

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Thais Juliana Tobias

**Desenvolvimento e aplicações de métodos de RMN em estado sólido para
análise de propriedades físicas e químicas de manteiga de cacau**

São Carlos

2025

Thais Juliana Tobias

Desenvolvimento e aplicações de métodos de RMN em estado sólido para análise de propriedades físicas e químicas de manteiga de cacau

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Luiz Alberto Colnago

Coorientador: Tiago Bueno de Moraes

São Carlos

2025

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.

Assinatura: Thais Juliana Tobias
Data: 24/03/2025

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Tobias, Thais Juliana

Desenvolvimento e aplicações de métodos de RMN em estado sólido para análise de propriedades físicas e químicas de manteiga de cacau / Thais Juliana Tobias. — São Carlos, 2025.

122 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2025.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Bueno de Moraes

1. RMN-ES. 2. RMN-DT. 3. Manteiga de cacau. 4. SFC. 5. Estrutura cristalina . I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8



Aos meus pais, Ronald e Sandra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Ronald e Sandra, não apenas por estarem presentes e envolvidos em minha vida, mas também por todo o amor, confiança, apoio e incentivo que me ofereceram ao longo de minha formação.

Agradeço também ao meu irmão, Arthur, pelo amor e incentivo. Aos meus familiares que me proporcionaram apoio e se alegraram em todas minhas conquistas, especialmente aos meus avós (*in memoriam*) que sempre me encorajaram a seguir caminhos que, por circunstâncias, não tiveram oportunidades de trilhar.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Luiz Colnago, por toda paciência, confiança, dedicação, orientação, ensinamentos e incentivos. Agradeço ainda ao professor Dr. Tiago Moraes, meu coorientador, pela disponibilidade, ajuda, sugestões e contribuições valiosas para o trabalho.

Agradeço aos meus amigos pelas conversas, risadas e desabafos. Em especial, agradeço aos amigos que fiz na Embrapa Instrumentação, que, além da amizade, estavam sempre dispostos a ajudar e me ensinaram muito.

Agradeço ao professor Dr. Eduardo Azevêdo e ao Dr. Rodrigo Garcia por toda a disponibilidade, auxílio e pelos conhecimentos compartilhados. À professora Dra. Priscilla Efraim pela concessão das amostras estudadas e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço à Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pelos conhecimentos transmitidos ao longo da graduação e mestrado. À Embrapa Instrumentação pela infraestrutura e a todos os funcionários que possibilitaram e colaboraram com o desenvolvimento deste projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O Brasil é um dos principais produtores de cacau, matéria-prima usada na produção de manteiga de cacau (MC) e de chocolates. A MC é um produto de alto valor agregado, usado tanto nas indústrias de alimentos quanto nas de cosméticos. O teor de gordura sólida ou *Solid-Fat Content* (SFC) é um importante parâmetro de qualidade da MC e sua determinação geralmente realizada em espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT), seguindo as normas ISO 8292-1 (método direto) e ISO 8292-2 (método indireto). Em ambos os métodos ISO, a determinação do SFC se dá pela intensidade dos sinais de ^1H obtidos por RMN-DT. Nessas medições, não há como assinalar os grupos químicos que geram os sinais dos componentes nos estados sólido e líquido. Neste trabalho, propõe-se utilizar a RMN em Estado Sólido (RMN-ES), para obter espectros de ^{13}C em alta resolução, o que permite identificar e diferenciar sinais de ^{13}C relativos às porções dos triglicerídeos (TAG) em estados sólido e líquido, em 34 e 30 ppm respectivamente. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar se esse método poderia ser usado para medições quantitativas do SFC e de outras propriedades físicas e químicas que não são observáveis por RMN-DT. Como as condições de análise para obtenção de espectros de ^{13}C por RMN-ES podem levar ao aquecimento da amostra e alterar o valor do SFC, foi necessário determinar as condições experimentais em que isso não ocorre. Essas condições foram: frequência de rotação da amostra (FR) de 3 kHz, potência de desacoplamento (DEC) de 70 W e tempo de reciclagem (RD) mínimo de 10 s. Para as medições quantitativas de SFC, utilizou-se a sequência de pulso de excitação direta da transição de ^{13}C (HPDEC), com FR de 3 kHz, DEC de 70 W e RD > $5T_1$. A determinação do valor de SFC se deu pelo cálculo com as áreas dos sinais de ^{13}C em 34 e 30 ppm. Os resultados foram concordantes com aqueles obtidos seguindo os métodos ISO, com a vantagem de não sofrer interferência pela presença de componentes distintos às moléculas TAG, como é observado para as medições de SFC seguindo a ISO 8292-1 para amostras de chocolate. A obtenção de espectro de ^{13}C , por RMN-ES utilizando a sequência de polarização cruzada (CPMAS), permitiu a identificação das diferentes formas cristalinas que ocorrem durante o processo de recristalização da MC.

Palavras-chave: manteiga de cacau, SFC, RMN-DT, RMN-ES, estrutura cristalina

ABSTRACT

Brazil is one of the leading producers of cocoa, which serves as a feedstock for the production of cocoa butter (CB) and chocolate. CB is a high-value product that is used in both the food and cosmetic industries. The Solid-Fat Content (SFC) is an important quality parameter for fat. Its measurement is performed using a Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) spectrometer, following the established protocols detailed in ISO 8292-1 (direct method) and ISO 8292-2 (indirect method). In both ISO methods, the determination of SFC is achieved through the intensity of the ^1H TD-NMR signal. However, this approach does not allow for the identification of the specific chemical groups responsible for the signal from the solid-state components. This study introduces a novel approach using high-resolution Solid-State NMR (SS-NMR) to obtain high-resolution ^{13}C spectra. This method enables the identification and differentiation of ^{13}C signals corresponding to the solid and liquid states of triglycerides (TAG) at 34 ppm and 30 ppm, respectively. The primary objective of this study was to assess the applicability of this novel method for the quantitative measurement of SFC and evaluate additional physicochemical properties not discernible through TD-NMR. The measurement parameters used to obtain ^{13}C spectra through SS-NMR may result in sample heating and affect the SFC value. Therefore, it was necessary to establish experimental conditions that would prevent the melting. The optimal analysis conditions identified include a spinning frequency (SF) of 3 kHz, decoupling power (DEC) of 70 W, and a minimum recycle delay (RD) of 10 s. To obtain quantitative measurements for the SFC, a ^{13}C direct excitation pulse sequence (HPDEC) was utilized, with SF of 3 kHz, DEC of 70 W, and $\text{RD} > 5T_1$. The determination of the SFC value was achieved by analyzing the ^{13}C signals areas corresponding to the peaks at 34 ppm and 30 ppm. The results were in agreement with those obtained by following the ISO-established protocols. Additionally, the novel method demonstrated an advantage in that it remained unaffected by the presence of other sample components that are not TAG, unlike measurements conducted according to the ISO 8292-1 protocol for chocolate samples. Furthermore, the acquisition of ^{13}C spectra using SS-NMR with a cross-polarization pulse sequence (CPMAS) enables the identification of the different crystalline forms that emerge during the recrystallization process of CB.

Key-words: cocoa butter, SFC, TD-NMR, SS-NMR, crystalline structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais regiões produtoras de cacau.....	21
Figura 2. Produção de derivados de cacau no mercado brasileiro entre os anos de 2018 e 2023.	22
Figura 3. Dados de exportação de chocolate pelo Brasil, entre 2018 e 2023.	22
Figura 4. a) Estrutura de triacilgliceróis, em que R_1 , R_2 e R_3 podem ou não ser iguais; b) estrutura química do ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), c) estrutura química do ácido esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$), d) estrutura química do ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) e e) exemplo de estrutura da TAG para POS.....	25
Figura 5. Representação das estruturas das celas cristalinas possíveis para triglicerídeos.	26
Figura 6. (A) Vetores momento magnético na ausência de campo magnético externo (B_0) são orientados de forma aleatória, logo, eles se anulam, o que leva ao sistema ter um momento magnético total nulo. (B) Quando na presença de B_0 , os vetores momento magnético se orientam e precessionam de acordo com tal campo, observando-se a formação de um vetor magnetização resultante (M_0) na direção de B_0	30
Figura 7. Representação da sequência de pulso Inversão-Recuperação (IR). Pulso de 180° seguido por pulsos de 90° , separados por tempo τIR . A aquisição de sinal inicia-se após tempo morto (τm) do instrumento.....	31
Figura 8. Intensidade do sinal de RMN para sequência de pulso IR em função do tempo. A presença de um platô, para tempos longos, indica que a majoritária parte do vetor magnetização resultante (M_0) retornou ao seu estado de equilíbrio térmico. ...	32
Figura 9. Visualização da perda de coerência do vetor magnetização resultante no plano xy (M_{xy}) com o passar do tempo. A defasagem encerra quando M_{xy} for nulo. A constante de tempo que define tal processo é T_2	32
Figura 10. Diferença de decaimento do sinal para o processo de relaxação spin-spin considerando campo magnético homogêneo (decaimento T_2) e considerando o efeito da não homogeneidade do campo magnético (decaimento T_2^*).....	33
Figura 11. Representação esquemática da sequência de pulso CPMG, comumente utilizada na determinação da constante de tempo T_2 . Consiste em pulso de 90°_x seguido por n pulsos de 180°_y . Os ecos gerados em função do tempo, resultam em decaimento independente da não-homogeneidade do campo magnético.	34
Figura 12. Espectrômetros de RMN de alto campo para amostras líquidas ou em solução e para amostras sólidas e espectrômetro de RMN no domínio do tempo....	35
Figura 13. Espectros de ^{13}C do acetato de cálcio sólido, $Ca(CH_3CO_2)_2$, a 22,6MHz. (a) estático, sem desacoplamento; (b) estático, com desacoplamento; (c) com desacoplamento, MAS e polarização cruzada.	38
Figura 14. Efeito do deslocamento químico anisotrópico para amostras sólidas a) sinal para cada orientação espacial da molécula b) sobreposição das frequências de cada orientação como observado em (a), resultando no alargamento de linha.....	40
Figura 15. Representação esquemática da relação geométrica entre a posição do rotor contendo amostra e o campo magnético externo B_0 . O ângulo indicado quando apresenta valor $\theta = 54,74^\circ$ é conhecido por ângulo mágico. Ao rotacionar o rotor em altas velocidades, quando em ângulo mágico, os efeitos da anisotropia são reduzidos.	42

Figura 16. Representação esquemática da sequência de pulsos utilizada para a polarização cruzada entre os spins para os canais de ^1H e ^{13}C . Note que para o canal do ^1H o pulso inicial, 90°_x , é responsável por levar a magnetização ao plano $x'y'$. O pulso em $-y$, para ambos os canais, é do tipo spinlock e o responsável pela condição de Hartmann-Hahn. Após o pulso de contato entre os canais, para o canal de ^1H tem-se o desacoplador, enquanto para o canal de ^{13}C abre a aquisição do sinal FID.	44
Figura 17. Níveis de energia para os spins ^1H e ^{13}C quando colocados na presença de: a) campo magnético B_0 igual para ambos os spins, a diferença entre ΔE é função da constante magnetogirica γ , a qual é diferente para cada spin e, no caso dos spins ^1H e ^{13}C , γ_H é aproximadamente quatro vezes maior do que γ_C e b) condição de Hartmann-Hahn, na qual cada spin experimenta um campo magnético diferente, devido ao pulso spinlock aplicado, quando ajustados corretamente atingem essa condição, na qual $\omega_{1H} = \omega_{13C}$, em que é possível a transferência de polarização entre os núcleos.	45
Figura 18. Espectros de ^{13}C obtidos utilizando sequência CPMAS obtidos para as diferentes estruturas polimórficas do TAG SOS.	48
Figura 19. Exemplo de decaimento de sinal FID utilizado para a determinação do valor de SFC seguindo o protocolo ISO. Em destaque, encontra-se as regiões de $11\ \mu\text{s}$ e $70\ \mu\text{s}$ utilizadas nos cálculos.	51
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H dos de uma amostra de MC com MAS de 10 kHz.	67
Figura 21. (a) Estrutura geral de um ácido graxo saturado com indicativo de posições que dão sinais em diferentes deslocamentos químicos e (b) representação da parte insaturada, em cis, de ácido graxo presente em MC.	68
Figura 22. Espectros de RMN de ^{13}C dos componentes líquidos (a) e componentes sólidos e líquidos (b) da MC. Os espectros foram obtidos em velocidade de rotação 10 kHz, potência de desacoplamento de 70 W e tempo de reciclagem de 250 s (para a sequência HPDEC) e 5 s (para a sequência CPMAS), respectivamente.	69
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C de MC entre 0 e 60 ppm obtidos com a sequência CPMAS, em diferentes frequências de rotação, com potência de desacoplamento de 70 W e tempo de reciclagem de 5 s. As diferentes velocidades aplicadas foram: (a) 10 kHz, (b) 3 kHz e (c) estático.	72
Figura 24. Variação da área referente a porção sólida, obtida através do espectro de ^{13}C adquirido com a sequência CPMAS, da amostra de manteiga de cacau, em função da frequência de rotação.	73
Figura 25. Espectros de RMN de ^{13}C , em diferentes potências do DEC, para amostra de MC, rotacionadas em 3 kHz. A sequência utilizada, CPMAS, permite variação no parâmetro de potência de desacoplamento da interação dipolar entre os spins ^1H e ^{13}C . As diferentes potências aplicadas foram: (a) 70 W, (b) 30 W e (c) 10 W.	74
Figura 26. (I) Espectros de ^{13}C obtido utilizando sequência CPMAS com diferentes valores de tempo de reciclagem: (a) 30 s, (b) 25 s, (c) 15 s, (d) 5 s e (e) 2 s. (II) Variação da intensidade do sinal 34 ppm em função do valor de tempo de reciclagem.	75
Figura 27. Experimento para avaliação do efeito da velocidade de rotação do rotor para espectros de ^1H em amostra de MC. A amostra foi girada em 3, 5 e 10 kHz por 30 minutos antes de fazer a aquisição do espectro sem rotação.	76

Figura 28. Espectros de RMN de ^1H , entre -1 e 7 ppm, de uma amostra MC submetida por 30 minutos a rotações de (b) 3, (c) 5 e (d) 10 kHz previamente a aquisição. O espectro em (a) representa o experimento estático sem prévia rotação (referência).	77
Figura 29. Experimento para avaliação do efeito da potência de desacoplador (DEC) e tempo de reciclagem (RD) para espectros de RMN de ^1H em amostra de MC. Os valores dos tempos de RD utilizados foram: 1, 5, 10 e 50 s.	78
Figura 30. Espectros de RMN de ^1H , entre -1 e 7 ppm, obtidos sem rotação. O espectro (a) é referente a amostra sem passar pelo processo de irradiação e é considerado o espectro de referência. Os demais espectros foram adquiridos após amostra ser irradiada por 30 minutos, na frequência de RMN de ^1H com 70 W. Durante esses 30 minutos o desacoplador foi ligado por 50 ms com tempos de repetição de: b) 50 s, c) 10 s, d) 5 s e e) 1 s.	79
Figura 31. Espectros de ^1H de amostras de manteiga comercial sem sal (a), gordura bovina (b) e gordura suína (c) com destaque ao sinal referente a água presente nas amostras.	80
Figura 32. Espectro de ^1H em diferentes frequências de rotação (a) e janela espectral referente ao sinal da água (b).	81
Figura 33. Variação da temperatura da amostra de manteiga comercial sem sal em função da frequência de rotação do rotor.	82
Figura 34. Variação da temperatura da amostra de manteiga comercial sem sal em função do tempo de reciclo entre os <i>scans</i>	83
Figura 35. Variação de área do sinal referente a porção sólida da amostra de manteiga comercial sem sal (34 ppm) como função da variação de (a) frequência de rotação e (b) tempo de reciclo.	84
Figura 36. Representação esquemática do experimento de Saturação-Progressiva, no qual o valor de D1 é variável.	86
Figura 37. Resultado do experimento de SP para amostra de MC: a) espectros de ^{13}C com D1 de 500 (I), 10 (II) e 1 s (III), janela espectral 36 – 29 ppm adquiridos com D1 em ordem crescente; b) área (u.a.) vs. tempo (s) para o deslocamento químico 34 ppm e 30 ppm para espectros visualizados em (a); c) espectros de ^{13}C com D1 de 500 (I), 10 (II) e 1 s (III), janela espectral 36 – 29 ppm adquiridos com D1 em ordem decrescente; d) área (u.a.) vs. tempo (s) para o deslocamento químico 34 ppm e 30 ppm para espectros visualizados em (c), juntamente com fitting mono-exponencial para o gráfico referente ao sinal em 34ppm.	87
Figura 38. Representação esquemática do experimento de Inversão-Recuperação, no qual o valor de D2 é variável.	88
Figura 39. Resultado do experimento de IR para amostra de MC: a) espectros de ^{13}C com D2 de 0,01; 0,15; 0,50; 4,0; 20,0; 100,0; 800,0 s, janela espectral 40 – 20 ppm adquiridos com D1 de 800,0 s; b) intensidade (u.a.) vs. tempo (s) para o deslocamento químico 34ppm e 30ppm para espectros visualizados em (a).	89
Figura 40. Espectros de ^{13}C , em diferentes potências, para amostra de MC, medido com velocidade de 3 kHz. A sequência utilizada, HPDEC, permite variação no parâmetro de potência do desacoplador no canal de ^1H . As diferentes potências aplicadas foram (a) 70 W, (b) 30 W e (c) 10 W.	91

Figura 41. Variação da área do sinal referente a porção líquida (30 ppm) da amostra de MC, obtido a partir do espectro de ^{13}C adquirido com a sequência HPDEC, em função do tempo de reciclo.	92
Figura 42. Espectro de ^{13}C , em diferentes frequências de rotação, para amostra de MC, medido com potência de 70 W. As diferentes velocidades aplicadas foram (a) 10 kHz, (b) 3 kHz e (c) sem rotação.	94
Figura 43. Variação da área do sinal referente a porção líquida (30 ppm) da amostra de MC, obtido a partir do espectro de ^{13}C adquirido com a sequência HPDEC, em função da frequência de rotação.	95
Figura 44. Espectros de RMN de ^{13}C dos componentes líquidos (a) e componentes sólidos e líquidos (b) da MC para identificação dos sinais sobrepostos pelo sinal da porção rígida do TAG (34 ppm), que devem ser corrigidos no cálculo de SFC seguindo o método HPDEC.	96
Figura 45. Comparativo entre os valores de SFC obtidos a partir de espectro ^{13}C por HPDEC, com e sem correção dos valores, devido a sinais que sobrepoem ao sinal referente à porção sólida em 34 ppm. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.	98
Figura 46. Comparativo dos valores de SFC obtido através da sequência HPDEC para amostras de derivados de cacau com e sem tratamento térmico. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.	99
Figura 47. Comparativo entre valores de SFC após tratamento térmico, obtidos seguindo os protocolos ISO 8292-1 (a) e ISO 8292-2 (b) para amostras diferentes derivados de cacau. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.	101
Figura 48. Comparativo dos valores de SFC obtidos seguindo a ISO 8292, tanto pelo método direto quanto pelo método indireto, e seguindo o método proposto (HPDEC) para diferentes amostras de manteiga de cacau que não passaram por tratamento térmico.	102
Figura 49. Comparativo valores de SFC obtidos para amostras de derivados de cacau que não passaram por tratamento térmico. Valores de SFC determinados através do método protocolado, tanto direto quanto indireto, e pela sequência propostas (HPDEC). Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: L refere-se ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.	103
Figura 50. Comparativo dos valores de SFC obtidos seguindo a ISO 8292, tanto pelo método direto quanto pelo método indireto, e seguindo o método proposto (HPDEC) para diferentes amostras de manteiga de cacau que passaram por tratamento térmico.	104
Figura 51. Comparativo valores de SFC obtidos para amostras de liquor de cacau, chocolate ao leite, 60% e 70% que passaram pelo tratamento térmico. Valores de SFC determinados através do método protocolado indireto, e pela sequência propostas (HPDEC). Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: L refere-se	

ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.	105
Figura 52. Comparativo entre as diferenças dos dados de SFC para os métodos indireto (quadrado preto) e direto (círculo vermelho) em relação aos valores de SFC obtidos por HPDEC (referência) para amostras de derivados de cacau que passaram por tratamento térmico. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.	106
Figura 53. Comparativo valores de SFC, com respectivos desvios padrões, obtidos pelo método proposto e pelo método indireto para as amostras CL_1, CL_4 e C60_2. Fitting linear descrito pela equação $y = 13,2 \pm 1,5 + 0,86 \pm 0,04x$, com R^2 equivalente a 0,99813.	107
Figura 54. Espectros de ^{13}C adquiridos com sequência CPMAS acompanhando o processo de cristalização da manteiga de cacau por 70 h (a) e transição sólido-sólido verificada pela variação de deslocamento químico do sinal referente à porção rígida do TAGs (b).	110
Figura 55. Cristalização da MC acompanhada pela variação de área dos sinais referente às porções móvel em 30 ppm (quadrado preto) e rígida em 33 ppm (círculo vermelho) e 34 ppm (triângulo azul).	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas polimórficas da manteiga de cacau, conforme a definição de Vaeck e a definição de Willie e Lutton. Valores de temperatura de fusão atribuídos a cada uma das estruturas, bem como o tipo de cela cristalina de cada.	26
Tabela 2. Valores de constante magnetogírica e abundância natural de alguns núcleos comumente estudados utilizando a técnica de RMN.....	45
Tabela 3. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência CPMAS. Para essa sequência, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C , enquanto o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos estático e com rotação em frequências até 11 kHz.	56
Tabela 4. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^1H , utilizando sequência one-pulse, o canal 1 refere-se ao ^1H nesta sequência. Tais parâmetros foram utilizados para experimentos sem rotação, contudo, entre cada medida, a amostra estava sob a influência da frequência de rotação desejada, 3 kHz, 5 kHz e 10 kHz, por 30 minutos.	58
Tabela 5. Parâmetros de aquisição do experimento Saturação-Progressiva, para a qual o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H ; utilizado frequência de rotação do rotor de 3kHz. * O parâmetro recycle delay foi variado para cada experimento, a sequência de realização dos experimentos, conforme RD foi: 500, 300, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 e 1 s, a ordem crescente de tempos também foi utilizada para obtenção dos resultados. ** Para RD menor que 100 segundos, foram utilizados 4 dummy scans.	60
Tabela 6. Parâmetros de aquisição do experimento Inversão-Recuperação, para a qual o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H ; utilizado frequência de rotação do rotor de 3kHz. * O parâmetro delay variável (VD) foi diferente para cada experimento, sendo os valores utilizados: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,5; 0,8; 1,3; 2,1; 3,3; 5,4; 8,6; 13,9; 22,4; 36,0; 57,8; 93,0; 149,5; 240,5; 386,7; 621,8; 1000,0 s.	60
Tabela 7. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência HPDEC, para esta, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos estático e com rotação em frequências 0,5 kHz a 12 kHz.....	61
Tabela 8. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência HPDEC, para esta, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos de determinação de SFC.....	62
Tabela 9. Descrição do tratamento térmico realizado para as amostras em estudo, com indicativo de temperatura e tempo em que a amostra foi mantida na temperatura especificada.	62
Tabela 10. Identificação, descrição e origem das amostras utilizadas no estudo da determinação e comparação entre diferentes métodos, protocolados e proposto, de obtenção de valores de SFC.....	63
Tabela 11. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência CPMAS, para essa sequência, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C , enquanto o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos de acompanhamento de cristalização.	65

Tabela 12. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência HPDEC, para esta, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2, ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos de acompanhamento de cristalização.....	65
Tabela 13. Assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H dos componentes líquidos da MC com deslocamento químico em função do grupo funcional.....	67
Tabela 14. Assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C dos componentes em estado líquido da MC com deslocamento químico em função do grupo funcional.....	69

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AQ	Tempo de aquisição
$\vec{B}_0$	Campo magnético estático
$\vec{B}_1$	Campo magnético oscilante
C60	Chocolate 60% de cacau
C70	Chocolate 70% de cacau
CL	Chocolate ao leite
CP	<i>Cross-Polarization</i> - Polarização cruzada
CPDPRG 2	Sequência de desacoplamento
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSA	<i>Chemical shift anisotropy</i> – Anisotropia de deslocamento químico
D	Constante de acoplamento dipolar
D1 or RD	<i>Recycle delay</i> – tempo de reciclagem ou tempo de reciclo
DEC	<i>High-Power Decoupling</i> - Desacoplamento de alta potência
δ	Deslocamento químico; em ppm
$\Delta\vec{B}_0$	Não-homogeneidade do campo magnético $\vec{B}_0$
DS	<i>Dummy scans</i>
f	Fator de correção para cálculo de SFC
FID	<i>Free Induction Decay</i> - Decaimento de Indução Livre
FR	Frequência de rotação da amostra
γ	Constante magnetogírica
h	Constante de Planck
IR	Inversão-Recuperação
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> - Organização Internacional de Padronização
J	Constante de acoplamento spin-spin
$\vec{L}$	Momento angular
L	Liquor de cacau
$\vec{M}_0$	Magnetização resultante
MAS	<i>Magic-Angle Spinning</i> - Rotação em torno do ângulo mágico
MC	Manteiga de cacau

NS	Número de acumulações (<i>scans</i>)
P1	Duração de pulso de excitação do canal 1
P3	Duração de pulso de excitação
P15	Tempo de contato
PLW1	Potência durante tempo de contato
PLW12	Potência de desacoplamento
POP	1,3-dipalmitato-2-oleato de glicerila
POS	1-palmitato-2-oleato-3-estearato de glicerila
r	Distância entre os núcleos
rf	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN-AR	Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução
RMN-DT	Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo
RMN-ES	Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido
S ₁₁	Intensidade do sinal em 11 μ seg
S ₇₀	Intensidade do sinal em 70 μ seg
SFC	<i>Solid-Fat Content</i> - Conteúdo de gordura sólida
SOS	1,3-diestearato-2-oleato de glicerila
SPW0	Potência do canal 2 durante tempo de contato
T ₁	Constante de tempo do processo de relaxação spin-rede ou longitudinal
T ₁ ρ	Constante de tempo de relaxação de pulso <i>spinlock</i>
T ₂	Constante de tempo do processo de relaxação spin-spin ou transversal
T ₂ [*]	Constante de tempo efetivo do processo de relaxação spin-spin
τ	Tempo
τ_m	Tempo morto do instrumento
θ	Ângulo de rotação da magnetização
TF	Transformada de Fourier
t _p	Duração do pulso de radiofrequência
$\vec{\mu}$	Momento magnético
ν	Frequência (Hz)
ω	Frequência angular (rad/s)

$\vec{\omega}_0$

Frequência de Larmor (rad/s)

SUMÁRIO

1.0.	Introdução	20
1.1.	Manteiga de cacau	23
1.1.1.	Estrutura cristalina de triglicerídeos	24
1.2.	Fundamentos de Ressonância Magnética Nuclear – RMN	27
1.2.1.	Características gerais das técnicas espectroscópicas de RMN	34
1.3.	Ressonância Magnética Nuclear de amostras sólidas	37
1.3.1.	Interações que influenciam na RMN-ES	39
1.3.1.1.	Anisotropias de deslocamento químico	39
1.3.1.2.	Interação dipolar	40
1.3.2.	Técnicas aplicadas em RMN-ES	41
1.3.2.1.	Rotação em ângulo mágico – MAS	41
1.3.2.2.	Desacoplamento de alta potência – DEC	42
1.3.2.3.	Polarização cruzada – CP	43
1.3.3.	Análise de Manteiga de cacau e derivados por RMN de ^{13}C em estado sólido e RMN-DT	46
1.4.	Conteúdo de gordura sólida – SFC	49
2.0.	Objetivos	53
2.1.	Objetivo Geral	53
2.2.	Objetivos Específicos	53
3.0.	Materiais e Métodos	54
3.1.	Preparo de amostra	54
3.2.	Parâmetros de aquisição	56
3.2.1.	Variação espectral ocasionada por MAS e DEC para experimentos utilizando sequência CPMAS	56
3.2.2.	Variação espectral ocasionada por MAS e DEC para experimentos utilizando sequência <i>one-pulse</i>	57
3.2.2.1.	Determinação da variação de temperatura da amostra	58
3.2.3.	Determinação da constante de tempo T_1	59
3.2.4.	Variação espectral ocasionada por MAS e DEC para experimentos utilizando sequência HPDEC	61
3.2.5.	Determinação dos valores de SFC	61
3.2.6.	Cristalização isotérmica de manteiga de cacau	64
4.0.	Resultados e Discussão	65

4.1.	Influência da frequência de rotação da amostra e irradiação de radiofrequência nos espectros de RMN de manteiga de cacau.....	71
4.1.1.	Influência do MAS e DEC nos espectros de ^1H de uma amostra de manteiga de cacau	75
4.2.	Determinação da variação de temperatura da amostra de manteiga comercial sem sal em função de MAS e DEC	80
4.3.	Análise da frequência de rotação e DEC nos espectros de RMN de ^{13}C de manteiga de cacau obtidos por sequência HPDEC	85
4.3.1.	Determinação da constante de tempo T_1 de ^{13}C da amostra de MC.....	85
4.4.	Avaliação da influência da DEC e MAS na razão sólido/líquido de amostra de manteiga de cacau por RMNq de ^{13}C.....	90
4.5.	Descrição do método de determinação de SFC por espectro ^{13}C obtidos por RMN-ES	95
4.6.	Comparação entre os valores de SFC obtidos por RMN-ES e RMN-DT (normas ISO).....	100
4.7.	Diferenciação de polimorfos durante o processo de cristalização isotérmico	108
5.0.	Conclusão.....	112
6.0.	Referências bibliográficas	114

1.0. Introdução

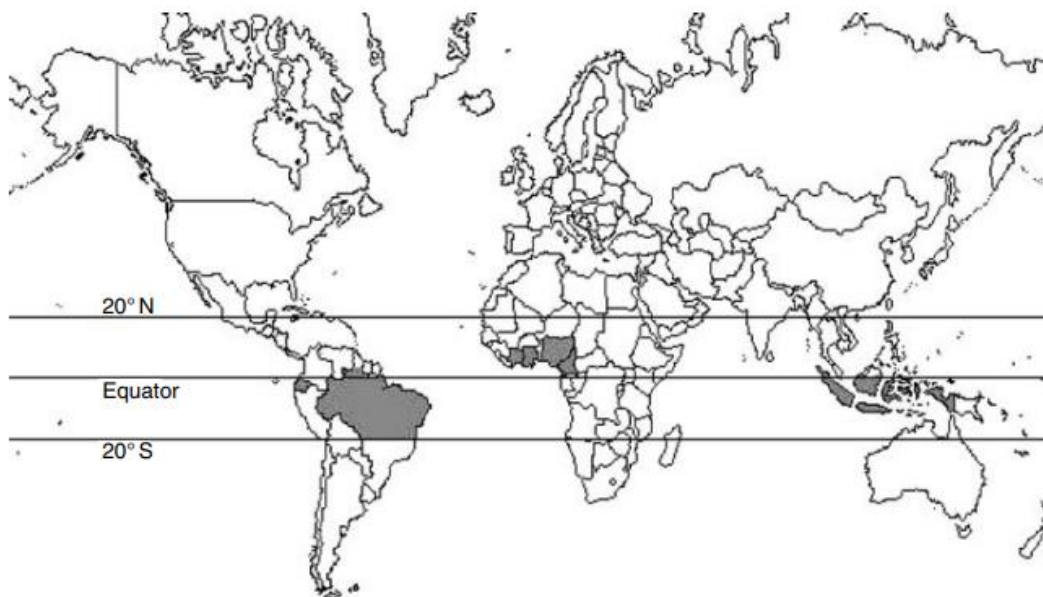
Historicamente, o chocolate foi primeiro consumido na forma de bebida, denominada *Chocolatl*, pela civilização Asteca, que estava localizada na região em que hoje se encontra o México. A partir da colonização espanhola da América, a bebida chegou à Europa, onde houve o desenvolvimento do produto até chegar ao chocolate que se conhece hoje em dia. Séculos se passaram até o surgimento do chocolate em barra, ocorrido no século XIX na Inglaterra, pela companhia J. S. Fry & Sons, Ltd., mais conhecida como Fry's. Já o chocolate ao leite foi desenvolvido por Daniel Peters na Suíça, anos depois, em 1876 (BECKETT, 2009; MINIFIE, 1994).

Os produtos de chocolate podem ser descritos como uma dispersão de partículas de cacau em uma fase gordurosa contínua, constituída pela manteiga de cacau, com demais ingredientes tais como leite e açúcar (LUCCAS, 2001). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define o que é chocolate na RDC nº 723, de primeiro de julho de 2022, como:

Produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (**Theobroma cacao** L.), massa, pasta ou liquor de cacau, cacau em pó ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC Nº 723, de 1º de julho de 2022.).

O fruto do cacaueiro *Theobroma cacao* L., nativo da floresta Amazônica, é a principal matéria prima para a produção do chocolate. Como se pode ver na Figura 1, o cacaueiro é cultivado em regiões próximas à linha do Equador, sendo que os maiores produtores, atualmente, se encontram nas regiões oeste do continente africano, na região sudoeste do continente asiático e na América do Sul (BECKETT, 2009; HENDERSON et al., 2007; MINIFIE, 1994).

Figura 1. Principais regiões produtoras de cacau.

