210	17,17	0,215	19,14	0,219	20,69	0,223	22,22	0,226	23,12	0,230	24,42
16	0,199	7,80	0,209	12,04	0,215	14,37	0,220	16,51	0,225	18,40	0,230	20,21	0,234	21,57	0,237	22,56	0,240	23,49
17	0,214	7,80	0,224	11,84	0,229	13,96	0,234	15,94	0,240	17,80	0,245	19,51	0,249	20,93	0,253	22,06	0,256	23,06
18	0,181	7,80	0,191	12,34	0,196	14,80	0,202	17,17	0,207	19,09	0,212	21,23	0,216	22,72	0,220	23,92	0,224	25,21
19	0,176	7,80	0,185	12,39	0,191	14,91	0,196	17,26	0,201	19,20	0,206	21,32	0,210	22,71	0,213	23,72	0,216	24,79
20	0,198	7,80	0,209	12,49	0,214	14,74	0,220	17,10	0,226	19,16	0,231	21,15	0,235	22,45	0,239	23,56	0,243	24,88

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base nessas informações, foi construído o gráfico que nos mostra a curva de teor de água das sementes de Soja contra o tempo de hidratação, para o período considerado, dado pela Figura 33.

Figura 33 - Teor de água (%) das sementes de Soja hidratadas por um período de 8 horas através do método do papel, com a apresentação do teor de água médio das sementes para cada hora de hidratação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O método da estufa considerado para a determinação do teor de água inicial das sementes consiste em se obter o valor da quantidade de água presente em uma certa quantidade de sementes, sendo assim um valor relativo àquela quantidade de sementes. Desta forma, após a pesagem inicial, as sementes são levadas para uma estufa e ficam por um período de 24 horas, na temperatura de $(105 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

3.2 Relaxometria: hidratação e secagem

Nesta etapa foram obtidas as curvas das distribuições dos tempos de relaxação das sementes de Milho e Soja, nas condições de hidratação pelo método do tambor por um período de 24 horas, medida a cada período de 8 horas e, também, para amostras em condições normais do mesmo lote, fizemos a secagem quando foi possível distinguir os picos de água e óleo nas sementes. Os períodos de secagem foram de 5 e 65 horas na temperatura de 40°C . Trabalhos semelhantes

foram realizados por Krishnan,⁶⁵⁻⁶⁶ com exceção que neles não foi realizada a medida do teor de água em que se encontrava a semente no momento da realização dos experimentos de Relaxometria.

Na Figura 34 apresentamos as curvas das distribuições dos tempos de relaxação das sementes de Milho, onde foi analisado um conjunto de 10 sementes para avaliar se o comportamento observado era semelhante entre todas as amostras. As sementes utilizadas tanto para a hidratação como para a secagem foram provenientes da mesma amostra e, conseqüentemente, possuíam o mesmo teor de água inicial.

Figura 34 - Curvas da distribuição dos tempos de relaxação coletadas em intervalos de 8 horas, por um período total de 24 horas, das sementes de Milho hidratadas pelo método do tambor, onde foi acrescentado 1 ml de água a cada hora.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Das curvas apresentadas na Figura 34, podemos observar que os picos mais à esquerda da distribuição são os que variam sua intensidade com a hidratação e ao mesmo tempo se deslocam para tempos de relaxação mais longos, sendo esse o sinal proveniente da água nas sementes. Ainda pode-se notar que essa água está fortemente ligada às estruturas internas das sementes, pois seus tempos de relaxação se encontram na ordem de milissegundos, enquanto que os picos à direita da distribuição e que aparentemente não mudam de intensidade com a hidratação, representam o sinal proveniente do óleo. A distorção dos picos acontece devido à própria transformada de Laplace, que não distingue efetivamente os tempos de relaxação de picos próximos. O efeito da hidratação das sementes de Milho pode ser melhor visualizado na Figura 35, das sementes 1 e 5, onde são apresentadas as curvas da distribuição dos tempos de relaxação para cada período de aquisição.

Figura 35 - Distribuição dos tempos de relaxação das sementes 1 e 5 de Milho, para cada intervalo de 8 horas e hidratadas pelo método do tambor. Pode-se observar o aumento da intensidade do sinal proveniente da água, como também seu deslocamento para tempos mais longos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para confrontar esses resultados obtidos com a hidratação das sementes de Milho, foram selecionadas outras sementes de uma amostra diferente da utilizada neste experimento, em condições normais de armazenamento, onde foi feita a secagem em estufa e a aquisição da distribuição dos tempos de relaxação antes e depois dos períodos de secagem. Trabalhos realizados em sementes de feijão mostraram que a porcentagem de água ligada na semente decresce gradualmente

em função do tempo de secagem.⁶⁷ Os resultados são apresentados na Figura 36, para as sementes identificadas como 1 e 7.

Figura 36 - Distribuição dos tempos de relaxação para sementes de Milho após a secagem em estufa por um período de 5 horas (verde) e 65 horas (vermelho) na temperatura de 40° C. Pode-se notar uma diminuição no pico da esquerda, resultado da subtração de água na semente, enquanto que o pico da direita permanece inalterado, que representa o sinal proveniente do óleo da semente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Destas imagens podemos notar de fato que os picos da distribuição dos tempos de relaxação localizados à esquerda são provenientes do sinal da água das sementes, onde vemos uma significativa diminuição de sua intensidade e o deslocamento para tempos mais curtos, restando apenas água que possivelmente esteja associada a macromoléculas.⁶⁸ Por outro lado, os picos localizados à direita das imagens não se alteram com a secagem das sementes, representando o sinal proveniente do óleo da semente, que não é perdido com a secagem.

