

Capítulo 3

Fundamentos e aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) em baixo campo em pós-colheita de frutas e hortaliças

Douglas William Menezes Flores

Marilia Bizzani

Luiz Alberto Colnago



XII International Meeting of H22



1. Introdução

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica que vem se destacando com inúmeras aplicações em diversos ramos da ciência, tais como: Química, Física, Medicina e Engenharias. Sua aplicação abrange a determinação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, a quantificação de metabólitos em extratos e nos tecidos intactos, água e gordura em alimentos e outros sistemas biológicos de maneira não destrutiva (VAN DUYNHOVEN et al., 2010).

As aplicações da RMN podem ser divididas em tomográficas e espectroscópicas. Nas aplicações tomográficas obtêm-se informações da distribuição espacial (imagens) da água e gordura em tecidos biológicos, desde alimentos até seres humanos. Nas aplicações espectroscópicas obtêm-se informações espectrais que podem ser usadas na determinação de estrutura molecular, concentração dos componentes em amostras como extratos, sucos, alimentos intactos, entre muitas outras aplicações. As aplicações espectroscópicas podem ser subdivididas em aplicações em baixa e alta resolução. A RMN em alta resolução em alto campo é usada principalmente na determinação de estrutura e dinâmica molecular, concentração dos componentes de amostras em solução entre muitas outras aplicações. A RMN em baixa resolução em baixo campo é largamente usada no controle de qualidade de indústria de alimentos há mais de 40 anos. Nas últimas duas décadas passou também a ser usada em horticultura como método não invasivo para avaliação de injúrias mecânicas, estudos fisiológicos e atributos sensoriais (FLORES et al., 2016; PEREIRA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2010).

2. Fundamentos da RMN

A RMN é observada quando certos núcleos atômicos como, por exemplo, os isótopos de hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C) e flúor (^{19}F), que possuem momento angular ou spin (L) diferente de zero, são submetidos a um campo magnético estático, denominado B_0 e a um campo magnético oscilante, denominado de B_1 .

Quando os momentos magnéticos desses núcleos não estão na presença de um campo magnético, eles não têm orientação preferencial e suas direções são aleatórias (Figura 1A). Quando submetidos a um campo B_0 esses isótopos orientam-se em relação ao campo magnético e passam a precessionar (fenômeno que consiste na mudança do eixo de rotação) com uma frequência angular denominada frequência de Larmor (Figura 1B). A frequência de precessão é proporcional ao campo magnético, B_0 , e à razão magnetogírica, tal que:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \text{ Equação (1)}$$

γ = razão magnetogírica e ω_0 = velocidade angular de precessão (rad/s).

Na Figura 1B tem-se um modelo vetorial dos momentos magnéticos individuais (μ) de núcleos com spin $1/2$, como o ^1H , precessionando em torno do eixo z que é a direção do campo magnético B_0 . Devido à distribuição aleatória de um número grande de μ a resultante no plano xy é nula (RIBEIRO et al., 2010). Entretanto, devido à diferença de energia entre os níveis, há sempre um excesso de população alinhada a favor de B_0 (α), o que torna a componente no eixo $+z$ não nula. Neste caso, ilustrado na Figura 1C, o vetor resultante do somatório dos vetores individuais μ em relação ao eixo $+z$ é chamado de magnetização resultante ou M_0 .

