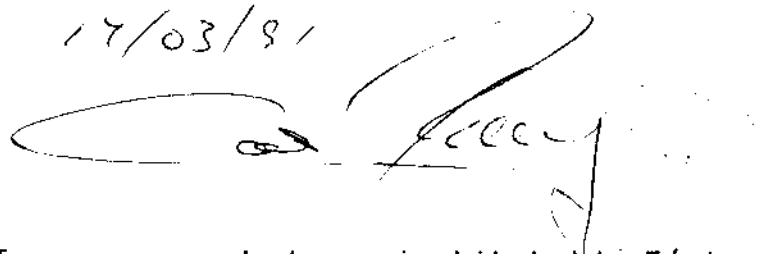


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN"

RESONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
E APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA E CÂNCER

Walter Mario Solano Reynoso

*Este exemplar corresponde a ridexas
fixas da tese defendida pelo
aluno e aprovada pela Comissão
Julgadora 17/03/91*



Tese apresentada ao Instituto de Física
"Gleb Wataghin" da Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP), para a obtenção
do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rettori

Campinas - São Paulo - Março de 1991.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, ao professor Carlos Rettori, que, além de orientar o presente trabalho teve a paciência e compreensão para eu poder culminar esta tese.

Agradeço, também, ao professor Gaston Barberis pela ajuda muitas vezes recebida.

Ao Gonçalo, técnico do Laboratório de Propriedades Magnéticas, com quem me inicie no manejo do equipamento de RMN, e pela ajuda que recebi sempre que necessário.

À Maria Amélia, colega do Laboratório, pelas correções finais do português do texto.

A todo o pessoal do Laboratório de Propriedades Magnéticas.

À Secretaria da Pós-Graduação do IFGW-UNICAMP.

Ao Dr. Ovidio Rettori, quem tornou possível realizar as medições nos tecidos de ratos.

Ao Claudio Ernani Mendes da Silva, com quem foi possível realizar o trabalho de gelatinização.

A meus irmãos, pelo estímulo e ajuda sempre recibida, em especial a minha irmã Martha.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram na realização do presente trabalho.

A realização deste trabalho foi possível graças ao suporte financeiro da CAPES.

A mis padres:
VICTOR y ARSENIA

À minha filhinha:
PRISCILA

R E S U M O

A ressonância magnética nuclear é uma técnica que já provou muita utilidade em aplicações práticas específicas, tanto em ciência e tecnologia de alimentos como em medicina. No presente trabalho, mediante RMN pulsada estudamos três diferentes aplicações:

1) A evolução dos tempos de relaxação, T_1 e T_2 , em diferentes órgãos de ratos inoculados com o tumor de Walker-256, em 4 sítios diferentes do animal. Nos tecidos estudados não apareceram metástases, e os órgãos mais afetados, desde o ponto de vista das medições T_1 e T_2 , foram o timo, fígado, adrenais e músculo, indicando probáveis efeitos a distância.

2) Mostramos que o processo de gelatinização de sistemas amido-água para diferentes concentrações e tempos de tratamento térmico, pode-se seguir através de medições da razão líquido/sólido que, mediante a definição do índice de liquefação relativo, dá informação da cinética de gelatinização.

3) São descritas medições de teor de óleo em sementes oleoginosas mediante técnicas tais como o decaimento de indução livre (FID), ecos de spin (spin echo) e Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Também são descritas, de modo geral, combinações dos métodos que permitem estimar, simultaneamente, conteúdo de óleo e umidade em sementes. Os métodos são rápidos e não destrutivos, permitindo diversas aplicações.

ÍNDICE

Página

INTRODUÇÃO.....	1
CAPITULO 1	
INTRODUÇÃO A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PULSADA.	
1.1 Fundamentos.....	4
1.2 Decaimento de indução livre (FID).....	16
1.3 A relaxação em ressonância magnética.....	22
1.4 Ecos de spin (Spin echo, SE).....	25
1.5 Sequência de pulsos de Carr e Purcell.....	30
1.6 A modificação de Meiboom e Gill.....	33
1.7 Sequências mais comuns para medir T1.....	37
i) Método de inversão e recuperação (IR).....	37
ii) Recuperação por saturação.....	40
iii) Saturação progressiva.....	40
1.8 Método do decaimento de indução livre (método do fator F)...	41
CAPITULO 2	
ESTUDO DE TECIDOS DE RATOS COM CANCER	
2.1 Introdução.....	44
2.2 Características do tumor.....	47
2.3 Procedimento.....	48
2.3.1 Medições RMN.....	49
2.3.2 Evolução da enfermidade.....	49
A.-Ratos com tumor inoculado.....	49
B.-Ratos com restrição alimentar.....	52
C.-Ratos com edema induzido.....	53
D.-Dependência de T2 com o espaçamento interpulso na sequência CPMG (Dispersão T2-CPMG).....	53

2.4 Discussão e conclusões.....	54
Tabelas.....	57
Gráficos.....	65

CAPÍTULO 3

GELATINIZAÇÃO

3.1 Introdução.....	80
3.1.1 O amido.....	81
3.1.2 Hidratação.....	84
3.1.3 Gelatinização.....	85
3.2 Procedimento, resultados e discussão.....	88
3.2.1 Medições de tempos de relaxação.....	88
3.2.2 Decaimento de indução livre (FID) do sistema amido-água.....	90
3.2.3 Relação líquido/sólido na gelatinização.....	90
3.3 Conclusões.....	94
Tabelas.....	96
Gráficos.....	104

CAPÍTULO 4

SEMENTES OLEAGINOSAS

4.1 Introdução.....	110
4.2 Métodos de RMN pulsada para estimação de teor de óleo em sementes.....	111
4.2.1 O método do decaimento de indução livre (FID) (o método do fator F).....	111
4.2.2 O método dos ecos de spin (spin echo).....	115
4.2.3 O método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).....	117
4.3 Combinação dos métodos para estimação simultânea de óleo	

e unidade em sementes.....	118
4.4 Alguns resultados experimentais.....	121
4.5 Conclusões.....	124
Tabelas.....	125
Gráficos.....	128
CONCLUSÕES.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	131

INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica condicionada à existência de núcleos atômicos com momentos dipolares magnéticos diferentes de zero tais como H^1 , H^2 , C^{13} , F^{19} , Na^{23} , P^{31} , etc.

Basicamente estamos interessados em núcleos de H^1 que têm spins $1/2$. A descrição feita será para sistemas de spin nuclear $1/2$ cuja descrição é fundamentalmente a mesma para núcleos de spins diferentes de $1/2$.

Existem duas formas de observar a RMN. A primeira, inicialmente usada por Bloch e independentemente pelo grupo de Purcell em 1946, é a chamada de onda contínua (continuous wave, cw) porque o campo de radiofrequência (rf) é aplicada continuamente, enquanto se faz a observação do espectro. A segunda, sugerida por Bloch, é usar pulsos curtos de radiofrequência numa sequência previamente definida, e denomina-se RMN pulsada.

Já que o presente trabalho consiste no uso de aplicações da RMN pulsada, as considerações básicas aqui descritas, visarão o entendimento das diferentes técnicas mais habitualmente usadas para medições com RMN pulsada, sem levarmos em conta a RMN-Transformada de Fourier, desde que estamos usando somente baixa resolução, por limitações de equipamento.

O descobrimento por Erwin Hahn dos ecos de spin (Spin Echo, SE) em 1950, foi o início do desenvolvimento dos métodos

pulsados até o desenvolvimento atual da espectroscopia bi, tri-dimensional e tomografia por RMN. A introdução da técnica da transformada de Fourier por Ernst e Anderson em 1966 foi fundamental para o desenvolvimento desse campo de trabalho.

A importância do uso da RMN pulsada, além de ter muitas aplicações que de outro modo seriam impossíveis por RMN de onda contínua, deve-se às rápidas medições, comparadas com a RMN-cw, permitindo economia de tempo e o melhoramento da razão sinal/ruído.

Como veremos, a relaxação do sistema de spins desempenha um papel muito importante em experimentos de pulsos, daí a técnica pulsada proporcionar os métodos mais úteis geralmente usados em medições de tempos de relaxação.

No Capítulo 1 descreveremos resumidamente o fenômeno da ressonância magnética, em termos fenomenológicos, com uma introdução a técnicas pulsadas como o decaimento de indução livre (Free Induction Decay, FID); os ecos de spin (Spin Echo), a sequência de pulsos de Carr e Purcell (CP) com a posterior modificação de Meiboom e Gill (CPMG), útil para medir tempos de relaxação spin-spin (T_2); métodos mais comumente usados para medir tempos de relaxação spin-rede (T_1) tais como a Inversão e Recuperação (IR), etc. Finalmente será descrita o método do fator F, que usa o decaimento livre (FID) para medir a relação sólido/líquido em amostras que tem misturas de componentes sólidos e líquidos.

Estas técnicas permitem diferentes aplicações em diversos campos da ciência e tecnologia, das quais mencionaremos o que

foram ou estão sendo realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética do IFGW da UNICAMP:

- Estudo do teor de óleo em sementes (amendoim, milho, soja, girasol, mamona) para melhoramento genético de sementes oleaginosas.

- Medições de tempos de relaxação em tecidos de ratos inoculados com tumores cancerígenos e a sua evolução com a doença no animal.

- Estudos de gelatinização em sistemas amido- água.

- Endurecimento de pastas de cimento.

As três primeiras aplicações são o interesse do presente trabalho.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO À RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PULSADA

1.1 FUNDAMENTOS.

Trata-se de estudar o sistema de spins nucleares paramagnéticos, onde cada núcleo têm um momento angular de spin $\hbar I$, submetido a um campo magnético estático uniforme H_0 , considerado na direção do eixo z no sistema de coordenadas do laboratório. O momento de spin tem, associado a ele, um momento dipolar magnético μ , proporcional a $\hbar I$, obedecendo à relação.

$$\mu = \gamma \hbar I = g_N \beta_N I, \quad (1)$$

onde γ é o fator giromagnético do núcleo, g_N é um número adimensional chamado fator g nuclear, e β_N é o magneton nuclear igual a $e\hbar/2Mc$ (M é a massa nuclear).

A Hamiltoniana de interação entre um campo magnético externo H e o momento magnético está dada por

$$\mathcal{H} = -\mu \cdot H = -\gamma \hbar I \cdot H. \quad (2)$$

Restringimos o presente estudo aos prótons dos átomos de hidrogênio(H_1) que têm spin $1/2$, embora essas considerações tenham validade geral. Para spin $1/2$ no campo H_0 a energia é dada por

$$E = -\gamma \hbar H_0 m_I, \quad (3)$$

onde m_I assume os valores $+1/2$ ou $-1/2$. Assim, temos dos níveis de energia, $E_1 = -1/2 \gamma \hbar H_0$, $E_2 = +1/2 \gamma \hbar H_0$, onde E_1 é o nível

fundamental de energia e E_2 corresponde ao estado excitado. A energia necessária para produzir transições é dada por

$$\Delta E = E_2 - E_1 = \gamma \hbar H_0 = \hbar \omega_0, \tag{4}$$

tendo como expressão da frequência o termo

$$\omega_0 = \gamma H_0. \tag{5}$$

que é a condição de ressonância. Para núcleos, ω_0 está na faixa das radiofrequências.

Numa amostra com N spins não interagentes no equilíbrio térmico, a proporção entre os spins nos dois níveis de energia é dada por

$$N_2/N_1 = \exp(-\Delta E/kT), \tag{6}$$

onde N_1 e N_2 são o número de núcleos no nível fundamental e excitado, respectivamente. Esta diferença de populações é o que permite detectar as transições entre os dois níveis aplicando-se radiação de frequência $\omega_0 = \gamma H_0$. (Ver esquema na figura 1). Pode-se observar que aumentando a intensidade de H_0 a diferença na proporção entre as populações N_1 e N_2 cresce, o que também ocorre com a diminuição da temperatura T

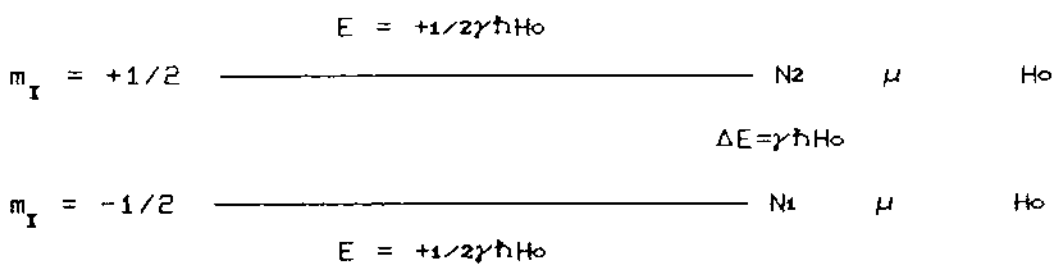


FIGURA 1. Diagrama dos níveis de energia para núcleos de spin 1/2.

Para produzir transições do nível inferior ao superior usa-se um campo magnético oscilante de amplitude H_1 aplicado perpendicularmente ao campo H_0 . Pela teoria das perturbações dependente do tempo, sabe-se que, a probabilidade de transição na unidade de tempo entre dois estados de momentos magnéticos m e m' é (Slichter [1]).

$$P_{m \rightarrow m'} = 1/2 \gamma^2 H_1^2 |\langle m | I | m' \rangle|^2 \delta(\omega_{m'} - \omega_m - \omega_0). \quad (7)$$

Isto dá uma linha de absorção ou emissão infinitamente aguda. Na realidade a função δ é substituída por uma função de forma $g(\omega)$ normalizada (Abragam [2]; Emsley, Feeney, Sutcliffe [3]),

$$\int g(\omega) d\omega = 1, \quad (8)$$

que dá uma descrição mais realista. Então, a Eq. (7) se transforma em

$$P_{m \rightarrow m'} = 1/2 \gamma^2 H_1^2 |\langle m | I | m' \rangle|^2 g(\omega). \quad (9)$$

Na presença do campo H_1 a variação com o tempo do número de spins N_1 , do nível inferior $-1/2$, é dada por

$$\frac{dN_1}{dt} = N_2 P_1 - N_1 P_2, \quad (10)$$

onde P_1 é a probabilidade $P_{-1/2 \rightarrow +1/2}$ dada pela Eq. (9) e P_2 corresponde à probabilidade de transição inversa. Sendo os elementos de matriz $\langle m | I | m' \rangle$ e $\langle m' | I | m \rangle$ iguais, temos que $P_1 = P_2 = W$. Logo a Eq. (10) fica

$$\frac{dN_1}{dt} = (N_2 - N_1)W = -nW, \quad (11)$$

onde $n = N_1 - N_2$. Se o número total de spins é $N = N_1 + N_2$, a Eq. (11) resulta

$$\frac{dn}{dt} = -2Wn, \quad (12)$$

com solução

$$n = n(0)e^{-2Wt},$$

sendo $n(0)$ o valor de n para $t = 0$. Quando a diferença de populações chega a zero, diz-se que o sistema está saturado.

Tendo em conta o acoplamento do sistema de spins à rede, a variação, com o tempo, da população N_1 é dada por uma relação similar à Eq. (10),

$$\frac{dN_1}{dt} = N_2W_1 - N_1W_2. \quad (13)$$

Aquí, W_1 representa a probabilidade de transição do estado $-1/2$ a $1/2$, e W_2 , a probabilidade de transição inversa. Em geral, W_1 não é igual a W_2 . Substituindo $N_1 - N_2$ por n e $N_1 + N_2$ por N na Eq. (13) obtemos

$$\frac{dn}{dt} = N(W_2 - W_1) - n(W_2 + W_1). \quad (14)$$

Se

$$n_0 = \frac{N(W_2 - W_1)}{W_2 + W_1} \quad (15)$$

e

$$\frac{1}{T_1} = (W_2 + W_1), \quad (16)$$

a Eq. (14) fica

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1}, \quad (17)$$

cujas solução é

$$n = n_0 + Ae^{-t/T_1}. \quad (18)$$

T_1 caracteriza o tempo necessário para atingir o equilíbrio tér-

mico, denominado tempo de relaxação spin-rede ou longitudinal. n_0 é a diferença final de equilíbrio da quantidade de spins.

A relação que combina a diferença de populações e atua o campo de radiofrequência, usando as expressões (12) e (17), resulta

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0}{1 + 2WT_1} \quad (20)$$

Da Eq. (7), ou (9), nota-se que W depende do quadrado da amplitude do campo de rf. Quando a amplitude H_1 cresce, n tende a ser pequeno e no limite se diz que o sistema de spins está saturado.

Nos processos onde intervêm T_1 , o sistema de spins está trocando energia com a rede, ou seja, com sistemas externos ao sistema de spins considerado. Como veremos depois, existe outro mecanismo de relaxação chamado de spin-spin ou transversal, onde o sistema de spins não troca energia com sistemas externos. Esta é a interação entre os mesmos elementos do sistema de spins sob consideração.

Para se ter uma imagem do comportamento dinâmico dos momentos magnéticos na presença dum campo magnético H , a equação quântica dos valores médios do observável A ,

$$\frac{d\langle A \rangle}{dt} = \frac{1}{i\hbar} \langle [A, \mathcal{H}] \rangle + \left\langle \frac{\partial A}{\partial t} \right\rangle, \quad (21)$$

nos conduz a uma equação para o comportamento médio de μ ,

$$\frac{d\langle \mu \rangle}{dt} = \frac{1}{i\hbar} \langle [\mu, \mathcal{H}] \rangle, \quad (22)$$

onde $\mathcal{H}$ é a Hamiltoniana do sistema e μ não depende explicitamente do tempo. Assim, chegamos a uma equação coincidente com o comportamento dinâmico clássico,

$$\frac{d\mu}{dt} = \gamma \mu \times H. \quad (23)$$

Como a magnetização, M , é o momento dipolar por unidade de volume, pode-se escrever uma equação análoga à (23),

$$\frac{dM}{dt} = \gamma M \times H. \quad (24)$$

O raciocínio de Bloch [4], seguindo a Eq. (17), conclui que a diferença de populações n dá uma magnetização na direcção do campo H_0 tal que

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1}. \quad (25)$$

Da mesma forma, para a direcção transversal introduz-se um tempo de relaxação T_2 , em geral diferente de T_1 , denominado relaxação spin-spin ou transversal. Assim, Bloch [4] propõe equações, de carácter fenomenológico, para descrever o comportamento dinâmico do sistema de spin num campo magnético. O conjunto de equações escrita em forma compacta é

$$\frac{dM}{dt} = \gamma (M \times H) - \frac{M_x i + M_y j}{T_2} - \frac{M_z - M_0}{T_1} k. \quad (26)$$

Quando é aplicado um campo $H_0 = H_0 k$, constante, junto com o campo de rf, as soluções constam de uma parte transiente e outra estacionária. Estes dois tipos de soluções definem os dois tipos de técnicas usadas nos experimentos de RMN, a pulsada para efeitos transientes e a estacionária para onda contínua. Existem combinações dos dois tipos de técnicas.

A imagem clássica dada pela Eq. (23) ou (24), conjuntamente com as equações de Bloch, nos ajudarão a compreender a técnica de pulsos usada em RMN, e estão descritas em livros básicos (Slichter [1], Abragam [2], Farrar and Becker [5], Fukushima

and Roeder [6], Sóhar [7], e publicações originais [4], [9], [10], [11] e [13].

A Eq. (23) nos diz que, em qualquer instante de tempo, as variações do momento dipolar μ são perpendiculares tanto a μ como a H . Se $H = H_0$ é estático, a evolução de μ descreverá uma superfície cônica com vetor de módulo constante (ver Figura 2).

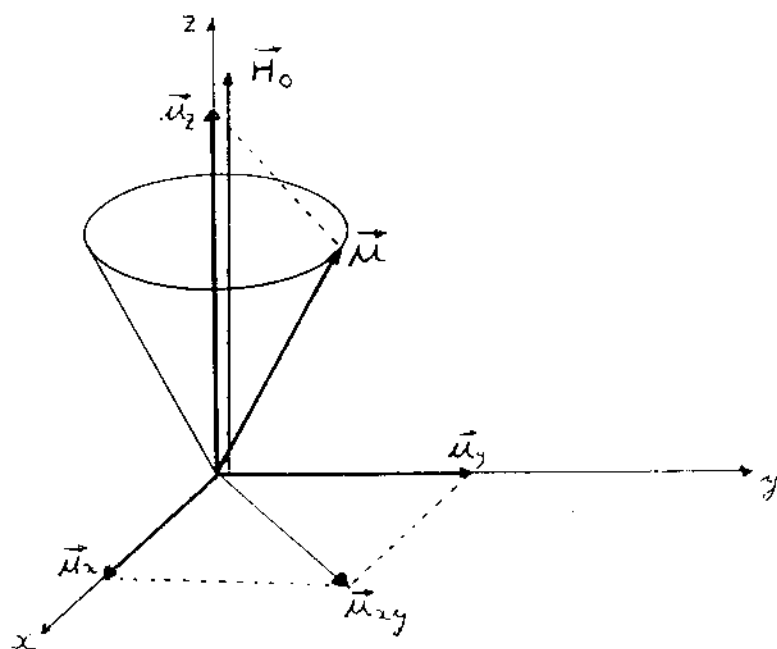


Fig. 2. O vetor momento magnético junto com as suas componentes transversais e longitudinal. Mesmo vale para a magnetização M

Esta solução pode ser obtida mais facilmente usando-se um sistema de coordenadas rotante (Rabi, Ramsey, Schimminger[8]). A variação do vetor A , dA/dt , passando ao sistema girante, de velocidade angular ω , é dada por

$$\frac{dA}{dt} = \frac{dA'}{dt} + \omega \times A, \quad (27)$$

onde dA'/dt denota a derivada no sistema rotante. Logo, a Eq. (23) escrita no sistema girante dá

$$\frac{d\mu'}{dt} = \mu \times (\gamma H_0 + \omega). \quad (28)$$

Se escolhermos o sistema que gira com uma frequência tal que

$$\gamma H_0 + \omega = 0,$$

então,

$$\frac{d\mu'}{dt} = 0, \quad (29)$$

e $\omega = -\gamma H_0$ ($\omega = \gamma H_0$). Isto significa que, quando o sistema gira com a frequência $\omega = \gamma H_0$, o vetor μ é estacionário nesse sistema, sendo a frequência de rotação denominada de frequência de Larmor que coincide com a frequência de ressonância, $\omega = \gamma H_0$, dada pela Eq. (5).

Já que para produzir a ressonância precisa-se de um campo de rf para alterar as populações relativas dos spins, vamos estudar o efeito que produz o campo H de rf. O que se quer é mudar a orientação de μ da posição mostrada na figura 2, onde μ tem componente $+\mu_z$, para outra que tenha $-\mu_z$ (para inverter a população). Isso pode-se conseguir fazendo com que μ gire em torno de H_1 , de modo que μ_z mude, com a condição de ser H_1 perpendicular a H_0 . Poderia-se escolher a direção x ou y de modo a ter H_1 constante no sistema girante.

Se escolhemos um campo da forma

$$H_1 = H_1(\cos\omega t x + \sin\omega t y), \quad (30)$$

com componentes

$$H_{1x} = H_1 \cos\omega t \quad (31)$$

$$H_{1y} = H_1 \sin\omega t$$

no sistema de laboratório, este mesmo campo no sistema girante, com frequência ω , dará

$$H_1 = H_1 x', \quad (32)$$

onde no sistema girante, as componentes z' e z coincidem entre si e os componentes x', y' em rotação giram em torno de z' , com velocidades angulares ω . Da mesma forma que se pode representar um campo circularmente polarizado por seus componentes perpendiculares linearmente polarizados (equações 31), um campo linearmente polarizado pode ser decomposto em componentes circularmente polarizados, tal que girem em sentidos contrários com frequências ω e $-\omega$. (ver Fig.3). Neste caso, na condição de ressonância, apenas um componente será efetiva; a outra produz efeitos de segunda ordem (Abragam [2]).

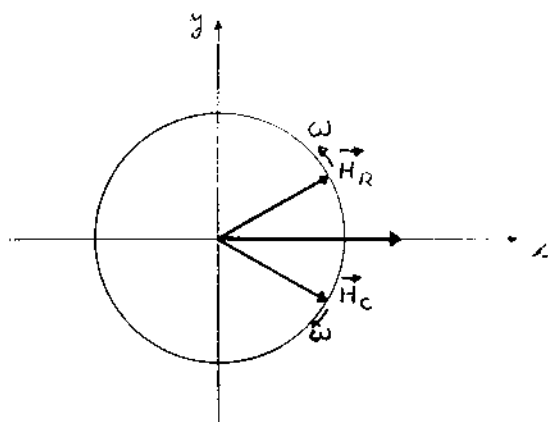


Fig. 3. Componentes rotantes do campo H_1 .

Assim, introduzindo a Eq. (32) na Eq. (28), no sistema girante, temos

$$\frac{d\mu'}{dt} = \mu \times (\gamma H_0 + \omega + \gamma H_1). \quad (33)$$

Para a condição de ressonância ($\omega = -\gamma H_0$) fica

$$\frac{d\mu'}{dt} = \mu \times (\gamma H_1). \quad (34)$$

Analogamente à interpretação da Eq. (23), a (34) nos diz que μ gira em torno de H_1 , com frequência angular $\omega_1 = \gamma H_1$, no sistema em rotação (ver Fig. 4).

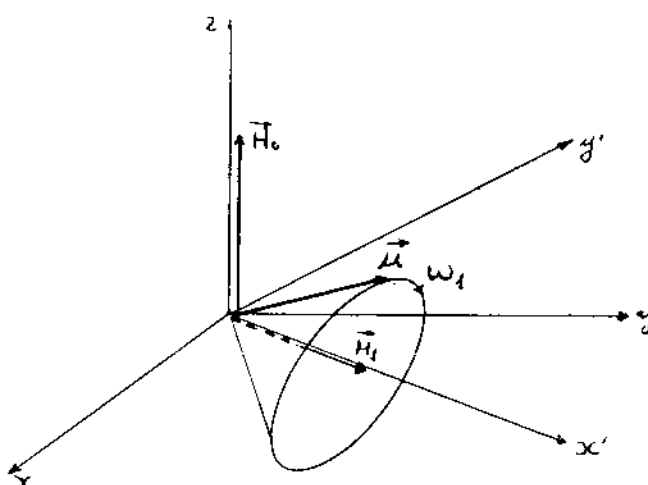


Fig. 4. Movimento de μ em torno de H_1 no sistema rotante na condição de ressonância.

O movimento de μ no sistema de laboratório é mais complicado já que μ está girando também em torno do campo H_0 (eixo $z'=z$). A trajetória do movimento está desenhada na Fig. 5, que vem a ser uma espiral de superfície esférica. Na prática geral o módulo de H_0 é muito maior que H_1 , tal que o giro em torno de z é maior que em torno do eixo x ($\omega_0 \gg \omega_1$).

Esta imagem nos leva a pensar que o vetor μ está girando e se afastando do eixo z em ângulos diversos, $40^\circ, 90^\circ, 160^\circ, 180^\circ$, etc.; que vai depender do tempo e da frequência ($\omega_1 = \gamma H_1$), segundo $\theta = \omega_1 t$.

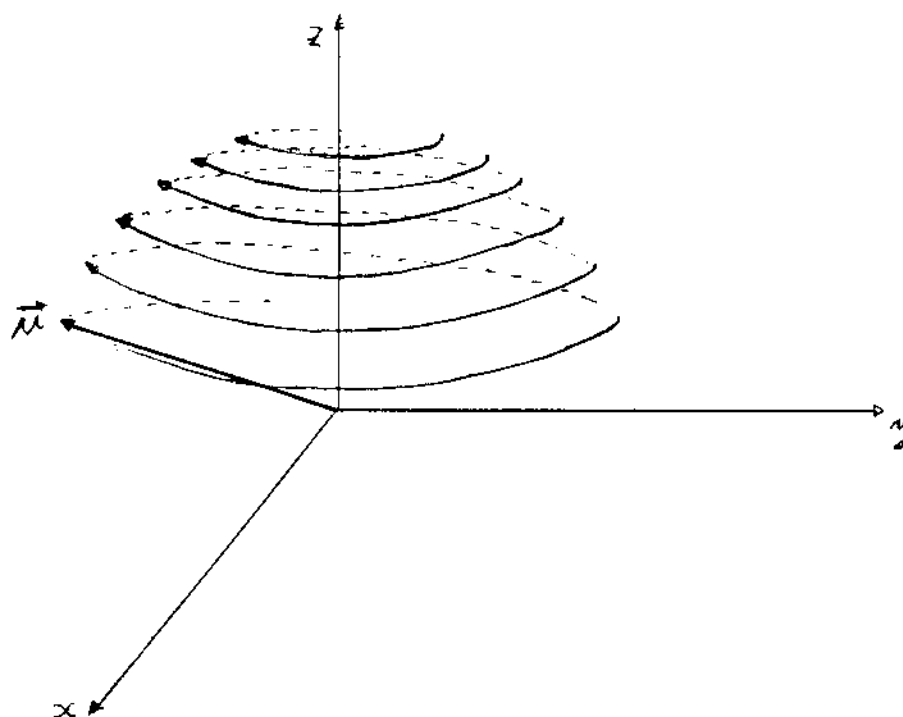


Fig. 5. Movimento de μ no sistema de laboratório

Para maior simplicidade, já que os planos $x-y$ e $x'-y'$ estão superpostos, vamos descrever no sistema giratório o movimento de μ que obedecem as equações (23) e (24). Para uma magnetização M_0 que inicialmente se encontra no eixo z (em presença do campo constante H_0), μ girará com velocidade angular ω_1 no plano $z - y'$ quando o campo H_1 atuar na direção x' . O ângulo de giro é

$$\theta = \omega_1 t = \gamma H_1 t \quad (35)$$

Esta relação é fundamental para o uso do método de pulsos.

Se o valor de $\gamma H_1 t$ é tal que $\theta = \pi/2$, se diz que está agindo um pulso de rf de 90° . Quando $\gamma H_1 t = \pi$, o pulso é de 180° , etc., (ver na Fig. 6).

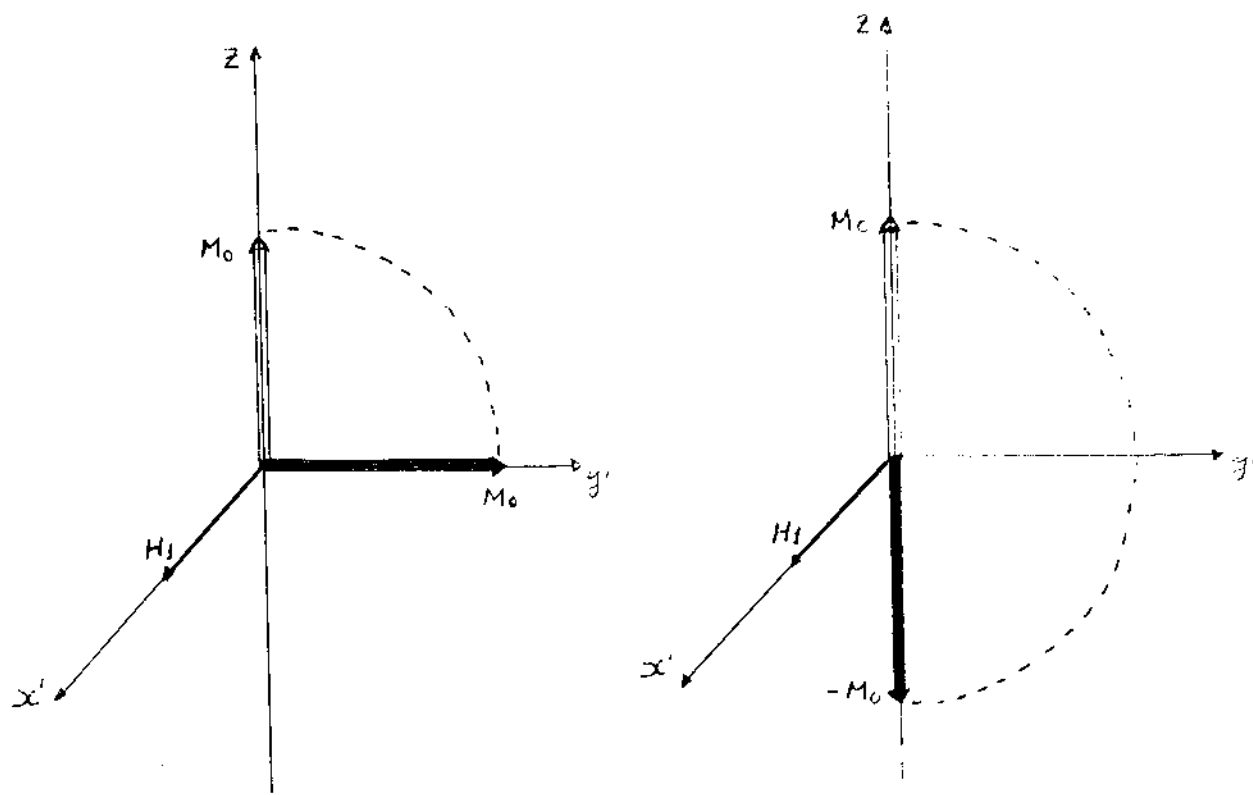


Fig. 6 (a) Pulso de 90° . (b) Pulso de 180° .

1.2 DECAIMENTO DE INDUÇÃO LIVRE (FID).

A resposta do sistema às aplicações de pulsos pode ser estudada com ajuda das equações de Bloch (equações (26)), as quais transformadas no sistema girante dão o sistema de equações abaixo (estamos usando d/dt para o sistema rotante).

$$\frac{dM_z}{dt} = -\gamma M_y H_1 + \frac{M_0 - M_z}{T_1},$$

$$\frac{dM_x}{dt} = +\gamma M_y (H_0 - \omega/\gamma) - \frac{M_x}{T_2}, \quad (36)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma M_z H_1 - \gamma M_x (H_0 - \omega/\gamma) - \frac{M_y}{T_2}.$$

Para gerar o campo de rf usa-se uma bobina colocada no campo H_0 , de modo que o campo de rf fique perpendicular a H_0 . O esquema está mostrado na Fig. 7. Para um pulso de 90° , por exemplo, depois que a magnetização chega ao eixo y' (Fig. 6(a)), este retornará a seu valor original de maneira que a recuperação de M_0 na direção z está governada pelo tempo de relaxação spin-rede, T_1 , e o desaparecimento da magnetização no plano $x-y$ é governada por T_2 .

O retorno da magnetização ao seu valor original, induz uma corrente que é captada pela mesma bobina geradora ou outra semelhante. Na verdade, detecta-se o componente transversal da magnetização que vai decaindo até o valor zero.