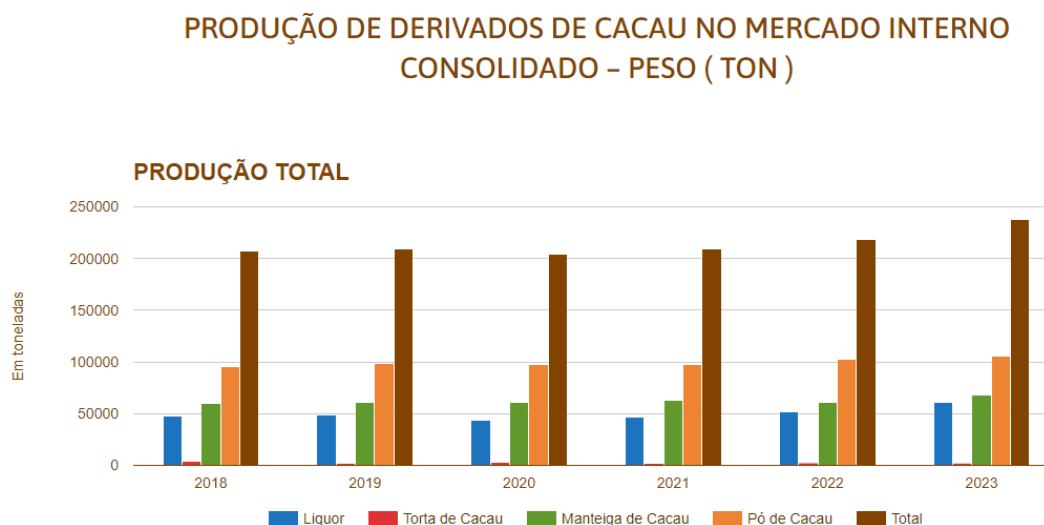


Fonte: BECKETT(2009)

O Brasil está entre os principais produtores de cacau do mundo. Contudo, a produção majoritária de cacau se encontra no continente africano, que é responsável por mais de 70% da produção de grãos de cacau em 2021/22. A Costa do Marfim é o maior produtor mundial (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2024).

Na Figura 2, pode-se ver que a cadeia do cacau no Brasil é um setor em franco crescimento. Considerando a produção total, houve aumento de mais de 30 mil toneladas produzidas entre 2018 e 2023 (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU, 2024a).

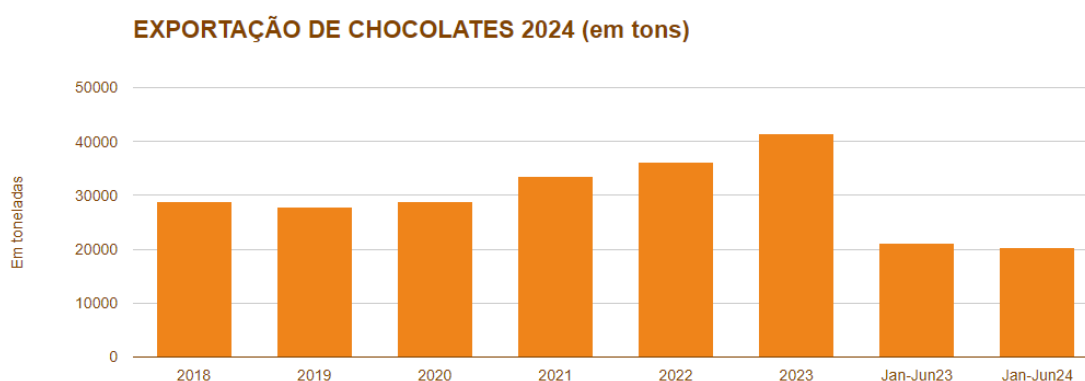
Figura 2. Produção de derivados de cacau no mercado brasileiro entre os anos de 2018 e 2023.



Fonte: ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU (2024a)

Considerando a exportação de chocolates (Figura 3), observa-se também um crescimento nas exportações brasileiras. Entre 2018 e 2023 houve um aumento de mais de 10 mil toneladas exportadas (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU, 2024b).

Figura 3. Dados de exportação de chocolate pelo Brasil, entre 2018 e 2023.



Fonte: ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU (2024b)

Além disso, há perspectiva de maior crescimento no mercado brasileiro. Em 2023, a cadeia do chocolate rendeu US\$ 3,24 bilhões e há previsão de que renda US\$ 3,98 bilhões até 2028. Também é válido ressaltar a importância desse setor para a

exportação, que até junho do ano de 2023 foi de US\$ 71,8 milhões (ABICAB, 2023; MORDOR INTELLIGENCE INDUSTRY REPORTS, 2023).

Dentre os constituintes do grão de cacau, a fração lipídica, denominada de manteiga de cacau, é um dos principais componentes e dá ao chocolate algumas das suas principais características sensoriais. Além disso, em muitos processos de produção de chocolate há adição de porções extras de manteiga de cacau, visando melhorar tanto suas características físico-químicas quanto sensoriais. Assim, pode-se dizer que o controle e garantia de qualidade da manteiga de cacau são imprescindíveis para a confecção de produtos de alta qualidade e com alto valor agregado. Sabe-se que as propriedades da manteiga de cacau variam conforme a variedade, características edafoclimáticas da região produtora (*terroir*), e da estação do ano em que o fruto foi colhido (FIGUEIRA; LUCCAS, 2022).

1.1. Manteiga de cacau

O chocolate é formado por uma porção lipídica e uma porção não lipídica, esta última é composta, majoritariamente, pelos sólidos de cacau não gordurosos, açúcar e derivados lácteos. Considerando a porção gordurosa, destaca-se a manteiga de cacau, que está sempre presente nos chocolates; outras fontes lipídicas são, por exemplo, o emulsificante e a gordura do leite, no caso de chocolate ao leite (TALBOT, 2012).

A manteiga de cacau é uma gordura vegetal responsável por muitas das características do chocolate, como brilho, dureza e quebra (*snap*) e, quando está na boca do consumidor, sua fusão completa permite a liberação de aromas, contribuindo para a percepção sensorial. Industrialmente, é geralmente extraída do liquor de cacau (prensagem hidráulica) e não da amêndoa (expeller) (LUCCAS, 2001; RIBEIRO et al., 2012; TALBOT, 2012).

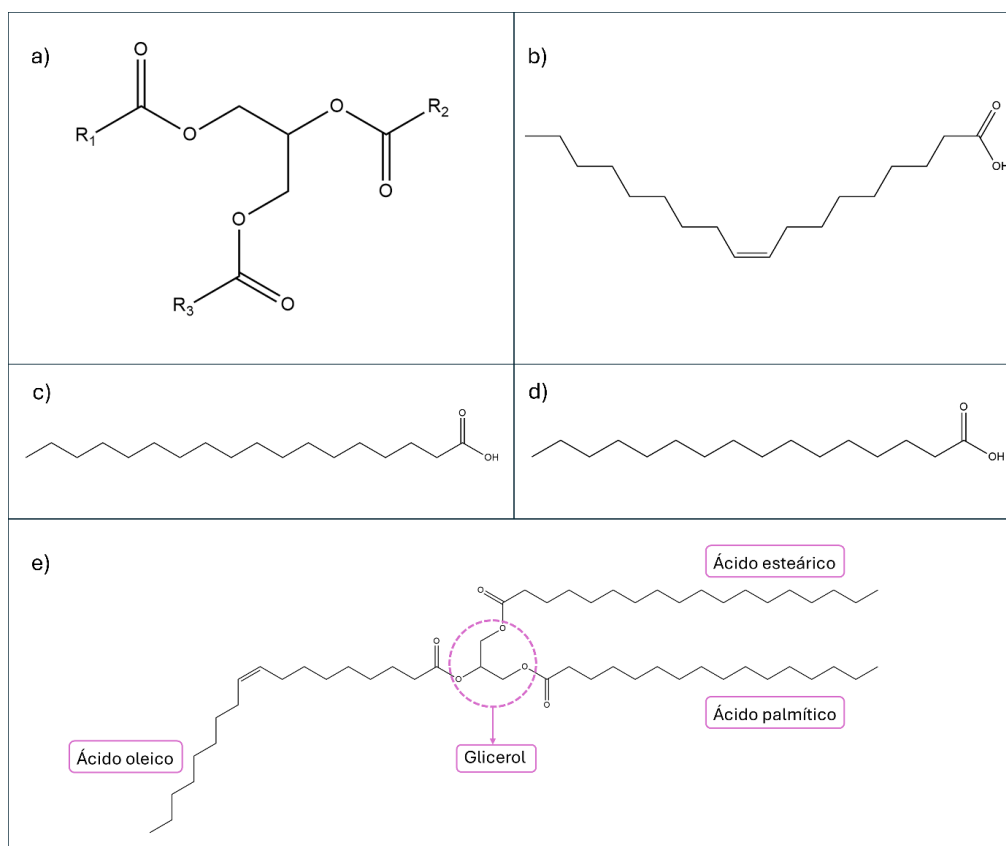
A composição da manteiga de cacau está atrelada às suas propriedades físicas, como microestrutura, fusão e cristalização, polimorfismo e conteúdo de gordura sólida (SFC). Contudo, a composição da manteiga de cacau varia de acordo com as condições de cultivo, ou seja, varia conforme a região geográfica e os climas,

como já mencionado. A manteiga de cacau produzida em algumas regiões do Brasil tem maior conteúdo de ácido oleico quando comparada com a de outras regiões produtoras, ou seja, tem ponto de fusão menor e, portanto, é mais macia e sua cristalização é menos favorável, contudo, há trabalhos que já demonstraram que amostras de determinadas regiões do Brasil possuem perfil similar à manteiga de cacau de regiões que apresentam maior conteúdo de gordura sólida (BECKETT, 2009; RIBEIRO et al., 2012; TALBOT, 2012; VIEIRA et al., 2015).

1.1.1. Estrutura cristalina de triglicerídeos

A manteiga de cacau é composta majoritariamente por misturas de triglicerídeos (TAG), já os componentes minoritários são diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Os TAG são ésteres de glicerol ligados a três moléculas de ácidos graxos (Figura 4). A maioria desses ácidos graxos na manteiga de cacau são: ácido oleico (C18:1), o qual corresponde a aproximadamente 35%, ácido esteárico (C18:0), aproximadamente 34%, e ácido palmítico (C16:0), aproximadamente 26% (BECKETT, 2008; GHAZANI; MARANGONI, 2021; SCHENK; PESCHAR, 2004).

Figura 4. a) Estrutura de triacilgliceróis, em que R_1 , R_2 e R_3 podem ou não ser iguais; b) estrutura química do ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), c) estrutura química do ácido esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$), d) estrutura química do ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) e e) exemplo de estrutura da TAG para POS.

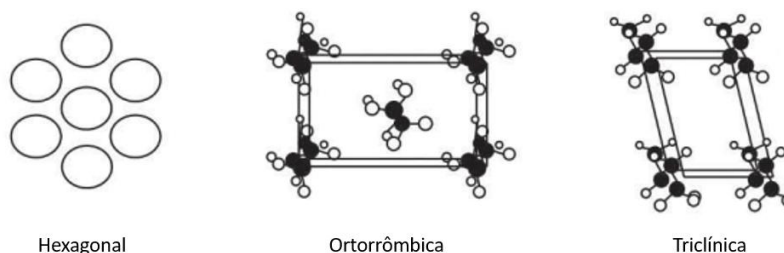


Fonte: Autoria própria

Os TAG mais comuns na MC são o POS (1-palmitato-2-oleato-3-estearato de glicerila), SOS (1,3-diestearato-2-oleato de glicerila) e POP (1,3-dipalmitato-2-oleato de glicerila), em que O representa o ácido oleico, S, o ácido esteárico e P, o ácido palmítico. A concentração desses TAG interfere tanto na forma cristalina quanto na transição de fases (BECKETT, 2008; GHAZANI; MARANGONI, 2021; SCHENK; PESCHAR, 2004).

Os triglicerídeos sólidos são estruturas polimórficas, isto é, possuem diferentes formas cristalinas. Comumente, apresentam três formas cristalinas: α , β' e β (Figura 5). A estrutura α possui celda do tipo hexagonal, a estrutura β' , ortorrômbica e a β , triclínica. A estabilidade dessas estruturas cresce na ordem apresentada, ou seja, $\alpha < \beta' < \beta$ (BECKETT, 2008; GHAZANI; MARANGONI, 2021; SASAKI; UENO; SATO, 2012; SCHENK; PESCHAR, 2004).

Figura 5. Representação das estruturas das celas cristalinas possíveis para triglicerídeos.



Fonte: Adaptado de SASAKI; UENO; SATO (2012)

Contudo, para a manteiga de cacau estão descritas na literatura seis estruturas cristalinas, de acordo com Vaeck (1960) e Willie e Lutton (1966). A Tabela 1 apresenta algumas de suas características (BECKETT, 2008; GHAZANI; MARANGONI, 2021; SASAKI; UENO; SATO, 2012; SCHENK; PESCHAR, 2004; VAECK, 1960; WILLE; LUTTON, 1966).

Tabela 1. Estruturas polimórficas da manteiga de cacau, conforme a definição de Vaeck e a definição de Willie e Lutton. Valores de temperatura de fusão atribuídos a cada uma das estruturas, bem como o tipo de cela cristalina de cada.

Vaeck	Wille e Lutton	Temperatura de fusão (°C)	Estrutura de cela
γ	I	17,3	Não determinada
α	II	23,3	Hexagonal
β'	III	25,5	Ortorrômbica
β'	IV	27,5	Ortorrômbica
β	V	33,8	Triclínica
β	VI	36,3	Triclínica

Fonte: adaptado de SASAKI; UENO; SATO (2012)

A forma cristalina γ é a mais instável das estruturas polimórficas da manteiga de cacau, por isso, logo é transformada na estrutura α , a qual também pode ser formada com o resfriamento da manteiga de cacau líquida. Analogamente, as estruturas β' (III), β' (IV) e β (V) são formadas diretamente do material em seu estado líquido, enquanto a estrutura β (VI) só é formada por transição do tipo sólido-sólido (BECKETT, 2008; GHAZANI; MARANGONI, 2021; SASAKI; UENO; SATO, 2012; SCHENK; PESCHAR, 2004).

1.2. Fundamentos de Ressonância Magnética Nuclear – RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma dentre várias técnicas espectroscópicas que utilizam a interação das ondas eletromagnéticas com a matéria para obter informações sobre propriedades físico-químicas de materiais, como por exemplo sua estrutura química. Para o caso da RMN, emprega-se ondas de rádio ou radiofrequências, as quais possuem baixa energia e são usadas para observar a transição de spins nucleares (MACOMBER, 1997; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

As primeiras observações da RMN em matéria condensada (líquida e sólida) surgiram em grupos independentes liderados pelos físicos Edward Purcell, da Universidade de Harvard, e Felix Bloch, da Universidade de Stanford. Tais estudos, cujos artigos foram publicados em 1946, renderam-lhes o Prêmio Nobel de Física em 1952, pela descoberta do fenômeno de ressonância magnética nuclear na matéria condensada (BLOCH; HANSEN; PACKARD, 1946; CLARIDGE, 2016; GIL; GERALDES, 1987; PURCELL; TORREY; POUND, 1946; THE NOBEL PRIZE IN PHYSICS, 1952).

Pesquisas feitas pelos grupos mencionados, bem como por outros grupos, resultaram em mais avanços na área. Por exemplo, os estudos realizados durante a década de 1950 possibilitaram observar que dependendo do ambiente químico do isótopo observado na RMN, sua frequência de precessão é ligeiramente diferente, fenômeno conhecido como deslocamento químico (δ) e devido às interações com seus ligantes vizinhos é observado o efeito da constante de acoplamento spin-spin (J), fenômenos os quais possibilitaram a determinação estrutural de moléculas orgânicas (GIL; GERALDES, 1987; LEVITT, 2013; SIEVERS, 1973).

Durante as décadas de 1960 e 1970, os avanços observados nesse campo de estudo foram ainda maiores, devido à introdução dos espectrômetros de ressonância magnética nuclear pulsados com transformada de Fourier, o qual promove a excitação de todos os sinais com pulso de RF único. Outros avanços no ganho de resolução espectral ocorreram com a introdução de ímãs supercondutores de alta homogeneidade de campo e na observação de outras interações dos spins nucleares

através das técnicas de RMN multidimensional nos anos seguintes (GIL; GERALDES, 1987; LEVITT, 2013; SIEVERS, 1973).

Os impactos dos estudos na área de RMN foram tamanhos que a Fundação Nobel premiou diversos cientistas, além de Bloch e Purcell (1952), Richard Ernst recebeu o Prêmio Nobel em Química em 1991, pelo desenvolvimento da RMN pulsada com Transforma de Fourier e RMN multidimensional, Kurt Wüthrich também recebeu o Prêmio Nobel em Química em 2002, pela utilização da técnica para a determinação da estrutura tridimensional de proteína. Já em 2003, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido à Paul Lauterbur e Peter Mansfield pela introdução da imagem por ressonância magnética (THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 1991; THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 2002; THE NOBEL PRIZE IN PHYSICS, 1952; THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE, 2003).

Atualmente, a RMN pode ser segmentada em duas grandes áreas: a espectroscopia e a tomografia por RMN ou imagem por ressonância magnética. A espectroscopia de RMN pode ser subdividida em espectroscopias de RMN em baixa resolução (largura de linha $\Delta\nu \gg 10$ ppm) em baixo campo, com densidade de fluxo magnético $\vec{B}_0 < 1\text{T}$, que usam ímãs permanentes e são aparelhos de bancada, e espectroscopia de RMN de alta resolução ($\Delta\nu \ll 0,01$ ppm) e alto campo ($\vec{B}_0 > 5\text{T}$). Atualmente, o aparelho com maior campo magnético tem $\vec{B}_0 = 28,2\text{ T}$, o qual possui frequência de ressonância de 1,2 GHz para ^1H . A espectroscopia de RMN de alta resolução pode ser subdividida em RMN de amostras líquidas ou solução e amostra sólidas. Essa subdivisão se deve a diferentes interações observadas em amostras líquidas e sólidas, o que leva a uso de diferentes sequências de pulsos, diferentes sondas (*probes*), e resulta em diferentes larguras de linha espectrais (CLARIDGE, 2016; COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; KEELER, 2011).

A espectroscopia de RMN utiliza as transições entre níveis de energia dos spins nucleares ($\vec{I}$) para a obtenção de informações sobre as amostras em estudo. Os núcleos que dão sinal de RMN têm spin de valores semi-inteiros ou inteiros ($1/2, 1, 3/2, 2 \dots$) e são núcleos que têm um próton ou um nêutron desemparelhado ou um próton e um nêutron desemparelhados. Dessa forma, os núcleos com spin possuem um momento angular quantizado ($\vec{L}$), cuja orientação na direção do campo

magnético é dada pelo número quântico magnético (m), e possuem um momento magnético ($\vec{\mu}$). Essas são propriedades intrínsecas do núcleo, como carga e massa (GIL; GERALDES, 1987; KEELER, 2011).

Uma vez inserido em campo magnético externo estático ($\vec{B}_0 \hat{z}$) orientado na direção $\hat{z}$, os momentos magnéticos de núcleos com spin diferente de zero ($\vec{I} \neq 0$) precessionam ao redor deste campo, com uma frequência conhecida como frequência de Larmor ($\vec{\omega}_0$), a qual é característica de cada isótopo, pois é função da constante magnetogírica (γ), que é a razão entre o momento magnético e o momento angular do núcleo. A frequência de Larmor, ou frequência de ressonância, é definida pela Equação 1 (GIL; GERALDES, 1987; KEELER, 2011):

$$\vec{\omega}_0 = \gamma \cdot \vec{B}_0 \quad \text{Equação 1}$$

Considere o caso do ^1H , o qual possui spin $1/2$, este se alinha paralela ou antiparalelamente ao campo estático ($\vec{B}_0$), o que pode ser descrito como dois níveis de energia diferentes: estado α (spin se orienta de forma paralela ao campo $\vec{B}_0$; é o estado de menor energia) e o estado β (spin se orienta de forma antiparalela ao campo $\vec{B}_0$; estado de maior energia). Na presença de $\vec{B}_0$, as populações dos estados α e β seguem a distribuição de Boltzmann, o que é conhecido como estado de equilíbrio térmico. Por possuir níveis distintos de energia, o sistema pode absorver energia, no caso, na região de radiofrequência (rf). A absorção segue a condição de Bohr, dada pela Equação 2 (KEELER, 2011).

$$\Delta E = h\nu \quad \text{Equação 2}$$

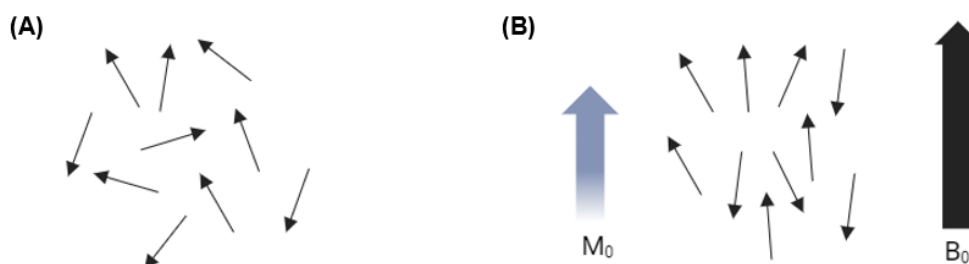
em que h é a constante de Planck e ν corresponde à frequência.

Com a aplicação de pulso de radiofrequência, na frequência de ressonância, ocorre a transição de spin entre os estados α e β , o que altera o equilíbrio térmico. O retorno dos spins ao estado de equilíbrio térmico é dado pelos processos de relaxação, que serão abordados mais adiante (KEELER, 2011).

É importante destacar que para amostras reais não se tem somente um único spin em estudo, e sim um conjunto de spins, cada qual representando um núcleo pertencente à amostra. Assim sendo, estuda-se o chamado momento magnético total

ou magnetização resultante ($\vec{M}_0$), que corresponde à soma dos vetores momento magnético de cada núcleo, como pode ser observado na Figura 6 (DUER, 2001; LEVITT, 2013).

Figura 6. (A) Vetores momento magnético na ausência de campo magnético externo ($\vec{B}_0$) são orientados de forma aleatória, logo, eles se anulam, o que leva ao sistema ter um momento magnético total nulo. (B) Quando na presença de $\vec{B}_0$, os vetores momento magnético se orientam e precessionam de acordo com tal campo, observando-se a formação de um vetor magnetização resultante ($\vec{M}_0$) na direção de $\vec{B}_0$.



Fonte: adaptado de DUER (2001)

Ao se aplicar um pulso de radiofrequência na amostra, haverá a geração de um campo magnético oscilante $\vec{B}_1$. Com isso, $\vec{M}_0$ precessionará em direção à $\vec{B}_1$, portanto, se deslocando do eixo $\hat{z}$. Uma vez encerrado o pulso, o campo $\vec{B}_1$ deixa de existir e $\vec{M}_0$ volta a precessar em direção ao campo $\vec{B}_0$. Essa volta pode ser medida, pois gera o sinal de RMN na bobina da sonda, esse sinal é conhecido como FID (*Free Induction Decay* ou decaimento de indução livre) (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; LEVITT, 2013).

A Equação 3 mostra que o ângulo de rotação do vetor $\vec{M}_0$ (θ) é função da intensidade de $\vec{B}_1$, da constante magnetogírica (γ) e da duração do pulso de radiofrequência (t_p) (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; LEVITT, 2013).

$$\theta = \gamma B_1 t_p \quad \text{Equação 3}$$

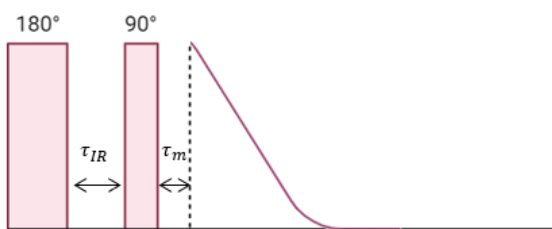
A volta da precessão de $\vec{M}_0$ em direção ao eixo $\hat{z}$ é denominada relaxação spin-rede (T_1) e o desaparecimento do sinal de RMN é conhecido como relaxação spin-spin (T_2). Esses dois processos ocorrem simultaneamente (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017).

A relaxação spin-rede, também conhecida por relaxação longitudinal, é dada pela constante de tempo T_1 . Ela busca reestabelecer o equilíbrio termodinâmico, ou seja, a volta do vetor $\vec{M}_0$ ao eixo $\hat{z}$ (direção de $\vec{B}_0$). A constante de tempo T_1 é costumeiramente determinada através da sequência Inversão – Recuperação (IR), na qual se aplica pulso de 180° seguido por um pulso de 90° separados por tempo τ . Ao variar o valor de τ , constrói-se curva exponencial, que pode ser ajustada pela Equação 4 (BLOCH; HANSEN; PACKARD, 1946; GIL; GERALDES, 1987; PURCELL; TORREY; POUND, 1946; VOLD et al., 1968):

$$M_Z = M_0 \left[1 - \exp \left(-\frac{t}{T_1} \right) \right] \quad \text{Equação 4}$$

Sua representação esquemática se encontra na Figura 7. Para a construção da curva utilizada na determinação de T_1 , realizam-se experimentos diferentes, nos quais se varia somente o valor de τ , numa escala de microssegundos a segundos (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; GIL; GERALDES, 1987; VOLD et al., 1968).

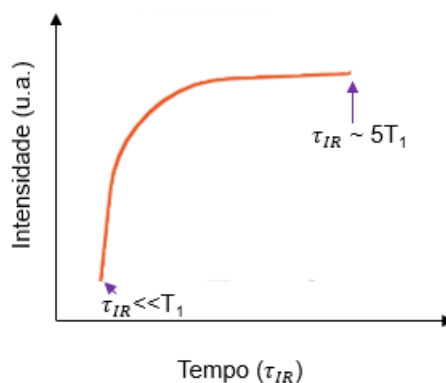
Figura 7. Representação da sequência de pulso Inversão-Recuperação (IR). Pulso de 180° seguido por pulsos de 90° , separados por tempo τ_{IR} . A aquisição de sinal inicia-se após tempo morto (τ_m) do instrumento.



Fonte: Autoria própria

É de grande importância a determinação do valor de T_1 , visto que ele interfere no tempo de espera entre medições de RMN. Como visto na Equação 4, o retorno ao estado de equilíbrio térmico é um processo exponencial. Assim, recomenda-se esperar um tempo equivalente à $5T_1$ entre uma análise e outra, garantindo que pelo menos 99% da magnetização original tenha retornado ao seu equilíbrio térmico, como visto na Figura 8. Isso é essencial para análises quantitativas (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017).

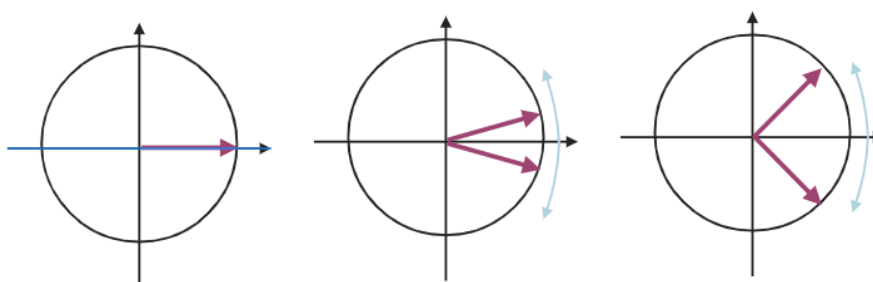
Figura 8. Intensidade do sinal de RMN para sequência de pulso IR em função do tempo. A presença de um platô, para tempos longos, indica que a maioritária parte do vetor magnetização resultante ($\vec{M}_0$) retornou ao seu estado de equilíbrio térmico.



Fonte: Autoria própria

Enquanto a relaxação spin-rede descreve a volta   condição de equilíbrio térmico, a relaxação spin-spin descreve a perda de coerência no plano transversal (xy), como visto na Figura 9. Por esse motivo, é também nomeada relaxação transversal e sua constante de tempo   T_2 (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; GIL; GERALDES, 1987; LEVITT, 2013).

Figura 9. Visualização da perda de coerência do vetor magnetização resultante no plano xy ($\vec{M}_{xy}$) com o passar do tempo. A defasagem encerra quando $\vec{M}_{xy}$ for nulo. A constante de tempo que define tal processo   T_2 .



Fonte: Autoria própria

Essa relaxação é descrita por decaimento exponencial, conforme mostrado pela Equação 5. Vale destacar que ambos os processos de relaxação ocorrem simultaneamente: enquanto o vetor $\vec{M}_0$ retorna à sua posição inicial na direção do eixo

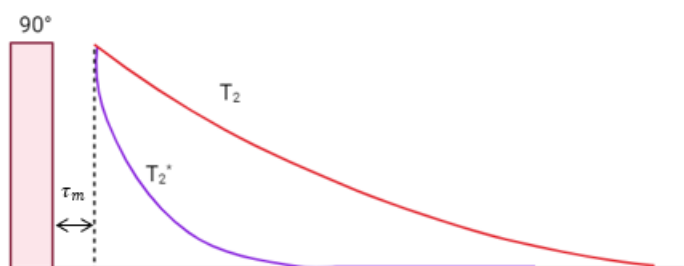
$\hat{z}$ (equilíbrio térmico), ele tende a zero considerando o plano xy (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017).

$$M_y(t) = M_{xy}(\cos \omega_0 t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad \text{Equação 5}$$

Além das interações moleculares, há outro fator que contribui para o decaimento de T_2 : a não-homogeneidade do campo magnético ($\Delta \vec{B}_0$). O valor de T_2 é sempre inferior ao de T_1 e, por ser o menor valor de constante de tempo, o sinal FID decai com T_2 , isso para campos magnéticos homogêneos. Contudo, quando há não-homogeneidade, o sinal decai conforme a constante de tempo efetivo (T_2^*), conforme mostrado pela Equação 6. A diferença no decaimento de um sinal de RMN em um campo homogêneo e não homogêneo pode ser visualizada na Figura 10. Em aparelhos com ímãs de baixa homogeneidade, o decaimento do FID é muito menor do que o valor de T_2 observado em amostras líquidas (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017).

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0 \quad \text{Equação 6}$$

Figura 10. Diferença de decaimento do sinal para o processo de relaxação spin-spin considerando campo magnético homogêneo (decaimento T_2) e considerando o efeito da não homogeneidade do campo magnético (decaimento T_2^*).

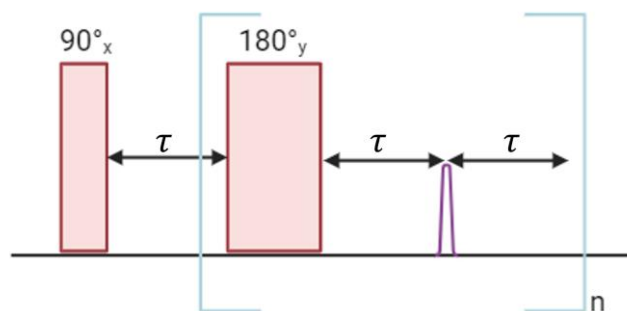


Fonte: Autoria própria

Essa dificuldade é superada utilizando-se sequência de eco de spin. Esse tipo de sequência refocaliza o sinal na forma de eco, e sua intensidade é independente da não-homogeneidade do campo magnético. Atualmente, a sequência mais utilizada para a determinação de T_2 é a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), desenvolvida pelos

pesquisadores que lhe dão o nome (CARR; PURCELL, 1954; COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; MEIBOOM; GILL, 1958).

Figura 11. Representação esquemática da sequência de pulso CPMG, comumente utilizada na determinação da constante de tempo T_2 . Consiste em pulso de 90°_x seguido por n pulsos de 180°_y . Os ecos gerados em função do tempo, resultam em decaimento independente da não-homogeneidade do campo magnético.



Fonte: Autoria própria

A sequência CPMG (Figura 11) é constituída por um pulso de 90°_x , seguido por um tempo τ , e por uma série de n pulsos de 180°_y , espaçados por um tempo 2τ , até que o sinal decaia totalmente, ou seja, sua intensidade atinja valores próximos a zero. O sinal de eco é medido no tempo central entre os dois pulsos de 180°_y . Note que o eco de cada pulso é adquirido após τ (CARR; PURCELL, 1954; COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; MEIBOOM; GILL, 1958).

1.2.1. Características gerais das técnicas espectroscópicas de RMN

Como mencionado previamente, a técnica espectroscópica RMN pode ser separada em RMN em baixa resolução em baixo campo e RMN em alta resolução em alto campo, a qual, por sua vez, pode ser ainda subdividida em função do estado físico da amostra: líquido/solução e sólido.

Na Figura 12 está um diagrama dos espectrômetros e as principais diferenças entre as três classes de espectrômetros de RMN. As análises espectroscópicas de alta resolução são realizadas em aparelhos grandes que usam ímãs supercondutores na temperatura de Hélio líquido, além de caros, possuem alto custo de manutenção principalmente devido à necessidade de reposição periódica de Hélio e N_2 líquidos.

As amostras líquidas são analisadas em tubos de quartzo de alta precisão enquanto as análises das amostras sólidas, em rotores cerâmicos. Já os aparelhos de baixo campo são pequenos, pois usam ímãs permanentes, e podem usar tubo de vidro comum para as análises e têm baixo custo de manutenção.

Figura 12. Espectrômetros de RMN de alto campo para amostras líquidas ou em solução e para amostras sólidas e espectrômetro de RMN no domínio do tempo.



Fonte: Autoria própria

As espectroscopias de RMN em alta resolução em alto campo (RMN-AR) baseiam-se principalmente no deslocamento químico. Os diferentes deslocamentos

químicos se devem às diferenças de blindagem magnética causadas pela densidade eletrônica na vizinhança dos núcleos atômicos presentes nas moléculas (KEELER, 2011; LEVITT, 2013).

No caso de RMN-AR de amostras líquidas os núcleos se encontram em um ambiente magnético isotrópico, devido à rápida reorientação molecular. Os espectros fornecem, além dos deslocamentos químicos, outros parâmetros espectrais, como acoplamentos spin-spin, multiplicidade dos acoplamentos etc. No caso de amostras sólidas os núcleos se encontram em um ambiente anisotrópico, devido à baixa ou nenhuma reorientação molecular, e os espectros podem ser muito largos devido à anisotropia do deslocamento químico, interação dipolar ou quadrupolar. Para se obter espectros de amostras sólidas em alta resolução é preciso usar técnicas especiais que serão discutidas em detalhes no item 1.3.2 (DUER, 2001; KEELER, 2011; LEVITT, 2013).

Nos aparelhos de RMN-AR pulsada (método padrão, atualmente) é necessário converter o sinal FID no domínio do tempo para domínio de frequência utilizando a Transformada de Fourier (TF). Esse método emprega, normalmente, ímãs supercondutores, os quais podem variar de 4,7 a 28,2 T, com frequência de ressonância entre 200 e 1200 MHz para o núcleo ^1H , o que garante alta resolução espectral. Recentemente, foram lançados aparelhos de RMN de bancada, de média resolução entre 1 e 2,3 T (40 a 100 MHz para ^1H), sua principal vantagem é o uso de ímãs permanentes, os quais não precisam de líquidos criogênicos como N_2 e He (CLARIDGE, 2016; COLNAGO; DE ANDRADE, 2017; KEELER, 2011).

