



## APLICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE PULSOS SSFP COM ALTERNÂNCIA DE FASE PARA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE ÓLEO EM SEMENTES

T. Monaretto<sup>1</sup>, F.D. Andrade<sup>2</sup>, T.B. Moraes<sup>3</sup>, L.A. Colnago<sup>2</sup>

- (1) Instituto de Química de São Carlos, IQSC/USP, Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, 13566-590, São Carlos, SP, tatiana.monaretto@gmail.com  
(2) Embrapa Instrumentação, XV de novembro, 1452, 13566-590, São Carlos, SP, fabianadiuk@yahoo.com.br, luiz.colnago@embrapa.br  
(3) Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP, Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, 13566-590, São Carlos, SP, tiagobuemoraes@gmail.com

**Resumo:** óleos provenientes de sementes oleaginosas geneticamente modificadas tem sido uma alternativa para aumentar a qualidade dos óleos utilizados em aplicações alimentícias e em biocombustíveis. Os métodos analíticos muitas vezes utilizados para análises dessas sementes geneticamente modificadas são demorados e trabalhosos. Neste trabalho, propõe-se a utilização de uma nova técnica rápida de RMN de baixa resolução, CPMG<sub>90y-y'</sub>. Esse novo método pode determinar tanto a quantidade quanto a qualidade do óleo das sementes. Isso é muito importante para o programa de melhoramento genético e controle de qualidade industrial onde a velocidade de obtenção de informações é crucial para a eficiência do processo.

**Palavras-chave:** estado estacionário de precessão livre, RMN, sementes.

### APPLICATION OF SSFP PULSE SEQUENCE WITH PHASE ALTERNATION FOR QUALITATIVE EVALUATION IN OILSEEDS

**Abstract:** oils derived from genetically modified oilseeds have been an alternative to increase the quality of the oils used in food applications and biofuels. The analytical methods often used for analyzes of these genetically modified seeds are laborious and time consuming. This work proposes the use a new rapid technique for low-resolution NMR analysis using steady state free precession method with phase alternation called CPMG<sub>90y-y'</sub>. This sequence can be use for quantitative and qualitative analysis of oilseeds. Therefore, this method can be very important for the breeding program and industrial quality control, where rapid analyses are crucial for the processes.

**Keywords:** steady state free precession, NMR, seeds.

### 1. Introdução

A crescente busca das indústrias alimentícias e de biocombustíveis por óleos vegetais de alta qualidade vem impulsionando pesquisas voltadas ao melhoramento genético das sementes de oleaginosas. A indústria alimentícia tem buscado óleos estáveis e funcionais, sem ácidos graxos *trans*, associados às doenças cardiovasculares. Estas indústrias também procuram por oleaginosas com alta concentração de ácido esteárico, para substituição da margarina e manteiga hidrogenada (PRESTES, COLNAGO, *et al.*, 2007). Ácidos graxos modificados também são uma alternativa para produção de biodiesel de alta qualidade. As propriedades do biodiesel como: capacidade de ignição, calor de combustão, estabilidade oxidativa, viscosidade e a lubrificação são dependentes das características dos ácidos graxos presentes nas sementes oleaginosas. Os ácidos graxos poli-insaturados são mais instáveis do que os monoinsaturados e saturados. Enquanto os saturados apresentam alta viscosidade e tendência em solidificar no frio.

Técnicas analíticas instrumentais utilizadas para determinação da qualidade dos ácidos graxos são baseadas em cromatografia gasosa (CG), espectroscopia de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de alta resolução (RMN-AR) do <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Porém, estas técnicas são trabalhosas, demandam muito tempo e destroem a amostra. Além disso, um programa de melhoramento genético demanda um grande número de análises (PRESTES, COLNAGO, *et al.*, 2007). Alternativamente, a RMN de baixa resolução (RMN-BR) tem se tornado uma ferramenta robusta, rápida e de melhor custo/benefício para análises de alimentos. As análises são baseadas, principalmente, no tempo de relaxação transversal (T<sub>2</sub>) utilizando a sequência *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) para análises quantitativas e qualitativas dos ácidos graxos em sementes intactas. (PRESTES, COLNAGO, *et al.*, 2007).

Recentemente, técnicas que utilizam menor potência vêm sendo desenvolvidas para análises *online* rápidas, dentre elas a CPMG<sub>90</sub> (trem de pulsos de 90°) e a técnicas do estado estacionário como *continuous wave free*

*precession* (CWFP) e *Carr-Purcell continuous wave free precession* (CP-CWFP). Estes métodos vêm sendo amplamente empregada em análises de alimentos como óleos e gorduras, sementes, frutas e produtos industrializados, tanto no modo estático (*offline*) quanto no modo *online*.