Do uso das equações de Bloch (Eqs(36)), na condição de ressonância ($H_0 = \omega/\gamma$), resolvidas para as condições depois do pulso de 90° , obtemos.

$$\begin{aligned} M_x &= 0, \\ M_y &= M_0 e^{-t/T_2}, \end{aligned} \quad (37)$$

no sistema girante. Isto gera no detetor uma voltagem que decai livre e exponencialmente, chamado decaimento de indução livre (FID). Na realidade o decaimento dado pela equação anterior é válido apenas para o conjunto de spins que tem a frequência de Larmor ω_0 . Devido à inhomogeneidade do campo H_0 na amostra (algo inevitável), existem conjuntos de spins de frequências menores e maiores que ω_0 . Cada conjunto de spins com a mesma frequência ω_i de Larmor denominam-se de spins isocromáticos. O decaimento exponencial puro resulta de um pulso de rf aplicado exatamente à frequência de ressonância de um tipo de núcleos isocromáticos. Este decaimento mede diretamente o decréscimo em M_{xy} através de um detector que tem a referência de fase do campo de rf e que responde continuamente à magnetização que tem a relação de fase fixada a H_1 (ver Farrar and Becker [5]).

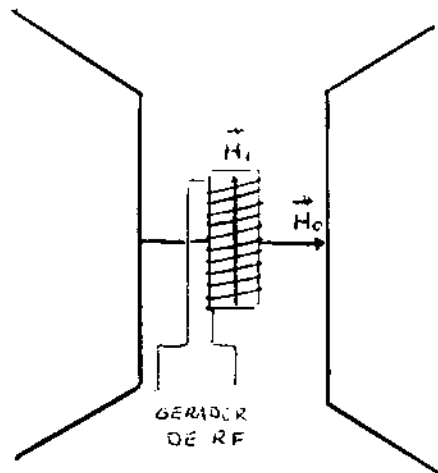


Fig. 7. Esquema do experimento de RMN.

Na figura 8 está mostrada a mudança da magnetização a partir de seu estado inicial (depois da aplicação do pulso de 90°). Inicialmente, na presença de H_0 , os momentos nucleares precessam com fase aleatória estacionária. Os momentos magnéticos estão estatística e uniformemente distribuídos sobre o cone de precessão (Fig. 8(a)). Quando o pulso H_1 está agindo, os momentos magnéticos e a magnetização estão se inclinando para gerar M_y' (Fig. 8(b)). Na figura 8(c) a magnetização M_y' está já estabelecida um instante após da ação do pulso. Como inicialmente não existia magnetização no plano $x'y'$ (Fig. 8(d)), os momentos magnéticos tem que recuperar sua fase estacionária chamada memória de fase, na qual se dá a troca de energia entre os momentos nucleares, isto é, está se produzindo a relaxação transversal T_2 ou spin-spin. Na figura 8(e) a magnetização transversal foi reduzida a zero, onde atinge-se a recuperação da fase estacionária, mas a magnetização no eixo z não alcançou seu valor original M_0 e continua a troca de energia com a rede (relaxação longitudinal T_1). Concluído o processo de recuperação, os momentos nucleares e a magnetização chegam ao estado inicial da figura 8(a).

Logo, em geral, tem-se que

$$T_2 \leq T_1 \quad (38)$$

Como se diz, a inhomogeneidade do campo faz com que os núcleos com diferentes frequências ω_i precessem mais rápido ou mais lentamente que ω_0 (que o sistema girante). Como M roda relativo ao sistema girante, o detector exhibe tanto o decaimento expo-

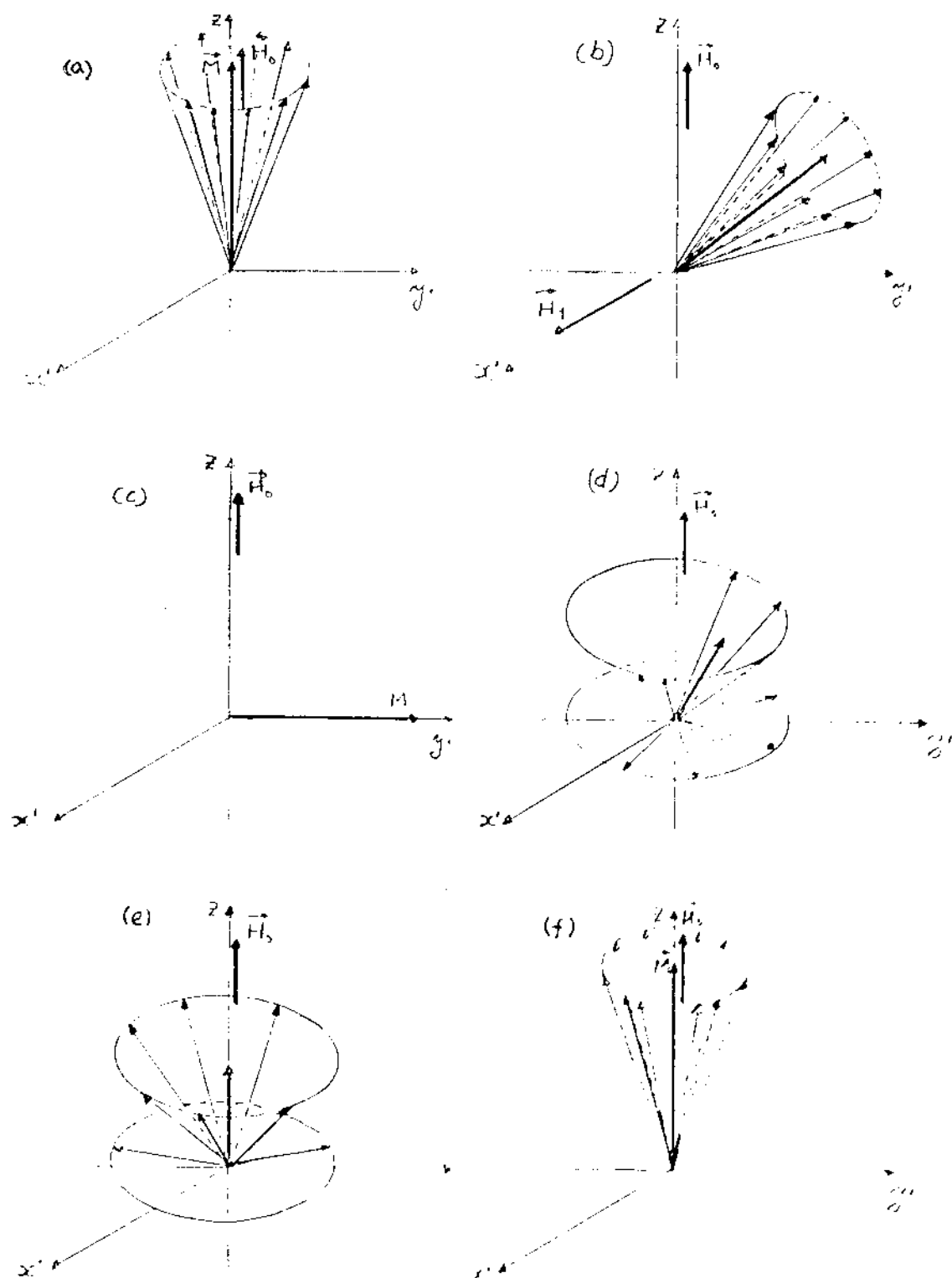


Fig. 8. A recuperação da magnetização depois do pulso de 90° .

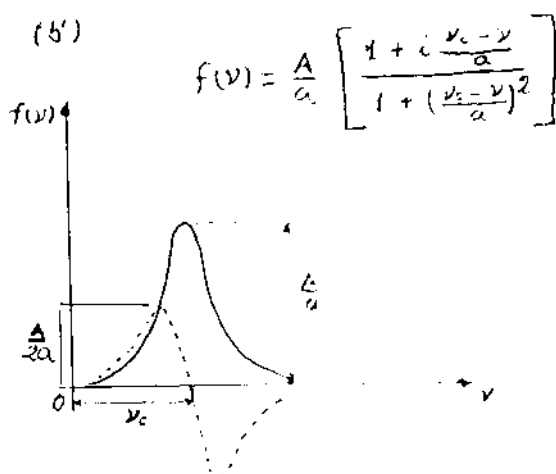
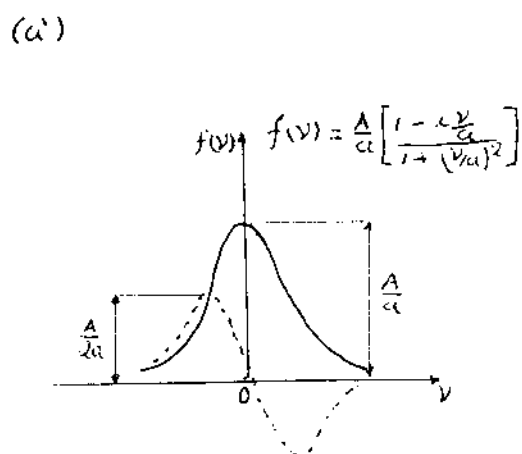
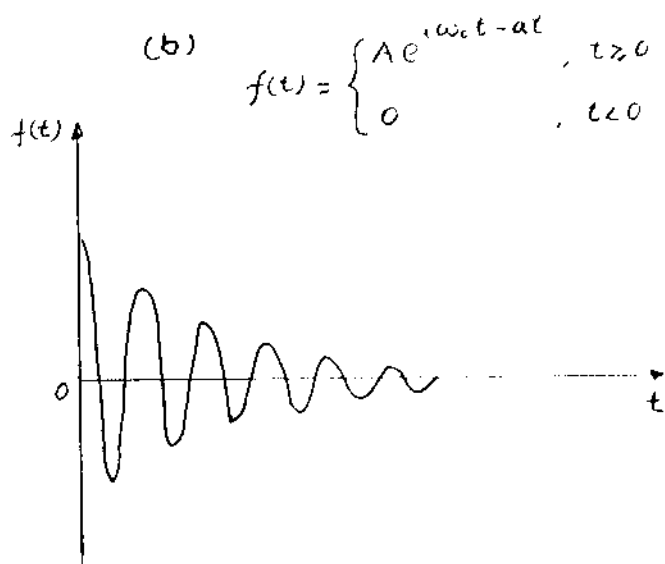
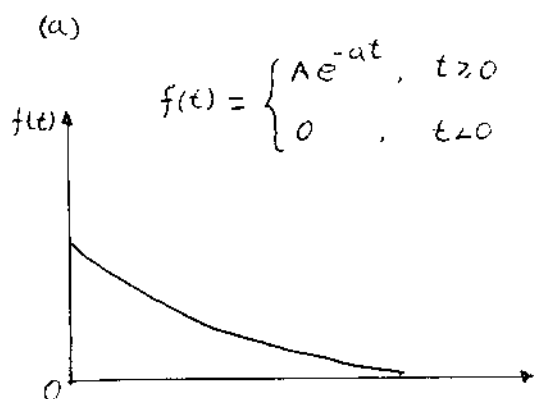


Figura 9. (a) FID exponencial para momentos com frequência ω_0 de ressonância. (b) FID de núcleos com frequências diferentes à de ressonância, $\omega_1 \neq \omega_0$. As figuras (a') e (b') representam as respectivas transformadas de Fourier.

nencial, assim como a interferência quando M_y e a frequência de referência estão alternativamente dentro e fora de fase. Na Fig. 9 está desenhada o FID puro (de frequência ω_0) e o decaimento da magnetização para $\omega_i \neq \omega_0$. No segundo caso, o decaimento já não será com a constante de tempo T_2 , mas com o tempo T_2^* , obviamente menor que T_2 ,

$$T_2^* \leq T_2 \leq T_1 \quad (39)$$

Se ΔH_0 representa a inhomogeneidade do campo, a relação entre T_2^* e T_2 é

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta H_0 / 2. \quad (40)$$

Observando a figura 9 e comparando tanto (a) e (a') como (b) e (b'), podemos ver, a grosso modo, que $f(\nu)$ representa a transformada de Fourier de $f(t)$. A função $f(\nu)$ é justamente o espectro observado a través do experimento de onda contínua que, por sua vez, é determinado do experimento pulsado mediante a realização de uma transformada de Fourier. A vantagem da técnica pulsada deve-se ao fato de registrar o espectro num tempo da ordem do decaimento da sinal (onde pode-se ter várias linhas do espectro), enquanto que na onda contínua cada linha é registrada separadamente demorando tempos da ordem de minutos.

1.3 A RELAXAÇÃO EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.

Antes de continuar com a descrição dos métodos de pulsos é importante falar sobre aspectos gerais da relaxação em RMN. A referência inicial obrigatória é a publicação histórica de Bloembergen, Purcell e Pound [9].

Na relaxação spin rede, para um spin com seu momento antiparalelo ao campo (de energia potencial μH) retornar à direção paralela ao campo (com energia potencial $-\mu H$), deve ceder uma energia $2\mu H$. Se não existir um agente para aceitar esta energia e um mecanismo para transferi-la, ou spin não poderá realizar o pulso para o estado de energia inferior. A rapidez com que a magnetização se forma depende dos mecanismos de aproveitamento para transferir a energia.

Um spin no estado de energia superior pode sofrer transições para o estado inferior via emissão espontânea ou estimulada. Mas, a probabilidade de emissão espontânea depende da terceira potência da frequência e para o rf este termo é muito pequeno para ser significativo. Assim, as transições em RMN são fundamentalmente estimuladas. Para isto acontecer os núcleos precisam ver campos flutuantes na frequência de ressonância (frequências de Larmor). Se um átomo se movimenta, os campos locais internos mudam. Como resultado disto, o núcleo experimentará interações magnéticas (e/ou quadrupolares) flutuantes no tempo, devido ao movimento destes íons, átomos ou moléculas. Estes campos que variam em função do tempo causarão as transições (spin-flip) dando lugar à relaxação spin-rede. Também causará a média das interações responsáveis pela largura de linha (proporcional a $1/T_2$)

ou motional narrowing.

Em geral, duas condições são necessárias para acontecer um mecanismo de relaxação com êxito. Em primeiro lugar, deve existir algum tipo de interação que aja diretamente sobre os spins; em segundo lugar esta interação deve ser dependente do tempo. Isso é possível graças aos campos que interagem com os momentos dipolares magnéticos e aos gradientes de campos elétricos que podem interagir com momentos quadrupolares elétricos dos núcleos (caso tiveram). Qualquer interação estática pode somente ser considerada como parte do Hamiltoniano do spin normal. Isto altera as posições e intensidades das linhas espectrais sem alongá-las.

Uma condição essencial para que ocorra relaxação é que os movimentos (atômicos ou moleculares) tenham uma escala temporal adequada, a qual para RMN é definida pela frequência de Larmor. Assim, para H^1 num campo de 10 kilogauss, $1/T_1$ será mais sensível para movimentos correspondentes à frequência de Larmor de $\omega_0 = \gamma H_0$, em torno de 42 MHz, enquanto que $1/T_2$ apresentará uma maior sensibilidade para movimentos caracterizados por frequências baixas em torno de γH_{loc} (10 Hz).

A difusão e rotação são fontes importantes de relaxação em líquidos. Vibrações da rede em sólidos; colisões em gases, certos movimentos rotacionais e de torsão dentro das moléculas, alguns processos de troca química, forças magnéticas intensas de spins eletrônicos desemparelhados presentes como impurezas magnéticas, etc.

Assim, existem diferentes mecanismos de troca de energia. O mais importante mecanismo de relaxação é a interação dipolar do sistema de spin-rede: (a) acoplamento dipolo-dipolo entre spins iguais, (b) acoplamento dipolo-dipolo entre spins nucleares diferentes, e (c) acoplamento dipolar e escalar de spin nuclear e eletrónico (de um íon ou sal paramagnético).

Em líquidos, as moléculas estão em rápido movimento térmico e seus dipolos estabelecem componentes perpendiculares a H , as quais giram à frequência de Larmor, levando a transições de spin, semelhantes às transições produzidas pelo campo de excitação H_1 . Evidência disso é a dependência da viscosidade com o tempo de relaxação T_1 [7]. Valores de T_1 mínimos são observados na viscosidade média. Para pequenos valores da viscosidade, devido a campos locais médios gerado pelo rápido "tumbling", aumenta T_1 . Inversamente, para grandes valores da viscosidade, é o número bem menor de campos locais possíveis que levam a uma relaxação que faz incrementar T_1 . Por razões similares, T_1 é grande para sólidos.

A relaxação spin-spin, como já foi mencionado, é a troca de energia dos spins do mesmo tipo, os quais formam o sistema sob consideração. A precessão de núcleos idênticos, e somente de núcleos idênticos, pode levar a um campo oscilante um com outro, na frequência de Larmor, onde se efectue o "flipping" mútuo dos spins dos núcleos interagentes, enquanto que a energia permanece constante. Como resultado as componentes transversais M_{xy} são reduzidas. Já que este tipo de interação requer que os núcleos estejam pertos um do outro, durante um longo tempo, T_2 é inversamente proporcional à viscosidade. Para viscosidades baixas,

a probabilidade de relaxação é reduzida como consequência dos rápidos movimentos térmicos, então T_2 cresce. Significa que para líquidos de viscosidade baixa, $T_2 \approx T_1$, enquanto que para líquidos viscosos $T_2 \ll T_1$, atingindo até valores mínimos da ordem de grandeza de 10^{-6} segundos (ver Fig. 10).

Como já se explicou, T_2 é gradualmente reduzido pela inhomogeneidade do campo H_0 . As frequências de precessão são diferentes como um resultado dos campos diferentes.

Partículas sólidas em solução podem também causar inhomogeneidades magnéticas.

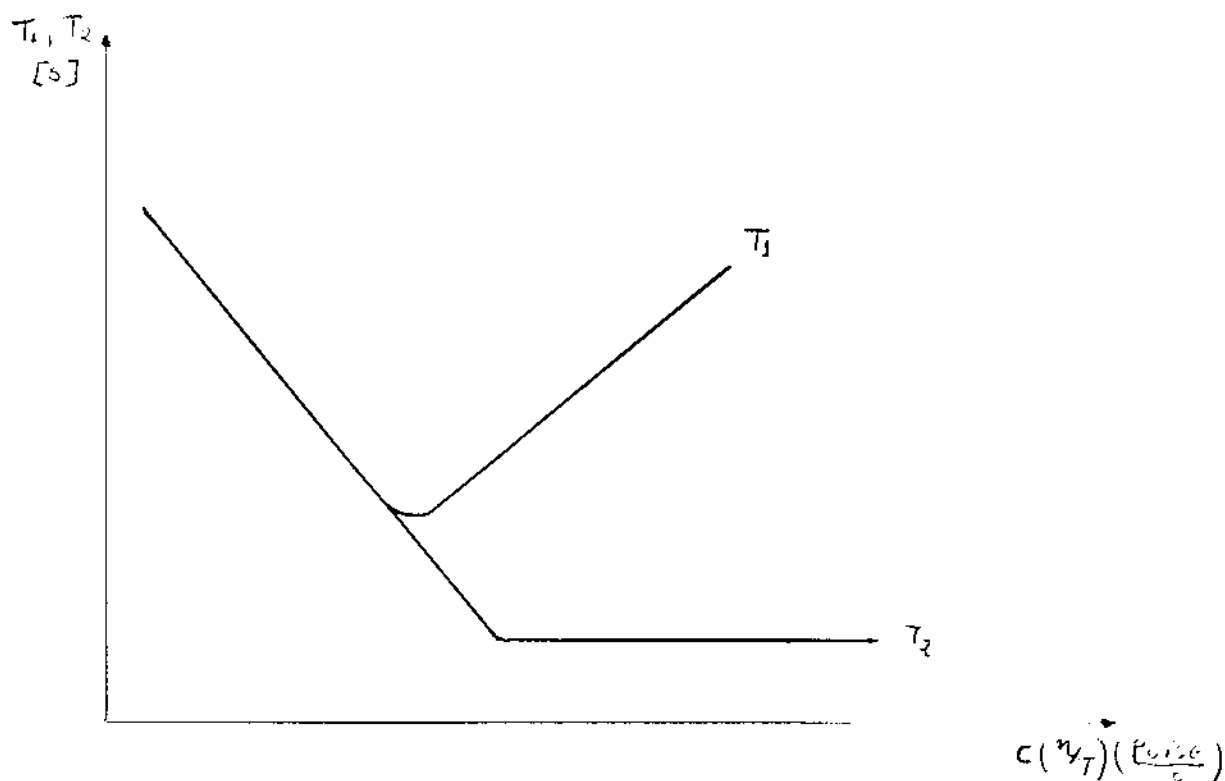


Fig. 10. Relaxação T_1 e T_2 como uma função da razão da viscosidade e temperatura absoluta.

2.4 ECOS DE SPIN (Spin Echo, SE).

Como falamos, devido à inhomogeneidade do campo H_0 , o decaimento livre depois do pulso de 90° era mais rápido com uma constante de tempo T_2^* dada pela Eq. (40). Isto não servia como um método direto de medir T_2 .

Os ecos de spin foram observados pela primeira vez por Hahn em 1950 [10], o qual serviu como um método para medir o tempo de relaxação T_2 . Com a ajuda da Fig 10 explica-se a aparição do eco. Estamos usando o sistema girante que rota com frequência angular $\omega_0 = \gamma H_0$. Depois do pulso 90° a magnetização está no eixo y' (Fig.11(a)). Consideramos M como a soma de pequenas magnetizações M_k , cada uma composta do respectivo conjunto de spins isocromáticos que giram com frequência ω_k . Então, as flechas mostradas na figura 10(b) representam os respectivos M_k , sendo a coincidente com o eixo y' a que tem frequência ω_0 no sistema de laboratório. Assim, os M_k que tem frequência $\omega_k > \omega_0$ giram num sentido (vetor 1), no sistema girante, e os que tem $\omega_k < \omega_0$ giram no sentido contrário (vetor 2). Aí vai se produzindo o decaimento devido a inhomogeneidade e o proceso natural de relaxação T_2 . Depois dum tempo τ dispara-se um pulso π (Fig 10(c)), e as magnetizações giram 180° . A partir daí a magnetização começa a se recuperar com o refocamento dos M_k (Fig.10(d)), até produzir o eco (Fig.10(e)) e logo começa outra vez o decaimento. Comparar com a figura 12.

Deve se notar que a altura do eco (o tamanho da magnetização) é menor que a altura do FID inicial, ou seja parte da magnetização é recuperada pelo refocamento, superando o

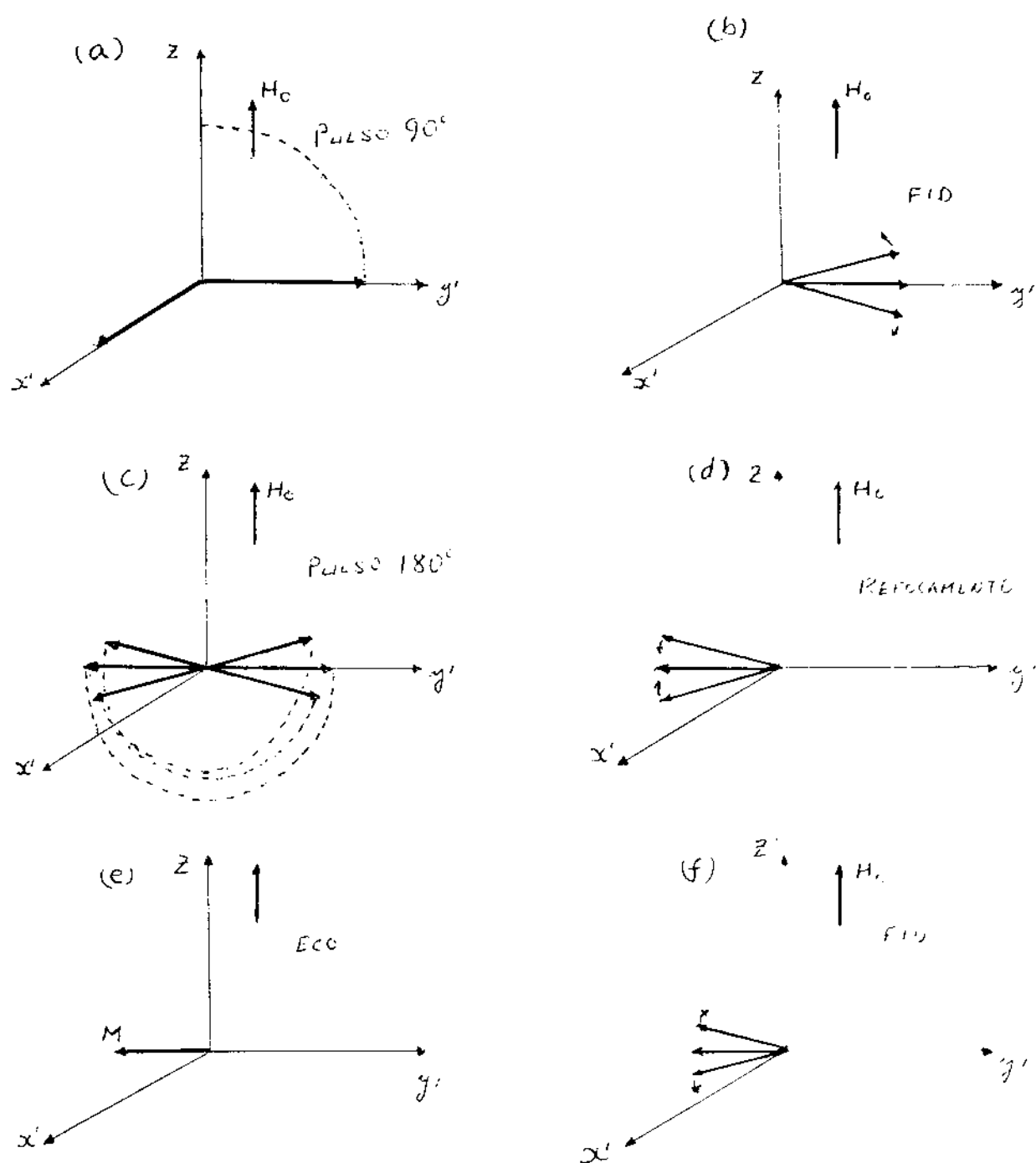


Fig. 11.- Esquemas sequenciais da formação do eco. (a) Pulso de 90° . (b) FID. (c) Pulso de 180° . (d) Refocamento. (e) eco. (f) FID.

problema da inhomogeneidade do campo H_0 , mas o processo natural da relaxação spin-spin não pode ser revertido devido às interações intrínsecas já explicadas, daí a diminuição da magnetização vista no eco. Isto sugere um método para medir T_2 . Na Fig. 13 se mostra o pulso de 90° seguido do pulso de 180° , obtendo o eco respectivo. Logo se deixa relaxar o tempo suficiente para o FID sumir. Seguidamente se envia outro par de pulsos de 90° e 180° , com intervalos de tempo entre eles cada vez maiores, se vê que a altura do eco respectivo vai diminuindo devido à relaxação T_2 segundo a relação

$$M = M_0 e^{-t/T_2}. \quad (41)$$

Construindo um gráfico logarítmico é fácil calcular T_2

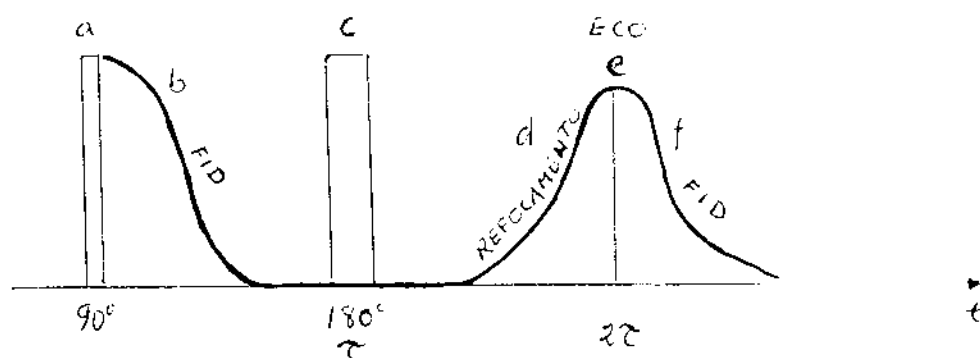


Fig. 12. - Eco de spin referente à figura 11.

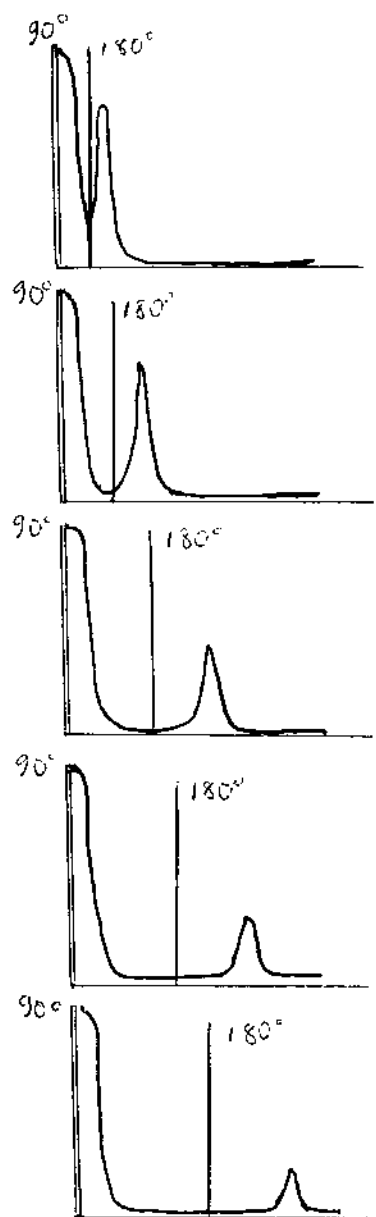


Fig.13.- Sucessivos par de pulsos de 90° e 180° a intervalos de tempo cada vez maiores. O decaimento da altura do eco da uma medida da relaxação spin-spin.

1.5 SEQUÊNCIA DE PULSOS DE CARR E PURCELL.

O método dos ecos de spin descrito para medir T_2 consome muito tempo, devido à espera de várias vezes o tempo de relaxação spin-rede, suficiente como para retornar à magnetização original.

Carr e Purcell [11] propuseram um método para superar o problema. Depois de um pulso de 90° , para $t = 0$, se envia uma sequência de pulsos de 180° para tempos $\tau, 3\tau, 5\tau, \dots, (2n-1)\tau$, cujos ecos serão observados nos tempos $2\tau, 4\tau, 6\tau, \dots, 2n\tau$, tal que a altura da sinal para o n -ésimo eco é proporcional a

$$e^{-2n\tau/T_2} \quad (42)$$

Na figura 14 e 15 se mostra os pulsos e ecos da sequência proposta por Carr e Purcell.

Em amostras viscosas com difusão desprezível o método do SE e a sequência de CP dão praticamente o mesmo T_2 . Em substâncias onde a difusão tem papel importante no FID, a medição de T_2 deve tomar em conta este fato. O refocamento preciso no tempo 2τ depende do campo H_0 ser constante para os spins isocromáticos. No entanto, pela difusão, os momentos magnéticos se deslocam de uma parte a outra de um campo inhomogêneo produzindo uma maior redução da amplitude do eco. Este efeito foi estudado por Carr e Purcell [11] e deduziram, através do tratamento do caminho aleatório, que o decaimento pela difusão cai como e^{-kt^3} . Torrey [12], resolveu o mesmo problema generalizando as equações de Bloch ao adicionar o termo da transferência da magnetização por

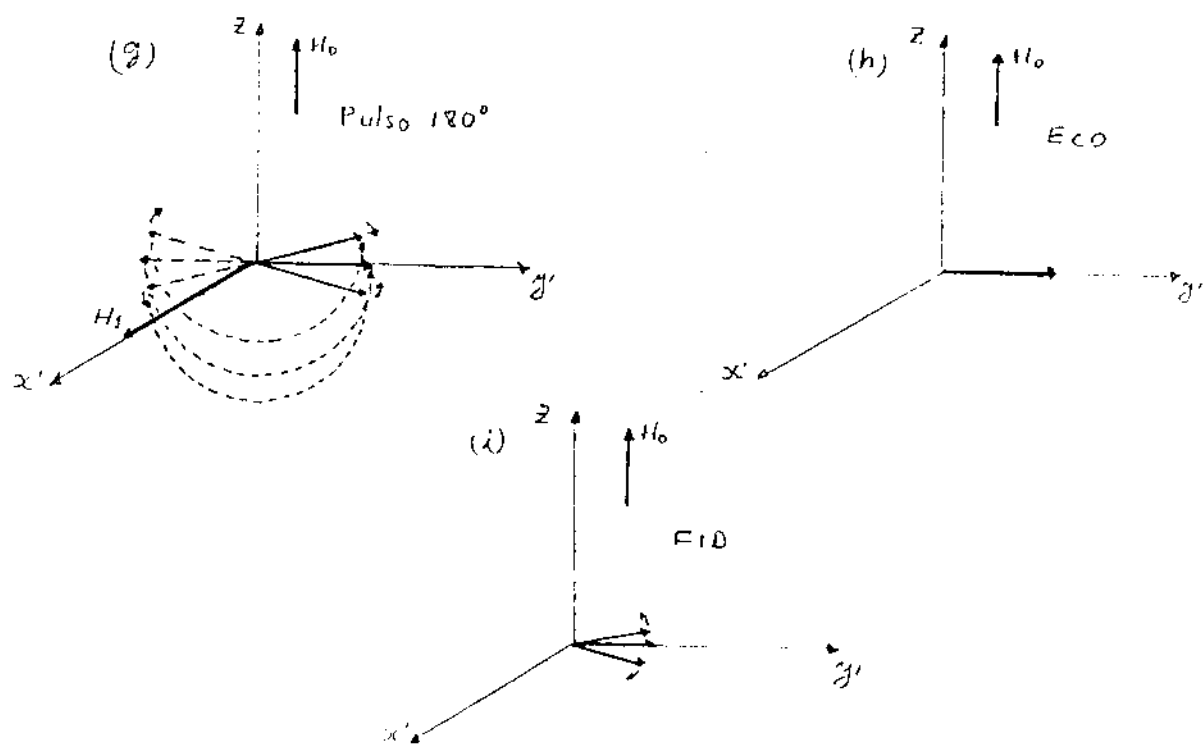


Fig. 14. - A sequência de Carr-Purcell

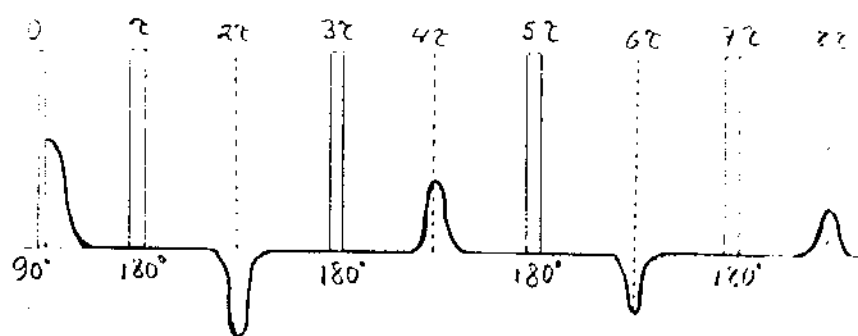


Fig. 15. - Trem de pulsos de Carr-Purcell

difusão. A equação proposta é

$$\frac{\partial M(r,t)}{\partial t} = \gamma M \times H(r,t) - \frac{Mx i'}{T_2} + \frac{My j'}{T_2} - \frac{Mz - M_0 k'}{T_1} + D \nabla^2 M, \quad (43)$$

onde D é o coeficiente de difusão. Notar que agora aparece a derivada parcial $\frac{\partial M(r,t)}{\partial t}$ devido à inclusão da dependência espacial.

