

Capítulo 4

Aplicações da ressonância magnética nuclear e eletrônica no agronegócio

Luiz Alberto Colnago, Sérgio da Costa Saab,
Lucimara Aparecida Forato, Wilson Tadeu Lopes
da Silva, Rubens Bernardes-Filho, Ladislau Martin-Neto

Introdução

Desde que as espectroscopias de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e magnética nuclear (RMN) foram descobertas na década de 1940, elas vem propiciando um grande avanço científico e tecnológico tanto nas áreas das ciências básicas, como física, química e biologia, quanto nas áreas tecnológicas, como engenharia de materiais, agronomia, veterinária, alimentos e também na área médica (CZOCH; FRANCIK, 1989; GIL; GERALDES, 1987). A RMN é usada na análise de propriedades físico-químicas da maioria dos materiais, como gases, pequenas moléculas em solução e até seres humanos. A importância científica da RMN pode ser demonstrada pelo número de prêmios Nobel recebidos por desenvolvimentos na área (COLNAGO et al., 2014). O primeiro foi o prêmio Nobel de Física de 1952, outorgado a Felix Bloch e Edward Mills Purcell, pela demonstração do fenômeno de ressonância magnética nuclear. A primeira grande aplicação da RMN foi na área de determinação da estrutura de moléculas orgânicas usando principalmente o isótopo de hidrogênio (^1H). Já em 1953, os primeiros espectrômetros, baseados no método de onda contínua, já estavam sendo comercializados para essa finalidade. A sensibilidade desses equipamentos não permitia a análise de isótopos com baixa receptividade, como o carbono 13 (^{13}C), encontrado em cerca de 1,1% na natureza. Essa deficiência só foi superada no final da década de 1960, com a introdução dos espectrômetros de RMN pulsados, com a transformada de Fourier. Nos espectrômetros pulsados, o sinal da RMN é adquirido no domínio do tempo e não pode ser interpretado diretamente, como no caso do sinal em onda contínua. Para converter o sinal do domínio do tempo para o domínio da frequência, similar ao obtido

com a técnica de onda contínua, usa-se a Transformada Rápida de Fourier. Com isso os espectrômetros pulsados precisavam ser acoplados a um computador digital, que não era de uso geral naquela época. Com o método pulsado pode-se também desenvolver a RMN multidimensional, que facilitou ainda mais a determinação da estrutura e da dinâmica molecular e a tomografia, que é largamente usada no diagnóstico médico por imagens. Pelos desenvolvimentos da RMN pulsada e da RMN multidimensional, o químico suíço Richard Ernst recebeu o prêmio Nobel de Química de 1991. Usando as técnicas multidimensionais desenvolvidas por Ernst, outro suíço, Kurt Wüthrich, ganhou o prêmio Nobel de Química de 2002, pelo desenvolvimento de métodos de RMN multidimensional, para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas em solução. Em 2003, o químico Paul Lauterbur e o físico Peter Mansfield, receberam o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da técnica de tomografia por RMN, hoje mais conhecida como ressonância magnética. A RPE, assim como a RMN, é usada na determinação da estrutura e da dinâmica de materiais orgânicos, inorgânicos, sistemas biológicos entre outros materiais que tenham elétrons desemparelhados, como os encontrados em radicais livres e íons de metais de transição (CZOCH; FRANCIK, 1989). Na pesquisa agrícola, as técnicas de ressonância magnética, RMN e RPE, vêm sendo cada vez mais usadas nas áreas de determinação da estrutura de compostos bioativos, em estudos aplicados ao ambiente, biotecnologia, agroenergia, alimentos, fibras, fisiologia animal e vegetal, qualidade dos produtos entre muitas outras aplicações. Nesse capítulo serão apresentados alguns conceitos básicos das técnicas de ressonância magnética e algumas aplicações no agronegócio.

Conceitos básicos

Os fenômenos de ressonância magnética envolvem a absorção de radiação eletromagnética na região entre as ondas de rádio (500 KHz) e micro-ondas (1 GHz) por materiais que possuem spin e momento magnético. Isso ocorre em amostras que possuam elétron desemparelhado (RPE) oriundos de radicais livres e íons de alguns metais de transição como Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , entre outros, ou em núcleos (RMN) com número ímpar de massa e/ou número atômico (CZOCH; FRANCIK, 1989; GIL; GERALDES, 1987). Praticamente todos os elementos químicos tem ao menos um isótopo que satisfaz essa condição. As espectroscopias de ressonância magnética são de absorção, como as espectroscopias nas regiões do infravermelho, visível, ultravioleta, entre outras. No entanto, as espectroscopias de ressonância magnética diferem dessas outras, pois as absorções só são observadas quando as amostras estão na presença de um campo magnético (efeito Zeeman). Ou seja, na ausência de campo magnético não há separação entre os níveis de energia

para se observar as transições espectroscópicas. O número de níveis de energia observados em RMN depende do spin nuclear (I), $(2nI+1)$ e do RPE do spin eletrônico (S), $(2nS+1)$.

A energia dos níveis da ressonância magnética depende de μ que é o momento magnético eletrônico (μ_e) ou nuclear (μ_n) e do campo magnético (H), em que:

$$E = - \vec{\mu} \vec{H} \quad (1)$$

O momento magnético eletrônico é dado por $\mu_e = g\beta S$ e o nuclear por $\mu_n = g_n\beta_n I$, em que S e I são os spins eletrônico e nuclear, β e β_n representam o magnéton de Bohr e o magnéton nuclear, e g e g_n são as constantes de proporcionalidade do elétron e dos núcleos, respectivamente. Os magnétons dependem da carga (e), da massa (m) das partículas (elétron ou núcleo), da constante de Planck (h) e da velocidade da luz (c), em que β ou β_n é definido

com $\frac{eh}{4\pi m}$: (sistema CGS). Sabendo que a massa de um próton é cerca de 2.000 vezes maior do que a de um elétron, $\beta \approx 2000 \beta_n$. O $g_e = 2,003$ para elétron livre e g_n varia de acordo com o núcleo. Para o caso de spin $\frac{1}{2}$, como observados em elétrons desemparelhados e alguns núcleos de isótopos como o 1H , ^{13}C e ^{31}P , existem duas transições possíveis $(2nI+1)$ para $n=1$. A energia desses níveis energéticos é dada

$$E = \pm \frac{1}{2} gbH \quad (2)$$

$$E = \pm \frac{1}{2} g_n bH \quad (3)$$

$$(\Delta E) = hn = gbH \quad (4)$$

em que ν é a frequência da irradiação. Em RMN, normalmente descreve-se essa diferença de energia, usando a razão entre momento magnético e momento angular $\gamma = \mu/L$ e a intensidade do campo magnético H_0 , em que

$$\Delta E = hn = \frac{hgH_0}{2\pi} \quad (5)$$

A faixa de frequência usada na RMN $n = \frac{gH_0}{2\pi}$ está na região das ondas de rádio, de alguns KHz até 1 GHz e a na RPE, na região da radiofrequência e da micro-onda, variando de algumas centenas de MHz até centenas de GHz.

Parâmetros espectrais.

Os principais parâmetros espectrais da RMN e RPE (CZOCH; FRANCIK, 1989; GIL; GERALDES, 1987) são:

a) Deslocamento químico e valor g . O deslocamento químico é o principal parâmetro da RMN. É um efeito induzido pelo campo magnético aplicado na nuvem eletrônica que envolve os núcleos e o ambiente molecular. Assim, os sinais de RMN dependem do ambiente químico do núcleo estudado e isso é usado para identificar os diferentes ambientes químicos presentes em uma molécula e, conseqüentemente, determinar a sua estrutura. O deslocamento químico é normalmente expresso em partes por milhão da frequência de ressonância (ppm), para ficar independente do campo magnético aplicado. O deslocamento químico em ppm é representado por δ . O valor g é um parâmetro similar ao deslocamento químico e reflete ambiente eletrônico molecular.

b) Acoplamento spin-spin e estrutura hiperfina. O acoplamento spin-spin (RMN) vem da interação intranuclear, por meio das ligações químicas e faz os sinais de RMN serem desdobrados em multipletos (vários sinais) de acordo com número de núcleos vizinhos. Na RPE, a estrutura hiperfina ou multiplete reflete o momento magnético do spin nuclear que está interagindo com o momento magnético do spin do elétron desemparelhado.

c) Tempos de relaxação. Os dois principais tempos de relaxação tanto da RMN quanto da RPE são os tempos de relaxação longitudinal, spin-rede ou T_1 e de relaxação transversal, spin-spin, ou T_2 . T_1 é a constante de tempo do retorno exponencial da magnetização ao equilíbrio térmico. T_2 é a constante de tempo exponencial da perda de coerência do sinal de RMN ou RPE, sem que haja alteração na população de spins. Como normalmente $T_1 > T_2$, T_2 é inversamente proporcional à largura de linha que é outro parâmetro espectral tanto da RMN quanto do EPR.

d) Largura de linha. A largura de linha dos espectros de RMN e RPE estão inversamente correlacionada com T_2 . Como T_1 e T_2 dependem da mobilidade molecular, a largura de linha pode ser usada para avaliar esse grau de mobilidade.

e) Área do sinal. A área do sinal de RMN e EPR é proporcional a concentração da espécie que está sendo analisada, desde que não ocorra

saturação espectral. Além desses parâmetros, tanto a RMN quanto a RPE possuem outros, que são usados nas análises de propriedades físicas e químicas das amostras, como a interação dipolar e quadrupolar, efeito Overhauser, entre outros.

