

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DEBORA JORGE MORAS**

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE SEQUÊNCIAS DE PULSO DE RMN EM BAIXO  
CAMPO PARA AVALIAR QUALIDADE DE MOLHOS DE TOMATE COMERCIAIS**

São Carlos-SP

2023

**DEBORA JORGE MORAS**

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE SEQUÊNCIAS DE PULSO DE RMN EM BAIXO  
CAMPO PARA AVALIAR QUALIDADE DE MOLHOS DE TOMATE COMERCIAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio  
Orientador de estágio: Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos-SP

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Folha de aprovação**

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de título de Bacharel em Química Tecnológica da candidata **Debora Jorge Moras**, realizada em 30/03/2023:



Documento assinado digitalmente

POLIANA MACEDO DOS SANTOS

Data: 12/04/2023 16:42:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Poliana Macedo dos Santos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Curitiba  
Nota: 8,5

---

Prof. Dr. Tiago Bueno de Moraes  
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP  
Nota: 8,5

---

Prof. Dr. Tiago Venâncio  
Universidade Federal de São Carlos  
Nota: 8,5

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar meu sonho de ingressar em uma universidade pública e aos meus pais Carlos Roberto Moras (*in memorian*) e Celi Lopes Jorge Moras, avós paternos Nair Ribeiro Moras (*in memorian*) e Dionísio Moras (*in memorian*) e maternos Rita Morato Lopes Jorge e Jorge Simões Jorge (*in memorian*) por estarem presente em todas as fases de minha vida, contribuindo diariamente com minha formação pessoal e profissional.

Agradeço por sempre acreditarem em meu potencial e fazerem todos os esforços para que eu pudesse estudar em boas escolas da cidade de São Carlos para que eu conseguisse ingressar em uma universidade pública.

Meu agradecimento aos meus amigos de São Carlos e Araraquara pela amizade, carinho, respeito e por estarem sempre por perto, compartilhando tantos momentos juntos.

E também ao meu orientador de estágio Luiz Alberto Colnago pela orientação durante esses meses de estágio na unidade da Embrapa Instrumentação em São Carlos, possibilitando que eu pudesse realizar o estágio e adquirir conhecimento e experiência e ao meu orientador de TCC Tiago Venâncio pela ótima orientação e por acompanhar-me durante a realização desse TCC.

“Dreams don’t work unless you do”.

Autor desconhecido.

## RESUMO

A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica espectroscópica baseada na interação dos núcleos atômicos com spin nuclear ( $I$ ) maior que zero quando estão na presença de um campo magnético estático ( $B_0$ ) e de um campo magnético oscilante ( $B_1$ ). Essa técnica é importante nas áreas de pesquisa e desenvolvimento em química orgânica, inorgânica, analítica e físico-química, produção e desenvolvimento de agroquímico, na indústria farmacêutica, de polímeros e de alimentos, em pesquisas bioquímicas e biológicas e também no campo da química para caracterizar a composição química de amostras a serem estudadas, investigar formulações, analisar misturas, determinar pureza de compostos e estudar a cinética e mecanismos de reação, além de caracterizar moléculas. Essas são algumas das aplicações da ressonância magnética nuclear nessa área. Nesse trabalho, é apresentada uma revisão acerca das aplicações da RMN em alimentos em geral e um exemplo do emprego de técnicas de RMN-DT para analisar a qualidade dos molhos de tomate baseadas nas sequências de pulsos CPMG e CPMG-90, usadas para determinar o tempo de relaxação transversal,  $T_2$ . No caso dos molhos de tomate, os valores de  $T_2$  mais longos foram relacionados com uma maior quantidade de água e menor viscosidade, podendo estar associado a uma menor qualidade (mais ralos). Para alguns tipos de molho, como por exemplo, o tipo bolonhesa, é esperado que tenha pedaços de carne em sua composição e isso aumenta a viscosidade, tornando o molho mais encorpado e com um menor valor de  $T_2$ , porém, dada a heterogeneidade dessa amostra, é importante fazer um estudo mais detalhado sobre outras componentes de  $T_2$ , possivelmente existentes.

**Palavras-chave:** Ressonância Magnética Nuclear. Produtos Alimentícios. Tempos de relaxação. CPMG. CPMG-90.

## ABSTRACT

Nuclear Magnetic Resonance is a spectroscopic technique based on the interaction of atomic numbers with nuclear spin ( $I$ ) greater than zero when in the presence of a static magnetic field ( $B_0$ ) and an oscillating magnetic field ( $B_1$ ). This technique is important in many areas of research and development such as organic, inorganic, analytical and physical chemistry, agrochemical production and development. Additionally, it is mostly employed in the pharmaceutical companies, polymer and food industry, in biochemical and biological research and also in the field of chemistry for characterize the chemical composition of samples to be studied, investigate formulations, analyze mixtures, determine purity of compounds and study kinetics and reaction mechanisms, in addition to characterizing molecules. In this work, some works on TD-NMR applied to food analysis are reviewed and an example of the application of this technique is employed to analyze the quality of tomato sauces, using CPMG and CPMG-90 pulse sequences. In the case of tomato sauces,  $T_2$  values were related to the amount of water and viscosity, which can be associated to the quality of the product. For some flavors, such as Bolognese type, it is expected to have pieces of meat in its composition and this increases the viscosity, making the sauce thicker and with a lower  $T_2$  value. However, given the heterogeneity of this type of sample, it is important to perform a detailed study about other existent  $T_2$  components.

**Key words:** Nuclear Magnetic Resonance. Food Products. Relaxation times. CPMG. CPMG-90.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do RMN em coordenadas girantes .....	16
Figura 2 - Sinal de RMN: (a) no domínio do tempo-Free Induction Decay(FID); (b) no domínio das frequências .....	17
Figura 3 - FID de uma amostra sólida heterogênea (semente de amendoim) .....	10
Figura 4 - Sequência de pulsos inversão-recuperação (a); Variação da amplitude de sinal (b).....	10
Figura 5 - Eventos da sequência de pulsos de inversão-recuperação a partir de uma representação vetorial da evolução da magnetização.....	20
Figura 6 - Esquema da sequência de pulsos CPMG .....	22
Figura 7 - Representação vetorial dos eventos que ocorrem na sequência CPMG ao longo do tempo .....	23
Figura 8 - Diagrama de blocos de instrumento de RMN.....	24
Figura 9 - Ímãs do tipo Halbach usados em análises não invasivas na Embrapa Instrumentação Agropecuária: (a) magneto em formato cilíndrico e (b) unilateral (superfície).....	25
Figura 10 - (a) Fotografia de um fruto de manga sem defeito na parte externa; (b) Fotografia de um fruto de manga com defeito na parte externa .....	26
Figura 11 - Relaxograma dos tempos de relaxamento transversal de mangas: 2a) estágio inicial de maturação; 2b) estágio final de maturação e 2c) com defeito fisiológico .....	27
Figura 12 - Média dos sinais de CPMG de três classes de tomate: verde, vermelho, BRIX $\geq 4.5$ e BRIX $> 4.5$ e com ou sem defeitos.....	29
Figura 13 - Tempo de distribuição $T_2$ dos sinais de CPMG médios obtidos de cada classe de tomate: a) verde e amarelo; b) Brix $\leq 4.5$ e Brix $> 4.5$ ; c) sem defeito e com defeito.....	30
Figura 14 - a) CPMG; b) CWFP-T1 de três curvas de relaxação de requeijão cremoso simples com diferentes composições químicas e a respectiva relaxação do espectro obtido em (c e) com o algoritmo ILT .....	33
Figura 15 - PCA das 45 amostras de requeijão cremoso.....	34
Figura 16 - Espectrômetro Spinlock (Flora) da Embrapa Instrumentação agropecuária: (a) visão frontal; (b) visão lateral .....	38
Figura 17 - Curvas de decaimento do sinal de RMN obtidos com a sequência CPMG para amostras de molho de tomate .....	40



Figura 18 - Curvas de decaimento do sinal de RMN obtidos com a sequência CPMG-90 para amostras de molhos de tomate.....	42
Figura 19 - $T_2$ CPMG-90 x CPMG.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Molhos de tomate e seus respectivos tipos .....	10
Tabela 2 - Valores de $T_2$ e a respectiva área de cada classe de tomate (maduro, SSC e com defeitos) .....	30
Tabela 3 - Molhos de tomate e seus respectivos tipos .....	39
Tabela 4 - Amostras de molhos de tomate e os respectivos valores de $T_2$ para a sequência CPMG com ajuste monoexponencial .....	40
Tabela 5 - Molhos de tomate e seus respectivos valores de $T_2$ para a sequência CPMG-90, obtidos com ajuste monoexponencial das curvas de decaimento .....	42



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN-DT: Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo

FID: Free Induction Decay

CP: Carr-Purcell

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

CPMG-90: Carr-Purcell-Meiboom-Gill adaptada

CWFP: Continuous Wave Free Precession

IR: Inversão-Recuperação

GOS: galactooligossacarídeo

XOS: xilooligossacarídeo

PCA: análise de componentes principais

PLS: regressão de mínimos quadrados parciais

TIL ou ILT: transformada da inversa de Laplace

SSC: teor de sólidos solúveis

Grau BRIX: conteúdo de açúcar

## LISTA DE SÍMBOLOS

$B_0$ : Campo Magnético Externo

$B_1$ : Campo Magnético Oscilante

$M_z$ : Magnetização no eixo z

$M_0$ : Magnetização no equilíbrio térmico

$M_{xy}$ : Magnetização no plano xy

$\theta$ : Ângulo de rotação da magnetização

$t_p$ : Tempo de pulso

$T_2^*$ : Constante de decaimento do FID

$T_2$ : Tempo de relaxação transversal

$T_1$ : Tempo de relaxação longitudinal

$T_r$ : Tempo de repetição

$\omega_0$ : Frequência de Larmor

$\omega$ : Frequência do campo magnético oscilante  $B_1$

$\tau$ : Tempo de duração do pulso

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO: A RMN.....	13
1.1	A RMN pulsada em baixo campo .....	15
1.2	Relaxação longitudinal ou spin-rede .....	18
1.3	Relaxação transversal ou spin-spin.....	20
1.4	RMN no domínio do tempo como ferramenta para a análise de produtos alimentícios.....	23
2	OBJETIVOS.....	35
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.1	Amostras.....	36
3.2	Preparo das amostras.....	36
3.3	Instrumentação e técnicas utilizadas .....	36
3.4	Detalhes experimentais .....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1	Análises por RMN-DT: CPMG.....	39
4.2	Análises por RMN-DT: CPMG-90.....	41
5	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DAS DUAS SEQUÊNCIAS DE PULSOS PARA OUTRAS AMOSTRAS .....	44
6	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	46
	REFERÊNCIAS .....	47

## 1 INTRODUÇÃO: A RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um fenômeno espectroscópico baseado na interação dos núcleos atômicos com spin nuclear ( $I$ ) maior que zero, quando esses são colocados na presença de um campo magnético estático ( $B_0$ ) e de um campo magnético oscilante  $B_1$ . Os spins nucleares podem assumir valores inteiros e semi-inteiros, que podem ser calculados usando-se o número atômico ( $Z$ ) e a massa atômica ( $A$ ). Se  $A$  for ímpar e  $Z$  par, o spin nuclear será semi-inteiro, ou seja,  $1/2, 3/2$ , etc. Se  $A$  e  $Z$  forem pares, o valor de  $I$  é igual a  $0$ , ou seja, não há spin nuclear, por isso esse núcleo não é observável por RMN. Se  $A$  for par e  $Z$  ímpar, o spin nuclear será um número inteiro, ou seja,  $1, 2, 3$ , etc. Os principais núcleos usados na RMN têm  $I=1/2$ , como os isótopos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , entre outros. A frequência de ressonância ( $\nu$ ) depende do valor da constante magnetogírica ( $\gamma$ ) e de  $B_0$ , e é dada por:

$$f = \gamma B_0 / 2\pi \quad (1)$$

Tabela 1- Valores da constante magnetogírica dos núcleos de hidrogênio-1 e carbono-13.