Para amostras suficientemente pequenas a dependência espacial de Hz através da amostra, em primeira aproximação, pode ser escrita como

$$H_z = H_0 + G \cdot Z \quad (44)$$

Onde G é o gradiente do campo (considerado constante). Está se considerando a simetria axial em torno de z, desprezando-se as contribuições em x e y, e a influência de M.

O resultado obtido por Carr e Purcell [11], de um tratamento do caminho aleatório, coincidente com o tratamento mais geral de Torrey [12] leva ao resultado do decaimento da magnetização transversal

$$My'(t) = M_0 e^{[-(1/T_2) + (-\gamma^2 G^2 D t^3 / 12 n^2)]} \quad (45)$$

Na exponencial n é o número de pulsos de 180° na sequência $90^\circ - \tau - 180^\circ$ e t o instante de tempo do n-ésimo eco. Se 2τ é o intervalo de tempo entre dois ecos sucessivos, o tempo para n ecos é $t = n2\tau$. A equação (45) fica

$$\begin{aligned} My'(t) &= M_0 e^{-t(1/T_2) + \gamma^2 G^2 D \tau^3 / 3} \\ &= M_0 e^{-t/T_2^*} \end{aligned} \quad (46)$$

onde

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{3} \gamma G^2 D \tau^2. \quad (47)$$

O T_2^* representa a constante de tempo do decaimento e temos, assim, um método para medir o coeficiente de difusão. Para medir diretamente T_2 seria suficiente fazer

$$\frac{1}{T_2} \gg \frac{1}{3} \gamma G^2 D \tau^2, \quad (48)$$

para o efeito da difusão ser desprezível. Isto se consegue com τ suficientemente pequeno.

1.6 A MODIFICAÇÃO DE MEIBOOM E GILL

Geralmente para trabalhos de um pulso, ou sequência de dois pulsos, a exatidão dos pulsos é adequada, mas com sequências multipulsos os efeitos acumulativos são críticos.

Um método, tecnicamente mais fácil para superar tal limitação experimental, foi proposto por Meiboom e Gill [13]. Este método usa a mesma técnica de Carr e Purcell, mas os pulsos de 180° são aplicados ao longo do eixo y' , i.e., com uma diferença de fase de 90° relativa ao pulso inicial de 90° .

A idéia do método é corrigir as imperfeições possíveis dos pulsos de 180° , já que na prática o giro do vetor magnetização com o pulso de 180° , poderia ser um ângulo imperfeito de $180^\circ \pm \alpha$. Na figura 16 ilustramos a sequência a produzir. Em (b) o desfaseamento

já teve início e estamos tomando somente uma magnetização, m_z , formado pelos respectivos spins isocromáticos. Na Figura 16(c) aplica-se o primeiro pulso imperfeito de $180^\circ - \alpha$ ao longo do eixo y' , onde a magnetização m_z girou e fica acima do plano $x'y'$ formando um ângulo α . Depois do refocamento, na Figura 16(d), mostra-se o eco imperfeito formando um ângulo α com o eixo y' . Em seguida (Fig. 16(e)), produz-se o desfaseamento com os momentos girando num plano que forma o ângulo α com o plano $x'y'$. Aplicando o segundo pulso de $180^\circ - \alpha$ (imperfeito) a magnetização m_z gira de maneira a ficar exatamente no plano $x'y'$ (Fig 16(f)). Com o refocamento correspondente se produz o segundo eco de modo perfeito (Fig. 16(g)).

Deve-se notar que o segundo eco e os seguintes ecos pares tem a amplitude correta, enquanto que os ímpares são reduzidos ligeiramente, mas não acumulativamente.

O método descrito, chamado de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), é um dos mais populares métodos de medição de tempos de relaxação T_2 devido à eliminação, de longe, de problemas de difusão e ajuste de pulsos. Não esquecer que cada um dos ecos individuais decaem com uma constante de tempo T_2^* , enquanto que a envoltória dos ecos decaem de acordo com uma curva exponencial da forma $e^{-2\tau/T_2}$ o que permite a determinação de T_2 . Ver a figura 17

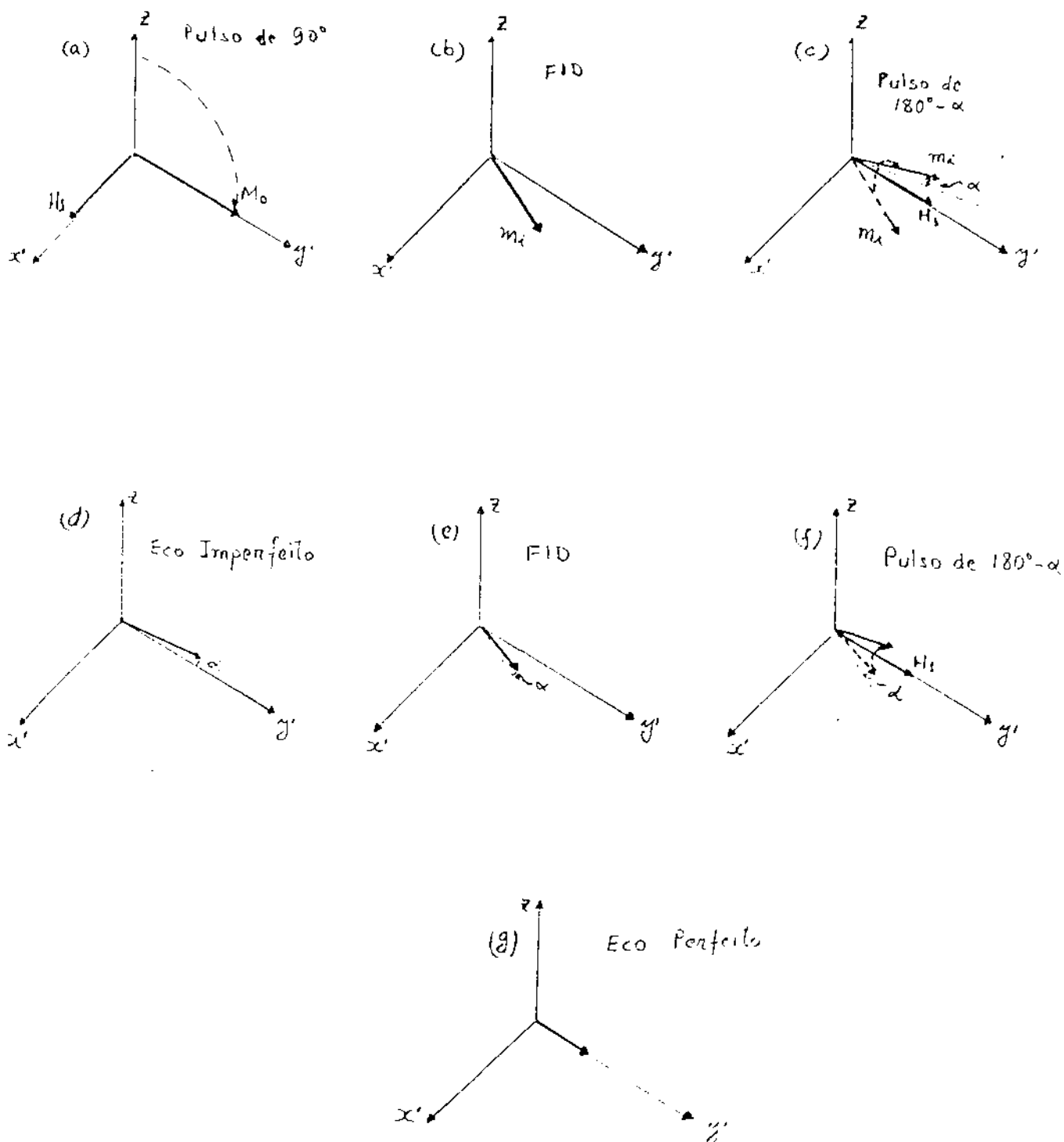


Fig. 10. - A correção de Meiboom-Gill da sequência Carr-Purcell.

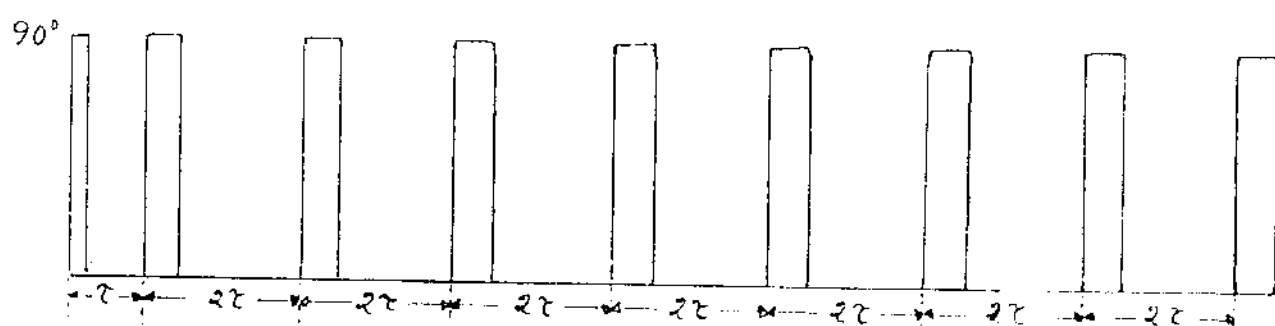
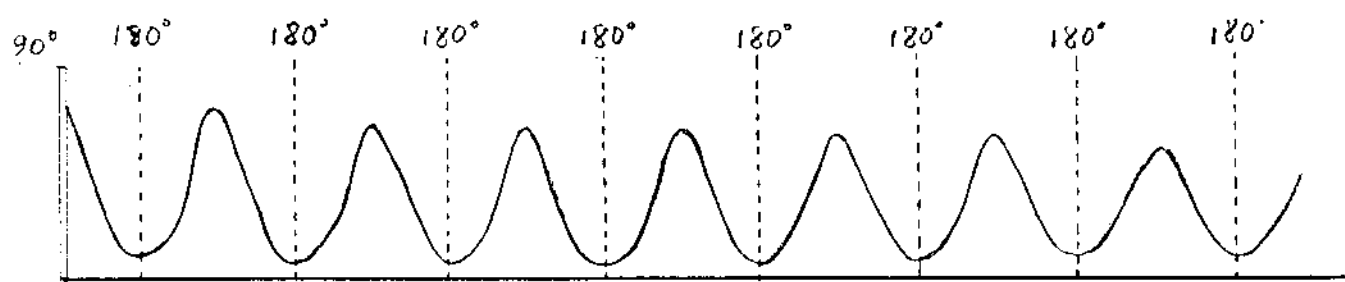


Fig. 17. - (a) Os ecos sucessivos na sequência CPMG
(b) O trem de pulsos correspondente.

1.7 SEQUÊNCIAS MAIS COMUNS PARA MEDIR T_1 .

As determinações de T_1 geralmente consomem mais tempo por não haver métodos semelhantes à sequência CPMG, além de precisar esperar pelo menos 5 vezes o tempo T_1 para a medição seguinte. O problema adicional é que não é diretamente mensurável a magnetização longitudinal, precisando colocar a magnetização transversalmente ao campo H_0 . Em seguida explicaremos alguns métodos mais conhecidos e usados.

1) MÉTODO DE INVERSÃO E RECUPERAÇÃO (Inversion Recovery, IR).

Este é o método mais comumente empregado e consiste na aplicação de uma sequência de pulsos $180^\circ - \tau - 90^\circ$. O pulso de 180° inverte a população dos spins dos núcleos, indo da magnetização inicial M_0 , ao longo do eixo z positivo, ao valor $-M_0$ (eixo z negativo). Então, através da relaxação longitudinal, M_z vai do valor $-M_0$, passando por zero, até seu valor original M_0 . Este processo pode ser manipulado mediante pulsos de 90° , aplicados no eixo x' , tal que M gire ao eixo y' onde se pode medir o tamanho do decaimento (ver a figura 18). Permite-se uma relaxação no sistema durante um tempo maior ou igual que 5 vezes T_1 , para assegurar o total decaimento e futuras imperfeições nas próximas medições (para $5T_1$, $M_z = 0.993M_0$).

Usando as equações de Bloch é fácil determinar o decaimento de M_z . As condições, depois do pulso de 180° , resultam ser $M_x = M_y = 0$ e $M_z = -M_0$, para $t = 0$. Assim, da primeira das equações (36) temos

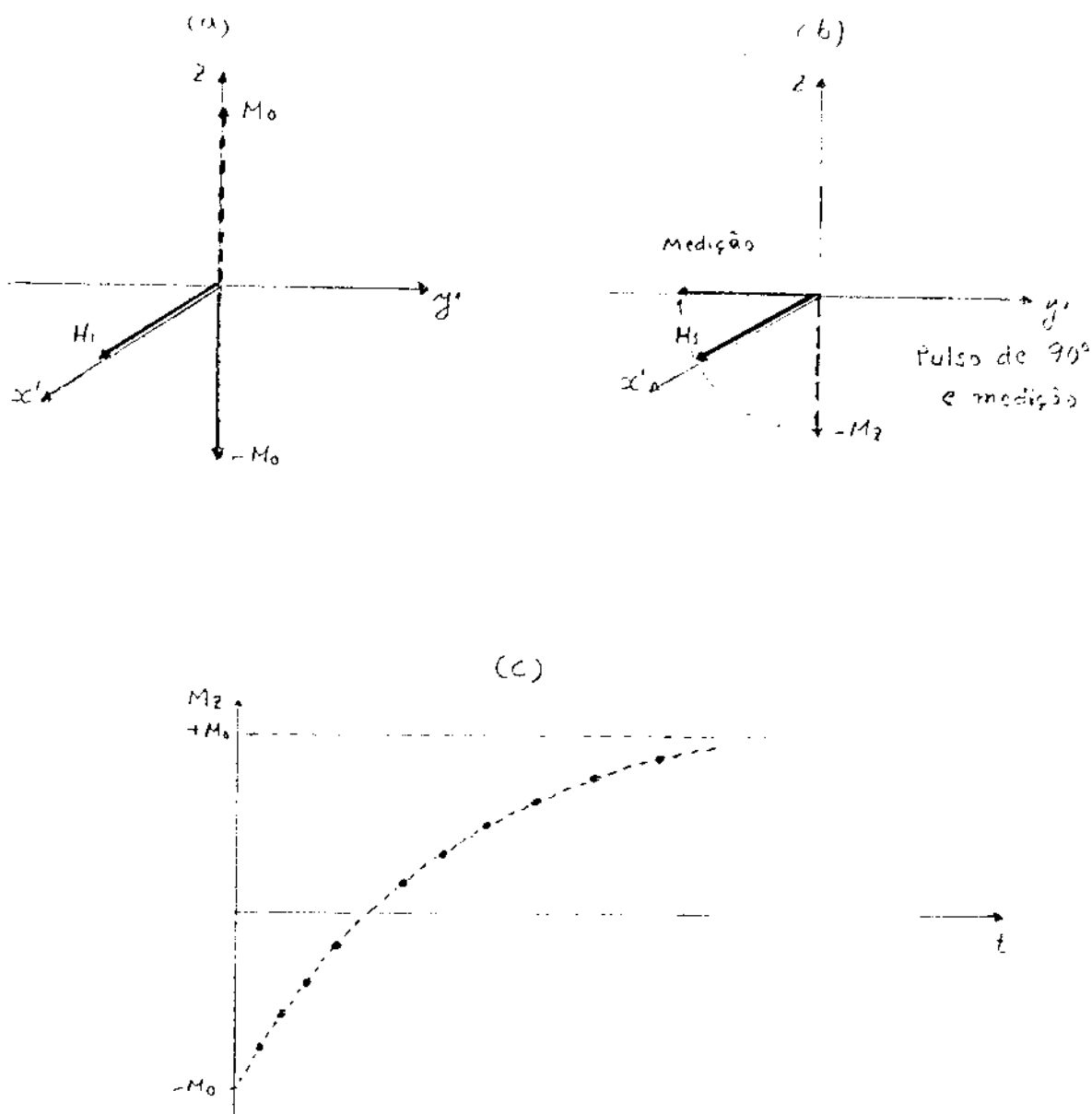


Fig. 10. (a) O pulso de 180° inverte a z a magnetização inicial. (b) Depois dum certo tempo t se dispara o pulso de 90° para colocar a magnetização no eixo y e logo medir. (c) A gráfica da magnetização contra o tempo t .

$$\frac{dM_z}{dt} = -(M_z - M_0)/T_1.$$

Integrando resulta

$$M_z = M_0(1 - e^{-\tau/T_1}), \quad (49)$$

que vem a ser justamente o gráfico mostrado na figura 18c). Então a medição é uma série de experimentos com a aplicação de sequências de pulsos ($180^\circ - \tau - 90^\circ$) de valores τ sucessivamente maiores. Ao trem de pulsos deve seguir outro, depois de permitir chegar ao sistema de spins o seu completo equilíbrio.

Mediante um gráfico do tipo

$$\ln(M_\infty - M_z) = \ln 2M_\infty - \tau/T_1, \quad (50)$$

ou

$$\ln\left(\frac{M_\infty - M_z}{M_\infty}\right) = \ln 2 - \tau/T_1, \quad (51)$$

pode-se determinar o valor de T_1 , onde M_∞ é a magnetização para um intervalo τ , muito grande, entre os pulsos de 180° e 90° ; M_z é a amplitude do FID que segue o pulso de 90° no instante τ .

Uma versão modificada do método é medir M_∞ , depois da medição de M_z , usando um segundo pulso de 90° aplicado depois de um tempo $T \gg T_1$. A sequência seria [$180^\circ - \tau - 90^\circ(M_z) - T - 90^\circ(M_\infty)$]. O segundo pulso de 90° é aplicado, depois de uma longa espera, para medir a magnetização M_0 (M_∞). Um gráfico de $\Delta M = M_\infty - M_z$ contra τ permite eliminar enormemente os erros que aparecem de parâmetros instrumentais durante a medição ([6]).

(ii) RECUPERAÇÃO POR SATURAÇÃO.

Este método usa dois pulsos consecutivos de 90° , $[90^\circ - \tau - 90^\circ]$. Não parece muito diferente do método anterior (IR). Os dados adquiridos englobam somente a metade da faixa dinâmica dos dados do método IR. Além disso, existem diferenças significativas com consequências práticas ([6]).

Neste caso a magnetização está dada por

$$M(\tau) = M_0(1 - e^{-\tau/T_1}) \quad (52)$$

(com condições $M_x = M_y = 0$, e $M_z = 0$ para $t = 0$).

(iii) SATURAÇÃO PROGRESSIVA.

Este método é usual quando $T_2 \ll T_1$. Neste caso, o FID que segue o primeiro pulso de 90° decai a zero muito mais rapidamente que quando M_z atinge seu valor de equilíbrio. Então, um segundo pulso de 90° é repetido com um intervalo comum τ , logo M decresce rapidamente a seu valor de estado estacionário dependente de τ e T_1 . Assim, a sequência $[90^\circ - \tau]_n$ produz sinais que vão se intensificando a medida que τ aumenta, sempre que no início do experimento τ seja o bastante pequeno para ter completa saturação da sinal. Neste caso, como no anterior (ii), a magnetização é dada pela equação (52) e T_1 é obtido do gráfico $\ln M_z$ contra τ . Este método é particularmente adequado porque não precisa esperar longos tempos no experimento, como ocorria com os anteriores. Sua limitação é que para ter boas medidas de T_1 é importante ter que $T_1 \gg T_2$.

1.8 MÉTODO DO DECAIMENTO DE INDUÇÃO LIVRE (MÉTODO DE FATOR F).

A diferença no decaimento dos sinais no FID de sólidos e líquidos é amplamente explorada na determinação das razões sólido/líquido (S/L) em sistemas multifásicos (van Pute, K.P.A.M. and van den Enden, J. [14] e Tiwari, P.N. and Burk, W. [15]).

O método é aplicável sempre que a amostra contenha dois tipos de prótons, sólido (S) e líquido (L), tais que os valores do tempo de relaxação T_2 para os sólidos seja muito mais curto que para o líquido (uma ordem de grandeza ou mais). Assim, é bem fácil e rápido determinar o conteúdo relativo dos dois tipos de prótons da amostra diretamente do FID. Em muitas aplicações, S e L podem representar outros critérios de "sólido" e "líquido" tais como por exemplo, fase cristalina e amorfa de um polímero, água adsorvida e água livre, etc.

Na figura 19 está mostrada o FID típico de uma amostra que tem uma parte sólida e outra líquida. Na figura 19(a) se mostra o FID separado de cada fase. O FID sólido é tipicamente Gaussiano e Lorentziana da parte líquida. No FID composto da figura 19(b) mostra-se, esquematicamente, como depois de um pulso de 90° há um tempo morto ou de recuperação do aparelho, antes dele poder medir. No instante da medição já passou um tempo τ_1 , cuja intensidade medida já não é o valor inicial procurado. Depois do tempo τ_2 o decaimento da parte sólida praticamente chegou a zero e a intensidade medida no instante τ_2 é a correspondente à parte líquida, cujo decaimento é desprezível comparado com o FID do sólido. Tipicamente o T_2 para sólidos é da ordem de μseg e para líquidos de mseg .

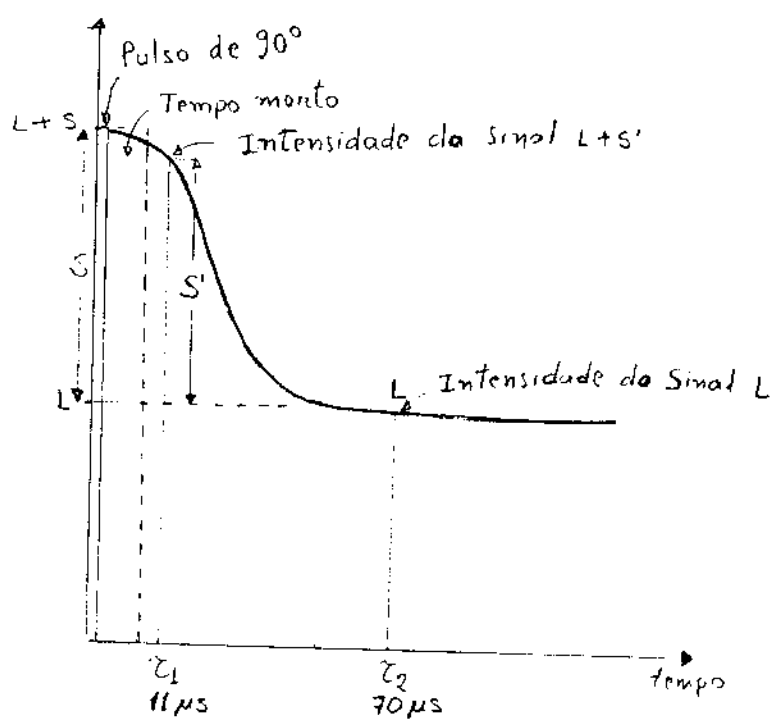
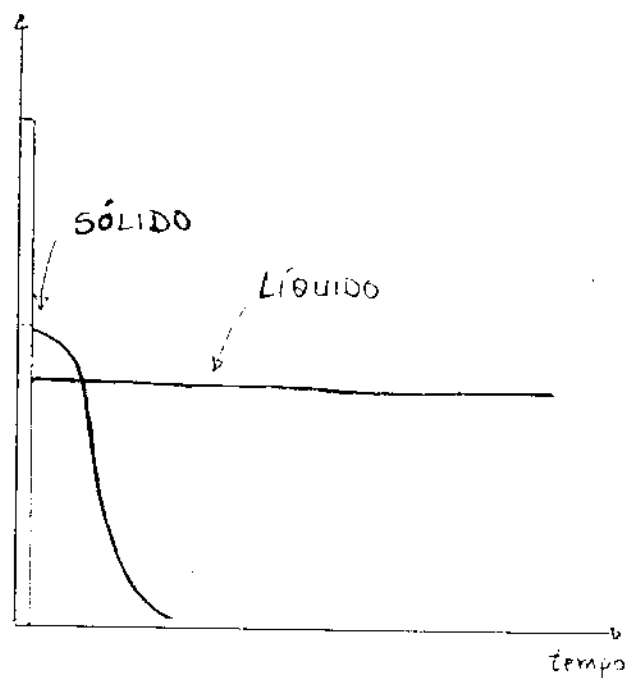


Fig.19.- FID TÍPICO DE UMA MISTURA SÓLIDO LÍQUIDO
 (a) FID separados do sólido e líquido. (b) FID composto de sólido e líquido, os valores do tempo são típicos do MINISPEC PC120 (Bruker).

Assim, o sinal total é $S + L$, onde S é a parte sólida, tal que a relação sólido a líquido é

$$\% \left(\frac{\text{sólido}}{\text{líquido}} \right) = \left(\frac{S}{S + L} \right) \times 100, \quad (52)$$

mas, devido ao tempo morto do receptor não é possível medir diretamente $(S + L)$ senão $(L + S')$. Para determinar S é necessário multiplicar S' por um fator de correção, chamado F , tal que $S = FS'$, ficando a Eq. (52) como

$$\% \left(\frac{\text{sólido}}{\text{líquido}} \right) = \left(\frac{FS'}{L + FS'} \right) \times 100 \%. \quad (53)$$

O fator F pode ser determinado usando amostras de relação S/L conhecidas ou por uma extrapolação da digitalização do FID [46].

ESTUDO DE TECIDOS DE RATOS COM CÂNCER

2.1. INTRODUÇÃO

O presente capítulo mostra os resultados obtidos para os tempos de relaxação T_1 e T_2 em diferentes tecidos biológicos de ratos, tanto normais (para controle) como inoculados de tumores cancerígenos, com o interesse de observar a evolução da doença no animal, como será descrita depois.

Desde a primeira publicação dada por Damadian em 1971 [16], observando que os tecidos cancerígenos podem ser distinguidos dos normais por meio da ressonância magnética nuclear (RMN) através das medições dos tempos de relaxação T_1 e T_2 dos prótons do ^1H de água, numerosos estudos de RMN em tecidos biológicos continuaram-se em diferentes direções.

Uma das mais importantes refere-se ao rol que a água desempenha nos sistemas biológicos, aparecendo a hipótese duma fração de água ligada (bound water) associada a interação estreita entre as moléculas de água e as macromoléculas que compõem o tecido biológico (proteínas, carboidratos, etc.), e uma fração de água livre (free water) imaginada como a água normal não interagindo diretamente com as macromoléculas biológicas (duas boas referências nesse sentido são a monografia de Mathur-de Vré (1979) [17] e o livro de Foster (1984) [18]). Agora, os tempos de relaxação da fração ligada é bem menor comparada a fração da água livre

que está na faixa dos milisegundos.

Em geral, os tempos de relaxação são diferentes para tecidos diferentes (por exemplo $T_1 \cong 300$ ms para o fígado e $\cong 600$ ms para o músculo) e, duma maneira geral, T_1 representaria a movilidade das moléculas de água, assemelhando-se mais com a água normal pura na medida que T_1 aumenta. Nos resultados que apresentaremos, os valores de T_1 e T_2 referen-se à água livre do tecido. Enquanto, como se explicou no primeiro capítulo que o T_2 está muito influenciado pela in-homogeneidade local do campo magnético na amostra, a relaxação spin-spin (T_2) é bastante afetado pela heterogeneidade dos sistemas biológicos, ou seja, o T_2 é marcadamente menor que T_1 . Por exemplo, T_2 para o fígado é ao redor de 45 ms e para o músculo está na faixa de 70 ms. Sentjurs et al. [19] concluíram que os valores de T_1 são bastante influenciados pelo conteúdo de água nos tecidos enquanto que outras influências não são importantes.

Uma das propriedades achadas no estudo dos sistemas biológicos por RMN referem-se às mudanças dos tempos de relaxação com as frequências de Larmor usadas (que por sua vez depende do campo H_0). Por exemplo, no artigo de Ling et al [20] aparecem valores de T_1 para o fígado, músculo e baço a 24 MHz e 2.5 MHz:

Frequência	Fígado	Músculo	Baço
24 MHz	(311 $\pm$ 15)ms	(554 $\pm$ 32)ms	(509 $\pm$ 11)ms
2.5 MHz	(141 $\pm$ 16)ms	(182 $\pm$ 12)ms	(258 $\pm$ 4) ms

Como se observa, o valor de T_1 aumenta com o crescimento da frequência de Larmor. Comenta-se (Damadian et al [21]) que a discriminação entre os valores de T_1 para tecidos cancerígenos e

normais melhoram a frequências baixas.

As mudanças dos tempos de relaxação que ocorrem em tecidos associados com a malignância também podem-se observar em estados anormais não malignos (Gwan and Edzes [22]); em tecidos com rápida divisão celular tal como o tecido fetal (Kiricuta et al. [23]) e tecidos regenerativos (Saryan, et al. [24]); também mudanças associadas com respostas inflamatórias locais (Ling and Foster [25]). Em todos estes casos os valores de T_1 são maiores em relação aos tecidos normais.

Um ponto controvertido foi a possibilidade de se usar T_1 para diagnosis de tumores malignos como foi proposto, por exemplo, por Weisman e outros [26] quando fizeram experiências, in vivo, no rabo dum camundongo para diferenciar entre o tecido normal e a melanona implantada no rabo. O tumor exibiu ao redor de 700 ms para T_1 e o tecido normal do rabo deu aproximadamente 300 ms. Mas de acordo com outros autores [27], e pelo dito no parágrafo anterior as possibilidades das diagnósias das malignâncias poderiam estar sujeitas a enganos. McLachlan [28] num trabalho sobre taxas de relaxação ($R_1 = 1/T_1$, relaxation rates) de RMN de prótons de plasma humano, conclui que os R_1 de pacientes com câncer não são suficientemente diferentes das pessoas normais para propósitos de discriminação, mas as medições sequenciais sugerem, no entanto, que podem proporcionar um indicador bastante útil do estatus do câncer para ser de uso clínico. O tratamento com drogas também alteram os tempos de relaxação, embora os mecanismos de alteração de T_1 e T_2 por fármacos sejam complexos [28']

2.2. CARACTERÍSTICAS DO TUMOR

- O tumor inoculado é o tumor de Walker-256.
- Carcinosarcoma de mama de origem espontânea.
- Altamente invasivo e metastatizante.
- A morte é muito rápida e os animais apresentam um quadro de devastação clínica e comportamental (moderada perda de peso, edemas, anorexia, alterações dos metabolismos hídrico e salino, depressão com períodos de excitação, priapismo, incontinência de urina, etc.)
- O tumor é mantido por transplantes, pela inoculação de células tumorais livres extraídas do peritônio (líquido ascítico) do animal doador e por crioconservação em nitrogênio líquido
- As metástases iniciam-se nos gânglios: inguinais, axilares, peri-tímicos e retroperitoneais (peri-rrrenais e abdomen inferior)
- Devido às vantagens que apresenta o trabalho com este tumor (facilidade, rapidez, reproducibilidade, etc.), é que ele está difundido quase universalmente.

A evolução clínica, anatomo-patológica e a morte, mesmo nos animais com o tumor de Walker-256, é muito influenciada pela presença física do tumor e suas metástases (tamanho e invasividade): obstruções, compresões, transtornos na locomoção, etc.

Estos efeitos emascarariam prováveis efeitos a distância induzidos por substâncias produzidas pelo próprio tumor (peptídios).

Para melhorar as condições do estudo dos efeitos a

distância, seria necessário lograr a indução deles antes do aparecimento dos efeitos locais do tumor primário e de suas metástases.

O intento de fazer estudos tipo curvas dose-resposta (aumentando o número de células tumorais inoculadas), até agora só conseguiu aumentar ligeiramente a velocidade do crescimento tumoral mas sem alterar substancialmente o quadro da evolução da enfermidade.

Num estudo anterior, em lugar de quadruplicar a dose de células inoculadas num mesmo sítio, inoculou-se a mesma dose em 4 lugares bem afastados (entre eles) em cada animal (4 tumores em cada animal) e surpreendentemente a enfermidade evoluiu muito rapidamente levando os animais a morte ainda com tumores primários relativamente pequenos e com metástases ganglionares tão reduzidas que não induziam efeitos compressivos locais. Ao mesmo tempo evidenciou-se uma outra vantagem: a sincronização na aparição e na intensidade dos sintomas entre os animais do grupo (ao contrário, quando se inocula um só tumor em cada rato, no grupo se misturam animais ainda em bom estado geral com outros apresentando variados estágios da enfermidade).

2.3. PROCEDIMENTO

O estudo da evolução clínica e anátomo-patológica dos ratos e seus tecidos principais foram feitos na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo corpo de médicos responsáveis do projeto. As medições RMN foram feitas no Laboratório de Propriedades Magnéticas do Instituto de Física da UNICAMP.

2.3.1 MEDICÕES RMN

As medições de T_1 foram feitas com o método de inversão-recuperação descrito no Capítulo 1. Tomou-se 8 pontos do decaimento exponencial, onde cada ponto foi medido 4 vezes para logo com a média de cada ponto fazer o ajuste da curva exponencial (todo é feito automaticamente pelo aparelho). Segundo os testes iniciais os tempos de relaxação dos tecidos estiveram entre 250 ms (fígado) e até aproximadamente 800 ms (tumor). Logo o intervalo de tempo apropriado entre sequências de pulsos, foi de 3 a 5 seg, pois dependendo do T_1 de cada tecido, é importante que o sistema de spins relaxe completamente antes de iniciar a seguinte medição (o tempo mínimo recomendável é 5 vezes T_1).

Nas medições de T_2 foi usada a sequência de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), tendo medido 10 pontos do decaimento exponencial e repetido automaticamente por 9 vezes para com a média fazer o ajuste da curva.

2.3.2 EVOLUÇÃO DA ENFERMIDADE

Inicialmente foram estudadas a evolução dos ratos com o tumor inoculado, logo, pelos resultados obtidos a serem explicados depois, estudou-se uma segunda série de ratos normais para ver o efeito produzido pela restrição alimentar (jejum), e um terceiro grupo de ratos sem tumor com edema induzido. Todas as séries foram acompanhadas com medições de ratos controle (normais)

A.- Ratos com tumor inoculado

30 ratos foram alojados em gaiolas metabólicas para seu estudo clínico-metabólico diário e separados em 7 grupos

Grupo	Num.Ratos	Sacrificados dias após da inocul. do tumor
1	4	2 dias após
2	4	4 dias após
3	4	6 dias após
4	4	7 dias após, apetite diminui aprox.50%.
5	4	9.5 dias após,apetite diminui aprox.75%.
6	5	Momento mais perto possível da morte.
7	5	Controles, sem tumor, a serem sacrificados ao final do experimento.

Estudos clínicos: avaliação diária do peso, bebida, alimento, composição da urina, crescimento tumoral e observação de sinais e sintomas.

Anatomia Patológica: realização imediata das autópsias, logo após o sacrifício dos ratos (guilhotina), descrição e avaliação dos tumores e metástases; descrição, peso húmedo e fixação dos principais órgãos.