Na sequência foram realizadas as mesmas medidas para as sementes de Soja, também realizado em um conjunto de 10 sementes, hidratadas pelo método do tambor para o período de 24 horas, realizando a medida a cada 8 horas, sendo os dados obtidos apresentados na Figura 37.

Figura 37 - Curvas da distribuição dos tempos de relaxação coletadas em intervalos de 8 horas, por um período total de 24 horas, das sementes de Soja hidratadas pelo método do tambor, onde foi acrescentado 1 ml de água a cada hora.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como no caso das sementes de Milho, nas sementes de Soja os picos mais intensificados pela hidratação foram aqueles localizados à esquerda da distribuição, onde se encontram os tempos de relaxação mais curtos e, devido à maior quantidade de óleo na semente de Soja comparado com a semente de Milho, os picos à direita se assemelham ao pico da água em relação a sua intensidade, como vemos na Figura 37-A. Por outro lado, como a semente de Soja apresenta uma maior quantidade de proteínas em comparação com a semente de Milho, e estas tendem a ter mais afinidade com a água, vemos com a hidratação que o pico do sinal proveniente da água chega a triplicar o seu valor inicial (Figura 37-D), correspondendo a uma maior absorção de água.

Aqui também foi feita a secagem das sementes de Soja na estufa e foram medidas as distribuições dos tempos de relaxação, onde foram utilizadas sementes em condições normais do mesmo lote, sendo os resultados apresentados na Figura 38.

Figura 38 - Distribuição dos tempos de relaxação para amostras de sementes de Soja após a secagem em estufa por um período de 5 horas (verde) e 65 horas (vermelho) na temperatura de 40° C. Aqui, como ocorre na semente de Milho, a secagem afeta somente o pico da esquerda, devido a diminuição da quantidade de água presente na semente, e o sinal oriundo do óleo permanece constante para todos os tempos de secagem.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Destes gráficos também vemos uma significativa redução da intensidade do sinal do pico que se encontra à esquerda da distribuição dos tempos de relaxação e ao mesmo tempo, independentemente do tempo que as sementes foram secadas, o pico central e o da direita permanecem inalterados, representando o óleo da semente que não é perdido pela secagem.

Com base nesses resultados foi confirmado que tanto para as sementes de Milho quanto para as sementes de Soja, o sinal proveniente da água encontra-se nos intervalos de tempos da ordem de milissegundos, sendo desta forma impossível sua detecção com as técnicas de imagem tradicionais por Ressonância Magnética. Mesmo assim, foi possível a realização das imagens pelo fato da existência de óleo nas sementes, cujo sinal pôde ser detectado para os tempos ao eco utilizados na sequência gradiente eco que foi implementada para a aquisição das imagens por Ressonância Magnética.

3.3 Imagens de sementes secas

Apresentaremos aqui as imagens obtidas pelas três técnicas utilizadas para a avaliação das sementes. Nesta etapa, todas as imagens foram coletadas no mês de março de 2015 e após três meses da inoculação dos fungos. As imagens de Ressonância Magnética foram adquiridas com a bobina tipo Sela Cruzada.

Porém, antes de serem mostradas as imagens das sementes, é apresentado abaixo as figuras das sementes de Milho e Soja, onde é ressaltado as principais estruturas internas encontradas nas sementes.

Figura 39 – Apresentação das estruturas internas encontradas em sementes de Milho e Soja. Notamos que a semente de Milho é mais sensível a danos mecânicos devido à estrutura rígida do endosperma, enquanto que a região do eixo embrionário na semente de Soja é mais frágil pois esta se encontra sob uma fina camada de tegumento.

Fonte: Cedida por Francisco Guilhien Gomes Junior.

Como as espécies de fungos inoculados nas sementes são comumente encontrados em sementes durante o armazenamento, apresentaremos aqui as sementes 17 e 19 que formavam o grupo de controle, e que também são apresentadas na fase seguinte quando as sementes são comparadas com as que foram inoculadas com o fungo *Aspergillus* spp., de forma que é mantida a mesma referência em relação às sementes sadias, como também as sementes 1 e 6 que foram inoculadas com o fungo *Penicillium* spp.

Desta forma, na aquisição das imagens por Ressonância Magnética com a bobina Sela Cruzada, microtomografia computadorizada e raios X, foram feitas imagens de sementes sadias para avaliar as mudanças que poderiam ser observadas em relação às sementes com injúrias mecânicas ou com a presença de

tecidos deteriorados pela ação dos fungos, que são apresentadas nas Figuras 40 e 41.

Figura 40 - Imagens da semente 17 de Soja seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 41 - Imagens da semente 19 de Milho seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos notar que as sementes sadias apresentam boas imagens para as técnicas utilizadas, onde podemos observar a posição do eixo embrionário da semente de Soja pela apresentação da fatia central da aquisição (Figura 40), como também a região do embrião do Milho intacto visualizado nas imagens da Figura 41 (A e B). Apesar da pouca resolução obtida pela Ressonância Magnética e granulação da imagem pela utilização de uma bobina não dedicada para esse tipo de amostra, podemos ter uma notável delineação da região do embrião, que

predominantemente contem óleo e, no caso das sementes secas, é o principal responsável pela formação da imagem.

Mostramos nas Figuras 42 e 43 as imagens das sementes 1 e 6 secas com a presença predominante do fungo *Penicillium* spp., com teor de água de 7,8 % para a semente de Soja e 9,3 % para a semente de Milho, onde o contraste da imagem por Ressonância Magnética é predominantemente devido à presença do óleo de suas estruturas internas.

