

UM MÉTODO NÃO DESTRUTIVO POR RMN DE BAIXO CAMPO E QUIMIOMETRIA PARA CLASSIFICAÇÃO DE SEMENTES DE MAMONA EM FUNÇÃO DO PERFIL ESPECTRAL DO ÓLEO

Everaldo Paulo de Medeiros¹, Poliana Harlanne Dantas Felix², Júlia Karla A. Melo², Aurelir Nobre Barreto¹, (*in memorian*), Joab Josemar Vitor R. do Nascimento³

¹Embrapa Algodão, everaldo@cnpa.embrapa.br, aurelir@cnpa.embrapa.br; ²UEPB, polianafelix@terra.com.br; UFCG, joabjosemarvitor@hotmail.com

RESUMO – A mamona se destaca como uma oleaginosa de alto teor e qualidade em óleo. A alta viscosidade do óleo deve-se a elevada concentração do ácido ricinoléico. Esse comportamento decorre da presença de ligações de hidrogênio do grupo -OH. A RMN de baixo campo é uma das técnicas empregadas para determinação do teor de óleo em sementes oleaginosas devido às vantagens de ser rápida e não destrutiva. Entretanto, poucos trabalhos na literatura relatam aplicações qualitativas devido a complexidade de sobreposição espectral. Mas, em sementes oleaginosas, o perfil espectral de RMN pode variar em função da composição de ácidos graxos. E, nesse contexto, a utilização de quimiometria pode ser empregada para definir novas estratégias analíticas. Neste trabalho preliminar objetivou-se desenvolver um método rápido e não destrutivo para classificação de sementes de mamona, provenientes de diferentes tratamentos com águas residuárias, quanto ao perfil espectral de RMN ^1H . Utilizou-se um planejamento experimental em blocos ao acaso com três tratamentos (dois de água residuária e um de água de abastecimento). Foi usada a cultivar BRS Energia a qual cultivou-se em lisímetros de solo monolítico. A coleta de sementes foi realizada após 100 dias do plantio. As medidas do teor de óleo e os espectros correspondentes foram realizados em RMN de baixo campo. A análise quimiométrica envolveu um pré-tratamento dos espectros e, em seguida, análise de componentes principais (PCA). Os resultados obtidos foram satisfatórios para classificação das sementes oriundas dos tratamentos com 100% de água residuária e 100% de abastecimento. Para o teor de óleo não houve diferença estatística entre os tratamentos. Mas o aumento do teor de óleo em T3 superou o T1 em 11,4%. Entretanto, diferenças no perfil espectral do óleo permitiram classificar os tratamentos usando duas componentes principais. As características observadas podem estar relacionadas com alterações de ácidos graxos em relação aos tratamentos. Diferenças de composição de ácidos graxos pode ser o principal fator no perfil dos espectros de RMN ^1H . Portanto, o uso de RMN combinando quimiometria pode ser uma nova estratégia para prospecção de oleaginosas de forma rápida e não destrutiva.

Palavras-chave: *Ricinus communis*, águas residuárias, irrigação, PCA.

INTRODUÇÃO

A mamona é uma oleaginosa com teor de óleo em média de 50% (m/m). A composição deste óleo predomina o ácido ricinoléico com concentração de cerca de 90% (m/m). Este ácido graxo confere diversas propriedades físico-químicas interessantes, além de alta viscosidade devido à formação de ligações de hidrogênio intermolecular dos grupos hidroxilas (-OH).

O fenômeno de RMN pode ser observado em qualquer espécie que possua um spin magnético total $I > 0$ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Em geral, o fenômeno é observado em isótopos com número ímpar de prótons ou nêutrons. O hidrogênio é a espécie mais explorada nas aplicações com RMN devido a sua abundância isotópica e sensibilidade.

A espectroscopia de RMN de baixo campo (frequências < 60 MHz) é uma técnica que se aplica a núcleos de ^1H de espécies químicas no estado líquido mesmo em amostras sólidas. Como é o caso do teor de óleo e umidade em sementes. A RMN de baixo campo é utilizada em determinações quantitativas de forma não destrutiva e não invasiva empregando pouca instrumentação, com um mínimo de amostra, de forma rápida, preservando sua constituição natureza. Porém, como ferramenta analítica sua aplicação para sementes tem sido restrita às determinações descritas. E, além disso, os instrumentos disponíveis são de alto custo. Entretanto, novas aplicações empregando medidas espectrais de RMN de baixo campo associando quimiometria têm permitido explorar novas estratégias analíticas expedidas em sementes oleaginosas (PRESTES et al, 2007).

