



4º CONGRESSO BRASILEIRO
DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL
1ª Clínica Tecnológica em Biodiesel

5047 118 R B 41516

VARGINHA, MG - 03 A 07 DE JULHO DE 2007

BIODIESEL: COMBUSTÍVEL ECOLÓGICO

<http://oleo.ufva.br/>



Slid 30640

DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE RMN DE BAIXA POTÊNCIA PARA ANÁLISE DA QUALIDADE DE ÓLEO EM SEMENTES INTACTAS

Fabiana Diuk de Andrade, IQSC/USP, fabianadiuk@cnpdia.embrapa.br

Daniela Toma, IQSC/USP, daniela@cnpdia.embrapa.br

Luiz Alberto Colnago, EMBRAPA/CNPIDIA, colnago@cnpdia.embrapa.br

RESUMO: A ressonância magnética nuclear (RMN) de baixa resolução vem sendo usada a mais de 30 anos na determinação do teor de óleo em sementes intactas, para melhoramento genético de oleaginosas, pois além de não destrutiva, é bastante rápida. Recentemente desenvolvemos uma técnica rápida de RMN de baixa resolução para medida da qualidade do óleo nas sementes, baseada na seqüência posposta por Carr-Purcell-Meiboom-Gill, denominada CPMG. Essa seqüência consiste de um pulso de 90 graus, seguido por um tempo T e um trem de pulsos de 180 graus separados por um tempo $2T$ ($90^\circ - T - (180^\circ - T) - (eco) - T - n$). O sinal gerado pela CPMG tem um decaimento exponencial, com constante de tempo de relaxação transversal T_2 , que é inversamente proporcional à viscosidade do óleo nas sementes, e também ao número de cetano, índice de iodo ao teor e tipo de ácidos graxos. Apesar do grande potencial dessa técnica, quando seu uso é intensivo, pode acarretar um menor tempo de vida dos componentes. Além disso, pode levar a um aquecimento indesejável na semente, reduzindo seu poder germinativo e a resultados errôneos, uma vez que a viscosidade varia com a temperatura. Assim, estamos apresentando uma nova técnica de medida de T_2 , similar à CPMG, porém usando somente pulsos de 90 graus denominada CPMG90, a qual tem demonstrado desempenho idêntico a CPMG convencional, na análise da qualidade de óleo de sementes. A CPMG90 tem a vantagem de se usar apenas 25% da potência da técnica convencional aumentando o tempo de vida do espectrômetro e também uma menor influência na temperatura da amostra. Essa técnica já está sendo utilizada para seleção de sementes de amendoim com alto teor de ácido oléico que é o componente ideal para produção de biodiesel, por possuir maior estabilidade oxidativa que os ácidos graxos poliinsaturados.

Palavras-Chave: RMN, biodiesel, CPMG, CPMG90, sementes oleaginosas.

1 INTRODUÇÃO

A ressonância magnética nuclear (RMN) de baixa resolução vem sendo usada a mais de 30 anos na determinação não-destrutiva do teor de óleo em sementes intactas, para melhoramento genético de oleaginosas. É um método padrão usado por melhoristas em todo o mundo, pois além de não destruir as sementes, é bastante rápido, chegando a analisar mais de três sementes por minuto (Colnago *et al.*, 1996; Azeredo *et al.*, 2000; Azeredo *et al.*, 2003; Venâncio *et al.*, 2005 e Colnago *et al.*, 2007).

Recentemente desenvolvemos um novo método de RMN baseada na seqüência de pulsos denominada CWFP (*Continuous Wave Free Precession*) que consiste de um trem de pulsos de 90 graus, calculado pela equação 1, separados por um intervalo de tempo τ na ordem de 300 microsegundos (Azeredo *et al.*, 2003; Venâncio *et al.*, 2005 e Colnago *et al.*, 2007). Essa seqüência é repetida milhares de vezes (n) até a aquisição total dos sinais de RMN. O esquema da seqüência CWFP está na Figura 1.

$$\theta = \gamma B_1 T_p \quad (1)$$

onde θ é o ângulo de excitação em graus, γ = constante magnetogírica, característica de cada isótopo, B_1 , a intensidade do campo de radiofreqüência (rf) aplicado sobre a amostra e T_p , o tempo de duração do pulso. Com essa equação observa-se que é possível ajustar o ângulo de excitação da amostra, variando a intensidade do campo B_1 ou o tempo de duração do pulso T_p .