A espectroscopia de RMN-AR de amostras em solução é a mais usada e encontra aplicações em diferentes áreas da química, como, por exemplo, na determinação da estrutura de produtos naturais e sintéticos, proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucleicos, nas análises do perfil de metabólitos (metabolômica) de extratos e fluidos biológicos, entre muitas outras aplicações (GIL; GERALDES, 1987; KEELER, 2011).

O espectro de RMN em baixa resolução, em baixo campo, por sua vez, apresenta sempre um único sinal muito largo, devido à inomogeneidade de $\vec{B}_0$. Ou seja, qualquer substância líquida ou em solução gera o mesmo sinal largo sem

qualquer resolução para observar os deslocamentos químicos. Com isso, não há necessidade de fazer a TF dos sinais em domínio do tempo, como é o caso para os sinais obtidos nos aparelhos de RMN-AR. Como se usa os sinais diretamente no domínio do tempo (FID e/ou ecos), é também conhecida como RMN no domínio do tempo (RMN-DT). Nesses aparelhos, as análises quantitativas são baseadas na intensidade do FID ou eco, nos tempos de relaxação T_1 e T_2 , entre outras medições (COLNAGO; DE ANDRADE, 2017).

A RMN-DT é largamente usada no controle e certificações de qualidade para produtos e processos industriais, principalmente nas indústrias alimentícias, petróleo e petroquímica, polímeros, farmacêutica e agricultura (MITCHELL et al., 2014).

1.3. Ressonância Magnética Nuclear de amostras sólidas

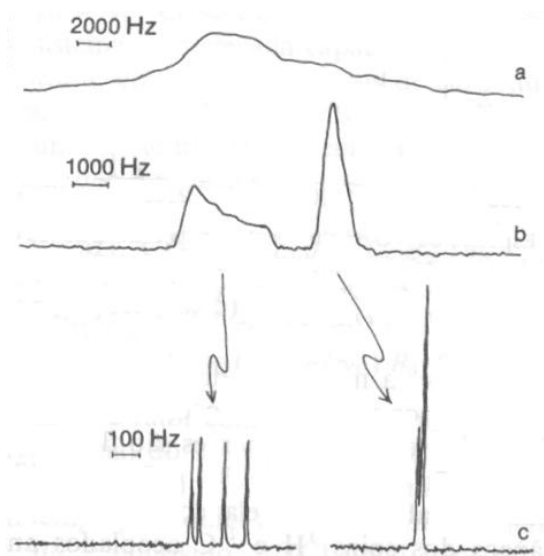
Como descrito anteriormente, nas amostras sólidas, os núcleos, devido à baixa ou nenhuma reorientação molecular, se encontram em um ambiente magnético anisotrópico. Com isso, os espectros de amostras em estado sólido possuem linhas muito largas, devido à anisotropia do deslocamento químico (*Chemical Shift Anisotropy* - CSA), interação dipolar ou quadrupolar. Como neste trabalho serão analisados os isótopos de ^1H e ^{13}C não se observa a interação quadrupolar, que ocorre para núcleos com $I > 1/2$.

Assim, nos espectros de RMN de ^{13}C ou ^1H das amostras sólidas de manteiga de cacau e chocolates, amostras que serão estudadas neste trabalho, observa-se a CSA e a interação dipolar. Eles são responsáveis pelo alargamento de linha e, portanto, devem ser minimizados ou eliminados para que se obtenham espectros de RMN de amostras sólidas com alta resolução. Os procedimentos utilizados para a obtenção de espectros de ^{13}C são: desacoplamento de alta potência (DEC – *High Power Decoupling*), o qual minimiza os efeitos da interação dipolar C-H, e rotação em torno do ângulo mágico (MAS – *Magic Angle Spinning*), a qual minimiza os efeitos da anisotropia de deslocamento químico (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

Na Figura 13 estão os espectros de RMN de ^{13}C de uma amostra de acetato de cálcio sólido. Na Figura 13c está o espectro de ^{13}C obtido utilizando condições experimentais para a obtenção de espectros de RMN de ^{13}C que simula os obtidos em solução. Como se pode ver no espectro da Figura 13a, obtido com pulso e sem DEC ou MAS, tem-se apenas uma linha muito larga devido à anisotropia do deslocamento químico e, principalmente, à interação dipolar. Na Figura 13b está o espectro da mesma amostra com DEC, no qual é possível observar dois sinais largos centrados em cerca de 170 ppm (grupo $-\text{COOH}$) e em 25 ppm (grupo $-\text{CH}_2$). Observe como o sinal da carboxila é muito mais largo do que o grupo $-\text{CH}_2$ devido à maior anisotropia das ligações $\text{C}=\text{O}$ (GIL; GERALDES, 1987).

Na Figura 13c está o espectro do acetato de cálcio usando tanto o DEC quanto o MAS, com rotação da amostra em velocidade superior à CSA e em ângulo mágico ($54,74^\circ$). Diferentemente do espectro de RMN de ^{13}C do acetato de cálcio em solução, que apresenta apenas dois sinais, o espectro em estado sólido apresenta quatro sinais para o grupo carboxila e dois para o grupo CH_3 . Esses diferentes deslocamentos químicos são devidos a diferentes ambientes em que cada carbono está localizado em função das diferentes formas cristalinas (GIL; GERALDES, 1987).

Figura 13. Espectros de ^{13}C do acetato de cálcio sólido, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, a 22,6MHz. (a) estático, sem desacoplamento; (b) estático, com desacoplamento; (c) com desacoplamento, MAS e polarização cruzada.



Fonte: GIL; GERALDES (1987)

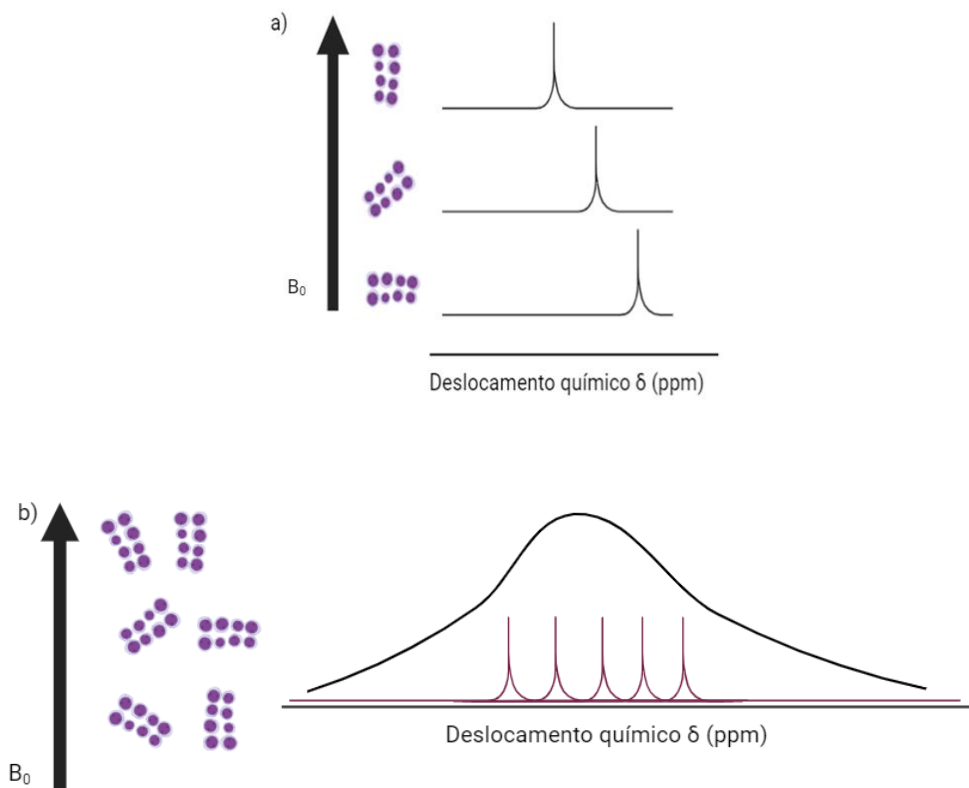
A seguir serão apresentados maiores detalhes dessas interações e das técnicas para fazer as análises de amostras sólidas em alta resolução.

1.3.1. Interações que influenciam na RMN-ES

1.3.1.1. Anisotropias de deslocamento químico

A CSA é resultado da interação dos elétrons que envolvem os núcleos, presentes nas moléculas, com o campo magnético externo ($\vec{B}_0$). Devido à circulação dos elétrons, na chamada nuvem eletrônica, há geração de campo magnético local, o qual pode blindar ou desblindar o núcleo. Como a densidade eletrônica na vizinhança dos núcleos normalmente não é esférica, os deslocamentos químicos das amostras sólidas têm dependência quanto à orientação das moléculas em relação ao campo magnético $\vec{B}_0$, na forma $(3 \cos^2 \theta - 1)$. Ou seja, cada núcleo sofre influência da blindagem em função da densidade eletrônica ao redor do núcleo e da orientação desta em relação ao campo $\vec{B}_0$, assim, cada núcleo experimenta uma blindagem eletrônica diferente levando a frequências ligeiramente diferentes, o que, por sua vez, resulta em alargamento de linha. Esse alargamento é função da sobreposição das frequências observadas para cada orientação, como pode ser visualizado na Figura 14. Ainda é válido lembrar que algumas orientações diferentes podem resultar em valores iguais de deslocamento químico, o que afeta a intensidade, a qual será proporcional à quantidade de moléculas naquela orientação. Esse espectro largo devido à CSA é conhecido como padrão de pó (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

Figura 14. Efeito do deslocamento químico anisotrópico para amostras sólidas a) sinal para cada orientação espacial da molécula b) sobreposição das frequências de cada orientação como observado em (a), resultando no alargamento de linha.



Fonte: adaptado de APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON (2012)

1.3.1.2. Interação dipolar

Como mencionado anteriormente, os núcleos sofrem influência de campos locais dos diferentes núcleos vizinhos. Considere o átomo de C de uma ligação do tipo C-H, além do campo externo $\vec{B}_0$, ele também sente a influência do campo local associado ao momento magnético do núcleo de H. Sua frequência de ressonância será dependente de ambas as contribuições ($\vec{B}_0$ e $\vec{B}_{loc}$). O campo magnético dipolar ($\vec{B}_{dip}$) é dado pela Equação 7. Observe a dependência da distância entre os núcleos (r_{12}), do momento magnético do hidrogênio ($\vec{\mu}_H$) e do ângulo θ formado pela orientação da ligação, no caso, C-H, em relação ao eixo de $\vec{B}_0$ (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001; ZERI, 1997).

$$\vec{B}_{dip} \approx \frac{\mu_H}{r_{12}^3} (1 - 3\cos^2\theta_{12}) \quad \text{Equação 7}$$

Por ser um sistema rígido, as amostras sólidas apresentam diversos conjuntos de ligações que tenham distâncias internucleares e ângulos θ diferentes, o que implica em diferentes frequências de ressonância e, portanto, alargamento de linha no espectro. É válido destacar que a interação dipolar magnética é a principal causa de alargamento de linha espectral para amostras sólidas (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001; ZERI, 1997).

Como já mencionado, para o caso da RMN em alta resolução, algumas técnicas podem ser utilizadas de forma a minimizar a influência das interações acima descritas. A anisotropia de deslocamento químico é minimizada por rotação em torno do ângulo mágico (MAS – *Magic-Angle Spinning*), os acoplamentos dipolares por desacoplamento de alta potência (DEC – *High-Power Decoupling*) e a baixa sensibilidade de certos núcleos por polarização cruzada (CP – *Cross-Polarization*) (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

1.3.2. Técnicas aplicadas em RMN-ES

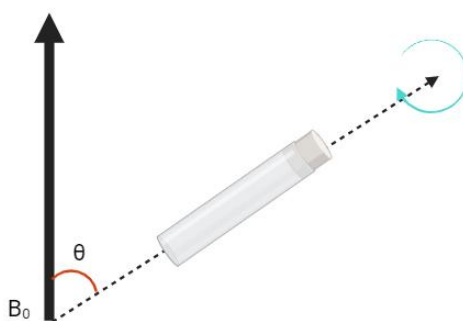
1.3.2.1. Rotação em ângulo mágico – MAS

A técnica MAS é rotineiramente utilizada, visando eliminar principalmente os efeitos da anisotropia do deslocamento químico, bem como minimizar os efeitos da interação dipolar (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

Durante a década de 1950, Lowe demonstrou que quando a interação dipolar é descrita na forma vetorial em relação ao campo $\vec{B}_0$, as interações anisotrópicas têm dependência angular, na forma de $3\cos^2\theta - 1$. A dependência geométrica é eliminada ao anular este termo, isto é $3\cos^2\theta - 1 = 0$, o que é possível se θ for equivalente a $54,74^\circ$ em relação ao campo $\vec{B}_0$. Tal ângulo é conhecido como ângulo mágico (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; COHEN; FEYNMAN; LOWE, 1957; DUER, 2001).

Na Figura 15, pode-se observar o posicionamento do rotor em relação ao campo magnético $\vec{B}_0$. Para que a dependência geométrica seja anulada, θ deve ser equivalente a $54,74^\circ$. Nesta figura, mostra-se, também, o eixo de rotação do rotor.

Figura 15. Representação esquemática da relação geométrica entre a posição do rotor contendo amostra e o campo magnético externo $\vec{B}_0$. O ângulo indicado quando apresenta valor $\theta = 54,74^\circ$ é conhecido por ângulo mágico. Ao rotacionar o rotor em altas velocidades, quando em ângulo mágico, os efeitos da anisotropia são reduzidos.



Fonte: Autoria própria

Para a eliminação dos efeitos mencionados, é necessário que haja rotação da amostra, pois, se ela somente estiver parada no ângulo mágico, ainda haverá orientações espaciais diferentes para cada molécula, logo, os efeitos de anisotropia ainda estariam presentes. Ao rotacionar a amostra em frequência de rotação grande suficiente, atinge-se a média de orientações espaciais, o que suprime os efeitos de anisotropia (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

1.3.2.2. Desacoplamento de alta potência – DEC

O acoplamento dipolar causa alargamento da linha do espectro, para amostras sólidas isso é ainda mais perceptível, visto que os valores da constante de acoplamento (D) são muito altos. Devido à sua abundância natural de apenas 1,1%, tem-se que o espectro de ^{13}C possui baixa sensibilidade, a qual se torna ainda mais baixa devido aos alargamentos causados pelo acoplamento dipolar entre, por exemplo, ^1H e ^{13}C (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

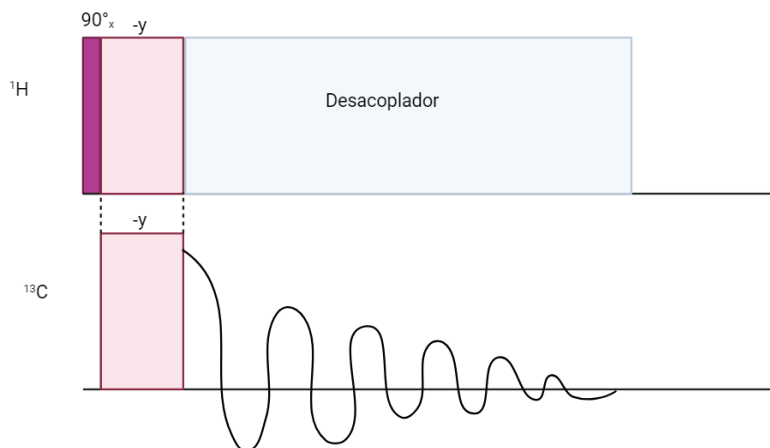
Com o intuito de melhorar a resolução, usa-se um desacoplador, o qual deve possuir potência elevada, visto que o campo aplicado deve ser suficientemente grande para compensar os efeitos de acoplamento dipolar. Essa irradiação é aplicada em um canal, por exemplo, o canal do ^1H , na frequência de ressonância deste, simultaneamente, à aquisição de sinal que é realizada no outro canal. Ou seja, mede-se o sinal FID em um dos canais, enquanto o outro está sob irradiação (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

É importante destacar o fato de que a potência aplicada, visando diminuir e/ou eliminar os efeitos dos acoplamentos dipolares, é alta, assim, cuidado deve ser tomado com seu ajuste, para não ultrapassar o limite da sonda, o que evitará danos a esta (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

1.3.2.3. Polarização cruzada – CP

Como mencionado anteriormente, para núcleos que possuem baixa abundância natural e baixa razão magnetogirica, o espectro é de baixa sensibilidade. Para melhorar a razão sinal-ruído é necessário a acumulação de muitos espectros, o que torna os experimentos longos. No caso de ^{13}C , o tempo de aquisição pode ser muito longo, pois os valores da constante T_1 podem ser da ordem de centenas de segundos. A fim de resolver este problema, foi desenvolvido a sequência de polarização cruzada (Cross-Polarization – CP), a qual pode ser visualizada na Figura 16. Esta sequência consiste em transferir magnetização do núcleo mais abundante, como é o caso do núcleo ^1H , para aquele de menor abundância, por exemplo, ^{13}C (DUER, 2001). Essa transferência é mediada pela interação dipolar entre os núcleos, ou seja, quanto maior a interação dipolar maior a intensidade dos sinais (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

Figura 16. Representação esquemática da sequência de pulsos utilizada para a polarização cruzada entre os spins para os canais de ^1H e ^{13}C . Note que para o canal do ^1H o pulso inicial, 90°_x , é responsável por levar a magnetização ao plano $x'y'$. O pulso em $-y$, para ambos os canais, é do tipo spinlock e o responsável pela condição de Hartmann-Hahn. Após o pulso de contato entre os canais, para o canal de ^1H tem-se o desacoplador, enquanto para o canal de ^{13}C abre a aquisição do sinal FID.



Fonte: Autoria própria

Para que seja possível a transferência de polarização, é necessário que o sistema esteja na condição de Hartmann-Hahn, descrita em artigo do ano de 1962. Isso implica dizer que os núcleos devem possuir a mesma frequência de precessão no campo magnético oscilante $\vec{B}_1$ (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001; HARTMANN; HANN, 1962).

Quando inserido em campo magnético $\vec{B}_0$, os spins nucleares são distribuídos em diferentes estados de energia, para o caso de spins $1/2$ se tem os estados α e β , ou seja, $+1/2$ e $-1/2$ respectivamente. Tais níveis são separados por variação de energia ΔE , em que $\Delta E = \frac{h\omega}{2\pi}$ (outra forma de escrever a Equação 2), a qual é proporcional à intensidade de $\vec{B}_0$. Tem-se, da Equação 1, que a frequência de precessão $\vec{\omega}$ é diretamente proporcional à constante magnetogírica γ , a qual, por sua vez, é intrínseca de cada núcleo. Como o campo $\vec{B}_0$ é o mesmo para os núcleos da amostra em estudo, a frequência $\vec{\omega}$ depende somente dessa constante γ . Na Tabela 2 se tem os valores da constante γ para alguns núcleos; desses valores, pode-se dizer que, por exemplo, a variação ΔE é aproximadamente quatro vezes maior para o núcleo ^1H em comparação ao ^{13}C . Ou seja, os núcleos precessionam em frequências

distintas e a transferência de magnetização, $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$, é inviável (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

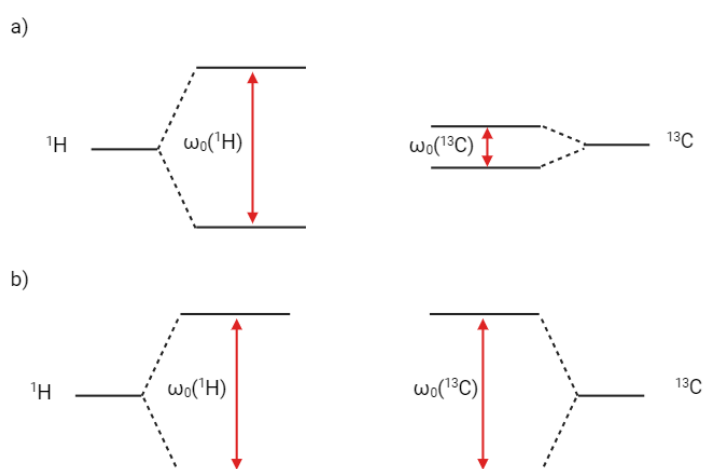
Tabela 2. Valores de constante magnetogírica e abundância natural de alguns núcleos comumente estudados utilizando a técnica de RMN.

Núcleo	Constante magnetogírica γ ($10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$)	Abundância natural (%)
^1H	267,522	~100
^{13}C	67,283	1,1
^{15}N	-27,126	0,37
^{31}P	108,394	~100
^{29}Si	-53,19	4,7

Fonte: Adaptado de LEVITT (2013)

Visando atingir a condição de Hartmann-Hahn, deve-se ajustar o sistema de forma que cada núcleo experimente um campo magnético distinto (Figura 17), afinal, a constante magnetogírica, por ser intrínseca a cada núcleo, não é variável. Isso é possível através da sequência de pulso utilizada, como visto na Figura 16 (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001; HARTMANN; HANN, 1962).

Figura 17. Níveis de energia para os spins ^1H e ^{13}C quando colocados na presença de: a) campo magnético $\vec{B}_0$ igual para ambos os spins, a diferença entre ΔE é função da constante magnetogírica γ , a qual é diferente para cada spin e, no caso dos spins ^1H e ^{13}C , γ_H é aproximadamente quatro vezes maior do que γ_C e b) condição de Hartmann-Hahn, na qual cada spin experimenta um campo magnético diferente, devido ao pulso spinlock aplicado, quando ajustados corretamente atingem essa condição, na qual $\omega_{1H} = \omega_{13C}$, em que é possível a transferência de polarização entre os núcleos.



Fonte: Autoria própria

Como se pode ver na Figura 16, aplica-se um pulso de 90°_x no canal de ^1H , o que leva a magnetização para o plano $x'y'$. Outro pulso, chamado pulso de contato, é aplicado em ambos os canais, esse pulso é do tipo *spinlock*, o que trava os spins no plano $x'y'$, por onde ocorrerá a transferência de polarização. O campo gerado pelo pulso *spinlock* no canal do ^1H , $\vec{B}_1(^1\text{H})$, pelo período de contato, é o único responsável pela quantização de energia, ou seja, os estados de energia durante a aplicação desse pulso são α_{H}^* e β_{H}^* . O análogo acontece para o canal do ^{13}C . Assim, os campos $\vec{B}_1(^1\text{H})$ e $\vec{B}_1(^{13}\text{C})$ podem ser ajustados de tal maneira que correspondam a condição de Hartmann-Hahn dada pela Equação 8 (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001; HARTMANN; HANN, 1962):

$$\gamma_{\text{H}}B_1(^1\text{H}) = \gamma_{\text{C}}B_1(^{13}\text{C}) \quad \text{Equação 8}$$

Quando na condição de Hartmann-Hahn, a variação ΔE é a mesma para ambos os núcleos, logo, uma transição entre os estados $\alpha_{\text{H}}^* \rightarrow \beta_{\text{H}}^*$, pode ser compensada por uma transição $\beta_{\text{C}}^* \rightarrow \alpha_{\text{C}}^*$. Assim, por interação dipolar, há redistribuição de energia entre os spins de ^1H e de ^{13}C , mantendo a energia total do sistema (DUER, 2001).

É importante destacar que o campo $\vec{B}_1(^1\text{H})$ gerado pelo pulso de *spinlock* é muito menor do que o campo $\vec{B}_0$ e, portanto, não consegue sustentar a magnetização originada desse último campo, o que leva ao sistema relaxar com constante de tempo $T_1\rho$. O parâmetro tempo de contato dos pulsos é de extrema importância, pois varia para cada núcleo, visto que a transferência melhor ocorre para núcleos cujos vizinhos são átomos de hidrogênio; levando em consideração a média: valores baixos não permitem uma polarização cruzada eficiente, enquanto valores muito altos sofrem o efeito da relaxação $T_1\rho$. Outro fator que deve ser considerado é a força da interação dipolar entre os spins, para sistemas rígidos a transferência de polarização será mais rápida (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012; DUER, 2001).

1.3.3. Análise de Manteiga de cacau e derivados por RMN de ^{13}C em estado sólido e RMN-DT

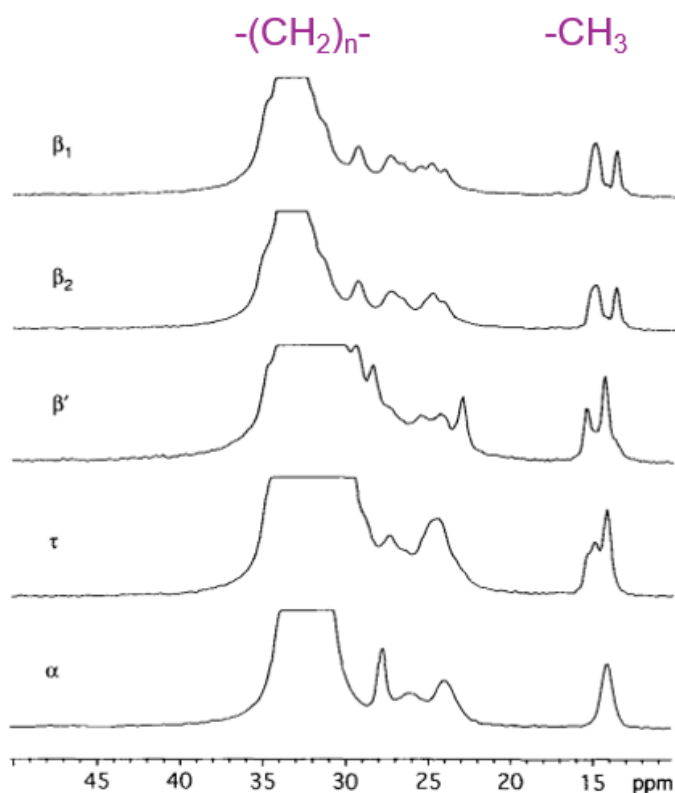
O estudo de triglicerídeos por RMN já foi realizado e com isso, tem-se definidas as regiões de deslocamento químico (δ) para cada parte da molécula, bem como as

pequenas variações em tais valores em função da estrutura cristalina do material. Os estudos em questão foram realizados tanto em RMN de solução quanto em RMN em estado sólido (ARISHIMA et al., 1996; DIOMANDÉ et al., 2022).

A espectroscopia de RMN-ES em alto campo tem como uma das principais aplicações no estudo de TAG a análise de suas estruturas polimórficas e dinâmica molecular, como demonstrado por Bociek em 1985. Nesse estudo, os espectros de ^{13}C de alta resolução em estado sólido foram obtidos para os TAG tripalmitina e triestearina, utilizando de alta-potência de desacoplamento (DEC), polarização cruzada (CP) e rotação em torno do ângulo mágico (MAS). Observou-se diferentes deslocamentos químicos e larguras de linha para diferentes estruturas polimórficas (BOCIEK; ABLETT; NORTON, 1985).

Os principais triglicerídeos da manteiga de cacau também já foram estudados por RMN-ES. De forma análoga ao estudo realizado por Bociek, diferenças tais como cadeias saturadas e insaturadas levam a conformações diferentes, o que permite a discussão sobre estrutura polimórfica, pois há alterações do ambiente local do núcleo e sua mobilidade, logo, observam-se diferentes padrões espectrais para cada estrutura (ARISHIMA et al., 1996). Na Figura 18 estão os espectros de RMN-ES de ^{13}C , obtidos utilizando sequência CPMAS, para as diferentes estruturas polimórficas do TAG SOS.

Figura 18. Espectros de ^{13}C obtidos utilizando sequência CPMAS obtidos para as diferentes estruturas polimórficas do TAG SOS.



Fonte: adaptado de ARISHIMA et al.(1996)

Considerando o sinal mais intenso das amostras, referente ao grupo $(-\text{CH}_2)_n$, tem-se diferentes deslocamentos químicos: para estruturas ortorrômbricas, isto é, as estruturas β' (III) e β' (IV), o sinal está em 33 ppm e para triclinica, estruturas β (V) e β (VI), o sinal está em 34 ppm, como destacado ao longo do texto de Arishima et al. (1996). A Figura 18, contudo, fornece informação associada ao grupo metílico terminal na região por volta de 15 ppm. Para a estrutura polimórfica α há apenas um pico, enquanto para as demais estruturas cristalinas aparecem dois, ou mesmo três sinais ao se considerar os desdobramentos observados para os espectros referente às estruturas denominadas τ e β' , o que indica que enquanto para a forma α os grupos $-\text{CH}_3$ terminais são simétricos para os ácidos graxos S e O, o mesmo não é válido para as outras formas polimórficas (ARISHIMA et al., 1996).

Em 2008, Adam-Berret utilizou tanto RMN-DT quanto RMN-ES para avaliar o efeito da temperatura e do comprimento de cadeia nos parâmetros de relaxação de

TAG. Enquanto se determinou o valor de T_2 para carbono a partir de RMN-DT, utilizou-se RMN-ES para determinar o valor do segundo momento M_2 e, a partir disso, confirmar a diferenciação das diferentes estruturas polimórficas (ADAM-BERRET et al., 2008).

Mais recentemente, Bernin e colaboradores estudaram a transição de fase sólido-líquido de TAG presente em produtos alimentícios advindos de gordura de porco, através de RMN-ES. Eles demonstraram a coexistência de moléculas de TAG em fases sólida e líquida, devido à presença de átomos de carbono saturados e insaturados e, também, devido a presença de menores cadeia carbônicas, visto que diferentes formas possuem diferentes temperaturas de fusão. A diferença nas proporções das fases sólida e líquida causa diferenças nas percepções sensoriais dos consumidores (BERNIN; LEVENTAKI; TOPGAARD, 2023).

Devido à possibilidade de caracterização quanto às estruturas químicas presentes, é possível estudar a composição de triglicerídeos presentes em óleos e gorduras, bem como seus derivados, utilizando a técnica de RMN em alta resolução. Com isso, pode-se avaliar propriedades físico-químicas e a utilização de materiais derivados como gorduras vegetais alternativas, bem como realizar estudos de autenticação do material (CASTRO-ALAYO et al., 2023; COGLIANO et al., 2022; TRUZZI et al., 2023).

1.4. Conteúdo de gordura sólida – SFC

Para produtos alimentícios é de grande importância que o consumidor esteja satisfeito com aquilo que está sendo comercializado, logo, aspectos sensoriais, tais como aparência, sabor e consistência são fundamentais. Quando se trata de gorduras, o conteúdo de gordura sólida (SFC – *Solid Fat Content*) influencia tais aspectos, pois a transição entre os estados sólido e líquido ocorre durante a mastigação (BERNIN; LEVENTAKI; TOPGAARD, 2023).

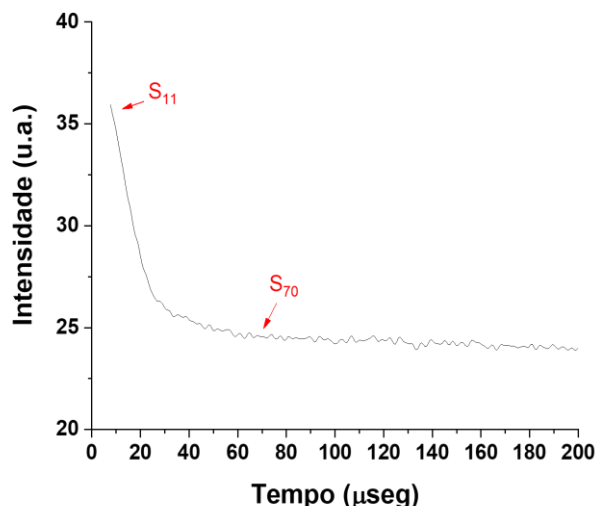
O valor de SFC da manteiga de cacau depende da variedade da planta e de sua região de cultivo, visto que suas propriedades variam em função do ambiente (*terroir*). Variações nos valores de SFC são responsáveis por modificações em suas

propriedades físicas, como sabor, textura e dureza em temperatura ambiente. Assim, em se tratando da indústria do chocolate, o valor de SFC se torna de interesse, uma vez que este influenciará a estabilidade do produto e, portanto, sua vida de prateleira, tal como influenciará na aceitabilidade do consumidor (LUCCAS, 2001; TALBOT, 2012; TORBICA et al., 2016).

Dentre as várias técnicas usadas para caracterizar tanto os grãos quanto a manteiga de cacau está a técnica de RMN-DT. Essa técnica é usada para a determinação do teor de manteiga de cacau nos grãos, o teor de gordura sólida das manteigas de cacau e chocolates (SFC) e, também, a dinâmica de sua cristalização (ADAM - BERRET et al., 2008; DECLERCK et al., 2018, 2021; LADD PARADA et al., 2019; LADD-PARADA et al., 2019; TODT et al., 2008). O SFC é uma das principais características analisadas para a manteiga de cacau e o procedimento estabelecido pelas normas ISO 8292-1 (método direto) e ISO 8292-2 (método indireto). O método direto é preciso, mas não exato e o método indireto é exato, mas não preciso. A análise de SFC pelo método direto pode ser aplicada somente para a manteiga de cacau, pois a presença de materiais sólidos, tais como proteínas e carboidratos nas amostras, resultam em valores SFC que não representam, de fato, somente a porção sólida de gordura das amostras, mas, representam o conjunto de todos os materiais sólidos presentes na amostra. Assim, novos métodos de determinação de SFC por RMN vêm sendo sugeridos para que sejam tanto exatos quanto precisos (DUYNHOVEN et al., 2002).

Por definição, o valor de SFC por RMN-DT pela ISO/CD 8292-1 (2008) método direto, é a razão entre a quantidade de ^1H em estado sólido em relação a quantidade de ^1H total da amostra, ou seja, prótons em ambos estados físicos (sólido e líquido), para temperatura específica. Para a determinação de seu valor, são utilizadas as intensidades do sinal FID em 11 μs e 70 μs , como na Figura 19 (ISO/CD 8292-1, 2008).