Resultados das observações clínicas.

- Ao redor do dia 4 após a inoculação , os tumores iniciam um ritmo de crescimento rápido

- Até o dia 4 não se observaram sinais ou sintomas significativos.

- Após o dia 4 observou-se diminuição progressiva do apetite e retenção de água.

- Após o dia 7-8 observou-se um rápido agravamento da enfermidade, rápida diminuição do apetite, desidratação (inibição da sede e aumento do volume urinário com diminuição da osmolaridade), retenção anormal do sódio (marcada diminuição da excreção

de sódio e aumento de apetite por sal), presença de proteínas na urina, alterações do comportamento, incontinência de urina, etc.

- 1 a 2 dias antes da morte, os ratos rapidamente empalideceram (nas autopsias quase não se recolheu sangue) e a temperatura começou a descer.

- A morte ocorreu ao redor do dia 11 sem que de modo nenhum ela pudesse ser explicada pelas metástases ou pela anorexia (anorexia de curta duração).

- Não se observou depressão respiratória até o final.

Resultados das observações nas autopsias.

- As metástases foram todas ganglionárias e até o dia 4, eram muito reduzidas em número e tamanho (grão de arroz). Nos grupos que se sacrificaram a partir do dia 9 depois da inoculação dos tumores, só 2 ratos apresentaram efeitos locais resultantes de metástases: a) começo de hidronefrose unilateral em um animal e b) isquemia renal unilateral em outro. Nos outros 9 ratos as metástases eram relativamente pequenas ou de tamanho moderado mas sem nenhum sinal evidente de efeito local.

TIMO: atrofia marcada e rápida após o dia 4

ADRENAIS: hipertrofia progressiva após o dia 4

BAÇO: moderada hipertrofia logo após o dia 4 e moderada atrofia ao final.

RINS E CORAÇÃO: não se observaram alterações significativas

Na Tabela 2.1 e nas Figuras 2.1 (a), (b) estão mostradas os resultados para a evolução dos pesos dos órgãos.

Resultados RMN

As Tabelas 2.1 e 2.2 mostram os resultados para os T_1 e T_2 dados em milisegundos (ms), onde cada valor é a média da resposta de 4 ratos (exeto os ratos controle e de 11 dias que foram em número de 5). As desvios junto a os resultados não representam erros na medição senão desvios devido às respostas individuais de cada rato na evolução da enfermidade, em outras palavras, é a resposta média dum grupo de 4 ou 5 indivíduos. Nos gráficos 2.2(a) e (b) estão representados a evolução de T_1 de cada órgão com o avanço da enfermidade. Os valores para zero dias representam os ratos controle (sadios). Os gráficos para T_2 aparecem nas Figuras 2.3(a) e (b).

B. RATOS COM RESTRIÇÃO ALIMENTAR.

Para simular os efeitos da perda de apetite dos ratos com tumor, estudou-se a resposta dos diferentes órgãos com a restrição alimentar (jejum) para dois, quatro e seis dias. Na Tabela 2.4 estão mostradas os resultados da ingestão alimentar, peso corporal dos ratos e o efeito produzido nos pesos dos diferentes órgãos. A Fig. 2.4(a) representa os resultados da ingestão alimentar. Para comparar mostramos na Fig. 2.4(b) o gráfico da evolução do apetite dos ratos com tumor. Na Tabela 2.5 estão mostrados os valores correspondentes dos tempos de relaxação T_1 e T_2 em ms como a média para 4 ratos. Os gráficos correspondentes aparecem nas Figuras 2.5 e 2.6.

C. RATOS COM EDEMA INDUZIDO.

Também aqui, com propósitos de simulação, devido à retenção de água, foi provocado o edema num grupo de 8 ratos acompanhados de 6 ratos controle (sadios e sem edema). Na figura 2.7 estão mostrados os resultados para as variações dos pesos relativos dos órgãos considerados. Os valores de T_1 e T_2 (em ms), tanto para os ratos controle quanto para aqueles com edema, aparecem na Tabela 2.6.

D. DEPENDÊNCIA DE T_2 COM O ESPAÇAMENTO INTERPULSO NA SEQUÊNCIA CPMG. (DISPERSÃO T_2 -CPMG)

Na Tabela 2.7 estão mostrados os valores de T_2 (em ms) em função de 2τ (intervalo de tempo entre os pulsos de 180° na sequência CPMG) para os diferentes órgãos estudados e representados na Fig. 2.8 (a) e (b). A dependência de T_2 com 2τ é chamada de dispersão T_2 -CPMG. Dos resultados deduz-se que o comportamento do músculo foi o mais crítico. Mostramos na Tabela 2.8 os valores de T_2 para músculos de ratos com tumor aos 2, 7 e 11 dias, junto com os valores dum músculo fresco (normal), que depois da medição normal dexou-se durante uma hora no ambiente para logo medir novamente (imediatamente antes de colocar no tubo de medição foi secado suavemente em papel absorvente). Também incluo o T_2 de um músculo de rato com edema induzido e o T_1 de cada um dos músculos tabelados para propósitos comparativos. Observou-se que o comportamento de T_2 do músculo "semi-seco" foi similar ao músculo com 11 dias de enfermidade, mas o T_1 do primeiro tinha caído de

615 ± 16 ms a 427 ± 15 ms sendo o T_1 do segundo 733 ± 15 ms. O músculo com edema induzido mostrou uma elevada variação com o espaçamento interpulso 2τ , tendo um $T_1 = 702 \pm 51$ ms comparável com o T_1 do músculo com 11 dias de enfermidade. Os resultados estão ilustrados na Figura 2.9 (a) e (b).

2.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nas figuras 2.2 para T_1 podemos observar que na evolução dos órgãos dos ratos com tumor os órgãos mais claramente afetados foram o timo, fígado e adrenais, com uma diminuição para o timo e acrescentamentos para o fígado e adrenais. O coração e os rins parecem os menos afetados, embora que o baço padece um ligeiro aumento e logo diminuição, não se pode dizer que finalmente tenham sofrido alguma alteração respeito a T_1 . É indubitável que o T_1 do músculo aumentou. O tempo de relaxação T_1 do tumor também sofreu alterações, no quarto e sexto dia chega a valores máximos de ao redor de 850 ms.

Referente à evolução de T_2 (Fig. 2.3) no timo não parece indicar alteração significativa; os adrenais tem aparentemente um aumento oscilante enquanto que nos rins parece ter uma tendência a aumentar. O T_2 no baço é praticamente inalterado mesmo no coração, embora neste apareça uma diminuição ligeira no quarto, sexto e sétimo dias. O aumento de T_2 para o fígado é claro tanto como a diminuição observada para o músculo.

A perda marcada do apetite (Fig. 2.4(b)) pelos ratos inoculados com o tumor sugeriu estudar animais controle (sem

tumor inoculados) com restrição alimentar (jejum) e observar a resposta das possíveis alterações produzidas desde o ponto de vista das medições de T_1 e T_2 nos diferentes órgãos. Os resultados mostrados na Tabela 2.4, e graficados nas Fig. 2.5 e Fig 2.6, não estão indicando variações comparáveis aos achados para os órgãos dos ratos com o tumor. O mesmo pode-se dizer dos resultados para os ratos com edema induzido cujos resultados estão na Tabela 2.6.

É importante assinalar que pelos resultados do estudo da evolução clínica, anatomo-patológica da enfermidade, devido à inoculação do tumor (Walker-256) em 4 lugares bem afastados (entre eles) em cada animal, as metástases foram todas ganglionares, ou seja, nos órgãos estudados não aparecem aparentemente efeitos metastatizantes. Isto significa que os resultados achados para as mudanças dos tempos de relaxação T_1 e T_2 , com a evolução da doença, são prováveis efeitos a distância e que os órgãos mais afetados, desde o ponto de vista das medições T_1 e T_2 , seriam aqueles que fazem parte do sistema imunológico (timo e fígado) e adrenais. Este resultado é da maior relevância, porque estaria indicando a presença de algum agente (ainda desconhecido) que seria o responsável pela alteração do sistema imunológico, o qual impede que o tumor seja rejeitado.

Os resultados achados para o músculo estão indicando um comportamento diferente, além de ter uma clara diminuição em T_2 com o desenvolvimento da doença, também é o único tecido que mostra variações bem marcadas com o espaçamento de tempo interpulso no T_2 -CPMG para depois diminuir no último dia da doença (Fig. 2.9(a)). Podemos só conjecturar que o comportamento do músculo obedeceria à

atividade física do animal nos últimos dias antes da morte, associado provavelmente a um aumento na concentração de íons de Fe^{2+} - Fe^{3+} , mas, para chegar a conclusões definitivas a este respeito é necessário a realização de outros experimentos tais como ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

O seguimento da evolução da enfermidade com medições de tempos de relaxação, mesmo como indicadores referenciais, está mostrando muita utilidade, pois prováveis direções no desenvolvimento futuro da pesquisa estão já abertos, tal como o possível aumento de Fe^{2+} - Fe^{3+} nos tecidos musculares o qual poderia ser detectado num experimento de RPE.

TABELA 2.1. - EVOLUÇÃO DOS PESOS RELATIVOS COM A ENFERMIDADE PARA DIFERENTES ÓRGÃOS DOS RATOS INOCULADOS COM TUMOR

TECIDO	CONTRU LE	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TUMOR					
		2 DIAS	4 DIAS	6 DIAS	7 DIAS	9 1/2 DIAS	11 DIAS
TIMO	0.160	0.180	0.180	0.090	0.070	0.035	0.045
ADRENAIS	0.010	0.021	0.022	0.028	0.029	0.036	0.040
RINS	0.88	0.88	0.85	0.95	0.96	0.90	0.90
BACO	0.360	0.380	0.410	0.520	0.450	0.300	0.255
CORAÇÃO	0.33	0.34	0.35	0.33	0.33	0.33	0.35
FIGADO	3.07	3.85	3.98	4.16	4.16	3.67	3.06
TUMOR	0.00	0.5	3.5	10.6	15.4	26.8	27.2
PULMÃO	0.63	0.73	0.74	0.66	0.70	0.91	0.78
ALIMENTO %	100	101	90	62	41	21	25

TABELA 2.2. - EVOLUÇÃO DOS TEMPOS DE RELAXAÇÃO T₁ (ms) COM A
ENFERMIDADE PARA RATOS INOCULADOS COM TUMOR

TECIDO	CONTRO- LE	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TUMOR					
		2 DIAS	4 DIAS	6 DIAS	7 DIAS	9 1/2 DIAS	11 DIAS
TIMO	715±25	730±16	694±17	640±19	624±66	534±69	507±93
ADRENAIS	395±19	421±21	405±18	506±25	470±16	462±65	504±43
RINS	575±21	547±15	568±18	585±10	596±27	579±28	583±19
BAÇO	645±34	690±10	686±20	703±35	715±53	631±64	634±33
CORAÇÃO	651±35	662±6	660±14	640±30	631±28	669±5	684±15
FIGADO	303±18	342±7	391±13	417±10	412±6	428±61	430±39
MÚSCULO	633±33	642±11	632±15	650±7	662±13	740±90	732±28
TUMOR	--	693±159	851±34	819±43	694±138	763±47	698±52

TABELA 2.3 - EVOLUÇÃO DOS TEMPOS DE RELAXAÇÃO T_2 (ms) COM A ENFERMIDADE PARA RATOS INOCULADOS COM TUMOR

TECIDO	CONTRO LC	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TUMOR					
		2 DIAS	4 DIAS	6 DIAS	7 DIAS	9+2 DIAS	11 DIAS
TIMO	81±2	83±3	82±1	78±5	78±6	81±5	77±7
ADRENAIS	63±2	68±6	64±4	59±2	61±3	72±10	68±5
RINS	65±2	62±1	66±4	67±1	72±5	75±4	72±3
BACO	70±2	75±2	70±2	71±2	71±4	70±4	67±2
CORAÇÃO	52±2	52±4	50±1	49±2	50±1	55±2	53±3
FIGADO	43±28	45±1	47±2	46±2	47±2	52±7	54±3
MÚSCULO	65±4	61±61	61±8	54±6	55±6	52±7	47± 4
TUMOR	--	105±9	81±64	77±73	86±14	84±8	67±6

TABELA 2.4 - RESTRIÇÃO ALIMENTAR CONTROLADA
(PAIR FEEDING)

		D I A S						
		0	1	2	3	4	5	6
% P E S O	Ingestão alimentar	100	78.00	62.00	41.00	33.00	28.00	21.00
	Peso Corporal	100		92.4		88.2		82.5
% P E S O R E L A T I V O	TIMO			0.204		0.182		0.184
	ADRENAIS			0.38		0.044		0.043
	RINS			0.70		0.71		0.71
	BAÇO			0.31		0.27		0.24
	CORAÇÃO			0.302		0.263		0.287
	PULMOES			0.548		0.611		0.576
	FIGADO			2.86		2.71		2.69

TABELA 2 5 - EVOLUÇÃO DE T_1 E T_2 COM A RESTRIÇÃO ALIMENTAR (JEJUM)

TECIDO	DIAS DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR					
	RESULTADOS PARA T_1			RESULTADOS PARA T_2		
	2	4	6	2	4	6
TIMO	676±51	669±14	691±26	79±2	79±1	79±3
FIBRA DO TIMO			441±24			
ADRENAIS	339±17	336±30	324±11	63±1	63±3	60±1
RINS	521±27	488±17	483±17	69±3	66± 4	66±4
BACO	504±7	484±39	464±30	61±	59±4	55±3
CORAÇÃO	616±20	601±17	603±11	48±2	47±1	47±1
FIGADO	276±10	274±9	284±6	38±1	36±1	37±2
MÚSCULO	610±42	615±17	599±39	74±8	69±10	80±3

TABELA 2.6. - TEMPOS DE RELAXAÇÃO T_1 E T_2 PARA OS RATOS DE CONTROL E RATOS COM EDEMA INDUZIDO

TECIDO	CONTROLE		COM EDEMA INDUZIDO	
	T_1 (ms)	T_2 (ms)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
TIMO	684±21	82±2	720±29	84±3
FIBRA DO TIMO	317±69	60±13		
ADRENAIS	336±15	63±3		
RINS	475±30	65±5		
BACO	469±20	60±2	497±27	61±2
CORAÇÃO	563±15	47±2	623±18	52±2
FIGADO	273±11	42±3	272±31	42±4
MUSCULO	634±36	93±15	685±45	100±31

TABELA 2.7 - DEPENDÊNCIA DO TEMPO DE RELAXAÇÃO SPIN-SPIN (T_2) COM O INTERVALO DE TEMPO DOS PULSOS DE 180° NA SEQUÊNCIA CARR-PURCELL-MEIBOOM-GILL (CPMG) PARA DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS CONTROLE (SADIOS). (DISPERSÃO T_2 -CPMG).

INTERVALO DOS PULSOS 180° CPMG 2τ (ms)	TIPO	FIBRA DO TIPO	ADRE- NAIS	RINS	BACO	CORAÇÃO	FÍGADO	MÚSCULO
0.23	73.7	42.7	60.2	60.7	43.8	45.7	40.2	38.4
0.46		41.8			49.9		42.9	45.3
0.69		48	68.2		57.1	45.1	41.2	51
0.92	75.9	45.6	62.2	69.8	56.4	46.3	41.4	56.9
1.15	79.6	40.1	69.1	67.8	62.9	43.5	42.7	66.9
1.38	82.0	48.7	61.6	74.2	66.7	45.2	42.3	74.8
1.61	77.3		66.6	76.1	52.8			78.9
1.84	84.3		61.4	75.2	59.3			88.5
2.07	81.7			73.1				88.6
2.30								108.5

TABELA 2.8. - DISPERSÃO T₂-CPMG PARA MÚSCULOS EM DIFERENTES ESTADOS DA ENFERMIDADE.

INTERVALO DOS PULSOS 180° CPMG 2τ (ms)	RATO 11 2 DIAS	RATO 19 7 DIAS	RATO 8 11 DIAS	MÚSCULO NORMAL	MÚSCULO "SEMI SECO"	MÚSCULO COM EDEMA
0.23	44.2	41.11	36.4	41.0	29.4	46.7
0.46	50.7	47.8	40.1	47.7	29.6	57.7
0.69			43.7	55.6	37.5	67.1
0.92	63.2	60.6	45.1	57.1	36.0	85.4
1.15	70.0		49.0	67.1	41.3	87.7
1.38	74.2	75.1	50.0	69.7	39.8	96.8
1.61			47.6	76.5	36.4	107.0
1.84	89.3	91.3	49.6	79.5	44.4	123.9
2.07			53.3	79.6	41.6	119.2
2.30	103.8	105.7	51.2	92.4		

Fig. 2.1(a)
Evolução dos pesos relativos com a
enfermidade para diferentes órgãos
dos ratos inoculados com tumor

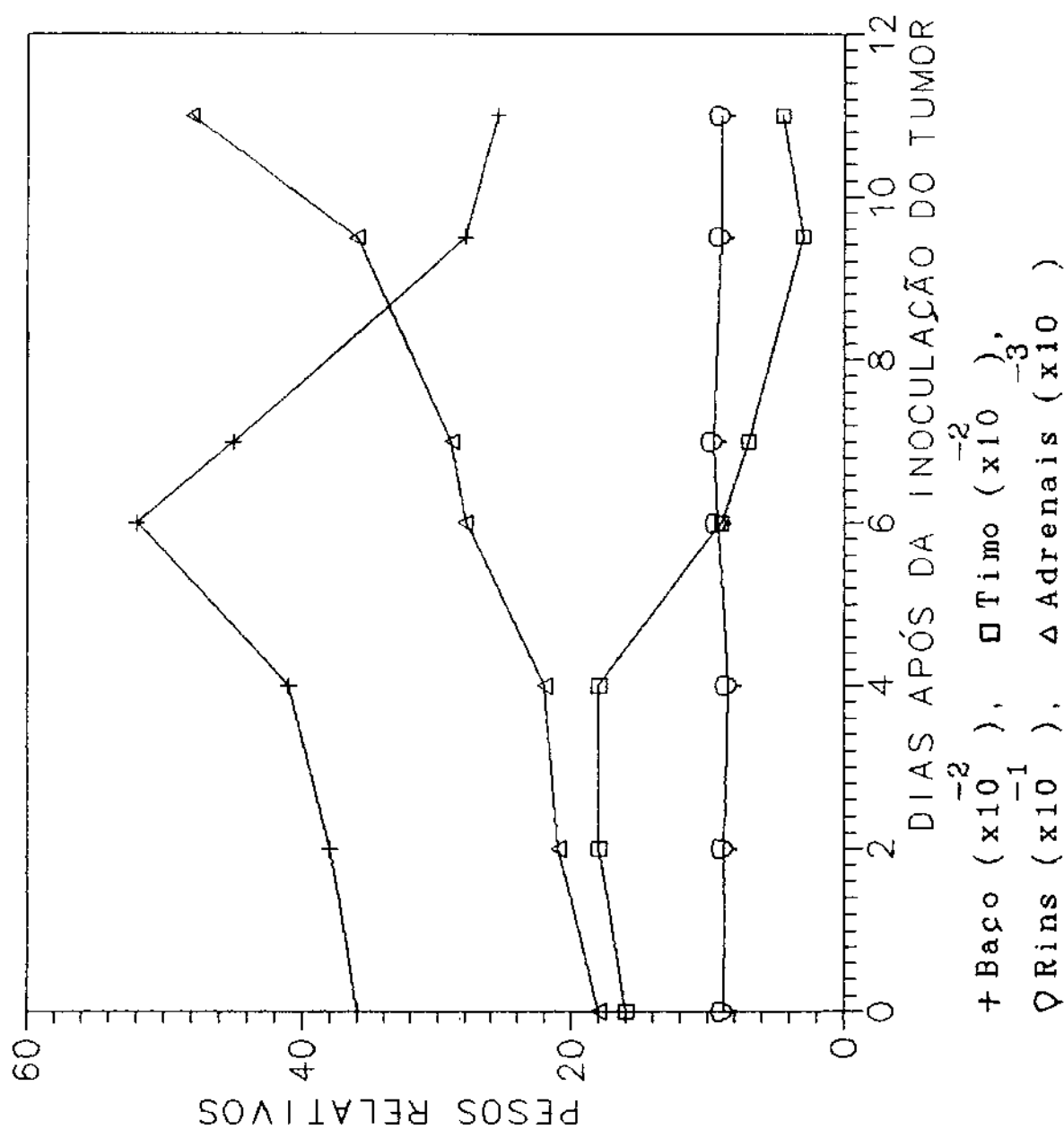
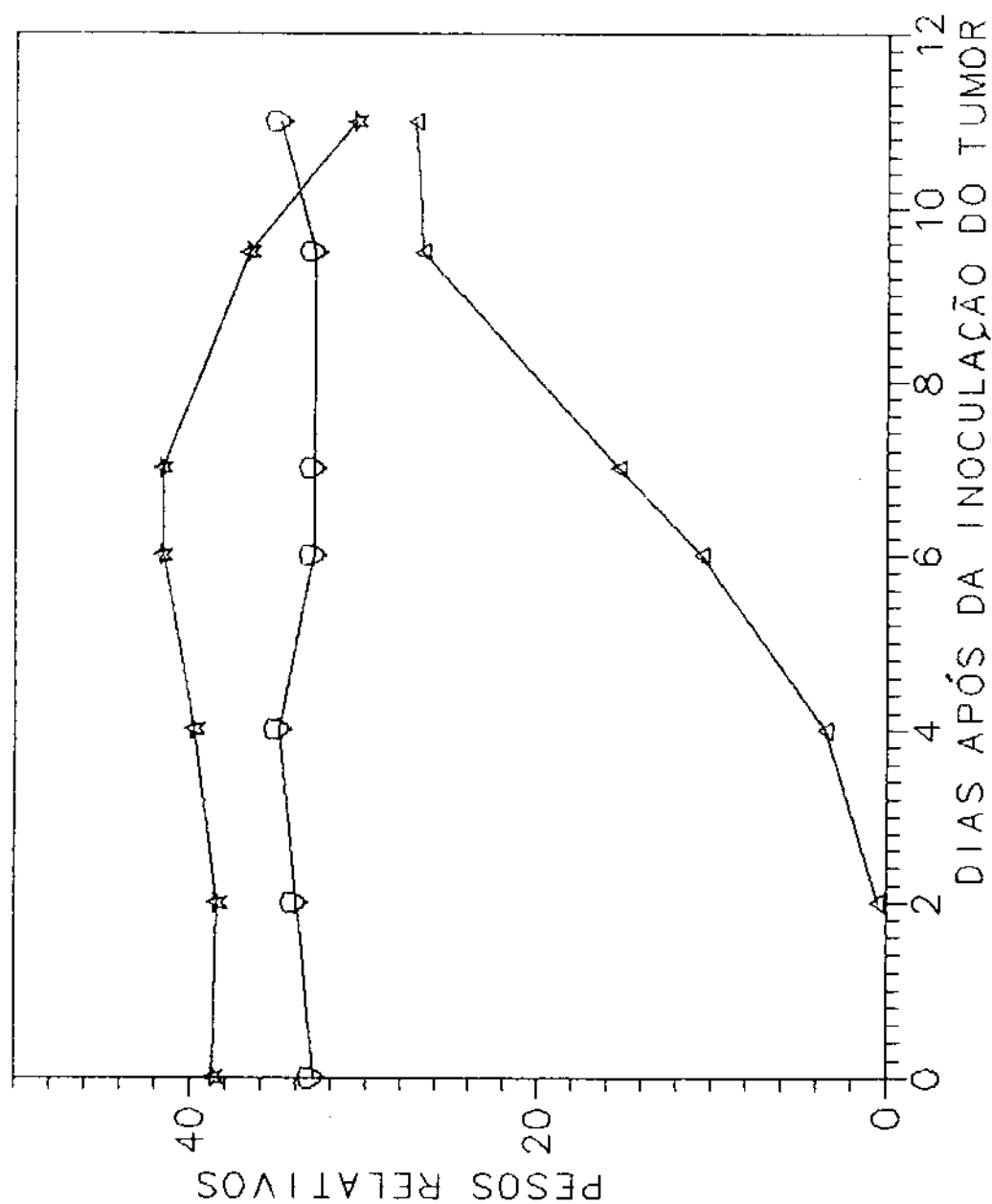


Fig. 2.1(b)
Evolução dos pesos relativos com a
enfermidade para diferentes órgãos
dos ratos inoculados com tumor



○ Coração ($\times 10^{-2}$). ☆ Fígado ($\times 10^{-1}$). Δ Tumor

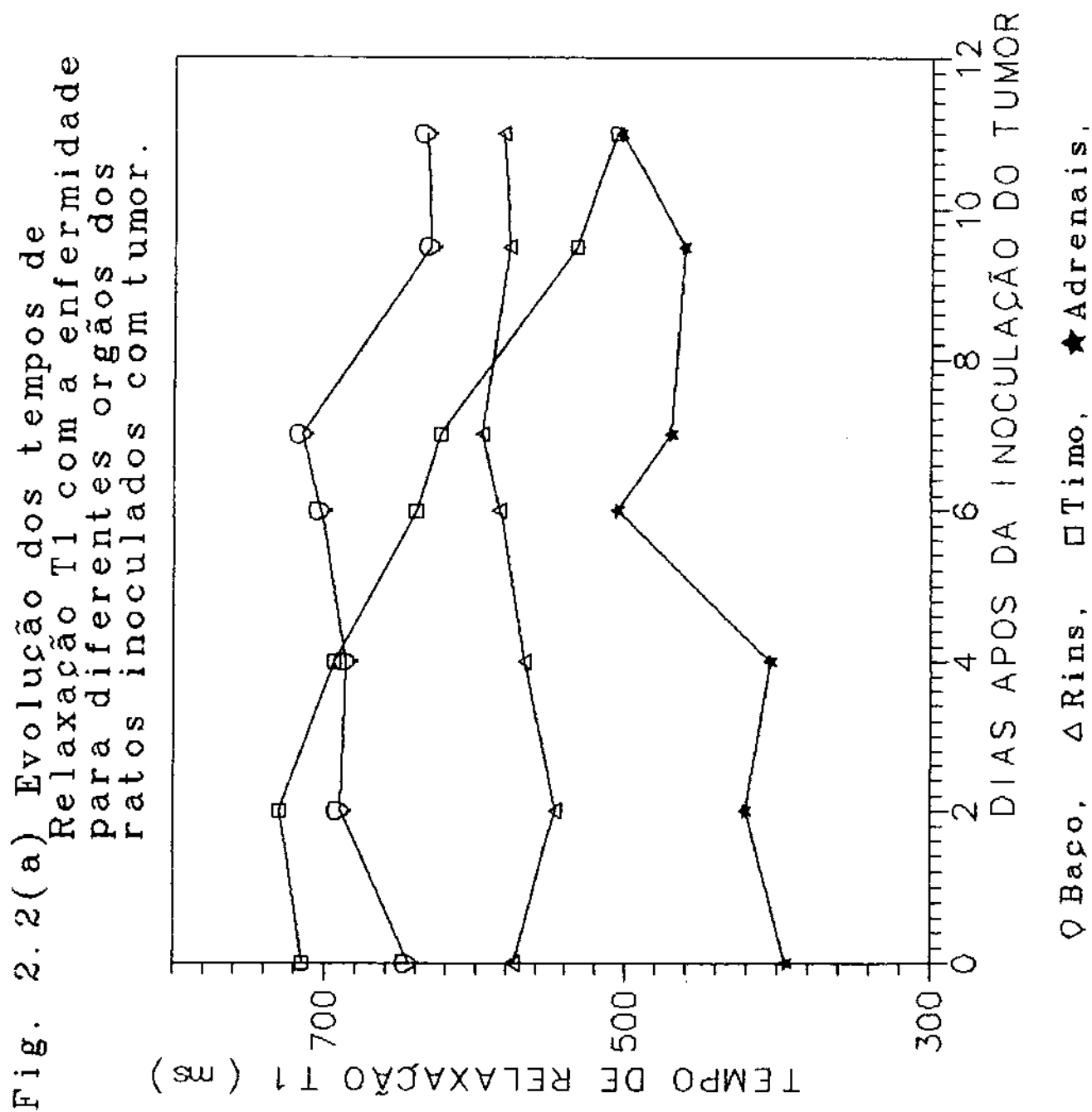


Fig. 2.2(b) Evolução dos tempos de Relaxação T1 com a enfermidade para diferentes órgãos dos ratos inoculados com tumor.

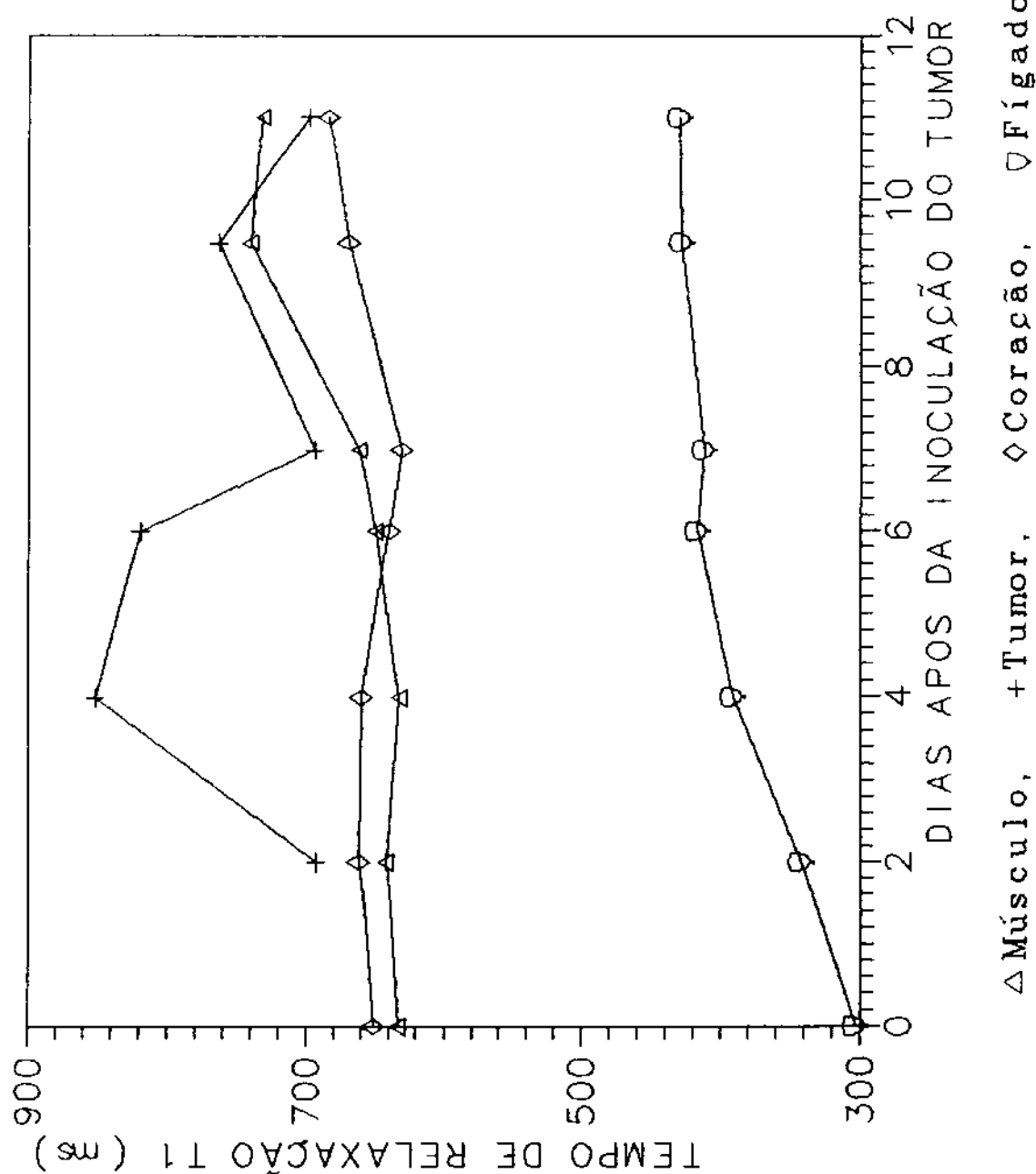


Fig. 2.3(a) Evolução dos tempos de Relaxação T2 com a enfermidade para diferentes órgãos dos ratos inoculados com tumor.

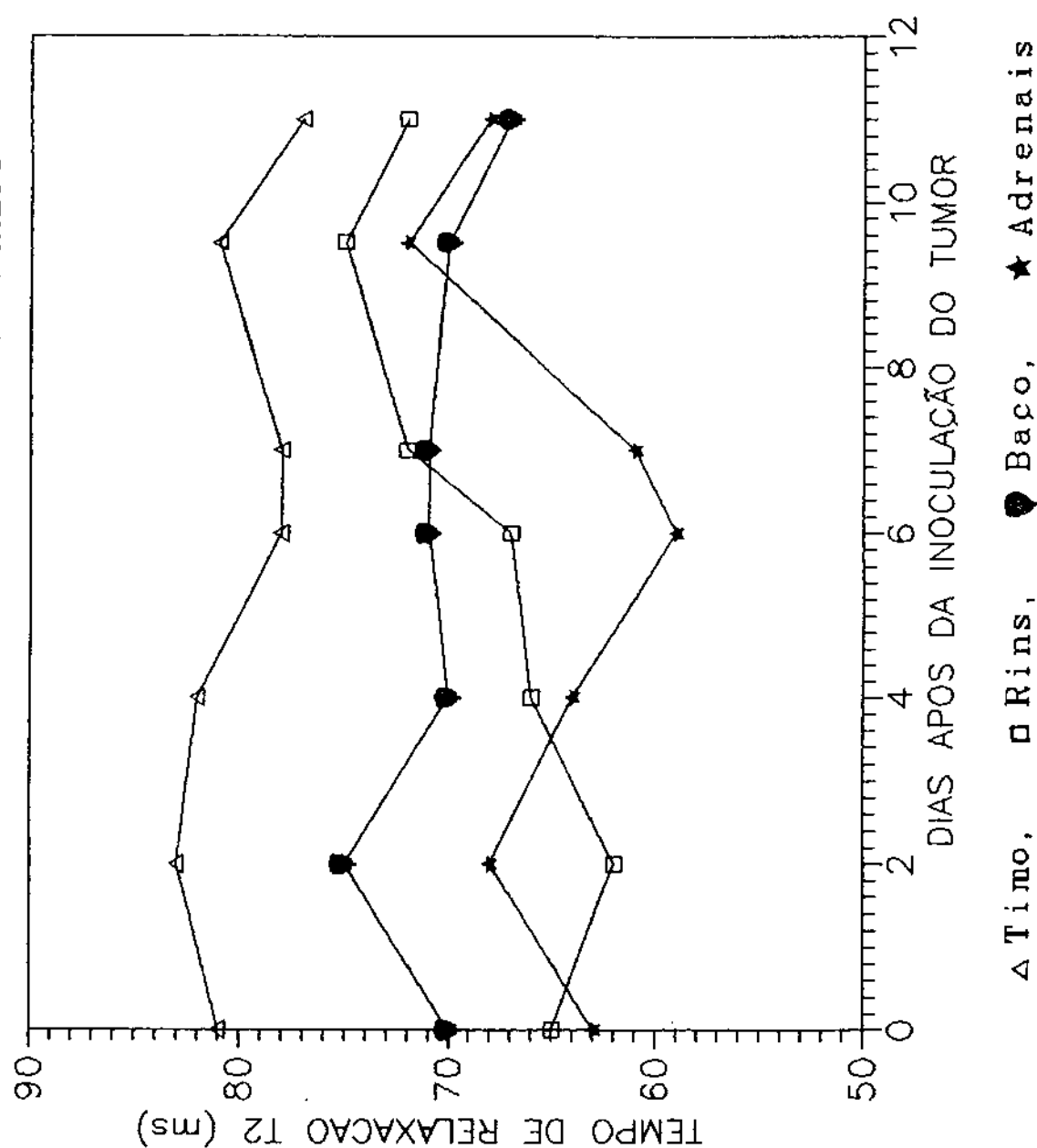


Fig. 2.3(b) Evolução dos tempos de Relaxação T2 com a enfermidade para diferentes órgãos dos ratos inoculados com tumor.