Aplicações da RMN na agropecuária

As aplicações da RMN podem ser divididas em aplicações de métodos espectroscópicos e tomográficos. Nos métodos espectroscópicos, analisa-se um ou mais parâmetros espectrais como deslocamento químico, acoplamento spin-spin, entre outros, para obter informações sobre a estrutura e a dinâmica molecular, componentes de uma mistura, cinética química, entre várias outras propriedades físicas e químicas. A espectroscopia pode ser subdividida em de baixa e de alta resolução, de acordo com a separação entre as linhas espectrais. Além disso, a espectroscopia de RMN em alta resolução pode ser novamente subdividida em espectroscopia de RMN em alta resolução para amostras líquidas e sólidas. A tomografia de RMN também pode obter os mesmos parâmetros da espectroscopia, mas sua principal característica é a medida da distribuição espacial de um ou mais componentes, como, por exemplo, água e gordura em um tecido vegetal ou animal.

Espectroscopia de RMN em baixa resolução

A espectroscopia de RMN em baixa resolução pulsada é também conhecida como RMN em baixo campo ou RMN no domínio do tempo. Uma das mais simples e conhecidas aplicações da RMN em baixa resolução na agropecuária é a medida do teor de óleo em sementes. Nessa análise, basta fazer uma curva de calibração entre o módulo da intensidade do sinal de RMN (FID – *Free Induction Decay*) após um certo tempo do pulso (dezenas de μs), e a concentração do teor de óleo nas sementes. Esse mesmo método também tem várias aplicações na medida dos componentes líquidos em amostras heterogêneas, como solos, fibras e alimentos. Na Figura 1 está um diagrama de como essa medida é feita em uma semente oleaginosa desidratada. Como a água de hidratação e os componentes, como proteínas e carboidratos, estão no estado sólido, têm um T_2 da ordem de alguns microssegundos, basta fazer a aquisição do sinal de RMN cerca de 50 μs após o pulso. Neste tempo, o sinal de RMN será devido apenas ao óleo, que está líquido e tem T_2 de centenas de milissegundos. Em materiais com baixo teor de óleo esse método também pode ser usado para a medida da umidade.

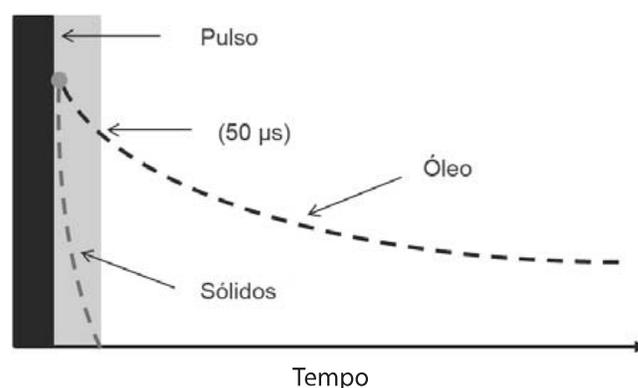


Figura 1. Diagrama dos eventos para medida do teor de óleo em sementes com baixa umidade.

A barra preta representa o pulso, que é da ordem de alguns microssegundos. A barra cinza o tempo de $50 \mu\text{s}$, na qual o sinal dos componentes sólidos decai para o valor mínimo (linha tracejada dentro da barra cinza) e pode-se medir a intensidade do sinal do óleo.

Quando a semente tem mais de 10% de umidade, o sinal da água pode interferir na intensidade do sinal do óleo. Assim, não se pode usar a intensidade do FID para medir o teor de óleo. Para isso, usa-se uma sequência de pulsos denominada "eco de spin". Esse método também se aplica à análise de gordura em alimentos como chocolates e farinhas, bem como para medir a razão sólido-líquido em margarinas (COLNAGO et al., 2014). Além desses métodos, outras sequências de pulsos mais complexas tem sido usadas para análises de RMN em baixa resolução. Dentre elas, destacamos a sequência de pulsos desenvolvida por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) que gera um sinal de RMN cujo decaimento depende de T_2 e a CWFP (*Continuous Wave Free Precession*), cujo sinal depende tanto de T_1 quanto de T_2 .

Esses métodos vêm sendo usados para medir a qualidade dos óleos vegetais em sementes, umidade, gordura e propriedades sensoriais em carnes bovinas, teor totais de sólidos solúveis em frutas e possui muitas outras aplicações em agropecuária.

Nas Figuras 2 a 4 estão alguns exemplos da aplicação da RMN em baixo campo. Na Figura 2 está o gráfico de correlação entre o número de cetano determinado por RMN em baixo campo versus o valor de referência (PRESTES et al., 2007). O coeficiente de correlação entre as duas medidas para 15 amostras de sementes oleaginosas como soja, pinhão manso, amendoim, macadâmia etc., foi de $r=0,92$. Isso indica que a técnica de RMN em baixo campo pode ser usada para prever, diretamente nas sementes, o número de cetano dos óleos vegetais, que é um dos principais parâmetros de qualidade do biodiesel.

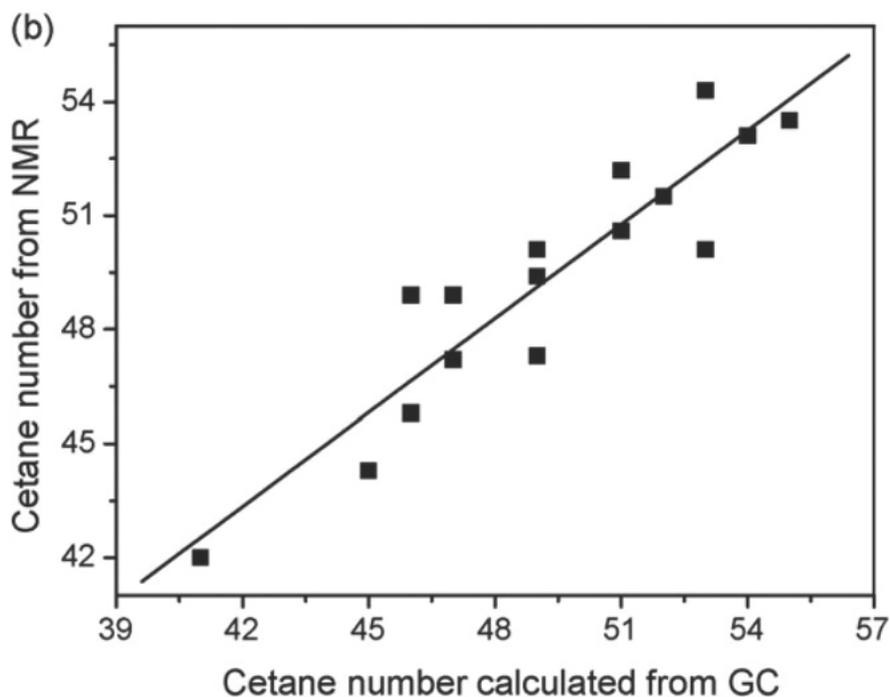


Figura 2. Gráfico de correlação entre o número de cetano previsto por RMN e o determinado a partir dos dados de cromatografia gasosa.