Figura 19. Exemplo de decaimento de sinal FID utilizado para a determinação do valor de SFC seguindo o protocolo ISO. Em destaque, encontra-se as regiões de 11 μs e 70 μs utilizadas nos cálculos.



Fonte: Autoria própria

Após o preparo da amostra seguindo os procedimentos estabelecidos pela ISO 8292-1, a medição do valor de SFC é realizada em um espectrômetro de RMN-DT com a medição das intensidades do sinal em 11 μs e 70 μs usando a Equação 9 (ISO/CD 8292-1, 2008).

$$SFC (\%) = \frac{f * (S_{11} - S_{70})}{f * (S_{11} - S_{70}) + S_{70}} * 100 \quad \text{Equação 9}$$

Em 11 μs a intensidade do sinal corresponde aos núcleos de ^1H em ambos os estados, representada por S_{11} , já em 70 μs a intensidade do sinal é referente apenas à porção líquida da amostra, representada por S_{70} . Logo, a quantidade de gordura sólida é a razão mostrada na Equação 9, na qual $S_{11} - S_{70}$ representa a intensidade do sinal somente para a porção sólida da amostra. O termo f representa um fator de correção empírica, que contabiliza o tempo morto do instrumento (ISO/CD 8292-1, 2008).

Para o método indireto, o cálculo de SFC é realizado utilizando uma amostra de referência. Ambas as amostras, de referência e de estudo, devem passar por duas medições: a 60°C, temperatura em que ambas estão líquidas, e a temperatura de análise. Para cada medição, determina-se a intensidade em 70 μs e, a partir desses valores, calcula-se o SFC segundo a Equação 10, na qual, $S_{70,ref\ 60}$ é a intensidade

em 70 μ s da amostra de referência em 60°C e $S_{70,ref T}$, na temperatura em estudo, os valores $S_{70,a 60}$ e $S_{70,a T}$ são os valores análogos para a amostra em estudo (ISO/CD 8292-2, 2008).

$$SFC_T (\%) = \left(1 - \frac{S_{70,ref 60} * S_{70,a T}}{S_{70,a 60} * S_{70,ref T}} \right) * 100 \quad \text{Equação 10}$$

Os métodos protocolados para a determinação de valor de SFC são utilizados há décadas, contudo, ambos apresentam limitações. Para o método direto, tem-se que este apresenta precisão, mas não exatidão, enquanto para o método indireto, observa-se o contrário, isto é, apresenta exatidão, mas não precisão. Além disso, é necessário um fator de calibração, experimentalmente calculado utilizando uma amostra do tipo plástico em óleo. Ademais, os métodos certificados foram desenvolvidos durante a década de 1970, logo, a medição de SFC pode se beneficiar com o desenvolvimento de novos métodos (DUYNHOVEN et al., 2002).

Utilizando espectrômetros de RMN de baixo campo, não só estudos de SFC para manteiga de cacau já foram realizados, mas também estudos de polimorfismo deste material, bem como estudos envolvendo o processo de cristalização da manteiga de cacau são encontrados utilizando espectrômetros de RMN do tipo *Fast Field Cycling* (FFC). Os resultados são suportados por estudos com técnicas mais comumente utilizadas, como por exemplo a Difração de Raios-X (ADAM-BERRET et al., 2008; DECLERCK et al., 2018, 2021; LADD PARADA et al., 2019; LADD-PARADA et al., 2019; TODT et al., 2008).

Esse trabalho de mestrado busca avaliar se técnicas de RMN de ^{13}C em alta resolução no estado sólido (RMN-ES) podem ser usadas para a determinação de SFC e outras propriedades físicas e químicas de manteiga de cacau e chocolates. Sabe-se, entretanto, que, quando amostras sólidas são analisadas, utilizando a técnica RMN-ES de ^{13}C em alta resolução, em alto campo, tanto a alta frequência de rotação à qual a amostra é submetida quanto à aplicação de desacoplamento de alta potência com curto tempo de repetição pode levar ao aquecimento da amostra (AGUILAR-PARRILLA et al., 1990). Como a manteiga de cacau tem faixa de fusão entre 17°C e 36 °C aproximadamente, os experimentos de RMN-ES podem levar à fusão da amostra, podendo ocasionar em resultados errôneos, mesmo quando estes são realizados com passagem de ar com temperatura da ordem de 24°C. Logo, fez-se

necessária a análise prévia das condições de aquisição dos espectros, antes das medições das propriedades físico-químicas da amostra.

2.0. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar as condições experimentais para a obtenção de espectros de RMN-ES sem aquecimento da amostra, para analisar manteiga de cacau e seus derivados e estudar a viabilidade de determinar a razão sólido-líquido (SFC) e formas cristalinas das amostras através destes espectros, além de averiguar eventuais outros parâmetros físico-químicos.

2.2. Objetivos Específicos

1- Avaliar os efeitos da frequência de rotação do rotor (FR), da potência de desacoplamento (DEC) e do tempo de reciclagem (TR) na temperatura da amostra.

2- Determinar as condições experimentais em que FR, DEC e TR não interferem na temperatura da amostra. Aquecimento de até 2°C.

3- Determinar os parâmetros experimentais da RMN de ^{13}C em estado sólido para medição do SFC e comparar com os métodos ISO 8292-1 e ISO 8292-2 (métodos direto e indireto, respectivamente).

4- Utilizar a RMN de ^{13}C no estado sólido para acompanhar o processo de cristalização isotérmico da amostra de manteiga de cacau e determinar as diferentes estruturas polimórficas que ocorrem durante o processo.

3.0. Materiais e Métodos

3.1. Preparo de amostra

As análises de condições experimentais foram realizadas com manteiga de cacau extraída da amêndoa de cacau já torrada, identificada como MC_1. As amêndoas torradas foram obtidas de produtores de chocolate localizados no Espírito Santo, Brasil.

Para a extração, retirou-se as cascas das amêndoas de cacau torradas e moeu os nibs de cacau em moinho analítico básico A11 IKA. Da amostra moída, foram separadas 4,0 g que foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL, ao qual se adicionou 50,0 mL de Clorofórmio P.A ACS (Êxodo Científica, lote: 2110185693); deixou-se o sistema sob agitação magnética (agitador magnético com aquecimento código ALL AMA05 – Allerbest Produtos para lab. Ltda) branda por um período de 1 h. Fez-se a filtragem separando o material sólido da manteiga de cacau dissolvida em clorofórmio. Utilizou-se um evaporador rotativo Fisatom modelo 801 para a extração do solvente e obtenção da manteiga de cacau, esta em fase líquida. A amostra foi colocada em tubo Falcon e esperou-se a cristalização do material.

As análises de parâmetros experimentais de RMN-ES foram realizadas com a amostra sólida. Para empacotá-las em rotor de zircônio de 4mm (4mm MAS Rotor Kit, Bruker BioSpin; material da tampa: Kel-F), foi utilizado um funil, o qual evitava o contato direto com a amostra, portanto, não a aquecendo devido à temperatura corporal. O rotor de zircônio 4mm, uma vez devidamente empacotado e tampado, era colocado em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 400MHz Avance III HD Bruker, localizado na Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP.

Com relação à determinação da variação de temperatura da amostra em função da frequência de rotação e da potência e duração dos pulsos de radiofrequência, utilizou-se amostra de manteiga comercial sem sal, comprada em mercado local. A manteiga de vaca foi escolhida devido a viabilidade de acompanhar a variação de temperatura em função do deslocamento químico referente ao sinal da água presente em tal produto, através de espectro de ^1H obtido por sequência *one-pulse* utilizando

RMN-ES, como será mais bem detalhado no item 4.2. Devido à textura da amostra, fez-se necessário sua fusão para devido empacotamento.

Uma quantidade de aproximadamente 3,0 g de manteiga comercial foi disposta em tubo criogênico de 5,0 mL. Este foi colocado em banho seco Agimaxx LAB-BS338, cuja temperatura foi ajustada para 65°C, por 10 minutos, a fim de os TAG fundirem completamente. Devido aos demais componentes da composição da manteiga, fez-se necessário deixar a amostra em agitador orbital básico IKA MS 3 por 1 minuto, para sua homogeneização. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a amostra fundida e homogeneizada foi colocada no rotor. Antes de tampá-lo, a amostra foi refrigerada por 5 minutos, para sua cristalização ser acelerada, evitando que o material não fundido se sedimentasse. Em seguida, o rotor foi tampado e a amostra colocada no espectrômetro para as devidas análises.

Diferentes amostras de manteiga de cacau e amostras de outros derivados de cacau foram analisadas, com o intuito de determinar o valor de SFC, utilizando-se dos espectros obtidos por RMN-ES, espectros estes adquiridos a partir da sequência de pulsos HPDEC (*High-Power Decoupling* ou Desacoplamento de Alta Potência). Duas amostras de manteiga de cacau (amostras MC_2 e MC_3) foram obtidas comercialmente, da mesma fazenda de produção das amêndoas de cacau torradas, as quais foram utilizadas para a extração da manteiga de cacau usada nos estudos dos parâmetros de aquisição (amostra MC_1), e uma amostra de manteiga de cacau foi extraída de chocolate comercial, seguindo procedimento descrito acima (amostra MC_4). Além disso, amostras de manteiga de cacau, liquor de cacau e chocolate também foram fornecidas pelo Laboratório de Frutas, Hortaliças e Produtos Açucarados (LFHPA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), codificada como MC_5, MC_6, L_1 a L_3, CL_1 a CL_6, C60_1 a C60_4, C70_1 e C70_2. Tais amostras foram empacotadas de forma análoga ao empacotamento de manteiga de cacau descrito acima. Descrição detalhada das amostras encontra-se na Tabela 9, no item 3.2.5.

Por fim, acompanhou-se o processo de cristalização isotérmico da amostra de manteiga de cacau extraída da amêndoa (amostra MC_1). A amostra foi empacotada de forma análoga ao descrito anteriormente, porém, antes de ser colocada no espectrômetro, ela foi fundida em banho seco a 60°C por 30 minutos.

3.2. Parâmetros de aquisição

As sequências de pulsos utilizadas foram: CPMAS, *one-pulse* e HPDEC. É importante destacar que as sequências utilizadas não foram obtidas da biblioteca da Bruker e, sim, sequências que foram modificadas para que cada um dos parâmetros pudesse ser alterado de forma individual sem afetar os demais.

3.2.1. Variação espectral ocasionada por MAS e DEC para experimentos utilizando sequência CPMAS

O comportamento da amostra quanto à frequência de rotação (MAS) foi avaliado para o espectro de ^{13}C , adquirido utilizando a sequência CPMAS, visto que esta é uma sequência que favorece os sinais referente às porções sólidas das amostras em estudo, o que, por vez, torna-se relevante para o estudo de estruturas polimórficas.

Para cada experimento, os parâmetros, destacados na Tabela 3, mantiveram-se os mesmos, exceto pela frequência de rotação, que era alterada, obtendo, ao final, um espectro em cada frequência de rotação, entre 0,5 kHz e 11 kHz, variando de 1 kHz em 1 kHz. Também foi obtido espectro estático.

Tabela 3. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência CPMAS. Para essa sequência, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C , enquanto o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos estático e com rotação em frequências até 11 kHz.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	5,0 s
Número de scans (NS)	2048
Tempo de contato com potência equivalente a PLW1 e SPW0 (P15)	1 ms
Potência durante tempo de contato (PLW1)	50 W
Duração pulso de excitação (P3) com potência PLW12	2,5 μs
Potência de desacoplamento (PLW12)	70 W
Potência do canal 2 durante tempo de contato (SPW0)	55 W

Fonte: Autoria própria

Além disso, o comportamento da amostra quanto à potência de desacoplamento (DEC) foi avaliado através das sequências CPMAS. Os parâmetros da Tabela 3 foram mantidos, com exceção do parâmetro PLW12, o qual foi variado para cada experimento, sendo utilizados os valores 10, 30 e 70 W. A frequência de rotação utilizada para estes experimentos foi mantida igual para todos como 3 kHz.

O comportamento do espectro foi também avaliado variando os valores de tempo de reciclagem. Utilizou-se os mesmos parâmetros descritos na Tabela 3, exceto o parâmetro D1, o qual foi avaliado para os valores: 2, 5, 15, 25 e 30 segundos para a análise de intensidade do sinal.

3.2.2. Variação espectral ocasionada por MAS e DEC para experimentos utilizando sequência *one-pulse*

A sequência CPMAS, por não ser usualmente utilizada em aquisições quantitativas, não é indicada para a determinação de propriedades quantitativas, como é o caso para o cálculo do valor de SFC. Para este, necessita-se de determinações quantitativas, a fim de correlacionar área e concentração das porções sólida e líquida da amostra. Assim, fez-se necessário o estudo de outras sequências de pulso, como é o caso da sequência *one-pulse*. Tal sequência permite a aquisição de espectros de ^1H em condições quantitativas.

Para verificação do comportamento da amostra em função da frequência de rotação (MAS), foram, portanto, adquiridos os espectros de ^1H utilizando sequência *one-pulse*. Para cada experimento, os mesmos parâmetros (Tabela 4) foram utilizados e os espectros foram obtidos de forma estática, ou seja, com o rotor parado. Para avaliar a influência da frequência, o rotor foi rotacionado na frequência em estudo (3 kHz, 5 kHz e 10 kHz) por meia hora, em seguida a rotação cessou e adquiriu-se o sinal com o rotor parado. O espectro de referência foi o primeiro obtido, no qual a amostra não havia sido rotacionada previamente.

Tabela 4. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^1H , utilizando sequência *one-pulse*, o canal 1 refere-se ao ^1H nesta sequência. Tais parâmetros foram utilizados para experimentos sem rotação, contudo, entre cada medida, a amostra estava sob a influência da frequência de rotação desejada, 3 kHz, 5 kHz e 10 kHz, por 30 minutos.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,17 s
Recycle delay (D1)	5,0 s
Número de scans (NS)	128
Duração pulso de excitação (P1)	5,0 μs
Potência do pulso de excitação (PLW1)	25 W

Fonte: Autoria própria

Desenvolveu-se um experimento que simulava o efeito sofrido pela amostra durante a aquisição de espectro desacoplado. Isto porque a sequência *one-pulse* não utiliza um segundo canal para realizar o desacoplamento, utiliza apenas o canal referente ao ^1H para a aquisição de espectro de excitação direta. Assim, para avaliar os efeitos referente ao DEC foi necessário desenhar um experimento que simulava pulso de desacoplamento, para isso, fez-se dois experimentos, um seguido do outro: o primeiro teve sua duração e potência de pulso alteradas para que equivalassem àquelas de uma sequência de desacoplamento e o segundo, o qual gerou os resultados analisada, mantinham os parâmetros de aquisição destacados na Tabela 4.

De forma a avaliar a influência do pulso de rf nas propriedades físico-químicas da amostra, foram realizados experimentos de variação de tempo de reciclagem. A amostra, sem rotação, foi submetida, por 30 minutos, à irradiação de rf com duração de 50 ms e potência de 70 W, separados por tempo de reciclagem RD, como indicado na Figura 29, no item 4.1.1., diferentes para cada experimento. Após tal período, adquiriu-se o espectro de ^1H utilizando a sequência *one-pulse* e os mesmos parâmetros apresentados na Tabela 4. Os valores de RD utilizados foram: 1, 5, 10 e 50 s.

3.2.2.1. Determinação da variação de temperatura da amostra

Para demonstrar a relação da variação espectral com a temperatura, determinou-se a variação da temperatura experimentada pela amostra. Essa medição

foi realizada com uma amostra de manteiga comercial sem sal. Utilizaram-se os experimentos análogos ao de variação de MAS e RD para avaliação da variação espectral observada para a sequência *one-pulse*, descrito acima. Assim, seguiu-se os mesmos parâmetros relacionados na Tabela 4.

Para a alteração ocasionada por MAS foram obtidos espectros com frequência de rotação entre 1 e 11 kHz, enquanto para a alteração ocasionada por diferentes tempos de reciclo, foram obtidos espectros com diferentes valores de D1, sendo eles: 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 50 segundos.

3.2.3. Determinação da constante de tempo T_1

Apesar da sequência *one-pulse* poder ser utilizada para a aquisição de espectros de forma quantitativa, o espectro de ^1H em si não viabiliza a distinção entre as porções sólida e líquida de moléculas de TAG, como é observado para espectros de ^{13}C . Assim, fez-se necessário o estudo da sequência de pulso HPDEC, uma sequência de excitação direta, para a aquisição de espectros de ^{13}C de forma quantitativa.

Para análises quantitativas a prévia determinação da constante de tempo de relaxação spin-rede (T_1) é necessária. Utilizou-se a sequência HPDEC e duas abordagens para a obtenção deste valor: saturação-progressiva (SP) e inversão-recuperação (IR), nas quais se variaram os tempos de reciclagem. Para SP os tempos de reciclagem utilizados foram 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 e 500 segundos, e os demais parâmetros de aquisição estão na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de aquisição do experimento Saturação-Progressiva, para a qual o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H ; utilizado frequência de rotação do rotor de 3kHz. * O parâmetro *recycle delay* foi variado para cada experimento, a sequência de realização dos experimentos, conforme RD foi: 500, 300, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 e 1 s, a ordem crescente de tempos também foi utilizada para obtenção dos resultados. ** Para RD menor que 100 segundos, foram utilizados 4 *dummy scans*.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	*
Dummy scans (DS)	**
Número de scans (NS)	8
Duração pulso de excitação do canal 1 (P1)	4,0 μs
Potência durante pulso de excitação (PLW1)	54W
Potência de desacoplamento (PLW12)	70W

Fonte: Autoria própria

Para a IR, utilizou-se de lista variável de *delay* (D2) com os valores: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,5; 0,8; 1,3; 2,1; 3,3; 5,4; 8,6; 13,9; 22,4; 36,0; 57,8; 93,0; 149,5; 240,5; 386,7; 621,8; 1000,0 segundos. Os demais parâmetros estão na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de aquisição do experimento Inversão-Recuperação, para a qual o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H ; utilizado frequência de rotação do rotor de 3kHz. * O parâmetro *delay* variável (VD) foi diferente para cada experimento, sendo os valores utilizados: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,5; 0,8; 1,3; 2,1; 3,3; 5,4; 8,6; 13,9; 22,4; 36,0; 57,8; 93,0; 149,5; 240,5; 386,7; 621,8; 1000,0 s.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	800 s
Delay variável (VD)	*
Número de scans (NS)	4
Duração pulso de excitação do canal 1 (P1)	4,0 μs
Duração pulso de excitação do canal 1 (P2)	8,0 μs
Potência durante pulso de excitação (PLW1)	54W
Potência de desacoplamento (PLW12)	70W

Fonte: Autoria própria

3.2.4. Variação espectral ocasionada por MAS e DEC para experimentos utilizando sequência HPDEC

O comportamento da amostra, frente à variação de potência (DEC) e frequência de rotação diferentes (MAS), para análise por HPDEC foi avaliado de forma análoga aos experimentos realizados para a sequência CPMAS. Para o estudo da influência da frequência de rotação, foram utilizados os parâmetros de aquisição apresentados na Tabela 7 para a amostra sem rotação, bem como para rotações entre 0,5 e 12 kHz. Para o caso da avaliação da influência da potência de desacoplamento, utilizou-se a velocidade de rotação de 3 kHz e os mesmos parâmetros da Tabela 7, com exceção de PLW12, o qual foi variado para cada experimento, ao final obtendo espectros em 10, 30 e 70 W.

Tabela 7. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência HPDEC, para esta, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos estático e com rotação em frequências 0,5 kHz a 12 kHz.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	250,0 s
Número de scans (NS)	128
Duração pulso de excitação do canal 1 (P1)	4000,0 μs
Potência do pulso de excitação (PLW1)	54W
Potência de desacoplamento (PLW12)	70W

Fonte: Autoria própria

Com relação ao tempo de reciclo, foram obtidos espectros com os parâmetros de aquisição da Tabela 7, exceto o valor de D1, e rotação em 3 kHz. Os valores de D1 para os espectros adquiridos foram: 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 50 segundos.

3.2.5. Determinação dos valores de SFC

Devido às limitações presentes para os métodos protocolados de determinação de SFC, propõe-se um novo método para tal determinação, este utiliza de espectros de ^{13}C por RMN-ES. A obtenção dos valores de SFC por RMN-ES foi realizada utilizando a sequência HPDEC, com os parâmetros de aquisição descritos na Tabela 8. Estes se assemelham aos da Tabela 7, ajustados para pulso de 30° , segundo a equação de Ernst.

Tabela 8. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência HPDEC, para esta, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos de determinação de SFC.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	25,0 s
Número de scans (NS)	128
Duração pulso de excitação do canal 1 (P1)	1350,0 μs
Potência do pulso de excitação (PLW1)	54W
Potência de desacoplamento (PLW12)	70W

Fonte: Autoria própria

Para a obtenção dos valores de SFC, a fim de comparação qualitativa com aqueles obtidos pelo método proposto, utilizou-se dos protocolos ISO 8292-1 e ISO 8292-2 para a preparação da amostra e a medição. Note que as análises foram realizadas para as amostras que não passaram e as que passaram por tratamento térmico. O tratamento térmico realizado é descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Descrição do tratamento térmico realizado para as amostras em estudo, com indicativo de temperatura e tempo em que a amostra foi mantida na temperatura especificada.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo
60	30 min
0	90 min
26	40 h
0	90 min
23	60 min

Fonte: Adaptado de ISO/CD 8292-1 (2008) e ISO/CD 8292-2 (2008)

A aquisição dos valores de SFC seguindo os protocolos foi realizada em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Minispec ND mq20 (Bruker, Alemanha) com ímã permanente de 0,47 T (19,9 MHz para ^1H), utilizando tubo de vidro de 10 mm. Os dados foram analisados com os programas Bruker TopSpin 4.2.0 e OriginPro (OriginLab Corporation).

Para este estudo foram utilizadas amostras de diferentes derivados de cacau, sendo eles: liquor de cacau (nibs de cacau finamente moído), manteiga de cacau e chocolate ao leite, 60% e 70% de cacau. A identificação das amostras se encontra na Tabela 10.

Tabela 10. Identificação, descrição e origem das amostras utilizadas no estudo da determinação e comparação entre diferentes métodos, protocolados e proposto, de obtenção de valores de SFC.

Identificação	Descrição da amostra	Origem
MC_1	Manteiga de cacau extraída de amêndoa de cacau fermentada, seca e torrada	Espírito Santo - Brasil
MC_2	Manteiga de cacau comercial utilizada na produção de chocolate da marca Lamberti	Espírito Santo - Brasil
MC_3	Manteiga de cacau comercial utilizada na produção de chocolate da marca Lamberti	Espírito Santo - Brasil
MC_4	Manteiga de cacau extraída do chocolate Lindt	Mistura
MC_5	Manteiga de cacau comercial da marca Barry Callebaut	Mistura
MC_6	Manteiga de cacau extraída de amêndoa de cacau fermentada, seca e torrada	Bahia - Brasil
L_1	Liquor de cacau obtido de amêndoas de cacau fermentadas, secas e torradas	Pará - Brasil
L_2	Liquor de cacau comercial da marca Barry Callebaut	Mistura
L_3	Liquor de cacau obtido de amêndoas de cacau fermentadas, secas e torradas	Bahia - Brasil
CL_1	Chocolate ao leite produzido com MC_5 e L_2, com teor de gordura de leite de 4,0%	MC_5 e L_2 (mistura)
CL_2	Chocolate ao leite produzido com MC_5 e L_2 (maior teor de proteínas), com teor de gordura de leite de 4,0%	MC_5 e L_2 (mistura)
CL_3	Chocolate ao leite produzido com MC_5 e L_2 (maior teor de minerais), com teor de gordura de leite de 4,0%	MC_5 e L_2 (mistura)
CL_4	Chocolate ao leite produzido com MC_5 e L_2 (mesma formulação CL_1), com teor de gordura de leite de 4,0%	MC_5 e L_2 (mistura)
		continua

Identificação	Descrição da amostra	continuação
		Origem
CL_5	Chocolate ao leite produzido com MC_5 e L_2 (mesma formulação CL_1), com teor de gordura de leite de 4,0%	MC_5 e L_2 (mistura)
CL_6	Chocolate ao leite produzido com MC_6 e L_3, com teor de gordura de leite de 5,2%	MC_6 e L_3 (Bahia)
C60_1	Chocolate intenso - 60% cacau, produzido com MC_6 e L_3	MC_6 e L_3 (Bahia)
C60_2	Chocolate intenso - 60% cacau, produzido com manteiga de cacau do Pará e L_1	Manteiga de cacau do Pará e L_1 (Pará)
C60_3	Chocolate intenso - 60% cacau, produzido com MC_6 e L_3	MC_6 e L_3 (Bahia)
C60_4	Chocolate intenso - 60% cacau, produzido com amêndoas de cacau não fermentadas	Bahia - Brasil
C70_1	Chocolate intenso - 70% cacau, produzido com MC_6 e L_3	MC_6 e L_3 (Bahia)
C70_2	Chocolate intenso - 70% cacau, produzido com MC_6 e L_3	MC_6 e L_3 (Bahia)

Fonte: Autoria própria

3.2.6. Cristalização isotérmica de manteiga de cacau

A cristalização da manteiga de cacau foi acompanhada tanto por sequência CPMAS (parâmetros na Tabela 11) quanto por sequência HPDEC (parâmetros na Tabela 12). Como já dito, a amostra empacotada foi fundida previamente, a fim de garantir que não houvesse memória de cristalização.

O rotor, com a amostra fundida, foi inserido no espectrômetro e um espectro de ^{13}C , obtido com a respectiva sequência, foi adquirido de hora em hora por um período total de 70 h. Para isso, foi utilizado *dummy scans* para que cada experimento durasse 1 h, começando pelo segundo experimento.

Tabela 11. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência CPMAS, para essa sequência, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C , enquanto o canal 2 ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos de acompanhamento de cristalização.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	30,0 s
Número de scans (NS)	64
Dummy scan (DS)	55
Tempo de contato com potência equivalente a PLW1 e SPW0 (P15)	1 ms
Potência durante tempo de contato (PLW1)	50W
Duração pulso de excitação (P3) com potência PLW12	2,5 μs
Potência de desacoplamento (PLW12)	70W
Potência do canal 2 durante tempo de contato (SPW0)	55W

Fonte: Autoria própria

Tabela 12. Parâmetros de aquisição dos espectros de ^{13}C , utilizando sequência HPDEC, para esta, o canal 1 refere-se ao canal do ^{13}C e o canal 2, ao canal do ^1H . Tais parâmetros foram utilizados para experimentos de acompanhamento de cristalização.

Parâmetros (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de aquisição (AQ)	0,049 s
Recycle delay (D1)	25,0 s
Número de scans (NS)	128
Dummy scans (DS)	16
Duração pulso de excitação do canal 1 (P1)	1350,0 μs
Potência do pulso de excitação (PLW1)	54W
Potência de desacoplamento (PLW12)	70W

Fonte: Autoria própria

4.0. Resultados e Discussão

O artigo intitulado “*Establishing optimal parameters to mitigate the heating effects caused by CPMAS sequence in ^{13}C solid-state NMR studies of cocoa butter and other fat samples*”, publicado no periódico Food Research International, refere-se a parte dos resultados neste trabalho apresentados. O artigo traz os resultados e discussão referente ao estudo das condições de análise e como elas influenciam nas características espectrais observadas, bem como os resultados referente ao processo de cristalização isotérmica (TOBIAS; MORAES; COLNAGO, 2025).

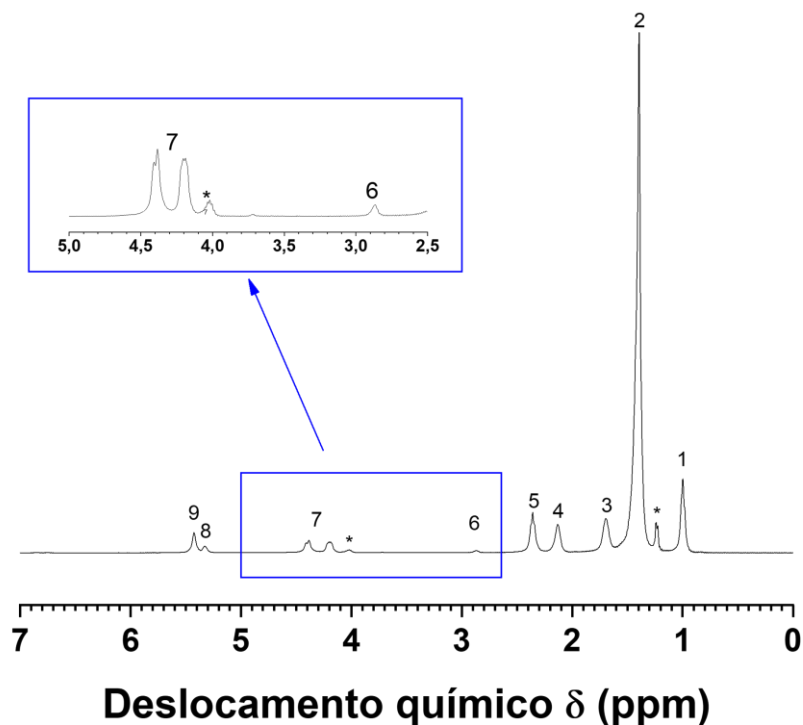
Como discutido na introdução, quando amostras heterogêneas, contendo fases sólida e líquida, como é o caso da manteiga de cacau (MC) e/ou derivados, são analisadas por RMN de ^{13}C e ^1H em estado sólido, dois fatores são muito influentes na resolução espectral do componente sólido: a interação dipolar entre os spins e a anisotropia de deslocamento químico (CSA). Esses fatores são responsáveis pelo alargamento de linha e, portanto, devem ser minimizados ou eliminados para se obter espectros de amostras sólidas em alta resolução. Os procedimentos utilizados para isso são: desacoplamento de alta potência (DEC), o qual minimiza os efeitos da interação dipolar, e rotação em torno do ângulo mágico (MAS), que minimiza principalmente os efeitos da anisotropia de deslocamento químico.

A potência de DEC tem que gerar uma banda de excitação maior do que a largura da interação dipolar, que é da ordem de dezenas de kHz. Além disso, a velocidade de rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS) deve ser maior do que a CSA. Por exemplo, para sólidos, em que a CSA do ^{13}C é da ordem de 200 ppm, referente ao espectro inteiro, ou seja, a todos os grupos orgânicos pertencentes à amostra, em campo magnético de 9,4T (frequência de ressonância para ^1H de 400 MHz), a velocidade de rotação seria da ordem ou superior a 20 kHz, o que garante que não haja banda lateral. Como o material de estudo é a MC, e deseja-se analisar os sinais de grupos CH_2 , é indicado que a rotação da amostra seja da ordem de 10 kHz, que é uma velocidade maior do que o CSA de cerca de 100 ppm dos CH_2 de triglicerídeos sólidos (DUNCAN, 1987).

Como já mencionado, os principais triglicerídeos da MC são: POS, SOS e POP, que representam cerca de 37, 30 e 22% dos TAGs, respectivamente. Os principais ácidos graxos dos TAGs da MC são: ácido esteárico (~35%), ácido oleico (~34%) e ácido palmítico (~26%). A MC possui, portanto, aproximadamente 63% de ácidos graxos saturados e 37% de ácidos graxos insaturados (BECKETT, 2008).

As amostras de MC foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C usando MAS, o que gera espectros com resolução similar aos de amostra líquida. Na Figura 20, tem-se espectro de RMN de ^1H de uma MC, com MAS de 10 kHz.

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H dos de uma amostra de MC com MAS de 10 kHz.



Fonte: Autoria própria

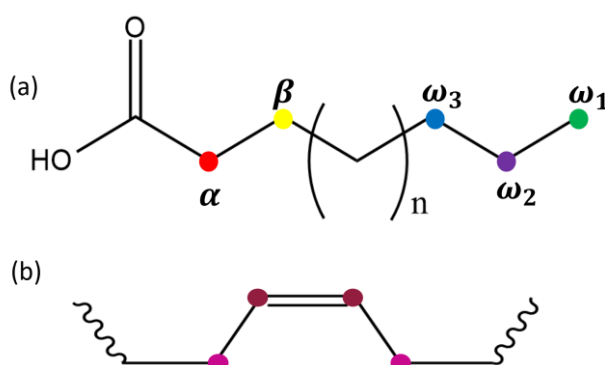
Tabela 13. Assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H dos componentes líquidos da MC com deslocamento químico em função do grupo funcional.

Sinal	Deslocamento químico δ (ppm)	Grupo funcional
1	1,00	$-\text{CH}_3$ todas as cadeias acil
2	1,39	$-(\text{CH}_2)_n$ da cadeia acil
3	1,69	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ da cadeia acil
4	2,13	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ todos ácidos graxos insaturados
5	2,36	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$ todas as cadeias acil
6	2,86	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ácido linoleico
7	4,20; 4,38	$-\text{CH}_2\text{OCOR}$ glicerol
8	5,33	$>\text{CHOCOR}$ glicerol
9	5,42	$-\text{CH}=\text{CH}-$ ácido graxo insaturado
*	1,23; 4,03	Não representam sinal de TAG

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 13 estão os assinalamentos dos principais sinais observados nesse espectro que são atribuídos aos ^1H com diferentes deslocamentos químicos das moléculas de TAGs (Figura 21). O sinal 1, em 1,00 ppm é referente aos hidrogênios do grupo $-\text{CH}_3$ terminal (ω_1), enquanto os hidrogênios presentes nos grupos $(\text{CH}_2)_n$, sinal 2, estão em 1,39 ppm. Os hidrogênios dos grupos α e β da Figura 21, sinais 5 e 3, estão em 2,36 e 1,69 ppm, respectivamente. Enquanto os hidrogênios diretamente envolvidos na dupla ligação (sinal 9) estão em 5,42 ppm, aqueles ligados aos carbonos vizinhos de uma dupla ligação estão em 2,13 ppm (sinal 4). Por fim, os sinais referentes aos hidrogênios do glicerol são assinalados aos hidrogênios nas posições 1 e 3, sinal 7 em 4,20 e 4,38 ppm, e na posição 2, sinal 8 em 5,33 ppm. O sinal 6, em baixa intensidade, é dos grupos CH_2 , entre duas duplas do ácido linolênico. Os sinais em 1,23 e 4,03 ppm, assinalados com um asterisco, não são dos TAGs, podendo ser de outros componentes minoritários presentes na MC.