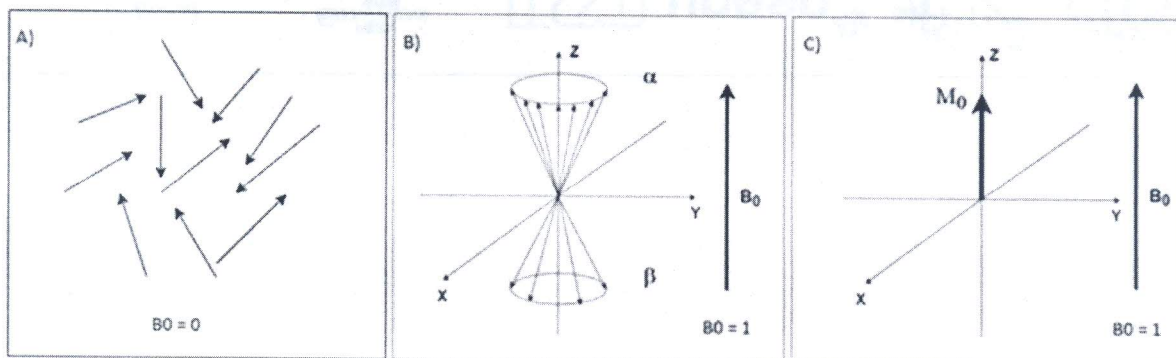


Figura 1A, 1B, 1C. Representação dos spins fora do campo magnético B_0 (A), cone de precessão (B) e do vetor magnetização resultante (M_0) no estado de equilíbrio térmico (C).
 Fonte: Adaptado de Forato, Bernardes Filho e Colnago (2011).

Para a obtenção do sinal de RMN, é necessário deslocar a magnetização resultante para o plano xy. Para isso usa-se um campo magnético oscilante, B_1 , na frequência de Larmor (Equação 1) e perpendicular a B_0 (Figura 2). Nos espectrômetros modernos o B_1 é aplicado na forma de um pulso (espectrômetro pulsado). O pulso faz com que a magnetização M_0 , que estava originalmente na direção do campo B_0 (eixo z), gire em um ângulo θ , proporcional à duração do pulso (t_p), à intensidade do campo B_1 e a γ (Equação 2).

$$\theta = \gamma B_1 t_p \text{ Equação (2)}$$

O pulso leva a uma magnetização no plano xy, originando as componentes M_x e M_y conforme a Figura 2.

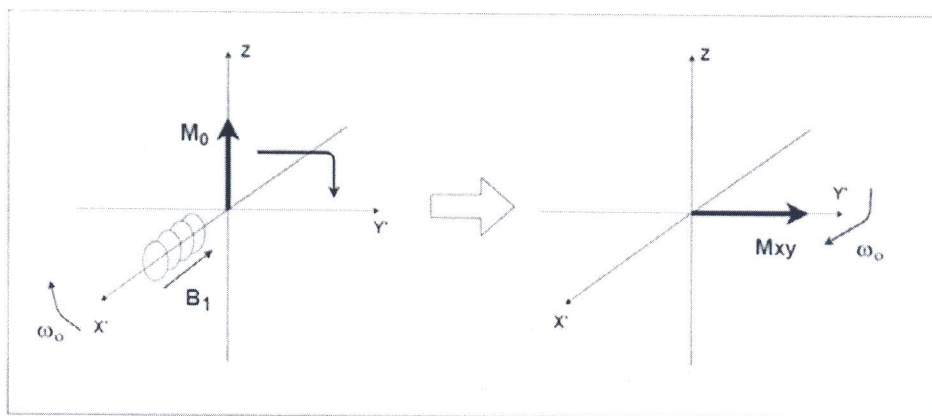
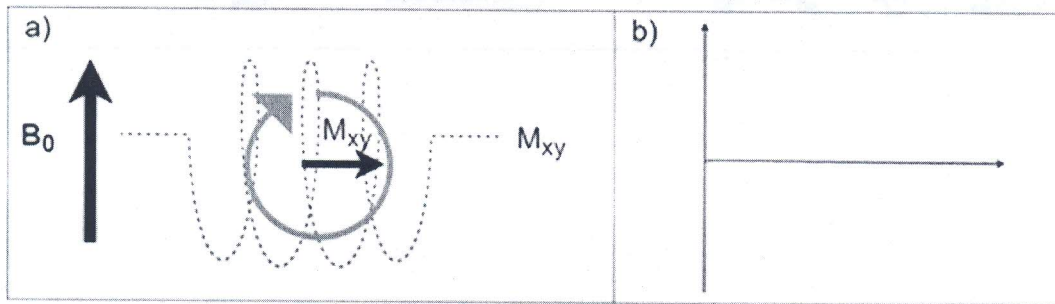


Figura 2. Efeito da aplicação de B_1 em M_0 no referencial rotativo.
 Fonte: Adaptado de Forato, Bernardes Filho e Colnago (2011).