Na Figura 3 está um gráfico de barras com os valores do coeficiente de correlação entre os valores previstos por RMN em baixo campo, com a sequências CPMG (barra cheia) e CWFP (barra quadriculada) e as propriedades sensoriais: sabor (1), suculência (2), maciez (3) e propriedades físicas e químicas como: perda de água por cocção (4), teor de gordura (5), umidade (6) e maciez instrumental (7), determinadas por métodos padrões (PEREIRA et al., 2013a). Como se pode ver, nesta figura a sequência CPMG, que depende apenas de T_2 , teve maior correlação com as propriedades sensoriais e a maciez instrumental do que com a CWFP. Por outro lado, a sequência CWFP, que depende de T_1 e T_2 , apresentou maior correlação para a perda de cocção, de teor de gordura e de umidade.

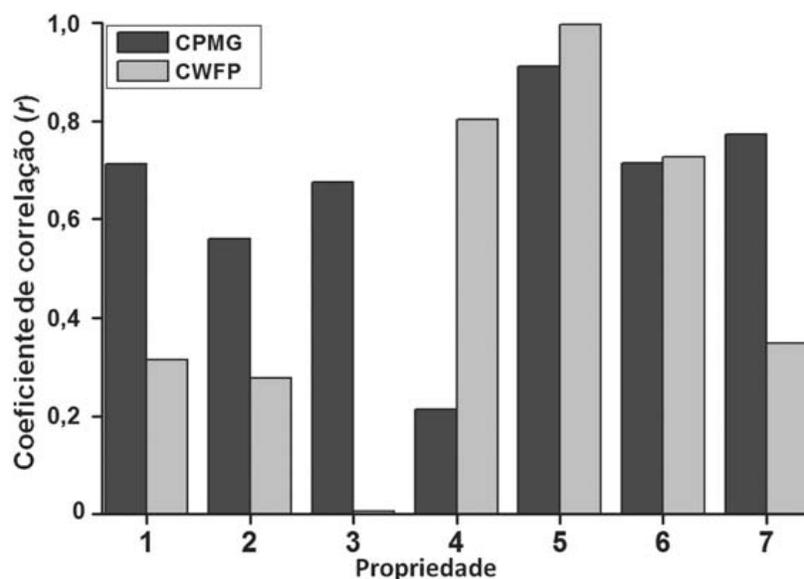


Figura 3. Gráfico de barras com os valores do coeficiente de correlação previsto por RMN (CPMG [barra escura] e CWFP [barra clara]) para o sabor (1), suculência (2), maciez (3), perda de água por cocção (4), teor de gordura (5), umidade (6) e maciez instrumental (7) da carne bovina.

A RMN em baixo campo também tem sido usada para medir a qualidade interna de frutas frescas (PEREIRA et al., 2013b). Na Figura 4 está o gráfico de correlação entre o teor de sólidos solúveis totais (SST-brix) em ameixas frescas, medidos por refratometria e o valor de SST, medido para mesmas frutas intactas, por RMN, com a sequência CPMG. Nesta figura, pode-se ver que há uma correlação inversa entre os valores de T_2 e o teor de SST em ameixas.

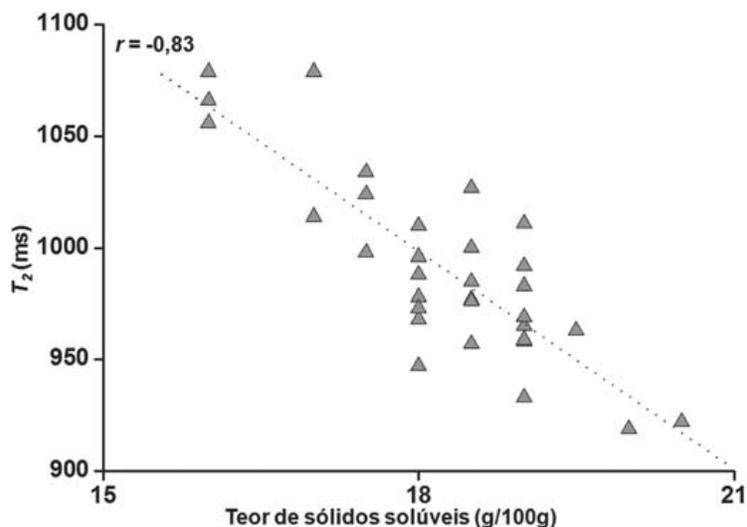


Figura 4. Gráfico de correlação entre o teor de sólidos solúveis totais (SST) em ameixas e o previsto por RMN, com a sequência CPMG.

Espectroscopia de RMN em alta resolução

a) Amostras em solução. Como descrito anteriormente, a RMN em alta resolução pode ser subdividida em RMN em alta resolução para líquidos e em alta resolução para amostras sólidas. Essa separação é necessária, pois as técnicas usadas em cada tipo de amostra e os parâmetros espectrais são bem diferentes. No caso de amostras líquidas ou em solução, os experimentos de RMN são obtidos com apenas um pulso de excitação, pois os tempos de relaxação T_1 e T_2 estão na ordem de alguns segundos, o que equivale a uma largura de linha de alguns Hz. Isso porque as moléculas estão em movimentos de alta velocidade, o que elimina as interações anisotrópicas do deslocamento químico e as interações dipolares e quadrupolares, que são observadas nas amostras sólidas. As principais aplicações da RMN em alta resolução na agricultura são utilizadas na determinação da estrutura de moléculas bioativas, proteínas, carboidratos e lipídeos, na análise da composição química e degradação de alimentos e agroquímicos, estudos *in vivo* do metabolismo animal, vegetal e de microrganismos, entre muitas outras aplicações. Forato et al. (2000) usaram a RMN em solução para analisar os ácidos graxos livres presentes em amostras de corpos proteicos de milho e concluíram que eram endógenos e não produtos de copurificação. Em 2004, Forato et al. (2004) utilizando a RMN de ^{13}C em solução, analisaram as interações das zeínas, prolaminas do milho com o ácido oleico e concluíram que tais interações podem ser eletrostáticas, via carboxila ionizada do ácido oleico com resíduos de arginina da proteína, bem como hidrofóbicas, pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos apolares presentes na proteína com a cadeia carbônica do lipídeo. Colzato et al. (2011) utilizaram a RMN de ^1H em solução para avaliar a oxidação de nozes macadâmia revestidas com filmes a base de zeínas.

b) Amostras sólidas. No caso de amostras sólidas, amorfas ou multicristalinas, as interações dipolares, quadrupolares e de anisotropia do deslocamento químico estão presentes e cada linha espectral pode ter largura de até alguns megaHertz (MHz). No caso de núcleos com spin $\frac{1}{2}$ como o ^{13}C , ^{31}P e ^{29}Si (que não tem interação quadrupolar), os espectros de RMN em alta resolução são obtidos com a amostra girando em alta rotação, em torno do ângulo de $54,73^\circ$ (conhecido como ângulo mágico), em relação à direção do campo magnético externo. O giro da amostra nesse ângulo minimiza ou elimina as interações anisotrópicas, o que permite a obtenção de espectros de amostras sólidas, com largura de linha de até algumas dezenas de Hz. Outro problema das amostras sólidas é que o T_1 de ^{13}C , ^{31}P etc. são muito longos e por isso, a aquisição dos espectros desses núcleos são muito demoradas. Para eliminar esse problema, foi desenvolvido o método de polarização

cruzada (CP) que faz a transferência de polarização do hidrogênio, que tem T_1 curto, para o isótopo que se deseja observar, com T_1 longo. Além disso, a polarização cruzada aumenta o sinal dos núcleos que se deseja observar pela razão entre o y do ^1H e y do isótopo analisado. Para o ^{13}C , essa razão é 4, que corresponde a um aumento de 4 vezes na intensidade de sinal. Ou seja, a técnica de CP permite a redução do tempo de análise em dezenas de vezes se comparado à técnica pulsada convencional. Entretanto, a técnica de CP fará a polarização do núcleo de interesse ocorrer em maior intensidade quanto maior for o número de átomos de hidrogênio que estiverem ligados diretamente ao núcleo de interesse e nas adjacências da cadeia.