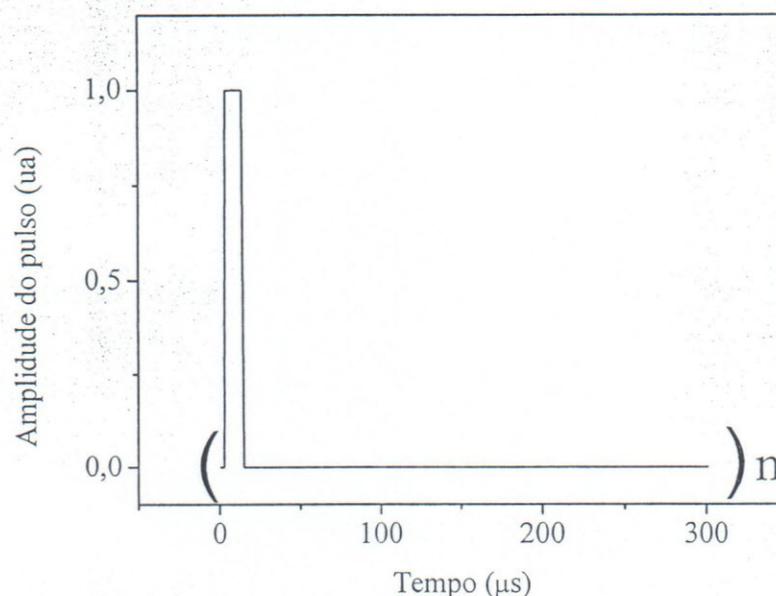


Figura 1 - Diagrama da seqüência CWFP $((90 - \tau)_n)$ com um pulso de 90 graus de 10 microsegundos e um intervalo τ de 300 microsegundos. A amplitude do pulso de rf está em unidades arbitrárias (ua).

Essa técnica viabiliza a determinação do teor de óleo em mais de 20 mil sementes intactas por hora e está sendo utilizada na avaliação do teor de óleo em sementes, na seleção de material genético para produção de biodiesel.

Desenvolvemos também uma outra técnica rápida de RMN de baixa resolução para medida da qualidade do óleo nas sementes, baseada na seqüência de pulsos desenvolvida por Carr-Purcell-Meiboom-Gill, denominada CPMG (Prestes *et al.*, 2007). Essa seqüência (Figura 2) consiste da aplicação de um pulso de excitação de 90_x graus (pulso aplicado no eixo x do modelo de coordenadas girantes) de alguns microsegundos de duração, seguido por um tempo (τ) de dezenas a centenas de microsegundos, então é aplicado um pulso de 180_y graus (pulso aplicado no eixo y), com o dobro do tempo do pulso de 90 graus. Após esse segundo pulso, espera-se um tempo de 2τ . A aquisição do sinal da técnica CPMG (Figura 1) ocorre após um tempo τ do pulso de 180 graus. Após o tempo de 2τ , repete-se a seqüência de pulsos de 180_y graus, n vezes ($n= 10^2$ a 10^3), até o desaparecimento do sinal de RMN. O sinal gerado pela seqüência CPMG é caracterizado por um decaimento exponencial, cuja constante de tempo, denominada T_2 , é relativa à relaxação transversal dos spins nucleares.

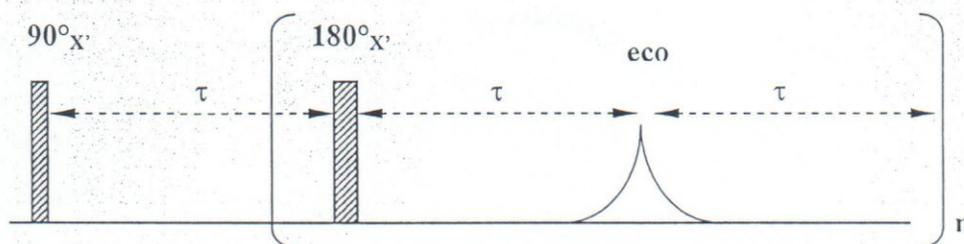


Figura 1 - Seqüência de pulso da técnica CPMG.

O decaimento exponencial T_2 é inversamente proporcional à viscosidade do óleo nas sementes (Figura 3) que por sua vez está diretamente relacionado aos teores e tipos de ácidos graxos (Prestes *et al.*, 2007).