No cenário atual dos biocombustíveis há um grande interesse por análises não invasivas ou destrutivas em sementes e grãos de forma rápida e seletiva de materiais graxos com maior potencial para produção de biodiesel (KNOTHE; STEIDLEY, 2005; KNOTHE et al, 2006). No entanto, poucos estudos tem sido realizados explorando a RMN H^1 e quimiometria para construção de modelos de classificação e de predição da qualidade de óleos vegetais diretamente em sementes oleaginosas. Nesse contexto, a partir da previsão da qualidade do óleo (ácidos graxos) ainda na semente é possível realizar a avaliação e seleção de materiais com melhor qualidade para atender altos padrões de biodiesel (KNOTHE; STEIDLEY, 2005).

No tocante ao programa de biodiesel no Brasil, a mamoneira têm sido uma das oleaginosas mais promissoras para a região Nordeste. Entre as principais vantagens, destacam-se a alta produção de óleo e sua resistência à seca. Mas em regiões semi-áridas o suprimento hídrico pode ser crítico para alta produtividade. Porém uma forma viável de minimizar esse problema será o uso de águas residuárias. Além dos prováveis impactos ambientais que essa proposta poderá ocasionar, será fundamental observar seus efeitos sob as propriedades de composição do óleo obtido para síntese de biodiesel.

Neste trabalho objetivou-se a aplicação da RMN H^1 de baixo campo e técnicas quimiométricas (PCA) para avaliar a possibilidade de classificação de amostras de sementes de mamona (BRS Energia), oriundas de diferentes tratamentos com águas residuárias, quanto ao perfil espectral do óleo em sementes intactas.

MATERIAL E MÉTODOS

O planejamento experimental usado foi em esquema de blocos ao acaso, constituído de 3 repetições e 3 tratamentos: T1 (aplicações sucessivas com 100% água residuária), T2 (aplicações sucessivas com 50% de água residuária + 50% de água de abastecimento) e T3 (aplicações sucessivas com 100% de água de abastecimento). Os tratamentos foram submetidos a aplicações sucessivas por cerca de 95 dias correspondendo a um total de aplicação de 700 mm. Utilizou-se a cultivar BRS energia que foi semeada em uma coluna de solo monolítico indeformado revestido com um tubo de PVC com 0,7 m de diâmetro e 1,0 m de comprimento perfazendo uma capacidade de 380 L. O solo usado foi amostrado as margens do riacho de Bodocongó nas imediações do Bairro da Dinamérica em Campina Grande. A coleta da água residuária foi realizada no mesmo riacho a montante da bacia hidráulica do açude de Bodocongó em área da UFCG. Enquanto, foi usada água de abastecimento da distribuidora local (CAGEPA).

O plantio foi realizado em setembro de 2007, utilizando-se 4 sementes da cultivar BRS Energia por unidade experimental. Os frutos foram colhidos após cerca de 100 dias quando atingiram a maturação, os quais foram secos ao sol e descascados para medições posteriores.

As medidas de RMN foram realizadas em instrumento MQA Oxford 7005 com um eletroíma de 0,47 T. Para aquisição dos espectros foram feitas adaptações de uma sonda com um tubo de acrílico em formato cilíndrico com capacidade para cerca de 20 g de sementes.

A temperatura e umidade do ambiente foram controladas em 20 °C e 60%. As amostras permaneceram por 1 hora nestas condições antes das medidas. O sinal de 90° ($\pi/2$) foi obtido a 10,1 μ s e de 180° (π) a 20,2 μ s empregando uma frequência de 4,3 Mhz. Os espectros de eco foram registrados durante 25 s perfazendo 250 pontos (variáveis espectrais) com uma média de 32 varreduras. Todas as medidas foram realizadas com cinco repetições autênticas para cada amostra dos tratamentos utilizados.

Para as medidas quimiométricas cada espectro com 250 variáveis foi suavizado para remoção de ruído aplicando a técnica da média móvel com $n=14$. Em seguida, a linha de base dos espectros foi corrigida empregando o algoritmo de Savitzky-Golay usando uma janela de 15 pontos (7 a esquerda e 8 a direita), primeira derivada e ajuste com polinômio de segunda ordem. Uma análise de componentes principais (PCA) foi empregada usando validação cruzada para todos os espectros com 250 variáveis resultantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão ilustrados os espectros de RMN brutos e tratados para todas as amostras. As diferenças espectrais são intrínsecas de cada tratamento e pode relacionar-se com o perfil de ácidos graxos na composição do óleo.