Desta forma, sinais de carbono presentes em estruturas alifáticas não substituídas tenderão a ser mais intensos que aqueles contidos em anéis aromáticos. Assim, um espectro de CPMAS de uma amostra não pode ser considerado de maneira quantitativa por si só, mas sim comparativamente a outros espectros, sendo comparáveis a mudanças nas intensidades de sinais em função de alguma outra variável. Como exemplo, no caso de estudos de matéria orgânica de solos (MOS), podemos citar como variáveis de interesse o manejo, a fertilidade, a textura, a profundidade, o tipo de cultura, entre outros (ABREU-JR et al., 2009). Assim, a técnica usada em RMN de ^{13}C , ^{31}P e ^{29}Si em estado sólido é denominada CPMAS, pois envolve ou uso da CP, na rotação no ângulo mágico (MAS). As aplicações em agropecuária envolvem análises de materiais sólidos de alimentos, fibras, matéria orgânica de solos, componentes inorgânicos, entre outros. O uso da CPMAS do ^{13}C tem sido muito comum na determinação das características da matéria orgânica do solo sob diversos manejos e situações ambientais. É uma técnica que permite a observação de diferenças estruturais pela integração de diferentes partes do espectro, que representam diferentes funções químicas orgânicas, conforme proposto por Skjemstad et al. (1998) e apresentado na Figura 5.

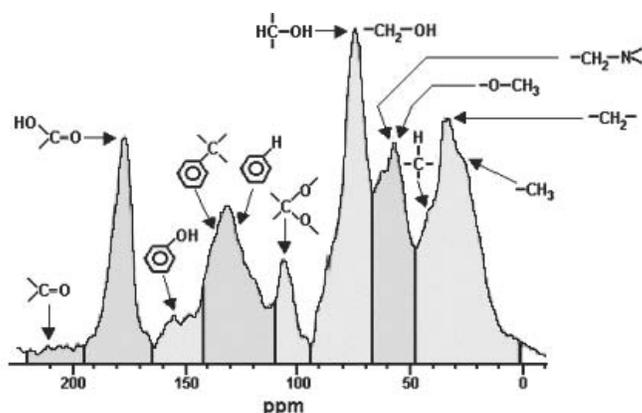


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C em estado sólido utilizando a técnica CPMAS de uma amostra de ácido húmico e o assinalamento dos sinais a grupos funcionais.

Fonte: Skjemstad et al., 1998.

Amostras de solo podem ser diretamente analisadas em casos nos quais há quantidades relativamente elevadas de carbono, bem como baixos teores de íons ferromagnéticos, como Fe^{3+} , por exemplo, que distorcem o campo magnético ao qual a amostra está submetida durante a análise. Segnini et al. (2013a) observaram diferenças estruturais relativas à matéria orgânica (MO) (Figura 6) presente em solos inundados de forma permanente ou periódica, conhecidos como Bofedales, encontrados na região dos Andes peruanos. Buscava-se conhecer a estabilidade da MO, frente às mudanças climáticas e à capacidade de sequestro de carbono destas áreas.

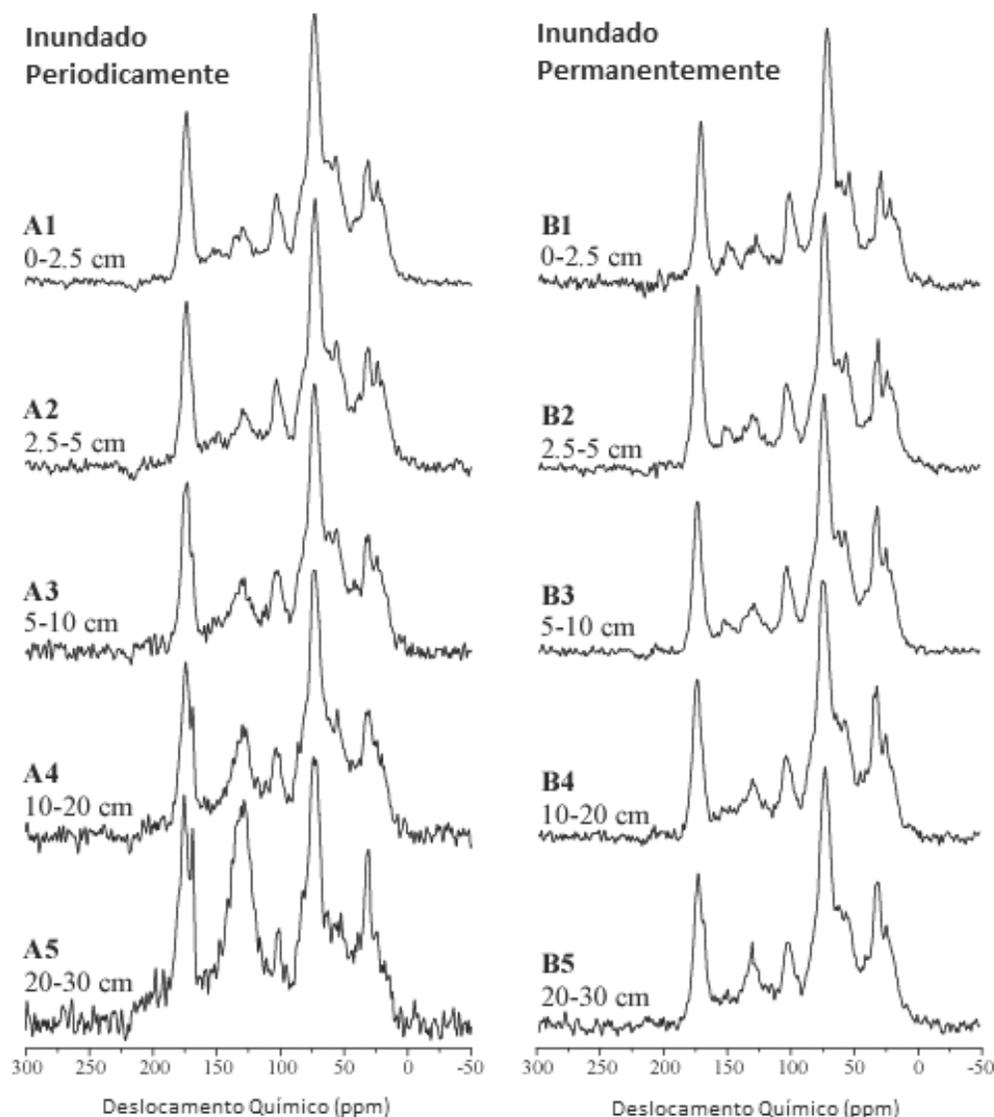


Figura 6. Espectros de RMN do isótopo carbono-13 (^{13}C VA-CPMAS) para amostras de solo (turfa andina conhecida como Bofedales) inundado de maneira periódica (A) ou permanente (B). Os índices 1 a 5 apresentados nos espectros relacionam-se às diferentes profundidades das amostras. Adaptado de Segnini et al. (2013a).

Os espectros de RMN apresentados na Figura 6 mostram uma tendência de aumento da quantidade de grupos funcionais com características de aromaticidade (anéis aromáticos e fenóis) representados nas regiões espectrais entre 110 ppm e 160 ppm, principalmente em solos inundados de maneira periódica. Isso ocorre devido à atividade microbiana sobre a biomassa presente, que possui a tendência de consumir estruturas alifáticas, concentrando proporcionalmente as partes mais aromáticas das cadeias. Este efeito não é tão evidente nas amostras retiradas da região permanentemente inundada, pois a baixa quantidade de oxigênio nestes locais propicia o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, que apresentam uma atividade menor, transformando de maneira menos acentuada a matéria orgânica do solo. Nota-se, também, uma proporção bastante alta de grupos funcionais oriundos de polissacarídeos, como a celulose (60-110 ppm), bem como de estruturas de carbono alifático, presentes principalmente em resíduos de óleos, ceras e gorduras (0-45 ppm), remanescentes do material vegetal original. Geralmente, as amostras de solo brasileiro tendem a possuir pequena quantidade de MO e grande quantidade de Fe^{3+} , o que, na prática, inviabiliza análises sem preparo prévio. Nesses casos, é feita a extração dos ácidos húmicos, que representam a fração mais humificada da matéria orgânica do solo (MARTIN-NETO et al., 2009; SEGNINI et al., 2013b). A extração segue um protocolo estabelecido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), que se baseia na solubilidade da matéria orgânica em meios ácido e alcalino (SWIFT, 1985). A Figura 7 apresenta um espectro de RMN de uma amostra de AH extraída do solo. Nesse caso, observa-se um sinal intenso, proporcionado por estruturas aromáticas e fenóis (110-160 ppm), característico de material em maior estado de humificação (PRIMO, 2012).