Figura 42 - Imagens da semente 1 de Soja seca sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Penicillium* spp. por um período de 3 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 43 - Imagens da semente 6 de Milho seca sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Penicillium* spp. por um período de 3 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível verificar na Figura 42 (B e C) a presença de tecidos deteriorados pela ação do fungo, apesar da imagem por Ressonância Magnética nesse caso

ainda ser bastante granulosa e a alteração na extensão do dano, observada com a utilização de técnicas do tipo gradiente eco que é sensível a variações na susceptibilidade magnética, deve estar relacionada à presença de ar no interior das estruturas da semente. Trabalhos semelhantes realizados por Köckenberger, W. et al²⁵ mostram no trigo regiões externas da semente onde se encontra amido hidrolisado, como também modificações na estrutura do embrião causadas pela presença do fungo.

Por outro lado, na imagem por microtomografia computadorizada, devido à maior resolução alcançada pela técnica, foi possível identificar locais no interior da semente onde os coeficientes de atenuação são distintos daqueles obtidos em regiões de tecidos saudáveis, conforme pode ser observado na Figura 42-B, que mostra uma secção transaxial da semente obtida com auxílio do *software DataViewer*, onde podemos visualizar uma parcela do dano causado pela presença do fungo.

Pela imagem obtida pela técnica de raios X (Figura 42-A) apesar da alta resolução obtida, onde podemos diferenciar a semente nas suas estruturas internas, como eixo do embrião e cotilédones, não é possível caracterizar uma alteração significativa na imagem da região que contém o dano causado pela presença do patógeno, devido à pouca diferenciação na densidade da região em relação às partes que apresentam tecidos saudáveis, fato que é dificultado se a lesão ainda se encontra em estágios iniciais.

Para as imagens da semente de Milho (Figura 43), podemos notar as injúrias no endosperma e sobre o eixo do embrião pela imagem de raios X (Figura 43-A). Porém, pela imagem de microtomografia computadorizada (Figura 43-B), foi constatado que as fraturas não atingiram partes vitais da semente, como a plúmula e a radícula. Já na imagem por Ressonância Magnética (Figura 43-C), devido à contribuição do sinal proveniente do óleo da semente e o baixo teor de água, não conseguimos visualizar a região do endosperma, apesar de conseguirmos identificar a fratura na parte superior do eixo embrionário (plúmula) mesmo que com pouca resolução.

3.4 Imagens de sementes secas e hidratadas

Nesta próxima etapa de aquisição de imagens, realizada no mês de junho de 2015, após três meses da primeira seção de aquisição das imagens e seis meses da inoculação dos fungos, as sementes foram analisadas com os mesmos parâmetros utilizados na primeira aquisição, porém agora foi utilizado para as imagens de Ressonância Magnética a bobina dedicada tipo solenoide, e as sementes apresentando dois teores de água, sendo de 9,3 % para o Milho e 7,8 % para a Soja, e outro de aproximadamente 15 % quando as sementes foram hidratadas. Para atingir o teor de água de 15 % as sementes de Soja foram hidratadas por um período de 3 horas, enquanto as de Milho foram hidratadas por um período de 4 horas, utilizando a metodologia do papel umedecido.

Figura 44 - Imagens da semente 17 de Soja seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 45 - Imagens da semente 17 de Soja do grupo controle, hidratada por um período de 3 horas, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como apresentado na seção anterior, as sementes sadias proporcionam imagens com boa qualidade e, com a utilização das bobinas dedicadas para a aquisição das imagens por Ressonância Magnética, foi possível uma melhor visualização das estruturas das sementes, principalmente da semente de Soja (Figura 45) e da semente de Milho hidratadas (Figuras 47), com uma melhor definição dos contornos das sementes e uma significativa melhora na resolução da imagem e redução do ruído de fundo, com o receptor do sinal mais próximo da amostra. Segundo Forti, V. A.; Cicero, S. M. e Pinto, T. L. F.¹⁵ foi possível identificar pela imagem de raios X danos em sementes de Soja causados por umidade, acarretando diminuição em seu potencial fisiológico durante o período de armazenamento, o que pode resultar na germinação de uma plântula anormal.

Figura 46 - Imagens da semente 19 de Milho seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 47 - Imagens da semente 19 de Milho do grupo controle, hidratada por um período de 4 horas, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas sementes de Milho, independente da bobina utilizada, ainda foi encontrada grande dificuldade para a visualização da região do endosperma das sementes secas (Figura 46-C e 47-B), onde os tempos de relaxação se encontram abaixo dos tempos utilizados para a aquisição do sinal por Ressonância Magnética. Entretanto, para a semente de Soja com ambas as bobinas (Figuras 42-C, 44-C e 45), foi possível identificar regiões onde existiam tecidos deteriorados pela ação dos fungos, diferentemente do que foi observado pelas técnicas de raios X.

Desta forma, a técnica de Imagem por Ressonância Magnética pode se tornar uma ferramenta auxiliar na identificação de injúrias mecânicas e tecidos deteriorados em sementes, de forma que a utilização de técnicas rápidas como a *Sweep Imaging with Fourier Transformation* (SWIFT),⁶⁹⁻⁷⁰ *Ultra-short Echo-time* (UTE)⁷¹ ou *Zero Echo Time* (ZTE),⁷² pode trazer melhores contrastes e assim uma maior nitidez das estruturas internas das sementes, sem a necessidade das sementes serem hidratadas.

Para efeito de comparação da ação dos fungos que foram inoculados nas sementes e considerados nessa pesquisa, aqui serão apresentadas as sementes 10 e 13 que foram inoculadas com o fungo *Aspergillus* spp. Assim, nas Figuras 48 e 49 encontram-se as imagens da semente de Soja seca e hidratada, respectivamente, utilizando as três técnicas de imagem, sendo a imagem por raios X obtida apenas com a semente na condição seca, ou seja, com teor de água de 7,8 %. Da mesma forma, as sementes de Milho são apresentadas nas Figuras 50 e 51, com a imagem de raios X obtida com um teor de água de 9,3 %.