<b>Núcleo atômico</b>	<b>Constante magnetogírica(<math>\gamma</math>) (<math>\times 10^{-7} \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}</math>)</b>
<b><math>^1\text{H}</math></b>	26,7522
<b><math>^{13}\text{C}</math></b>	6,7283

Fonte: NASCIMENTO, 2016, p.14-15

A espectroscopia de RMN é uma técnica extremamente importante nas áreas de pesquisa e desenvolvimento em química orgânica, inorgânica, analítica e físico-química, na produção e desenvolvimento de agroquímicos, na indústria farmacêutica, de polímeros, de alimentos e em pesquisas bioquímicas e biológicas.

Dentro do campo da química, a espectroscopia de RMN é amplamente utilizada na elucidação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, na caracterização da composição química das amostras estudadas, na investigação de formulações, análise de misturas, na determinação de pureza de amostras, em ensaios de garantia e controle de qualidade, em análises quantitativas de áreas diversas, na identificação e confirmação de compostos, análise de processos de

troca inter e intramolecular, estudos de cinética e mecanismos reacionais, caracterização molecular, entre outras.

O fenômeno de RMN observado em amostras líquidas e sólidas foi estudado pela primeira vez em 1946 pelos físicos Purcell, Torrey e Pound, da Universidade de Harvard e pelos físicos Bloch, Hansen e Packard, da Universidade de Stanford, de forma independente. Após quatro anos, a RMN já começava a ser usada na determinação da estrutura de moléculas orgânicas. Nessa mesma década, o primeiro espectrômetro de RMN de alta resolução para  $^1\text{H}$  operando em onda contínua começou a ser comercializado.

Em 1966 houve a introdução da espectroscopia de RMN pulsada com o uso da Transformada de Fourier (FT). Essa tecnologia, associada ao uso de magnetos supercondutores, permitiu um enorme avanço da técnica em termos de rapidez de medida e sensibilidade da técnica.

No início da década de 1970 foi introduzida a RMN multidimensional e a tomografia por Ressonância Magnética Nuclear (Ressonância Magnética por imagem). (COLNAGO; ANDRADE, 2017).

A RMN é uma técnica informativa que fornece dados qualitativos e quantitativos em uma mesma análise, assim é possível obter informações relacionadas à origem, autenticidade, adulterações e contaminações em diversos produtos oriundos da indústria.

A RMN pode ser dividida em três áreas, sendo elas: a tomografia por RMN ou Imagem por Ressonância Magnética (RMI), que é equivalente ao termo em inglês NMR tomography or Nuclear Magnetic Resonance Imaging (MRI); a espectroscopia de RMN em alta resolução em alto campo (RMN-AR; ou do inglês High resolution high field NMR spectroscopy); e a RMN de baixa resolução ou em baixo campo (no inglês Low-resolution NMR ou low-field NMR), também conhecida como RMN no domínio do tempo (RMN- DT, ou no inglês time-domain NMR – TD-NMR). A RMN de média resolução, que utiliza campos magnéticos entre 1 e 2 T vem se consolidando na última década, por não requerer uso de magnetos supercondutores, mas usando mais permanentes de elevada homogeneidade.

A tomografia é usada principalmente na área médica como um método de diagnóstico não invasivo. A RMN de alta resolução, em alto campo, fornece como principais informações o deslocamento químico, as quantidades relativas de núcleos



com mesmo ambiente eletrônico, análise quantitativa, as constantes de acoplamento ( $J$ ) e as correlações de uma série de núcleos de elementos distintos.

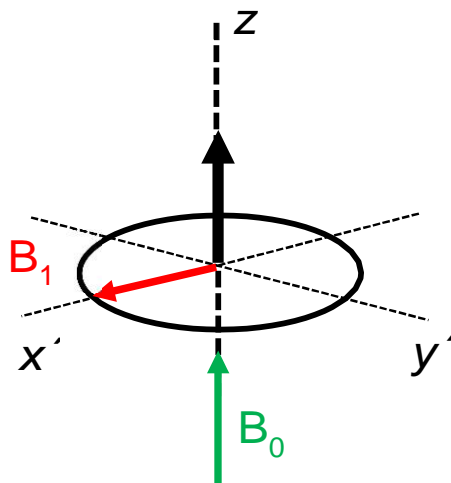
Na RMN-DT são analisadas principalmente as amplitudes dos sinais, obtidas após a aplicação de um pulso, sinais esses conhecidos como FID, que reflete o decaimento livre de indução. Em outros experimentos esse sinal também pode ser obtido na forma de ecos, obtidos por meio da aplicação de uma sequência de pulsos. Outros parâmetros obtidos pela análise do FID são os tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ). Devido ao uso de campos magnéticos muito baixos, a RMN-DT é aplicada para núcleos de átomos com grande abundância natural e alta razão magnetogírica,  $\gamma$ , como hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), flúor ( $^{19}\text{F}$ ) e fósforo ( $^{31}\text{P}$ ).

### 1.1 A RMN pulsada em baixo campo

Na RMN em baixo campo, os campos magnéticos de baixa intensidade ( $B_0 < 0,77\text{T}$ ), possuem baixa resolução com larguras de linha  $\Delta B_0 > 100$  ppm. Os ímãs utilizados nesses equipamentos são ímãs do tipo permanente e normalmente são de pequeno porte. Devido à baixa resolução dos espectros obtidos com apenas um sinal para qualquer amostra, os dados dos espectrômetros pulsados de baixo campo e baixa resolução são analisados no domínio do tempo e, portanto, esta modalidade é conhecida como RMN no domínio do tempo, RMN-DT.

Na RMN pulsada, os sinais são observados quando as amostras inseridas no campo magnético  $B_0$  são submetidas a um campo magnético oscilante  $B_1$ , com frequência ( $\nu$ ), perpendicular a  $B_0$  e na forma de um pulso. Na figura 1 é apresentado um diagrama representativo de um sistema de spins submetidos a um campo magnético  $B_0$ , em que a magnetização resultante ( $M_0$ ) está na sua direção, com a aplicação de um pulso de campo oscilante ( $B_1$ ) perpendicular a  $B_0$ .

Figura 1 - Representação da RMN em coordenadas girantes



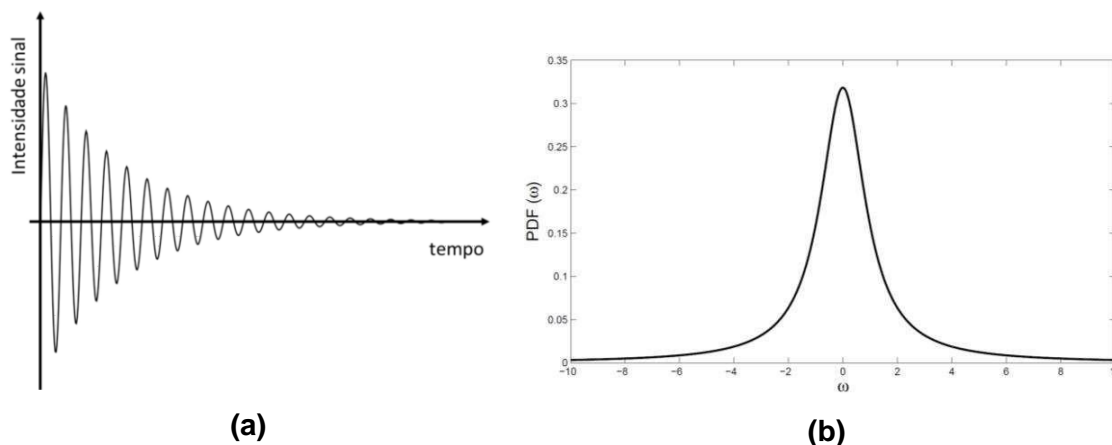
Fonte: Autoria própria, adaptado do livro de Colnago e Andrade (2017, p.442).

Esse pulso fará com que a magnetização  $M_0$  que inicialmente se orienta na direção do campo  $B_0$  (eixo  $z$ ), quando em equilíbrio térmico, desloque de um ângulo  $\theta$  que é proporcional à duração do pulso ( $\tau_p$ ), à intensidade do campo  $B_1$  e à constante magnetogírica ( $\gamma$ ) (Equação 3). Dessa forma, a magnetização será levada no plano  $x'y'$  (sistema de coordenadas rotatórias, que permite eliminar a contribuição angular das componentes  $x,y$ ) das componentes  $M_x$  e  $M_y$ .

$$\theta = \gamma B_1 \tau_p \quad (2)$$

Com a retirada do pulso, a magnetização contida no plano  $x'y'$  passa a precessionar em torno de  $B_0$ , produzindo um sinal elétrico induzido em função do tempo. O comportamento temporal desses sinais induzidos produz o decaimento livre de indução (FID), como representado na figura 2 (a). O FID resulta da ação de dois processos de relaxação distintos, que podem ser descritos pelas constantes de tempo  $T_1$  (relaxação longitudinal) e  $T_2$  (relaxação transversal). Em sistemas muito complexos o FID é pouco informativo e precisa ser processado por uma operação matemática chamada Transformada de Fourier, que transforma um sinal no domínio do tempo em um sinal do domínio da frequência (figura 2 (b)).

Figura 2 - Sinal de RMN: (a) no domínio do tempo-Free Induction Decay(FID); (b) no domínio das frequências

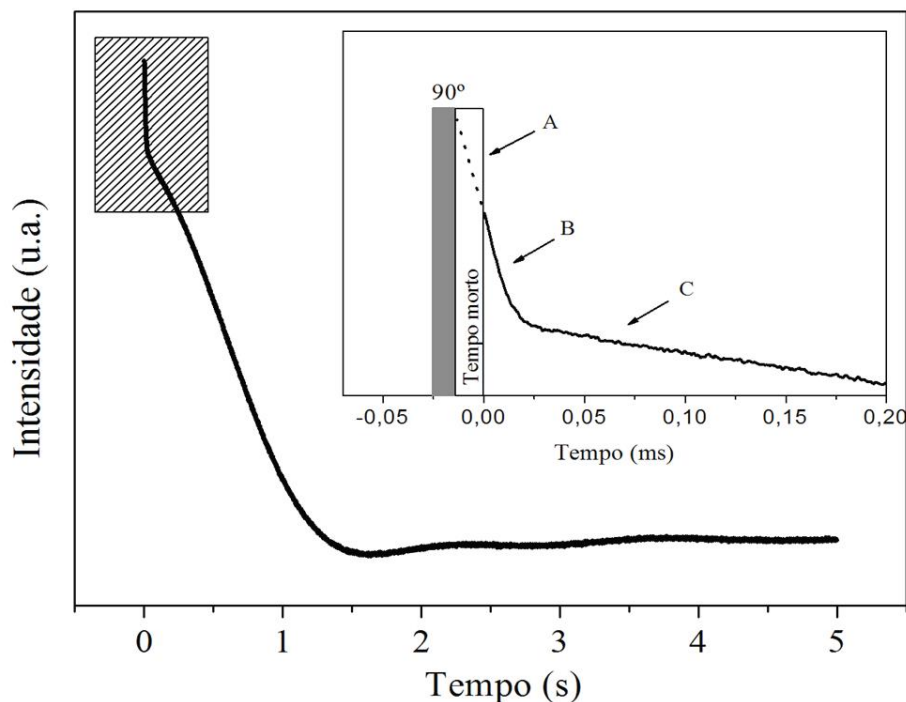


Fonte: **(a)** Adaptado de WikiMedia (2020); **(b)** D'Amico et al. (2012, p. 1750).

A relaxação longitudinal ocorre com o retorno da magnetização à condição de equilíbrio térmico e a relaxação transversal está relacionada ao desaparecimento do sinal no plano  $x'y'$ , devido à interação spin-spin. Esses tempos de relaxação interferem em parâmetros como quantificação de analito, largura da linha e tempo de experimento.