O resultado obtido empregando a técnica PCA pode ser verificado na Figura 2. Pode-se constatar uma formação de agrupamentos e boa separação entre os tratamentos T1 e T3. O T2 é parcialmente classificado entre os grupo T1 e T3. Isso poderá ter sido em decorrência de T2 ser um tratamento contendo 50% de T1 e de T3.

O resumo da ANOVA para o teor de óleo é observado na Tabela 1. Nenhum tratamento foi estatisticamente relevante para o Teste F ao nível de 99% de probabilidade ($p \leq 0,01$). Com efeito, pode-se constatar um comportamento sistemático de T1, T2 e T3 no teor de óleo obtido. O aumento do teor de óleo em T3 superou o T1 em 11,4 % (Figura 3). Nas condições experimentais estudadas, o uso de água de baixa qualidade (água residuária) em relação a água de abastecimento não teve efeito significativo sobre o teor de óleo. Além disso, o solo utilizado tem características de saturação de alguns constituintes que estão sendo avaliados.

Contudo, o teor de óleo não deve ser estudado isoladamente sem considerar a composição de ácidos graxos. Em geral, a compensação de ácidos graxos no triglicerídio pode não modificar o teor total de lipídios, mas ter efeito em sua composição. Essas modificações estão relacionadas com propriedades como viscosidade, densidade, calor específico, solubilidade, entre outras. E no óleo de mamona poderá ser mais evidente em razão de modificações de concentração do ácido ricinoléico alterarem os espectros de RMN (H^1).

Nesse contexto, devido a alterações espectrais de RMN (H^1), a classificação entre T1 e T3 foi realizada adequadamente. Em T1 consta-se maior dispersão do agrupamento formado do que T3. Este fato pode ser explicado pela maior variação de composição da água de aplicação para T1 do que em T3. Como efeito, uma variação de comportamento no perfil de ácidos graxos pode ter causado maior influência. Além disso, a ocorrência de variações espectrais podem estar relacionadas a variações de composição de ácidos graxos e com isso possibilitar uma classificação aceitável dos tratamentos. Para esta comprovação encontra-se em andamento a determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa das amostras usadas neste trabalho. Segundo Prestes et al (2007) as variações espectrais de RMN H^1 são atribuídas a composição de ácidos graxos que podem ser combinadas para construção de modelos de reconhecimento de padrões. Porém, para sementes de mamona essa estratégia não tem sido aplicada devido a ocorrência do ácido ricinoléico ser intrínseco à mamona ao contrário de outras oleaginosas. Assim há possibilidade de identificar acessos de mamona com diferentes combinações de ácidos graxos dentro de um conjunto representativo.

CONCLUSÃO

A metodologia proposta neste trabalho permitiu classificar amostras de sementes de mamona oriundas de tratamentos com água residuária de forma rápida e não destrutiva em sementes intactas. A utilização dos espectros de RMN H¹ de baixo e de PCA foram satisfatórios para obter a identificação de amostras oriundas de água de residuária e de abastecimento. Em todos os tratamentos não houve diferença para teor de óleo ao nível de 99% de probabilidade. Entretanto, em termos relativos observou-se um percentual de T3 em relação a T1. Além disso, constatou-se mudanças no perfil espectral RMN H¹ de baixo para cada tratamento.

Finalmente, há possibilidade de utilização da metodologia proposta para implementação de procedimentos analíticos rápidos objetivando a identificação de acessos de banco germoplasma promissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 analyze oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 325-329, 2007.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. **FUEL**, v. 84, n. 9, p. 1059-1065, 2005.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. VAN; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

Tabela 1. Resumo da análise de variância do teor de óleo em sementes de mamona produzidas por de plantas submetidas à irrigação com diferentes tipos de água.

Teor de óleo		
Fonte de variação	G. L.	Quadrado médio
Blocos	2	2.78363 ns
Tratamentos	2	29.03610 ns
Resíduo	4	7.35378
C.V. (%)	-	4.88

Ns: Não significativo, pelo teste F.