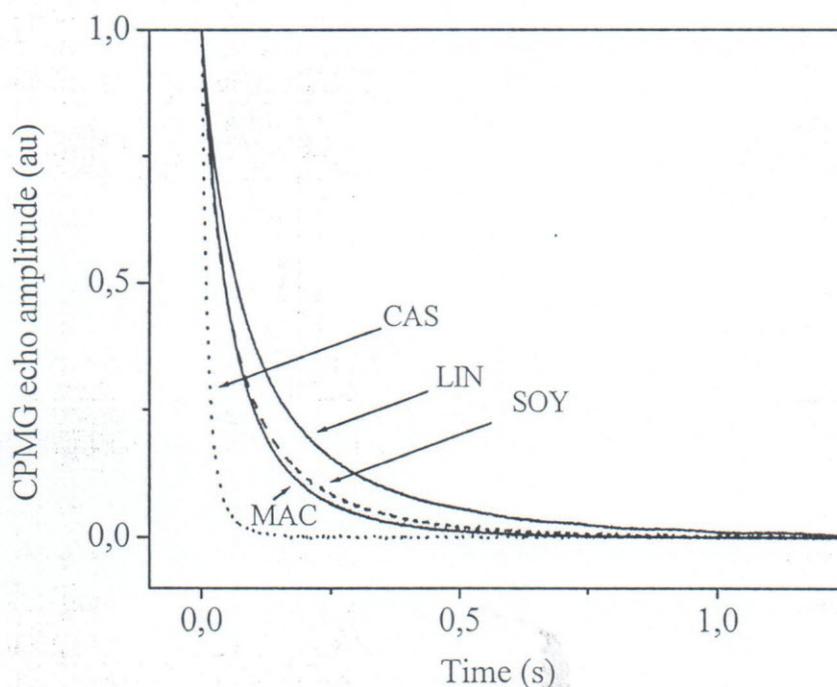


Figura 2 - Curvas de decaimento do sinal de RMN obtidos com a seqüência CPMG.

Na Figura 3 a semente de linhaça (LIN) apresenta o decaimento mais longo, por ser rica em ácido linolênico (> 50%), um ácido graxo com 18 carbonos e três insaturações (C18:3), cujos ésteres são os menos viscosos. O biodiesel produzido a partir do óleo de linhaça possui viscosidade cinemática (μ) $3,6 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$. A semente de soja (SOY) por apresentar mais que 50% de ácido linoléico (C18:2) produz biodiesel mais viscoso ($4,1 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) que a linhaça e menos viscoso que a macadâmia ($4,4 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), a qual contém mais de 70% de ácido oléico (C18:1) em sua composição. A mamona possui um óleo muito mais viscoso que as outras três

sementes, uma vez que contém mais de 80% de ácido ricinoléico, um ácido graxo C18:1, mas com uma hidroxila no C12. Essa hidroxila permite ligações de hidrogênio intramoleculares, responsável pela alta viscosidade ($12,8 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) do biodiesel produzido com o óleo da mamona (Knothe, 2005 e Prestes *et al.*, 2007).

Como as propriedades do biodiesel, tais como viscosidade, número de cetano e índice de iodo são dependentes do tipo e da concentração dos ácidos graxos presentes no óleo, desenvolveu-se a aplicação da técnica CPMG para a medida desses parâmetros diretamente nas sementes. Na Figura 4 são apresentadas as curvas de calibração para a viscosidade (coeficiente de correlação $r = 0,94$) e número de cetano ($r = 0,92$) calculados pela técnica CPMG diretamente em sementes como soja, pinhão-manso, amendoim, girassol entre outras (Prestes *et al.* 2007). Nesta técnica a semente deve ficar imóvel durante a análise por cerca de 1 segundo (*stop and flow*), demandando maior tempo de análise que a técnica CWFPP, utilizada para medir o teor de óleo nas sementes, apesar de poder analisar mais de 1000 amostras por hora.