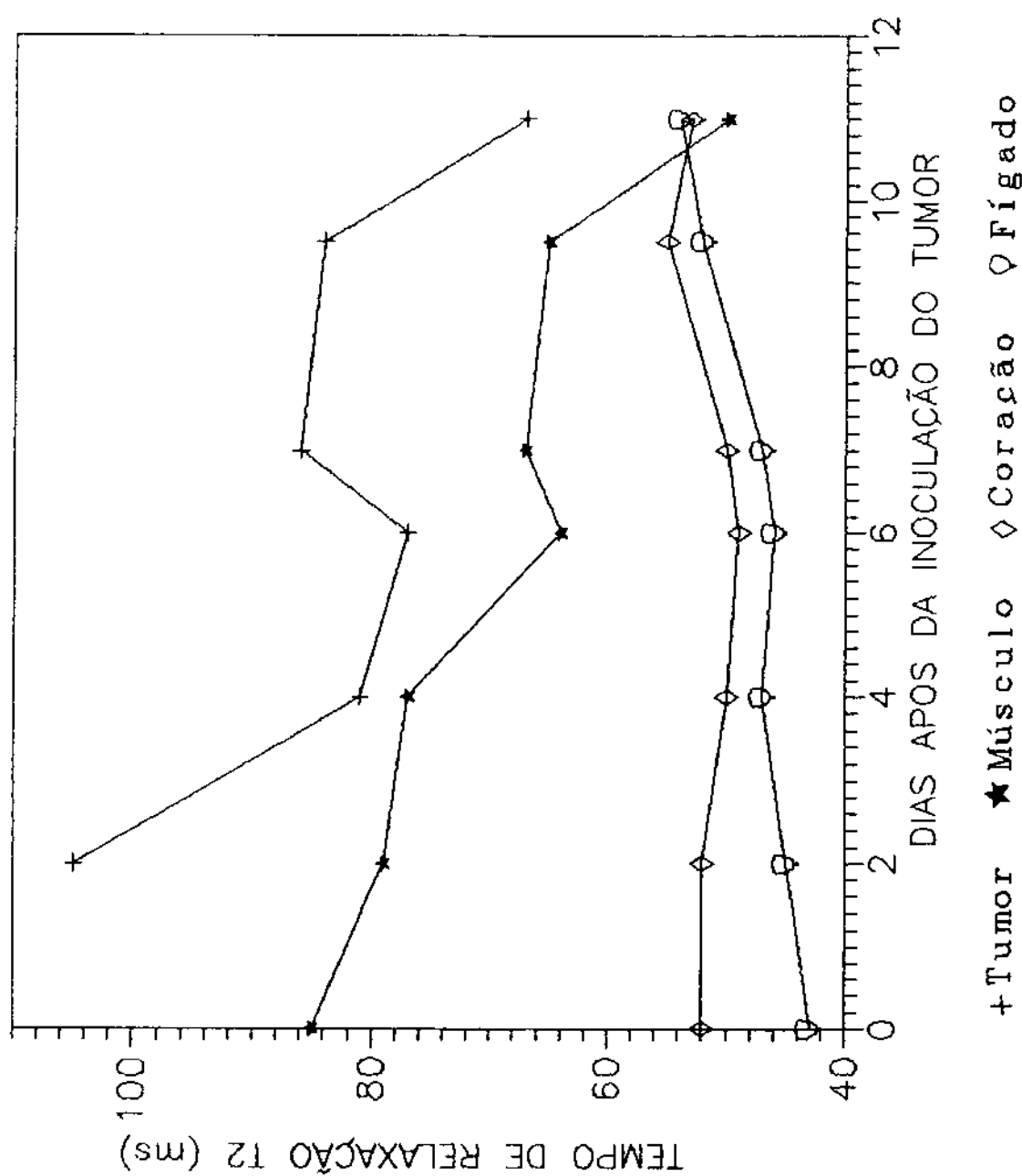


Fig. 2.4(a)
Evolução do apetite dos ratos com tumor

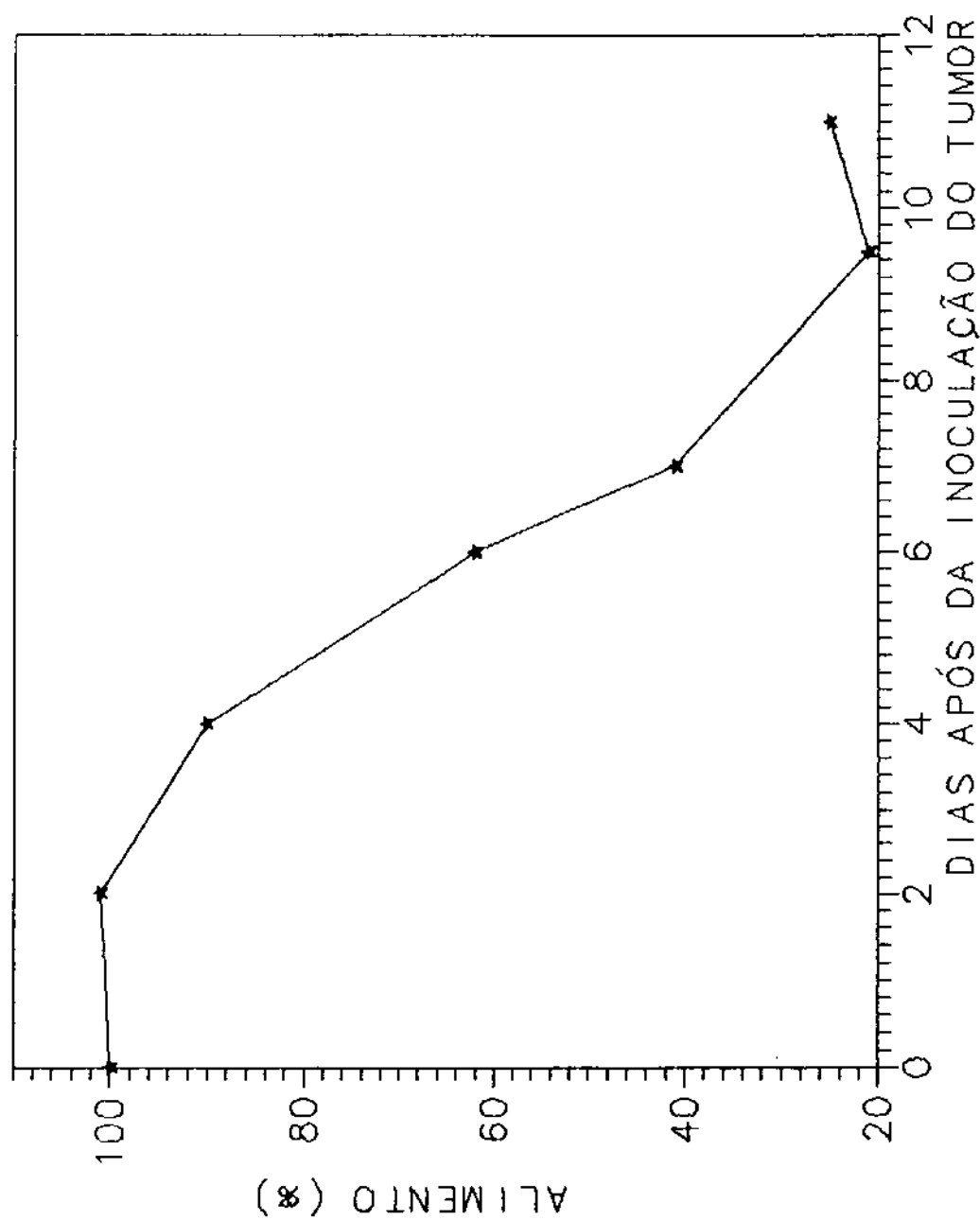
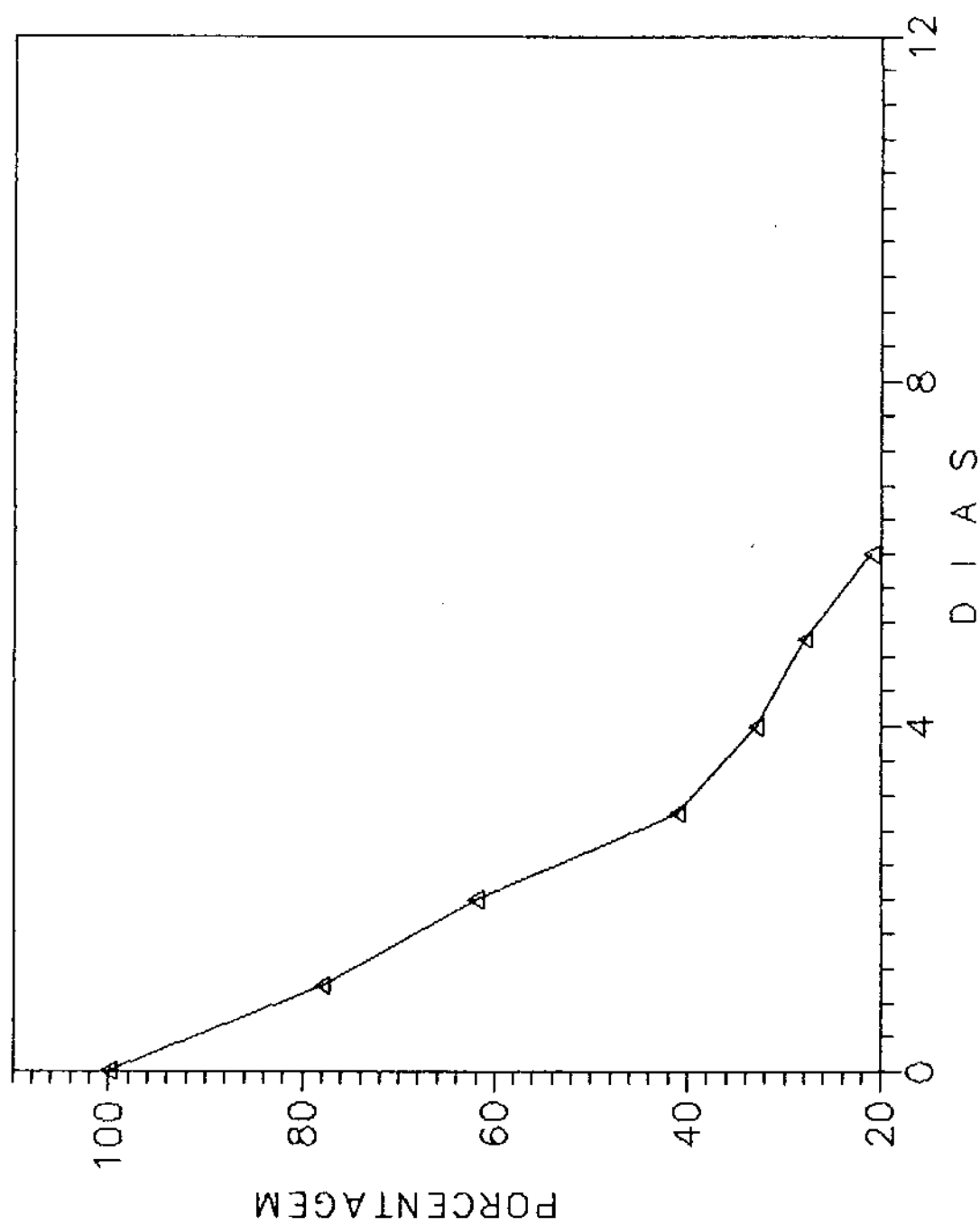


Fig. 2.4(b)
(Restrição alimentar controlada



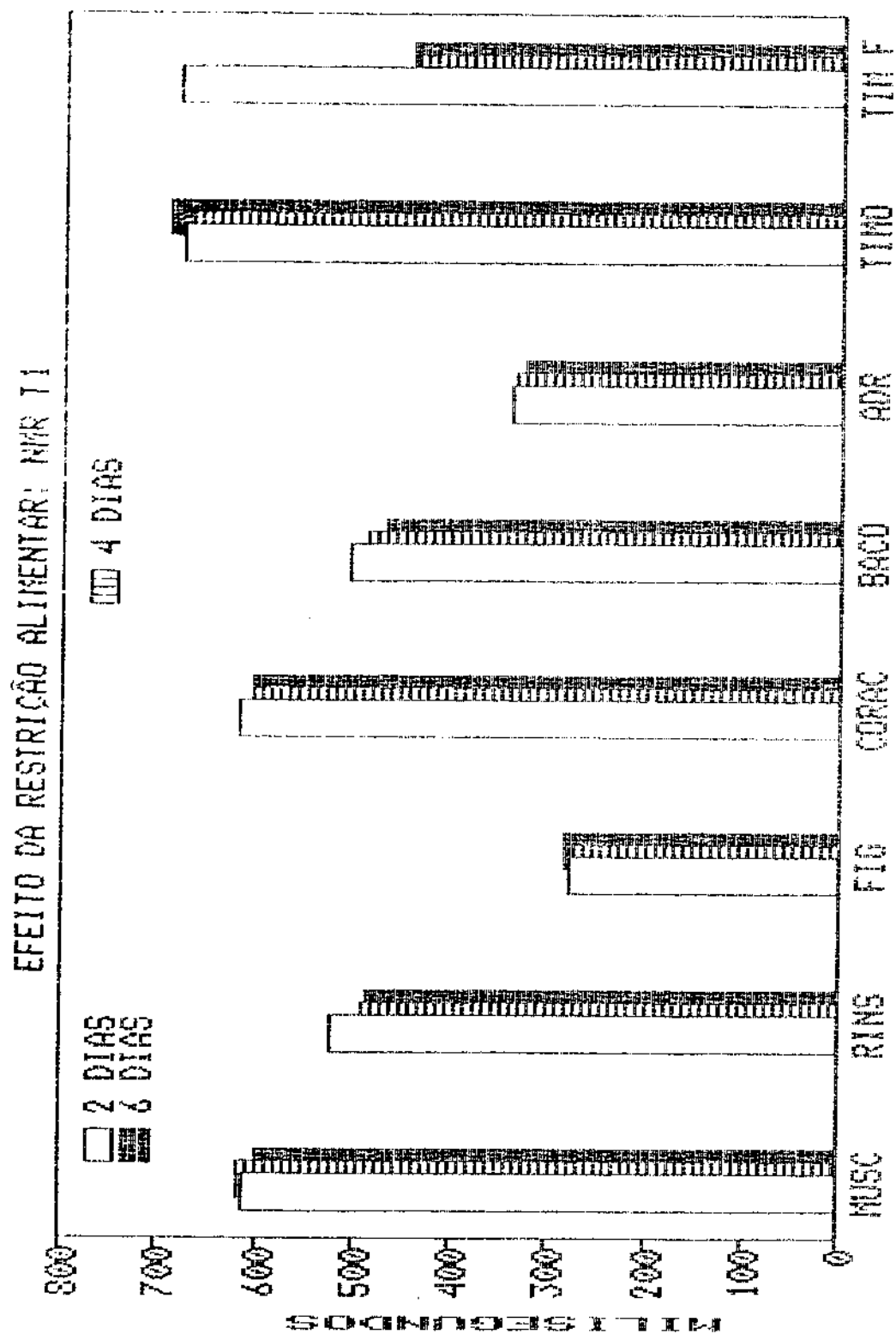


FIG. 2.5

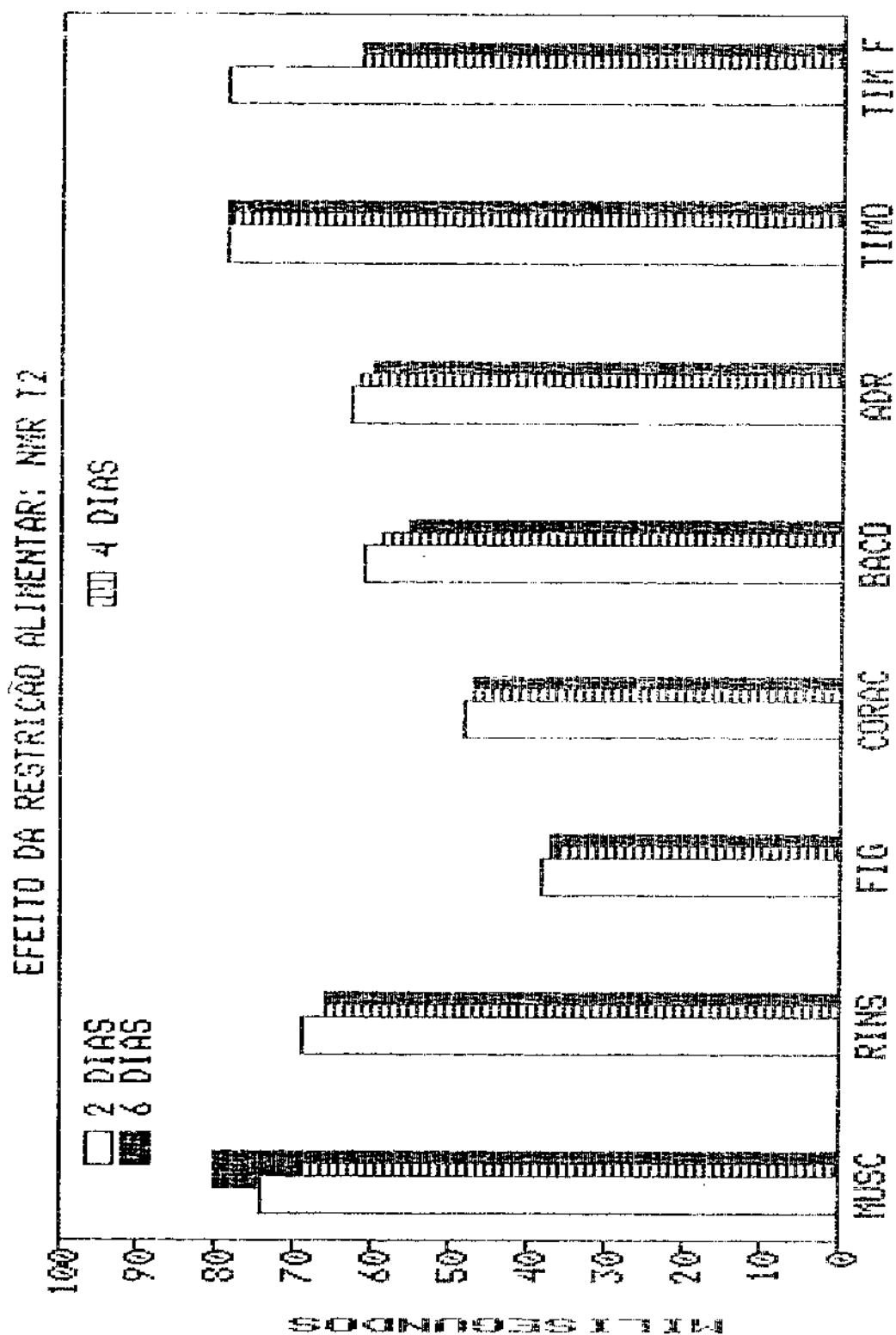


FIG. 2.6

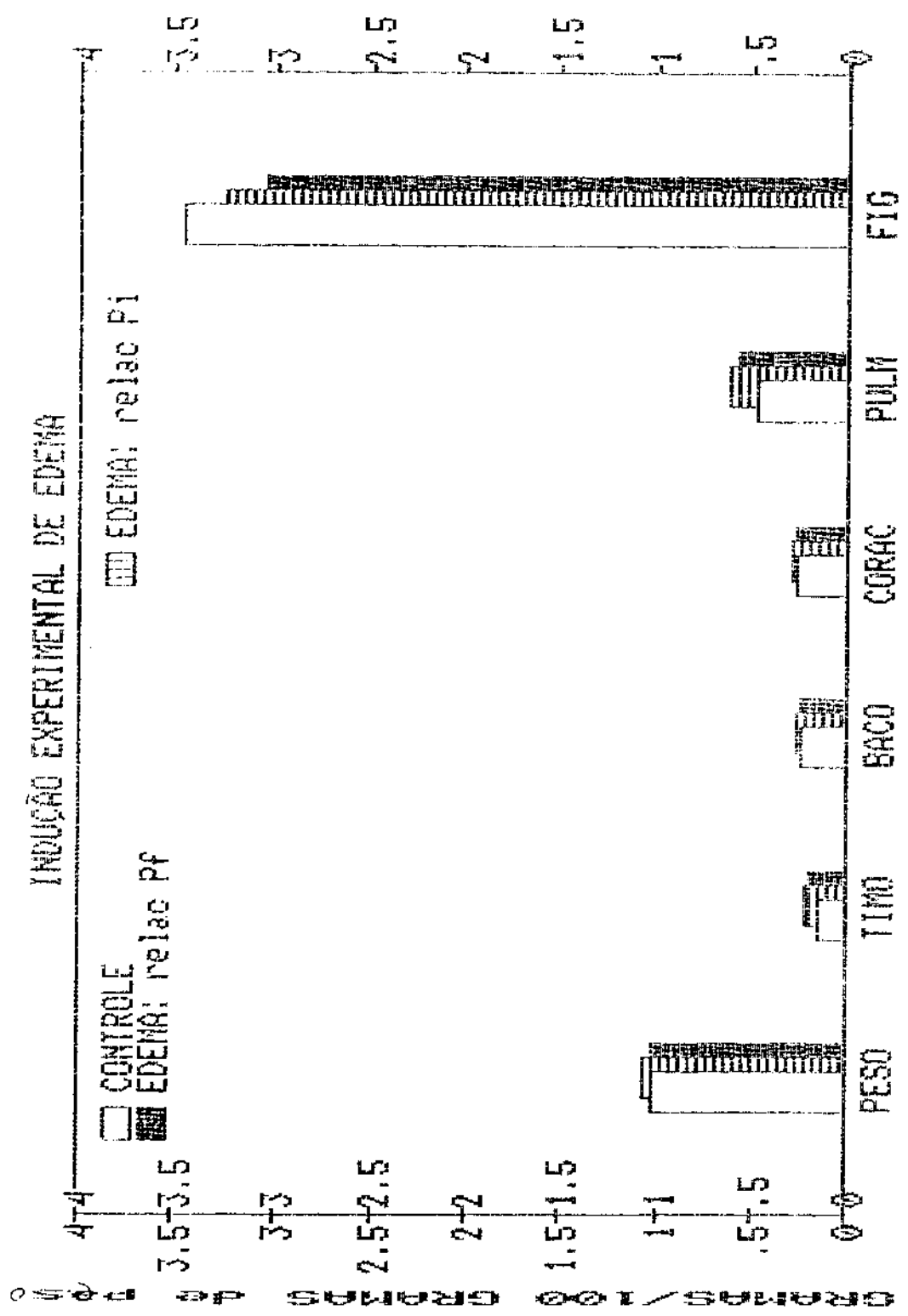
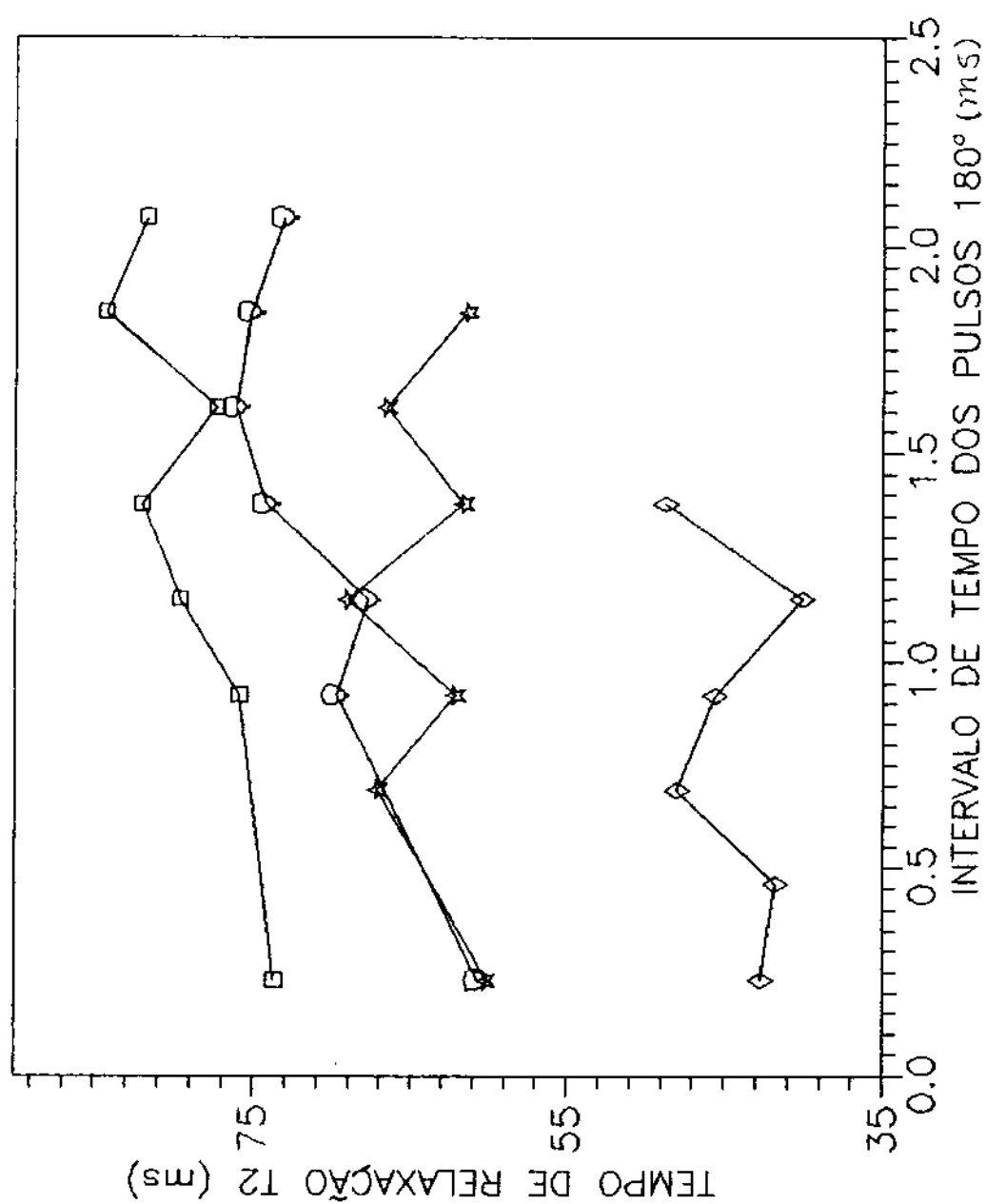


FIG. 2.7

Fig. 2.8(a)
Dispersão T2 - CPMG para diferentes
órgãos ratos controle



□ Timo, ○ Rins, ☆ Adrenais, ◇ Fíbrea do Timo

Fig. 2.8(b)
Dispersão T2 - CPMG para diferentes
órgãos ratos controle

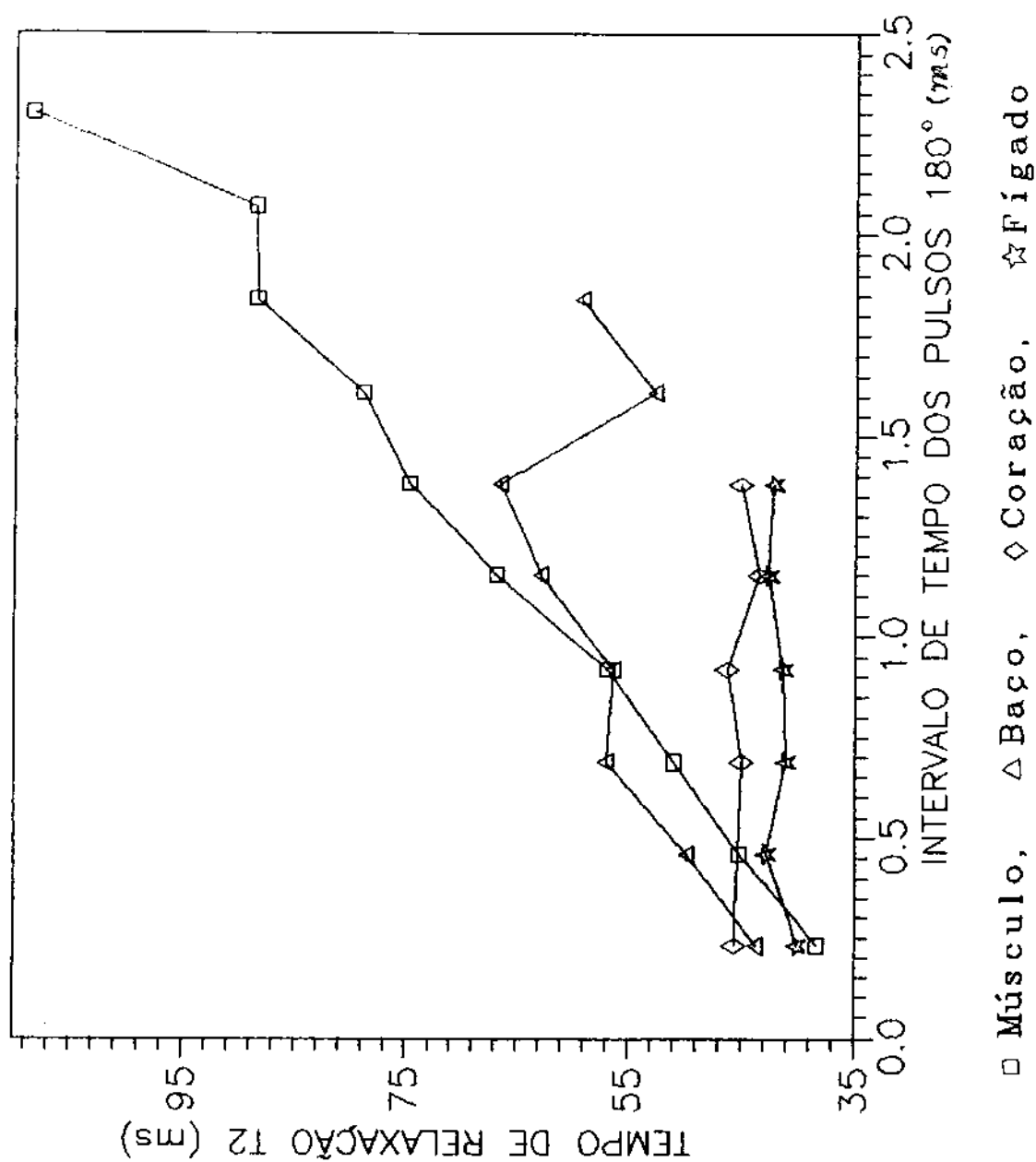


Fig. 2.9(a)
Dispersão T2-CPMG para músculos em
diferentes estados da enfermidade

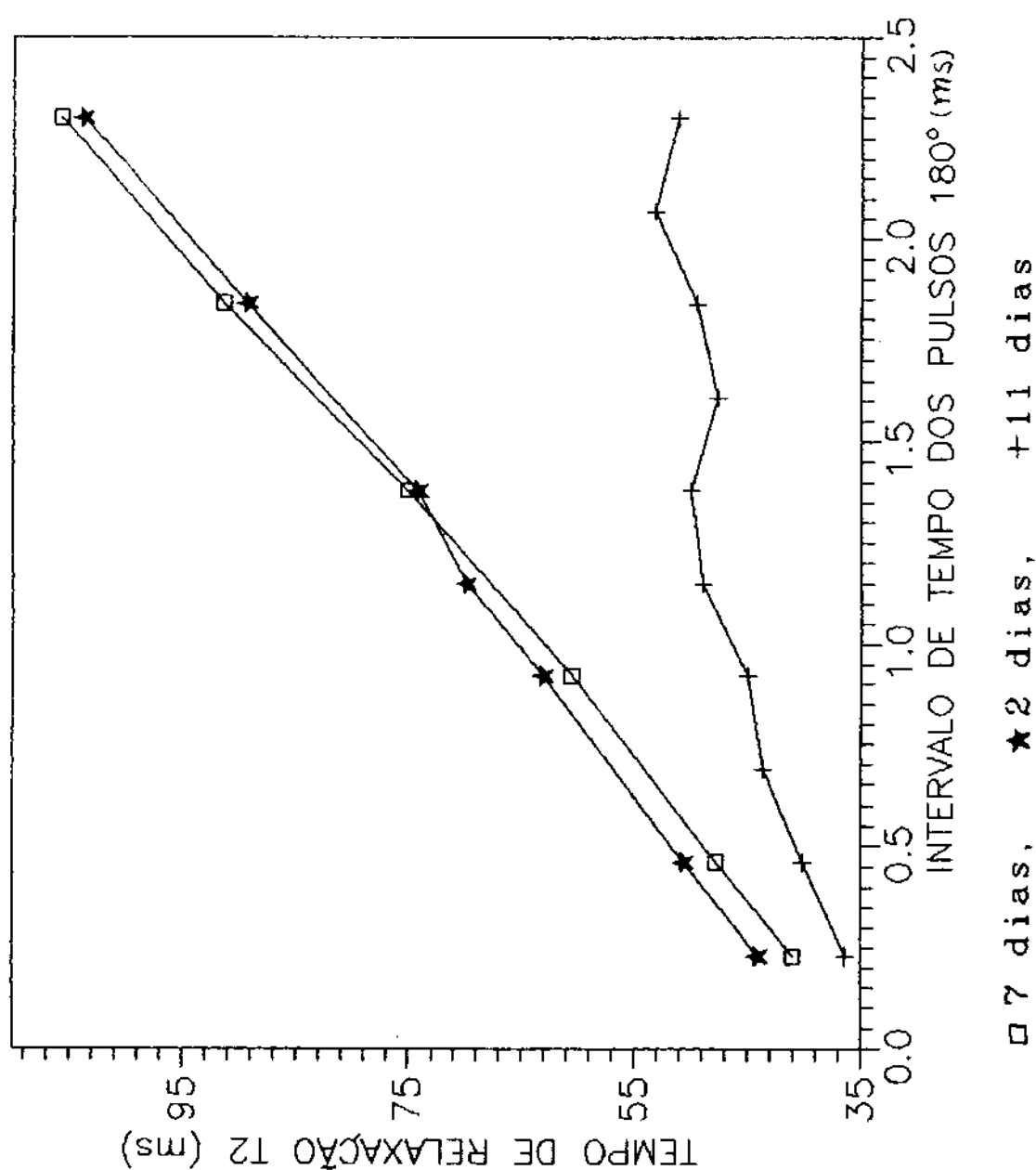
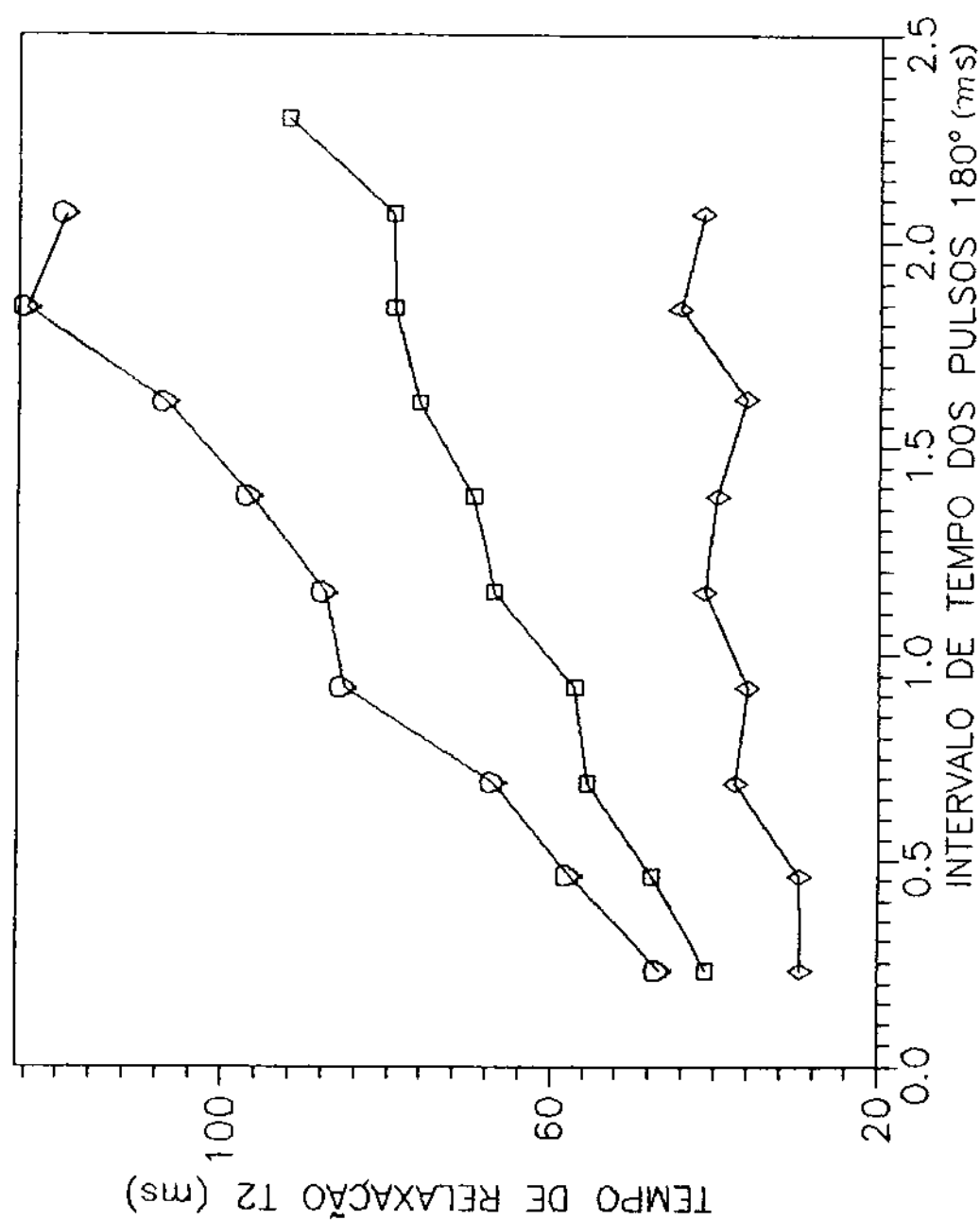


Fig. 2.9(b)
Dispersão T2-CPMG para músculos em
diferentes estados.