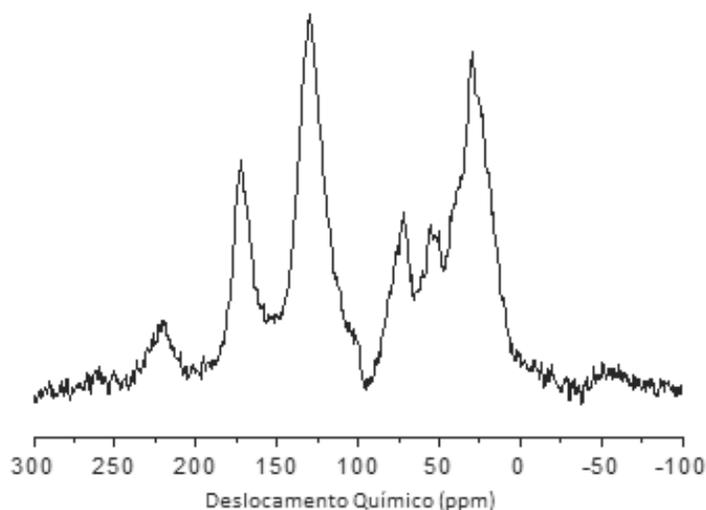


Figura 7. Espectro de RMN de amostra de ácido húmico extraído de solo tropical. Adaptado de Primo (2012).

Outro exemplo é o acompanhamento do processo de humificação da MO em uma leira de compostagem. A compostagem é um processo exotérmico aeróbio pelo qual resíduos orgânicos de diferentes origens são transformados em materiais relativamente estáveis. Os principais produtos do processo são CO_2 , água e matéria orgânica estabilizada, composta principalmente por ácidos húmicos recém-produzidos (LÓPEZ et al., 2002). A formação dessas substâncias está ligada ao grau de humificação do composto. Durante um processo de compostagem, por exemplo, estruturas orgânicas mais lábeis são degradadas, enquanto estruturas mais recalcitrantes tendem a ser preservadas. Como exemplo, são mostrados, na Figura 8, espectros de amostras de ácidos húmicos extraídos de um composto agrícola em diferentes estágios de maturação (FIALHO et al., 2010).

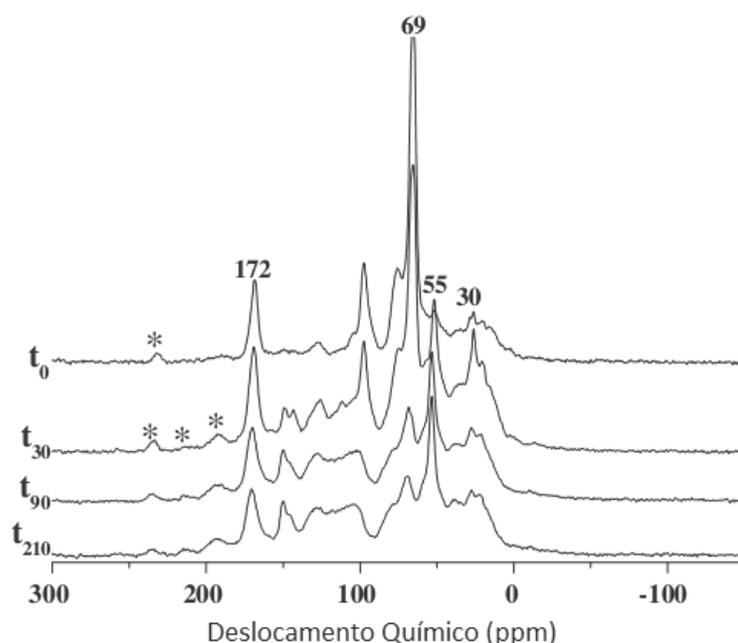


Figura 8. Espectros de RMN ^{13}C (VA-CPMAS) de ácidos húmicos extraídos de composto orgânico em diferentes tempos de compostagem. t_0 – Mistura inicial (bagaço de laranja + poda de jardinagem); t_{30} – 30 dias de compostagem; t_{90} – 90 dias de compostagem e t_{210} – 210 dias de compostagem. Extraído de Fialho et al., 2010.

Pelo espectro, observa-se que inicialmente (t_0) existe a predominância do sinal em 69 ppm, correspondente à presença de pectina existente no bagaço de laranja. A pectina é facilmente degradada, sendo que esse sinal diminui bastante no ácido húmico extraído após 30 dias de compostagem e praticamente some após 210 dias. O sinal em 172 ppm é característico de ácidos carboxílicos, que estão presentes nos ácidos orgânicos no bagaço de laranja e que continuam presentes após o processo de compostagem, em

função do processo de síntese microbiana. Com 30 dias de compostagem, sinais entre 0-45 ppm (C-H de estruturas alifáticas) e 60-110 ppm (C-O de polisacarídeos e açúcares) tornam-se mais proeminentes. Ao passar de 210 dias, as estruturas aromáticas e fenólicas (110-160 ppm) tornam-se mais evidentes, mostrando uma maior maturação do ácido húmico extraído. Desta forma, fica evidente como se dá o uso de RMN na caracterização dos produtos de uma degradação microbiana, sendo uma ferramenta muito útil do ponto de vista da caracterização estrutural de substâncias orgânicas de interesse agrônomo/ambiental.

Tomografia por RMN (TORMN)

A tomografia por RMN (TORMN), conhecida na área médica como Ressonância Magnética (RM), é usada para fazer uma imagem da distribuição espacial de uma substância química dentro de um objeto. A maioria das imagens por RM são usadas para fazer um mapa da distribuição da água e ou da gordura usando o isótopo ^1H . Esse tipo de imagem gera um contraste, conhecido como densidade de prótons (PD) e é usado para determinar a distribuição da água e/ou da gordura desde alimentos (Figuras 7 e 8) até seres humanos. Além desse tipo de contraste, a TORMN pode gerar imagens com contraste baseados nos tempos de relaxação T_1 e T_2 , fluxo, difusão molecular, entre outros tipos de contraste.

Os contrastes por T_1 e T_2 são os mais comuns e são usados para diferenciar a água da gordura e a água em diferentes ambientes físicos e químicos, o que ocorre em tecidos e órgãos normais e alterados. Por exemplo, pode-se observar, com esses tipos de contraste, o efeito de injúrias mecânicas, por baixa temperatura em frutas. A água, na área que sofreu a injúria, está em um ambiente físico-químico diferente da água que está no tecido intacto. Na imagem, essa diferença de ambiente se reflete no tempo de relaxação, que permite que se identifique facilmente a região com a injúria.

As imagens da Figura 9 mostram uma manga infestada com mosca da fruta (BISCEGLI et al., 2000). Na parte (A) está uma imagem com contraste por T_1 e na parte (B) a imagem da mesma manga, mas com contraste por T_2 . Nessas imagens, as regiões mais claras, no lado esquerdo da manga, refletem as regiões em que os tecidos estão muito danificados e a polpa está bem gelatinosa. Os pontos escuros nessas regiões são os furos causados pelas larvas. Apesar da maioria dos danos serem observados em ambas as imagens, o efeito é mais marcante no caso da imagem contrastada por T_1 (Figura 9a).

Na Figura 10 está uma imagem por TORMN de um contrafilé bovino. A imagem tem contraste por T_1 e as partes claras são as regiões ricas em gordura, enquanto as partes cinzas são o tecido muscular ou a carne.

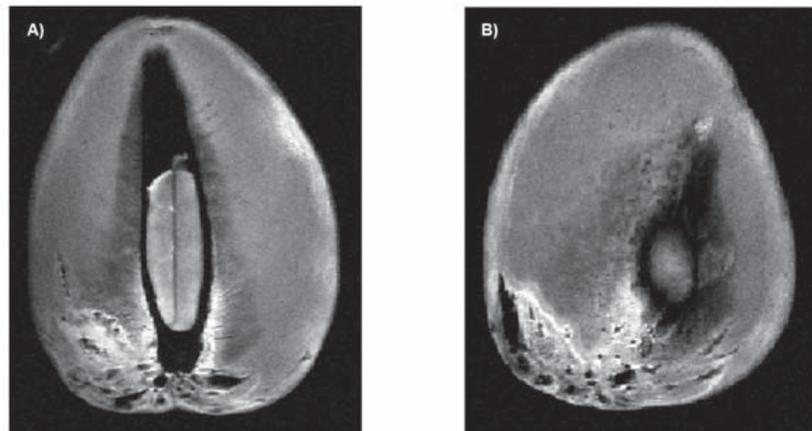


Figura 9. Imagens por TORMN de uma manga infestada com larvas da mosca da fruta. A imagem (A) foi obtida com contraste de T_1 , usando tempo de repetição de 6 s e tempo de eco de 0,06 s. A imagem (B) foi obtida com contraste por T_2 , com tempo de repetição de 0,5 s e tempo de eco de 0,015 s.