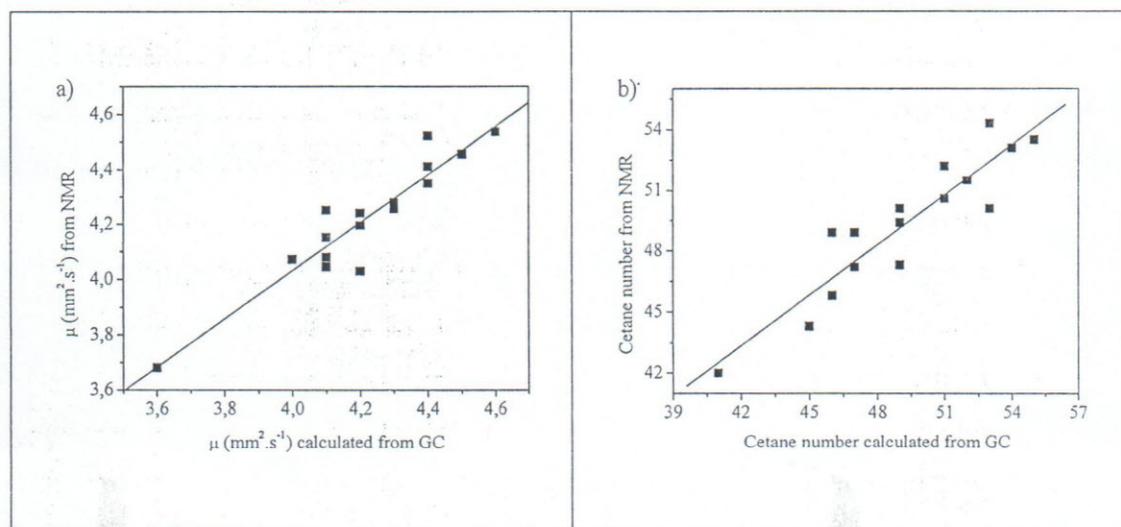


Figura 3 - Curvas de correlação relativas às propriedades do biodiesel, calculadas por GC e previstas pelo método CPMG, a) curva de calibração da viscosidade cinemática e b) curva de calibração do número de cetano.

Apesar do grande potencial da técnica CPMG, tem-se encontrado alguns problemas quando seu uso é intensivo. A aplicação dos pulsos de 180 graus com cerca de 20 microsegundos, em intervalos de tempo τ de 100 microsegundos e uma potência de rf de aproximadamente 100 Watts, causam no equipamento, principalmente no amplificador de potência e na sonda detectora, uma sobrecarga, acarretando uma menor durabilidade nos componentes. Além disso, esse trem de pulsos praticamente contínuo, pode levar a um

aquecimento indesejável na semente. O aquecimento, além de reduzir o poder germinativo da mesma, também pode levar a resultados errôneos, uma vez que a viscosidade varia exponencialmente com a temperatura (Prestes *et al.*, 2007).

Assim, neste trabalho estamos apresentando uma nova técnica de medida do tempo de relaxação T_2 , similar ao CPMG, porém usando somente pulsos de 90 graus, que denominamos CPMG₉₀. Como vamos demonstrar nesse trabalho, essa técnica usa apenas ¼ da potência da técnica de CPMG convencional.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sementes intactas de pinhão-mansão, amendoim, baru, abóbora, amêndoa, castanha do Brasil, castanha de caju, patí, colza, gergelim branco e preto, girassol, linhaça, macadâmia, mamona, macaúba, moringa, niger, noz, piaçava, pipoca, rabanete e soja.

Utilizou-se um espectrômetro de RMN baseado em um transmissor/receptor CAT-100 da Tecmag e um ímã de 2,1 T Oxford com 30 cm de bore. A frequência de ressonância do 1H é de 85 MHz e 5 MHz para 1H).

As análises dos sinais de RMN foram realizadas com as técnicas CPMG convencional (Figura 2) $90^\circ_x - \tau - (180^\circ_y - \tau - \text{eco}) - \tau - n$, e CPMG₉₀ (Figura 5): $90^\circ_x - \tau - (90^\circ_y - \tau - \text{eco}) - \tau - n$.

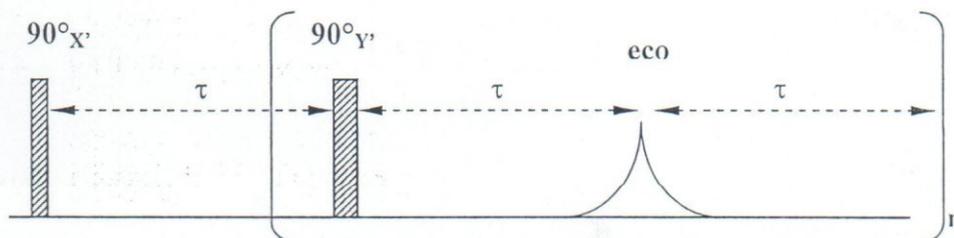


Figura 4. Sequência de pulsos da técnica de CPMG₉₀.

Os parâmetros de análise para essas técnicas foram: largura de pulso de 10 μs , tempo entre os pulsos (τ) de 100 μs , números de ecos (n) = 600 ecos. Todas as medidas foram executadas na temperatura de $22^\circ C \pm 0.5^\circ C$.