Após o pulso, B_1 é desligado e o processo de restabelecimento do equilíbrio térmico é iniciado. Esse fenômeno é conhecido como relaxação. Durante a relaxação, quando a magnetização volta a precessionar em torno de B_0 , também é feita a aquisição do sinal de RMN. Esta aquisição, é feita pelo processo de rotação da magnetização no plano xy (Figura 3A) a qual induz uma voltagem oscilante na bobina de recepção, conforme a Figura 3B. A voltagem induzida gera um sinal analógico, denominado FID (*Free Induction Decay*).



Figuras 3 A, B. Rotação de M_{xy} na bobina de recepção (a) sinal induzido (FID) (b).
 Fonte: Adaptado de Forato, Bernardes Filho e Colnago (2011).

O FID passa por dois processos de relaxação distintos: a relaxação longitudinal (T_1), que está envolvida no retorno da magnetização ao equilíbrio térmico; e a relaxação transversal (T_2), que está relacionada com o desaparecimento do sinal no plano $x'y'$. Esses tempos de relaxação interferem diretamente na quantificação da técnica, largura da linha, decaimento do FID entre outras variáveis.

2.1. Medida do tempo de relaxação longitudinal (T_1)

O processo de relaxação longitudinal ou spin-rede encontra-se relacionado ao retorno da magnetização ao estado de equilíbrio térmico, M_0 . Este processo é resultado da existência de momentos magnéticos transitórios produzidos pelos movimentos rotacionais e translacionais de moléculas da vizinhança. O T_1 é responsável pela recuperação exponencial do módulo da magnetização, ao longo do eixo z (M_z) de acordo com a Equação 3:

$$M_z(t) = M_0 [1 - \exp(-t/T_1)] \quad \text{Equação (3)}$$

Assim, para análises quantitativas, o T_1 deve ser conhecido ou estimado para evitar a saturação de um ou mais sinais da amostra. Normalmente é necessário um tempo de espera, T_r , de pelo menos $5T_1$ entre cada varredura do espectro de RMN para que a magnetização M_z retorne aproximadamente 99% de M_0 .

A técnica de Inversão-Recuperação (IR) é a mais utilizada na determinação de T_1 , que consiste na aplicação de um pulso de inversão de 180° e um pulso de leitura de 90° , a partir do qual o sinal FID é detectado, separados por um tempo t_n durante o qual se desenvolve o processo de relaxação longitudinal, demonstrado na Figura 4.

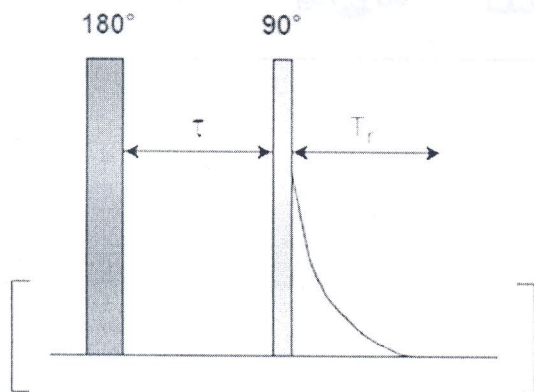


Figura 4. Representação da técnica de Inversão-Recuperação, para determinação do tempo de relaxação longitudinal T_1 .

Fonte: Adaptado de Colnago e Andrade (2017).

O pulso de 180° inverte a magnetização no equilíbrio térmico M_0 , deslocando-a do eixo $+z$ para o eixo $-z$. Durante o tempo de espera t_n , os momentos magnéticos relaxam, fazendo com que a magnetização retome sua orientação inicial. Em seguida, o pulso de leitura de 90° deflete a magnetização longitudinal M_z na direção do plano $x'y'$ e o sinal FID $I^{IR}(t)$ é detectado. Assim, para se obter o valor de T_1 realizam-se várias medições incrementando os valores de t_n até que o sinal detectado alcance um valor máximo.