Na figura 3 é apresentado FID de uma amostra heterogênea (semente de amendoim). O amendoim possui óleo (componente líquida) na maior parte de sua constituição e componentes sólidos como açúcares, água de hidratação e proteínas. Portanto, um FID obtido para uma amostra de amendoim (figura 3) em um aparelho de RMN-DT pode ser descrito por 3 componentes (A, B e C). A parte A representa a parte inicial do FID, que decai durante o tempo morto do espectrômetro (período em que as interferências ocasionadas pelas imperfeições instrumentais são maiores que o sinal do FID), B é a parte do FID após o tempo morto e que decai muito rapidamente devido aos componentes sólidos da amostra, e por fim, na parte C, estão apenas os sinais dos componentes no estado líquido, como é o caso do óleo, que decaem mais rapidamente que a parte B.

Figura 3 - FID de uma amostra sólida heterogênea (semente de amendoim)



Fonte: Colnago e Andrade (2017, p.443). Uso autorizado pela editora.

## 1.2 Relaxação longitudinal ou spin-rede

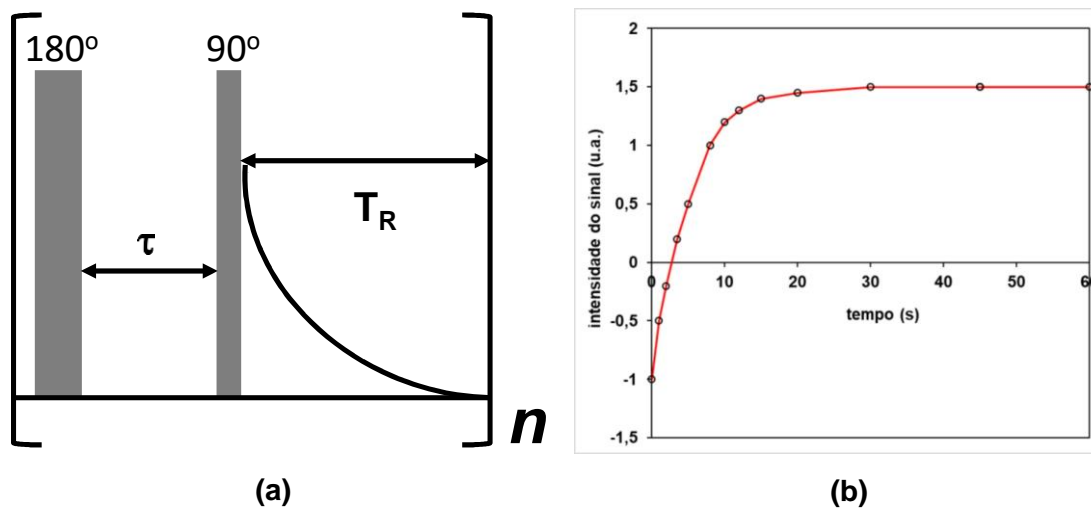
Como mencionado anteriormente, o FID ocorre pela ação de dois mecanismos, sendo um deles a relaxação longitudinal ou spin-rede e o outro, a relaxação transversal ou spin-spin. A relaxação longitudinal está relacionada ao retorno da magnetização ao estado de equilíbrio térmico denominado de  $M_0$ , o qual ocorre após a excitação. Esse retorno se acontece perda de energia dos spins para o ambiente (ou rede- a saber: solvente, paredes do tubo, etc.) na forma de calor. Esse processo depende dos momentos magnéticos transitórios de movimentos rotacionais e translacionais das moléculas vizinhas que possuem oscilação em frequências apropriadas em torno da frequência de Larmor. Essa relaxação resulta no decaimento do sinal, que segue um comportamento exponencial, descrito pela equação 4, na qual  $T_1$  está contido no termo que se refere à recuperação exponencial do módulo da magnetização ao longo do eixo z ( $M_z$ ) e é determinado pelo ajuste exponencial como a constante de tempo de decaimento.

$$M_z(t) = M_0 [1 - \exp(\frac{-t}{T_1})] \quad (3)$$

Por esse motivo,  $T_1$  deve ser conhecido ou estimado para evitar que ocorra a saturação de um ou mais sinais presentes na amostra, principalmente quando se deseja fazer análises quantitativas. Assim, o tempo de espera (ou de repetição,  $T_R$ ) deve ser pelo menos igual a  $5T_1$  entre cada varredura do espectro de RMN, para que a magnetização  $M_z$  seja igual a aproximadamente 99% de  $M_0$ .

A figura 4 (a) mostra a sequência de pulsos inversão-recuperação (IR), mais utilizada para a determinação de  $T_1$ . Essa sequência é formada por um pulso de  $180^\circ$  que inverte a direção da magnetização ao longo do eixo z e é seguida por um tempo  $\tau$  (variável) e por um pulso de  $90^\circ$  para que seja feita a leitura da intensidade do FID. Na figura 4 (b) está representado um gráfico da variação da intensidade do FID em função de  $\tau$  obtido a partir da sequência de IR.

Figura 4 - Sequência de pulsos inversão-recuperação (a); Variação da amplitude de sinal (b)



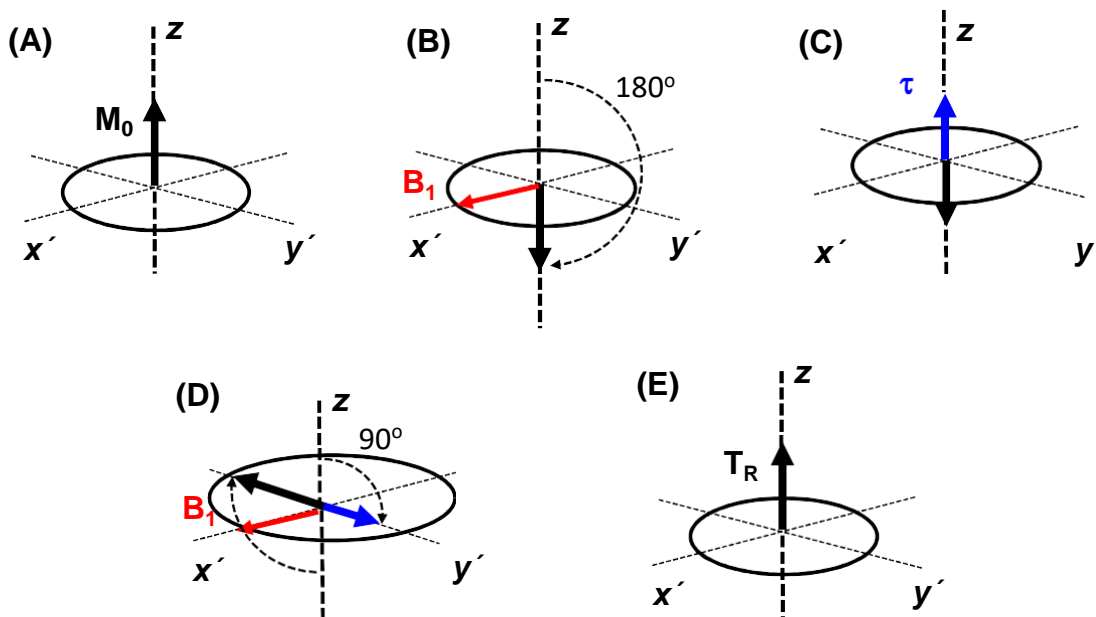
Fonte: Autoria própria, baseado em Colnago e Andrade (2017, p.445).

Na figura 4 é possível observar o comportamento da magnetização durante a aplicação de uma sequência de IR. Com o pulso de  $180^\circ$  ocorre a inversão da magnetização no eixo z ( $M_z$ ) para  $-z$ . Para que sejam detectadas as componentes oriundas da variação é aplicado um pulso de  $90^\circ$  para que a magnetização seja rotacionada para o plano  $x'y'$ , para que seja feita a medida da intensidade do sinal de RMN. Dessa forma, o sinal varia de negativo a positivo dependendo do valor de  $\tau$  e de  $T_1$ . Para obter o valor de  $T_1$  é preciso ajustar a curva obtida, utilizando a equação a seguir. (COLNAGO; ANDRADE, 2017).

$$I(\tau) = I_0 \left[ 1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right] \quad (4)$$

Em que  $I_0$  = intensidade do sinal quando  $T_r > 5T_i$

Figura 5 – Eventos da sequência de pulsos de inversão-recuperação a partir de uma representação vetorial da evolução da magnetização.



Fonte: Autoria própria, adaptada de Colnago e Andrade (2017, p. 446).

### 1.3 Relaxação transversal ou spin-spin

A relaxação transversal ou spin-spin reflete a perda de magnetização no plano  $x'y'$ , que ocorre devido às interações diretas entre os momentos magnéticos individuais dos spins em uma amostra. Essa relaxação é descrita por um decaimento exponencial da magnetização transversal, conforme equação 6.

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

A relaxação transversal é mais lenta em moléculas pequenas (alta mobilidade) e seu valor diminui com a redução da mobilidade molecular da amostra. (COLNAGO; ANDRADE, 2017).

Na RMN-DT, o FID de uma amostra líquida ou em solução decai mais rapidamente que o determinado por  $T_2$ . Nesses aparelhos, o decaimento do FID é determinado pelo tempo de relaxação efetivo ( $T_2^*$ ), que possui maior contribuição com a não homogeneidade do campo magnético ( $\Delta B_0$ ), que  $T_2$  natural da amostra, de acordo com a equação 7. (COLNAGO; ANDRADE, 2017).

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

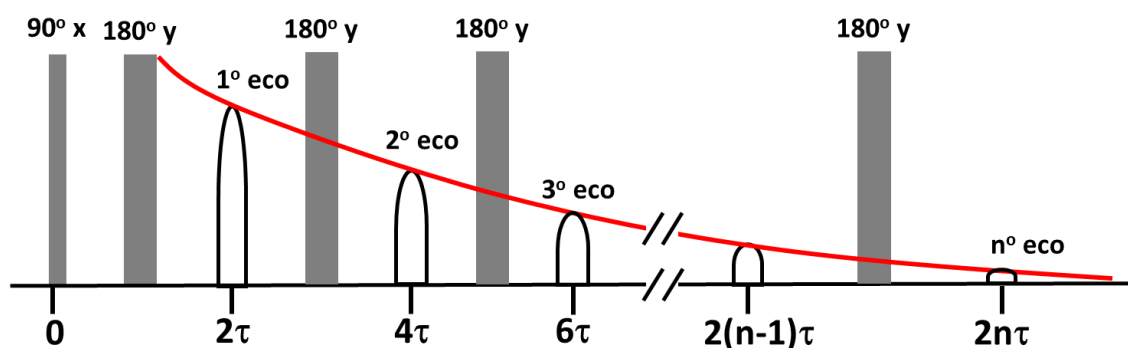
Para realizar as medições de  $T_2$ , de forma a eliminar a contribuição da não homogeneidade de campo, Hahn propôs, em 1950, uma sequência de pulsos que consiste em dois pulsos de  $90^\circ$  com mesma fase, espaçados por um intervalo de tempo  $\tau$ . Após um tempo de  $2\tau$  a partir do primeiro pulso de  $90^\circ$  é medido um sinal de RMN chamado de eco de spin, cuja amplitude é independente da não-homogeneidade do campo magnético. (HAHN, 1950; COLNAGO; ANDRADE, 2017). Em 1954, Carr e Purcell propuseram uma modificação na sequência de Hahn, substituindo-se o segundo pulso por um pulso de  $180^\circ$ , que foi denominada de sequência A. Para a determinação de  $T_2$ , tanto pela sequência de pulso de Hahn ( $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ ), quanto pelo método A ( $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ ), é necessário realizar medições da intensidade do eco, utilizando-se valores crescentes de  $\tau$ . Além disso, é necessário esperar um tempo de pelo menos  $5T_1$  entre as repetições da sequência para que a magnetização retorne ao equilíbrio ( $M_0$ ). Portanto, se gasta muito tempo durante as medidas de  $T_2$  utilizando-se essas duas técnicas. (CARR; PURCELL, 1954; ANDRADE, F.D,2011).