Figura 48 - Imagens da semente 10 de Soja seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 49 - Imagens da semente 10 de Soja hidratada por um período de 3 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos observar na imagem da Figura 48-C uma alteração significativa causada pela ação do fungo na deterioração do tecido de um dos cotilédones, relacionado possivelmente com a mudança na densidade do tecido, de forma que essa mudança torna-se sensível na imagem por Ressonância Magnética, já que ela baseia-se na densidade nuclear local para a formação do pixel na imagem. Também é possível visualizar em todas as imagens uma pequena fratura localizada no centro do cotilédone e, novamente, com a possível presença de ar no interior desta estrutura, na imagem por Ressonância Magnética esse dano aparece distorcido, diferentemente do que nas demais técnicas utilizadas.

O efeito da hidratação pode ser evidenciado se compararmos as imagens B e C da Figura 48 com as imagens da Figura 49 (A e B) da semente de Soja, onde vemos um aumento do volume dos cotilédones nas imagens obtidas pela microtomografia computadorizada, de forma que o tecido do cotilédone aumenta seu tamanho até ocupar o volume determinado pelo tegumento. Segundo Hong, Y. et al,⁷³ para imagens de Soja hidratadas e ponderadas por T_1 , o sinal de Ressonância Magnética observado representa uma sobreposição dos sinais provenientes da água e do óleo presentes na semente, resultando em artefatos do tipo sombra nas regiões próximas da intersecção dos cotilédones.

Ainda, se visualizarmos as imagens obtidas pela Ressonância Magnética (Figura 48-C e 49-B), vemos um aumento da intensidade do sinal proveniente do eixo embrionário, relacionado a uma maior absorção de água pela presença de uma maior quantidade de proteínas, como também uma variação do brilho na imagem do exterior da semente para seu centro, representando uma absorção de água na direção radial. Ainda, podemos notar que essa absorção de água não é homogênea, pois a distribuição do brilho na imagem não é uniforme.

Figura 50 - Imagens da semente 13 de Milho seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Raios X; (B) Microtomografia computadorizada e; (C) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 51 - Imagens da semente 13 de Milho hidratada por um período de 4 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses, adquiridas por: (A) Microtomografia computadorizada e; (B) Ressonância Magnética. Barra de escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a semente de Milho, mesmo com a utilização de bobinas dedicadas, apesar da melhora na qualidade da imagem, com a consequente diminuição do ruído e do efeito granulado, ainda existe muita dificuldade na observação do sinal proveniente do endosperma da semente na condição seca, fato que é evidenciado na Figura 50-C, como uma pequena delineação da região do pericarpo. Isso ocorre porque na região do pericarpo existe a camada de aleurona, composta por proteínas, as quais possuem alta afinidade à água.

A fratura que ocorre na porção central da semente, que começa desde a parte superior do endosperma e atravessa toda sua extensão até a região central pode ser observada em todas as técnicas de imagem (Figura 50 e 51), com a microtomografia nos confirmando que o embrião não foi afetado pelo dano, podendo resultar numa plântula sadia na germinação, apesar da deficiência de nutrientes que a fratura pode causar. Além disso, devido à fratura atingir uma região profunda do endosperma da semente, no momento da hidratação, esse dano facilitou a entrada de água na semente, e disso foi possível observar essa região na imagem da semente hidratada por Ressonância Magnética no período considerado, como mostra a Figura 51-B.

Figura 52 - Distribuição dos tempos de relaxação da semente de Milho apresentadas em relação às suas diferentes estruturas, como embrião (verde) e endosperma (vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 52 apresenta a distribuição dos tempos de relaxação da parte do endosperma da semente do Milho sem hidratação, representado pela curva em vermelho, como também os tempos de relaxação do embrião da semente na curva em verde. Pode ser notado que a região do embrião concentra todo o óleo da semente, o que nos confirma que na aquisição das imagens da semente do Milho somente observamos o sinal proveniente desta estrutura, a não ser que a semente seja levada a uma condição de hidratação.

Para a obtenção da Figura 52 foi feita uma separação mecânica das partes da semente através do auxílio de uma lâmina de corte e adquirido a distribuição dos tempos de relaxação das partes da semente de forma separada.

Tabela 11 - Percentagem dos constituintes totais indicado nas estruturas físicas específicas da semente de Milho seca.

Semente de Milho	% do grão	Amido	Lipídeos	Proteínas
Endosperma	82	98	15,4	74
Embrião	11	1,3	82,6	26
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6
Ponta	2	0,1	0,8	0,9

Fonte: Adaptada de PAES, M. C. D.⁷⁴

Na tabela 11 vemos a percentagem dos constituintes da semente de Milho, o que reforça o fato das imagens por Ressonância Magnética serem majoritariamente devido à presença de óleo, pois obtemos somente a imagem da região do embrião,

independente da região do endosperma conter a maior parcela das proteínas da semente e essa ter maior afinidade com a água.

4 CONCLUSÕES

O grande impulso para o desenvolvimento desta pesquisa reside no fato do Brasil ser considerado um dos maiores mercados no contexto mundial da indústria de sementes, com uma quantidade produzida de aproximadamente 86 milhões de toneladas de Soja e 78 milhões de toneladas de Milho, em grãos, representando uma área colhida de aproximadamente 30 milhões de hectares para a Soja e 15 milhões de hectares para o Milho, sendo as principais culturas nacionais segundo dados do IBGE para o ano de 2014. Como os efeitos das alterações climáticas, como por exemplo, o aquecimento global, podem causar uma diminuição significativa da produtividade dessas culturas, existe uma necessidade da melhor avaliação da qualidade das sementes produzidas para atender às empresas que lidam com o seu beneficiamento.