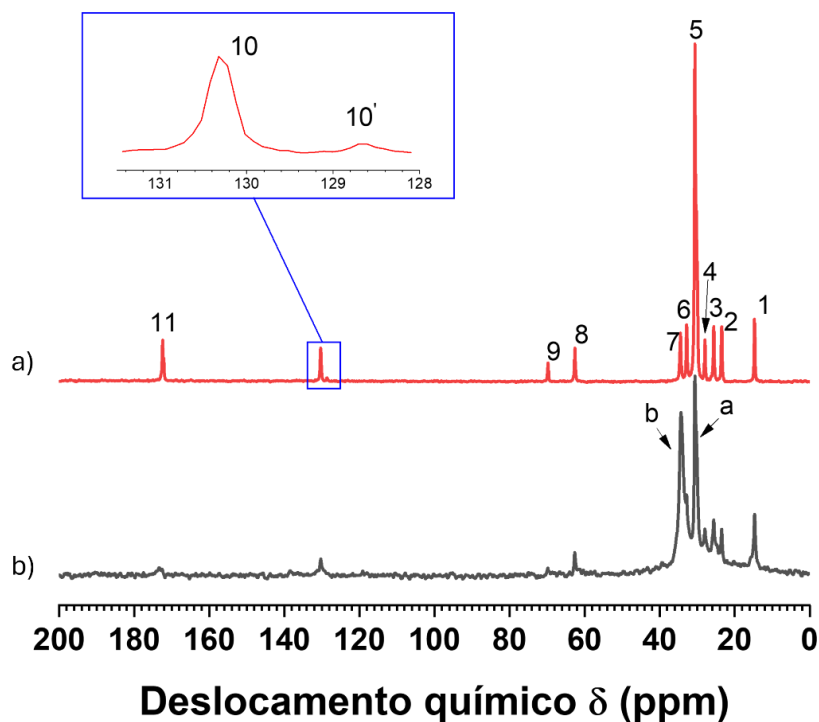
Figura 21. (a) Estrutura geral de um ácido graxo saturado com indicativo de posições que dão sinais em diferentes deslocamentos químicos e (b) representação da parte insaturada, em cis, de ácido graxo presente em MC.



Fonte: Autoria própria

Na Figura 22 estão o espectro de RMN de ^{13}C dos componentes líquidos de uma amostra de MC obtido com HPDEC, com MAS de 10 kHz e um pulso no carbono e DEC de 70 W (a) e o espectro dos componentes sólidos e líquidos (b) obtido com a sequência CPMAS. Na Tabela 14 estão os assinalamentos de todos os sinais do espectro do componente líquido, aos respectivos carbonos dos TAGs.

Figura 22. Espectros de RMN de ^{13}C dos componentes líquidos (a) e componentes sólidos e líquidos (b) da MC. Os espectros foram obtidos em velocidade de rotação 10 kHz, potência de desacoplamento de 70 W e tempo de reciclagem de 250 s (para a sequência HPDEC) e 5 s (para a sequência CPMAS), respectivamente.



Fonte: Autoria própria

Tabela 14. Assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C dos componentes em estado líquido da MC com deslocamento químico em função do grupo funcional.

Sinal	Deslocamento químico δ (ppm)	Grupo funcional
1	14,7	-CH ₃ terminal (ω_1)
2	23,4	-CH ₂ - (ω_2)
3	25,5	-CH ₂ - beta
4	28,0	-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -
5	30,6	-(CH ₂) _n
6	32,8	-CH ₂ - (ω_3)
7	34,4	-CH ₂ - alpha
8	62,6	-CH ₂ OCOR glicerol
9	69,7	>CHOCOR glicerol
10	130,3	-CH=CH- ácido oleico
10'	128,7	-CH=CH- ácido linoleico
11	172,40	-COOH carboxílico

Fonte: Autoria própria

Todos os sinais no espectro da Figura 22a podem ser assinalados aos diferentes carbonos dos triglicerídeos da MC. O sinal em 14,7 ppm é assinalado ao grupo $-\text{CH}_3$ (ômega 1 - ω_1) terminal de todos os ácidos graxos, os sinais em 23 ppm, 25 ppm, 32 ppm e 34 ppm são referentes aos grupos $-\text{CH}_2$ dos grupos ω_2 , β , ω_3 e α respectivamente, observados na Figura 21. Em 28 ppm, tem-se os carbonos alílicos 8 e 11 do ácido oleico e o sinal em 30 ppm corresponde aos demais grupos $-\text{CH}_2$. Os sinais referentes à molécula de glicerol estão em 62,6 ppm (carbonos 1 e 3) e 69,7 ppm (carbono 2). Os carbonos 9 e 10 em dupla ligação no ácido oleico apresentam sinal em 130,3 ppm enquanto para uma das duplas ligações no ácido linoleico estão em 128,7 ppm, enquanto a outra dupla ligação se sobrepõe ao sinal em 130,3 ppm. Já o sinal em 172,40 ppm é assinalado ao carbono carboxílico.

Comparando os dois espectros da Figura 22a e 22b, pode-se perceber diferenças significativas entre os sinais dos componentes líquidos (a) e componentes líquidos e sólidos (b). Diferentemente do espectro (a), o espectro (b) apresenta dois picos bem intensos, os quais são referentes aos grupos $(\text{CH}_2)_n$ em estado líquido (30 ppm) e em estado sólido (34 ppm). A diferença de deslocamento químico entre os dois estados físicos está associada à configuração *trans* rígida que se observa na estrutura cristalina da MC (ARISHIMA et al., 1996). Esses picos serão utilizados, por exemplo, para identificar ambos os estados físicos da amostra e eventualmente serão utilizados para calcular a razão entre gordura sólida e líquida (SFC), em medidas quantitativas de RMN.

Como a temperatura de fusão da MC está na faixa de 17,3°C a 36,3°C, ela pode se liquefazer com o aquecimento da amostra tanto pela sua alta rotação nos experimentos de MAS quanto pela alta potência de desacoplamento (DEC) e curto tempo de repetição da sequência (RD- *recycle delay* ou D1 nos equipamentos Bruker). Por isso foi necessário estudar o efeito desses parâmetros na fusão da MC em experimento à temperatura ambiente (AGUILAR-PARRILLA et al., 1990; BERNARD et al., 2017; DVINSKIKH; CASTRO; SANDSTRÖM, 2004; HINDMAN, 1966; HOFFMAN, 2022; HOFFMAN; BECKER, 2005; JAEGER; WANG; HU, 2020; MALÄR et al., 2021; SASAKI; UENO; SATO, 2012; THURBER; TYCKO, 2009).

4.1. Influência da frequência de rotação da amostra e irradiação de radiofrequência nos espectros de RMN de manteiga de cacau

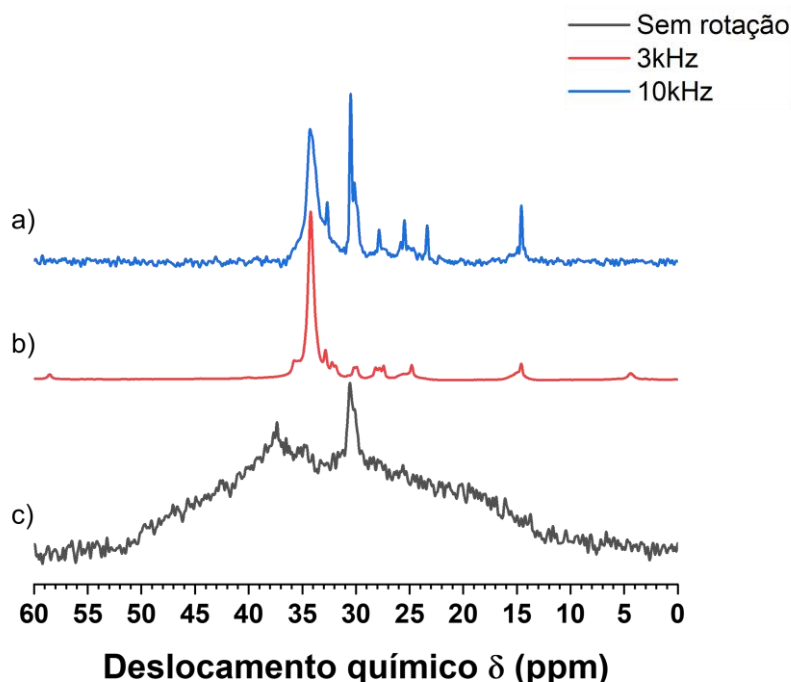
Como descrito anteriormente, as análises de RMN de ^{13}C , no estado sólido, usam normalmente a sequência polarização cruzada (CP) com rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS) e desacoplamento de alta potência (DEC), ou simplesmente CPMAS. A sequência de CP é usada para acelerar a aquisição dos sinais de RMN, visto que muitos dos experimentos em estado sólido envolvem o estudo de spins com baixa abundância natural e baixa razão magnetogírica e longos tempo de relaxação T_1 , como é o caso do ^{13}C .

Além da CP, as amostras têm que ser rotacionadas a uma alta frequência (10 kHz ou mais) e utilizar desacoplamento de alta potência que podem levar a fusão da MC em experimentos realizados na temperatura ambiente (cerca de 23°C). Para que a amostra gire nessa frequência alta é necessário que o rotor seja suspenso por um colchão de ar ou gás inerte (*bearing*) e que um gás passe em alta velocidade pelas aletas da tampa do rotor, fazendo-o girar. Esse processo causa atrito entre o rotor e o gás, o que pode aquecer e até fundir a MC (AGUILAR-PARRILLA et al., 1990).

Como potências de DEC, de dezenas de Watts, precisam ser aplicadas na amostra de cerca de 100 mg, por vários milissegundos, com tempo de repetição de alguns segundos, uma grande quantidade de energia é incidida sobre a amostra, o que também pode levar a fusão de amostras de MC.

Na Figura 23, encontram-se os espectros de RMN de ^{13}C , da região dos grupos CH_2 e CH_3 , entre 0 e 60 ppm, obtidos utilizando sequência CPMAS em diferentes velocidades de rotação.

Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C de MC entre 0 e 60 ppm obtidos com a sequência CPMAS, em diferentes frequências de rotação, com potência de desacoplamento de 70 W e tempo de reciclagem de 5 s. As diferentes velocidades aplicadas foram: (a) 10 kHz, (b) 3 kHz e (c) estático.



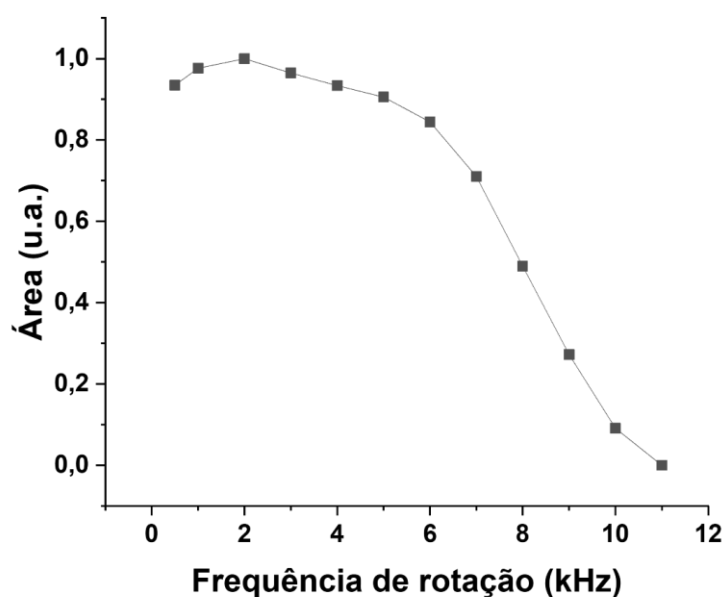
Fonte: Autoria própria

Para a amostra de MC sendo rotacionada em 10 kHz (Figura 23a), os sinais em 34 e 30 ppm relativos aos componentes sólido e líquido, respectivamente, estão presentes e com áreas relativamente similares. Ou seja, a MC amostrada está com componentes em ambos os estados físicos. Contudo, no espectro adquirido com rotação de 3kHz (Figura 23b), somente o sinal do componente sólido (34 ppm) tem alta área, enquanto a área do componente líquido é muito pequena.

A hipótese para essa aparente discrepância, com relação ao espectro em 3 kHz (pouco componente líquido), é que a amostra de MC fundiu parcialmente a 10 kHz e que não fundiu ou fundiu menos a 3 kHz. Ou seja, a ausência de um sinal de grande área em 30 ppm para rotação em 3 kHz indica que, nessa velocidade, a amostra de MC tem uma menor quantidade da fração líquida se comparado com o espectro em 10 kHz. Para o espectro estático (Figura 23c) se pode ver um sinal muito largo, de 10 a 50 ppm, e com grande área, referente a porção sólida e um sinal mais estreito em 30 ppm e com área bem menor, referente a porção líquida, indicando também uma menor quantidade da fração líquida nessa condição de análise.

Como o sinal referente a porção sólida (34 ppm) da amostra está presente em todos os espectros encontrados na Figura 23, foi possível utilizá-lo para acompanhar a variação da área do sinal em função da frequência de rotação, como pode ser visto na Figura 24 a seguir.

Figura 24. Variação da área referente a porção sólida, obtida através do espectro de ^{13}C adquirido com a sequência CPMAS, da amostra de manteiga de cacau, em função da frequência de rotação.



Fonte: Autoria própria

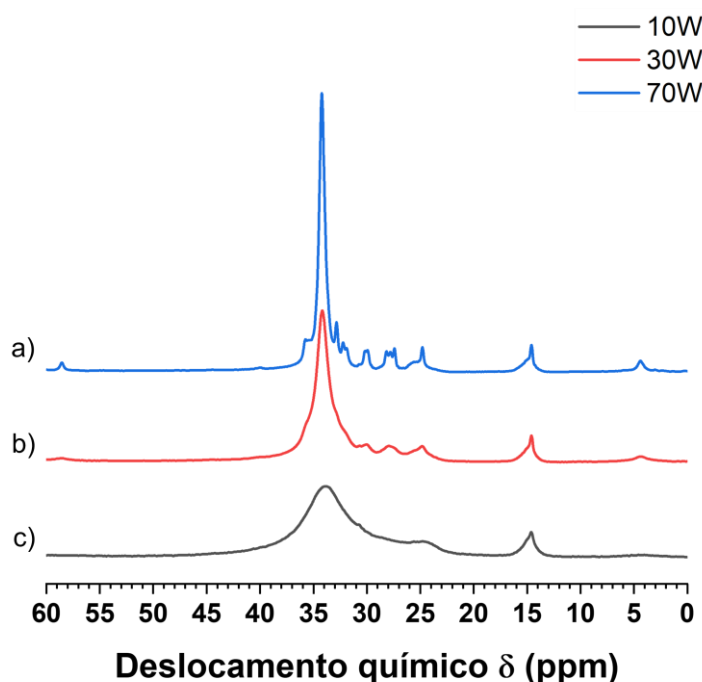
A área foi calculada para toda a região entre 0 e 60 ppm, visto que para baixas frequências de rotação existem bandas laterais, cujas áreas contribuem para a área total da porção sólida da manteiga de cacau.

Pode-se perceber que, conforme o aumento da frequência de rotação, a área referente à porção sólida diminui; é interessante destacar que este decréscimo não é linear, sofrendo uma queda rápida a partir de 7 kHz. A área acompanhada no gráfico representa a concentração do material em estado sólido, portanto, sua diminuição implica dizer que a amostra está sofrendo os efeitos do aquecimento causado pela rotação (MAS) e se liquefazendo. Os TAGs fundidos passam a contribuir para o sinal referente à porção líquida da amostra, ou seja, o sinal na região em 30 ppm, por isso, passa-se a observar este sinal de forma mais representativa no espectro, como pode

ser visualizado na Figura 23, quando comparados os espectros obtidos em 3 e 10 kHz.

Quanto à potência de desacoplamento, tem-se, na Figura 25, os espectros de RMN de ^{13}C obtidos com a sequência CPMAS e várias potências de desacoplamento, utilizando frequência de rotação de 3 kHz. Nesta figura, pode-se ver que, ao reduzir a potência do DEC, as linhas dos sinais do componente sólido ficam mais largas devido à ineficiência do DEC em eliminar a interação dipolar. Portanto, a potência de DEC deve ser suficientemente alta para suprimir a interação dipolar entre ^1H e ^{13}C , o que leva a melhores resoluções espectrais.

Figura 25. Espectros de RMN de ^{13}C , em diferentes potências do DEC, para amostra de MC, rotacionadas em 3 kHz. A sequência utilizada, CPMAS, permite variação no parâmetro de potência de desacoplamento da interação dipolar entre os spins ^1H e ^{13}C . As diferentes potências aplicadas foram: (a) 70 W, (b) 30 W e (c) 10 W.



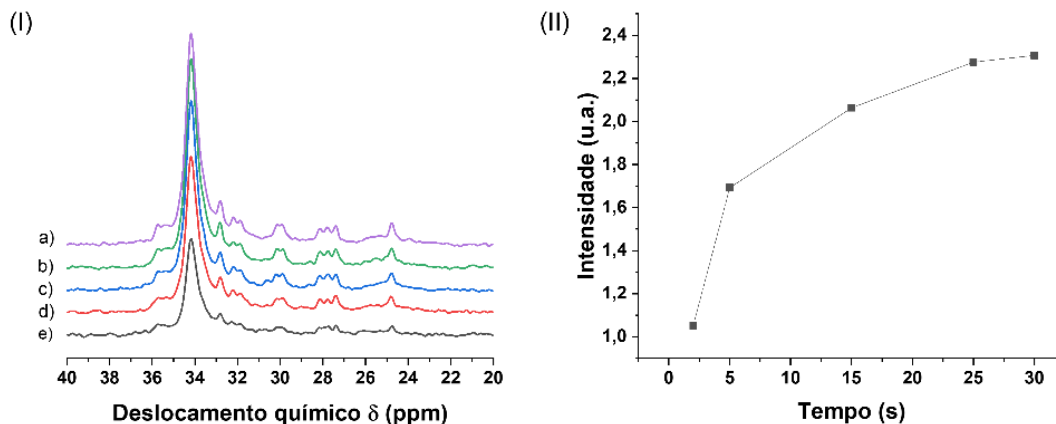
Fonte: Autoria própria

O problema de utilizar DEC de 70 W está no fato de esta ser uma potência muito alta, logo, pode causar aquecimento da amostra, o que não é desejado. Assim, para reduzir esse efeito do aquecimento, deve-se aumentar o RD para dar tempo de a amostra voltar à temperatura anterior, ou seja, dissipar energia. Além disso, na sequência de CP, durante o tempo de contato (TC), a amostra está sob irradiação

tanto na frequência de ^1H quanto de ^{13}C , por longos períodos (faixa de milissegundos), para que ocorra a transferência de polarização (condição de Hartmann-Hahn). Após o TC, ainda há o DEC no canal do ^1H , durante a aquisição do espectro de ^{13}C .

Na Figura 26 estão os espectros CPMAS de uma MC adquiridos com diferentes valores de RD. Como se pode acompanhar pelo sinal em 34 ppm, a intensidade aumenta com o aumento de RD, ou seja, intensidade do sinal para $\text{RD} = 30 > 25 > 15 > 5 > 2$ segundos. O T_1 dos ^1H dos TAG está na ordem de 7 s, o que também pode influenciar as áreas desses sinais, pois na sequência CP a intensidade do sinal de ^{13}C depende do T_1 do ^1H . Para caracterizar se a alteração da área do sinal em 34 ppm foi função do aquecimento, por MAS ou DEC, ou devido ao valor de T_1 , foram feitos experimentos de RMN de ^1H e experimentos de RMN de ^{13}C em estado sólido, obtidos por outra sequência de pulsos.

Figura 26. (I) Espectros de ^{13}C obtido utilizando sequência CPMAS com diferentes valores de tempo de reciclagem: (a) 30 s, (b) 25 s, (c) 15 s, (d) 5 s e (e) 2 s. (II) Variação da intensidade do sinal 34 ppm em função do valor de tempo de reciclagem.



Fonte: Autoria própria

4.1.1. Influência do MAS e DEC nos espectros de ^1H de uma amostra de manteiga de cacau

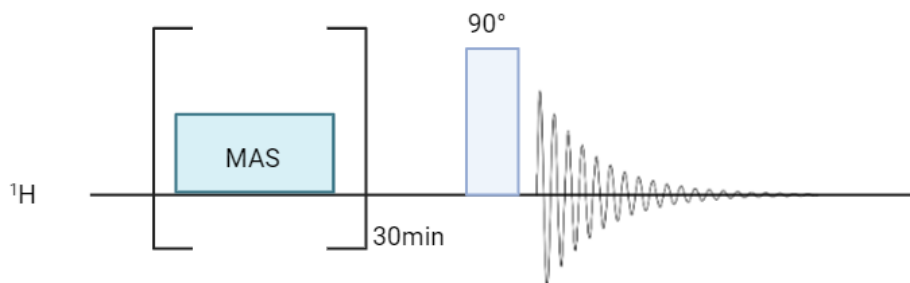
Como a sequência de CP não é quantitativa, resolveu-se averiguar a possibilidade de utilizar RMN de ^1H estático para verificar tanto o efeito da rotação da amostra, quanto da potência do desacoplamento na fusão parcial ou total das

amostras de MC. Para isso, foram montados dois tipos de experimentos, cada um referente a um desses parâmetros. No primeiro, as amostras de MC foram giradas em velocidades de 3, 5 e 10 kHz, por 30 minutos antes da aquisição dos espectros estáticos da MC (Figura 27) e, usou-se como referência de largura de linha o espectro de RMN de ^1H adquirido sem rotação prévia da amostra (Figura 28a). Além disso, no segundo tipo de experimento, avaliou-se o efeito da potência do DEC e do tempo de reciclagem nos espectros de RMN de ^1H de uma amostra de MC. Nesse caso, as amostras foram irradiadas por 30 minutos, na frequência de RMN de ^1H com 70 W e diferentes valores de RD (Figura 29). Durante esses 30 minutos o desacoplador foi ligado por 50 ms com tempos de repetição de 1, 5, 10 e 50 segundos (Figura 30) antes de fazer a aquisição do sinal da amostra estática.

É válido ressaltar que os experimentos aqui realizados não medem explicitamente a temperatura da amostra em função da velocidade de rotação ou DEC, mas apresentam os efeitos causados pelo aquecimento da amostra, por esses dois fatores, na largura das linhas dos espectros obtidos, após o MAS ou DEC, sem a rotação das amostras, ou seja, em espectros estáticos.

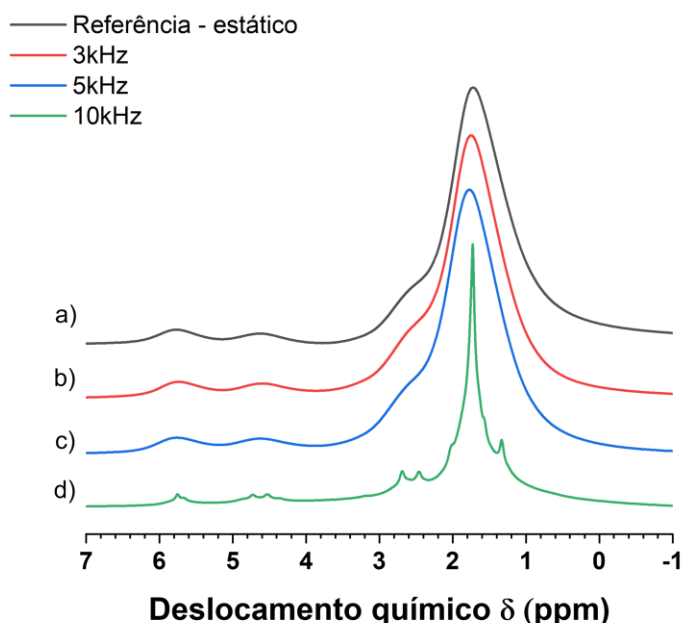
Na Figura 28 estão os espectros de RMN de ^1H de uma amostra de MC, que foi girada em frequências de rotação de 3, 5 e 10 kHz, por 30 minutos antes da aquisição do espectro estático da MC (espectro sem rotação da amostra).

Figura 27. Experimento para avaliação do efeito da velocidade de rotação do rotor para espectros de ^1H em amostra de MC. A amostra foi girada em 3, 5 e 10 kHz por 30 minutos antes de fazer a aquisição do espectro sem rotação.



Fonte: Autoria própria

Figura 28. Espectros de RMN de ^1H , entre -1 e 7 ppm, de uma amostra MC submetida por 30 minutos a rotações de (b) 3, (c) 5 e (d) 10 kHz previamente a aquisição. O espectro em (a) representa o experimento estático sem prévia rotação (referência).



Fonte: Autoria própria

A sequência utilizada na obtenção desses espectros foi do tipo excitação direta da frequência de RMN de ^1H , *one-pulse*, na qual somente um pulso de excitação é utilizado. Os parâmetros de aquisição foram apresentados na Tabela 4.

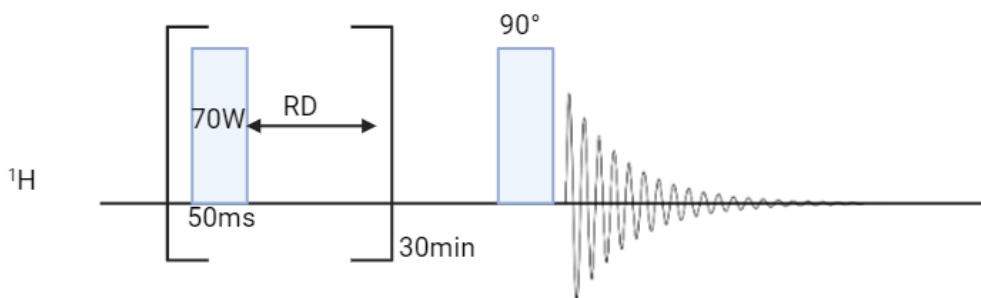
Apesar de todos os espectros da Figura 28 terem sido obtidos sem rotação, cada um tem uma condição anterior diferente: na Figura 28a, tem-se o espectro de referência, obtido da amostra que não foi submetida a nenhuma rotação. O espectro (b), da amostra parada, após sua rotação por 30 minutos em 3 kHz. Nos espectros (c) e (d) estão os espectros sem rotação das amostras previamente rotacionadas por 30 minutos em 5 kHz e 10 kHz, respectivamente.

Para a rotação em 3 kHz (Figura 28b) e em 5 kHz (Figura 28c) não se observa diminuição da largura de linha em comparação ao espectro de referência. Ou seja, os espectros obtidos nessas rotações não apresentam diferenças significativas em relação ao espectro padrão, o que indica que não houve fusão de parte da amostra. O mesmo não pode ser dito para o espectro obtido após a rotação em 10 kHz (Figura 28d) visto que a largura das linhas deste espectro é menor do que o espectro de referência. Considerando que todos os espectros foram obtidos sem MAS (de forma

estática), uma justificativa plausível para essa alteração é a fusão parcial da amostra, visto que, quando em estado líquido, há maior movimento molecular e, conseqüentemente, uma redução ou eliminação dos efeitos de CSA e interação dipolar. Note, contudo, que a melhora na resolução não indica que toda a amostra fundiu, pois o espectro ainda apresenta característica de espectro de sólido e não de espectro de solução homogênea, isto é, ainda existe alargamento de linha.

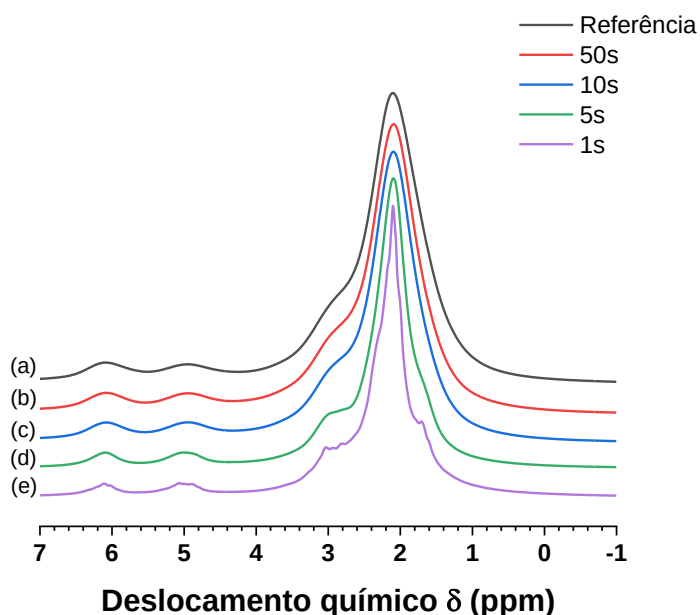
Como mencionado anteriormente, também se avaliou o efeito da potência de desacoplador (DEC) e do tempo de reciclagem (RD) nos espectros de RMN de ^1H de uma amostra de MC. A Figura 30 apresenta os espectros da MC após 30 minutos de irradiação, por 50 ms na frequência de RMN de ^1H com 70 W e RD variável (Figura 29). Os tempos de repetição foram de 1, 5, 10 e 50 segundos.

Figura 29. Experimento para avaliação do efeito da potência de desacoplador (DEC) e tempo de reciclagem (RD) para espectros de RMN de ^1H em amostra de MC. Os valores dos tempos de RD utilizados foram: 1, 5, 10 e 50 s.



Fonte: Autoria própria

Figura 30. Espectros de RMN de ^1H , entre -1 e 7 ppm, obtidos sem rotação. O espectro (a) é referente a amostra sem passar pelo processo de irradiação e é considerado o espectro de referência. Os demais espectros foram adquiridos após amostra ser irradiada por 30 minutos, na frequência de RMN de ^1H com 70 W. Durante esses 30 minutos o desacoplador foi ligado por 50 ms com tempos de repetição de: b) 50 s, c) 10 s, d) 5 s e e) 1 s.



Fonte: Autoria própria

Como se pode ver os espectros para os RD de 50 e 10 segundos (Figuras 30b e 30c respectivamente) não apresentaram variações com relação àquele de referência, obtido sem irradiação da amostra (Figura 30a). Contudo, com RD equivalente a 5 s (Figura 30d), percebe-se a diminuição da largura de linha, indicativo de fusão da amostra. Para RD de 1 s (Figura 30e) a diminuição da largura de linha é ainda mais perceptível e tem uma melhor separação de linhas. Assim, pode-se entender que maiores valores de RD são indicados para análises a fim de evitar a fusão da amostra.

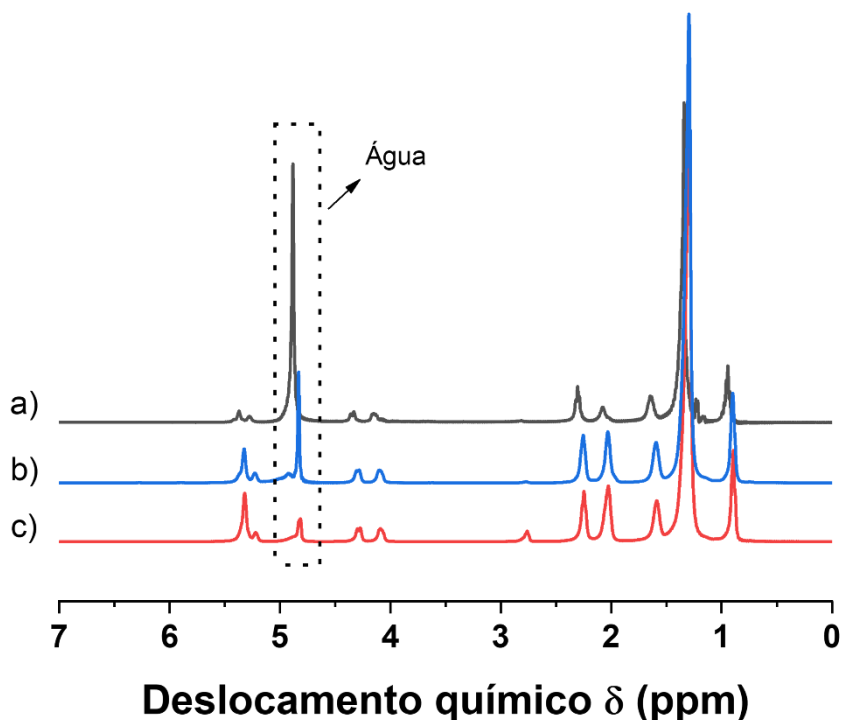
Desta forma, o aquecimento da amostra pode ser minimizado pela longa duração do tempo de reciclagem, ou seja, o tempo de espera entre a aquisição de um *scan* e outro, e pela rotação da amostra em baixa velocidade, 3 kHz, por exemplo. Neste caso, entretanto, os espectros de ^1H não podem ser utilizados para fazer avaliação quantitativa de quanto a MC se liquefaz por efeitos de MAS ou DEC. Assim, se fez necessário estudar esses efeitos através de RMN quantitativo (RMNq) de ^{13}C ,

como será visto em seções adiante. Prévio a isso, destaca-se a avaliação da variação de temperatura experimentada pela amostra devido aos efeitos desses mesmos fatores.

4.2. Determinação da variação de temperatura da amostra de manteiga comercial sem sal em função de MAS e DEC

A determinação da variação de temperatura da amostra em função da frequência de rotação e potência de desacoplamento não é possível para a amostra de manteiga de cacau, visto que esta não possui nenhum sinal cujo deslocamento químico se altere conforme a mudança de temperatura. Contudo, existem outras amostras de TAG sólidos que permitem a determinação de sua temperatura, como é o caso de manteiga comercial, gordura suína e gordura bovina, cujos espectros estão na Figura 31.

Figura 31. Espectros de ^1H de amostras de manteiga comercial sem sal (a), gordura bovina (b) e gordura suína (c) com destaque ao sinal referente a água presente nas amostras.