Figura 10. Imagem por TORMN de um contrafilé bovino, com contraste por T_1 .

Aplicações da espectroscopia de RPE na agropecuária

As aplicações da RPE na agropecuária ocorrem nos estudos de alimentos, nos sistemas biológicos e, principalmente, no estudo da matéria orgânica (MO) e de substâncias húmicas (SH) de solos e aquáticas. Assim, as

aplicações da RPE discutidas serão relativas aos estudos com MO e SH, analisando os sinais de radicais livres e dos íons paramagnéticos.

Determinação da humificação da MO por RPE

O sinal do radical livre orgânico medido por RPE pode ser usado para estimar várias propriedades da MO e de SHs, como o grau de humificação, os sítios de ligação de metais, a interação com pesticidas e substâncias apolares, entre outras aplicações. Esse método para determinar a humificação se baseia no fato que quanto maior a humificação da MO ou das SHs, maior será a presença de grupos funcionais com alta capacidade de estabilização de radicais livres, como grupos aromáticos policondensados, grupos fenólicos, entre outros. Por meio dessa técnica podem ser analisados espectros do radical livre orgânico em amostras de ácidos húmicos (AH) extraídos de solos de sistemas de plantio direto e convencional. Os resultados indicam menor humificação dos AH sob plantio direto. Assim, em ambiente menos oxidativo no solo em plantio direto, promove diminuição da humificação da matéria orgânica, em comparação aos solos manejados sob preparo convencional. Os sinais de radicais livres também têm sido utilizados para estudos básicos, como caracterizar a localização desses radicais em solos e em SHs. Na Figura 11 estão os espectros de RPE com os sinais dos radicais livres de amostras de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA), AH, humina (HU) e ácido fúlvico (AF). Como a forma do sinal e o valor do $g = 2,004$ são similares para todas as amostras, pode-se concluir que se trata de um mesmo radical livre, nesse caso um radical livre orgânico.

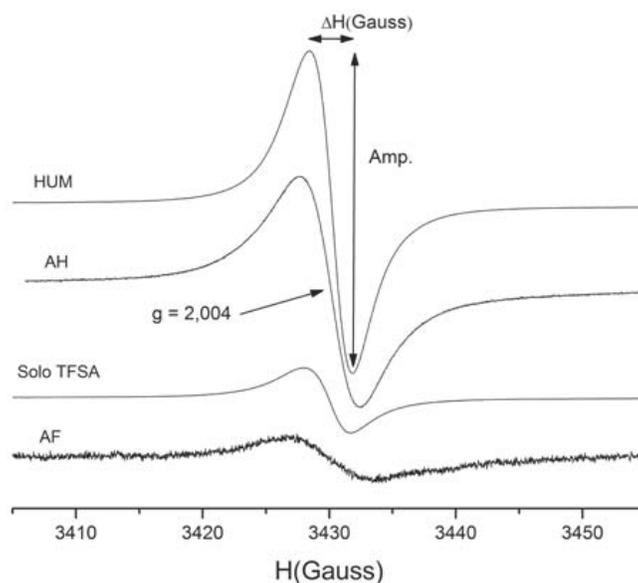


Figura 11. Espectros de RPE do radical livre orgânico nas frações AH, AF e HU como também no solo TFSA. Largura de linha (ΔH) e amplitude (Amp.). Adaptado de Saab e Martin-Neto (2004).

Os espectros de RPE também foram usados para estudar o comportamento do radical livre orgânico em função do tamanho de partículas dos solos e da temperatura (Figura 12). Observou-se que o conteúdo de radicais livres cresce em todas as frações até a temperatura de 200 °C. Isto pode ser explicado pelo fato que a fração alifática da MO é decomposta, primeiramente, aumentando a concentração relativa da fração aromática e, com isso, aumentando a quantidade de radicais livres, além da perda de água presente nas amostras. A partir de 400 °C há uma diminuição no conteúdo de radicais livres em todas as frações, sendo que a fração > 53 µm é a menor de todas as frações. Para a fração 0-2 µm o desaparecimento completo ocorre a partir de 600 °C, na fração 2-20 µm e 20-53 µm ainda permanece um conteúdo residual de radicais livres. Esse resultado pode ser explicado pelo fato que nas frações 2-20 µm e 20-53 µm a MO humificada pode estar mais recalcitrante ou ligada mais firmemente aos minerais (provavelmente agregados de argilas), desta forma a MO fica protegida pelas frações.

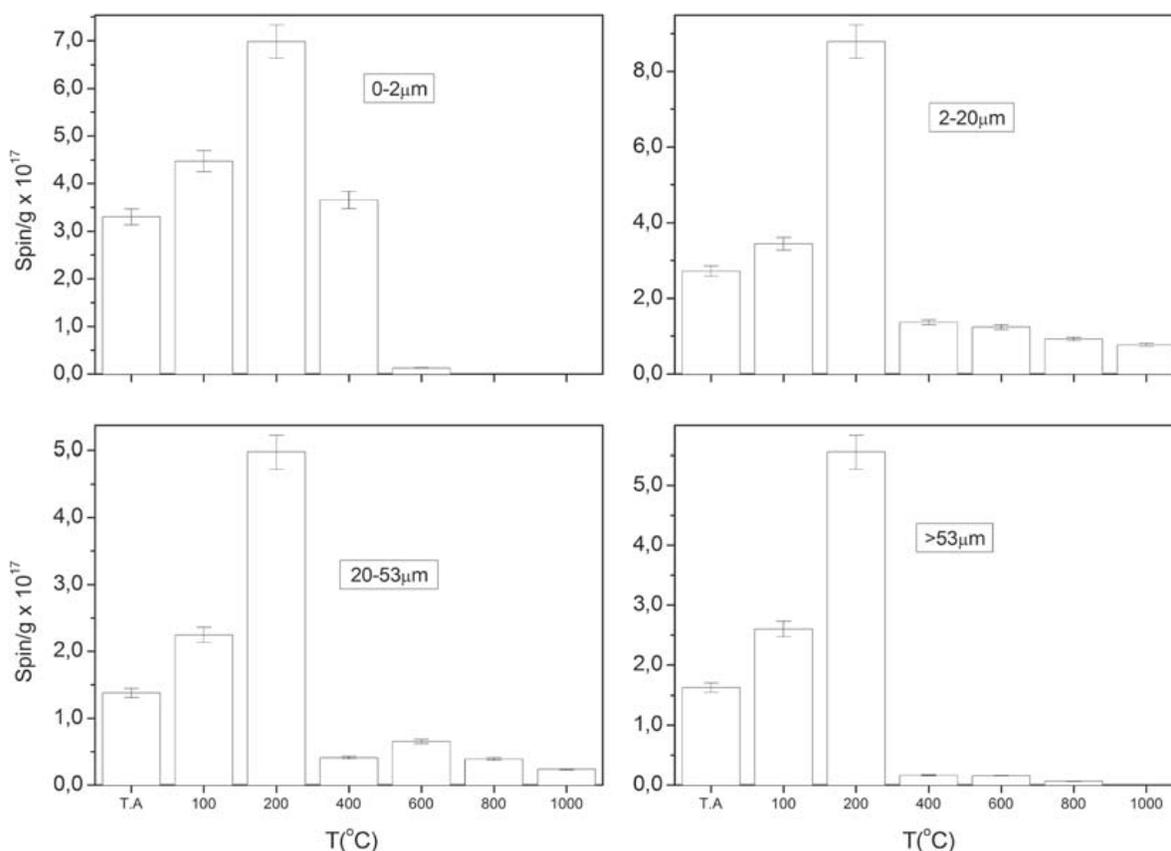


Figura 12. Quantidade de radicais livres orgânicos em função da temperatura (T.A. é a temperatura ambiente, 28 °C) nas frações físicas de gleissolo. Mostra-se a barra de erro das medidas. Adaptado de Saab e Martin-Neto (2003).