Os sistemas desenvolvidos para a preparação das sementes, o canhão pneumático para a produção dos danos mecânicos, como também o tambor de hidratação para a realização dos experimentos de relaxometria, simularam satisfatoriamente as condições comumente encontradas nas sementes nos seus diversos estágios de produção, desde a colheita no campo até sua estocagem em armazéns.

Com a imagem adquirida pela técnica de raios X, um dos métodos tradicionais já muito bem estabelecido, foi possível observar nitidamente todas as estruturas das sementes, como eixo embrionário na semente de Soja e danos mecânicos nas sementes de Milho localizados em suas diversas regiões, como o endosperma e eixo do embrião.

Porém, por ser uma única imagem formada pela amostra como um todo, houve dificuldade de se avaliar a extensão do dano mecânico com relação a sua profundidade, ou se esse chegou a atingir regiões vitais das sementes, como a plúmula e a radícula nas sementes de Milho. Por outro lado, pelo fato da técnica se basear na densidade dos tecidos, tornou-se impossível distinguir regiões das sementes que foram afetadas pela presença dos patógenos, principalmente se essa lesão se encontrava nos seus estágios iniciais de ocorrência. Quando se encontravam em estágios mais avançados, o que surgia na imagem era uma

pequena variação na quantidade do brilho naquela determinada região, de forma que não foi possível avaliar sua profundidade no tecido.

Com a utilização da imagem obtida pela técnica de microtomografia computadorizada, um grande avanço foi possível, como a obtenção de resoluções da ordem de poucos microns, a diferenciação de tecidos deteriorados nas sementes de Soja, a possibilidade de se avaliar a extensão de danos mecânicos causados nas sementes de Milho e se esses atingiram regiões vitais das sementes, podendo resultar no crescimento de uma plântula anormal ou mesmo na morte dos embriões.

Entretanto, como a técnica tem os mesmo princípios que a imagem de raios X, baseada na densidade e composição química do tecido, uma das desvantagens desse método esteve no fato de não ser capaz de identificar a variação do teor de água das sementes, quando observadas na condição seca e hidratada. Ainda, algumas imagens apresentadas neste trabalho apresentaram alguns artefatos de anéis, típico da intercalibração entre fonte e detector do equipamento utilizado.

A realização dos experimentos de relaxometria foram fundamentais, tanto para o conhecimento do ambiente interno encontrado nas sementes e o comportamento dos sinais provenientes da água e do óleo encontrados dentro das suas diferentes estruturas, como também para a otimização do protocolo de imagem por Ressonância Magnética utilizado nesta pesquisa, onde foi possível obter o sinal oriundo do óleo das sementes secas e da água das sementes na condição de estresse hídrico.

O desenvolvimento de bobinas dedicadas do tipo solenoide para a aquisição das imagens das sementes representou uma melhora significativa da qualidade das imagens, onde foi possível observar uma diminuição do ruído de fundo das imagens, devido à proximidade entre o receptor e a amostra. Também com as novas bobinas foi alcançada maior resolução, representando uma diminuição no tamanho do pixel de aproximadamente 37,5 %, saindo de $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ e chegando em $125 \times 125 \mu\text{m}^2$ no plano, permanecendo inalterada a terceira dimensão espacial em $500 \mu\text{m}$.

Além disso, houve também uma diminuição relevante no tempo de aquisição das imagens por Ressonância Magnética, que com a bobina do tipo sela cruzada se levava aproximadamente 60 minutos para a aquisição de um conjunto de quatro amostras, com a bobina do tipo solenoide esse tempo caiu para aproximadamente 20 minutos. A vantagem certamente se encontra na considerável melhora da relação sinal-ruído obtida com as novas bobinas.

A aplicação da imagem por Ressonância Magnética, através da sequência *Fast-Low Angle Shot* (FLASH), mostrou-se satisfatória na aquisição das imagens das sementes, onde com um tempo ao eco curto e *ângulo de flip* baixo foi possível obter imagens ponderadas majoritariamente pelo contraste em T_1 .

Porém, uma desvantagem observada com a utilização dessa sequência, consequência exclusiva desse tipo de metodologia, esteve no fato de não se conseguir observar o sinal proveniente da água, já que essa tem tempos de relaxação da ordem de uma centena de microsegundos, somente sendo possível sua observação quando a semente se encontra na condição hidratada.

Entretanto, a técnica de imagem por Ressonância Magnética mostrou ser uma ferramenta auxiliar para a avaliação de danos mecânicos e tecidos deteriorados pela ação de fungos em sementes, uma vez que a metodologia é não invasiva e não destrutiva, possibilitando a investigação de outros parâmetros, como por exemplo, o vigor das sementes após a aquisição das imagens, através do teste de germinação.

Esses resultados sinalizam a necessidade da continuidade da pesquisa sobre a aquisição de imagens por Ressonância Magnética em sementes. Dentre os aspectos a serem explorados, um deles é a implementação de técnicas que possibilitem a observação de sinais provenientes da água que apresentam tempos de relaxação extremamente curtos. Como exemplo, podem-se sugerir as técnicas ZTE, UTE e SWIFT.

A justificativa para a utilização dessas técnicas de imagens está no fato que com elas seria possível a aquisição da imagem de objetos que apresentam T_2 extremamente curtos, possibilitando a construção de imagens ponderadas por T_2 ou ainda por T_2^* . Esta é uma perspectiva interessante porque o grupo de pesquisadores do CIERMag está engajado num esforço internacional, multiinstitucional para desenvolver esta técnica e outras similares, que prometem revolucionar a forma com que imagens serão obtidas num futuro próximo.