As constantes de tempo (T_2) dos decaimentos das curvas CPMG foram analisadas no software Origin 6.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 6 apresenta os decaimentos das sementes de linhaça, amendoim e baru, obtidos com as técnicas, CPMG convencional com trem de pulsos de 180 graus e com a técnica proposta, CPMG90, com um trem de pulsos de 90 graus. É possível visualizar nesta figura, uma sobreposição quase completa entre os decaimento medidos pelas duas técnicas. Assim como discutido na introdução, as diferenças entre as velocidades de decaimento dos sinais são relativas à sua viscosidade, composição etc.

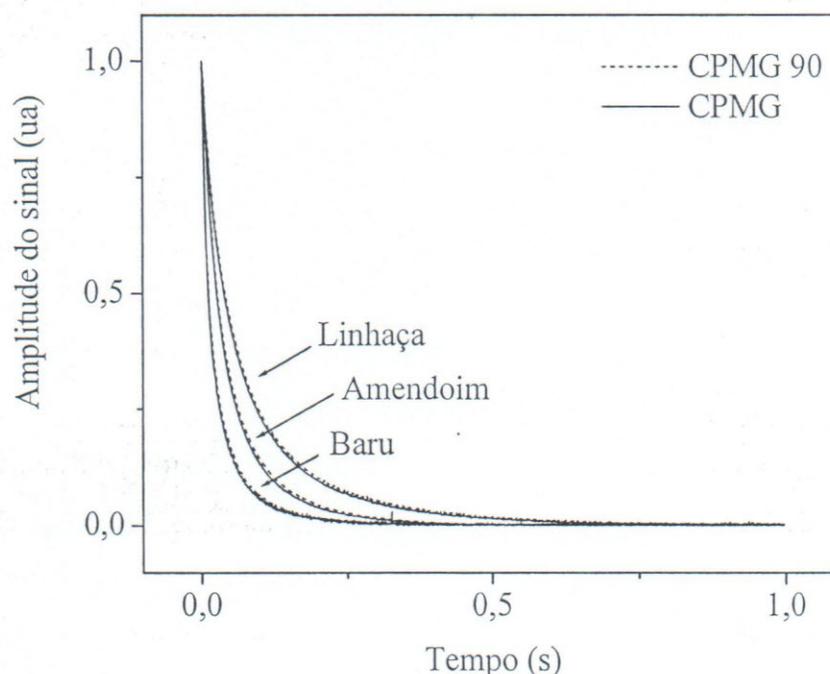


Figura 5. Curvas de decaimento do sinal de RMN obtidos com a seqüência CPMG convencional e CPMG90, das sementes de linhaça, amendoim e baru.

Para uma análise quantitativa das similaridades dos dois métodos, fez-se uma correlação entre os T2 medidos para 24 sementes de diferentes espécies. Na Figura 7 a curva de calibração entre os dados medidos com a CPMG convencional e CPMG90 com um coeficiente de correlação $r = 0,997$, que confirma que a técnica CPMG90 pode substituir totalmente as medidas realizadas com CPMG convencional para a determinação da qualidade do óleo em sementes.

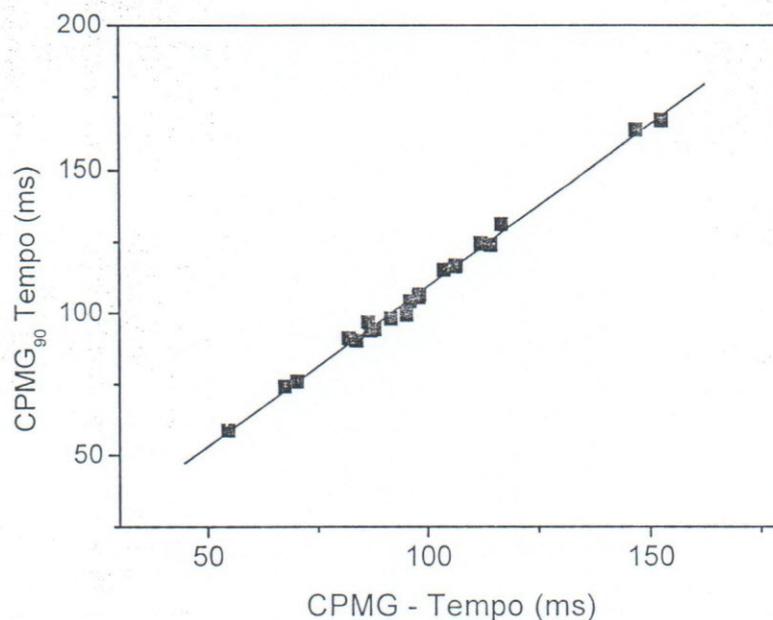


Figura 6. Curva de correlação nos tempos de relaxação T2 medidos com as técnicas de CPMG convencional e CPMG90.