Carr e Purcell também desenvolveram outra sequência de pulsos que foi chamada de sequência B, ou sequência CP, na qual é aplicado um pulso de  $90^\circ$ , seguido de um tempo  $\tau$  e uma série de pulsos de  $180^\circ$  espaçados por  $2\tau$ . (CARR; PURCELL, 1954; ANDRADE, 2011). A sequência CP trouxe diversas vantagens, tal como economia de tempo nas medições de  $T_2$ , uma vez que tornou possível obter as intensidades de todos os ecos em uma única varredura. Outra vantagem foi a eliminação do efeito da difusão da amostra, uma vez que possibilitou utilizar um valor de  $\tau$  pequeno para obter todo decaimento do sinal de RMN. Uma desvantagem é que a técnica CP é muito suscetível a erros de calibração dos pulsos de  $180^\circ$ , o

que leva ao acúmulo de erros de amplitude e conseqüentemente a erros de medição de  $T_2$ . (COLNAGO; ANDRADE, 2017).

Em 1958, Meiboom e Gill introduziram na seqüência CP uma mudança de fase nos pulsos de  $180^\circ$ , de x para y, como mostrado na figura 6, e a técnica foi chamada de CPMG. A seqüência CPMG também produz ecos de mesma fase, diferentemente da seqüência CP, que não é sensível a erros de calibração dos pulsos de  $180^\circ$ . (MEIBOOM; GILL, 1958; COLNAGO; ANDRADE, 2017).

Figura 6 - Esquema da seqüência de pulsos CPMG



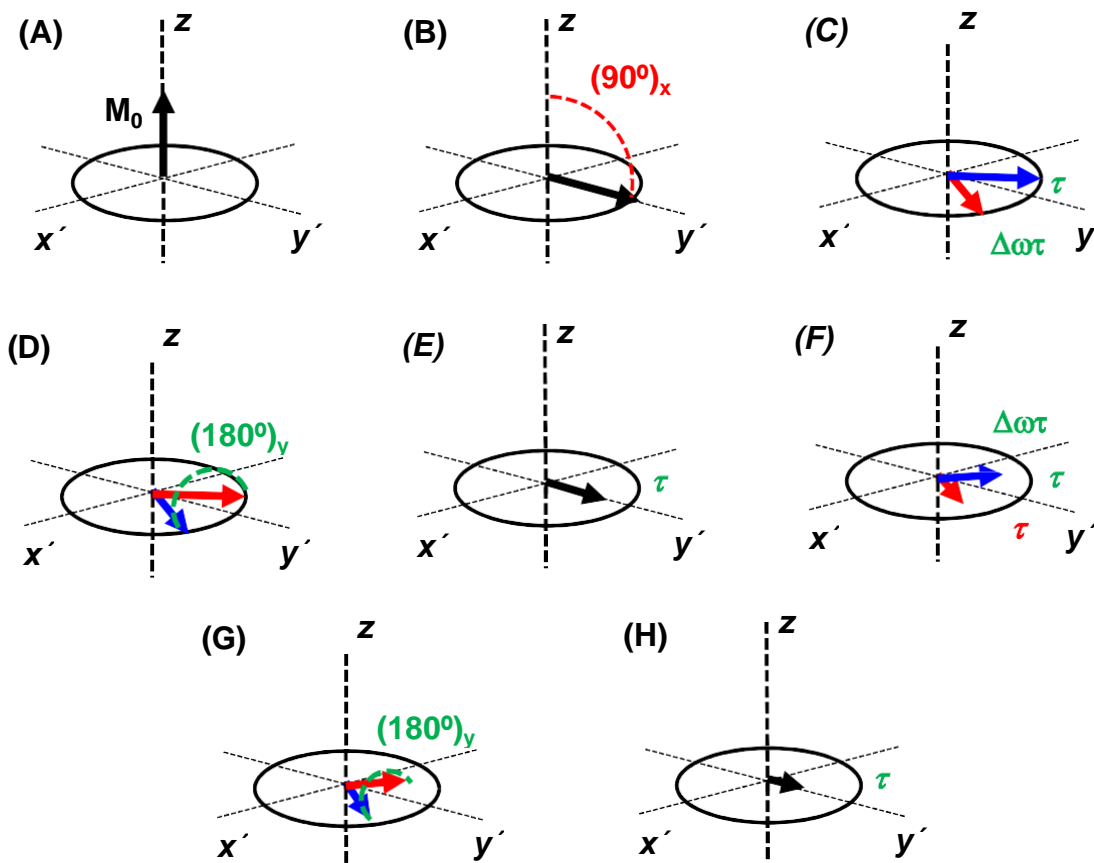
1

Fonte: Autoria própria, adaptado de Lacerda Júnior e Beatriz, (2017, p. 246).

Na figura 7 é mostrada a evolução vetorial da magnetização da seqüência CPMG. No instante inicial (A), temos a magnetização na direção z e com um pulso de  $90^\circ$  segundo x' ela é deslocada para o plano x'y' (B). Depois do tempo  $\tau$  (C), os spins começam a defasar e é aplicado o pulso de  $180^\circ$  segundo y'(D). Esse pulso inverte a direção dos vetores no plano x'y' e após o tempo  $\tau$  (E), as magnetizações são refocalizadas em y, gerando o sinal do eco. Depois do tempo  $\tau$  (F), os spins começam a se defasar e é aplicado outro pulso de  $180^\circ$  em y'(G), invertendo-se os vetores no plano x'y'. Após o tempo  $\tau$  (H), ocorre a refocalização das magnetizações em y' e o sinal do eco é gerado. (MEIBOOM; GILL, 1958; COLNAGO; ANDRADE, 2017).



Figura 7 - Representação vetorial dos eventos que ocorrem na sequência CPMG ao longo do tempo.



Fonte: Autoria própria, adaptado de Meiboom e Gill (1958)

#### 1.4 RMN no domínio do tempo como ferramenta para a análise de produtos alimentícios

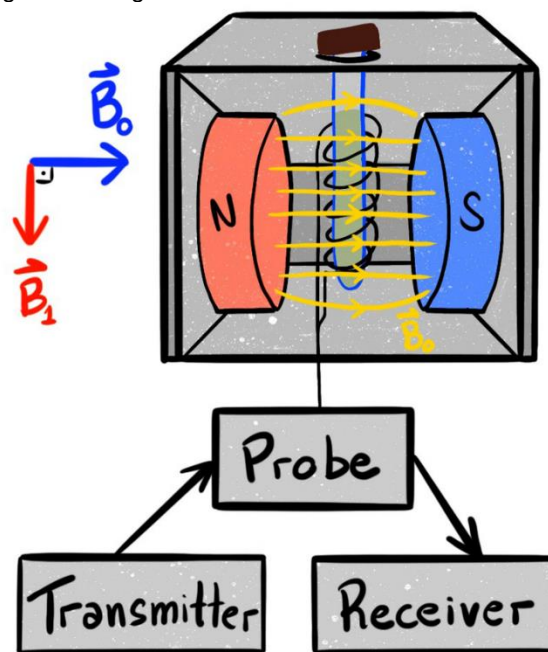
Com base no artigo de Moraes e Colnago (2021), diversos métodos físicos não invasivos baseados nas interações de ondas eletromagnéticas com a matéria têm sido utilizados para avaliar a qualidade de alimentos, sendo que alguns desses métodos utilizam radiação ionizante ou radiação que interage fortemente com compostos químicos, limitando-se a análise à superfície do alimento.

A RMN-DT é um método que não utiliza radiação ionizante e não é considerada invasiva, por isso a técnica pode ser utilizada com os produtos dentro de embalagens plásticas, vidro, papel e em embalagens não metálicas, mantendo-os intactos.

Para as análises não invasivas de produtos alimentícios com RMN-DT, utiliza-se um equipamento composto por: i) campo magnético estático  $B_0$  (ímã do tipo “H”) para dividir os níveis de Zeeman; ii) transmissor para produzir pulsos de campo magnético oscilante de radiofrequência ( $B_1$ , rf) na frequência de Larmor para excitar as transições; iii) a sonda para converter a radiofrequência em  $B_1$  oscilante e detectar o sinal de RMN induzido na amostra; iv) receptor que amplifica e digitaliza o sinal de RMN.

Esses instrumentos são usados para medir a intensidade do sinal de RMN, que é proporcional às medidas de relaxação e de difusão, fornecendo informações sobre as propriedades físicas e químicas dos alimentos, como mostrado na figura 8.

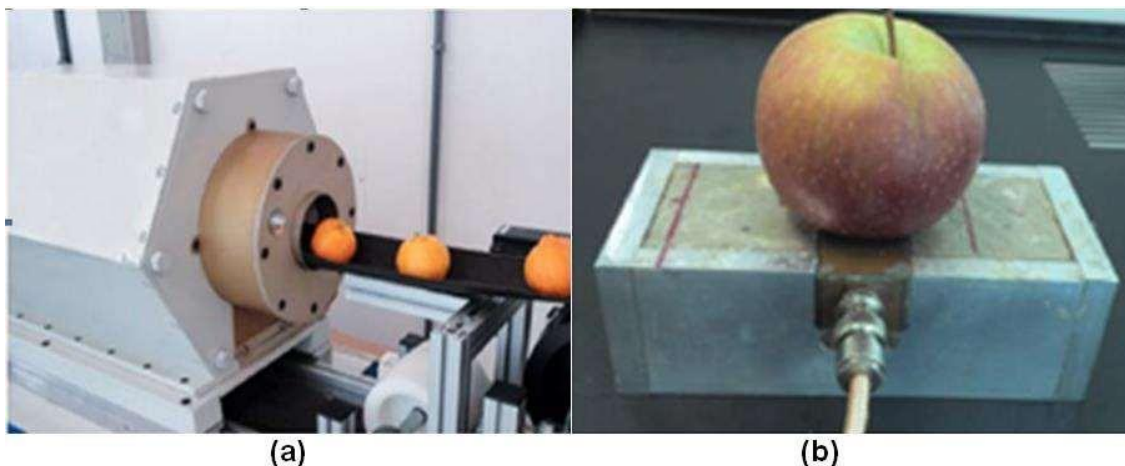
Figura 8 - Diagrama de blocos de instrumento de RMN



Fonte: Moraes e Colnago (2021, p.02). Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527191479201).

Além de ímãs do tipo “H” pode-se usar na RMN-DT ímãs do tipo Halbach, que pode ter um “*bore*” livre de mais de 10 cm de diâmetro (figura 9 (a)), que permite análise de vários tipos de alimentos in natura ou industrializados. As análises também podem ser feitas com ímã e sonda unilateral (figura 9 (b)), que pode analisar amostras de qualquer tamanho. Com esses ímãs e espectrômetros de RMN-DT vários tipos de amostras vêm sendo analisadas, usando-se as sequências CPMG, CWFP-T<sub>1</sub> e IR. (MORAES; COLNAGO, 2021).

Figura 9 - Ímãs do tipo Halbach usados em análises não invasivas na Embrapa Instrumentação Agropecuária: (a) magneto em formato cilíndrico e (b) unilateral (superfície)



Fonte: Moraes e Colnago (2021, p. 6). Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527191479201).