REFERÊNCIAS

- 1 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/site/estatisticas/#>>. Acesso em: 06 out. 2015.
- 2 BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1994.
- 3 POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977.
- 4 CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000.
- 5 FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de Soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984.
- 6 PETERSON, J. M.; PERDOMO, J. A.; BURRIS, J. S. Influence of kernel position, mechanical damage and controlled deterioration on estimates of hybrid maize seed quality. **Seed Science and Technology**, v. 23, n. 3, p. 647-657, 1995. ISSN 0251-0952.
- 7 CICERO, C. M.; SILVA, W. R. Danos mecânicos associados a patógenos e desempenho de sementes de Milho. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 305-314, 2003. ISSN 2333-9721.
- 8 CICERO, S. M.; BANZATTO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de Milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 29-36, 2003. ISSN 1806-9975.
- 9 CICERO, S. M. et al. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 603-612, 1998. ISSN 0251-0952.
- 10 OBANDO FLOR, E. P. et al. Avaliação de danos mecânicos em sementes de Soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 68-76, 2004. ISSN 1806-9975.
- 11 PINTO, T. L. F. et al. An assessment of mechanical and stink bug damage in soybean seed using X ray analysis test. **Seed Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 110-120, 2009. ISSN 0251-0952.
- 12 GOMES JUNIOR, F. G.; CICERO, S. M. X-ray analysis to assess mechanical damage in sweet corn seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 78-85, 2012. ISSN 1806-9975.
- 13 MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M. Análise de imagens na avaliação da qualidade de sementes de Milho localizadas em diferentes posições na espiga. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 9-18, 2005. ISSN 1806-9975.
- 14 PUPIM, T. L. et al. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de Embaúba. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 28-32, 2008. ISSN 0101-3122.

- 15 FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Avaliação da evolução de danos por "umidade" e redução do vigor em sementes de Soja, cultivar TMG113-RR, durante o armazenamento, utilizando imagens de raios x e testes de potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 123-133, 2010. ISSN 0101-3122.
- 16 TANNÚS, A. et al. NMR imaging at IFQSC. **Medical Physics**, v. 15, n. 5, p. 801-801, 1988. ISSN 0094-2405.
- 17 KÖCKENBERGER, W. Functional imaging of plants by magnetic resonance experimentes. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 7, p. 286-292, 2001. ISSN 1360-1385.
- 18 RABI, I. I. et al. The molecular beam resonance method for measuring nuclear magnetic moments. the magnetic moments of $^3\text{Li}6$, $^3\text{Li}7$ and $^9\text{F}19$. **Physical Review**, v. 55, n. 6, p. 526-535, 1939. ISSN 1079-7114.
- 19 PURCELL, E. M.; TORREY, H. C.; POUND, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, v. 69, n. 1-2, p. 37-38, 1946. ISSN 1079-7114.
- 20 BLOCH, F.; HANSEN, W. W.; PACKARD, M. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 69, n. 3-4, p. 127-127, 1946. ISSN 1079-7114.
- 21 LAUTERBUR, P. C. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. **Nature**, v. 242, p. 190-191, 1973. doi:10.1038/242190a0.
- 22 MANSFIELD, P.; GRANNELL, P. K. NMR 'diffraction' in solids? **Journal of Physics C: solid state physics**, v. 6, n. 22, p. L422-L426, 1973. ISSN 0022-3719.
- 23 ABRAGAM, A. **The principles of nuclear magnetism**. Oxford: Oxford University Press, 1961.
- 24 KÖCKENBERGER, W. Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 356, p. 641-652, 2000. ISSN 1460-2431.
- 25 KÖCKENBERGER, W. et al. High resolution NMR microscopy of plants and fungi. **Journal of Microscopy**, v. 214, n. 2, p. 182-189, 2004. ISSN 1365-2818.
- 26 HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, N. et al. An NMR study on internal browning in pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 260-270, 2007. ISSN 0925-5214.
- 27 SLICHTER, C. P. **Principles of magnetic resonance**. New York: Springer-Verlag, 1989.
- 28 HAACKKE, E. M. et al. **Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design**. New York: Wiley-Liss, 1999.
- 29 HASHIMOTO, R. F. **Visão e processamento de imagens**. Disponível em: <http://www.vision.ime.usp.br/~ronaldo/mac0417-03/sensoriamento_remoto/radiacao_eletro.html>. Acesso em: 20 out. 2015.
- 30 REIF, F. **Fundamentals of statistical and thermal physics**. New York: Mcgraw-Hill, 1965.