Um modelo vetorial, em termos da dinâmica da magnetização longitudinal, é mostrado na Figura 5. Para valores de t_n muito curtos em relação ao tempo de relaxação T_1 , a magnetização permanece quase toda invertida, produzindo um sinal negativo após o pulso de 90° , tempo $t_n = 0$ na Figura 5. Para um valor de t_n igual a $T_1 \cdot \ln(2)$, a magnetização se anula, $M_z = 0$, e não se observa nenhum sinal após o pulso de 90° , tempo $t_n = t_1$ na Figura 5. A partir deste ponto, o sinal de RMN após o pulso de 90° é positivo, atingindo um máximo ($M_z = M_0$) para $t_n > 5T_1$.

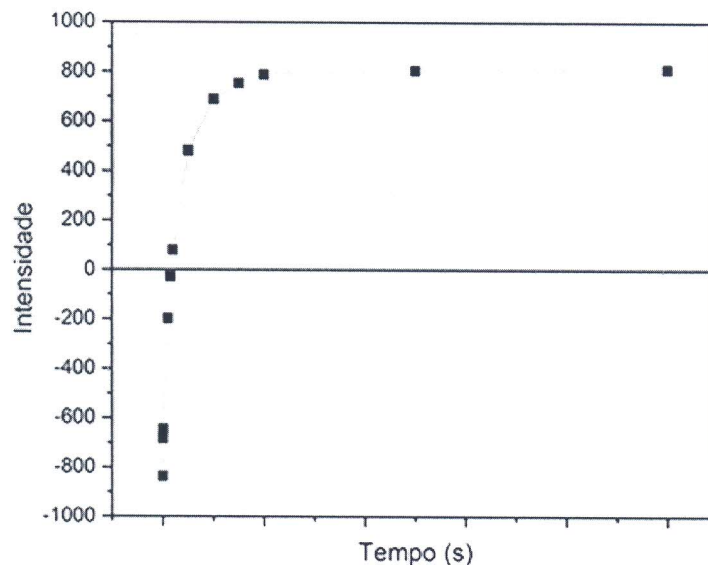


Figura 5. Representação da dinâmica da magnetização submetida à sequência de pulsos do experimento Inversão-Recuperação. Cada ponto da curva representa a magnitude da magnetização longitudinal M_z . Fonte: Adaptado de Colnago e Andrade (2017).

2.2. Medida do tempo de relaxação transversal (T_2)

O processo de relaxação transversal spin-spin está relacionado à perda de coerência da magnetização no plano x^1y^1 . Essa perda de coerência é atribuída às interações diretas entre os momentos magnéticos individuais dos spins em uma amostra. A relaxação transversal provoca um decaimento exponencial da magnetização transversal, de acordo com a Equação 4:

$$M_y(t) = M_{xy} \cos \omega_0 t \exp(-t/T_2) \text{ Equação (4)}$$

O método mais utilizado para a medida de T_2 é conhecido como CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) (ANDRADE; NETTO; COLNAGO, 2011) (Figura 6). A sequência CPMG recupera o sinal de RMN na forma de eco de spin e consiste em um pulso de rádio frequência de 90° , aplicado no eixo x^1 , seguido de um intervalo τ e de um trem de pulso de 180° , aplicado no eixo y^1 . Este método possibilita as medidas das intensidades de n ecos para diversos tempos $t=2n\tau$, até que o eco não seja mais observado.

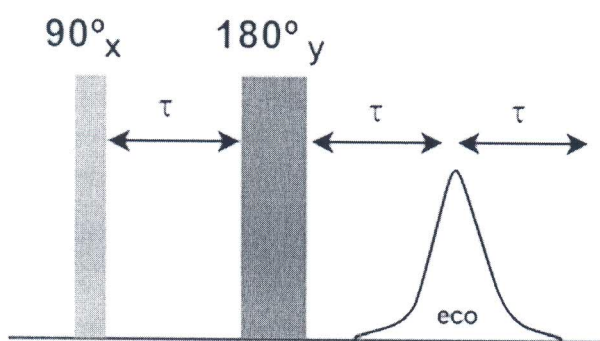


Figura 6. Técnica de eco de spin, mostrando a formação do eco após a aplicação do pulso de refocalização 180° , com máximo em 2τ .
Fonte: Adaptado de Colnago e Andrade (2017).