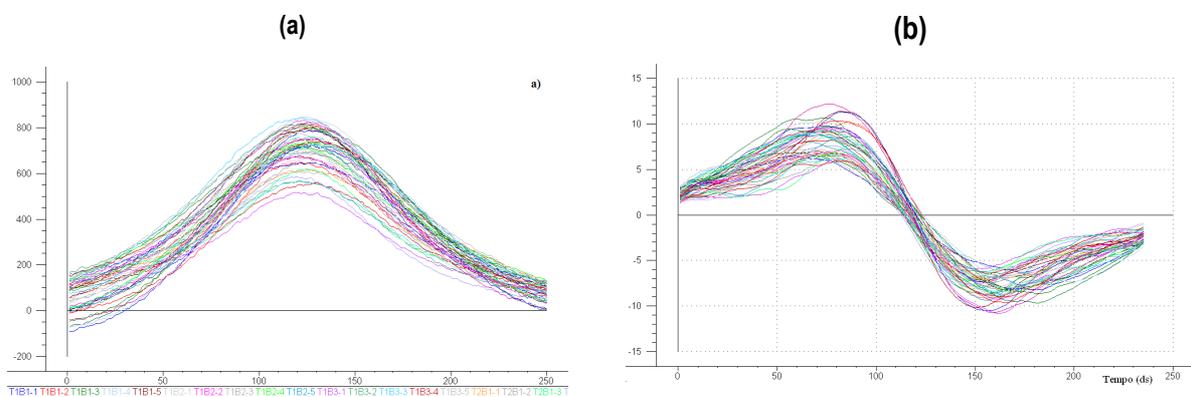


Figura 1. (a) Espectros brutos de RMN de baixo campo. (b) Espectros tratados com média móvel (n=14) e algoritmo de Savitzky-Golay (n=15) com primeira derivada e ajuste com polinômio de segunda ordem.

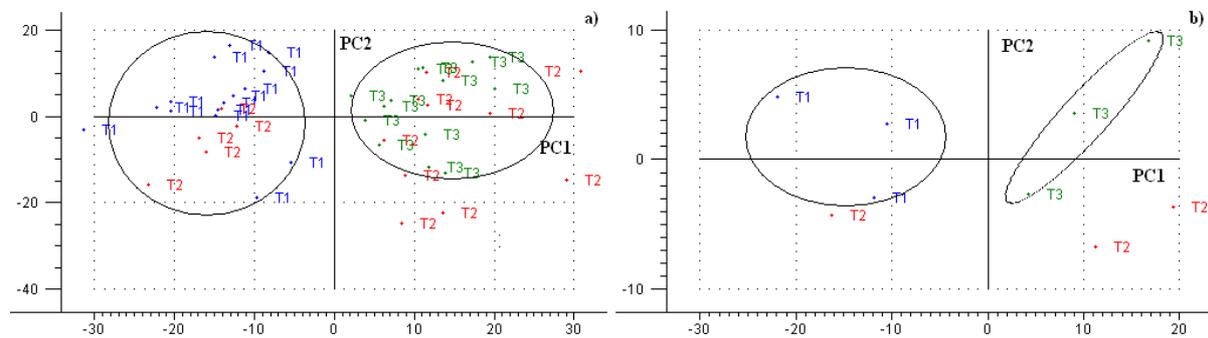


Figura 2. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) para as sementes obtidas dos tratamentos T1, T2 e T3. a) Gráfico com espectros de cinco repetições autênticas da mesma amostra. b) Gráfico com espectro médio de cinco repetições para cada tratamento individual.

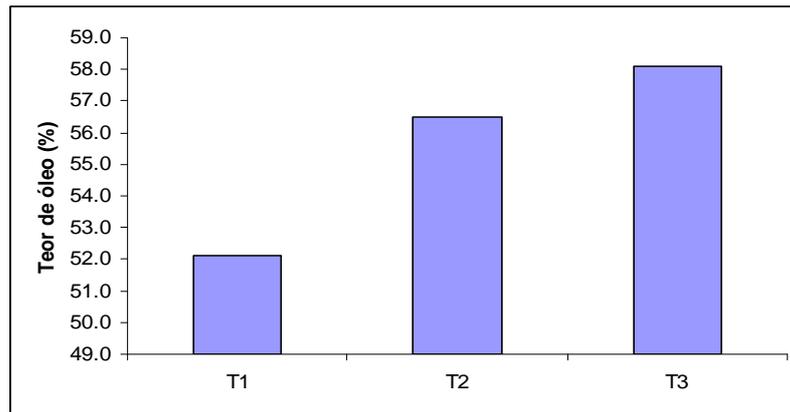


Figura 3. Teor de óleo em sementes produzidas por mamoneira submetidas à irrigação com diferentes tipos de água.