- 31 WANGSNESS, R. K. **Electromagnetic fields**. New York: John Wiley, 1979.
- 32 CALLAGHAN, P. T. **Principles of nuclear magnetic resonance microscopy**. New York: Oxford University Press Inc., 1995.
- 33 HAHN, E. L. Spin echos. **Physical Review**, v. 80, n. 4, p. 580-594, 1950. ISSN 1079-7114.
- 34 BRIGHAM, E. O. **The fast Fourier transform**. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 1974.
- 35 PAPOTI, D. **Transdutores de RF para experimentos de imagens em pequenos animais**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 36 BONAGAMBA, T. J. **Seleção de planos em tomografia por Ressonância Magnética Nuclear**. 1986. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1986.
- 37 XAVIER, R. F. **Desenvolvimento e construção de bobinas de gradiente com blindagem ativa (active shielding) com aplicação em imagens por RMN**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- 38 TANNÚS, A. **Desenvolvimento da tecnologia de tomografia por Ressonância Magnética Nuclear**. 1987. Tese (Doutorado) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.
- 39 PAIVA, F. F. **Metodologia de imagens de NMR que utiliza um único pulso adiabático de inversão**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- 40 CHEN, Q. et al. Fast magnetic resonance imaging techniques. **European Journal of Radiology**, v. 29, n. 2, p. 90-100, 1999. ISSN 1872-7727.
- 41 HAASE, A. et al. FLASH imaging. rapid NMR imaging using low flip-angle pulses. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 67, n. 2, p. 258-266, 1986. ISSN 1096-0856.
- 42 MARKL, M.; LEUPOLD, J. Gradient echo imaging. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 35, n. 6, p. 1274-1289, 2012. ISSN 1522-2586.
- 43 ERNST, R.; BODENHAUSEN, G.; WOKAUN, A. **Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions**. Oxford: Clarendon Press, 1987.
- 44 LASSO, P. R. O. **Avaliação da utilização de resíduos de construção civil e de demolição reciclados (RCD-R) como corretivos de acidez e condicionadores de solo**. 2011. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- 45 SILVA, A. M. et al. **Tomógrafo de resolução micrométrica para estudos de solos**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. (Boletim de pesquisa, 4/97). ISSN 1413-9537.
- 46 REIS NETO, J. M. et al. A microtomografia computadorizada de raios X integrada à petrografia no estudo tridimensional de porosidade em rochas. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 41, n. 3, p. 498-508, 2011. ISSN 2177-4382.

- 47 SARKAR, P. S. et al. Development and characterization of a 3D cone beam tomography system. **Nuclear Instruments and Methods in Physics**, v. 524, n. 1-3, p. 377-384, 2004. ISSN 0168-9002.
- 48 LIMA, I.; ASSIS, J. T.; LOPES, R. T. Three-dimensional conic beam X-ray microtomography in bone quality. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 64, n. 11-12, p. 1173-1179, 2009. ISSN 0584-8547.
- 49 VAN GEET, M.; SWENNEN, R. Quantitative 3D-fracture analysis by means of microfocus x-ray computer tomography (μ CT): an example from coal. **Geophysical Research Letters**, v. 28, n. 17, p. 3333-3336, 2001. ISSN 1944-8007.
- 50 VAN GEET, M.; SWENNEN, R.; WEVERS, M. Quantitative analysis of reservoir rocks by microfocus X-ray computerised tomography. **Sedimentary Geology**, v. 132, n. 1-2, p. 25-36, 2000. ISSN 0037-0738.
- 51 GOMES JUNIOR, F. G. **Injúrias mecânicas em sementes de Milho doce**. 2009. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- 52 WARREN, J. E.; BENNETT, M. A. Seed hydration using the drum priming system. **HortScience**, v. 32, n. 7, p. 1220-1221, 1997. ISSN 2327-9834.
- 53 GOMES JUNIOR, F. G. et al. Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. **Seed Technology**, v. 31, n. 1, p. 95-100, 2009. ISSN 1096-0724.
- 54 GINSBERG, D. M.; MELCHNER, M. J. Optimum geometry of saddle shaped coils for generating a uniform magnetic field. **Review of Scientific Instruments**, v. 11, n. 1, p. 122-123, 1970. ISSN 1089-7623.
- 55 MINARD, K. R.; WIND, R. A. Solenoidal microcoil design. part II: optimizing winding parameters for maximum signal-to-noise performance. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 13, n. 2, p. 190-210, 2001. ISSN 1552-5023.
- 56 MINARD, K. R.; WIND, R. A. Solenoidal microcoil design. part I: optimizing RF homogeneity and coil dimensions. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 13, n. 2, p. 128-142, 2001. ISSN 1552-5023.
- 57 D'EURYDICE, M. N. **Desenvolvimento de metodologias para o estudo de meios porosos por Ressonância Magnética Nuclear**. 2011. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 58 BORGIA, G. C.; BROWN, R. J.; FANTAZZINI, P. Uniform-penalty inversion of multiexponential decay data. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 132, n. 1, p. 65-77, 1998. ISSN 1090-7807.
- 59 CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630-638, 1954. ISSN 1079-7114.
- 60 MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688-691, 1958. ISSN 1089-7623.
- 61 HAASE, A. et al. NMR probeheads for in vivo applications. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 12, n. 6, p. 361-388, 2000. ISSN 1552-5023.

- 62 PAPOTI, D. **Desenvolvimento de bobinas de RF transmissoras e receptoras do tipo phased arrays para experimentos de imagens por Ressonância Magnética em ratos**. 2011. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 63 KAUFMAN, L. et al. Measuring signal-to-noise ratios in MR imaging. **Radiology**, v. 173, n. 1, p. 265-267, 1989. ISSN 1527-1315.
- 64 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 398 p.
- 65 KRISHNAN, P.; NAGARAJAN, S.; MOHARIR, A. V. Changes in NMR relaxation times in soybean and wheat seeds equilibrated at different temperatures and relative humidity. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, n. 1, p. 46-50, 2003. ISSN 0975-0959.
- 66 KRISHNAN, P. et al. Characterisation of soybean and wheat seeds by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 1, p. 117-120, 2004. ISSN 1573-8264.
- 67 MIKAC, U.; SEPE, A.; SERSA, I. MR microscopy for noninvasive detection of water distribution during soaking and cooking in the common bean. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 33, n. 3, p. 336-345, 2015. ISSN 0730-725X.
- 68 ZHANG, L.; MCCARTHY, M. J. NMR study of hydration of navy bean during cooking. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 402-408, 2013. ISSN 0023-6438.
- 69 IDIYATULLIN, D. et al. Fast and quiet MRI using a swept radiofrequency. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 181, n. 2, p. 342-349, 2006. ISSN 1096-0856.
- 70 IDIYATULLIN, D. et al. Gapped pulses for frequency-swept MRI. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 193, n. 2, p. 267-273, 2008. ISSN 1096-0856.
- 71 ROBSON, M. D. et al. Magnetic resonance: an introduction to ultrashort TE (UTE) imaging. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 27, n. 6, p. 825-846, 2003. ISSN 0363-8715.
- 72 WEIGER, M.; PRUESSMANN, K. P.; HENNEL, F. MRI with zero echo time: hard versus sweep pulse excitation. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 66, n. 2, p. 379-389, 2011. ISSN 0740-3194.
- 73 HONG, Y. et al. Artifacts in the measurement of water distribution in soybeans using MR imaging. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 267-272, 2009. ISSN 0308-8146.
- 74 PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