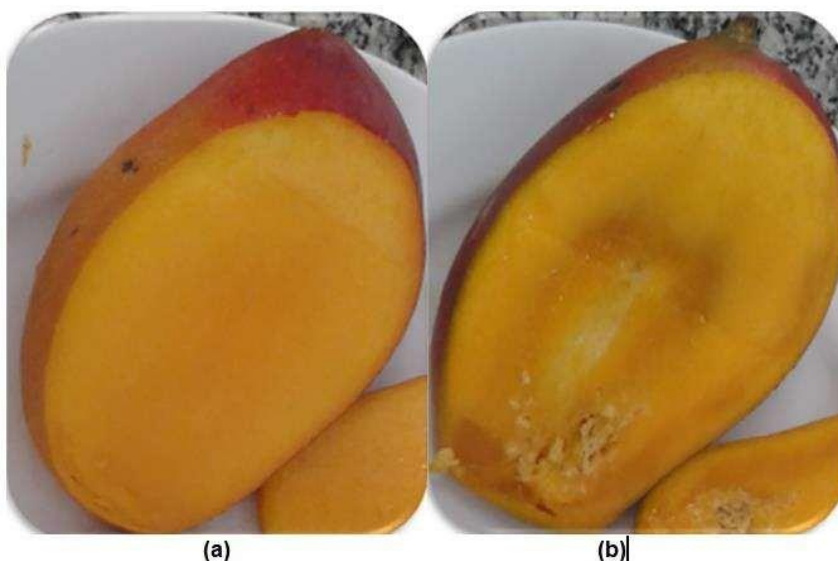
De acordo com Bizzani et al. (2020), foram apresentadas aplicações dessa técnica por meio de processos não invasivos que utilizaram a relaxometria em RMN-DT. Através dessa técnica foi possível relacionar o tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) aos diferentes estágios de amadurecimento da manga Palmer (fase inicial, fase final e a fase em que a manga apresenta defeito físico). Trata-se de uma técnica muito mais barata, se comparada aos aparelhos de RMN de alta resolução e/ou de imagem por alto campo (RMI de alto campo). Esse método é utilizado para análises, não apenas em manga Palmer, mas também em caqui, tomate, kiwi, tangerina, banana, ameixa e laranja. (COLNAGO et al, 2021).

Para realizar essas análises, geralmente são usadas as sequências CPMG e CWFP que são respectivamente a sequência de Carr-Purcell-Meiboom-Gill e de precessão contínua livre de onda contínua (Continuous Wave Free Precession, CWFP) (BIZZANI; et.al, 2020). Em alguns casos essas sequências podem ser usadas em análise de componentes principais (PCA) e a Inversa de Transformada de Laplace (ILT), sendo que a ILT fornece informações do RMN no domínio do tempo. (AZEREDO et al., 2003; VENÂNCIO et al., 2005; ANDRADE; MARCHI NETTO; COLNAGO, 2011, 2012).

No artigo de Bizzani (2020), a RMN-DT foi utilizada para que fossem acompanhadas as mudanças que ocorrem no amadurecimento de frutas que contenham ou não defeitos internos (ou externos). A primeira figura 10(a), mostra o amadurecimento da manga Palmer que não está machucada, enquanto a figura

10(b) mostra o amadurecimento da manga Palmer que está machucada externamente.

Figura 10 - (a) Fotografia de um fruto de manga sem defeito na parte externa; (b) Fotografia de um fruto de manga com defeito na parte externa



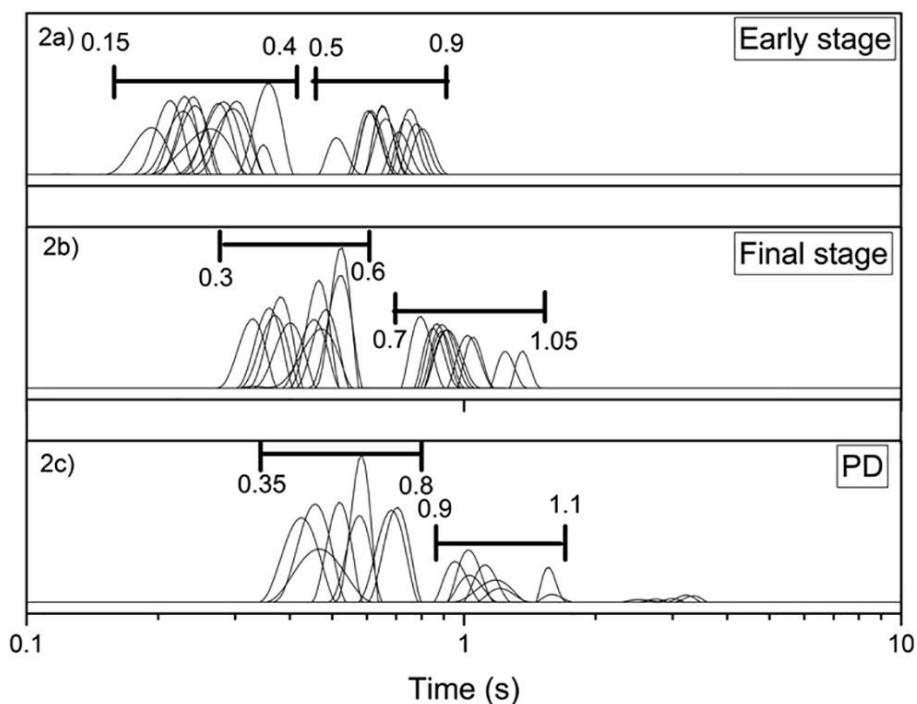
Fonte: Bizzani et al. (2020, p. 02). Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527200469669).

A sequência utilizada para a realização das medidas em mangas sem deterioração externa foi a CPMG, enquanto os dados foram tratados pela Transformada Inversa de Laplace (TIL ou ILT, do inglês “*inverse Laplace transform*”), para analisar as mangas deterioradas externamente.

A partir das análises feitas em mangas Palmer deterioradas externamente e não deterioradas externamente, classificaram-nas em 3 grupos: mangas verdes ou em estágio inicial de amadurecimento, mangas em estágio final de amadurecimento e mangas em estágio final de amadurecimento com defeitos fisiológicos.

Para analisar os resultados dos sinais da sequência CPMG em relaxograma de  $T_2$ , aplicou-se a Transformada da Inversa de Laplace para tratar os dados de RMN-DT de 32 amostras de manga Palmer, como mostrado pela figura 11, a seguir:

Figura 11 - Relaxograma dos tempos de relaxamento transversal de mangas: 2a) estágio inicial de maturação; 2b) estágio final de maturação e 2c) com defeito fisiológico.



Fonte: Bizzani et al. (2020, p.03). Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527200469669).

Com base nas ILTs, observou-se aumento da média de  $T_2$  com o estágio de amadurecimento e com os defeitos fisiológicos. Isso pode ser observado a partir da formação de 2 picos de  $T_2$ , tanto na figura 2a), quanto na figura 2b), sendo que na figura 2c) há um terceiro pico, devido a água eliminada pelas mangas quando elas apodrecem. (BIZZANI et.al. 2020).

No trabalho de Borba et al. (2021) analisou-se a qualidade dos tomates, considerando a cor, teor de sólidos solúveis (SSC) e defeitos para desenvolver modelos de classificação precisos e não destrutivos, com base no estágio de maturação do tomate e na presença de defeitos, através do uso da Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo associada a métodos computacionais.

Foram estudadas duas classes de tomate, sendo uma delas os tomates verdes, e a outra, os vermelhos. Ao estudar cada uma dessas técnicas, identificou-se que os tomates verdes apresentaram um sinal de decaimento mais curto que os tomates vermelhos, em função do diferente local do tecido vegetal estar relacionado ao armazenamento de água. O decaimento da sequência de CPMG associado a

métodos computacionais podem ser usados como uma técnica de RMN-DT para aplicação de triagem de alto rendimento antes do processamento.

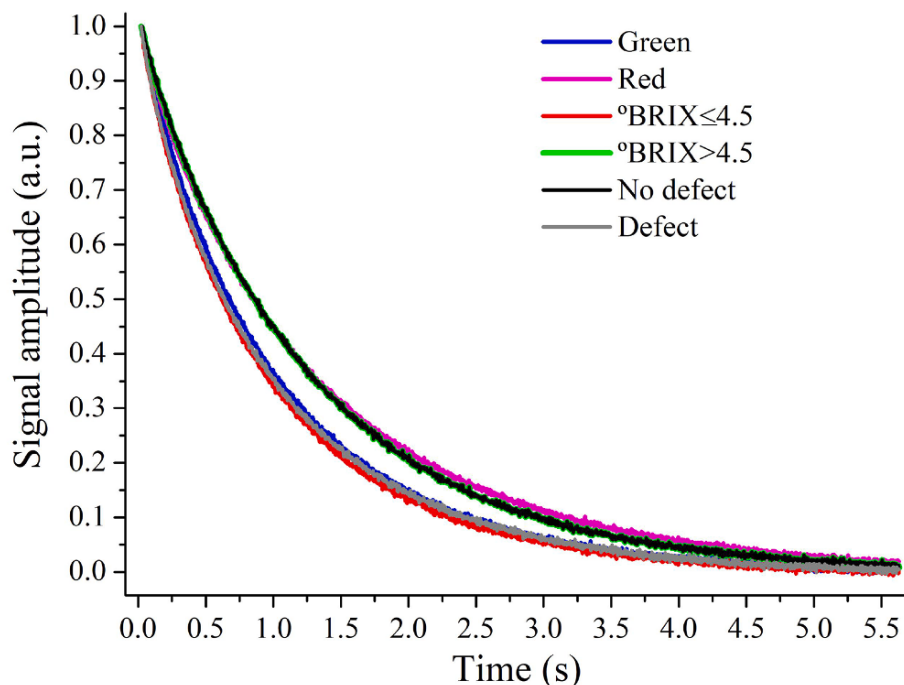
Para a realização das análises de qualidade de tomate, consideraram-se alguns parâmetros, como cor (que tem relação com o amadurecimento do fruto), teor de sólidos solúveis e defeitos relacionados ao apodrecimento e não amadurecimento dos tomates. Alguns tomates podem apresentar defeitos que podem ser classificados de leves a graves, sendo considerados defeitos leves as manchas superficiais, tomates não maduros e deformações, enquanto os defeitos graves são o apodrecimento do fruto.

Para analisar quantitativamente esses produtos foram utilizadas algumas técnicas, como relaxometria e a difusometria de RMN-DT, através do uso de instrumentos de bancada e de baixo campo. A RMN no domínio do tempo também tem sido utilizada para determinar a maturação, defeitos e qualidade de frutas e vegetais frescos, como ameixas, laranjas, mangas, bananas, nozes e pepino.

A técnica de RMN no domínio do tempo tem algumas vantagens em relação a outros métodos, como ser uma técnica não destrutiva e não invasiva que preserva a integridade da amostra, além de analisar todo o conteúdo presente na amostra e realizar medidas simples e rápidas em que não são preparadas amostras. Essa técnica, associada a algoritmos, foi usada para classificar o estado de amadurecimento do tomate, presença de defeitos e SSC dos alimentos.

Ao considerar os sinais de relaxação de RMN no domínio do tempo, a média dos sinais de CPMG foi classificada de acordo com a cor ou estado de maturação dos tomates (verde ou vermelho), conteúdo de SSC, considerando-se o grau BRIX (conteúdo de açúcar) e com ou sem defeitos. A partir dos decaimentos de CPMG foi possível concluir que tomates verdes possuem esses decaimentos mais rápidos que os tomates vermelhos que possuem baixo SSC e defeitos, como mostrado pela figura 12 a seguir:

Figura 12 - Média dos sinais de CPMG de três classes de tomate: verde, vermelho, BRIX  $\geq 4.5$  e BRIX  $>4.5$  e com ou sem defeitos.



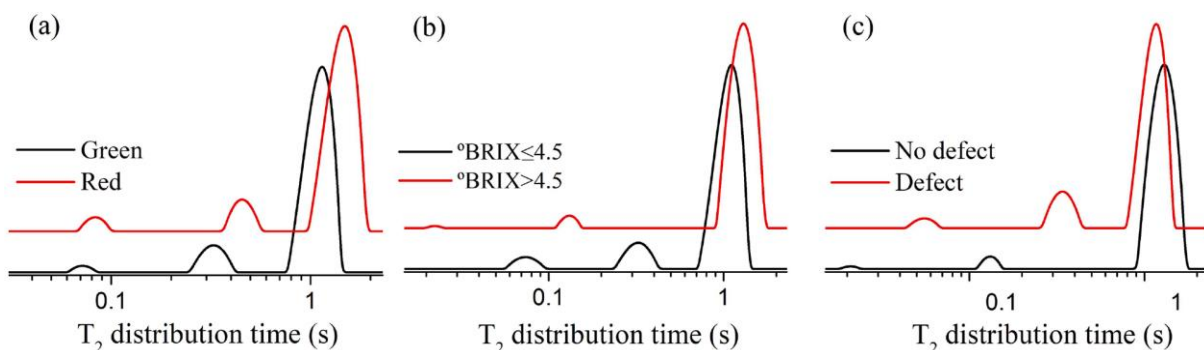
Fonte: Borba et al. (2021, p. 02). Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527200931535)

A figura 13 apresenta as distribuições de  $T_2$  obtidas pelo algoritmo ILT da média dos sinais de CPMG. As distribuições de  $T_2$  mostradas na figura 13 mostraram que os tomates são compostos por 3 tempos de relaxação ( $T_{2,1}$ ,  $T_{2,2}$  e  $T_{2,3}$ ) como é observado nas frutas.