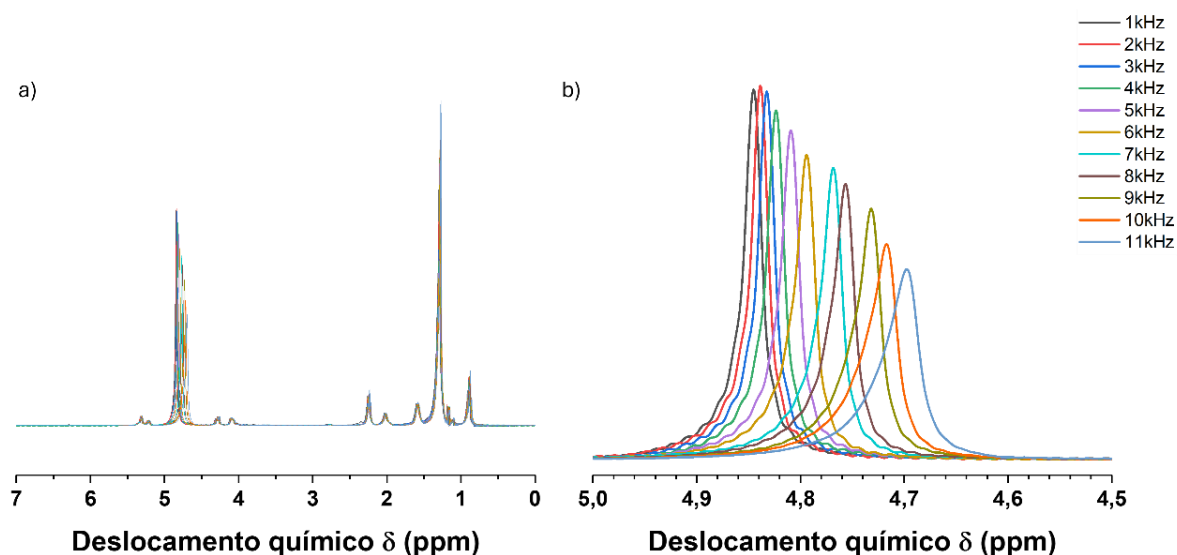


Fonte: Autoria própria

A diferença entre a manteiga de cacau e as outras amostras exemplificadas é a presença de água, a qual possibilita a determinação da temperatura da amostra. Isso é viável devido à alteração de deslocamento químico desse sinal conforme a temperatura; ocorre uma variação de $0,0090 \pm 0,0005 \text{ ppm } ^\circ\text{C}^{-1}$ (DVINSKIKH; CASTRO; SANDSTRÖM, 2004). Assim, pode-se acompanhar a alteração de temperatura sofrida pela amostra, devido à utilização de MAS e DEC. Averiguou-se tal mudança para a amostra de manteiga comercial sem sal.

A Figura 32 mostra a variação do deslocamento químico do sinal referente à água presente na amostra de manteiga comercial sem sal em função da frequência de rotação. É importante destacar que o experimento foi realizado de forma análoga aos experimentos de aquisição de espectro de ^1H para a manteiga de cacau, ou seja, o espectro foi adquirido após 30 minutos de rotação do rotor na frequência indicada, a fim de se atingir temperatura estável por toda a amostra. Note, contudo, que para o caso desse experimento, as aquisições foram realizadas com as amostras ainda em rotação na frequência indicada.

Figura 32. Espectro de ^1H em diferentes frequências de rotação (a) e janela espectral referente ao sinal da água (b).



Fonte: Autoria própria

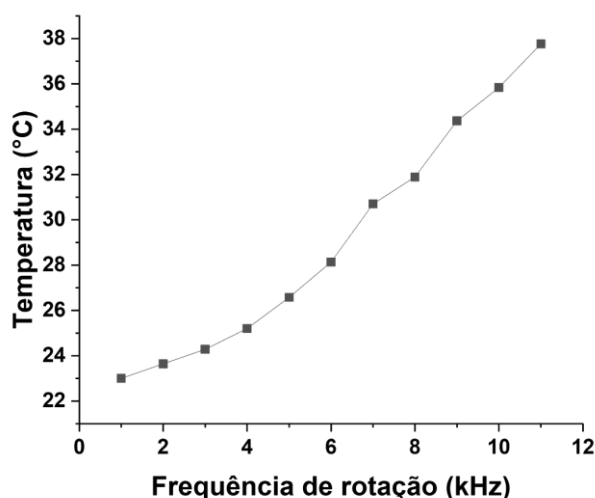
Como se pode perceber, a sobreposição dos espectros obtidos em diferentes frequências de rotação resulta em espectro idêntico, exceto pelo sinal na região de

4,8 ppm, ou seja, o sinal referente à água, que sofre deslocamento para a direita conforme aumenta a frequência de rotação. Isso é explicado pelo aumento de temperatura sofrido pela amostra, justificado pelo atrito entre o rotor e o gás, o que é responsável pelo aquecimento da amostra conforme se aumenta a frequência de rotação.

O equivalente acontece para a potência de desacoplamento. Os experimentos de aquisição de espectros de ^1H para diferentes valores de tempo de reciclagem passam por 30 minutos sob irradiação de pulso de rf com potência de 70 W, para se assemelhar ao sistema de desacoplamento para sequências de aquisição de espectros de ^{13}C , como já visto na Figura 29. Para estes experimentos também se observou a variação no deslocamento químico do sinal referente à água. O aumento de temperatura para este caso é justificado pelo acúmulo de energia provido por pulsos de rf, que não é dissipado para valores baixos de tempo de reciclo.

A literatura descreve que o sinal de água no espectro de ^1H desloca aproximadamente $0,01 \text{ ppm } ^\circ\text{C}^{-1}$, como já mencionado. A partir desta relação, consegue-se calcular a variação de temperatura da amostra, considerando que esta está a princípio na temperatura ambiente do laboratório, que, no caso, é de 23°C . Esta variação de temperatura é visualizada na Figura 33.

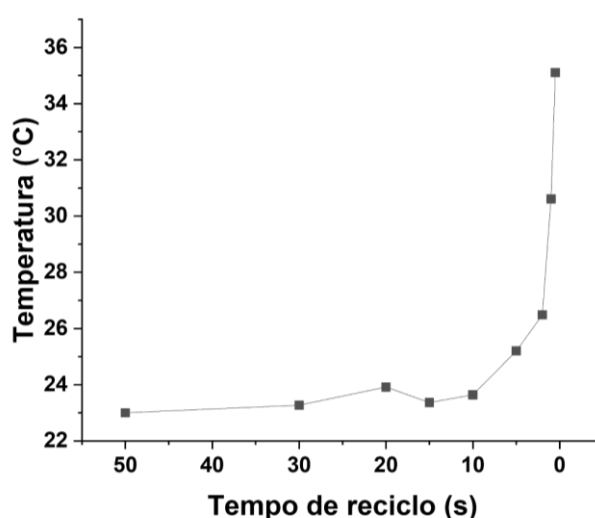
Figura 33. Variação da temperatura da amostra de manteiga comercial sem sal em função da frequência de rotação do rotor.



Note que para a amostra de manteiga comercial sem sal houve um acréscimo de temperatura em forma quase linear com relação ao aumento de frequência de rotação, o que levou a uma variação de quase 15°C, atingindo na rotação de frequência 11 kHz a temperatura de 37,8°C. Apesar da amostra não ser equivalente a manteiga de cacau e, portanto, não se pode dizer que as temperaturas atingidas são as mesmas, é possível utilizar esses dados para afirmar que um aumento de temperatura similar é também observado para manteiga de cacau, quando esta é analisada em altas frequências de rotação, logo, a amostra, em especial a manteiga de cacau devido à sua faixa de fusão, se liquefaz. A liquefação da amostra resulta em variação espectral não desejada, como já demonstrado anteriormente, o que, por sua vez, leva à determinação errônea de propriedades físico-químicas da amostra sólida ao não se atentar a essa fonte de aquecimento.

Estudo análogo pôde ser realizado para a alteração de temperatura em função da potência de desacoplamento. Como já visto, tanto a potência quanto o tempo de reciclo são fatores que resultam em aquecimento da amostra, contudo, enquanto se pode alterar o parâmetro de aquisição do tempo de reciclo, não é recomendado diminuir a potência de desacoplamento, visto que isto resultaria em perda de resolução nos espectros, devido às interações dipolares entre os átomos ^1H - ^{13}C . A influência do tempo de reciclo na temperatura pode ser vista na Figura 34.

Figura 34. Variação da temperatura da amostra de manteiga comercial sem sal em função do tempo de reciclo entre os *scans*.

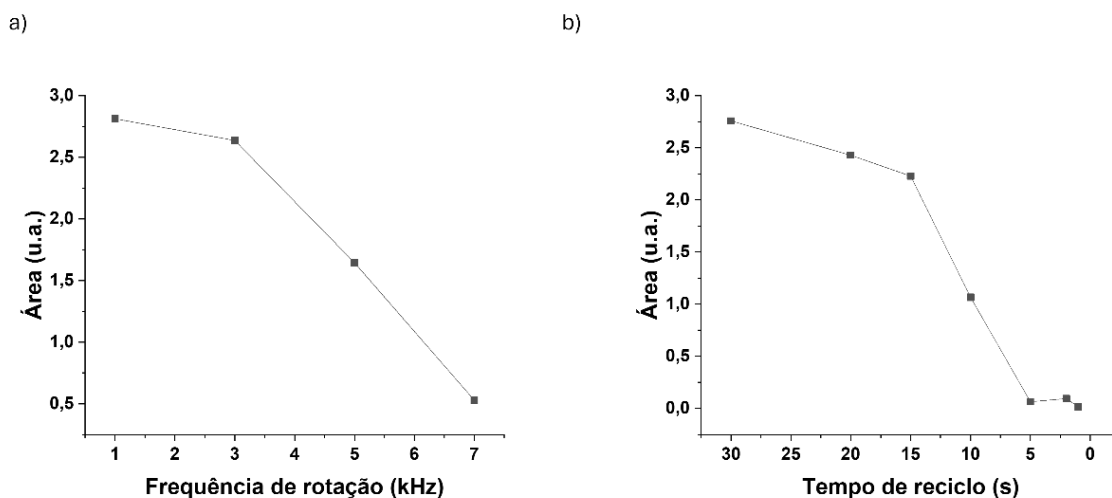


Fonte: Autoria própria

Note na Figura 34 que o aumento de temperatura em função do tempo de reciclo não segue uma característica linear, mas sim uma característica exponencial, na qual quanto menor o tempo de reciclo, maior será a temperatura da amostra. A variação de temperatura observada neste experimento foi de aproximadamente 13,5°C, atingindo 36,45°C para tempo de reciclo equivalente a 0,5 s. Essa variação de temperatura similarmente resultaria no aquecimento e liquefação da amostra de manteiga de cacau.

A fim de demonstrar que os efeitos de MAS e DEC responsáveis pelo aquecimento da amostra podem ser acompanhados a partir da variação de área do sinal em espectros de ^{13}C , utilizou-se a sequência CPMAS para a obtenção dos espectros de ^{13}C para a manteiga comercial sem sal. De forma análoga ao estudo realizado para a averiguar a variação de área da MC, fez-se para a amostra em questão. Os resultados estão na Figura 35.

Figura 35. Variação de área do sinal referente a porção sólida da amostra de manteiga comercial sem sal (34 ppm) como função da variação de (a) frequência de rotação e (b) tempo de reciclo.



Fonte: Autoria própria

Considerando o aumento de temperatura ocasionado pelo aumento da frequência de rotação, a amostra sofre liquefação e, portanto, a concentração do material sólido diminui, como observado na Figura 35a. O equivalente é observado na Figura 35b para o caso da variação de tempo de reciclo, quanto menor este for, maior o aquecimento causado, logo, maior a liquefação e, portanto, a concentração de material sólido diminui.

Assim, pode-se utilizar a variação de área como indicativo do aquecimento e liquefação da amostra de manteiga de cacau, visto que esta não tem sinal que varia conforme a temperatura da amostra.

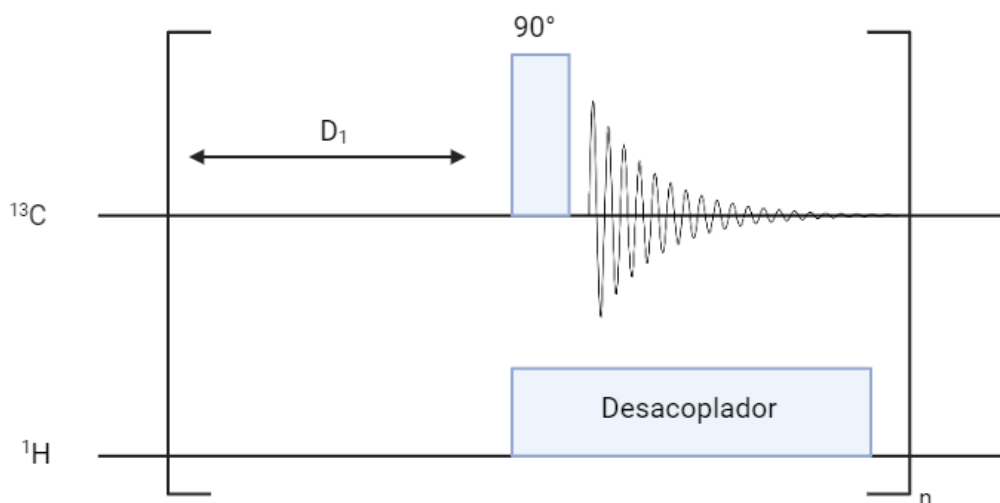
4.3. Análise da frequência de rotação e DEC nos espectros de RMN de ^{13}C de manteiga de cacau obtidos por sequência HPDEC

Para fazer análises quantitativas por RMN de ^{13}C usando a excitação direta da transição dos ^{13}C usando a sequência HPDEC (Figura 36), foi necessário determinar os valores de T_1 da amostra de MC. Isso é necessário para determinar qual deve ser o tempo de reciclagem (RD) da sequência ($\text{RD} \sim 5T_1$), que corresponde ao retorno de 99,33% da magnetização à condição de equilíbrio termodinâmico. Ou seja, um erro de até 0,67%.

4.3.1. Determinação da constante de tempo T_1 de ^{13}C da amostra de MC

A melhor sequência de pulsos para determinar T_1 é a Inversão-Recuperação (IR). No entanto, a medição com essa sequência é a mais longa, visto que é necessário esperar um tempo de pelo menos $5T_1$ entre cada aquisição. Como se sabe que os valores de T_1 dos ^{13}C de sólido orgânicos são bem mais longos do que os do ^1H , uma análise de T_1 por IR não é interessante. Por isso, utilizou-se inicialmente uma sequência mais rápida de medição de T_1 conhecida como Saturação Progressiva (SP), descrita na Figura 36. Essa sequência consiste em pulsos de 90° separados por tempo repetição ($\text{TR} = \text{AQ} + \text{D1}$). Usa-se essa sequência em experimentos com diferentes valores de D1 ou RD. Com isso, pode-se determinar o valor de T_1 , fazendo-se uma curva da variação de área do sinal em função do D1 ou RD.

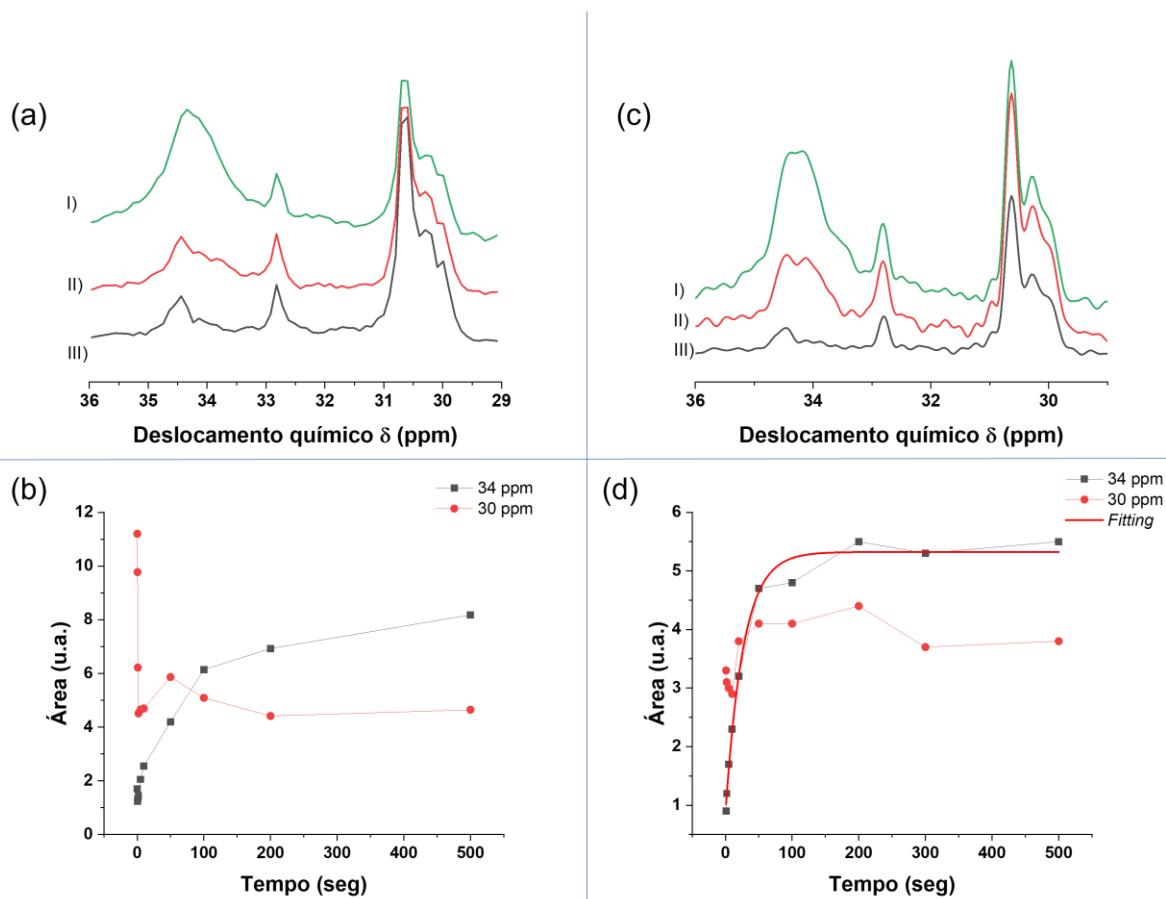
Figura 36. Representação esquemática do experimento de Saturação-Progressiva, no qual o valor de D_1 é variável.



Fonte: Autoria própria

Na Figura 37a, observa-se os espectros de ^{13}C entre 36 e 29ppm, correspondente à região dos grupos $(\text{CH}_2)_n$, sólidos e líquidos, em 34 e 30 ppm, respectivamente. Nesta figura são mostrados apenas os sinais adquiridos com D_1 de 500 (I), 10 (II) e 1 s (III). No caso do sinal de sólidos, pode-se ver, como esperado, que há aumento da área do sinal com o aumento de D_1 . No entanto, com o componente líquido, acontece o contrário, há diminuição da área com o aumento de D_1 . Esses dois efeitos podem ser mais bem observados na Figura 37b que mostra a variação de área dos dois sinais em função do tempo de D_1 . O sólido apresenta um crescimento similar a uma exponencial, sem atingir um máximo mesmo em 500 s, enquanto o sinal do componente líquido apresenta um rápido decréscimo e depois atinge um plateau.

Figura 37. Resultado do experimento de SP para amostra de MC: a) espectros de ^{13}C com D1 de 500 (I), 10 (II) e 1 s (III), janela espectral 36 – 29 ppm adquiridos com D1 em ordem crescente; b) área (u.a.) vs. tempo (s) para o deslocamento químico 34 ppm e 30 ppm para espectros visualizados em (a); c) espectros de ^{13}C com D1 de 500 (I), 10 (II) e 1 s (III), janela espectral 36 – 29 ppm adquiridos com D1 em ordem decrescente; d) área (u.a.) vs. tempo (s) para o deslocamento químico 34 ppm e 30 ppm para espectros visualizados em (c), juntamente com *fitting* mono-exponencial para o gráfico referente ao sinal em 34ppm.



Fonte: Autoria própria

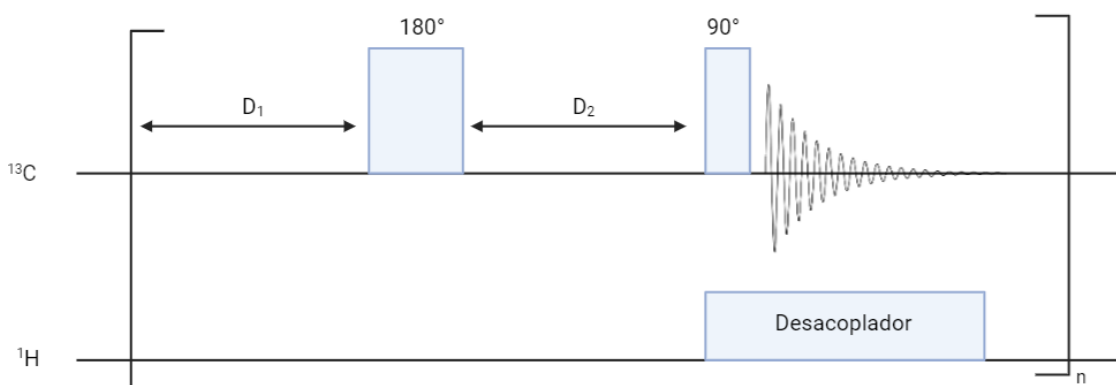
A explicação para essa redução na amplitude do sinal do componente líquido pode ser atribuída ao aquecimento da amostra (fusão) causado pela potência do desacoplamento utilizada e para os valores de D1 curtos. Essa grande variação de área também pode ser explicada por esse experimento ter sido realizado em ordem crescente de D1. Com isso, a amostra aqueceu e liquefez nos primeiros experimentos, com D1 curtos, menores do que 10 s. Por isso, observa-se sinal em 30 ppm com áreas grandes nesses tempos curtos, nos quais não há tempo para a amostra trocar calor com o ambiente, enquanto para D1 maior que 10 s, em que há tempo hábil para isso, a área não é tão grande. Com isso não foi possível obter um valor preciso de T_1 , pois a concentração do componente líquido se altera com o valor de D1.

Com o intuito de verificar se tal hipótese era verdadeira, o experimento foi repetido, mas, agora, em ordem decrescente do valor de D_1 . Os espectros, análogos àqueles indicados na Figura 37a, e as áreas dos sinais em função de D_1 podem ser visualizados nas Figuras 37c e 37d, respectivamente. Nesse caso, ambos os sinais se tornam mais intensos com o aumento de D_1 . Nota-se, contudo, que a intensidade do sinal na região de 30 ppm para valores de D_1 menores que 10 s volta a aumentar, o que contribui para a explicação dada anteriormente, ou seja, há fusão da amostra para pequenos valores de D_1 .

Por essa variação na curva do sinal em 30 ppm para D_1 menores que 10 s, o ajuste da curva do sinal nesta região foi feito a partir desse tempo, ou seja, desconsiderou-se os dados para valores de D_1 menores que 10 s. Com o ajuste, obteve-se T_1 correspondente a 6 s. Já o ajuste exponencial do sinal em δ 34ppm apresentou $T_1 = 30$ segundos.

Para obter valores de T_1 mais precisos e evitar a fusão parcial da amostra, fez-se também a determinação do T_1 pelo método de Inversão-Recuperação (IR). Nessa sequência (Figura 38), usa-se um pulso de 180° , na ressonância do ^{13}C , seguido de um tempo D_2 variável e um pulso de 90° , após o qual há aquisição conjuntamente com o desacoplamento em alta potência do ^1H .

Figura 38. Representação esquemática do experimento de Inversão-Recuperação, no qual o valor de D_2 é variável.



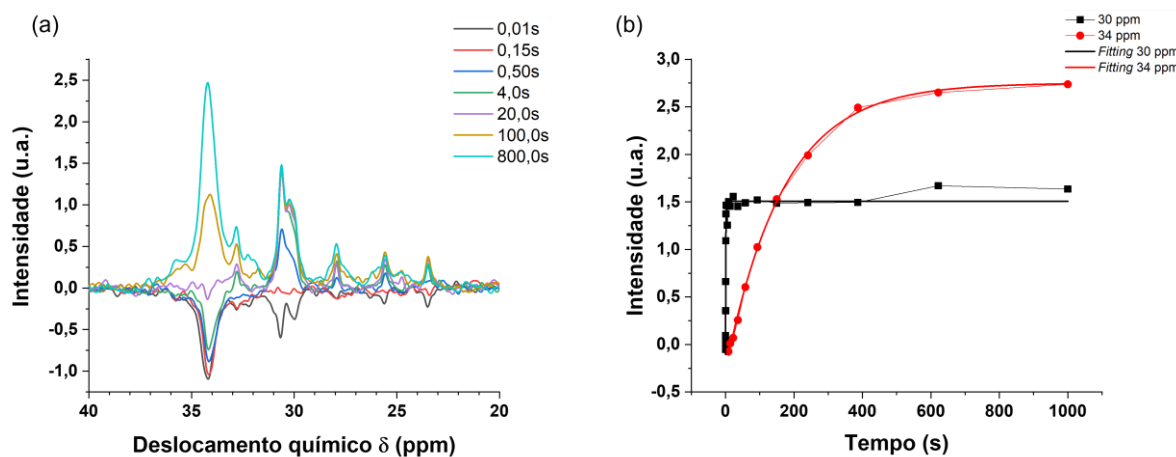
Fonte: Autoria própria

Na Figura 39a estão os sinais do IR, pode-se ver que para valor de 0,01s tanto o sinal em 34 e 30 ppm estão negativos. Com RD de 0,15 s se percebe uma diminuição

na intensidade do sinal em 34 ppm e o sinal em 30 ppm fica nulo. Pode-se estimar o valor de T_1 usando-se esse tempo do ponto nulo (PN), através da equação $T_1 = \frac{PN}{\ln 2}$, que corresponde a 0,22 s. Para RD de 0,5 s, o sinal em 30 ppm fica positivo enquanto o sinal em 34 ppm ainda está negativo. Para RD de 4,0 s, o sinal em 33 ppm ao lado do sinal de sólidos já está positivo confirmando que ele é referente ao grupo CH_2 do componente líquido. Em RD de 20 s, o sinal de sólido fica perto do valor nulo, e, a partir deste, estima-se que o valor de T_1 é da ordem de 30 s. Com RD de 100,0 s, ambos os sinais já estão positivos, mas a área do sinal do sólido está menor do que a do sinal em 30 ppm. Com RD de 800,0 s o sinal de sólido atinge valor máximo, bem maior do que o sinal em 30 ppm.

Na Figura 39b estão os ajustes exponenciais tanto para o sinal líquido (preto) quanto para o componente sólido (vermelho). O componente líquido apresentou ajuste para curva indicando um $T_1 = 0,70$ s. O ajuste exponencial do sinal do componente sólido apresentou um T_1 de 169,0 s, ou seja, para amostras que podem fundir devido a potência do DEC em valores de RD curtos, o IR tem que ser usado para não se chegar a valores errôneos.

Figura 39. Resultado do experimento de IR para amostra de MC: a) espectros de ^{13}C com D2 de 0,01; 0,15; 0,50; 4,0; 20,0; 100,0; 800,0 s, janela espectral 40 – 20 ppm adquiridos com D1 de 800,0 s; b) intensidade (u.a.) vs. tempo (s) para o deslocamento químico 34ppm e 30ppm para espectros visualizados em (a).



Fonte: Autoria própria

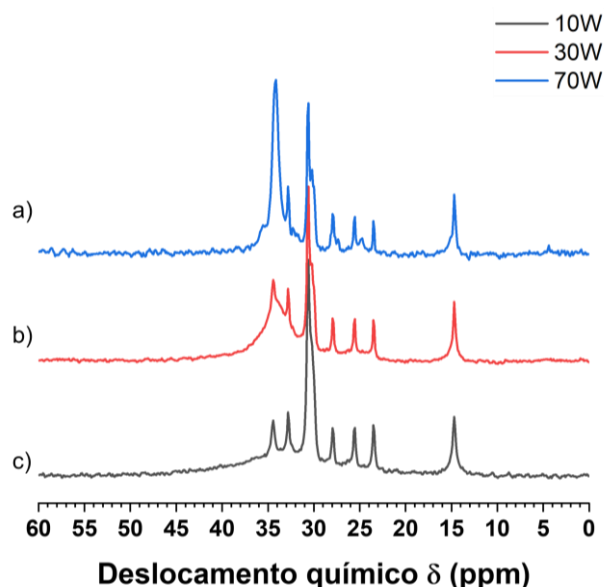
4.4. Avaliação da influência da DEC e MAS na razão sólido/líquido de amostra de manteiga de cacau por RMNq de ^{13}C

Nas seções anteriores foram discutidas a influência de parâmetros de aquisição para sequências CPMAS e *one-pulse*. A sequência CPMAS, como já mencionado, não é uma sequência quantitativa, pois é baseada na transferência de polarização entre os núcleos. Já a sequência *one-pulse* não fornece informações que permitam a diferenciação entre as porções sólida e líquida da amostra. Visando obter espectros com informações quantitativas a respeito dessas porções, utilizou-se a sequência HPDEC, que é uma sequência de um pulso de excitação no ^{13}C , com desacoplamento de alta potência (DEC) e rotação da amostra no ângulo mágico e com valor de RD suficientemente longo, de pelo menos 5 vezes o valor de T_1 , para que pelo menos 99,33% da magnetização retorne ao eixo z. Para isso, utilizou-se o valor de T_1 determinado experimentalmente, o qual foi tratado na seção anterior.

De forma análoga à sequência CPMAS, foram estudados os efeitos causados tanto pela variação de potência aplicada ao canal de ^1H , quanto aqueles causados pela frequência de rotação.

Novamente, a potência é um fator importante, pois pode causar aquecimento da amostra, além disso, para o caso da sequência HPDEC, a utilização de potências muito altas pode provocar danos ao aparelho. O efeito da potência nos espectros pode ser visualizado na Figura 40.

Figura 40. Espectros de ^{13}C , em diferentes potências, para amostra de MC, medido com velocidade de 3 kHz. A sequência utilizada, HPDEC, permite variação no parâmetro de potência do desacoplador no canal de ^1H . As diferentes potências aplicadas foram (a) 70 W, (b) 30 W e (c) 10 W.



Fonte: Autoria própria

O desacoplador visa eliminar os efeitos da interação dipolar entre os spins em estudo, no caso ^1H e ^{13}C . Essa interação é significativa para substâncias em estado sólido, mas não para substâncias líquidas. Como a amostra em estudo tem componentes em ambos os estados, pode-se acompanhar a eficiência de desacoplamento com a variação da potência.

Para potências baixas, a interação dipolar não é suficientemente eliminada, assim, o sinal obtido referente à porção sólida não será favorecido, enquanto o sinal referente à porção líquida se mostrará intenso. Característica observada para o espectro da Figura 40c adquirido com 10 W. É válido ressaltar que esse espectro possui baixa resolução, visto que principalmente o sinal referente à porção sólida da amostra tem a característica de banda larga.

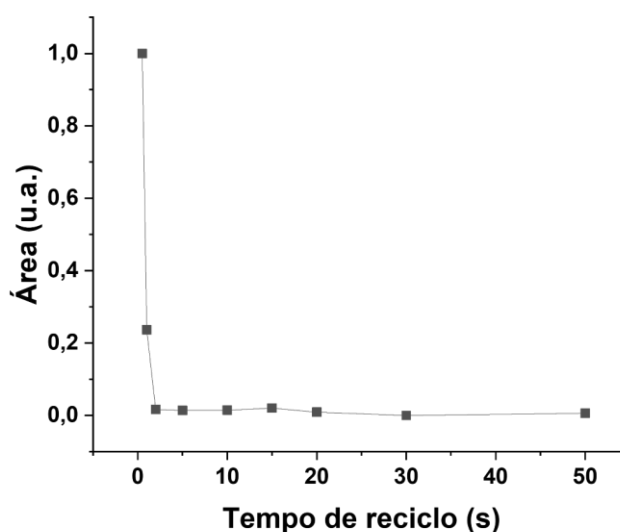
Com o aumento da potência, a interação dipolar começa a ser reduzida, assim, o sinal sólido passa a estar presente. Uma potência média elimina parte da interação dipolar, logo, o sinal que era visível na forma da banda larga, passa a ter resolução suficiente para aparecer como um pico. O experimento realizado em 30W (Figura 40b) demonstra essa observação, pois tanto o sinal em deslocamento δ 30ppm quanto aquele em deslocamento δ 34ppm passam a ser observados.

Conforme o aumento da potência, a contribuição do sinal em deslocamento δ 34 ppm passa a aumentar, ou seja, há melhora na resolução espectral, como pode ser percebido pela comparação entre os espectros obtidos com potência de 70 W (Figura 40a).

Esses resultados são concordantes com aqueles apresentados para os sinais obtidos utilizando a sequência CPMAS. De forma geral, a aplicação de baixas potências de desacoplamento da interação dipolar entre ^1H e ^{13}C , resultam em espectros de baixa resolução, bem como sinais referentes à porção sólida do material com baixa intensidade para o caso da sequência HPDEC.

Em se tratando do aquecimento causado pela aplicação de DEC, tem-se, também, que considerar o fator tempo de reciclagem. Como visto para CPMAS e *one-pulse*, o tempo de reciclagem curto leva ao maior aquecimento da amostra quando comparado a tempos longos de reciclagem, isso porque a amostra não tem tempo suficiente para dissipar a energia fornecida entre um pulso e o seguinte, logo, o acúmulo de energia leva ao aquecimento e possível fusão do material. Para este estudo, acompanhou-se a variação do sinal referente à porção líquida, 30 ppm, em função do tempo de reciclo (Figura 41).

Figura 41. Variação da área do sinal referente a porção líquida (30 ppm) da amostra de MC, obtido a partir do espectro de ^{13}C adquirido com a sequência HPDEC, em função do tempo de reciclo.