○ com edema, □ normal, ◇ semiseco.

GELATINIZAÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO.

Assim como nos estudos de tecidos biológicos, o rol e estado da água é de máxima importância em estudos dos sistemas que têm a ver com ciência e tecnologia de alimentos. A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas que mais contribuíram com o estudo detalhado da estrutura e mobilidade em muitos sistemas biológicos. Infelizmente, devido à complexidade dos sistemas biopolímeros-água, existem diferentes modelos e interpretações da dinâmica das interações nesses sistemas [17].

O comportamento das moléculas da água são normalmente estudados por RMN de prótons, deutério (^2H) e oxigênio-17 (^{17}O), sendo a RMN pulsada a normalmente utilizada e os parâmetros mais habitualmente medidos são os tempos de relaxação T_1 e T_2 , acompanhados muitas vezes de medições de coeficientes de difusão, e intensidade do sinal (FID, eco, etc.) dando informação da dinâmica molecular dos sistemas macromoléculas-água [29, 30, 31, 32, 33]. Falando mais especificamente dos sistemas amido-água, Lechert e outros [34] fazem uma discussão das possibilidades e limitações das técnicas de RMN de largura de linha e pulsada para a investigação de problemas especiais em ciência e tecnologia de alimentos. Richardson et al. [35] resumiram em quatro aspectos o uso da RMN em estudos de hidratação do amido: 1) conteúdo de água total, 2)

capacidade de água ligada (bound water), 3) mobilidade da água ligada e mecanismos de ligação da água associada e 4) o fenômeno da gelatinização e inchamento. Este último aspecto é o interesse do presente capítulo, onde basicamente justificarei a possibilidade de estudar a cinética de gelatinização do amido de trigo mediante medições da relação líquido/sólido (FID) no processo de gelatinização. O presente trabalho foi motivado pela necessidade de desenvolver um método rápido e reproduzível para estudos de cinética de gelatinização do amido, já que os métodos tradicionais, tais como a susceptibilidade enzimática, é muito lento e pouco preciso [36].

Como é importante ter o modelo estrutural do sistema a estudar, exporemos brevemente a estrutura do amido, assim como o processo de hidratação e gelatinização.

3.1.1 O AMIDO

O amido é uma fonte de carboidratos e, devido à complexidade deste tipo de sistemas, a sua estrutura não está definitivamente esclarecidas. A recente revisão de Zobel (1988) [37] ajuda, de maneira breve e simples, a se introduzir rapidamente no conhecimento do amido para os fins de nosso interesse.

O amido está formado por partículas de diferentes formas granulares (i.e., esferas, elipsóides, polígonos, etc.) que podem ser isoladas de raízes, tubérculos, sementes, frutas, etc. Os grânulos tem dimensões entre 0.5 a 175 μm e estão formados de duas entidades moleculares (polímeros): amilose (a fração linear) e a amilopectina (a fração ramificada), embora se fale de um terceiro

componente que alguns grânulos contém em até 20% [38], referido como um polisacarídeo de fração intermediária, ao parecer, pouco ramificado (a amilose e a amilopectina são polisacarídeos). Estes polímeros têm como unidade básica constituinte a molécula de glucose denominada α -D-glucose (Fig. 3.1(a)). A molécula de amilose têm uma estrutura linear, como está esquematizada na Fig. 3.1 (b), com massas moleculares de 200 a 250 mil daltons (para o milho) até de 1.0×10^6 daltons para a batata [37].

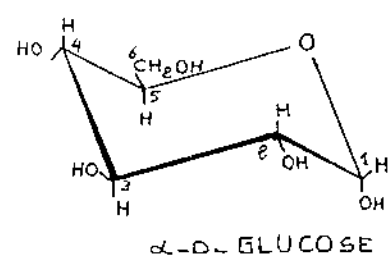


Fig. 3.1 (a)

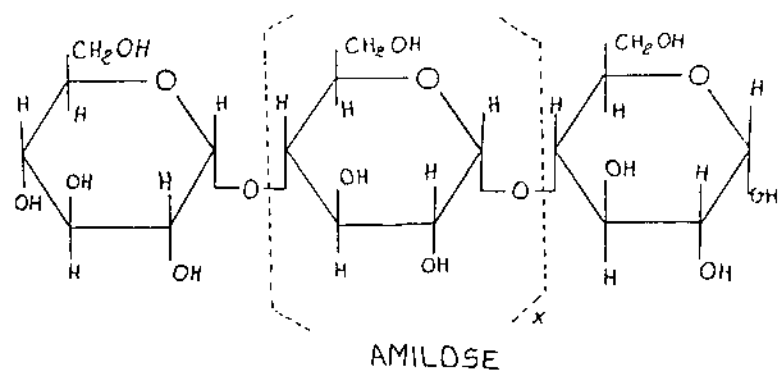
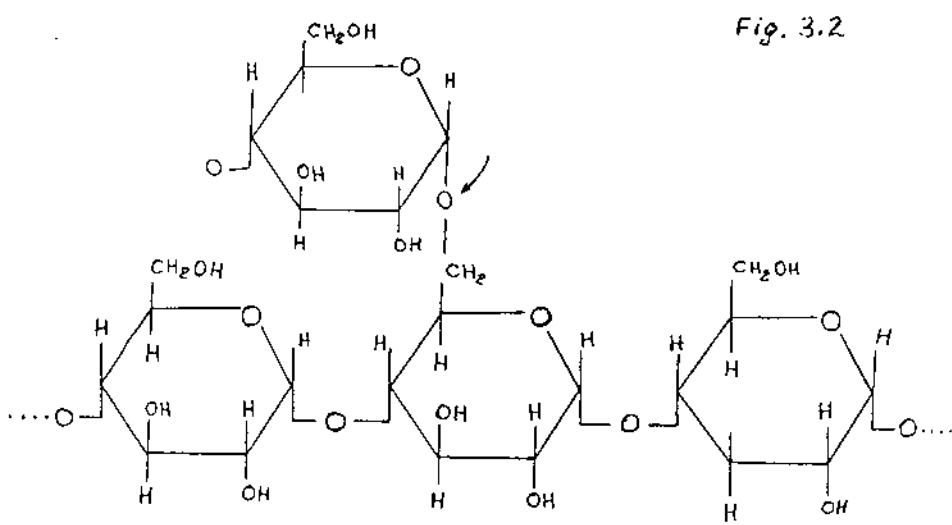
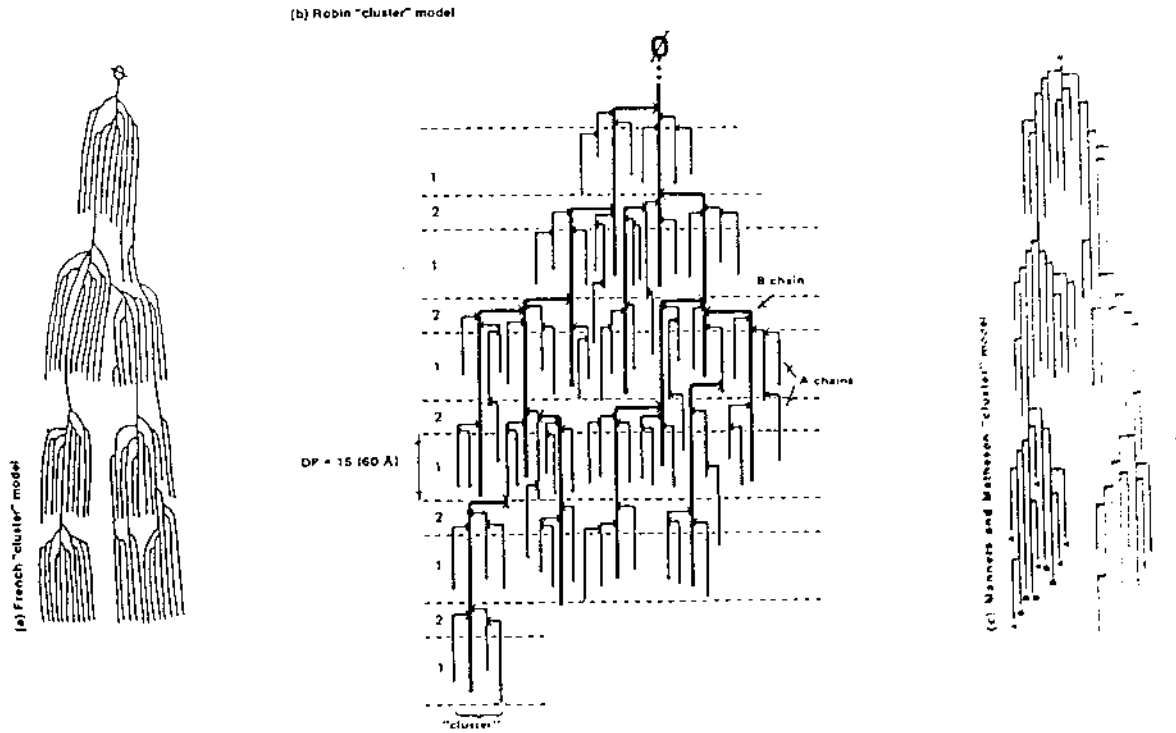


Fig. 3.1 (b)

A amilopectina é um polímero altamente ramificado, na Fig. 3.2 está desenhada a cadeia principal com um ponto rama na posição 1,6 e na parte inferior aparece um possível esquema de ramificação [37, 38]. Nos grânulos de amido a amilose e amilopectina não estão uniformemente distribuídas, existindo regiões amorfas e cristalinas. Ambos os polímeros existem nas duas regiões



AMILOPECTINA



3.1.2 HIDRATAÇÃO

Os polisacarídios secos em condições de umidade normal contêm de 8 a 10% de água como água de hidratação. Nas regiões amorfas, por ter as moléculas os segmentos da cadeia em arranjos desorganizados, existem ligações de hidrogênio insatisfeitos pelo que podem-se hidratar facilmente. Quando o polisacarídio é colocado em água, as moléculas de água penetram nas regiões amorfas e unem-se com os polímeros aproveitáveis competindo e eventualmente reduzindo a números desprezíveis as ligações interpolisacarídios [39]. Os segmentos duma cadeia do polímero tornam-se completamente solvatadas e deslocam-se pela ação cinética. Muitas seções das cadeias do polisacarídio são sucessiva e completamente solvatadas e solubilizadas enquanto diminui o número de segmentos ainda vinculados a outras cadeias do polisacarídio não solvatadas completamente. Este estágio intermediário representa um estado gel transiente. Os polímeros solúveis continuam a se hidratar até ficar rodeados de uma atmosfera de moléculas de água parcialmente imobilizadas e o polímero é monodispersado. No caso do amido à temperatura normal, a água rodeia o grânulo sem dissolvê-lo.

Os estudos de relaxação nos sistemas amido-água mediante RMN de prótons (^1H) causa dificuldades na interpretação de dados [40], mas, nos últimos anos, mediante estudos de RMN de ^2H e ^{17}O e da mobilidade da água em suspensões de amido, estão se chegando a resultados esclarecedores sobre os mecanismos de hidratação do amido a través de estudos de relaxação spin-spin (T_2). Richardson et al. [31, 35] acharam quatro regiões de mobilidade da água por medições taxas de relaxação ($R_2 = 1/T_2$) com a concentração do amido: A

região I, de 10 a 40%(gramas de amido seco/mol de água); região II de 40 a 60%; região III, de 60 a 70%, até uma região IV de 92 a 96% (com ^2H). Somente a região I é linear, onde o modelo isotrópico de dois estados com troca rápida (fast exchange) pode ser usado, ou seja [31,35]:

$$\frac{1}{T_{\text{ob}}} = \frac{P_B}{T_B} + \frac{P_F}{T_F},$$

onde P_B e P_F são os percentuais decimais das frações de água ligada (bound water) e livre (free water). Nas outras regiões, devido ao comportamento não linear, propõem-se dois modelos que não mencionarei mas estão indicando a complexidade do problema.

3.1.3 GELATINIZAÇÃO

A gelatinização é, em geral, o termo aplicado à sequência de transformações quando uma dispersão aquosa do amido é aquecida [36].

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria mas incham quando aquecidos em meio aquoso. No início do processo o inchamento é reversível, e quando atingida determinada temperatura, o inchamento torna-se irreversível, onde a estrutura do grânulo começa a se alterar significativamente. Este processo denominado gelatinização ocorre numa faixa de temperaturas variáveis. No amido de trigo situa-se entre 60 e 75 °C [13]. Inicialmente a gelatinização acontece nas regiões amorfas do grânulo, e quando atingida a temperatura de gelatinização, acontece uma rup-

tura das ligações de hidrogênio responsáveis pela manutenção da integridade do grânulo. Como consequência do intenso grau de ruptura das pontes de hidrogênio, o grânulo fica completamente hidratado. Poderia-se dizer que a gelatinização é a continuação da hidratação do amido por efeito do aquecimento, quebrando o grânulo de amido para ficar hidratado parcial ou totalmente, o que depende da quantidade da água, da temperatura e o tempo de tratamento. O aquecimento contínuo em excesso de água causa inchamento e provoca ruptura dos grânulos de amido, perda da cristalinidade e liberação de material solúvel dos grânulos. Devido à perda de cristalinidade o amido gelatinizado foi denominado "amorfo". Na Fig. 3.3 está esquematizada o arranjo amorfo tal como ficariam os polímeros com a hidratação ou gelatinização. A água que rodeia as linhas dos polímeros estão parcialmente imobilizadas.



Fig. 3.3. -Possível arranjo do amido hidratado.

Lelievre e Mitchel [41] assinalaram em 1975 que outras técnicas (não RMN) são relevantes em aplicações práticas, mas a contribuição para o entendimento das mudanças moleculares que acontecem na gelatinização foi muito limitada. Eles [41], mediante estudos com RMN pulsada, chegaram a determinar que o decaimento observado em T_2 , no processo de gelatinização, corresponde ao início do derretimento dos arranjos cristalinos dos polímeros nos grânulos de amido. No entanto os prótons no sistema existem em diferentes estados (por exemplo os prótons formando as ligações diretas entre os hidrogênios e as cadeias dos polisacarídios, prótons dos grupos hidroxilos dos polímeros e a água fora da vizinhança do grânulo), equivalente à existência de diferentes tempos de relaxação, foi observado o comportamento duma única fase (um único tempo de relaxação) por Basler e Lechert [42] e confirmado por Lelievre e Mitchel [14]. Estas observações conduziram a assumir a existência de troca rápida entre diferentes sítios (fases) para interpretação de tempos de relaxação em gels de polisacarídios [43]. Posteriormente, Callaghan et al. [44], em estudos de pastas de amido de trigo, também observaram que, tanto T_2 como T_1 , estão caracterizados por constantes únicas de tempo, indicando troca rápida entre a água normal (bulk water) e a água associada com o polímero.

3.2 PROCEDIMIENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O amido utilizado foi extraído de farinha de trigo nacional cedida pela SANBRA com a seguinte composição: 13.42% de proteína, 2.45% de gordura e 0.47% de cinzas.

As amostras estudadas consistiram dos sistemas amido + água destilada + algum aditivo (glútem, NaCl, sacarose, etc.).

O aquecimento das amostras (para propósitos de gelatinização) foram feitas num forno com control de temperatura e tempo de aquecimento. Todas as amostras foram preparadas no Laboratório de Cereais da FEA-UNICAMP, descritas no trabalho de Silva [9], enquanto que as medições RMN no Laboratório de Propriedades Magnéticas do IFGW-UNICAMP com o Minispec PC120 da Bruker.

3.2.1 MEDIÇÕES DE TEMPOS DE RELAXAÇÃO

Os primeiros ensaios RMN consistiram em medir os tempos de relaxação T_1 e T_2 para diferentes concentrações de amido-água a temperatura ambiente. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.1 e graficados na Fig. 3.4. Como é de esperar para sistemas heterogêneos tanto T_1 e T_2 diminuem rapidamente com o aumento da concentração de amido (ou maior concentração de prótons na fase sólida). Outro comportamento interessante de T_2 foi a dispersão T_2 -CPMG já observada em tecidos biológicos (Cap. 2). Na Tabela 3.1 pode-se observar as mudanças de T_2 para dois valores de 2τ (intervalo dos pulsos de 100°) que também aparece graficado na Fig. 3.4.

A Tabela 3.2 representa a dispersão T_2 -CPMG para um conjunto de 7 amostras amido-água de 60% de água, tratadas termicamente

(com diferentes tempos de gelatinização) a 130°C , acompanhadas duma amostra padrão P (sem tratamento térmico) e uma amostra TG suposta totalmente gelatinizada (com 5 min de tratamento térmico). Observe-se que a partir da amostra 2 (120 seg de tratamento térmico) a dispersão de T₂ é menos que nas amostras P e 1. A Fig. 3.5 é um gráfico de tal comportamento para algumas das amostras. Belton e Hills [45] e Hills et al. [33], concluíram que a dispersão T₂-CPMG está relacionada com o comportamento multiexponencial e este, por sua vez, com a heterogeneidade da amostra. Sob estes argumentos, os valores de T₂ mostrados na Tabela 3.2 parecem razoáveis se consideramos que com a gelatinização a heterogeneidade, apresentadas pelas amostras P e 1, são reduzidas desde a amostra 2 até a TG, já que os grânulos começam a se hidratar e quebrar. Pareceria que a gelatinização está relacionada a uma diminuição da heterogeneidade.

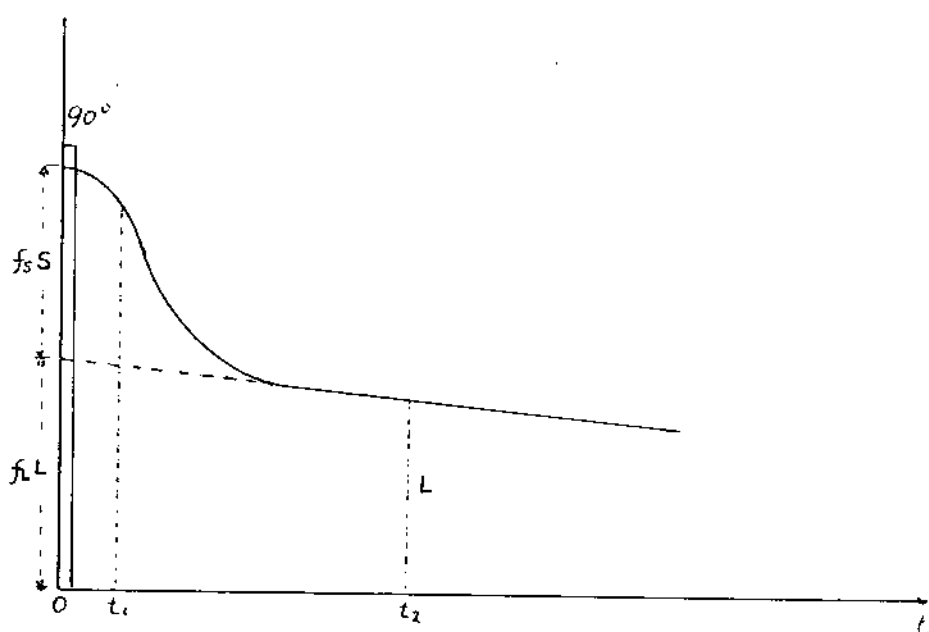
Outro comportamento observado para as mudanças de T₁ e T₂ com o processo de gelatinização estão mostrados na Tabela 3.3 e Fig. 3.6 (a) e (b). A pouca variação observada em T₁ coincide com as observações de Child e Pryce [43]. Por outro lado, se o comportamento com o tempo de tratamento térmico, obtido por nós, for comparada com a observação de Lelievre e Mitchel [41], (que T₂ começa a diminuir com o início do hinchamento e fusão dos grânulos até um mínimo e logo aumentar, independentemente da concentração), nossos resultados pareceriam coincidir com a descida de T₂ no início da gelatinização. Para propósitos ilustrativos incluímos os de T₁ e T₂ para um sistema amido + água + sacarose (40%) a 55% de água.

3.2.2 DECAIMENTO DE INDUÇÃO LIVRE (FID) DO SISTEMA. AMIDO-ÁGUA.

Na Fig. 3.7 mostramos o FID dum sistema amido-água para diferentes concentrações à temperatura ambiente. Os pontos experimentais foram obtidas mediante um programa do Minispec PC-120 que dá o conteúdo total de prótons de hidrogênio (em unidades arbitrárias) num ponto do FID. Também mostramos o FID (Fig. 3.8) de algumas das amostras apresentadas na Tabela 3.2. para propósitos de comparação. Segundo Lelievre e Mitchel [41], os tempos de relaxação T_2 da fase sólida ficam na ordem de $10 \mu s$ enquanto que para a região hidratada está nos milisegundos. Esta região corresponde á fase gelatinizada (hidratada com ou sem tratamento térmico) e atribuir-lhe um único tempo de relaxação seria errado, a menos que a heterogeneidade seja totalmente destruída. Mas o interessante para os nossos propósitos é ver como é que vai crescendo o sinal da região gelatinizada. Isto é o que mostra a Fig. 3.8. se comparamos o tamanho do sinal dos decaimentos para $9 \mu s$ e $70 \mu s$ das amostras 6 e P da Tabela 3.3. Evidentemente a maior altura nos $70 \mu s$ para a amostra 6 está indicando gelatinização, pois ambas amostras têm 60% de água.

3.2.3 RELAÇÃO LÍQUIDO/SÓLIDO NA GELATINIZAÇÃO.

Em 1978, Brosio et al.[46] usaram o método da relação líquido/sólido para a determinação do teor de umidade em produtos alimentícios ricos em amidos, mas eles, além de achar o fator de correção da sinal do sólido, como explicado no Cap. 1, precisaram



corrigir o sinal do líquido a $t = 0$ (ver figura), já que esta teria decaído não desprezivelmente no tempo t_2 . Este problema não foi considerado nas determinações da relação sólido/líquido por Van Putte e van den Enden [14] em gorduras parcialmente cristalizadas, ou, por Tiwari e Burk [15] na medição de teor de óleo em sementes. O problema ficaria ainda mais complicado se o decaimento é multiexponencial. Mas esta dificuldade poderia ser evitada considerando que o interesse é medir o "índice de liquefação relativo" [36], que denotaremos por I , e que está definido

COMO

$$I = \frac{L/S - L_0/S}{L_T/S - L_0/S} \quad , \quad (3.1)$$

onde

L/S = porcentagem líquido/sólido da amostra parcialmente gelatinizada,

L_0/S = porcentagem de líquido/sólido da amostra padrão de teor de sólido conhecido com a qual se calculava o fator f .

L_T/S = Porcentagem líquido/sólido da amostra totalmente gelatinizada.

Cada um dos termos da relação (3.1) tem a forma

$$\frac{f_L L}{f_L L + f_S S} \quad ,$$

onde f_L seria a correção da sinal do líquido e f_S do sólido. É simples ver que se as massas das amostras amido + água + algum aditivo, foram constantes durante o processo da gelatinização, o índice de liquefação relativo não dependeria dos fatores de correção e ficaria

$$I = \frac{L - L_0}{L_T - L_0} \quad (3.2)$$

Isto significaria que seria suficiente medir o sinal correspondente a cada L no instante de tempo t_z .

Nós calculamos os índices de liquefação relativo mediante a definição (3.1), sem a correção do sinal do líquido, com um programa já incluído no Minispec PC-120 que corrige o sinal do sólido mediante o cálculo do fator f_S , para o qual se utiliza uma amostra

padrão de relação líquido/sólido conhecido tal como a amostra P. Na Tabela 3.4 aparecem resultados de fatores f_s para diferentes pares de instantes de tempo t_1 e t_2 da amostra P da Tabela 3.2. Os valores correspondentes da relação líquido/sólido das amostras da Tabela 3.2 aparecem na Tabela 3.5. Pode-se observar que estes resultados não estão muito dispersos, exceto a partir de $t_1 = 10 \mu s$ e $t_2 = 140 \mu s$ ($f_s = 1.9018$) onde começa a aparecer um maior desvio. Para $t_1 = 20 \mu s$, $t_2 = 60$ e $120 \mu s$, os desvios são mais aparantes (com f_s iguais a 5.0794 e 3.9497, respectivamente). Note-se que, mesmo aparecendo os desvios mencionados, o crescimento da relação L/S observado está indicando aumento da gelatinização.

Na Tabela 3.6 estão os valores calculados dos índices de liquefação relativos correspondentes, aos dados da Tabela 3.5 (amostras de 1 a 7). A desvio mais notável aparece na primeira amostra. Isto aconteceria porque o tempo de tratamento térmico não seria suficiente para o início da gelatinização, como se vê, o valor da relação líquido/sólido da amostra 1 fica muito próximo do valor da amostra padrão. Lembre-se que a amostra 1 apresentou maior dispersão T₂-CPMG.

O interesse de medir os índices de liquefação relativos foi correlacioná-los com os graus de gelatinização [47] dos diferentes sistemas estudados por Silva [36]. Na Tabela 3.7 estão mostrados os resultados obtidos. A baixa correlação existente para o amido com 35% de umidade atribui-se à limitação de água para a ocorrência da gelatinização [36]. O método da susceptibilidade enzimática (Chiang e Johnson [48]), onde a susceptibilidade do grânulo

à ação enzimática é consideravelmente aumentada quando o grânulo está na forma gelatinizada, foi usada para efeitos de correlação. Como se observa, a correlação é boa para todos os sistemas estudados, exceto o sistema amido-água a 35% como já comentado.

No trabalho da preparação das amostras apareceram dificuldades de carácter prático que merecem ser comentar, já que parecem não ter afetado os resultados finais básicos. Se bem que as amostras ficassem seladas, não foi o suficiente para evitar a fuga de vapor de água no processo de tratamento térmico, especialmente nas temperaturas maiores e tempos mais longos de tratamento térmico. Isto influi na ocorrência de menos gelatinização pela perda de água disponível. Se resolvida a fuga do vapor de água e com medições in situ, poderiam ser melhorados os resultados e até usar simplesmente a relação (3.2) com um programa adequado para a automatização das medições.

3.3 CONCLUSÕES.

As medições comparativas dos índices de liquefação relativos e os graus de gelatinização determinados com o método da susceptibilidade enzimática, mostram boa correlação, exceto para baixo conteúdo de água (35%). Isto permitiu desenvolver, pela primeira vez, estudos de Cinética de Gelatinização do Amido mediante medições da relação líquido/sólido por RMN pulsada, feitas no trabalho de Silva [36], calculando energias de ativação no processo de gelatinização. O método tem a virtude de ser rápido e reproduzível o qual permitiria dinamizar futuros estudos com outros tipos

de sistemas. Pelo comentário pessoal de Silva, existem poucos trabalhos de cinética de gelatinização devido, possivelmente, a que as técnicas tradicionais usadas (descritas na tese de Silva [36]), não tem a rapidez e reproduzibilidade do método RMN.

TABELA 3.1. Valores de T_1 e T_2 para diferentes concentrações do sistema amido-água

CONCENTRACAO (% DE AMIDO)	T_1 (ms)	T_2 (ms) *	
		($2\tau = 207\mu s$)	($2\tau = 230\mu s$)
20	431	97	221
25	316	60	115
30	215	45	102
35	176	36	88
40	155	29	77
45	157	23	61
50	148	13	27
55	135	7	8
60	115	4	4
65	102	3	-
70	87	-	-
75	67	-	-
80	62	-	-

* Os valores que não aparecem na Tabela não puderam ser medidos. Obviamente devem ser menores de 3 ms.

TABELA 3.2. Dispersão T₂-CPMG de sistemas amido-água com diferentes tempos de tratamento térmico. Concentração de 60% de água e temperatura de 130° C de tratamento térmico. O tempo 2 τ representa o espaçamento interpulso de 180°. Os valores de T₂ estão em milisegundos.

2 τ (ms)	TEMPO DE TRATAMENTO TÉRMICO (segundos)								
	0	90	120	150	180	210	240	270	300
0.23	15	19	10	11	11	12	11	11	12
0.46	24	30	11	12	13	12	11	11	12
0.69	39	59	11	11	9	--	11	11	13
0.92	84	131	--	13	12	14	12	13	13
1.15	--	--	--	13	14	13	13	15	17
1.38	--	--	--	14	22	--	15	14	16
1.61	--	--	--	--	28	20	15	18	20
1.84	--	--	--	--	27	23	21	17	15
	P	1	2	3	4	5	6	7	TG
Identificação de cada amostra*									

* P identifica a amostra padrão e TG a totalmente gelatinizada.

TABELA 3.3. O comportamento de T₁ e T₂ com a gelatinização para varios tempos de tratamento térmico.

(a) Sistema amido-água,*
60% de água, 130° C.

Ident. da Amos.	Tempo Trat. Term. (seg)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
P	0	160	15
1	90	162	19
2	120	180	10
3	150	191	11
4	180	197	11
5	210	183	12
6	240	186	11
7	270	184	11
TG	300	200	12

(b) Sistema amido-água-sacarose(40%), 55% de água,
120° C.

Tempo de Trat. Termico (seg)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
120	156	25
135	161	27
150	154	19
165	150	11
180	143	11
195	134	10
210	138	11
225	138	11

* as identifiçacoes correspondem as amostras da Tabela 3.2.

TABELA 3.4. Fatores f_e para alguns pares de valores t_1 e t_2 do FID da amostra padrão, P, da Tabela 3.2

t_1 (μs)	t_2 (μs)	Fator f_e	
10	50	2.2592	f_1
10	60	2.2961	f_2
11	70	2.2086	f_3
10	80	2.1481	f_4
10	90	2.1640	f_5
10	110	1.9358	f_6
10	140	1.9018	f_7
20	60	5.0793	f_8
20	140	3.9497	f_9

TABELA 3.5. Relação SÓLIDO/LÍQUIDO para valores de fe-
dadas na Tabela 3.4. A identificação co-
rrespondem às amostras da Tabela 3.2.