APÊNDICE A: Imagens por Ressonância Magnética

Neste apêndice é apresentado o conjunto de imagens de algumas sementes utilizadas nesta pesquisa obtidas pela técnica de Ressonância Magnética. A sequência utilizada para a aquisição das imagens (FLASH) nos retorna um conjunto de imagens, ou tomos, do objeto tridimensional, através de imagens bidimensionais. As imagens obtidas pela bobina do tipo sela cruzada contém quatro sementes para cada aquisição, enquanto que para a bobina do tipo solenoide as aquisições das imagens ocorreram de forma individual para cada semente.

Assim, como foi apresentado no texto desta pesquisa, será mostrado primeiro as imagens das sementes obtidas pela bobina do tipo sela cruzada nas suas condições normais de armazenamento, isto é, sem a hidratação. Posteriormente a isso, será apresentada as imagens das sementes obtidas pelas bobinas dedicadas, na condição seca e hidratada.

Na Figura 53 temos as imagens das sementes de Soja marcadas por 17 e 18 na parte superior das imagens, formando o grupo controle, enquanto que as sementes inferiores somente são utilizadas para a geração da imagem.

Figura 53 - Imagens da semente 17 e 18 de Soja secas do grupo controle, mantidas em condições normais de armazenamento, obtidas pela bobina tipo Sela Cruzada.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir, Figura 54, é apresentado o conjunto de imagens das sementes de Milho mercadas por 19 e 20, obtidas pela bobina do tipo sela cruzada e mantidas em condições normais de armazenamento, formando o grupo controle. As sementes em questão são as que se encontram na parte superior de cada imagem.

Figura 54 - Imagens da semente 19 e 20 de Milho secas do grupo controle, mantidas em condições normais de armazenamento, obtidas pela bobina tipo Sela Cruzada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na próxima etapa, com a aquisição das imagens das sementes sendo feita com a utilização da bobina dedicada tipo solenoide, é apresentado as imagens da semente de Soja 10, Figuras 55 e 56, nas condições normais e hidratada (3 horas de hidratação pelo método do papel), respectivamente, que também foi submetida a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp.

Figura 55 - Imagens da semente 10 de Soja seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses, obtida pela bobina tipo solenoide.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 56 apresenta as imagens obtidas da semente de Soja 10 quando hidratada por um período de 3 horas através do método do papel.

Figura 56 - Imagens da semente 10 de Soja hidratada por um período de 3 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. obtida pela bobina tipo solenoide.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Agora, é apresentado as imagens da sementes de Milho 13 que foram obtidas com a bobina dedicada tipo solenoide, Figuras 57 e 58, nas condições normais e hidratada (4 horas de hidratação pelo método do papel para que a semente atingisse um teor de água de 15 %), submetida a danos mecânicos e inoculada com o fungo de armazenamento *Aspergillus* spp.

Figura 57 - Imagens da semente 13 de Milho seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses, obtida pela bobina tipo solenoide.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 58 é disposto as imagens obtidas da semente de Milho 13 quando hidratada por um período de 4 horas através do método do papel.

Figura 58 - Imagens da semente 13 de Milho hidratada por um período de 4 horas, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. obtida pela bobina tipo solenoide.
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE B: Imagens por Microtomografia Computadorizada

Por outro lado, nesta pesquisa também foram obtidas imagens das sementes de Soja e Milho através da técnica de Microtomografia Computadorizada de raios X, que se baseia nos mesmos princípios que a imagem radiográfica tradicional, com a vantagem de que aqui, é adquirido um conjunto de imagens bidimensionais do objeto que, após reconstrução por retroprojeção, é criada uma imagem tridimensional, possibilitando a avaliação interna sem a necessidade de destruir o objeto, apesar de utilizar radiação ionizante.

Pelo fato da imagem por micro-TC se basear, entre outros fatores, na densidade do objeto e, como a hidratação causa uma pequena alteração nesse parâmetro, não houve mudanças significativas no contraste da imagem de sementes secas e hidratadas.

Por isso, é apresentado neste apêndice as imagens da semente de Soja 17 do grupo controle e a semente 1 que foi submetida a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. Ambas as imagens foram adquiridas em condições normais de armazenamento, sem hidratação.

Figura 59 - Imagens da semente 17 de Soja seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 60 - Imagens da semente 1 de Soja seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Penicillium* spp. por um período de 6 meses.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir, são apresentadas as imagens das sementes de Milho 20 do grupo controle, sem danos mecânicos e inoculação de fungos, mantida em condições normais de armazenamento.

Figura 61 - Imagens da semente 20 de Milho seca do grupo controle, mantida em condições normais de armazenamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Finalmente, temos na Figura 62 as imagens de micro-TC da semente de Milho 13, que foi submetida a danos mecânicos e inoculada com o fungo de armazenamento *Aspergillus* spp.

Figura 62 - Imagens da semente 13 de Milho seca, sujeita a danos mecânicos e inoculada com o fungo *Aspergillus* spp. por um período de 6 meses.
Fonte: Elaborada pelo autor.