A partir da ressonância magnética nuclear é possível concluir que todas as amostras têm um pico em  $T_{2,3}$  aproximadamente igual a 1s e que representa uma quantidade de água maior que 95% nos tomates. Esses picos foram atribuídos devido à quantidade de água nos tomates. Os outros dois picos menores são os de  $T_{2,3}$  e de  $T_{2,1}$ , sendo que  $T_{2,3}$  representaria a água presente no citoplasma e  $T_{2,1}$  a água nas paredes celulares, ambas com mobilidade mais baixa que a água livre e presente em maior quantidade. Os três valores de  $T_2$  dos tomates vermelhos são os maiores valores dentre as classes de tomates estudados, como mostrado na tabela 1 e figura 12.

A partir da tabela 1 e da figura 13, a seguir, foi possível concluir que tomates com maior Brix tem maior valor de  $T_{2,3}$  que tomates com menor Brix. (BORBA et al., 2021).

Figura 13 - Tempo de distribuição  $T_2$  dos sinais de CPMG médios obtidos de cada classe de tomate: a) verde e amarelo; b) Brix  $\leq 4.5$  e Brix  $> 4.5$ ; c) sem defeito e com defeito.



Fonte: Borba et al. (2021, p. 03). Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527200931535)

Cada um dos tempos de relaxação ( $T_{2,1}$ ,  $T_{2,2}$  e  $T_{2,3}$ ) possuem uma área característica que são mostrados na tabela 1:

Tabela 2 - Valores de  $T_2$  e a respectiva área de cada classe de tomate (maduro, SSC e com defeitos).

Classe de tomates		$T_2$ (s)	Área relativa (%)
<b>Verde</b>	$T_{2,1}$	0,072	0,3
	$T_{2,2}$	0,322	3,2
	$T_{2,3}$	1,16	96,5
<b>Vermelho</b>	$T_{2,1}$	0,083	0,4
	$T_{2,2}$	0,455	3,3
	$T_{2,3}$	1,48	96,3
<b>Brix (<math>\leq 4,5</math>)</b>	$T_{2,1}$	0,075	0,5
	$T_{2,2}$	0,322	3,4
	$T_{2,3}$	1,130	96,1
<b>Brix (<math>\geq 4,5</math>)</b>	$T_{2,1}$	0,022	0,1
	$T_{2,2}$	0,130	0,3
	$T_{2,3}$	1,290	99,6
<b>Sem defeito</b>	$T_{2,1}$	0,021	0,1
	$T_{2,2}$	0,130	0,3
	$T_{2,3}$	1,29	99,6
<b>Com defeito</b>	$T_{2,1}$	0,055	0,4
	$T_{2,2}$	0,345	4,7
	$T_{2,3}$	1,16	94,9

Fonte: BORBA, R.Karla; et.al,2021,p.03. Uso autorizado pela Editora (Licença: 5527200931535).



Outra aplicação da relaxometria por Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo na análise de produtos alimentícios é relatada no trabalho de Machado et al. (2022). No trabalho, essa técnica foi utilizada para determinar os teores de umidade, gordura e matéria seca desengordurada em queijo do tipo requeijão cremoso, diretamente em embalagens comerciais de requeijões em copos ou bisnagas de aproximadamente 200g.

As análises de  $T_1$  e de  $T_2$  foram realizadas utilizando-se pulsos únicos CWFP- $T_1$  e CPMG. Foram empregadas duas técnicas de processamento de dados em conjunto com a RMN no domínio do tempo para analisar a qualidade dos requeijões cremosos, dentre elas a análise de componentes principais (PCA) dos sinais de CWFP- $T_1$  e CPMG e otimização por seleção de preditores ordenados (OPS). Os melhores resultados foram obtidos com erros quadráticos médios de predição para massa seca desengordurada, gordura na matéria seca e úmida e umidade, respectivamente. Dessa forma, é possível concluir que dados de CWFP- $T_1$  modelados com quimiometria pode ser um método rápido para monitorar a qualidade de requeijões cremosos diretamente em embalagens comerciais.

Nesse artigo, foi investigada a mobilidade da água no requeijão cremoso caseiro com a adição de galactooligossacarídeo (GOS), utilizando a relaxometria RMN-DT, que mostrou um aumento do tempo de relaxamento transversal ( $T_2$ ) com o aumento do GOS. O requeijão caseiro cremoso com adição de xilooligossacarídeo (XOS, redução de sódio e realçadores de sabor (arginina e extrato de levedura), também foi estudado por relaxometria RMN-DT e não apresentou diferenças em  $T_2$  em amostras com teor de sal reduzido em 50% e com adição de 1% de arginina ou extrato de levedura.

No entanto, a redução nos valores de  $T_2$  foi observada em requeijões cremosos com menor teor de gordura. Essa diminuição foi associada à diminuição da mobilidade da água que se liga as proteínas. A adição de XOS em 3,3% levou a uma redução substancial nos tempos de relaxamento transversal ( $T_2$ ) e longitudinal ( $T_1$ ). Para realizar análises de relaxometria por RMN-DT em grandes amostras como em frutas frescas e oleaginosas e alimentos industrializados embalados, utilizou-se um ímã do tipo Halback de diâmetro largo, subtipos de C e H de gap largo ou ímãs unilaterais.

A relaxometria unilateral tem como deficiência ser uma técnica unilateral que tem um forte gradiente de campo magnético e apenas uma pequena parte da

amostra é analisada. Assim, a relação sinal-ruído (SNR) é muito baixa e o tempo de medição é muito maior quando comparado ao campo dos ímãs homogêneos. Nessas análises, utiliza-se a sequência de pulso Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) que é muito sensível ao erro de calibração de pulso e à falta de homogeneidade do campo magnético oscilante de radiofrequência ( $B_1$ ).

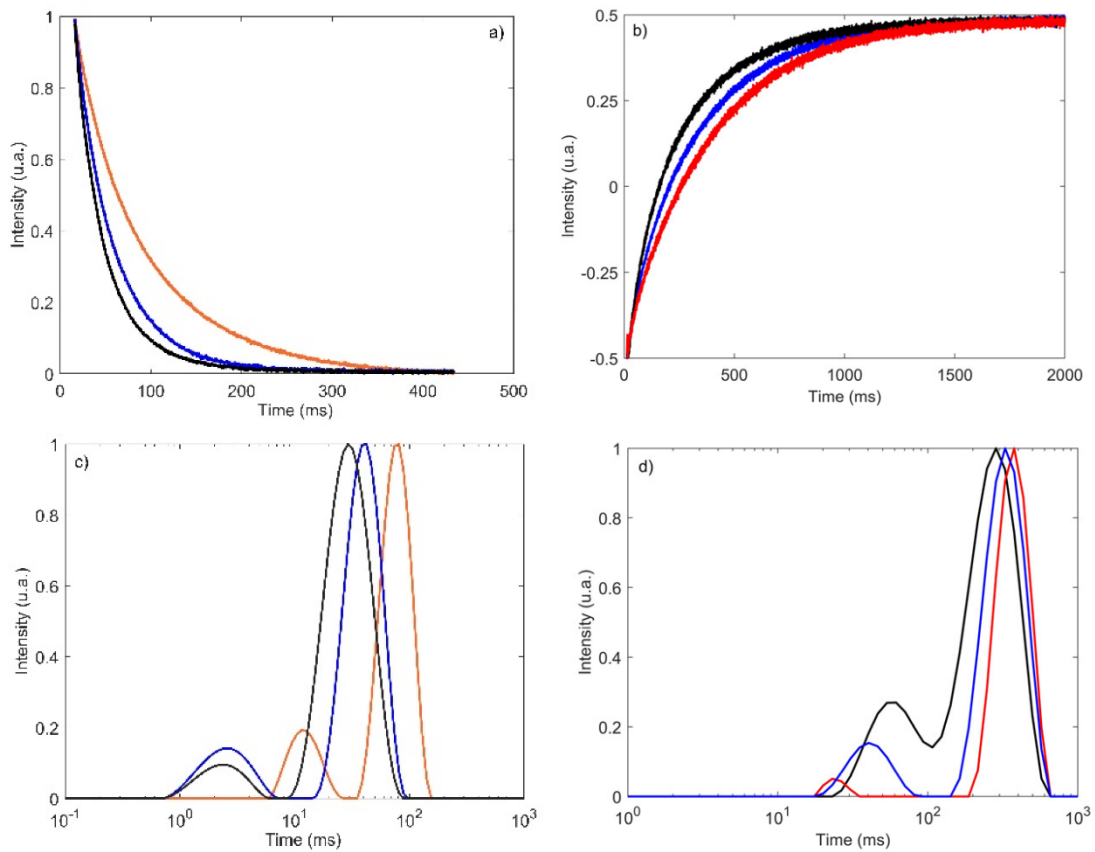
Além da sequência CPMG, a sequência de pulso explorada na análise por RMN-DT é a precessão livre de onda contínua (CWFP) em que os pulsos de radiofrequência são separados por um intervalo menor que o tempo de relaxação transversal efetivo ( $T_2^*$ ). Em sequências de sinais CWFP em que são usados pulsos de  $90^\circ$ , os sinais dessa sequência dependem dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ . Nesse estudo, foi demonstrada a viabilidade do uso de CPMG e CWFP- $T_1$  para prever teores de umidade, gordura e massa seca desengordurada em amostras comerciais de requeijão cremoso.

As análises de requeijão cremoso em RMN-DT foram avaliadas de forma não invasiva e não destrutiva diretamente na embalagem comercial original. Os experimentos de  $^1\text{H}$  de RMN-DT foram realizados em um espectrômetro SLK-IF 1399 equipado com um ímã permanente do tipo Halbach de 0,23 T e uma sonda de 100 mm. Os valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) foram determinados utilizando-se a sequência de pulsos CWFP- $T_1$  com uma largura de pulso  $\pi/2$  de 33  $\mu\text{s}$  e largura de pulso  $\pi/10$  de 4  $\mu\text{s}$ , total de 399  $\mu\text{s}$ , 3000 ecos e um tempo de repetição de 1s. Em ambas as sequências foram acumuladas 16 varreduras.

O teor de umidade em gramas de água por 10 g de requeijão cremoso foi determinado secando-se a amostra até peso constante em estufa a  $105^\circ$ . A gordura foi determinada de maneira gravimétrica após a extração de Soxhelt da matéria seca (MS) e o resíduo da extração foi considerado como a massa seca desengordurada (MSD). A porcentagem do teor foi calculada em relação à matéria seca (FMS) e úmida (FWM), respectivamente.

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada em uma avaliação preliminar para observar semelhanças e/ou diferenças entre os diferentes tipos de amostras de requeijão cremoso. Antes da análise, os dados químicos foram dimensionados automaticamente e os decaimentos RMN-DT (CPMG e CWFP- $T_1$ ) foram centrados na média. Os modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos com base na regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) para quantificar umidade, FDM, FWM e DDM em amostras de requeijão.