### 1.1. Estado estacionário

O método CWFP, uma condição especial do *steady state free precession* (SSFP), foi primeiramente apresentado por Azeredo e colaboradores (2000). Esta técnica é composta por um trem de pulsos de  $\pi/2_x$  espaçados por um  $\tau < T_2^*$ . O comportamento da magnetização frente à aplicação de uma sequência de pulsos idênticos e com igual espaçamento entre eles foi descrito por Ernest e Anderson (1966) através de expressões analíticas, derivadas da equação de Bloch (equações 1-4). Estas equações descrevem um conjunto de isocromatas no estado estacionário (EE) com frequência angular  $\omega_0$  onde a componente  $M_{xy}^-$  representa a magnetização antes de cada pulso, denominada *eco*. A componente  $M_{xy}^+$  da magnetização é denominada de FID, e é obtida após a aplicação de um pulso  $\alpha$  ( $\alpha =$  ângulo de rotação). (ERNEST e ANDERSON, 1966).

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

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

$$M_z^- = M_0 (1 - E_1) [1 - E_2 \cos \psi - E_2 \cos \alpha (\cos \psi - E_2)] / D \quad (3)$$

$$D = (1 - E_1 \cos \alpha) (1 - E_2 \cos \psi) - (E_1 \cos \alpha) (E_2 - \cos \psi) E_2 \quad (4)$$

Nas equações descritas acima,  $\psi = (\omega - \omega_0) \tau$  representa o ângulo de precessão das isocromatas,  $\omega_0$  é a frequência angular de precessão,  $M_0$  a magnetização no equilíbrio térmico,  $E_1 = \exp(-\tau/T_1)$ ,  $E_2 = \exp(-\tau/T_2)$ ,  $\tau$  o tempo entre os pulsos e  $T_1$  e  $T_2$ . (ERNEST e ANDERSON, 1966)

Venâncio e colaboradores (2005) também demonstram que a sequência CWFP pode ser usada para medida simultânea dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  em um único experimento, com mesma duração da sequência CPMG (VENÂNCIO, ENGELSBERG, *et al.*, 2005). No experimento CWFP a magnetização decresce exponencialmente até atingir um EE conforme equação 5. Este decaimento nos fornece o  $T^*$ . Por meio deste e da amplitude da magnetização no EE é possível determinar os tempos de relaxação, equações 6 e 7.

$$M(\tau) = M_0 \exp(-\tau/T^*) \quad (5)$$

$$T^* = 2T_1 T_2 / (T_1 + T_2) \quad (6)$$

$$[(M_x^\pm)^2 + (M_y^\pm)^2]^{1/2} = M_0 T_2 / (T_1 + T_2) = M_{EE} \quad (7)$$

Rearranjado as equações acima:

$$T_1 = (T^* (\pi/2) / 2) / (M_{EE} / M_0) \quad (8)$$

$$T_2 = (T^* (\pi/2) / 2) / (1 - (M_{EE} / M_0)) \quad (9)$$

Entretanto, quando  $T_1$  e  $T_2$  da amostra são parecidos, a medida de relaxação por CWFP é muito sensível a ruídos devido à pequena diferença de amplitude entre os sinais do estado *quasi*-estacionário (*EQE*) e *EE*. Para resolver esse problema, Andrade e colaboradores (2011) introduziram uma sequência denominada *Carr-Purcell-continuous wave free precession* (CP-CWFP). O sinal gerado por CP-CWFP apresenta uma grande diferença de amplitude entre os estados *EQE* e *EE*, permitindo um melhor ajuste da curva de  $T^*$  para amostras com  $T_1 \sim T_2$ . (ANDRADE, NETTO e COLNAGO, 2011)

Porém, tanto a CWFP quanto a CP-CWFP têm como principal desvantagem a necessidade do deslocamento da frequência de *offset*, de acordo com o inverso do valor do tempo entre os pulsos ( $\tau$ ). Assim, erros no cálculo da frequência de *offset* podem agregar erros na medida dos tempos de relaxação. Portanto, passou-se a investigar o uso de sequências de pulsos tipo SSFP, com alternância de fase entre os pulsos, as quais não necessitam deslocar a frequências de *offset*. Neste trabalho está sendo estudada a sequência CPMG<sub>90-y</sub> para análise de sementes oleaginosas. Os resultados obtidos com esta sequência em estudo foram comparados com os obtidos pela sequência convencional CPMG<sub>90</sub>.

## 2. Materiais e Métodos

O equipamento utilizado para as análises foi um espectrômetro Minispec mq-20 da Bruker, com um magneto de 0,5 T e 19,9 MHz para o  $^1\text{H}$ , com *probe* de 10 mm com variação de temperatura de -100 a 150°C. As amostras utilizadas foram sementes intactas de soja, amendoim, macaúba, macadâmia, pinhão manso, mamona e linhaça.