Estudos com marcadores hidrofóbicos foram realizados através da técnica de RPE para identificar e caracterizar regiões hidrofóbicas nas moléculas de AH e nos solos. Os estudos com RPE também foram usados para caracterizar a sorção dos herbicidas imazaquim e atrazina em solo e AH. Os resultados indicaram que os herbicidas podem estar interagindo com os AHs por ligações de hidrogênio e/ou transferência de prótons, troca catiônica e, principalmente, interações hidrofóbicas.

Caracterização dos íons paramagnéticos na MOS e SH

Espectros de RPE de AF e AH possuem uma característica comum: normalmente apresentam sinal de radicais livres em $g = 2,00$. Uma segunda característica é a linha assimétrica que surge em $g = 4,2 - 4,3$, que é geralmente atribuída ao íon Fe^{3+} (alto spin) ligado ao AF e ao AH em sítio tetraédrico ou octaédrico em um campo cristalino de simetria cúbica (MARTIN-NETO et al., 1991; SAAB; MARTIN-NETO, 2008; SENESI, 1990a). A considerável resistência dessa forma de ferro em se reduzir ou realizar reações de troca, sugere que o Fe^{3+} é fortemente ligado e protegido, formando complexos de esfera interna de AF e AH. Uma linha com sinal bastante alargado aparece em $g \approx 2$, também comum nos espectros de AF e AH, e provavelmente consiste em um envelope de várias ressonâncias devido à interação spin-spin entre vários íons paramagnéticos absorvendo nessa região. Em alguns espectros de AF aparecem sinais em $g = 9 - 10$, que provavelmente surgem do Fe^{3+} em sítios de simetria rômbrica (SAAB, 1999).

Sinal de RPE devido ao íon Cu^{2+} também é característico nas amostras de AH e AF. Os espectros geralmente correspondem em duas componentes, $g//$ e g^{\perp} , que surgem do eixo principal de simetria do íon Cu^{2+} ($I=3/2$) paralelo ou perpendicular, respectivamente, ao campo magnético (GONZÁLES PÉREZ et al., 2004; MARTIN-NETO et al., 1991). Parâmetros de RPE determinados dos espectros sugerem uma contribuição de ligação covalente e são consistentes com sítios de Cu^{2+} em AF ligado somente com grupos funcionais que contêm oxigênio (carboxílicos, hidroxílicos, fenólicos, carbonilas e moléculas de água), ou por oxigênio e nitrogênio ligado ao AF (SENESI, 1990a, 1990b). Resultados obtidos por SAAB (1999) e SAAB e MARTIN-NETO (2008) estudando gleissolos do Rio de Janeiro identificaram em amostras de AH que apresentaram sinal de Fe^{3+} em $g = 4,3$, como mostra a Figura 13. Esse sinal é devido ao Fe^{3+} com spin alto, $5/2$, ligado a grupos funcionais do AH em um sítio tetraédrico ou octaédrico (MARTIN-NETO et al., 1991). O sinal de VO^{2+} foi observado em todas as amostras com oito linhas hiperfinas, spin nuclear $I=7/2$ (SENESI et al., 1990a). Os sinais VO^{2+} com simetria axial com 8 linhas paralelas e 8 perpendiculares ao campo magnético são encontrados em AH de solos devido

à capacidade da substância húmica de reduzir o íon $(VO_3)^-$, o que é a forma mais estável do vanádio sob condições típicas do solo para o íon vanadilo (VO^{2+}). No solo TFSA, os sinais de Fe^{3+} foram observados em $g = 9$, $g = 5$, $g = 4,3$, $g = 3,3$ e $g = 2$. Os sinais em $g = 9$ e $g = 4,3$ são devidos ao íon Fe^{3+} em simetria rômbrica; os valores em $g = 5$ e $g = 3,3$ são devidos ao íon Fe^{3+} em mais alta simetria (GOODMAN; HALL, 1994). Os sinais em $g = 5$ e $g = 3,3$ no solo intacto e HU são devidos ao material mineral e não aparecem no AH e AF. O sinal em $g = 2$ é provavelmente devido ao íon Fe^{3+} na forma de óxido, que está na superfície do mineral ou da MO (GOODMAN; HALL, 1994).

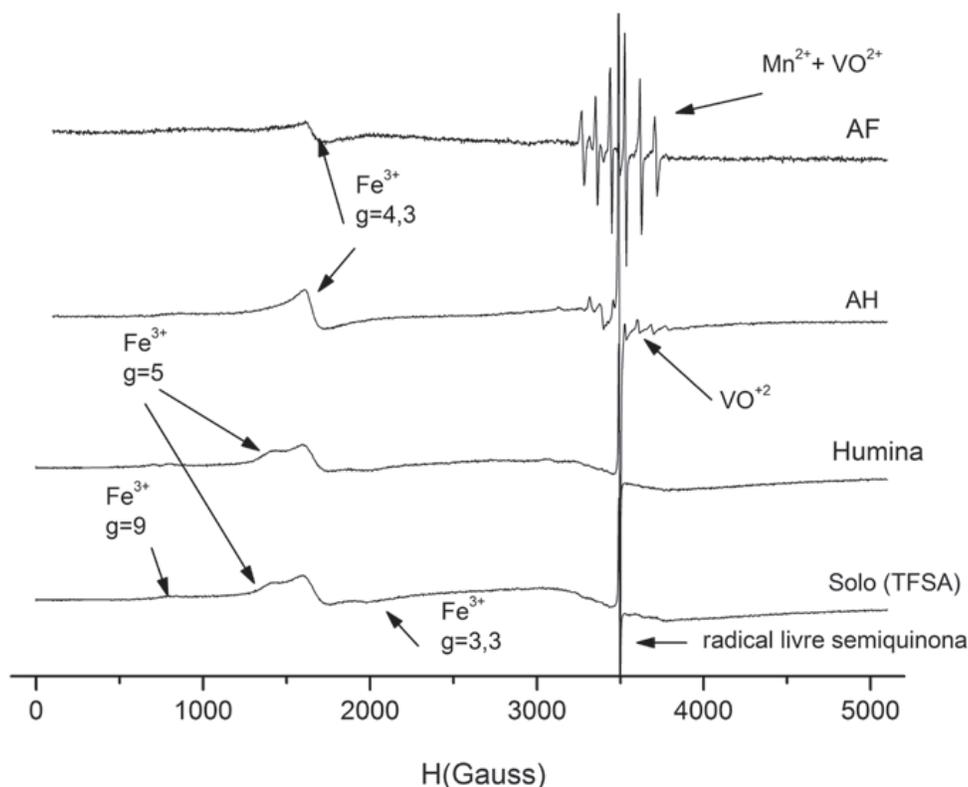


Figura 13. Espectros de RPE de gleissolo TFSA e das suas respectivas frações: AH, AF e HU. Os sinais estão nas mesmas condições experimentais, com frequência de micro-ondas de 9,7 GHz. Adaptado de Saab (1999) e Saab e Martin-Neto (2008).

Na HU foi observado um sinal semelhante ao do solo intacto, com sinais de Fe^{3+} aparecendo em todas as amostras e confirmando, assim, a maior percentagem da fração HU no solo. No AF observa-se a presença dos sinais de Mn^{2+} e do VO^{2+} , como mostra a Figura 14, em que o Mn^{2+} possui spin nuclear (I) igual a $5/2$, e, portanto, 6 linhas hiperfinas com $g = 2,005$ e espaçamento hiperfino de $A = 87$ G, enquanto o VO^{2+} possui $I = 7/2$, isto é, 8 linhas com $g = 1,98$, sendo que possui simetria axial com componentes paralelos e perpendiculares ao campo magnético (SAAB, 1999; SENESI, 1990a).