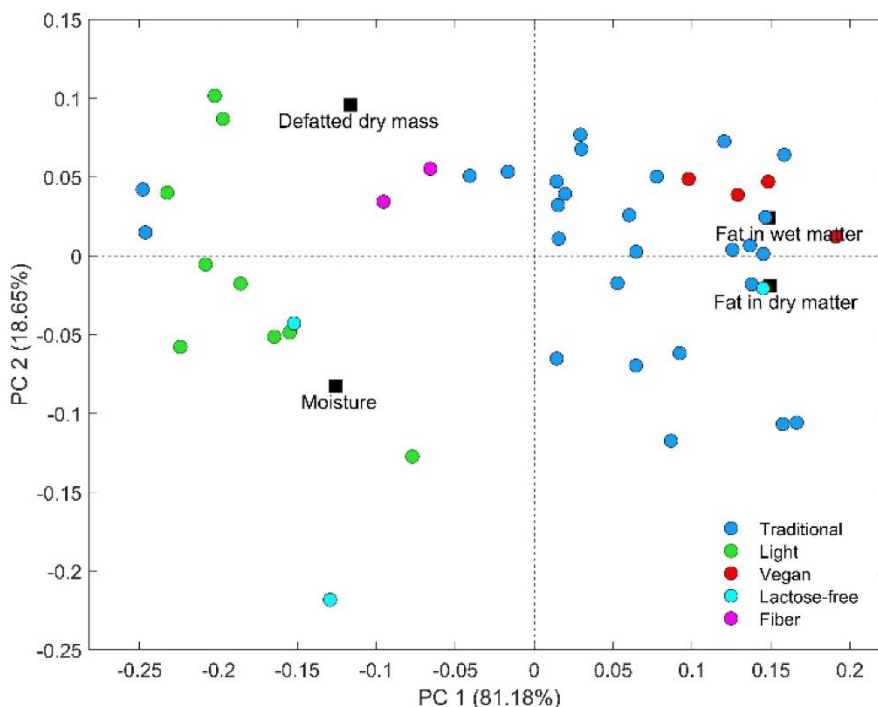
Figura 14 - a) CPMG; b) CWFP-T1 de três curvas de relaxação de requeijão cremoso simples com diferentes composições químicas e a respectiva relaxação do espectro obtido em (c e) com o algoritmo ILT.



Fonte: Machado et al. (2022, p. 04). Licença Creative Commons 4.0 – Internacional.

Segundo Machado et al. (2022) os algoritmos de regularização explícita substituem o problema do ajuste dos mínimos quadrados, como mostra a figura 15 a seguir:

Figura 15 - PCA das 45 amostras de requeijão cremoso.



Fonte: Machado et al. (2022, p. 04). Licença Creative Commons 4.0 – Internacional.

As 45 amostras de requeijão cremosos disponíveis comercialmente, sendo 27 requeijões tradicionais, 9 requeijões light, 4 veganos, 3 zero lactose e 2 fibras foram analisadas a partir da construção de uma matriz  $x$  (45x4) e os resultados foram apresentados em PCA, como mostrado pela figura 15 acima. Os dois primeiros componentes principais (PC<sub>1</sub> e PC<sub>2</sub>) explicavam 99,8% da variância total (81,2% e 18,6%, respectivamente) e proporcionaram uma ligeira separação de amostras tradicionais e veganas dos demais tipos de requeijão cremoso (light, sem lactose e fibra).

Os exames das cargas revelaram que as variáveis que mais contribuíram para essa separação foram FWM e FDM que estão posicionados positivamente em PC<sub>1</sub>. Esses resultados estão de acordo com os valores químicos que revelaram que os requeijões tradicionais e veganos possuem o maior teor de gordura em seco ( $61,4 \pm 9,3\%$  e  $67,4 \pm 3,1\%$ , respectivamente) e matéria úmida ( $23,2 \pm 4,6\%$  e  $28,1 \pm 1,7\%$ , respectivamente). (MACHADO et al., 2022).

## **2 OBJETIVOS**

Aplicar diferentes métodos de RMN no domínio do tempo (RMN-DT) em análises de amostras comerciais de molhos de tomate em embalagens plásticas, utilizando as sequências CPMG e CPMG-90 e o equipamento Espectrômetro Spinlock. Além disso, foi apresentada a revisão bibliográfica e a metodologia utilizada em cada um dos artigos utilizados na revisão.

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Amostras**

Foram utilizadas 53 amostras de molhos de tomate de diferentes marcas e sabores, dentre eles Pizza, com pedaços de manjeriço, tradicional, com pedaços de pimenta, Bolonhesa, Ervas finas, Azeitona, Encorpado, Peneirado, Extrato de tomate, Caseiro, Passata Rústica, Extrato de tomate concentrado, Premium e Light. Como em 5 produtos as embalagens continham metal em sua composição, não foi possível obter um sinal de RMN ao inserir a embalagem no Espectrômetro Spinlock. Por esse motivo, esses sachês foram substituídos por outros, totalizando 53 molhos de tomate analisados.

#### **3.2 Preparo das amostras**

Não houve qualquer preparo de amostra, pois as embalagens foram inseridas diretamente no porta amostras do equipamento, portanto não foi necessária a abertura das embalagens para a realização das análises das sequências CPMG e CPMG-90. A partir dos dados obtidos no Espectrômetro Spinlock para essas sequências foi realizada a comparação entre elas. Essas medidas e análises foram realizadas na Embrapa Instrumentação em São Carlos, e contou com o apoio do Dr. Luiz Alberto Colnago, pesquisador daquela unidade

#### **3.3 Instrumentação e técnicas utilizadas**

O equipamento utilizado para analisar os molhos de tomate foi o Espectrômetro Spinlock, que é constituído por um imã permanente com configuração Halbach com 10 cm de Bore e campo igual a 0,23 T (equivalente a 0,9 MHz para o  $H^1$ ) e uma sonda com bobina soleinodal de 1L de volume útil (Spinlock, Córdoba, Argentina). Esse sistema foi acoplado a um console transmissor receptor de RMN, Apollo (Tecmag, Houston, EUA). Para tratamento dos dados adquiridos foi utilizado o software NTNMR versão 2.3.8 (Tecmag, Houston, EUA). O equipamento utilizado está instalado na Embrapa Instrumentação São Carlos.

Além de terem sido utilizados o espectrômetro Spinlock e o software NTNMR, foi utilizado o Origin para realizar ajustes monoexponenciais e o ajuste dos dados adquiridos no Spinlock.

A técnica usada foi a análise de  $T_2$  a partir do uso das sequências CPMG e CPMG-90 no Espectrômetro Spinlock para a realização de análises quantitativas para, a partir dessas sequências, concluir como a marca e tipo de molhos de tomate interferem nas análises desses alimentos.

Os parâmetros utilizados para a sequência CPMG foram tempo de aquisição (aq) = 64  $\mu$ s, tempo de reciclagem (d1) = 5 s, tau1 = 200  $\mu$ s, tau2 = 143  $\mu$ s e número de ecos (ne) = 10.000, enquanto os parâmetros utilizados para a sequência CPMG-90 foram tempo de aquisição (aq) = 64  $\mu$ s, d1= 5 s, tau1= 200  $\mu$ s, tau2 = 156  $\mu$ s e ne = 15.000.

### **3.4 Detalhes experimentais**

Como se trata de um equipamento que não detecta o conteúdo (concentração) de molhos de tomate em embalagens comerciais que contenham metal na composição da embalagem, foram descartados 5 molhos de tomate que não apresentaram sinal para as sequências CPMG e CPMG-90 ao serem nele inseridas.

Para que o sinal fosse obtido de maneira correta foi necessário atentar-se para o modo como a amostra era inserida no respectivo compartimento, respeitando-se a linha marcada no suporte preto e com o fundo da embalagem voltado para o lado do operador do equipamento. É importante também que a amostra não esteja tombada ao ser inserida no porta-amostra para não comprometer os dados obtidos. As fotografias do equipamento em que foram inseridas as amostras estão apresentadas na figura 16 a seguir:

Figura 16 - Espectrômetro Spinlock (Flora) da Embrapa Instrumentação agropecuária: (a) visão frontal; (b) visão lateral.



Fonte: Autoria própria



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados de 5 das 53 amostras comerciais de molhos de tomate, as quais foram analisadas pelos experimentos CPMG e CPMG-90 no domínio do tempo para realizar um estudo de caso, a fim de exemplificar a aplicação dessas sequências para analisar a qualidade dos molhos de tomate em embalagens comerciais plásticas.

### 4.1 Análises por RMN-DT: CPMG

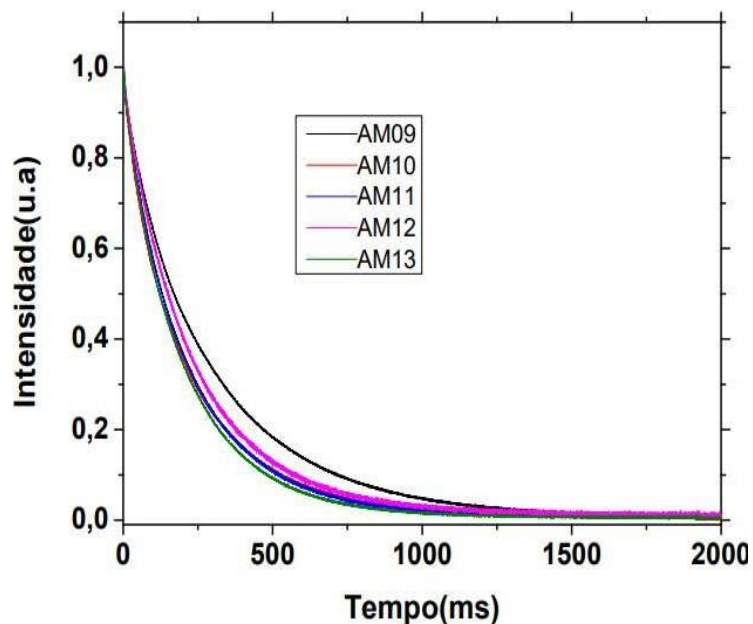
Na figura 17 foram representados os sinais de RMN para a sequência CPMG sem suporte durante a análise relativo ao  $T_2$  das amostras embaladas obtidas através do Espectrômetro Spinlock 8 MHZ para exemplificar o uso e eficiência da sequência CPMG na análise dos molhos de tomate.

Tabela 3 - Molhos de tomate e seus respectivos tipos.

<b>Amostra</b>	<b>Valor de <math>T_2</math></b>
AM 09	Tradicional
AM 10	Bolonhesa
AM 11	Manjericão
AM 12	Base de tomate
AM 13	Tradicional

Fonte: autoria própria.

Figura 17 - Curvas de decaimento do sinal de RMN obtidos com a sequência CPMG para amostras de molho de tomate



Na figura 17, são apresentadas as curvas obtidas do experimento CPMG para as amostras AM09, AM10, AM11, AM12 e AM13. O ajuste monoexponencial destas curvas possibilitou a determinação dos valores de  $T_2$  que serão apresentados na tabela 3:

Tabela 4 - Amostras de molhos de tomate e os respectivos valores de  $T_2$  para a sequência CPMG com ajuste monoexponencial.

Amostra	Valor de $T_2$ (ms)
AM 09	292
AM 10	217
AM 11	214
AM 12	232
AM 13	200

Fonte: autoria própria.

É conhecido que o valor de  $T_2$  tem uma dependência inversamente proporcional com a viscosidade, portanto, quanto menor a viscosidade maior o valor de  $T_2$ . A viscosidade, por sua vez, está relacionada com a mobilidade das moléculas, sendo menor para moléculas menores. Dessa forma, uma maior quantidade de

moléculas pequenas, como água, podem deixar a amostra mais fluída, portanto, com menor viscosidade.