As sequências de pulsos utilizadas foram: CPMG<sub>90</sub>, composta por um pulso de  $\pi/2$  em  $x'$  espaçado por  $\tau/2$  e seguido de um trem de pulsos de  $\pi/2$  em  $y'$  espaçados por  $\tau$  (Figura 1A) e CPMG<sub>90y-y'</sub>, com características próximas a CPMG<sub>90</sub>, porém o trem de pulso é com inversão de fase em  $y'$  e  $-y'$  e o  $\tau < T_2^*$  (Figura 1B).

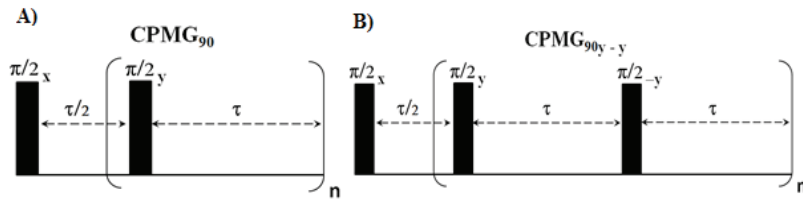


Figura 1. Sequências de pulsos: A) CPMG<sub>90</sub> e B) CPMG<sub>90y-y'</sub>.

### 3. Resultados e Discussão

Nas sementes oleaginosas encontramos dois conjuntos principais de óleos que são caracterizados por apresentarem diferentes viscosidades. A viscosidade depende do tamanho das cadeias de carbono e do número de insaturações presente. Portanto, como a viscosidade dos óleos está inversamente relacionada com os valores de  $T_2$ , foi necessário aplicar um ajuste de curva biexponencial para realizar o tratamento dos dados. Na Figura 2 (A) e (B) são apresentados os sinais obtidos com as sequências CPMG<sub>90</sub> e CPMG<sub>90y-y'</sub>, respectivamente, para análise do óleo das sementes de macadâmia, linhaça, macaúba, soja, amendoim, pinhão manso e mamona.

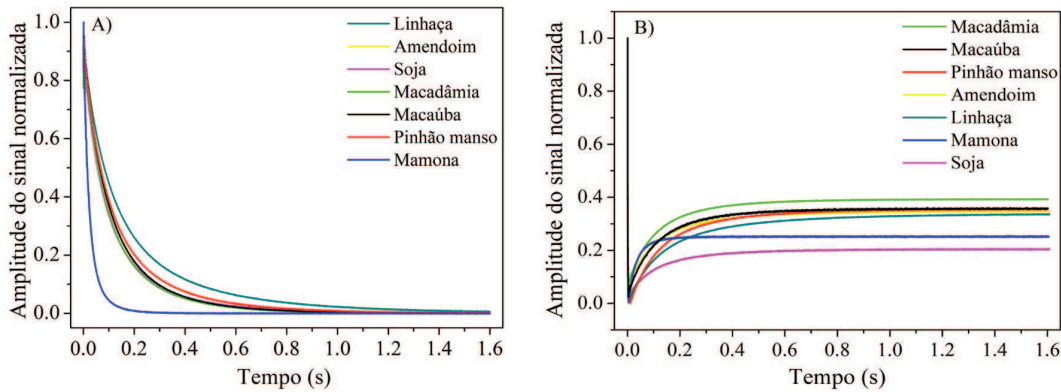


Figura 2. Sinais experimentais obtidos para as sequências: A) CPMG<sub>90</sub> e B) CPMG<sub>90y-y'</sub>, para as sementes de linhaça, macadâmia, amendoim, macaúba, soja, pinhão manso e mamona.

Na técnica CPMG<sub>90</sub>, Figura 2 (A), se observa que os decaimentos dos sinais ( $T_2$ ) de óleos com diferentes viscosidades. A semente de mamona apresentou o decaimento mais rápido. Isso é decorrente de seu óleo ser composto por ~ 80% do ácido ricinoléico, que é um ácido graxo viscoso de cadeia longa monoinsaturada e ainda apresenta uma hidroxila no décimo segundo carbono, o que aumenta ainda mais sua viscosidade. Já as sementes de linhaça apresentaram o decaimento mais longo, devido seu óleo ter ~ 50% do ácido linolênico, um ácido poli-insaturado com baixa viscosidade (PRESTES, COLNAGO, *et al.*, 2007). Portanto, quanto mais viscoso o óleo, mais rápido o decaimento do sinal. As outras sementes: amendoim, soja, macadâmia, macaúba e pinhão manso, apresentam viscosidades muito próximas, desta forma o decaimento dos sinais para estas foram similares, tornando difícil a distinção entre as sementes.