É possível observar pela equação 1, que o ângulo de excitação (θ) dos spins nucleares pode ser ajustado tanto pelo intensidade de B1, quanto pelo tempo Tp. Desses fatores, a duração do pulso deve ser curta o suficiente para que a banda de irradiação gerada, seja superior a banda espectral a ser analisada ($8f$), onde $T_p \ll 1/\Delta f$. Assim, na seqüência CPMG convencional, o valor máximo de Tp é limitado pelo tempo de duração do pulso de 180 graus, uma vez que a largura do pulso de 90 graus é metade desse valor e conseqüentemente tem o dobro da banda de irradiação. Com isso para a técnica CPMG90, pode-se apenas reduzir o tempo de duração do pulso, que leva a uma redução de 50% da potência incidida, mas com o dobro da banda espectral ($8f$) necessária. Uma maneira mais eficiente de reduzir a potência consiste em utilizar a largura dos pulsos de 90 graus com a mesma duração dos pulsos de 180 graus da técnica CPMG convencional. Para isso reduz se pela metade a intensidade de B1, que depende da potência (P) do pulso de rf do fator de qualidade da sonda (Q), da freqüência de ressonância (ν_0) e do o volume da bobina detectora (V) de acordo com a equação 2.

$$B_1 \cong 3 \left(\frac{PQ}{\nu_0 V} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

onde P é a dado em Watts (W), ν_0 em megahertz (MHz) e V em cm³.

4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

Como Q , v_0 e V são constantes para uma mesma sonda/espectrômetro, o $B1$ depende apenas da raiz quadrada da potência, ou seja, $B1 \sim P^{1/2}$. Assim, a redução de $B1$ pela metade para os pulsos de 90 graus equivale a uma redução de 4 vezes da potência incidida na amostra. Experimentalmente isso está equivalendo a uma mudança de potência de cerca de 100W usada na técnica CPMG convencional para apenas 25W em CPMG90.

4 CONCLUSÃO

A técnica CPMG90 tem desempenho idêntico a CPMG convencional, podendo ser utilizada para a análise da qualidade de óleo de sementes. A CPMG90 apresenta a vantagem de utilizar apenas 25% da potência da técnica convencional, aumentando a durabilidade do espectrômetro com uma menor influência na temperatura da amostra. Essa técnica já está sendo utilizada para seleção de sementes de amendoim com alto teor de ácido oléico que é o componente ideal para produção de biodiesel. O ácido oléico tem maior estabilidade oxidativa que os ácidos graxos poliinsaturados, como o linoléico e linolênico, principais componentes da maioria das sementes oleaginosas e a mesmo tempo menos viscoso que os ácidos graxos saturados e ricinoléico.

5 AGRADECIMENTOS

À FAPESP, FINEP, CNPq e CAPES pelas bolsas e financiamento do projeto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBURG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. *Analytical Chemistry*, v. 72, p. 2401-2405, 2000.

AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUSA, A. A.; ENGELSBURG, M. Continuous wave free precession: a practical analytical tool for low resolution NMR measurements. *Analytica Chimica Acta*, v. 478, p. 313-320, 2003.

COLNAGO, L. A.; TORRE NETO, A.; FERRAZINI, J.; OSTE, R. *Espectrômetro de RMN para análises quantitativas*. INPI, MU7602306-0, 1996.

Colnago, L.A.; ENGELSBURG, M.; SOUZA, A.A.; Barbosa, L.L. High-throughput, non-destructive, determination of oil content in intact seeds by continuous wave free precession nuclear magnetic resonance. *Analytical Chemistry*, v. 79, p. 1271-1274, 2007.

KNOTHE, G. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel*, v. 84, p. 1059-1065, 2005.

PRESTES, R.A.; COLNAGO, L.A.; FORATO, L.A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E.H.; CARRILHO E. A rapid and automated low resolution NMR method to select intact oilseeds with a modified fatty acid profile. *Analytica Chimica Acta*, 2007. No prelo.

VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. V.; ALEM, N. E. R.; COLNAGO, L.A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 173, p. 34-39, 2005.