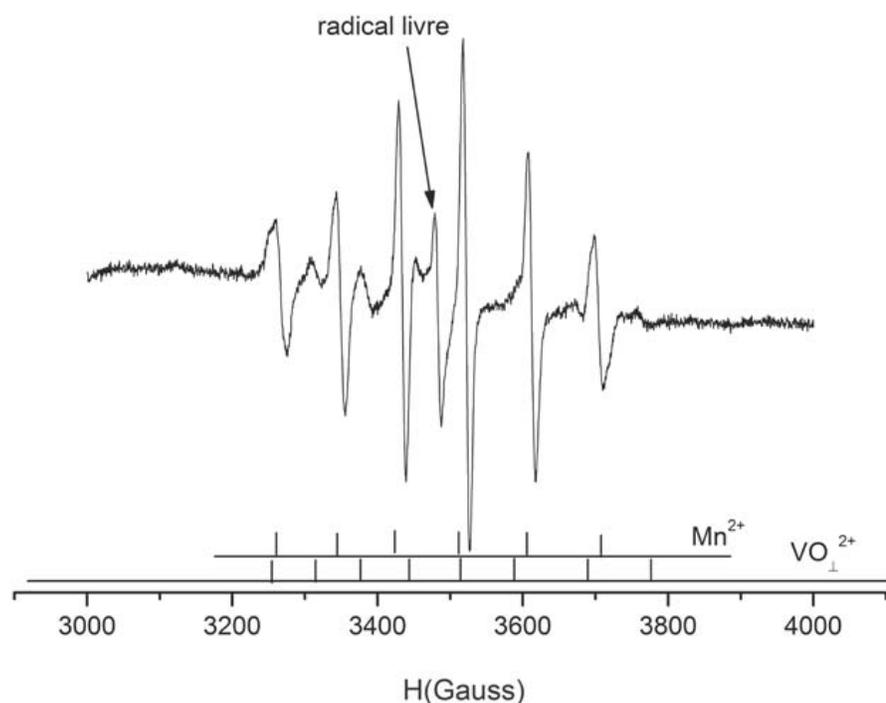


Figura 14. Espectro de RPE do AF evidenciando sobreposição de linhas Mn^{2+} e VO^{2+} (sítios perpendiculares ao campo magnético). Frequência de micro-ondas de 9,79 GHz. Adaptado de Saab (1999).

Considerações finais

Como demonstrado acima, tanto as espectroscopias de RMN, quanto as de EPR e também as de TORMN têm um enorme campo de aplicação no agronegócio, indo desde análises laboratoriais, para determinar a estrutura, dinâmica ou função de uma substância química até aplicações para resolver problemas no campo e no setor agroindustrial. Na aplicação no campo as espectroscopias de RMN e EPR tem demonstrado seu enorme potencial para estudo da matéria orgânica de solos, dos processos de humificação e compostagem, entre outras aplicações. No setor agroindustrial, a RMN vem se tornando uma ferramenta que poderá agregar valor tanto aos produtos *in natura* quanto processados. As aplicações envolvem análise não invasiva da qualidade de frutas, carnes e produtos industrializados e embalados como maioneses, molhos de salada, de mostarda, entre outros. Espera-se que em um futuro próximo as aplicações de técnicas de ressonância magnética tenham ainda mais aplicações no agronegócio, principalmente pela redução do custo dos aparelhos, maior portabilidade e maior sensibilidade.

Referências

- ABREU-JR, C. H.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; SIMOES, M. L.; DA SILVA, W. T. L. Métodos analíticos utilizados em química do solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, R. F. (Org.). **Química e Mineralogia do Solo**. v. 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 529-685.
- BISCEGLI, C. I.; FRANCO, R. W. A.; TANNUS, A.; COLNAGO, L. A. Use of magnetic resonance imaging and spectroscopy in tropical fruits: Challenges and opportunities. In: CRUVINEL, P. E.; COLNAGO, L. A. (Ed.). **Advances in agricultural tomography**. São Carlos: Embrapa, 2000. cap. 10.
- COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D.; SOUZA, A. A.; AZEREDO, R. B. V.; LIMA, A. A.; CERIONI, L. M.; OSÁN, T. M.; PUSIOL, D. J. Why is Inline NMR Rarely Used as Industrial Sensor? Challenges and Opportunities. **Chemical and Engineering Technology**, [S. I.], v. 37, n. 2, p. 191-203, 2014.
- COLZATO, M.; SCRAMIN, J. A.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. ¹H NMR investigation of oil oxidation in macadamia nuts coated with zein-based films. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. I.], v. 35, n. 6, p. 790-796, 2011.
- CZOCH, R.; FRANCIK, A. **Instrumental effects in homodyne electron paramagnetic resonance spectrometers**. Nova York: John Wiley & Sons, 1989.
- FIALHO, L. L.; DA SILVA, W. T. L.; MILORI, D. M. B. P.; SIMOES, M. L.; MARTIN-NETO, L. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. **Bioresource Technology**, [S. I.], v. 101, p. 1927-1934, 2010.
- FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A.; GARRATT, R. C.; LOPES-FILHO, M. A. Identification of Free Fatty Acids in Maize Protein Bodies and Purified Zeins by ¹³C and ¹H Nuclear Magnetic Resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1453, n. 1, p. 106-114, 2000.
- FORATO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; FISCHER, H.; MASCARENHAS, Y. P.; CRAIEVICH, A. F.; COLNAGO, L. A. Conformation of the Z19 Prolamin by FTIR, NMR, and SAXS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 8, p. 2382-2385, 2004.
- GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.
- GOODMAN, B. A.; HALL, P. L. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. In: WILSON, M. J. **Clay mineralogy: spectroscopic and chemical determinative methods**. London: Chapman & Hall, 1994. 173 p.
- GONZALEZ-PEREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S. C.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, B. P.; BAGNATO, V.; COLNAGO, L.; MELO, W.; KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 118, n. 3-4, p. 181-190, 2004.

Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura

LÓPEZ, M. J.; ELORRIETA, M. A.; VARGAS-GARCIA, M. C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. **Bioresource Technology**, [S. I.], v. 81, n. 2, p. 123-129, 2002.

MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O. R.; TALAMONI, J.; POPPI, N. R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a brazilian soil. **Soil Science**, Philadelphia, v. 151, n. 5, p. 377, 1991.

MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; DA SILVA, W. T. L.; SIMOES, M. L. EPR, FTIR, Raman, UV-visible light absorption and fluorescence spectroscopies in studies of humic substances. In: SENESI, N.; XING, B.; HUANG, P. M. (Org.). **Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Organic Matter in Environmental Systems**. Hoboken, New Jersey: Wiley IUPAC Series, 2009. p. 651-728.

PEREIRA, F. M. V.; PFLANZER, S. B.; GOMIG, T.; GOMES, C. L.; FELÍCIO, P. E.; COLNAGO, L. A. Fast determination of beef quality parameters with time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, [S. I.], v. 108, p. 88-91, 2013a.

PEREIRA, F. M.; CARVALHO, A. S.; CABEÇA, L. F.; COLNAGO, L. A. Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Microchemical Journal**, [S. I.], v. 108, p. 14-17, 2013b.

PRESTES, R.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze the oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, [S. I.], v. 596, n. 2, p. 325-329, 2007.

PRIMO, D. C. **Manejo da adubação orgânica para culturas oleaginosas e alimentícias na região semiárida**. 2012. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SAAB, S. C. **Caracterização da matéria orgânica em gleissolos por espectroscopias de EPR, RMN, iIV e UV-Visível**. 1999. 111 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, 497-498, 2003.

_____. Studies of semiquinone free radicals by ESR in the whole soil, HA, FA and humin substances. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 34-37, 2004.

_____. Characterization by Electron Paramagnetic Resonance of Organic Matter in Whole Soil (Gleysoil) and Organic-Mineral Fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 413-417, 2008.

SEGNINI, A.; SOUZA, A. A.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B. P.; DA SILVA, W. T. L.; BONAGAMBA, T. J.; POSADAS, A.; QUIROZ, Z. Characterization of Peatland Soils from the High Andes through ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, [S. I.], v. 77, n. 2, p. 673-679, 2013a.

SEGNINI, A.; CARVALHO, J. L. N.; BOLONHEZI, D.; MILORI, D. M. B. P.; DA SILVA, W. T. L.; SIMOES, M. L.; CANTARELLA, H.; DE MARIA, I. C.; MARTIN-NETO, L. Carbon stock and humification index of organic matter affected by sugarcane straw and soil management. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 5, p. 321-326, 2013b.

SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part I. The electron spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**, Campinas, v. 232, p. 51-75, 1990a.

_____. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. In: **Advances in soil science**. v. 14. Nova York: Springer Verlag, 1990b. p. 77-130.

SKJEMSTAD, J. O.; JANIK, L. J.; TAYLOR, J. A. Non-Living soil organic matter: what do we know about it? **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Clayton, v. 38, n. 7, p. 667-680, 1998.

SWIFT, R. S. Fractionation of soil humic substances. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. (Eds.). **Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization**. Nova York: Wiley & Sons, 1985. p. 387-408.