Utilizando a sequência CPMG<sub>90y-y'</sub> também é possível determinar a viscosidade do óleo presente nas sementes fazendo o cálculo de  $T_2^*$ , utilizando a equação 9 e os valores de  $T^*$  e as amplitudes do EE ( $M_{EE}$ ) e do equilíbrio térmico ( $M_0$ ) (Figura 2 B).  $T^*$  é obtido pelo ajuste de curva biexponencial do sinal CPMG<sub>90y-y'</sub> entre os estados EQE e EE, pois como já abordado, as oleaginosas apresentam dois grupos principais de óleo.

Uma correlação entre os valores de  $T_2$  obtidos por CPMG<sub>90</sub> e CPMG<sub>90y-y'</sub> é apresentada na Figura 3. Em (A) estão os valores da componente de  $T_2$  relacionada com o conjunto de óleo com maior viscosidade, portanto, com menor valor e decaimento mais rápido. E na Figura 3(B), os valores da componente com maior viscosidade, portanto, com maior valor de  $T_2$  e decaimento mais longo. Em ambas as Figuras, destacam-se a mamona e linhaça que apresentaram valores extremos de  $T_2$  devido a alta e baixa viscosidade, respectivamente. Foram obtidos valores de correlação linear de 0,96 (Figura 3A e Figura 3B) para os dois valores de  $T_2$  obtidos pelo ajuste biexponencial. Esses resultados indicam que a sequência CPMG<sub>90y-y'</sub> pode ser uma alternativa à CPMG<sub>90</sub> para obtenção dos valores de  $T_2$  de sementes oleaginosas para análise qualitativa de óleos.

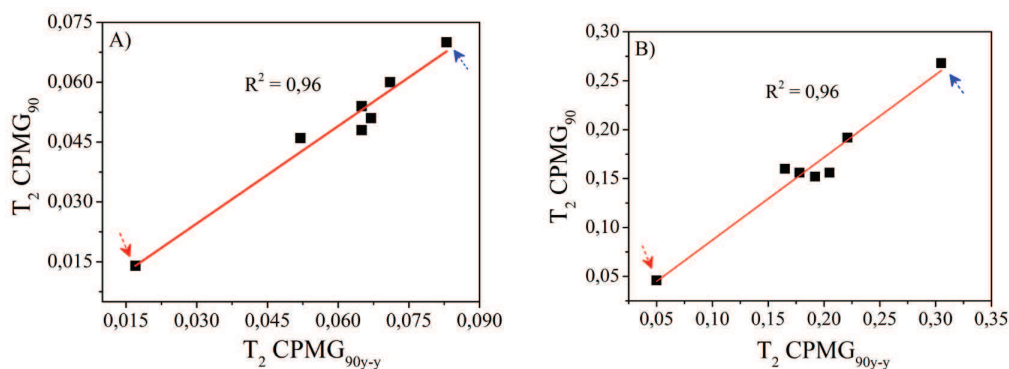


Figura 3. Correlação entre os valores de  $T_2$  obtidos com a técnica  $CPMG_{90}$  e  $CPMG_{90-y}$  para o conjunto de ácido graxo: (A) decaimento rápido e (B) decaimento lento. Seta vermelha – mamona; seta azul – linhaça.

#### 4. Conclusões

Pode-se concluir com esse trabalho que a técnica  $CPMG_{90-y}$  se mostrou uma alternativa para obtenção da constante de tempo  $T_2$ , a qual está relacionada com a viscosidade dos óleos presentes nas sementes. Assim,  $CPMG_{90-y}$  pode ser empregada para análises qualitativas rápidas em programas de melhoramento genético e controle de qualidade industrial onde a velocidade de obtenção de informações é crucial para a eficiência do processo.

#### Agradecimentos

FAPESP (processos 2013/03770-1 e 2011/11160-3) e CNPq (processo #38077/2014-2).

#### Referências

- ANDRADE, F. D. D.; NETTO, A. M.; COLANGO, L. A. Use of Carr- Purcell pulse sequence with low refocusing flip angle to measure T1 and T2 in a single experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, v.214, n. 2, p. 184-188, 2012.
- ERNEST, R. R.; ANDERSON, W. A. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Review of Scientific Instruments*, v. 37, n. 1, p. 93-102, January 1966.
- PRESTES, R. A. et al. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. *Analytica Chimica Acta*, n. 596, p. 325-329, 2007.
- VENÂNCIO, T. et al. Fast and simultaneou measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continous wave free precession experiment. *Journa of Magnetic Ressonance*, n. 173, p. 34-39, 2005.