	2.2592	2.2961	2.2086	2.1481	2.1640	1.9358	1.9018	5.0794	3.9497
1	62.52	63.67	60.21	63.95	62.33	59.63	61.24	62.85	61.72
2	78.29	80.46	78.06	80.37	81.30	76.97	78.03	84.38	83.05
3	91.58	93.88	91.09	92.64	89.53	91.73	88.72	94.39	91.46
4	96.16	95.86	95.16	94.65	93.55	90.33	89.30	104.35	91.43
5	96.70	96.18	98.76	96.72	98.80	95.93	91.73	107.05	101.78
6	94.96	93.74	96.06	95.72	93.83	96.42	94.08	106.08	95.76
7	95.72	97.58	97.48	95.74	96.06	96.30	92.26	107.55	92.34
T o	100.29	99.17	99.63	97.67	99.42	98.07	96.03	109.23	97.12

TABELA 3.6 índices de Liquefação Relativos (em %) calculados com os resultados da Tabela 3.5. As identificações correspondem às mesmas amostras.

	f ₁	f ₂	f ₃	f ₄	f ₅	f ₆	f ₇	f ₈	f ₉	DESVIO (%)
1	6.25	9.37	0.83	10.43	5.91	1.07	3.44	5.79	4.63	59.80
2	43.33	50.45	47.62	53.17	56.08	42.02	49.65	50.77	42.11	10.34
3	77.56	85.99	79.26	86.37	76.03	83.78	79.55	70.60	85.36	6.63
4	89.36	91.23	89.14	91.81	85.77	80.20	81.17	90.25	85.39	4.90
5	90.75	92.08	97.89	97.42	98.50	94.52	87.97	95.68	112.05	7.13
6	86.27	85.62	91.33	94.71	86.45	95.78	94.54	93.76	96.48	4.80
7	88.23	95.79	94.78	94.77	91.86	95.47	89.45	96.67	87.64	3.78

Tabela 3.7' - Correlação entre o índice de liquefação relativo e o grau de gelatinização de amostras contendo amido + água + outros componentes tratados à 130,0°C

Sistema	Unidade (%)	Tempo de tratamento (s)	Índice de liquefação relativo (medido pelo método RMN)	% de Gelatinização (medida pelo método de Chiang & Johnson)	Coefficiente de correlação r^2
1. amido + água	35	120	3,21±0,26	10,6±0,3	0,7544
		135	9,98±0,44	12,2±1,4	
		150	12,22±0,54	13,5±1,3	
		165	18,00±0,79	14,0±1,7	
		180	12,00±0,50	14,1±2,4	
2. amido + água	65	105	50,47±0,76	51,7±3,4	0,9997
		120	93,81±2,11	96,4±0,4	
		135	39,11±2,67	92,4±1,6	
		150	96,63±2,31	100,0±0,3	
		180	94,52±1,16	98,5±1,3	
3. amido + glúten (7%)	45	75	1,57±0,02	9,3±0,4	0,9873
		105	22,66±0,78	40,5±1,3	
		120	36,19±1,24	31,6±1,1	
		165	39,37±1,18	35,4±1,3	
		180	38,37±0,92	35,2±0,8	
4. amido + glúten (28%)	45	90	0,58±0,01	3,4±0,5	0,9658
		105	5,67±0,14	25,4±0,6	
		120	12,97±0,45	58,1±0,8	
		135	21,00±0,29	77,0±1,0	
		180	27,99±1,01	32,1±1,4	
5. amido + saca-rose (10%)	55	105	52,41±1,90	61,9±1,3	0,9893
		135	9,98±0,44	72,4±1,2	
		165	12,22±0,54	98,1±1,2	
		180	18,00±0,79	80,3±2,0	
		210	12,00±0,50	89,6±2,0	
6. amido + saca-rose (40%)	55	120	0,00±0,00	5,0±0,3	0,9904
		135	1,60±0,04	6,5±0,6	
		150	2,53±0,10	7,1±0,5	
		165	36,53±1,28	56,0±3,3	
		180	54,76±1,41	66,4±0,9	
7. amido + ácido esteárico (5%)	55	105	2,17±0,11	2,4±1,2	0,9545
		120	6,72±0,20	12,3±1,6	
		150	16,88±0,43	25,8±1,1	
		165	32,98±0,11	40,7±1,8	
		195	34,98±0,32	44,1±8,8	

8. amido + ácido esteárico (20%)	55	105	$2,10 \pm 0,02$	$4,1 \pm 0,5$	0,9644
		120	$25,77 \pm 0,20$	$33,7 \pm 1,7$	
		150	$28,55 \pm 0,35$	$39,9 \pm 2,5$	
		195	$32,39 \pm 1,03$	$19,4 \pm 1,8$	
		210	$37,13 \pm 0,13$	$15,6 \pm 3,0$	
9. amido + NaCl (0,43 N)	55	105	$25,02 \pm 0,32$	$28,7 \pm 1,3$	0,9953
		120	$43,53 \pm 0,55$	$50,6 \pm 2,2$	
		135	$50,23 \pm 0,65$	$58,0 \pm 1,0$	
		150	$54,25 \pm 0,68$	$61,2 \pm 2,3$	
		180	$56,13 \pm 1,29$	$70,9 \pm 2,4$	
10. amido + NaF (0,43 N)	55	105	$0,00 \pm 0,00$	$8,0 \pm 0,2$	0,9975
		120	$14,25 \pm 0,22$	$16,3 \pm 0,7$	
		135	$32,43 \pm 0,32$	$40,9 \pm 2,2$	
		150	$36,74 \pm 0,56$	$49,1 \pm 0,9$	
		180	$51,56 \pm 0,78$	$54,0 \pm 0,8$	
11. amido + NaSCN (0,43 N)	55	75	$30,75 \pm 0,51$	$35,6 \pm 1,5$	0,9679
		90	$39,58 \pm 0,66$	$42,3 \pm 1,6$	
		120	$50,06 \pm 0,78$	$71,0 \pm 1,1$	
		150	$51,69 \pm 0,65$	$73,8 \pm 1,7$	
		180	$53,98 \pm 1,38$	$79,4 \pm 1,0$	
12. amido + Na2SO4 (0,43 N)	55	135	$18,99 \pm 0,21$	$23,0 \pm 1,0$	0,9907
		150	$33,98 \pm 0,42$	$38,5 \pm 1,1$	
		180	$39,99 \pm 0,38$	$46,2 \pm 1,2$	
		210	$38,99 \pm 0,42$	$46,1 \pm 1,1$	
		225	$40,87 \pm 0,51$	$50,4 \pm 1,5$	

Fig. 3.4
Valores de T1 e T2 para diferentes
concentrações de amido-agua.

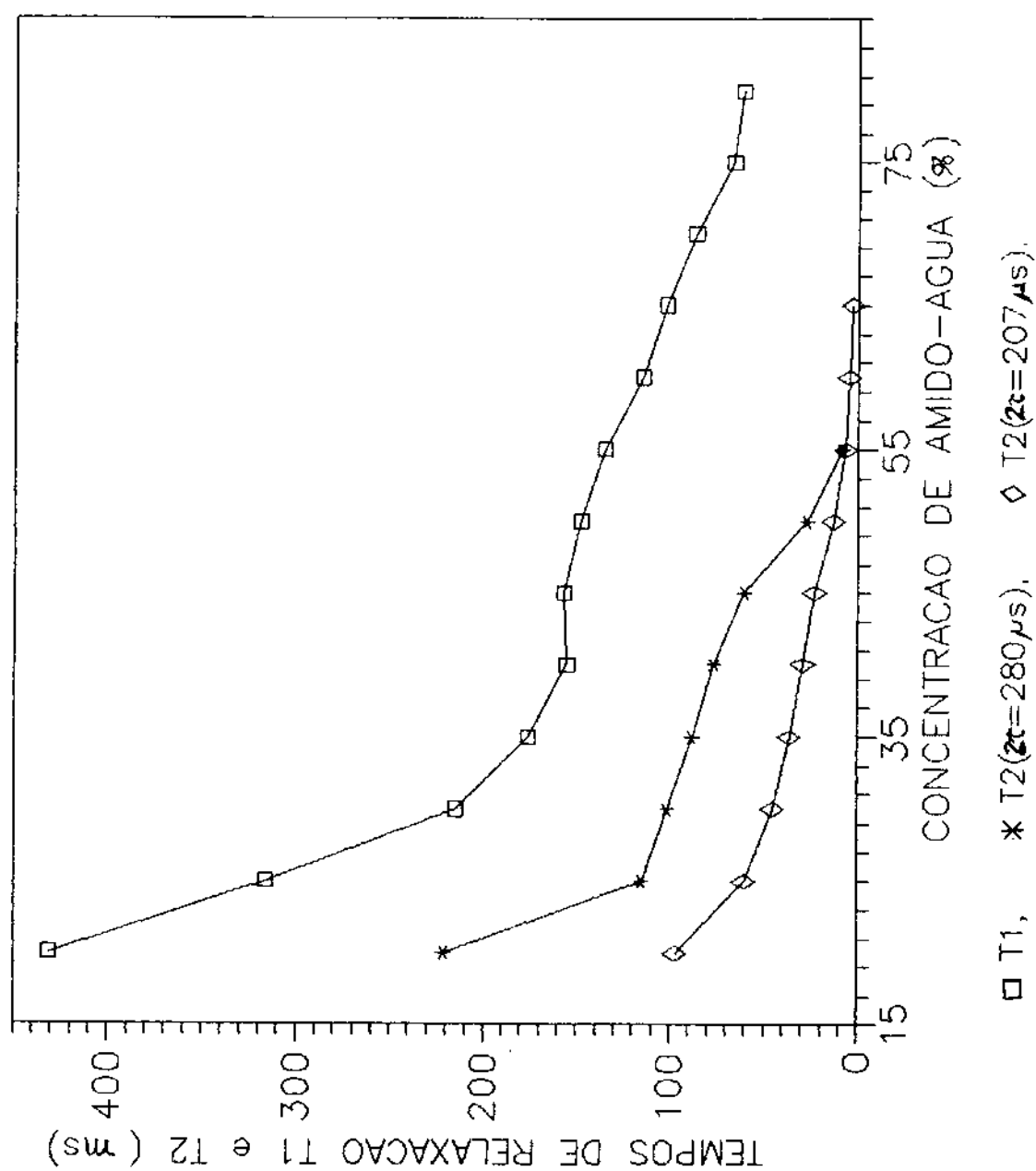


Fig. 3.5
 Dispersao T2-CPMG de sistemas com
 tratamento termico.
 2 representa o espacamento interpulso

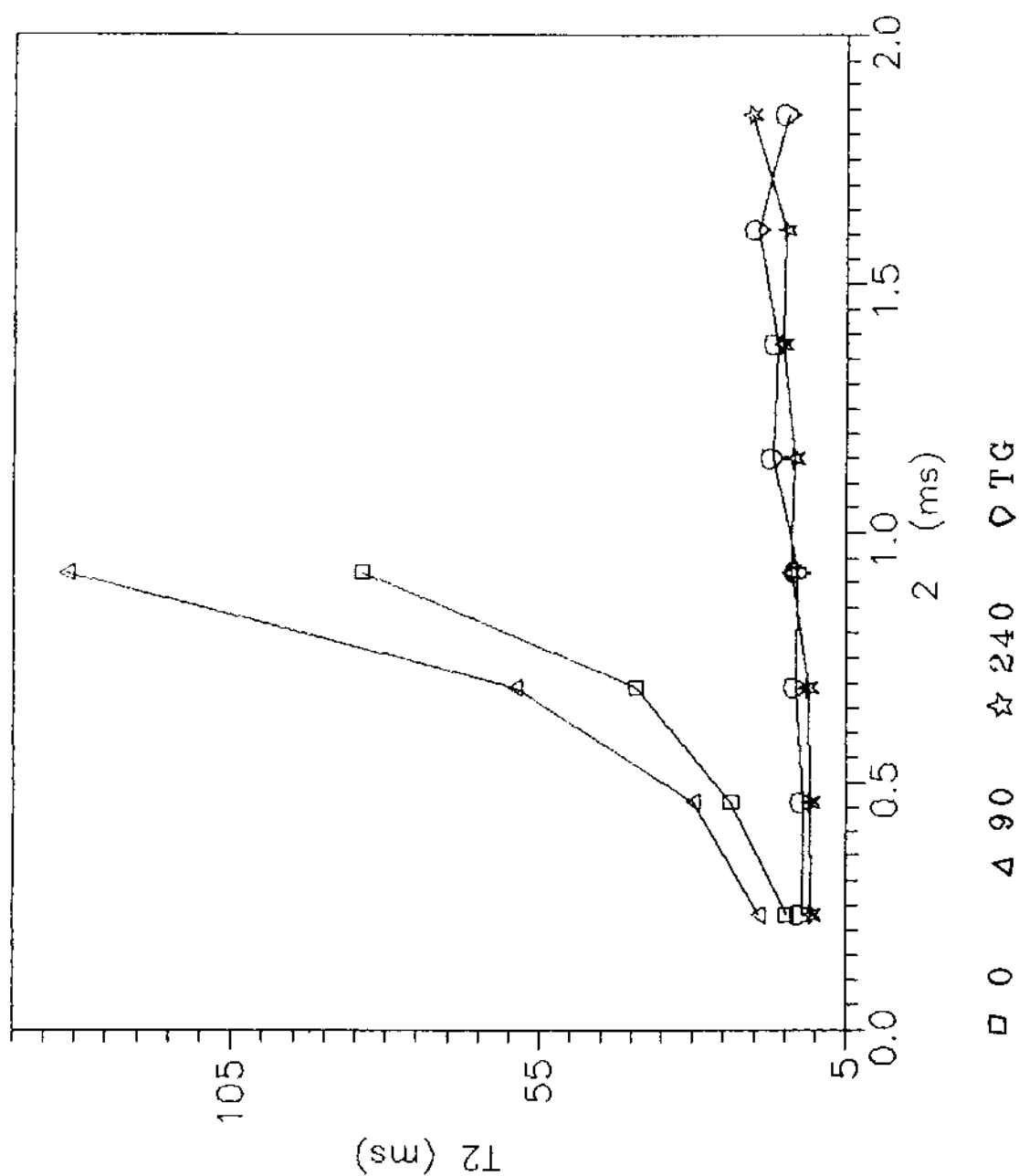


Fig. 3.6(a)
Comportamento do T1 com o tempo de
tratamento termico.

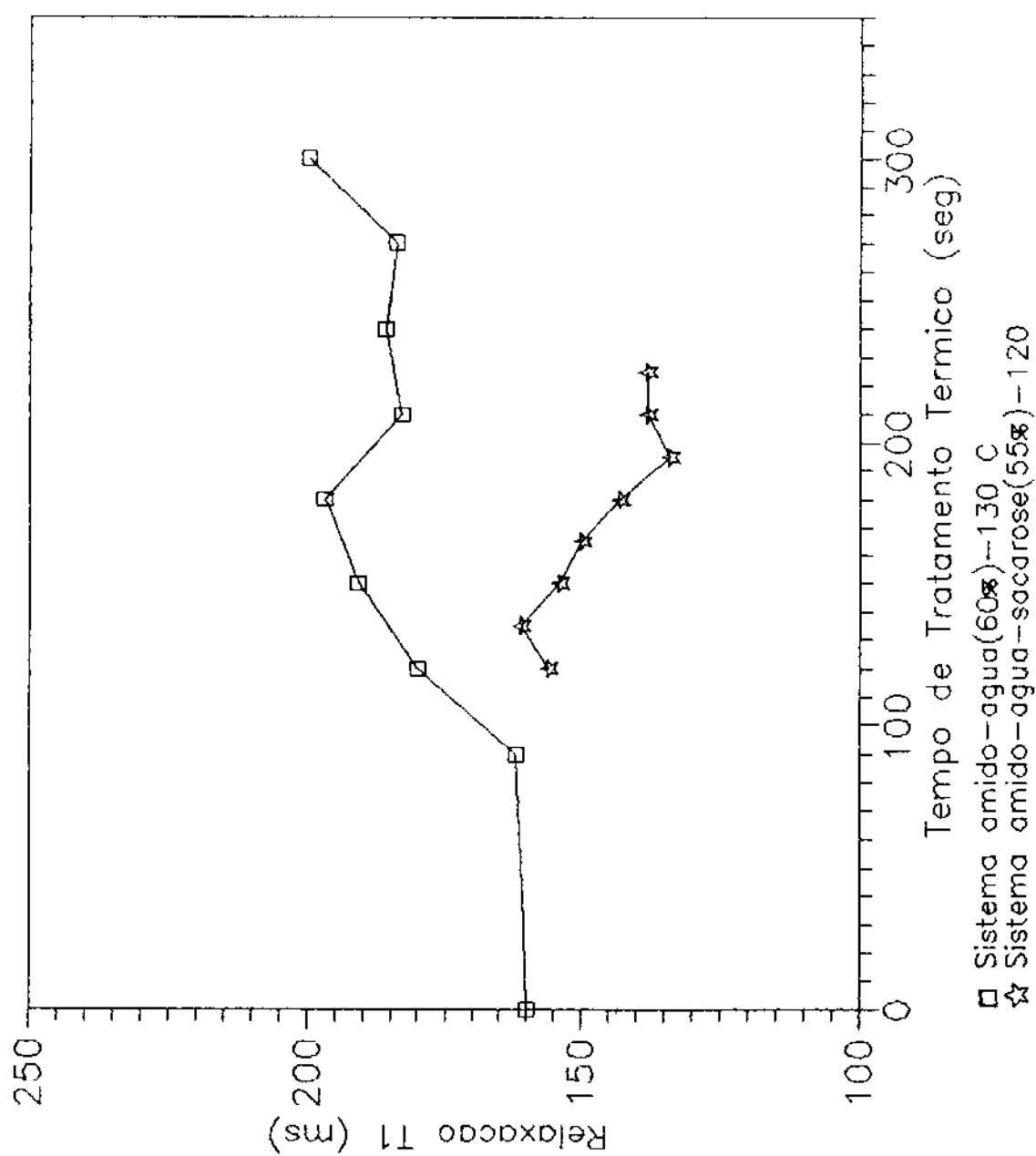


Fig 3 6(b)
Comportamento do T2 com o tempo de
tratamento termico.

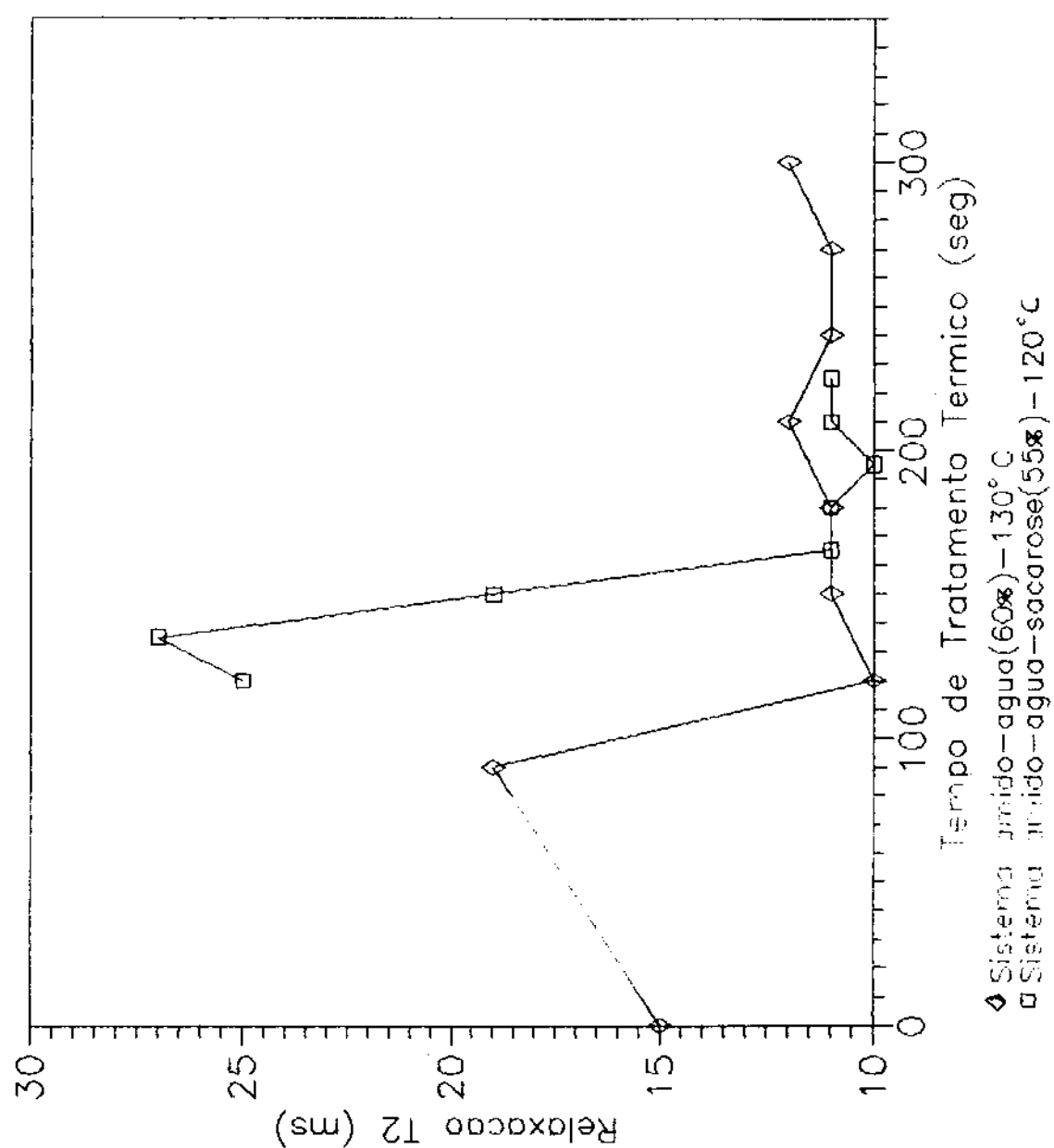


Fig. 3.7 FID do sistema amido-agua
para algumas concentrações

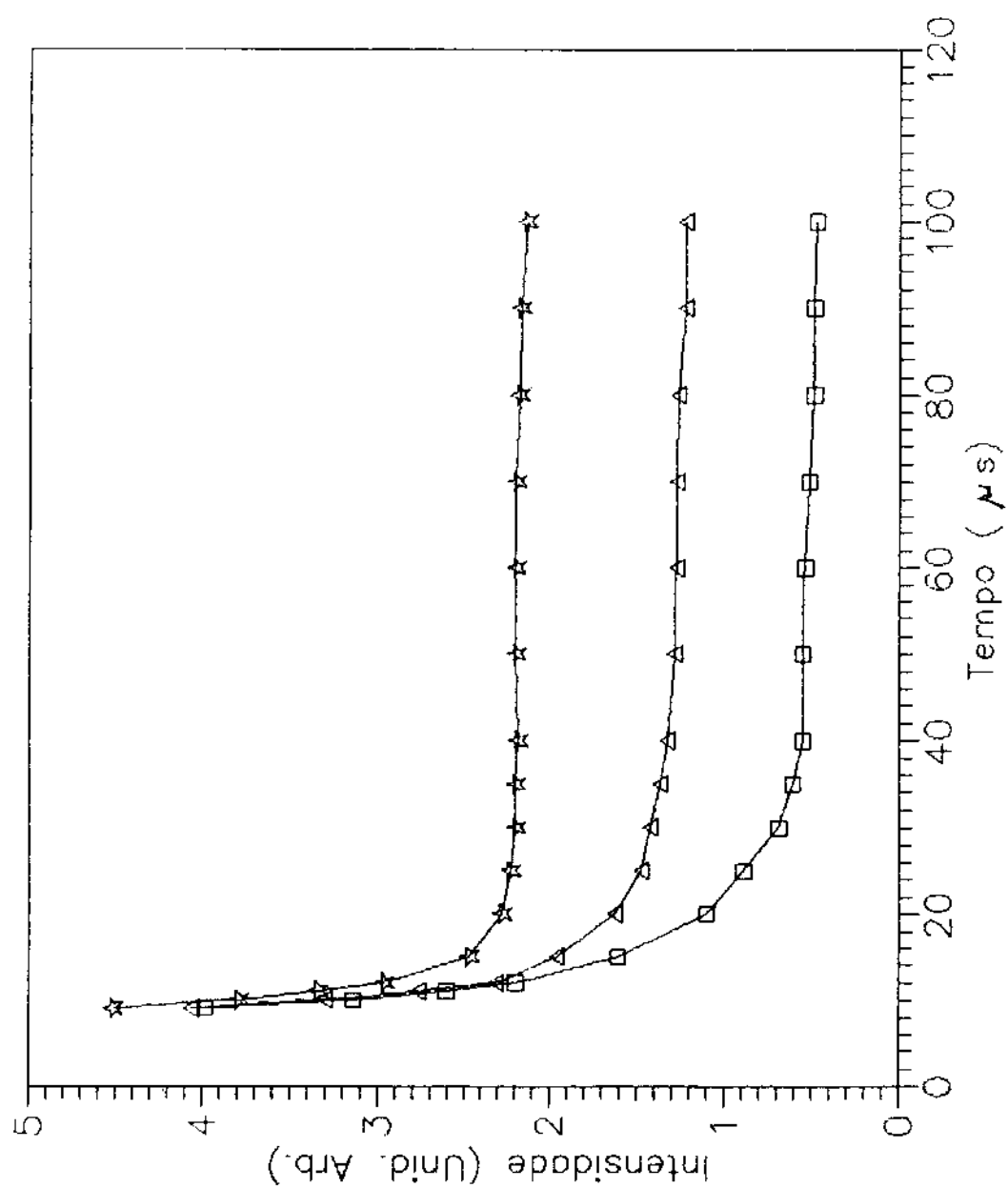
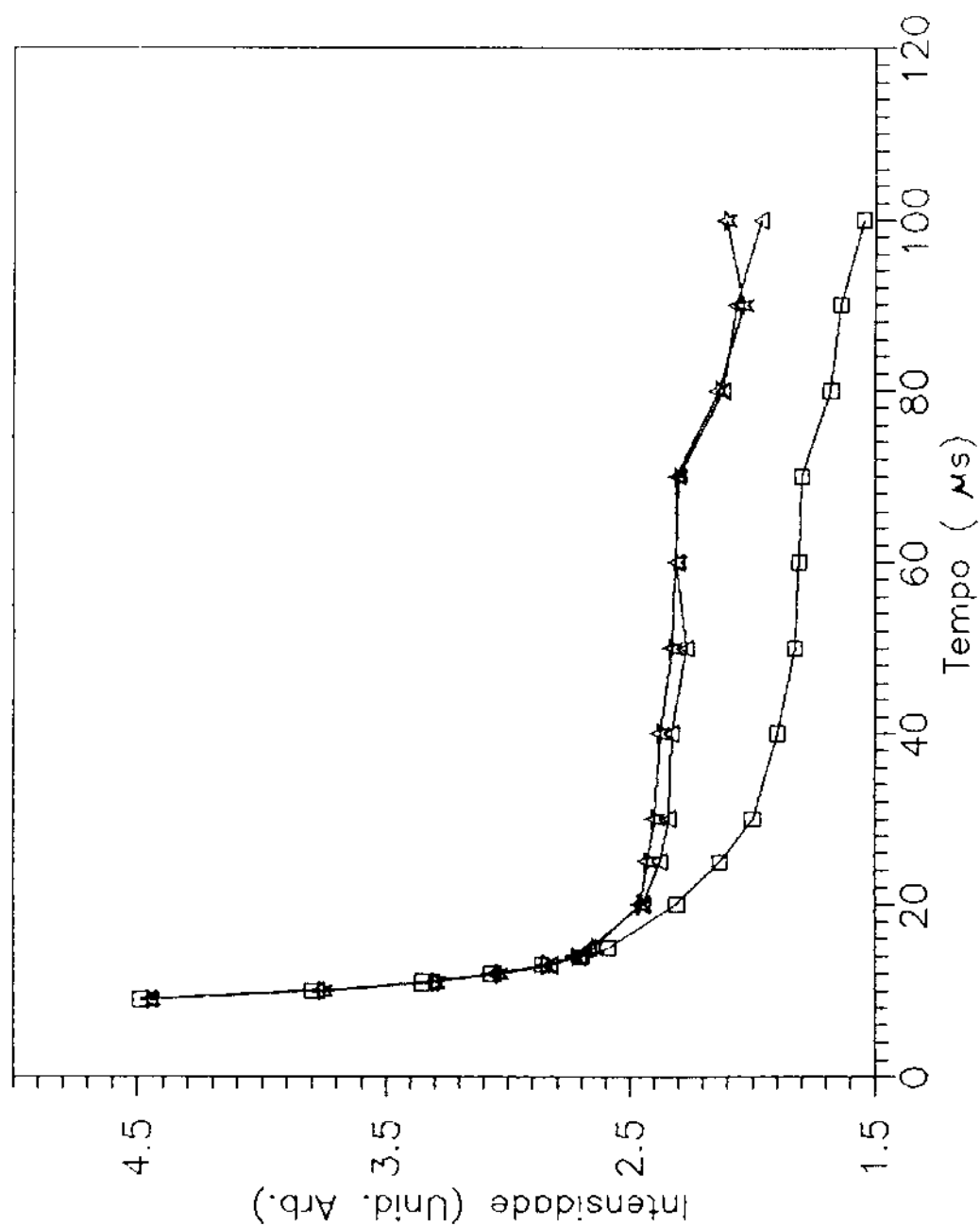


Fig. 3.8 FID do sistema amido-agua gelatinizado (Tab. 3.2)



□ Padrao, ☆ amostra (Trat. Term. 270 s.), Δ TG.

CAPITULO 4

SEMENTES OLEAGINOSAS

4.1 INTRODUÇÃO.

No presente Capítulo descreveremos técnicas, de RMN pulsada, normalmente utilizadas na determinação de teor de óleo em sementes oleaginosas, tais como o decaimento de indução livre (FID), ecos de spin (spin echo, SE), e a sequência de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

As primeiras medições RMN de conteúdo de óleo em sementes, desenvolvidas a partir da década dos anos 60, foram usando RMN de onda contínua [49, 50, 51, 52, 53]. O desenvolvimento e aparição de instrumentos comerciais de RMN pulsada permitiram implementar novos métodos RMN na determinação de teor de óleo em sementes [15, 54, 55, 56], ganhando rapidez, tanto na obtenção como no processamento de dados. As possibilidades de novas aplicações foram se ampliando com combinações das técnicas pulsadas para determinações simultâneas de umidade e teor de óleo em sementes [57, 58].

A precisão do método RMN já foi muitas vezes testada, tanto como a correlação com métodos tradicionais. Por exemplo, Gandra [59] obteve um erro acumulado de 6% para a determinação de teor de óleo em milho, mediante RMN de onda contínua; enquanto que com o método químico de Gold e Fisher deu 9%. De Godoy et al. [60] dão

uma correlação de 0.98 entre o método Soxhlet e RMN, que usa a técnica do spin echo para medir o teor de óleo em amendoim.

A aparição do método RMN para a estimação do teor de óleo em sementes é remarcável, pois "representou a primeira análise química quantitativa completamente não destrutiva de um embrião vivo. Um logro verdadeiramente relevante!" [61].

Uma das aplicações particularmente importantes, foi em programas de seleção e melhoramento genético de sementes oleaginosas [56, 59, 62]; ampliando-se as possibilidades de aplicações, com as determinações simultâneas de teor de óleo e umidade, para armazenamento pós-colheita, estudos fisiológicos, avaliação germem-plasma, indústria de alimentos, etc.[58].

4.2 MÉTODOS DE RMN PULSADA PARA ESTIMAÇÃO DE TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES.

Serão descritas 3 métodos: FID, Ecos de Spin, Carr-Purcell-Meiboom-Gill.

4.2.1.- O MÉTODO DO DECAIMENTO DE INDUÇÃO LIVRE (FID). (O MÉTODO DO FATOR f)

Para propósitos de medições de teor de óleo em sementes mediante RMN, divide-se o sinal em três componentes básicas: o sólido (composto de carboidratos, proteínas, etc.), o óleo e a água (umidade). Cada um destes contribuem para a intensidade do sinal observado, com seus respectivos tempos de relaxação, mediante uma relação da forma [56]

$$I(t) = Ae^{-(t/T_{2s})^2} + Be^{-t/T_{2a}} + Ce^{-t/T_{2o}}, \quad (4.1)$$

onde o primeiro termo representa a contribuição da parte sólida da semente, com relaxação transversal T_{2s} ; o segundo é a contribuição da água, com tempo de relaxação transversal T_{2a} ; e, o terceiro, vem a ser o sinal do óleo, com relaxação transversal T_{2o} . Normalmente, para sementes secas, com aproximadamente 5 a 6% de umidade, a contribuição da água consta de um único termo; mas pode existir duas componentes de água se a umidade ultrapassar certos limites (até aproximadamente 15%), ou inclusive três componentes para 20% de umidade [58].

Para estimativas normais de teor de óleo em sementes, supõe-se que o mínimo de conteúdo de umidade não exceda o poder germinativo da semente, nem o máximo tolerável, para considerar que temos uma única componente de água.

Isto é importante, já que normalmente os tempos de relaxação são tais que

$$T_{2s} \ll T_{2a} \ll T_{2o}, \quad (4.2)$$

para considerar que o sinal do sólido e a umidade são desprezíveis quando medimos o sinal do óleo. O T_{2s} está na faixa dos 10 μs , $T_{2a} \sim 1$ ms, e T_{2o} fica entre aproximadamente 50 ms a 100 ms.

Na Fig. 4.1 está esquematizado o FID típico de uma semente. O ideal seria medir a intensidade total no instante $t = 0$, mas devido ao tempo morto do aparelho (aproximadamente 9 μs no Minispec PC-120), pode-se medir somente a partir de certo instante (10 μs

no Minispec PC-120). Assim, a intensidade medida no instante t_1 é $S' + L$ (contribuição do sólido e líquido); depois, no instante t_2 , mede-se a contribuição de somente o sinal do líquido, com o cuidado de ter em conta que a contribuição do sólido é nulo ou

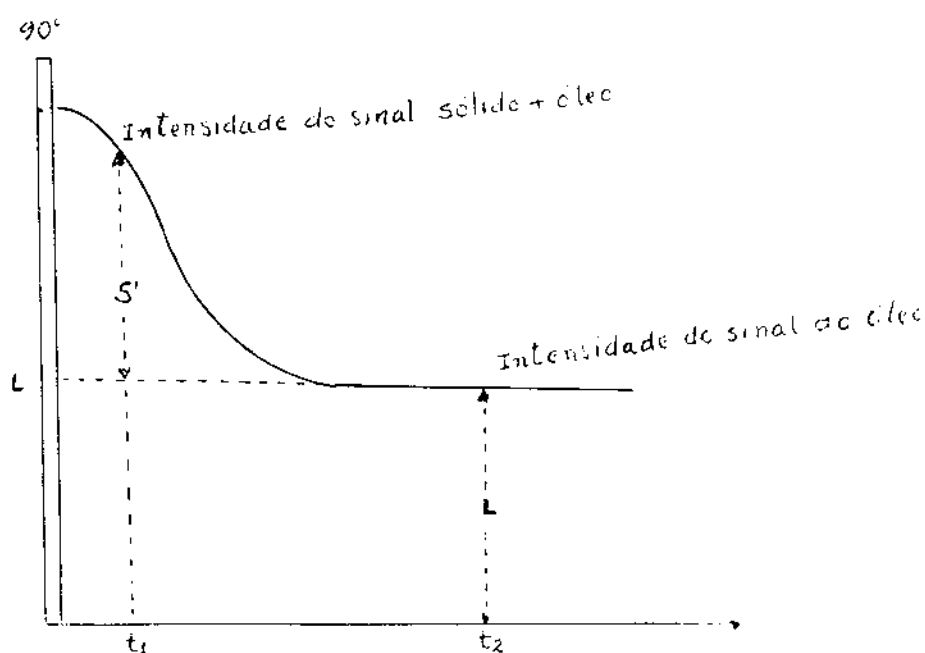


Fig. 4.1 FID típico de uma semente.

desprezível, e, considerar que o decaimento do óleo foi muito pequeno. Em qualquer caso a contribuição da umidade está sendo desprezada. Assim, corrigindo o valor de S' mediante um fator f determinado experimentalmente, temos que $S = fS'$. Logo, o teor de óleo, em porcentagem, escreve-se como

$$\% \text{ (óleo)} = 100 L / (L + fS').$$

(4.3)

óbviamente o fator f depende do tempo morto do aparelho, do tempo de relaxação da componente sólida e dos instantes de tempo t_1 e t_2 . Tiwari et al. [15, 54] calculam o fator f mediante o "método do sinal de óleo", considerado como exato, mas é necessário secar a semente no forno e então pesar. Brosio et al. [57, 63], sugerem calcular o fator f mediante a extrapolação gráfica do FID digitalizado. Pode existir combinações de métodos para determinar o fator f , tal como descrevem Gambhir e Agarwala [58].