O CPMG é hoje o método padrão para medida de T_2 dos componentes com alta mobilidade e largamente usado para análises qualitativas e quantitativas em RMN-DT. Essas análises são baseadas, principalmente, nas diferenças entre os tempos de relaxação transversal, T_2 , dos vários componentes da amostra (ANDRADE; NETTO; COLNAGO, 2011).

3. Aplicações prontas para uso e tendências de desenvolvimento

A RMN no domínio do tempo (RMN-DT) também é conhecida como RMN em baixa resolução ou baixo campo. Por mais de 40 anos a RMN-DT vem sendo utilizada para controle de qualidade de matéria prima em indústrias de alimentos. Reconhecida pela International Standard (ISO), a RMN-DT é aplicada para mensurar a razão do teor de gordura sólida (*Solid Fat Content – SFC*) e líquida em óleos, gorduras e composições de margarinas e chocolates. Este tipo de aplicação da RMN-DT é primordial para o desenvolvimento de novos produtos e controle dos processos industriais e é padronizada pela ISO8292-1 e pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS) método Cd16b-93.

No ramo do agronegócio a RMN-DT está posicionada entre umas das poucas técnicas analíticas com potencial de medir a qualidade de grãos, frutas e hortaliças em seu estado original, sem a necessidade de algum processo que antecede a leitura. A RMN-DT possui metodologias padronizadas pela ISO que permite quantificar simultaneamente o teor de óleo e umidade em sementes de colza, sementes de soja, sementes de linhaça e sementes de girassol com um teor de água inferior a 10%. Nesta aplicação, a RMN-DT utiliza uma sequência de pulsos chamada *Free Induction Decay* (FID) associada à *Echo-Spin* (FID-Echo), em que a FID é originada após um pulso de radio frequência de 90° e o eco é resultante da aplicação de

um pulso de radiofrequência de 180° seguido de mais um pulso de 90° . A razão entre a intensidade da FID e do *echo* dividida pela massa da amostra pode ser calibrada para o teor de umidade e somente a intensidade do *echo* é utilizada para calibrar o teor de óleo (VAN DUYNHOVEN et al., 2010).

As aplicações da RMN-DT para teor de gordura sólida (SFC), teor de óleo e umidade em grãos já são métodos comercialmente disponíveis por empresas especializadas que entregam softwares junto dos equipamentos que permitem através de um botão realizar a medida em apenas alguns segundos sem a necessidade de um especialista em RMN para configurar ou calibrar o equipamento. Entre elas, uma empresa Brasileira (*Fine Instrument Technology*, São Carlos-SP), uma Argentina (*Spin Lock*, Cordoba-AR) entre outras na Europa e Estados Unidos (MEYER et al., 2016).

A RMN-DT também está presente no setor citrícola com aplicações que visam controlar os processos de extração-filtração de suco de laranja via análises dos tempos de relaxação transversal (T_2) utilizando a sequência de pulsos CPMG em amostras retiradas diretamente do processo e inseridas no equipamento. A RMN é capaz de ser calibrada utilizando os valores de T_2 com os valores da análise da polpa chamada pela indústria de *QuickFiber* (QF teste de fibra rápida) que quantifica em mililitros o teor de suco disponível no bagaço/polpa de laranja retida no equipamento de filtração. Se o valor de QF está muito alto ou muito baixo indique a etapa de filtração deve ser regulada para garantir o alto rendimento industrial (MILLA et al., 2014).