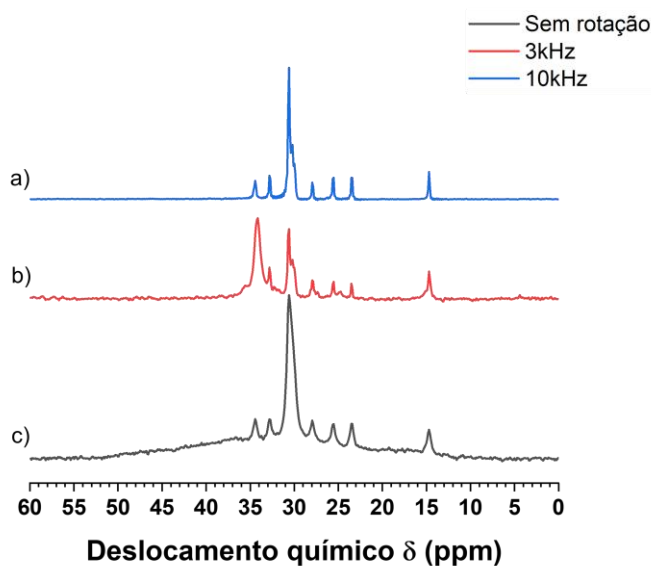


No gráfico acima (Figura 41), acompanha-se a variação da área referente à porção líquida dos TAGs da MC. Perceba para curtos tempos de reciclo que a concentração do material referente à porção líquida é alta, contudo, para longos tempos de reciclagem, a concentração da mesma porção é menor e constante, ou seja, é indicado utilizar um RD de ao menos 2 s para que não se observe a liquefação da amostra, que resultará no aumento da concentração do material líquido.

É importante destacar que o tempo de reciclagem necessário para evitar o aquecimento da amostra para a sequência CPMAS, como visto na Figura 26, é maior do que para HPDEC. Isso acontece porque na sequência CPMAS existe o tempo de contato, no qual ambos os canais, de ^1H e ^{13}C , estão sob irradiação, a fim de atingir a condição de Hartmann-Hahn, para que haja a transferência de polarização, o que não é presente para a sequência HPDEC, ou seja, a energia fornecida durante a aquisição de espectro de ^{13}C por HPDEC é menor do que aquela fornecida para a aquisição realizada por CPMAS.

Considerando a frequência de rotação do rotor, para os experimentos utilizando 3 kHz, tem-se que a amostra não se liquefaz, como demonstrado pelos experimentos apresentados nas Figuras 23 e 28. Contudo, é interessante observar como a velocidade interfere nas características espectrais para a sequência HPDEC, utilizando a potência que apresentou melhor resultado de desacoplamento da interação dipolar. O efeito de MAS no espectro pode ser visualizado na Figura 42.

Figura 42. Espectro de ^{13}C , em diferentes frequências de rotação, para amostra de MC, medido com potência de 70 W. As diferentes velocidades aplicadas foram (a) 10 kHz, (b) 3 kHz e (c) sem rotação.



Fonte: Autoria própria

O espectro obtido com frequência de rotação de 3 kHz (Figura 42b) apresenta os sinais em ambos os deslocamentos, δ 30ppm e δ 34ppm, isto é, as componentes líquida e sólida. Por serem obtidos da sequência HPDEC, pode-se utilizar de suas áreas para calcular valores de SFC, como será apresentado em seção posterior.

As duas frações, líquida e sólida, também estão presentes no espectro obtido com o rotor parado (Figura 42c), contudo, o sinal referente à porção sólida é uma banda larga, isso implica dizer que tal espectro tem baixa resolução.

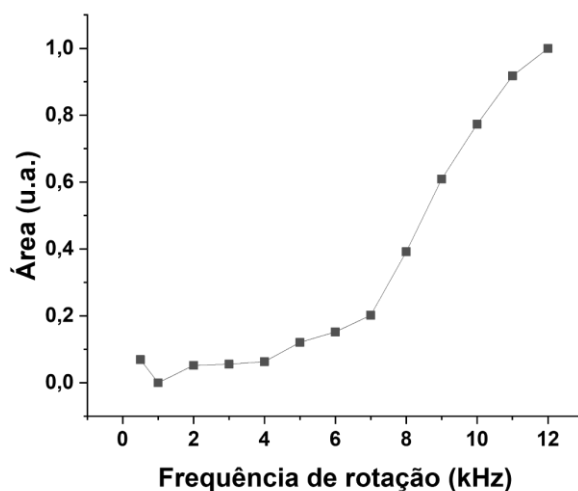
Para o experimento realizado em 10 kHz (Figura 42a), percebe-se a presença do componente líquido da amostra (deslocamento δ 30ppm), contudo o componente sólido quase não está presente. Como mencionado anteriormente, a sequência HPDEC resulta em sinais proporcionais às concentrações da amostra, assim, pode-se entender o resultado obtido como função da fusão desta quando rotacionada em tal velocidade, o que é suportado pelos espectros de ^1H apresentados na Figura 28.

Se comparado aos resultados obtidos com velocidade de rotação de 10 kHz utilizando sequência CPMAS e HPDEC, se torna evidente que o sinal intenso relativo ao componente sólido no espectro de CPMAS é resultado da transferência de

polarização, a qual é muito efetiva para componentes sólidos, que possuem forte interação dipolar.

Pode-se também acompanhar a variação da concentração da porção líquida da manteiga de cacau a partir da variação da frequência de rotação (Figura 43). De forma contrária ao que foi observado na Figura 24, a concentração da porção móvel de TAGs da MC aumenta conforme se aumenta a frequência de rotação. A justificativa, contudo, mantém-se: a fricção entre o gás e o rotor leva ao aquecimento da amostra conforme progride a frequência de rotação, este é suficiente para fazer com que a amostra passe por fusão, visto que a faixa de fusão da MC, de 17,3°C até 36,3°C, não tem temperaturas altas. Uma vez fundida, a porção sólida passa a contribuir para a concentração da porção líquida, logo aumenta a concentração desta última.

Figura 43. Variação da área do sinal referente a porção líquida (30 ppm) da amostra de MC, obtido a partir do espectro de ^{13}C adquirido com a sequência HPDEC, em função da frequência de rotação.



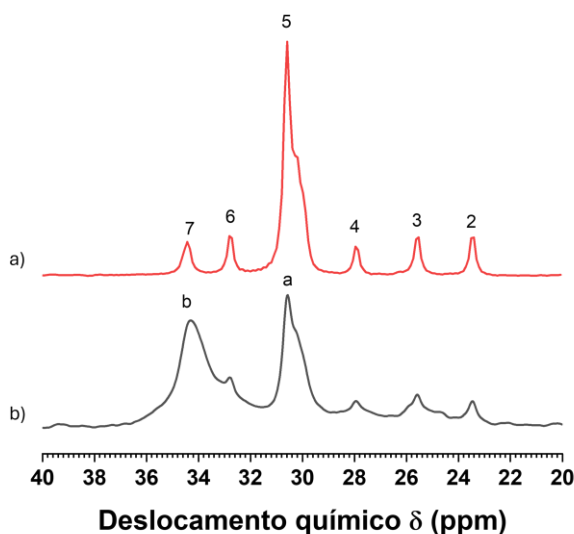
Fonte: Autoria própria

4.5. Descrição do método de determinação de SFC por espectro ^{13}C obtidos por RMN-ES

No presente trabalho, também, desenvolveu-se um novo protocolo, o qual permite a avaliação do teor de gordura no estado sólido, isto é, SFC, utilizando a Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido (RMN-ES) de ^{13}C . Para isso, usou-

se os sinais da amostra de MC correspondentes aos componentes líquido (30 ppm) e sólido (34 ppm). Na Figura 44 estão os espectros, obtidos com a sequência HPDEC, de RMN de ^{13}C , entre 20 e 40 ppm, da MC líquida (a), a cerca de 40°C, e da MC com componentes sólido e líquido (b), a cerca de 23°C. Na Figura 44a, pode-se ver o sinal intenso em 30 ppm (5), relativo aos grupos $(\text{CH}_2)_n$, e os sinais 2, 3, 4, 6 e 7 relativos aos outros carbonos da MC (discutidos no item 4.0., com relação à Figura 22). Na Figura 44b, pode-se ver o sinal $(\text{CH}_2)_n$ tanto em 34 ppm (componente sólido), quanto em 30 ppm (componente líquido) para a amostra de MC, além disso, observa-se os sinais 2, 3, 4 e 6 da Figura 44a, no entanto, o sinal 7 não é observado, pois este está sobreposto pelo sinal do componente sólido em 34 ppm.

Figura 44. Espectros de RMN de ^{13}C dos componentes líquidos (a) e componentes sólidos e líquidos (b) da MC para identificação dos sinais sobrepostos pelo sinal da porção rígida do TAG (34 ppm), que devem ser corrigidos no cálculo de SFC seguindo o método HPDEC.



Fonte: Autoria própria

Com isso, para o cálculo do valor de SFC é necessário a correção da área do sinal de ^{13}C da fração sólida, em 34 ppm, a fim de retirar a contribuição dos sinais 6 e 7. Para essa correção, usa-se a Equação 11, na qual a área do sinal em 34 ppm corrigida (A_c) é a área desse sinal menos 2/3 das áreas dos sinais laterais 2, 3 e 4 (A_{laterais}).

$$A_c = A_{34\text{ppm}} - \frac{2}{3}A_{\text{laterais}} \quad \text{Equação 11}$$

Com essa correção, o valor de SFC pode ser calculado com a Equação 12, na qual a área corrigida (A_c) é dividida pela área total do grupo $(CH_2)_n$, que corresponde à soma da área do sinal em 34 ppm corrigida (A_c) e da área do sinal em 30 ppm (A_{30ppm}).

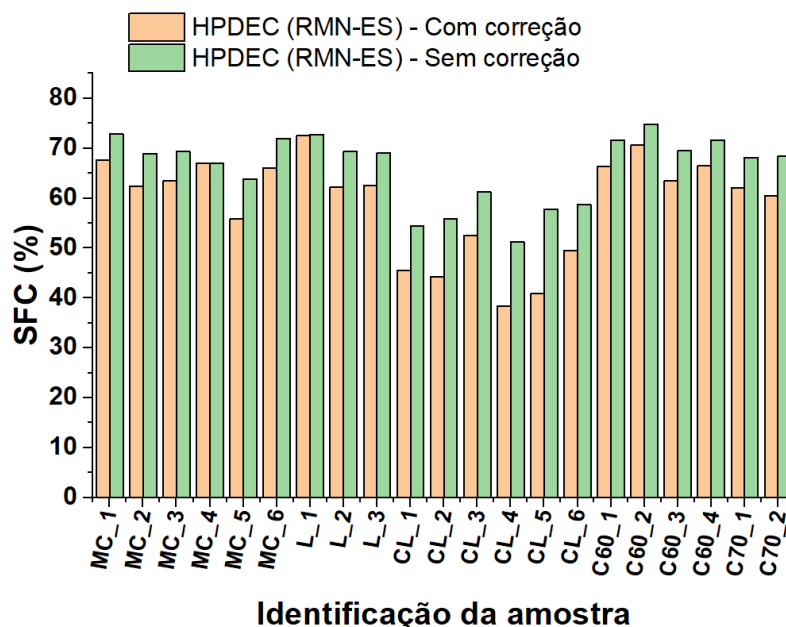
$$SFC (\%) = \frac{A_c}{A_c + A_{30ppm}} \quad \text{Equação 12}$$

Contudo, para que esta determinação seja possível é necessário utilizar as condições de aquisição em que a amostra não aqueça, que são: FR = 3 kHz e DEC 70 W e RD > 10 s. Além disso, é necessário obter espectros de forma quantitativa utilizando a sequência HPDEC. Para ser uma análise quantitativa, usando pulsos de 90°, é necessário esperar um tempo de reciclagem equivalente à pelo menos $5T_1$. Como o T_1 da fração sólida da MC é 169 s (Figura 39), é necessário esperar um tempo RD de 850 s, o que equivale a aproximadamente 14 minutos, para, então, fazer uma nova varredura. Como é necessário adquirir um grande número de *scans*, o tempo total de análise pode ser de até algumas horas. A fim de diminuir o tempo da análise, mantendo a mesma razão sinal ruído, passou-se a usar pulso de apenas 30°. Com isso, calculou-se o valor de RD, seguindo a Equação 13, conhecida como ângulo de Ernst (APPERLEY; HARRIS; HODGKINSON, 2012). Na Equação 13, tem-se que θ_E é o ângulo de Ernst. Para um ângulo de 30° o valor de RD foi de apenas 25 s.

$$\cos \theta_E = e^{-(RD)/T_1} \quad \text{Equação 13}$$

Na Figura 45 estão os valores de SFC sem subtração dos sinais 6 e 7, HPDEC (RMN-ES) – sem correção, e com a subtração desses sinais, HPDEC (RMN-ES) – com correção. Como se pode ver, os valores de SFC sem a correção são sempre maiores do que os valores corrigidos.

Figura 45. Comparativo entre os valores de SFC obtidos a partir de espectro ^{13}C por HPDEC, com e sem correção dos valores, devido a sinais que sobrepõem ao sinal referente à porção sólida em 34 ppm. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.



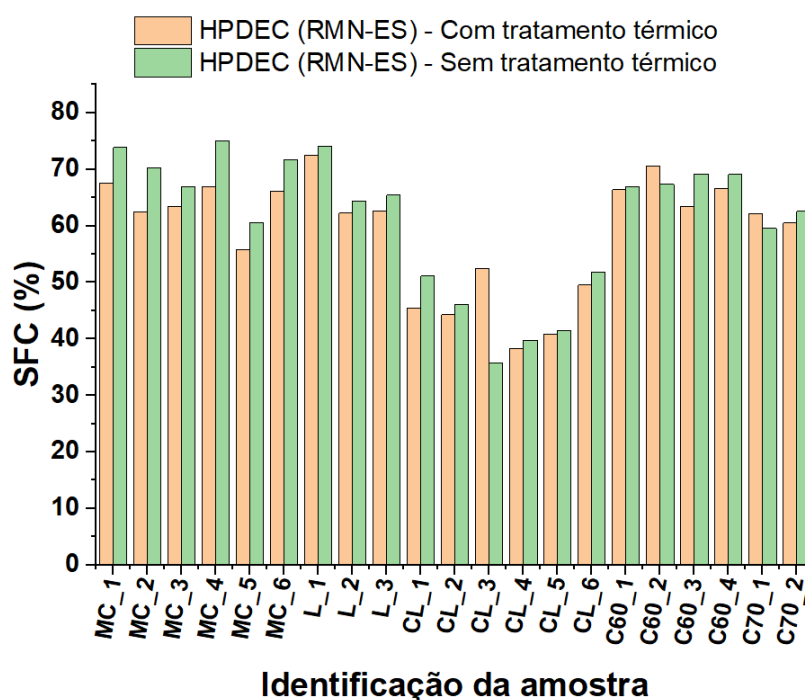
Fonte: Autoria própria

Fez-se, também, comparação dos valores de SFC, determinados por RMN de ^{13}C , para as mesmas amostras com e sem tratamento térmico. O tratamento térmico é usado para fundir a MC, ou outros produtos derivados da MC no caso do presente estudo, visando eliminar o histórico térmico da amostra e cristalizá-la de forma homogênea e controlada, uma vez que após a fusão, a amostra segue um processo de cristalização determinado pela ISO 8292-1 e ISO 8292-2 para amostras β estabilizadas.

Na Figura 46 estão os valores de SFC obtido através da sequência HPDEC para amostras de derivados de cacau (manteiga de cacau, liquor de cacau, chocolate ao leite, 60% e 70% de cacau) com e sem tratamento térmico prévio. Como o esperado, nesta figura, pode-se ver que as amostras após o tratamento térmico apresentaram menor valor de SFC. A exceção foi a amostra CL_3, a qual é uma amostra de chocolate ao leite, com 25% de substituição de leite. Esta substituição de leite pode ter afetado o processo de cristalização da amostra, observado no período desde sua temperagem até a análise.

Contudo, as diferenças entre os valores de SFC não são grandes e as diferenças observadas podem ser justificadas pela presença de diferentes estruturas cristalinas, visto que o tratamento térmico viabiliza a cristalização homogênea das amostras, enquanto àquelas que não passaram por tratamento térmico podem apresentar quaisquer estruturas polimórficas. Note, por exemplo, que as amostras que estavam há mais tempo em processo de cristalização, podem ter passado pela transição sólido-sólido de longa duração da forma β (V) para a forma β (VI). Assim, quando comparados os valores de SFC para a mesma amostra com e sem tratamento térmico, devido as diferentes estruturas cristalinas presentes nesta amostra, observa-se diferentes valores de SFC.

Figura 46. Comparativo dos valores de SFC obtido através da sequência HPDEC para amostras de derivados de cacau com e sem tratamento térmico. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.



Fonte: Autoria própria

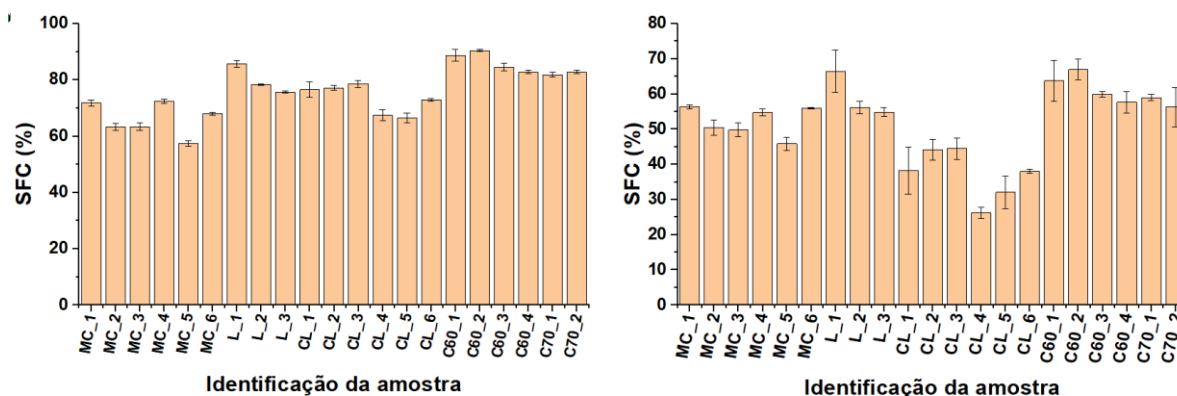
4.6. Comparação entre os valores de SFC obtidos por RMN-ES e RMN-DT (normas ISO)

Fez-se a comparação entre os valores de SFC determinado pela RMN-ES de ^{13}C e aqueles determinados seguindo os métodos de RMN-DT da ISO. A determinação do valor de SFC é usualmente realizada seguindo o protocolo da ISO 8292-1, para o método direto, e ISO 8292-2, para o método indireto (ISO/CD 8292-1, 2008; ISO/CD 8292-2, 2008). Como já descrito no item 1.4, tais métodos possuem limitações e isto leva à procura de melhores métodos de determinação de SFC.

A diferença entre os métodos ISO e o método proposto se dá ao fato de que os métodos ISO usam a determinação da quantidade de ^1H sólido e/ou líquido, o que depende do número de ligações duplas do ácido graxo. Ácidos graxos saturados, como o ácido esteárico, têm maior proporção de hidrogênio que ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico por exemplo. Para o método proposto, determina-se quantos grupos $(\text{CH}_2)_n$, nas frações sólida e líquida, estão presentes. Isso é independente da presença de saturação ou não.

Outras limitações dos métodos protocolados envolvem a precisão e exatidão das medidas, como já mencionado (DUYNHOVEN et al., 2002). Isso pode ser visto na Figura 47. Nesta figura, encontram-se os valores de SFC obtidos para as diferentes amostras de MC e derivados de cacau. Como se pode ver nesta figura, os valores de SFC determinados pelo método direto têm menores barras de erro, ou seja, é mais preciso do que o método indireto, o qual apresenta maiores barras de erros.

Figura 47. Comparativo entre valores de SFC após tratamento térmico, obtidos seguindo os protocolos ISO 8292-1 (a) e ISO 8292-2 (b) para amostras diferentes derivados de cacau. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.



Fonte: Autoria própria

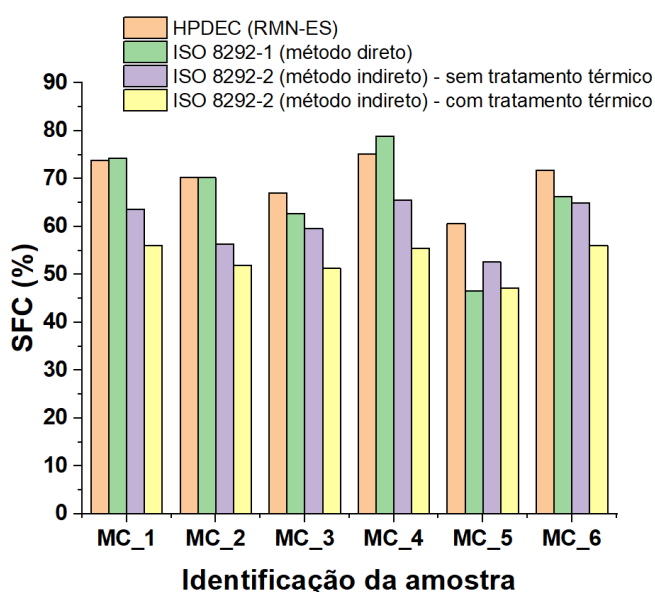
Segundo DUYNHOVEN et al. (2002), os valores de SFC determinados pelo método indireto são exatos, enquanto valores determinados pelo método direto não são exatos. Isso pode ser claramente observado, ao comparar os valores de SFC obtido por ambos os métodos, que se encontram na Figura 47. Para amostras de derivados de cacau do tipo liquor de cacau, chocolate ao leite e chocolates 60% e 70% de cacau, os valores de SFC determinados pelo método direto são muito maiores do que os determinados pelo método indireto. Isso é devido à presença de outros componentes sólidos que não são gorduras, como é o caso de açúcares, proteínas, massa de cacau entre outros, os quais interferem na análise.

Isso ocorre porque no método direto a determinação do valor de SFC ocorre pela correlação entre as intensidades do sinal FID em 11 μ s e 70 μ s. Tais intensidades são referentes à concentração total de ^1H da amostra (11 μ s) e à concentração de ^1H da porção móvel da amostra (70 μ s), ou seja, a determinação do valor de SFC ocorre em uma única medição e o componente sólido interferente aumenta a intensidade do sinal em 11 μ s. Já para o método indireto, observa-se a correlação da intensidade do sinal FID em 70 μ s em duas temperaturas. Em uma das análises a amostra está a 60°C, portanto a amostra está totalmente líquida. A outra análise se faz na temperatura que se deseja determinar o valor de SFC. Devido à determinação ser realizada a partir de sinais obtidos em dois experimentos diferentes, com período de tratamento térmico

entre eles, tal determinação é dita ser indireta. Como as medições são sempre do sinal do componente líquidos, outros produtos sólidos não interferem na medição do SFC. Por isso pode ser usada para determinar o SFC em chocolates e liquor de cacau, por exemplo.

Na Figura 48 estão os valores de SFC das amostras de MC determinados pelos métodos ISO e HPDEC, sem tratamento térmico e indireto com tratamento térmico.

Figura 48. Comparativo dos valores de SFC obtidos seguindo a ISO 8292, tanto pelo método direto quanto pelo método indireto, e seguindo o método proposto (HPDEC) para diferentes amostras de manteiga de cacau que não passaram por tratamento térmico.



Fonte: Autoria própria

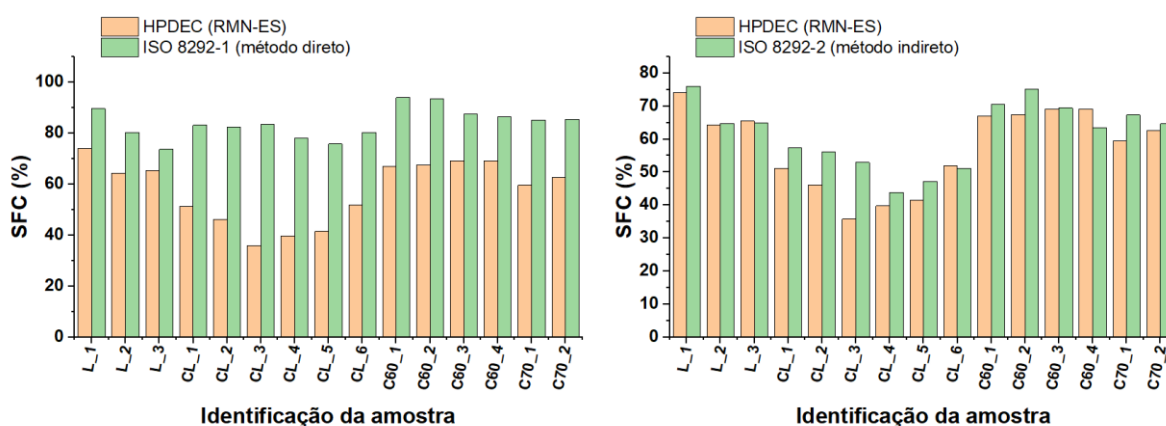
Na Figura 48, pode-se ver a diferença entre os valores de SFC obtidos pelos vários métodos. No caso do método indireto, tem-se os valores de SFC tanto para amostras que passaram quanto para amostras que não passaram pelo tratamento térmico. Na prática, o que se alterou durante as análises foram as ordens de temperatura de medição, ou seja, para as que passaram por tratamento térmico, elas foram, primeiro, fundidas, passaram por tratamento térmico e, depois, fez-se a análise na temperatura em estudo. Já para as análises indicadas como “sem tratamento térmico”, realizou-se, primeiro, a medição na temperatura de estudo e, depois, em temperatura na qual as amostras estão fundidas. Devido a isso, pode-se observar a influência do efeito das diferentes estruturas cristalinas presentes na amostra. É interessante destacar que a falta de tratamento térmico prévio à análise, implica em amostras com estruturas cristalinas não identificadas e, portanto, estas podem ser

diferentes, o que afeta o valor de SFC, quando comparado tais valores obtidos para a mesma amostra quando esta passou ou não pelo tratamento térmico. Destaca-se, também, que na temperatura de análise, 23°C, algumas das estruturas polimórficas já estão fundidas, o que, por sua vez, afeta o valor de SFC.

Tal efeito pode ser também utilizado para justificar as diferenças entre os valores de SFC obtidos por cada um dos métodos. Para as análises por método indireto sem tratamento térmico, foram utilizadas amostras que não passaram pelo mesmo período de cristalização, pois elas já haviam sido usadas anteriormente para o estudo e determinação de SFC com tratamento térmico, aplicados para tais métodos. Por isso, observa-se, para a maioria das amostras, que o valor de SFC obtido pelo método indireto sem tratamento térmico difere dos valores de SFC obtido pelos métodos direto e HPDEC para as amostras que não passaram por tratamento térmico.

Na Figura 49, encontra-se a comparação entre os valores de SFC obtidos para amostras de liquor de cacau, chocolate ao leite, 60% e 70% de cacau. Os valores de SFC, analogamente ao experimento anterior, foram obtidos utilizando os três métodos, contudo, são comparados dois a dois: método direto e HPDEC (Figura 49a) e método indireto e HPDEC (Figura 49b).

Figura 49. Comparativo valores de SFC obtidos para amostras de derivados de cacau que não passaram por tratamento térmico. Valores de SFC determinados através do método protocolado, tanto direto quanto indireto, e pela sequência propostas (HPDEC). Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: L refere-se ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.



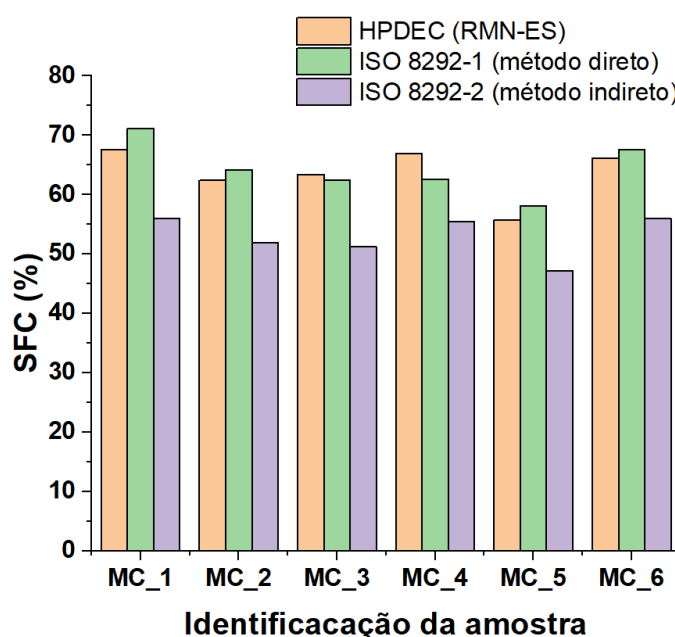
Fonte: Autoria própria

Considerando os valores de SFC obtidos pelo método direto, para amostras de derivados de cacau, observa-se um padrão com relação àqueles adquiridos utilizando o método HPDEC (Figura 49a): todos os valores de SFC foram maiores para o método direto. Essa diferença é facilmente justificável em função dos interferentes presentes, como massa de cacau e açúcar, os quais vão contribuir para a concentração total de ^1H presente na amostra. Assim, determina-se a porção sólida da amostra, não somente a porção de gordura sólida da amostra, como é o caso para a obtenção dos valores de SFC por HPDEC.

Na Figura 49b estão os valores de SFC determinados pelos métodos indireto e HPDEC. Note que os valores de SFC entre os métodos são similares, exceto para as amostras CL_1, CL_2 e CL_3. Essa discrepância para amostras de chocolate ao leite, pode ser devido aos TAGs presente no leite ou outros produtos adicionados.

Segundo a ISO 8292 para se determinar os valores reais de SFC, as amostras devem passar por tratamento térmico prévio (ISO/CD 8292-1, 2008; ISO/CD 8292-2, 2008). Na Figura 50 estão os valores de SFC para diferentes amostras de manteiga de cacau que passaram por tratamento térmico, obtidos seguindo a ISO 8292 (métodos direto e indireto) e o método proposto (HPDEC).

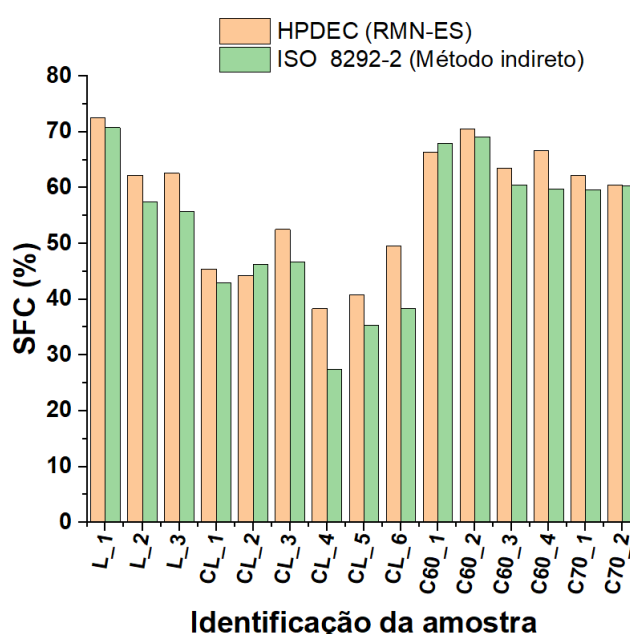
Figura 50. Comparativo dos valores de SFC obtidos seguindo a ISO 8292, tanto pelo método direto quanto pelo método indireto, e seguindo o método proposto (HPDEC) para diferentes amostras de manteiga de cacau que passaram por tratamento térmico.



Como pode ser visto na Figura 50, os valores de SFC, para amostras de MC tratadas termicamente, adquiridos pelos métodos direto e HPDEC foram similares e maiores do que os valores medidos pelo método indireto. Este padrão também foi percebido para as mesmas amostras sem tratamento térmico. Uma explicação para essa diferença ainda não foi obtida.

Na Figura 51 se encontra o comparativo entre os valores de SFC obtidos para amostras de liquor de cacau, chocolate ao leite, 60% e 70% de cacau que passaram por tratamento térmico. Note, contudo, que aqui não se apresenta os valores de SFC obtidos pelo método direto, visto que este sofre a interferência de outras moléculas sólidas que não são TAG, logo, seus valores de SFC são todos maiores do que os métodos indireto e HPDEC, o que torna a comparação inviável.

Figura 51. Comparativo valores de SFC obtidos para amostras de liquor de cacau, chocolate ao leite, 60% e 70% que passaram pelo tratamento térmico. Valores de SFC determinados através do método protocolado indireto, e pela sequência propostas (HPDEC). Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: L refere-se ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.



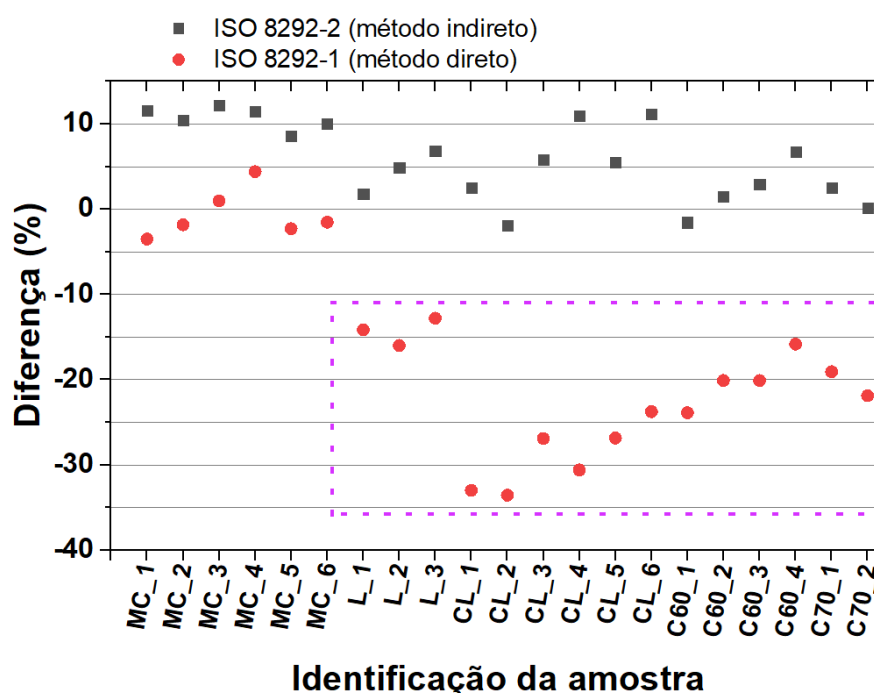
Fonte: Autoria própria

Nesta figura, pode-se ver que os valores de SFC, obtidos por ambos os métodos, indireto e HPDEC, para as amostras que passaram por tratamento térmico, são similares. As maiores diferenças foram observadas para as amostras CL_4, CL_5 e CL_6, todas as quais são de amostras de chocolate ao leite. Considerando que as maiores diferenças foram observadas para amostra de chocolate ao leite, pode-se

justificar devido à presença de leite e sua gordura ou de adição de outros componentes no produto.