Tiwari e Burk [15] assinalaram três problemas para o uso da aproximação (4.3). O primeiro, já mencionado, é a contribuição da umidade ao sinal no instante t_2 , que fica na faixa de $70 \mu s$. O segundo refere-se à densidade de prótons na fase sólida, que não é a mesma do óleo. Terceiro, pode existir consideráveis diferenças no T_2^* da fase sólida em amostras diferentes da mesma colheita. A correlação que eles acham para o método do fator f com o "método do sinal do óleo", é de 98.8% para mostarda (mustard), 94.5% para o girassol, e 93.1% para soja. A vantagem do método do fator f é a não necessidade de pesar as sementes.

Nos estudos comparativos feitos por Srinivasan [55], assinala que o alongamento de t_2 para a medição do sinal de óleo, evitando a contribuição da água, levaria a erros acrescentados na medição de teor de óleo, com o agravante da diminuição do sinal pela não homogeneidade do campo, conduzindo a uma razão do sinal/ruído muito pobre. Por outro lado, o efeito da orientação das amostras é também crítico; obviamente isto aparece pela distribuição não

homogênea do óleo na semente. As diferentes partes da semente experimentam diferentes campos magnéticos. Este efeito é máximo no método do FID, especialmente se o decaimento é decidido pela não homogeneidade do campo. Srinivasan [55] mostra que este efeito pode ser reduzido se a medição é feita para um t_2 o mais curto possível, mas a contribuição da água pode produzir erros maiores.

4.2.2 O METODO DOS ECOS DE SPIN (SPIN ECHO).

Como foi explicado no Cap. 1, a inomogeneidade do campo magnético no FID, depois de aplicado o pulso de 90° , produz uma taxa de desfaseamento de spins dada por

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta H/2, \quad (4.4)$$

onde T_2 é o tempo de relaxação transversal intrínseco da amostra e ΔH representa a inomogeneidade do campo. Para sólidos,

$$T_2 (\sim 10 \mu s) \ll \gamma \Delta H/2. \quad (4.5)$$

Isto quer dizer que o efeito da inomogeneidade pode ser desprezado [56], mas para líquidos, tal como o óleo, o sinal do FID é fortemente afetado.

Assim, utiliza-se a técnica dos ecos de spin para eliminar o efeito da inomogeneidade do campo. Na Fig. 4.2 está esquematizado o FID e o eco. Medindo a altura do eco (para o tempo 2τ) pode-se determinar a quantidade de hidrogênio que contribui ao sinal.

No Minispec PC-120 existe um programa do spin-echo que utiliza uma reta de calibração com amostras de óleo de massas crescentes, logo fornecem-se as massas das sementes de teor de óleo desconhecidos, para se determinar automaticamente os teores absolutos de óleo nas sementes. Também pode-se, obviamente,

calcular a porcentagem de óleo nas sementes.

Este método é mais vantajoso que o método do FID. Pode-se minimizar ou eliminar a contribuição da umidade tornando τ o suficientemente longo, já que, basicamente, está se comparando a altura do eco de uma amostra padrão com a altura do eco da semente de teor de óleo desconhecido.

Assim, por um lado, o efeito da dependência angular sobre a intensidade do sinal é reduzida, porque a amplitude do eco não é influenciada pela inhomogeneidade do campo magnético; por outro lado, a umidade também não influencia a amplitude do eco se tomamos τ o suficientemente longo. Srinivasan [55] presume que os efeitos de difusão influenciam a altura do eco.

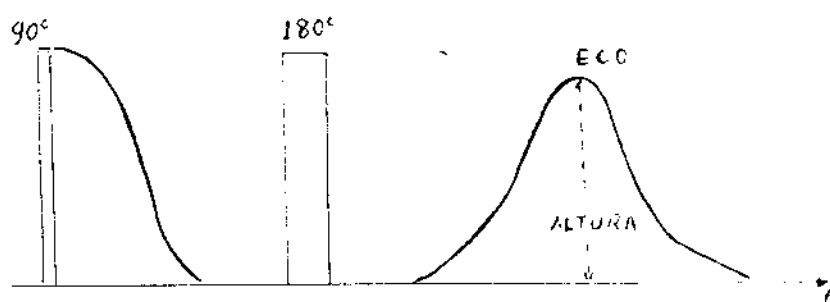


Fig. 4.22 FID e eco típicos de sementes. A altura do eco de uma amostra padrão é comparada com a altura do eco da semente de teor de óleo desconhecido.

4.2.3.-O MÉTODO DE CARR-PURCELL-MEIBOOM-GILL (CPMG).

A relação para a altura dos ecos (Cap. 1), combinando tanto o efeito da inhomogeneidade do campo e a difusão, é

$$M(t) = M_0 e^{-t(1/T_2 + \gamma G^2 D \tau^2 / 3)},$$

com

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma G^2 D \tau^2 / 3. \quad (4.6)$$

G representa o gradiente do campo magnético e D o coeficiente de difusão. O intervalo de tempo entre pulsos sucessivos é 2τ , ou equivalentemente, entre ecos consecutivos. A ideia de utilizar a relação (4.6) é minimizar o efeito da difusão, para o qual se deve fazer τ o mais pequeno possível, ficando o T_2^* observado muito próximo do tempo de relaxação intrínseco T_2 . Nestas condições, os dados experimentais dos $M(t)$ podem-se ajustar a uma exponencial simples.

$$M(t) = M_0 e^{-t/T_2}. \quad (4.7)$$

Isto é o que se faz no Minispec PC-120. Os dados são ajustados a uma exponencial, se obtendo o valor de M_0 e T_2 . O valor de M_0 extrapolado para $t = 0$ é proporcional à quantidade de hidrogênios no líquido. É fácil ver que tomando os dados a partir do eco, onde a contribuição da umidade é praticamente eliminada, o valor de M_0 terá somente a contribuição dos hidrogênios do óleo. Logo, comparando com o M_0 da amostra conhecida, é fácil determinar o teor de óleo da semente. Assim, o método de CPMG é superior aos

dois anteriores métodos, pois, além de reduzir ou eliminar o efeito da difusão, pode tolerar níveis maiores de umidade comparado com o spin echo. Ratkovic [9] menciona que para níveis de umidade de 20%, representa somente o 2% do sinal CPMG do óleo.

Srinivasan et al [64] mostra que é melhor usar CPMG para estimar o conteúdo de óleo em sementes de algodão dando boa correlação com o método de extração Soxhlet.

Em outro artigo, Srinavasan et al [65], estudando o efeito do conteúdo do hidrogênio na estimativa de óleo em sementes, sugerem a necessidade de investigar o conteúdo de hidrogênios de cada óleo de um número grande de diferentes variedades de amostras de sementes, para obter uma idéia da variação do conteúdo de hidrogênio que provavelmente aparecerá, isto, por sua vez, decidirá as incertezas associadas com os valores estimados por RMN.

4.3 COMBINAÇÃO DOS METODOS PARA ESTIMAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÓLEO E UMIDADE EM SEMENTES.

Nesta seção daremos uma descrição geral e breve de algumas combinações dos métodos pulsados para estimação simultânea de teor de óleo e umidade em sementes.

Um gráfico da amplitude do eco com τ (intervalo de tempo entre o pulso de 90° e 180°) pode permitir separar o sinal do óleo do sinal combinado água-óleo [57], já que a partir de algum valor de τ a contribuição da umidade na intensidade do eco, pode ser eliminada ou, pelo menos, reduzida a níveis desprezíveis. Supõe-se que o τ é o suficiente para considerar que o sinal do sólido foi eliminado.

Na Fig. 4.3 os pontos representam os valores das intensidades dos ecos para diferentes tempos τ . Extrapolando o sinal do óleo, determina-se a contribuição do óleo na intensidade inicial. A diferença entre o sinal total A e o sinal do óleo, A_o , (para $t = 0$), dará a contribuição da umidade no sinal. Assim, pode-se determinar a porcentagem de óleo, ou umidade, mediante

$$\%(A_o \text{ ou } A_v) = 100A_o/(A_o + A_v) \text{ ou } 100A_v/(A_o + A_v), \quad (4.8)$$

que representarão somente a porcentagem, de óleo ou umidade, na fase líquida, respectivamente.

O gráfico 4.3 pode ser substituído pela sequência de ecos do método de CPMG, dando melhores resultados, especialmente pela redução do problema de difusão e ganhando em rapidez de obtenção de dados.

Para determinar o teor de óleo ou umidade na semente, deve-se achar a porcentagem de líquido na semente. Para isso, pode-se utilizar o FID na determinação da porcentagem de líquido (ou sólido). Mas existe o problema adicional de corrigir, no FID, o sinal do líquido (ver Fig. 4.4) [57, 63], já que não estamos desprezando a contribuição da água no sinal L' . Não podemos considerar que o decaimento do líquido seja desprezível no instante t_2 , pelo que, tanto S' como L' , precisam ser corrigidos mediante fatores f_s e f_L , respectivamente [12,18]. Então, a porcentagem de líquido será

$$\%(L) = 100 \frac{f_L L'}{f_L L' + f_s S'} \quad (4.9)$$

A combinação das relações (4.8) e (4.9) permite determinar o teor de óleo ou umidade.

Brosio et al. [63] sugerem calcular f_1 e f_2 através duma extrapolação gráfica dos FIDs digitalizados.

Gambhir e Agarwala [58], combinando os FIDs e CPMG, chegam a relações para porcentagens de umidade e óleo em função de parâmetros que tem que ser determinados previamente. Eles consideram inclusive duas frações de água, com dois tempos de relaxação, e o método que propõem não precisa pesar nem secar as sementes.

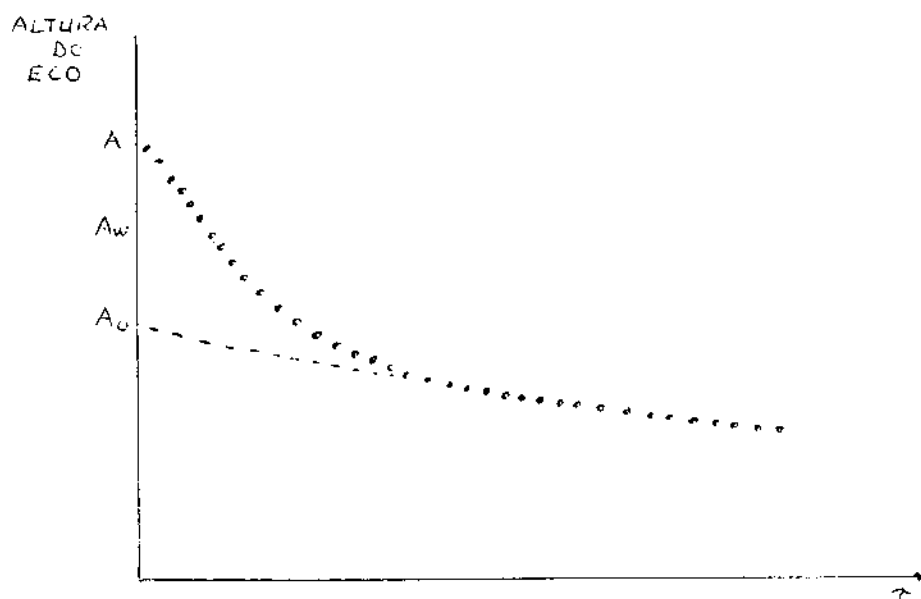


Fig. 4.9 Gráfico da altura dos ecos com o intervalo de tempo entre os pulsos de 90° e 180° .

4.4 ALGUNS RESULTADOS EXPERIMENTAIS.

Com propósito ilustrativo mostraremos alguns resultados experimentais em quatro grupos de sementes oleaginosas: milho, girassol, soja e amendoim. Utilizamos 5 padrões de óleo para determinar o teor absoluto de óleo (massa de óleo de cada semente). O Minispec PC-120 foi usado em todas as medições.

Na Fig. 4.4 estão mostrados os FIDs experimentais dos quatro tipos de sementes. Os FIDs estão indicando quais sementes têm maior quantidade de óleo e até poderia-se discernir aquelas que teriam maior porcentagem de óleo. Como já foi explicoado, o decaimento rápido corresponde ao sinal do sólido mais o líquido, e a parte quase-horizontal ao sinal do óleo (possivelmente inclua água). Por exemplo, vemos que o milho têm mais óleo que o girassol (o milho têm maior altura do sinal correspondente ao óleo), mas em porcentagem de óleo, o girassol pode ter maior teor, já que o decaimento rápido é mais curto, podendo dar uma relação líquido/sólido maior que para o milho.

A importância de medirmos os tempos de relaxação spin-rede dos padrões de óleo e os grupos de sementes, está no fato de que o conhecimento destes parâmetros é essencial para estimar os intervalos de tempos mínimos utilizáveis entre sequências das medições (o mínimo recomendável é $5T_1$). As médias dos resultados estão a seguir:

	T_2 (ms)	% Desvio
5 padrões de óleo	125.77 ± 6.82	5.42
10 sementes de milho	88.96 ± 2.58	2.90
10 sementes de girassol	106.19 ± 3.40	3.20
10 sementes de soja	111.74 ± 5.36	4.80
10 sementes de amendoim	121.55 ± 1.64	1.35

Como se observa, os valores de T_1 ficam na faixa de 100 ms. Nós utilizamos 2 s para o intervalo entre sequências de pulsos de medição.

Estudamos também o comportamento de T_2 nos padrões de óleo e sementes. Os resultados mostram o comportamento dispersivo de T_2 -CPMG já observado nos sistemas estudados nos capítulos anteriores (Tabela 4.1 e 4.2). Além disso, incluímos os valores das intensidades do sinal extrapolados a $t = 0$ (estas intensidades são proporcionais à quantidade de óleo ou M_0 da Eq. (4.7)). Parece que a tendência a uma diminuição da intensidade fora devido pelo tamanho de amostra, pois, se observa que no padrão de maior massa e na semente de maior conteúdo de óleo (amendoim), a diminuição é mais ecentuada.

Estes resultados mostram que é importante manter fixo o intervalo de tempo, 2τ , entre pulsos de 180° em todas as medições CPMG para determinação de conteúdo de óleo.

Em seguida mostraremos os desvios dos valores de T_2 das diferentes amostras estudadas medidas com um valor de $2\tau = 1.61$ ms:

	T ₂ (ms)	% Desvio
5 padrões de óleo	88.95 ± 3.79	4.26
10 sementes de milho	88.19 ± 7.97	9.04
10 sementes de girassol	77.16 ± 13.85	17.95
10 sementes de soja	87.71 ± 4.72	5.38
10 sementes de amendoim	98.95 ± 2.41	2.44

Para achar o conteúdo de óleo das sementes, mediante CPMG, determinamos previamente os valores das intensidades (que denotaremos por I₀) dos padrões de óleo que apresentaremos a seguir:

massa (mg)	I ₀ (u.a.)	massa/I ₀ (mg/u.a.)
15.8	104.5	0.1513
25.6	178.6	0.1433
34.7	229.1	0.1515
46.5	315.0	0.1476
57.2	369.9	0.1546

(u.a. está indicando alguma unidade de voltagem que para os nossos fins não é relevante). Dos dados mostrados achamos que o valor médio da relação massa/I₀ é 0.1497 ± 0.0043 , com um desvio de 2.89 %. Então, utilizando CPMG medimos os valores das intensidades I₀ das diferentes sementes, que multiplicando pelo valor 0.1497 mg/u.a. determina-se o conteúdo de óleo. Cada semente precisa ser pesada para obtermos as estimativas das porcentagem de óleo. Os resultados aparecem na Tabela 4.3.

Para determinar o conteúdo de óleo mediante o método do spin echo, o Minispec PC-120 já têm incluído um programa, onde a curva de calibração é feita em relação às amostras padrões. O conteúdo

de óleo das sementes é então medido com referência a esta curva. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.3.

4.5 CONCLUSÕES

Este Capítulo mostra que os métodos da RMN pulsada para determinação de conteúdo de óleo, além de ser rápido e não destrutivo, fornecem possibilidades de ampliar aplicações com estimativas simultâneas de conteúdo de óleo e umidade.

O conhecimento dos tempos de relaxação de sementes desconhecidas, antes das medições rotineiras, podem ser importantes na fixação de parâmetros.

Tal como foram descritos os diferentes métodos, a utilização de qualquer um deles dependerá das necessidades específicas de aplicação.

TABELA 4 2. - DISPERSÃO T_2 -CPMG DAS SEMENTES

2τ	MILHO		GIRASSOL		SOJA		AMENDOIM	
(ms)	T_2 (ms)	I_0	T_2 (ms)	I_0	T_2 (ms)	I_0	T_2 (ms)	I_0
0.23	65	153	49	248	63	277	72	1557
0.46	80	145	57	248	73	276	79	1741
0.69	85	147	57	244	73	275	82	1728
0.92	93	150	61	249	78	268	88	1696
1.15	89	153	71	238	79	269	98	1696
1.38	102	154	70	226	86	265	95	1667
1.61	103	151	68	223	88	256	99	1657
1.84	104	149	74	330	101	258	110	1646
2.07	102	141	81	216	93	262	106	1621
2.30	119	146	76	225	97	258	117	1612

TABELA 4.1.- DISPERSÃO T₂-CPMG DOS PADRÕES DE ÓLEO.

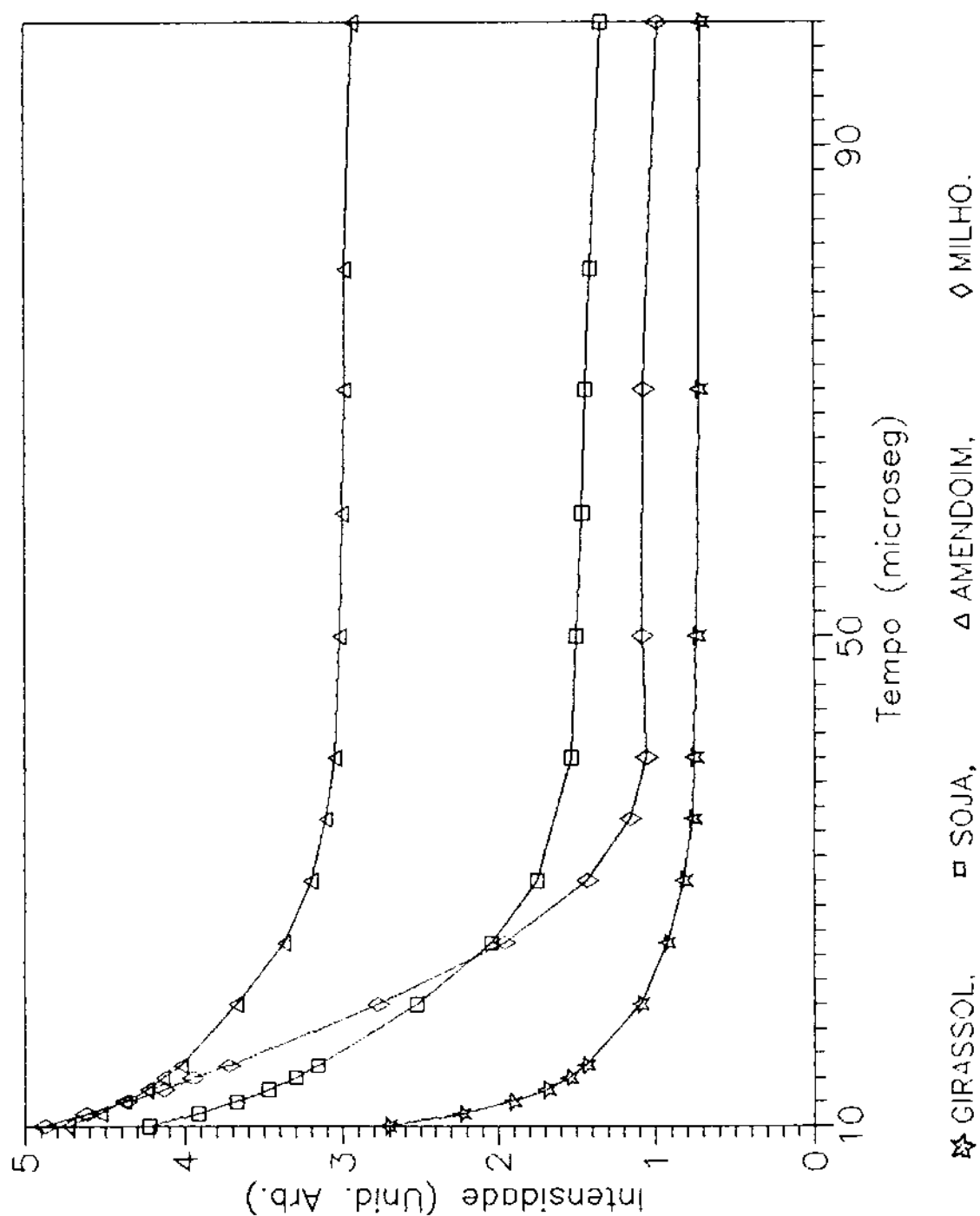
	m ₂ = 1.58mg		m ₃ = 25.6mg		m ₃ = 34.7mg		m ₄ = 46.5mg		m ₅ = 57.2mg	
2τ (ms)	T ₂ (ms)	I ₀	T ₂ (ms)	I ₀	T ₂ (ms)	I ₀	T ₂ (ms)	I ₀	T ₂ (ms)	I ₀
0.23	69	129	63	205	74	273	69	375	71	455
0.40	69	133	71	200	78	279	76	370	77	456
0.69	75	119	73	199	77	278	78	363	79	452
0.92	83	119	81	198	80	274	81	371	80	446
1.15	73	122	77	199	80	268	84	363	83	446
1.38	78	126	78	196	78	287	86	358	83	445
1.61	85	124	84	198	83	269	88	365	88	445
1.84	90	122	83	198	76	272	87	359	90	440
2.07	87	127	86	196	91	266	94	354	101	425
2.30	85	118	86	197	83	267	95	348	94	426

I₀ está em unidades arbitrárias de voltagem

TABELA 4.3. - PORCENTAGEM DE ÓLEO DETERMINADOS MEDIANTE
CPMG e SPIN-ECHO (SE)

Nro. AMOS TRA	MILHO		GIRASSOL		SOJA		AMENDOIM	
	CPMG	SE	CPMG	SE	CPMG	SE	CPMG	SE
1	5.70	5.22	28.97	30.06	19.13	19.08	49.95	50.78
2	5.36	4.73	27.97	26.58	19.04	19.98	43.87	44.25
3	4.41	4.47	32.27	34.07	20.02	20.74	45.53	46.11
4	3.94	3.75	27.12	26.34	19.90	19.75	52.73	53.76
5	5.54	4.85	25.91	20.05	20.66	20.99	49.93	50.77
6	5.37	5.40	28.97	28.24	19.71	19.81	45.25	46.00
7	6.35	6.11	31.34	34.34	20.45	20.92	47.97	48.96
8	5.07	5.18	26.61	22.95	19.78	16.71	43.40	43.69
9	5.56	4.77	29.38	28.51	20.09	23.76	51.28	52.16
10	5.53	5.26	25.98	28.41	20.05	20.40	50.30	50.82

Fig. 4.4
FID de algumas sementes



CONCLUSÕES

As conclusões específicas para as diferentes aplicações estudadas foram já discutidas nos respectivos capítulos. Entretanto, é interessante assinalar algumas considerações gerais no que diz respeito a utilização da técnica de RMN.

A importância das medições dos tempos de relaxação em sistemas biopolímeros-água, além da simples correlação com as mudanças do estado do sistema, oferecem, pelo menos, algumas informações microscópicas deste mesmo sistema. Recentemente, Hills et al. [33], concluíram que as medições de relaxação de prótons (^1H) mesmo não dando informações úteis acerca do estado da água (água unida e outros estados), fornecem informações valiosas do estado dos biopolímeros e algumas informações da morfologia do sistema.

É importante mencionar que em ciência e tecnologia de alimentos a RMN oferece um caminho para substituir, como técnica de análises, muitos métodos tradicionais, especialmente por ela ser rápida e reproduzível. Mencionarei algumas das aplicações, só referencialmente:

- Curvas de fusão de gorduras alimentárias.
- Conteúdo de umidade em arroz, macarrão e pastas.
- Gordura e umidade de leite em pó, queijos e derivados lácteos.
- Determinação de gelo e água líquida em carnes, pescados e outros alimentos ultracongelados.

Para geração de imagens, tem importância o conhecimento da distribuição dos tempos de relaxação.

Nós trabalhamos somente com RMN de prótons, mas nos últimos anos [35] vem se mostrando a importância de analisar núcleos como o ^{17}O e ^2H , útil para separar a mobilidade do esqueleto (biopolímeros) da água associada (água unida mais outros estados), pelo que instrumentos com capacidade multinuclear podem ser importantes.

Existem diferentes aplicações em outras áreas, por exemplo, estudos de endurecimento de pastas de cimento e materiais cerâmicos. Em materiais porosos, podem-se determinar a média do tamanho dos poros e a distribuição de tamanho de poros.

No entanto, a procura das diversas aplicações só será possível através de pesquisas interdisciplinares, pois somente o conhecimento da técnica não é suficiente se, além disso, a necessidade de aplicações específicas não estiverem bem estabelecidas.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SLICHTER, C.P., Principles of Magnetic Resonance (2° Ed.)
Springer-Verlag, Berlin (1978).
- [2] ABRAGAM, A., The Principles of Nuclear Magnetism, Oxford,
University Press, Oxford (1965).
- [3] EMSLEY, J.W.; FEENEY, J., and BECKER, E.D., High Resolution
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Vol.1,
Pergamon Press, Oxford (1965).
- [4] BLOCH, F., Phys. Rev., 70, 470 (1946).
- [5] FARRAR, T.C. and BECKER, E.D., Pulse and Fourier Transform NMR
Academic Press, London (1971).
- [6] FUKUSHIMA, E. and ROEDER, S.B.W., Experimental Pulse NMR,
Addison Wesley (1981).
- [7] SOHÁR, Pál, Nuclear Magnetic Spectroscopy, Vol. 1, CRC Press
Florida (1983).
- [8] RABI, J.I.; RAMSEY, N.Y.; and SCHWINGER, J., Rev. Moder. Phys.
73, 167 (1954).
- [9] BLOEMBERGEN, N.; PURCELL, R.V. and POUND, R.V., Phys. Rev.,
73, 672 (1948).
- [10] HAHN, E.L., Phys. Rev., 80, 580 (1950).
- [11] CARR, H.Y. and PURCELL, E.M., Phys. Rev., 94, 630 (1954).
- [12] TORREY, H.C., Phys. Rev., 104, 563 (1954).
- [13] MEIBOOM, S. and GILL, D., Rev. Scient. Inst., 29, 688 (1958).
- [14] VAN PUTTE, K.P.A.M. and VAN DEN ENDEN, J., J. Phys., E,
Scient. Inst., 6, 910 (1973).
- [15] TIWARI, P.N. and BURK, W., J. Amer. Oil Chem. Soc. (JAACS),
57, 119 (1980).
- [16] DAMADIAN, R., Science, 171, 1151 (1971).
- [17] MATHUR-DE VRÉ, R., Prog. Biophys. Mol. Biol., 35, 103 (1979).

- [18] FOSTER, M.A., Magnetic Resonance in Medicine, Pergamon Press (1984).
- [19] SENTJURC, M.; SCHARA, M.; AVERSPERG, M.; GOLOUGH, R.; and LAMOVEE, J., Radiol. Jugosl., 4, 319 (1974).
- [20] LING, C.R.; FOSTER, M.A.; HUTCHISON, J.M.S., Phys. Med. Biol., 25, 748 (1980).
- [21] DAMADIAN, R.; ZEENER, K.; HOR, D.; DIMAIO, T.; MINKOFF, L.; GOLDSMITH, N., Ann. New York Acad. Sci., 222, 1084 (1973).
- [22] GWAN GO, K. and EDZES, H., Arch. Neurol., 32, 462 (1975).
- [23] KIRIKUTA, T.C. and SIMPLACEANU, V., Cancer Res., 35, 1164 (1975).
- [24] SARYAN, L.A.; HOLLIS, D.P.; ECONOMOW, J.S.; and EGGLESTON, J.C.; J. Natn. Cancer Inst. 52, 599 (1974).
- [25] LING, C.R.; FOSTER, M.A.; Phys. Med. Biol., 27, 853 (1982).
- [26] WEISMAN, I.O.; BENETT, L.H.; MAXWELL, L.R.; WOODS, M.W.; BURK, D. Science, 1288 (1972).
- [27] INCH, W.R.; MACREDIE, J.A.; KNISPEL, R.R.; THOMPSON, R.T. and PINTAR, M.M.; J. Natl. Cancer Inst., 52, 353 (1974).
- RANADE, S.S.; CHAUCHULE, S.R.; KASTURI, S.R., NADKARNI, S.S.; TALWALKAR, G.V.; WAGH, W.V.; KORDGANKAR, K.S.; VIJAYARAGAAVAN, R., Indian J. Biochem. Biophys. 12, 229 (1975).
- EGGLESTON, J.C.; SARYAN, L.A.; HOLLIS, D.P., Cancer Res. 35, 1326 (1975).
- [28] McLACHLAN, Phys. Med. Biol., 25, 309 (1980).
- [28] JKARLIK, S.I., Mag. Reson. Med., 3, 181 (1986).

- [29] LEUNG, H.H.; STEINBERG, M.P.; WEI, L.S.; NELSON, A.I.,
J. Food Science, 41, 297 (1976).
- [30] LANG, K.W.; STEINBERG, M.P.; J. Food Science, 48, 517 (1983).
- [31] RICHARDSON, S.J.; BAIANU, I.C.; STEINBERG, M.P.,
Starch, 39, 198 (1987).
- [32] HILLS, B.P.; WRIGHT, K.M.; BELTON, P.S., Mol. Phys., 67,
193 (1989).
- [33] HILLS, B.P.; S.F. TAKACS; BELTON, P.S., Food Chemistry, 37,
95 (1990).
- [34] LECHERT, H.; MAIWALD, W.; KÖTHE, R. and BASLER, W.D.,
J. Food Proc. Preserv., 3, 275 (1980).
- [35] RICHARDSON, S.J.; BAIANU, I.C.; STEINBERG, M.P., Starch,
39, 79 (1987).
- [36] SILVA, Claudio E. Mendes da, Tese de Doutorado, Fac. Eng.
Alim.-UNICAMP (1991).
- [37] ZOBEL, H.F., Starch, 40, 44 (1988).
- [38] MANNERS, D.J., Cereal Food World, 30, 461 (1985).
- [39] CLICKSMAN, Martin, Food Hydrocolloids, Vol. I CRC Press,
Inc., Florida (1982).
- [40] RICHARDSON, S.J.; BIANCU, I.C.; STEINBERG, M.P., J. Agric.
Food Chem. 34, 17 (1986).
- [41] LELIEVRE, J. and MITCHELL, J., Starch, 27, 113 (1975).
- [42] BASLER, W. and LECHERT, H., Starch, 25, 289 (1975).
- [43] CHILD, T.F. and PRYCE, N.G., Biopolymer, 11, 409 (1972).
- [44] CALLAGHAN, P.T.; JOLLEY, K.W.; LELIEVRE, J.; WONG, R.D.K.,
J. Colloid. Interf. Science (1987).
- [45] BELTON, S.P. and HILLS, B.P., Mol. Phys., 61, 999 (1987).
- [46] BROSIO, E.; CONTI, F.; LINTAS, C. and SYKORA, S., J. Food
Technol., 13, 107 (1982).

- [47] CHIASI, K.; HOSENEY, R.C.; VARRIANO-MARTSON, E., *Cereal Chem.*, **59**, 81 (1982).
- [48] CHIANG, B.Y. and JOHNSON, J.A., *Cereal Chemistry*, **54**, 429 (1977).
- [49] CONWAY, T.F. and EARLE, F.L., *JAOCS*, **40**, 265 (1963).
- [50] ALEXANDER, D.E.; SILVELA, S.L.; COLLINS, F.I. and RODGERS, R.C., *JAOCS*, **44**, 555 (1967).
- [51] COLLINS, F.I.; ALEXANDER, D.E.; RODGERS, R.C. and SILVELA, S.L., *JAOCS*, **44**, 708 (1967).
- [52] ZUPANCIC, I.; VRSCAJ, S.; POROK, J.; LEVSTEK, I.; ERZEN, R. and BLINC, R., *Acta Chem. Scand.*, **21**, 1664 (1967).
- [53] ROBERTSON, J.A. and MORRISON, W.O., *Ho.*, **56**, 961 (1979).
- [54] TIWARI, P.N.; GAMBHIR, P.N. and RAJAN, T.S., *JAOCS*, **51**, 104 (1974).
- [55] SRINIVASAN, V.T., *JAOCS*, **56**, 1000 (1979).
- [56] RATKOVIC, S., *Proced. 7th Ampere Intern. Summer School*, Portoroz June, 14-20, 325 (1982).
- [57] BROSIO, E.; CONTI, F.; DI NOLA, A.; SCORAND, O. and BALESTRIERI, F., *J. Food Technol.*, **16**, 629 (1981).
- [58] GAMBHIR, P.N. and AGARWALA, A.K., *JAOCS*, **62**, 103 (1985).
- [59] GANDRA, Maria C.W.G., *Tese de Mestrado*, IFGW-UNICAMP (1979).
- [60] DE GODOY, I.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; NAGAI, V. e RETTORI, C. *Bragantia*, Campinas, **45**, 161 (1986).
- [61] WATSON, S.A. and FREEMAN, S.E., *Thirtieth Ann. Conrand Sorghum Res. Conf. Chicago*, December 9-11; p. 251 (1975).
- [62] BAUMAN, L.F.; CONWAY, T.F.; WATSON, S.A., *Science*, **139**, 498 (1963).

- [63] BROSIO, E.; CONTI, F.; LINTAS, C. and SYIWRA, S., J. Food Technol. 13, 107 (1985).
- [64] SRINIVASAN, V.T.; SINGH, B.B.; CHIDAMBARESWARAN, P.K.; SUNDARANA, V., JAOCs, 62, 1021 (1985).
- [65] SRINIVANSAN, V.T.; SINGH, B.B.; CHIDAMBARESWARAN, P.K.; SUNDARANA, V., JAOCs, 63, 1059 (1985).
- [66] CASTIÑEIRA, M., Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 29, 449 (1989).