Na cadeia de produção e extração de óleo de palma a RMN-DT começou a ser utilizada para mensurar o teor de óleo residual em pasta de frutos de palma prensados durante o processo de extração. A medida do teor de óleo via RMN-DT substitui a extração/quantificação via *Soxhlet* que leva em torno de 24 horas para ser concluída, aumentando assim, o tempo de resposta para ajuste do processo de prensagem dos frutos para obtenção do óleo de palma.

Recentemente, a RMN-DT vem sendo explorada juntamente de análises de componentes principais (*Principal Components Analysis* - PCA), modelos de regressão lineares multivariados (*Partial Least Squares*- PLS) e modelos de classificação (*Partial Least Squares Discriminant analysis*- PLS-DA). Estas técnicas matemáticas possibilitam extrair um número maior de informação nos sinais de RMN-DT que resultam em novas aplicações, muitas delas, não invasivas e não destrutivas, indicando assim, uma tendência de desenvolvimento de novas aplicações da RMN-DT para frutas e outros alimentos empregando tais metodologias.

O uso do sinal de RMN-DT obtido via sequência de CPMG explorado com as análises multivariadas possibilitou a avaliação não invasiva do teor de sólidos solúveis (Figura 7), pectina total, firmeza e espessura da casca em laranjas (BIZZANI et al., 2017; FLORES et al., 2016) e teor de sólidos solúveis em ameixas inteiras (PEREIRA et al., 2013).

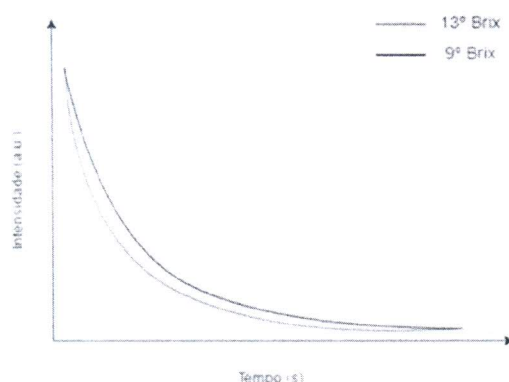


Figura 7. Sinais de RMN-DT obtidos via CPMG de duas laranjas com diferentes teores de sólidos solúveis totais (°Brix).

Fonte: Flores et al. (2016), autorizado pelo autor Elsevier (2016).

A abordagem não invasiva da RMN-DT juntamente com uso de técnicas quimiométricas via método de PLS-DA possibilitou classificar laranjas colhidas aleatoriamente em duas classes distintas, uma de elevado teor de sólidos solúveis e uma de baixo teor de sólidos solúveis (FLORES et al., 2016) (Figura 8).

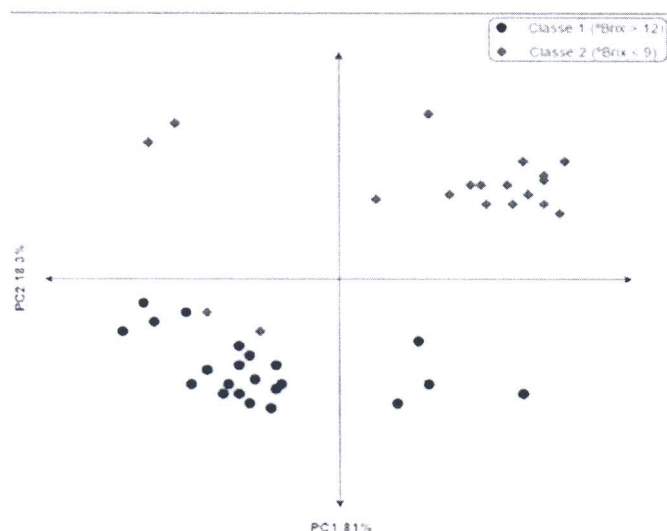


Figura 8. Análise de componentes principais realizada utilizando sinais de RMN-DT obtidos via CPMG de laranjas com diferentes teores de sólidos solúveis. Fonte: Flores et al. (2016), autorizado pelo autor Elsevier (2016).

Com esta classificação não invasiva, é possível direcionar os frutos de alto teor de sólidos para a extração de suco (Classe 1) e realizar a comparação e avaliação sensorial quanto ao atributo “doce” percebido por provadores em uma análise de comparação pareada dessas amostras (Figura 9).