De forma geral, é de mais fácil visualização a diferença entre os valores de SFC pelos três métodos distintos ao tomar um dos métodos como referência (DUYNHOVEN et al., 2002). Na Figura 52, usou-se o método HPDEC como referência para demonstrar como variam os valores de SFC obtidos pelos métodos ISO 8292-1 e ISO 8292-2.

Figura 52. Comparativo entre as diferenças dos dados de SFC para os métodos indireto (quadrado preto) e direto (círculo vermelho) em relação aos valores de SFC obtidos por HPDEC (referência) para amostras de derivados de cacau que passaram por tratamento térmico. Na identificação da amostra há indicativo do que é a amostra: MC refere-se à manteiga de cacau, L ao liquor de cacau, CL ao chocolate ao leite, C60 ao chocolate 60% de cacau e C70 ao chocolate 70% de cacau.



Fonte: Autoria própria

Como descrito anteriormente, nesta figura, usou-se o método HPDEC como referência. Logo, os valores no eixo y para o SFC determinado pelo método direto (círculos vermelhos) e indireto (quadrados pretos) indicam as diferenças para os valores determinados por HPDEC.

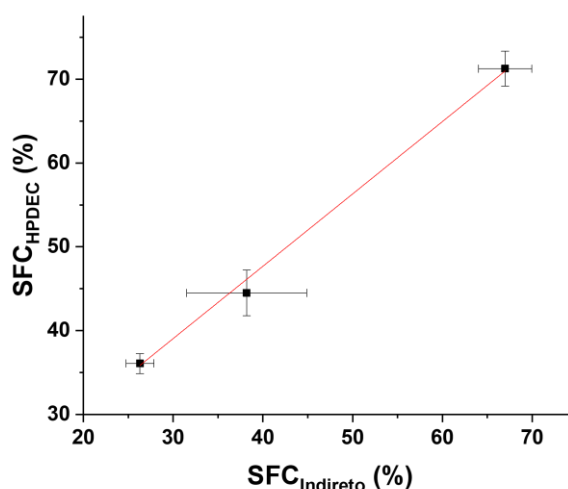
Observe que para o método indireto as diferenças se encontram em região de até 10% para todas as amostras, logo, em uma análise qualitativa entre os métodos,

pode-se dizer que os valores são concordantes. Como os valores da diferença do método indireto são, em sua maioria, positivos, isso indica que os valores de SFC obtidos por método indireto são menores do que aqueles obtidos por HPDEC.

Quando se compara os valores de SFC obtidos pelo método direto, observa-se uma clara distinção entre dois grupos de amostras. Para as amostras de MC (amostras MC_1 a MC_6), as diferenças observadas estão na faixa de 5%, indicando que os métodos são concordantes. Contudo, para as amostras de derivados de cacau: liquor de cacau (amostras L_1 a L_3), chocolate ao leite (amostras CL_1 a CL_6), 60% (amostras C60_1 a C60_4) e 70% de cacau (amostras C70_1 e C70_2), destacados pelo retângulo pontilhado, observa-se a interferência nos resultados, ocasionada pela presença de componentes sólidos que não são TAG, como já mencionado.

Fez-se, por fim, a análise do comportamento linear da determinação dos valores de SFC, comparando os valores obtidos seguindo o método ISO 8292-2 (método indireto) e o proposto (HPDEC). Para isso, utilizou-se das amostras CL_1, CL_4 e C60_2, que têm valores de SFC baixo, médio e alto. Os resultados podem ser visualizados na Figura 53.

Figura 53. Comparativo valores de SFC, com respectivos desvios padrões, obtidos pelo método proposto e pelo método indireto para as amostras CL_1, CL_4 e C60_2. *Fitting* linear descrito pela equação $y = (13,2 \pm 1,5) + (0,86 \pm 0,04)x$, com R^2 equivalente a 0,99813.



Fonte: Autoria própria

Na Figura 53, pode-se observar que os desvios-padrão dos valores de SFC referente às análises realizadas utilizando HPDEC são menores do que àqueles para as análises realizadas seguindo o método indireto. É, contudo, necessário destacar a importância da correção de fases dos espectros de RMN de ^{13}C . As fases devem ser ajustadas de forma que para cada uma das análises, elas sejam iguais, pois, o cálculo é baseado na área integrada do sinal, a qual varia para fases distintas. Ou seja, o ajuste é necessário para garantir que desvios padrões grandes não sejam observados.

Para o *fitting* linear observado na Figura 53, tem-se R^2 equivalente a 0,99, o que indica boa correlação entre os valores de SFC obtidos pelos métodos indireto e HPDEC. Isso implica dizer que o método proposto, no qual a determinação do valor de SFC é realizada através de RMN-ES pode ser utilizado como uma alternativa aos métodos ISO. O que precisa ainda ser melhor determinado é o porquê houve essas diferenças principalmente quando o HPDEC foi comparado ao método indireto.

4.7. Diferenciação de polimorfos durante o processo de cristalização isotérmico

Entender o processo de cristalização isotérmica é de interesse industrial, visto que a composição da manteiga de cacau é afetada pela região de cultivo do cacaueiro. Devido às características da manteiga de cacau, o processo de cristalização é afetado, o que, por vez, afeta, por exemplo, a estabilidade do chocolate.

Como visto na seção 1.1.1., a manteiga de cacau possui 6 diferentes estruturas cristalinas. O processo de cristalização de forma isoterma é comumente estudado através das técnicas de Difração de Raio X (DRX) e Calorimetria de Varredura Diferencial (*Diferencial Scanning Calorimetry* - DSC). Em se tratando de estudo por RMN-ES, tem-se a caracterização dos diferentes polimorfos de moléculas de TAGs, mas não o estudo da transição de fase sólido-líquido.

Para que a transição de fase possa ser rapidamente observada por RMN de ^{13}C em estado sólido, utilizou-se a sequência CPMAS, que detecta preferencialmente os sinais das regiões rígidas da amostra. Apesar da CPMAS não ser uma análise

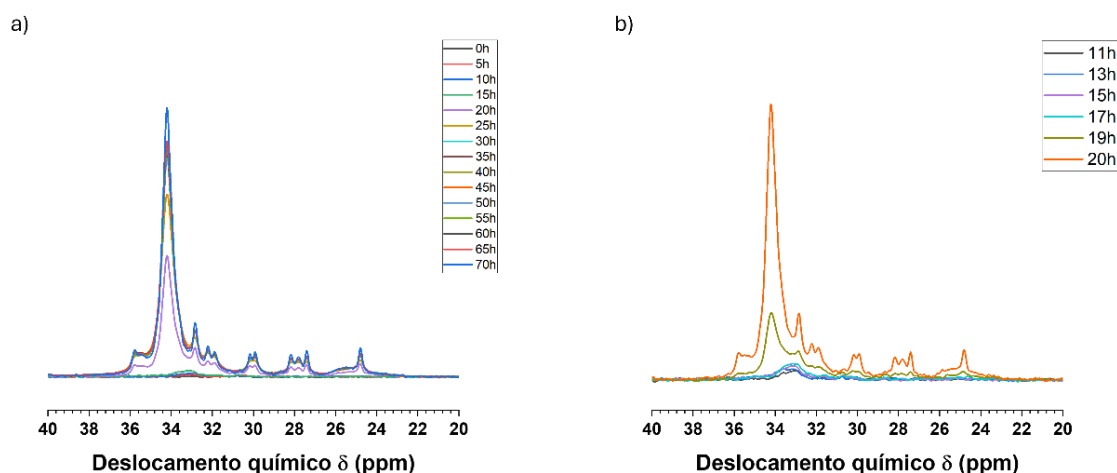
quantitativa, é possível utilizar tal sequência para a aquisição dos sinais em função do tempo de cristalização e identificar os polimorfos presentes em cada fase.

Para isso, fez-se a aquisição dos espectros de RMN-ES em função do tempo de cristalização de amostras de MC, previamente aquecidas a 60°C por 30 minutos, para eliminar qualquer forma cristalina, e, em seguida, colocadas no *probe* com a temperatura de 23°C. Quando a MC fundida é colocada em uma temperatura perto de 20°C, observa-se a transição líquido-sólido para a estrutura polimórfica α , seguida pela transição sólido-sólido α para β' e, por fim, a transição sólido-sólido β' para β . Já para temperaturas até por volta de 25°C a transição líquido-sólido acontece, contudo, a estrutura polimórfica observada é β' , seguida pela transição sólido-sólido β' para β (MALSSSEN et al., 1999; SCHENK; PESCHAR, 2004).

As transições podem ser acompanhadas através da variação do deslocamento químico referente a porção sólida do material em espectros de ^{13}C adquiridos utilizando a técnica de RMN-ES. O sinal em 33 ppm é assinalado às estruturas cristalinas α e β' , enquanto o sinal em 34 ppm é assinalado às estruturas β e γ (ARISHIMA et al., 1996).

A Figura 54 mostra os espectros de ^{13}C , obtidos através da sequência CPMAS, durante o processo de cristalização. Destaca-se, na Figura 54b, os espectros entre os tempos 11 h e 20 h, nos quais se observa tanto a variação de amplitude do sinal quanto seu deslocamento químico variando de 33 ppm para 34 ppm; até 18 h de cristalização é visto o sinal em 33 ppm, a partir de 19 h, passa-se a observar o sinal em 34 ppm.

Figura 54. Espectros de ^{13}C adquiridos com sequência CPMAS acompanhando o processo de cristalização da manteiga de cacau por 70 h (a) e transição sólido-sólido verificada pela variação de deslocamento químico do sinal referente à porção rígida do TAGs (b).

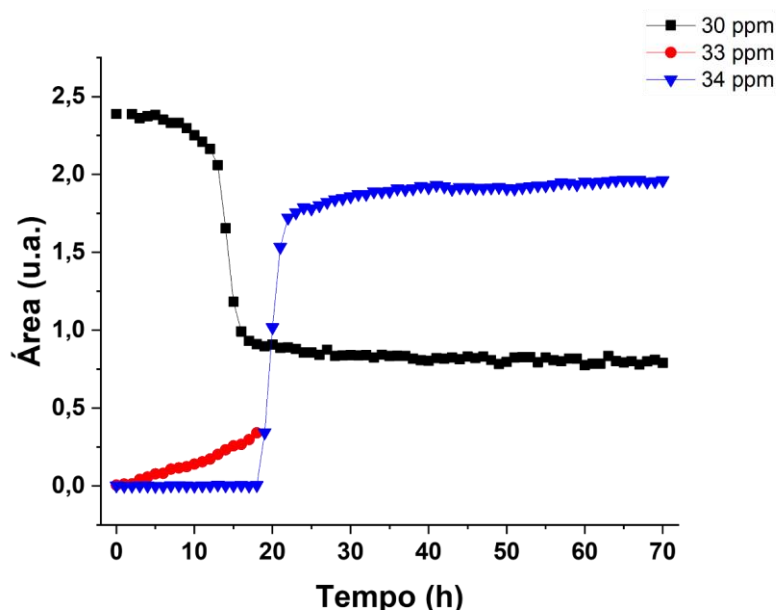


Fonte: Autoria própria

A transição sólido-sólido acontece a fim de atingir a estrutura polimórfica mais estável, para o caso da manteiga de cacau as estruturas cristalinas mais estáveis são $\beta(V)$ e $\beta(VI)$. Note, contudo, que na literatura não se faz a distinção entre as formas $\beta(V)$ e $\beta(VI)$ em dados de cristalização isotérmica ou em dados de variação de deslocamento químico, como pode ser visto em Schenk e Peschar (2004), assim, para a distinção dessas estruturas se faz necessário que a amostra seja cristalizada em cada uma dessas estruturas, o que foge do objetivo do experimento que acompanha o processo de cristalização natural da amostra.

O acompanhamento da cristalização pode ser melhor observado no gráfico da Figura 55, o qual correlaciona a variação de área dos sinais em 30, 33 e 34 ppm em função do tempo. O sinal em 30 ppm é referente à fração líquida, em 33 ppm, da forma α ou β' e, em 34 ppm, da forma β .

Figura 55. Cristalização da MC acompanhada pela variação de área dos sinais referente às porções móvel em 30 ppm (quadrado preto) e rígida em 33 ppm (círculo vermelho) e 34 ppm (triângulo azul).



Fonte: Autoria própria

A área do sinal em 30 ppm (quadrados pretos) foi determinada com sequência HPDEC. Como a amostra está a princípio líquida, espera-se observar o decaimento da área desse sinal com o tempo. Tal decaimento é lento nas primeiras 12 h, seguido por um decaimento rápido entre 12 h e 17 h de experimento e, por fim, um novo decaimento lento até o final do experimento, em 70 h, em que a amplitude fica aproximadamente constante

Para os sinais obtidos com a sequência CPMAS (círculo vermelho, referente ao sinal em 33 ppm, e triângulo azul, para o sinal em 34 ppm), referentes às porções rígidas dos TAGs, tem-se primeiro o aumento da área do sinal em deslocamento químico de 33 ppm (círculos vermelhos) até a hora 18. Note que este período corresponde ao decaimento lento inicial da área do sinal em 30 ppm. Após 18 h, observa-se a sobreposição deste sinal com àquele em 34 ppm (Figura 54.b), logo, não se pode dizer, em definitivo, em qual momento a cristalização nas formas α e β' deixa de ocorrer, visto que o sinal na região de 34 ppm é muito maior do que o sinal em 33 ppm. A área em 34 ppm aparece em 18 h e tem um crescimento rápido até as 22 h, seguido por crescimento lento até o final do experimento (70 h). Note que este

crescimento rápido acontece duas horas após o fim do decréscimo rápido do sinal em 30 ppm.

Os resultados obtidos por RMN-ES são concordantes com aqueles obtidos por DRX e por DSC encontrados em literatura. Por DRX foi observado as transições de fase em isoterma a 18°C, no qual se verificou a estrutura cristalina α sendo formada na primeira hora do experimento, seguida pela formação do polimorfo β' por 5 dias e, por fim, a formação da estrutura β depois de seis semanas. Já os resultados em isoterma a 20°C mostra a formação da estrutura α , analogamente, na primeira hora, seguida pela estrutura β' até 12 h e após tal período, o polimorfo β era o dominante (MALSSSEN et al., 1999; SCHENK; PESCHAR, 2004).

5.0. Conclusão

A análise de materiais classificados como gorduras, como é o caso da manteiga de cacau, por espectroscopia de RMN de ^{13}C em estado sólido deve ser cautelosa quanto aos parâmetros utilizados. Como visto, a frequência de rotação e potência de desacoplamento, que são técnicas comumente utilizadas a fim de melhorar a resolução espectral, são fatores que podem ser fontes de aquecimento para a amostra. As condições rotineiras de análise podem levar ao aquecimento de até 15°C da amostra, o que, para a amostra de manteiga de cacau, implica dizer que esta sofre fusão completa.

Como averiguado pelo estudo de alteração de parâmetros de aquisição, a potência de 70 W para o desacoplador deve ser utilizada para valores de RD superiores a 10 s e a frequência de rotação que evita o aquecimento da amostra é 3 kHz. Menores valores de tempo de reciclagem para a utilização de DEC de 70 W, bem como maiores frequências de rotação implicam no fornecimento de energia térmica acarretando movimentos moleculares, os quais afetam as interações dipolares características de amostras em estado sólido. Os processos dinâmicos promovem aspectos isotrópicos para o sistema em detrimento de aspectos anisotrópicos originais do material em estado sólido, conseqüentemente, afeta-se a característica espectral que de fato corresponde à amostra.

A fusão da amostra é prejudicial às análises de propriedades físico-químicas desta, quando se deseja avaliar as características do material em estado sólido, como é o caso para as propriedades SFC e polimorfismo. As análises destas propriedades podem ser realizadas utilizando espectros de ^{13}C em estado sólido, desde que utilizando os parâmetros de aquisição descritos acima, visto que tais condições levam ao aquecimento mínimo da amostra (aproximadamente 2°C).

O parâmetro SFC é de grande relevância para a avaliação de gorduras e sua determinação é realizada seguindo as normas ISO 8292-1 e ISO 8292-2, que possuem limitações quanto à precisão, exatidão e à presença de interferentes, esta última para o caso da ISO 8292-1. A medição do valor de SFC através de espectros de alta resolução, como é caso do método proposto, o qual utiliza espectros ^{13}C obtidos por RMN-ES, permite a distinção entre os componentes, assim, pode-se determinar o valor de SFC a partir somente dos grupos $-(\text{CH}_2)_n$ dos triglicerídeos que estão em estados sólido e líquido. Os estudos comparativos mostraram os resultados obtidos utilizando o método HPDEC condizentes com aqueles obtidos seguindo métodos ISO. A vantagem do método proposto, em relação ao método direto, está no fato de não sofrer interferências pela presença de outros materiais sólidos, como açúcares, proteínas e massa de cacau.

Os espectros de ^{13}C da manteiga de cacau também permitem a distinção entre as estruturas polimórficas. Essas análises devem, contudo, ser realizadas de forma que o sinal sólido seja favorecido, por isso, utilizou-se a sequência de pulso CPMAS. Com valores característicos para estruturas polimórficas distintas, acompanhou-se o processo de cristalização isotérmico da amostra de manteiga de cacau. Devido às estruturas cristalinas diferentes, observa-se o deslocamento químico referente à porção sólida do triglicerídeo variar conforme a transição líquido-sólido e sólido-sólido. Para o caso da manteiga de cacau, pode-se observar a transição líquido-sólido para a estrutura polimórfica α e a transição sólido-sólido para a estrutura β .

Nas perspectivas futuras um esforço deverá ser dado para entender as diferenças nos valores de SFC principalmente quando comparado o método HPDEC com o método indireto.

6.0. Referências bibliográficas

ABICAB. **Dia do chocolate**: produção de chocolates aponta crescimento de 9,8% no 1º trimestre de 2023. São Paulo, 2023. Disponível em: <https://www.abicab.org.br/noticias/dia-do-chocolate-producao-de-chocolates-aponta-crescimento-de-9-8-no-1o-trimestre-de-2023/>. Acesso em: 29 jan. 2024.

ADAM-BERRET, M.; RONDEAU-MOURO, C.; RIAUBLANC, A.; MARIETTE, F. Study of triacylglycerol polymorphs by nuclear magnetic resonance: effects of temperature and chain length on relaxation parameters. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Hoboken, v. 46, n. 6, p. 550–557, 2008. DOI: 10.1002/mrc.2213.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC N° 723, de 1° de julho de 2022. Dispõe sobre os requisitos sanitários do açúcar, açúcar líquido invertido, açúcar de confeitaria, bala, bombom, cacau em pó, cacau solúvel, chocolate, chocolate branco, goma de mascar, manteiga de cacau, massa de cacau, melaço, melado e rapadura. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 126, p. 203-204, 6 jul. 2022. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/487329>. Acesso em: 20 ago. 2024

AGUILAR-PARRILLA, F.; WEHRLE, B.; BRAUNLING, H.; LIMBACH, H. Temperature gradients and sample heating in variable temperature high speed mas NMR Spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 87, p. 592–597, 1990. DOI: 10.1016/0022-2364(90)90315-Z.

APPERLEY, D. C.; HARRIS, R. K.; HODGKINSON, P. **Solid state NMR**: basic principles & practice. New York: Momentum Press, 2012.

ARISHIMA, T.; SUGIMOTO, K.; KIWATA, R.; MORI, H.; SATO, K. ¹³C cross-polarization and magic-angle spinning nuclear magnetic resonance of polymorphic forms of three triacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Bognor Regis, v. 73, n. 10, p. 1231–1236, 1996. DOI: 10.1007/BF02525451.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU. **Produção de derivados de cacau no mercado interno consolidado**. São Paulo, 2024a. Disponível em: <https://aipc.com.br/estatisticas/derivados/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU. **Exportação de chocolates 2024**. São Paulo, 2024b. Disponível em: <https://aipc.com.br/estatisticas/exportacao/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

BECKETT, S. T. **The science of chocolate**. 2. ed. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2008.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2009.

BERNARD, G. M.; GOYAL, A.; MISKOLZIE, M.; MCKAY, R.; WU, Q.; WASYLISHEN, R. E.; MICHAELIS, V. K. Methylammonium lead chloride: a sensitive sample for an accurate NMR thermometer. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 283, p. 14–21, 2017. DOI: 10.1016/j.jmr.2017.08.002.

BERNIN, D.; LEVENTAKI, E.; TOPGAARD, D. Solid–liquid phase transitions of triglycerides in Griebenschmalz, Smalec, and Fedt Studied using ¹³C solid-state NMR with dynamics-based spectral filtering. **Applied Magnetic Resonance**, Vienna, v. 54, p. 1165–1175, 2023. DOI: 10.1007/s00723-023-01564-5.

BLOCH, F.; HANSEN, W. W.; PACKARD, M. The nuclear induction experiment. **Physical Review**, Berwyn Heights, v. 70, n. 7–8, p. 474–485, 1946. DOI: 10.1103/PhysRev.70.474.

BOCIEK, S. M.; ABLETT, S.; NORTON, I. T. A ¹³C-NMR study of the crystal polymorphism and internal mobilities of the triglycerides, tripalmitin and tristearin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Bognor Regis, v. 62, n. 8, p. 1261–1266, 1985.

CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, Berwyn Heights, p. 630–638, 1954.

CASTRO-ALAYO, E. M.; BALCÁZAR-ZUMAETA, C. R.; TORREJÓN-VALQUI, L.; MEDINA-MENDOZA, M.; CAYO-COLCA, I. S.; CÁRDENAS-TORO, F. P. Effect of tempering and cocoa butter equivalents on crystallization kinetics, polymorphism,

melting, and physical properties of dark chocolates. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, p. 114402, 2023. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114402.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2016.

COGLIANO, T.; TURCO, R.; RUSSO, V.; DI SERIO, M.; TESSER, R. ¹H NMR-based analytical method: a valid and rapid tool for the epoxidation processes. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 186, p. 115258, 2022. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115258.

COHEN, M.; FEYNMAN, R. P.; LOWE, L. J. Free induction decays of rotating solids. **Physical Review Letters**, Berwyn Heights, v. 2, p. 71, 1957.

COLNAGO, L. A.; DE ANDRADE, F. D. RMN no domínio do tempo: fundamentos e aplicações offline e inline. *In*: RESENDE, R. R. (org.). **Biotecnologia aplicada à agro&indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4.

DECLERCK, A.; NELIS, V.; DANTHINE, S.; DEWETTINCK, K.; VAN DER MEEREN, P. Characterisation of fat crystal polymorphism in cocoa butter by time-domain NMR and DSC deconvolution. **Foods**, Basel, v. 10, n. 3, p. 520, 2021. DOI: 10.3390/foods10030520.

DECLERCK, A.; NELIS, V.; RIMAU, T.; DEWETTINCK, K.; VAN DER MEEREN, P. Influence of polymorphism on the solid fat content determined by FID deconvolution. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Hoboken, v. 120, n. 3, 2018. DOI: 10.1002/ejlt.201700339.

DIOMANDÉ, D.; DRO, T. T.; AKPA, J. S.; VIRGINIE, S.; TEA, I.; REMAUD, G. S. Quantitative measurement of the chemical composition of fatty acid of cocoa butter and the isotopic content of glycerol contained in cocoa butter by the NMR ¹³C from the INEPT sequence and characterization of the geographical origin of the cocoa. **American Journal of Analytical Chemistry**, Irvine, v. 13, n. 03, p. 79–95, 2022. DOI: 10.4236/ajac.2022.133007.

DUER, M. J. **Solid-state NMR spectroscopy principles and applications**. Hoboken: Wiley, 2001. DOI: 10.1002/9780470999394.

DUNCAN, T. M. ^{13}C Chemical shieldings in solids. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, Melville, v. 16, n. 1, p. 125–151, 1987. DOI: 10.1063/1.555789.

DUYNHOVEN, J.; DUBOURG, I.; GOUDAPPEL, G. J.; ROIJERS, E. Determination of MG and TG phase composition by time-domain NMR. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 383–388, 2002. DOI: 10.1007/s11746-002-0493-7.

DVINSKIKH, S. V.; CASTRO, V.; SANDSTRÖM, D. Heating caused by radiofrequency irradiation and sample rotation in ^{13}C magic angle spinning NMR studies of lipid membranes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Hoboken, v. 42, n. 10, p. 875–881, 2004. DOI: 10.1002/mrc.1477.

FIGUEIRA, A. C.; LUCCAS, V. Physicochemical characterization of national and commercial cocoa butter used in Brazil to make chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 25, p. e2022033, 2022. DOI: 10.1590/1981-6723.03322.

GHAZANI, S. M.; MARANGONI, A. G. Molecular origins of polymorphism in cocoa butter. **Annual Review Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 12, p. 567–590, 2021. DOI: 10.1146/annurev-food-070620.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

HARTMANN, S. R.; HANN, E. L. Nuclear double resonance in the rotating frame. **Physical Review**, Berwyn Heights, v. 128, p. 2042–2053, 1962.

HENDERSON, J. S.; JOYCE, R. A.; HALL, R.; HURST, W. J.; MCGOVERN, P. E. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 48, p. 18937–18940, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0708815104.

HINDMAN, J. C. Proton resonance shift of water in the gas and liquid states. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 44, n. 12, p. 4582–4592, 1966. DOI: 10.1063/1.1726676.

HOFFMAN, R. Solid-state chemical-shift referencing with adamantane. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 340, 2022. DOI: 10.1016/j.jmr.2022.107231.

HOFFMAN, R. E.; BECKER, E. D. Temperature dependence of the ^1H chemical shift of tetramethylsilane in chloroform, methanol, and dimethylsulfoxide. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 176, n. 1, p. 87–98, 2005. DOI: 10.1016/j.jmr.2005.05.015.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Production of cocoa beans**. [S. /], 2024. Disponível em: https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-L-No.-2.pdf. Acesso em: 20 ago. 2024.

ISO. **ISO/CD 8292-1:2008**: animal and vegetable fats and oils - determination of solid fat content by pulsed NMR. Part 1: direct method. Geneva: International Organization for Standardization, 2008.

ISO. **ISO/CD 8292-2:2008**: animal and vegetable fats and oils - determination of solid fat content by pulsed NMR. Part 2: indirect method. Geneva: International Organization for Standardization, 2008.

JAEGERS, N. R.; WANG, Y.; HU, J. Z. Thermal perturbation of NMR properties in small polar and non-polar molecules. **Scientific Reports**, Berlin, v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-63174-6.

KEELER, J. **Understanding NMR spectroscopy**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011.

LADD PARADA, M.; POVEY, M. J.; VIEIRA, J.; RAPPOLT, M.; RIES, M. E. Early stages of fat crystallisation evaluated by low-field NMR and small-angle X-ray

scattering. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Hoboken, v. 57, n. 9, p. 686–694, 2019. DOI: 10.1002/mrc.4860.

LADD-PARADA, M.; POVEY, M. J.; VIEIRA, J.; RIES, M. E. Fast field cycling NMR relaxometry studies of molten and cooled cocoa butter. **Molecular Physics**, Oxon, England, v. 117, n. 7–8, p. 1020–1027, 2019. DOI: 10.1080/00268976.2018.1508784.

LEVITT, M. H. **Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gordura de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 2001. 195 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MACOMBER, R. S. **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**. Hoboken: Wiley-Interscience, 1997.

MALÄR, A. A.; VÖLKER, L. A.; CADALBERT, R.; LECOQ, L.; ERNST, M.; BÖCKMANN, A.; MEIER, B. H.; WIEGAND, T. Temperature-dependent solid-state NMR proton chemical-shift values and hydrogen bonding. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 125, n. 23, p. 6222–6230, 2021. DOI: 10.1021/acs.jpcb.1c04061.

MALSSSEN, K.; LANGEVELDE, A.; PESCHAR, R.; SCHENCK, H. Phase behavior and extended phase scheme of static cocoa butter investigated with real-time X-Ray Powder Diffraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Oxford, v. 76, n. 6, p. 669–676, 1999. DOI: 10.1007/s11746-999-0158-4.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, Melville, v. 29, n. 8, p. 688–691, 1958. DOI: 10.1063/1.1716296.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology**. 3. ed. New York: Chapman & Hall, 1994.

MITCHELL, J.; GLADDEN, L. F.; CHANDRASEKERA, T. C.; FORDHAM, E. J. Low-field permanent magnets for industrial process and quality control. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Oxford, v. 76, p. 1–60, 2014. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.09.001.

MORDOR INTELLIGENCE INDUSTRY REPORTS. **Análise do tamanho e participação do mercado de chocolate no Brasil: tendências e previsões de crescimento (2023 – 2028)**. Hyderabad, 2023. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/brazil-chocolate-market>. Acesso em: 29 jan. 2024.

PURCELL, E. M.; TORREY, H. C.; POUND, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, Berwyn Heights, v. 69, n. 1–2, p. 37–38, 1946. DOI: 10.1103/PhysRev.69.37.

RIBEIRO, A. P. B.; CLARO DA SILVA, R.; GIOIELLI, L. A.; DE ALMEIDA GONÇALVES, M. I.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G.; GUENTER KIECKBUSCH, T. Physico-chemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part I Chemical composition, solid fat content and consistency. **Grasas y Aceites**, Madrid, v. 63, n. 1, p. 79–88, 2012. DOI: 10.3989/gya.069011.

SASAKI, M.; UENO, S.; SATO, K. 6-Polymorphism and mixing phase behavior of major triacylglycerols of cocoa butter. *In*: GARTI, N.; WIDLAK, N. R. (org.). **Cocoa Butter and Related Compounds**. Urbana: AOCS Press, 2012. p. 151–172. DOI: 10.1016/B978-0-9830791-2-5.50009-8.

SCHENK, H.; PESCHAR, R. Understanding the structure of chocolate. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, England, v. 71, n. 3–4, p. 829–835, 2004. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2004.04.105.

SIEVERS, R. E. **Nuclear magnetic resonance shift reagents**. New York: Academic Press, 1973.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

TALBOT, G. Chocolate and cocoa butter - structure and composition. *In*: GARTI, N.; WIDLAK, N. R. (org.). **Cocoa butter and related compounds**. Urbana: Elsevier, 2012. DOI: 10.1016/C2015-0-02409-1.

THE NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in chemistry 1991**: Richard R Ernst. Stockholm, [20--?]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1991/summary/>. Acesso em: 17 dez. 2023.

THE NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in chemistry 2002**: John B. Fenn, Koichi Tanaka, Kurt Wüthrich. Stockholm, [20--?]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/summary/>. Acesso em: 17 dez. 2023.

THE NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in physics 1952**: Felix Bloch, Edward Mills Purcell. Stockholm, [20--?]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1952/summary/>. Acesso em: 17 dez. 2023.

THE NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in physiology or medicine 2003**: Paul C. Lauterbur, Peter Mansfield. Stockholm, [20--?]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2003/summary/>. Acesso em: 17 dez. 2023.

THURBER, K. R.; TYCKO, R. Measurement of sample temperatures under magic-angle spinning from the chemical shift and spin-lattice relaxation rate of ⁷⁹Br in KBr powder. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 196, n. 1, p. 84–87, 2009. DOI: 10.1016/j.jmr.2008.09.019.

TOBIAS, T. J.; MORAES, T. B.; COLNAGO, L. A. Establishing optimal parameters to mitigate the heating effects caused by CPMAS sequence in ¹³C solid-state NMR studies of cocoa butter and other fat samples. **Food Research International**, Oxford, v. 204, p. 115944, 2025. DOI: 10.1016/j.foodres.2025.115944.

TODT, H.; GUTHAUSEN, G.; BURK, W.; SCHMALBEIN, D.; KAMLOWSKI, A. Time-domain NMR in quality control: standard applications in food. *In*: WEBB, G. A. (ed.). **Modern magnetic resonance**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1739–1743.

TORBICA, A.; JAMBREC, D.; TOMIC, J.; PAJIN, B.; PETROVIC, J.; KRAVIC, S.; LONCAREVIC, I. Solid fat content, pre-crystallization conditions, and sensory quality of chocolate with addition of cocoa butter analogues. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 19, n. 5, p. 1029–1043, 2016. DOI: 10.1080/10942912.2015.1052881.

TRUZZI, E.; MARCHETTI, L.; FRATAGNOLI, A.; ROSSI, M. C.; BERTELLI, D. Novel application of ¹H NMR spectroscopy coupled with chemometrics for the authentication of dark chocolate. **Food Chemistry**, London, v. 404, p. 134522, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134522.

VAECK, S. V. Cocoa-butter and fat bloom. **Manufacturing confectioner**, Princeton, v. 40, p. 35–74, 1960.

VIEIRA, L. R.; EFRAIM, P.; VAN DE WALLE, D.; DE CLERCQ, N.; DEWETTINCK, K. Influence of Brazilian geographic region and organic agriculture on the composition and crystallization properties of cocoa butter. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Bognor Regis, v. 92, n. 11–12, p. 1579–1592, 2015. DOI: 10.1007/s11746-015-2728-y.

VOLD, R. L.; WAUGH, J. S.; KLEIN, M. P.; PHELPS, D. E. Measurement of spin relaxation in complex systems. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 48, n. 8, p. 3833–3834, 1968. DOI: 10.1063/1.1669699.

WILLE, R. L.; LUTTON, E. S. Polymorphism of cocoa butter. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Oxford, v. 43, n. 8, p. 491–496, 1966. DOI: 10.1007/BF02641273.

ZERI, A. C. M. **Aplicação de análise multivariada de dados a espectroscopia de alta resolução em sólidos por ressonância magnética nuclear**. 1997. Dissertação (Mestrado em Física Básica) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997. DOI: 10.11606/D.76.1997.tde-09032009-150936.