Análise de comparação pareada

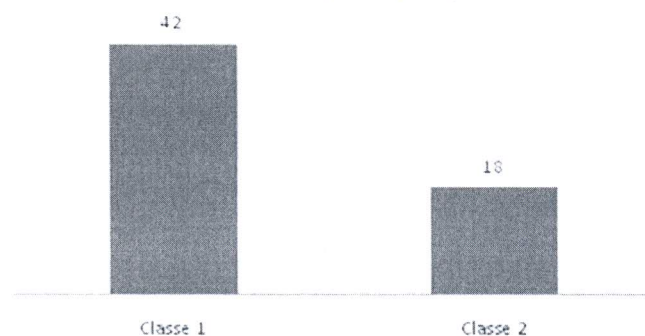


Figura 9. Análise de comparação pareada realizada utilizando sucos das laranjas de Classe 1 ($> 12^\circ$ Brix) e Classe 2 ($< 9^\circ$ Brix) com 60 provadores não treinados. Fonte: Flores et al. (2016), autorizado pelo autor Elsevier (2016).

Os resultados indicaram que o RMN-DT foi capaz de classificar laranjas para sucos de duas classes distintas (Classe 1 e Classe 2), de forma não invasiva, pelo teor de sólidos solúveis de forma significativa, algo percebido pelos provadores dos sucos dentro de um intervalo de confiança de 95% (FLORES et al., 2016).

Desta forma, neste capítulo, foram apresentados os fundamentos da técnica de RMN no domínio do tempo e suas aplicações prontas para uso e tendências de desenvolvimento. Os trabalhos mencionados têm por objetivo oferecer um método de avaliação da qualidade interna de alimentos, de forma rápida e não destrutiva, que pode ser utilizado em unidades de beneficiamento de frutas e hortaliças.

Referências

- ANDRADE, F. D.; NETTO, A. M.; COLNAGO, L. A. Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles. **Talanta**, v. 84, n. 1, p. 84–88, 2011.
- BIZZANI, M.; FLORES, D. W. M.; COLNAGO, L. A.; FERREIRA, M. D. Non-invasive spectroscopic methods to estimate orange firmness, peel thickness, and total pectin content. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 168–174, 2017.
- COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D. de. RMN no domínio do tempo: fundamentos e aplicações offline e inline. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4, p. 439-470.
- FORATO, L. A. ; BERNADES FILHO, R. ; COLNAGO, Luiz Alberto. Análise da qualidade de frutas por ressonância magnética nuclear. In: Marcos Davi Ferreira. (Org.). **Tecnologias pós colheita em frutas e hortaliças**. 1a ed. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. v. 1, p. 173-182.
- FLORES, D. W. M.; COLNAGO, L. A.; FERREIRA, M. D.; SPOTO, M. H. F. Prediction of Orange juice sensorial attributes from intact fruits by TD-NMR. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 113–117, 2016.
- MEYER, K., KERN, S., ZIENTEK, N., GUTHAUSEN, G., MAIWALD, M. Process control with compact NMR. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 83, p. 39-52, 2016.
- MILLA, J. D.; SCHRADER, G. W.; SUTER, M. L.; DANNER, D. S. **U.S. Patent n. 8,820,226**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2014.
- PEREIRA, F. M. V.; DE SOUZA CARVALHO, A.; CABEÇA, L. F.; COLNAGO, L. A. Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Microchemical Journal**, 108, p. 14-17, 2013.
- RIBEIRO, F. Z.; MARCONCINI, L. V.; DE TOLEDO, I. B.; DE VASCONCELLOS AZEREDO, R. B.; BARBOSA, L. L.; COLNAGO, L. A. Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: A new mechanism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 12, p. 2052–2057, 2010.
- VAN DUYNHOVEN, J.; VODA, A.; WITEK, M.; VAN AS, H. Time-domain NMR applied to food products. **Annual reports on NMR spectroscopy**, 69, p. 145-197, 2010.