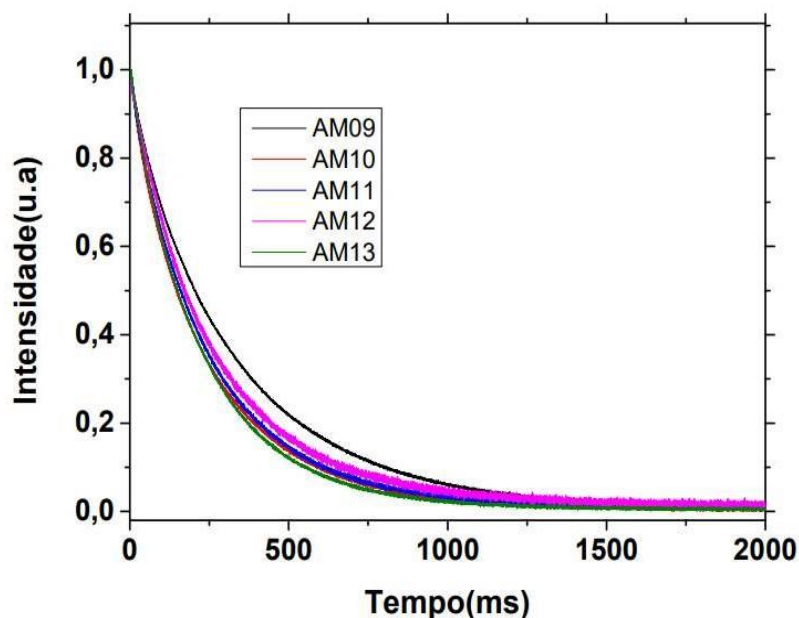
A partir dos valores de  $T_2$  apresentados na tabela 3 é possível explorar os valores de  $T_2$  em função da viscosidade do molho de tomate, sendo que quanto mais viscoso o molho de tomate, menor o valor de  $T_2$ . Como a viscosidade está relacionada com a quantidade de água é possível avaliar essa relação, em que quanto maior o teor de água menor será a viscosidade. Neste contexto, a amostra 09 deve ter uma maior quantidade de água (portanto, mais fluída) que a amostra 13, e isso justifica o maior valor de  $T_2$  dessa amostra, que são de diferentes marcas, mas de mesmo tipo, ou seja, o tradicional. Como a quantidade de água é um dos parâmetros a ser considerado ao analisar a qualidade dos molhos de tomate, ou seja, quanto maior a quantidade de água presente na composição de um produto, pior a qualidade dele, conclui-se que a amostra 09 é de pior qualidade que a amostra 13. Os molhos de tomate do tipo manjericão e bolonhesa possuem tempos de relaxação mais baixos também, indicando que possuem uma maior viscosidade, podendo conter uma menor quantidade de água. Já a amostra 12, cujo molho é classificado como molho de tomate base possui um tempo de relaxação intermediário, possuindo um teor de água intermediário.

Com esse raciocínio, podemos propor que, de acordo com a tabela 3, a ordem crescente de viscosidade para a sequência CPMG é: AM13 < AM11 < AM12 = AM10 < AM09.

#### **4.2 Análises por RMN-DT: CPMG-90**

Foram utilizadas as mesmas amostras AM09, AM10, AM11, AM12 e AM13 para a obtenção dos sinais de RMN da sequência CPMG-90, mantendo-se as mesmas condições experimentais que as utilizadas para a análise CPMG.

Figura 18 - Curvas de decaimento do sinal de RMN obtidos com a sequência CPMG-90 para amostras de molhos de tomate.



Fonte: Autoria própria

Tabela 5 - Molhos de tomate e seus respectivos valores de  $T_2$  para a sequência CPMG-90, obtidos com ajuste monoexponencial das curvas de decaimento.

Amostra	Valor de $T_2$ (ms)
AM 09	329
AM 10	244
AM 11	250
AM 12	265
AM 13	229

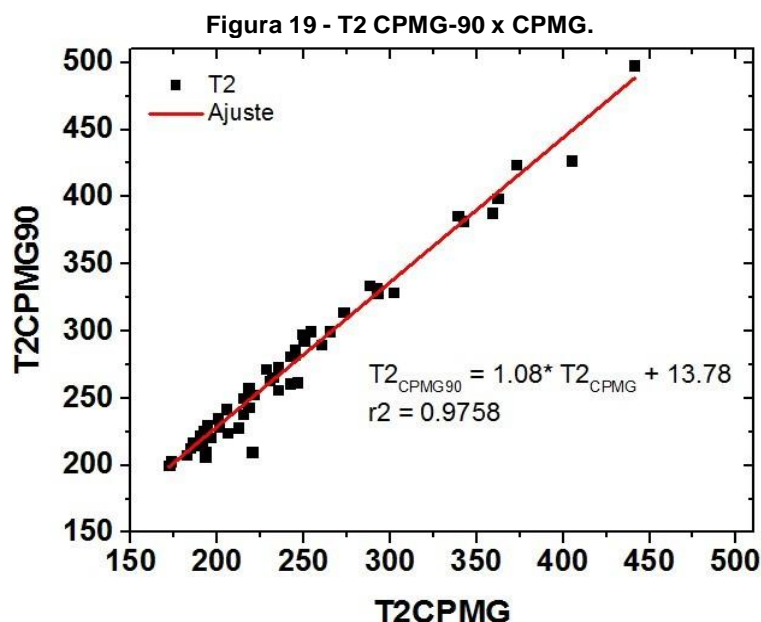
Fonte: autoria própria.

A partir dos dados apresentados na tabela 4 e na figura 18 foi possível concluir que a ordem crescente de viscosidade para os 5 molhos de tomate para a sequência CPMG-90 é: AM13 < AM10 = AM11 < AM12 < AM09, considerando-se o tempo de decaimento. A amostra 09 possui o maior tempo de decaimento se comparado às demais amostras. Os tempos obtidos a partir da sequência CPMG-90 são maiores que os obtidos pelos sinais de CPMG convencional apresentados na seção anterior, como já era esperado para essa sequência, porém, segue a mesma tendência observada com a sequência de pulsos avaliada anteriormente.

Como a viscosidade é um parâmetro que está relacionado à maior mobilidade das moléculas, ao tamanho delas e à quantidade de água, ao considerar a amostra 10, que é de um molho de tomate sabor Bolonhesa, espera-se que pelo fato desse molho possuir carne em sua composição leva a um aumento na viscosidade e conseqüentemente a um menor valor de  $T_2$ , devido a menor quantidade de água presente, e conseqüentemente, à maior viscosidade.

## 5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DAS DUAS SEQUÊNCIAS DE PULSOS PARA OUTRAS AMOSTRAS

Com base nos dados de CPMG-90 da figura 19, observou-se que há uma alta correlação ( $r=0,9758$ ) dessa sequência com a sequência CPMG.



Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os dados obtidos para as sequências CPMG e CPMG-90, concluiu-se que os sinais de CPMG e CPMG-90 possuem um decaimento bem diferente entre as amostras, mesmo quando são comparados molhos de tomate que pertencem a um mesmo grupo, como observado pelo tempo de decaimento das figuras 17 e 18.

A sequência CPMG-90 foi utilizada, pois ela gasta  $\frac{1}{4}$  da potência gasta pela sequência CPMG, e conseqüentemente, há um gasto menor de energia quando é utilizada essa sequência, assim o equipamento aquece menos, alcançando uma vida útil maior e uma economia com gastos relacionados a manutenção do equipamento.

Outra característica que distingue as sequências CPMG e CPMG-90 é a presença da componente  $T_1$ , além da  $T_2$ , ao ser utilizada a sequência CPMG-90, assim além de ser medido o  $T_2$  também é medido  $T_1$  quando é utilizada essa sequência. Isso ocorre porque possivelmente a homogeneidade do campo ( $\Delta B_0$ ) e o

tempo de espera entre os pulsos ( $\tau$ ) são elevados, ou porque algum desses parâmetros possui um valor elevado. Dessa forma, o sinal obtido pela sequência  $T_2$  levará a um sinal com um maior decaimento de  $T_2$  se comparado a sequência CPMG.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

É possível concluir que a técnica de RMN-DT foi uma técnica eficiente na estimativa da viscosidade das amostras analisadas, estando diretamente relacionada com o conteúdo de água das amostras, sendo que uma maior quantidade de água pode estar relacionada com uma pior qualidade dos molhos de tomate. Dessa forma, maior será o valor obtido para o tempo de relaxação ( $T_2$ ) a partir das sequências CPMG e CPMG-90, adquiridos pelo equipamento espectrômetro Spinlock.

Futuramente será interessante utilizar outros parâmetros, sequências de pulsos e equipamentos, além desses especificados, para que possa ser concluído como as diferentes marcas e tipos de molhos interferem na qualidade dos produtos analisados, considerando-se a relaxação transversal ( $T_2$ ).

De acordo com a legislação do controle de qualidade para os molhos de tomate, deve-se considerar alguns parâmetros ao avaliá-lo. Tratam-se dos parâmetros físico-químicos de controle de qualidade, que são: sólidos solúveis, pH, acidez titulável (AT), cloreto de sódio, consistência, densidade e cor. (BAIER; CATTELAN, 2020).

Assim, pretende-se realizar análises físico-químicas, tais como: teor de umidade, proteínas e gorduras, além do BRICS, que é utilizado para detectar a quantidade de sólidos solúveis presentes nos molhos juntamente com os dados contidos nesse TCC para que seja possível concluir sobre a qualidade desses produtos analisados, e correlacioná-los com as análises por RMN-DT, avaliando-se assim o potencial dessa técnica.



## REFERÊNCIAS

ANDRADE, F. D. **Desenvolvimento de seqüências de pulso de eco de spin de baixa potência para RMN *on-line***. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-06072011-163715/pt-br.php>; Acesso em 12 fev. 2023.

ANDRADE, F. D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L. A. Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell/Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles. **Talanta (Oxford)**, v. 84, p. 84-88, 2011.

ANDRADE, F. D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L. A. Use of Carr-Purcell pulse sequence with low refocusing flip angle to measure T1 and T2 in a single experiment. **Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. 1997: Print)**, v. 214, p. 184-188, 2012.

AZEREDO, R. B. V. et al. Continuous wave free precession - Practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n. 2, p. 313-320, 2003.

BAIER, M. E.; CATTELAN, M. G. Influência de parâmetros físico-químicos e microbiológicos no controle de qualidade de molho de tomate refogado e catchup: uma revisão bibliográfica. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2020. Disponível em: <https://revistas.unilago.edu.br/index.php/revista-cientifica/article/view/380>. Acesso em: 01 abr. 2023.

BIZZANI, M. et al. Non-invasive detection of internal flesh breakdown in intact Palmer mangoes using time domain nuclear magnetic resonance relaxometry. **Microchemical journal**, v.158, p. 01-04, 2020. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X20317136>. Access in: jan. 26, 2023.

BORBA, L. K. et al. Selection of industrial tomatoes using TD-NMR data and computational classification methods. **Applied Science**, v.11, n.3209, p.01-03, 2021. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X21001338?via%3Dihub>. Access in: feb, 01, 2023.

CARR, H. Y.; PURCELL E.M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. **Physical Review**. V.94, p. 630-38, 1954. Available in: <https://journals.aps.org/pr/abstract/10.1103/PhysRev.94.630>. Access in: feb. 14, 2023.

COLNAGO, L. A. et al. Low field, time domain NMR in the agriculture and agrifood setors: An overview of application in plants, foods and biofuels. **Journal of Magnetic Ressonance**, v.323, n.106899, p. 2020. Available in:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090780720302172>. Access in: feb. 11, 2023.

COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D. de. RMN no domínio do tempo: fundamentos e aplicações offline e online, p. 439 -470. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

D'AMICO, R. et al. On the use of the Lorentzian function for the evaluation of the frequency averaged input power into plates. **Proceedings of ISMA**, p. 1747-1760, 2012. Available in: [https://past.isma-isaac.be/downloads/isma2012/papers/isma2012\\_0808.pdf](https://past.isma-isaac.be/downloads/isma2012/papers/isma2012_0808.pdf). Access in: já., 16, 2023.

HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, v.80, p. 580-594, 1950. Available in: <https://journals.aps.org/pr/abstract/10.1103/PhysRev.80.580>. Access in: feb., 13, 2023.

MACHADO, G. O et al. Non-Invasive Method to Predict the Composition of Requeijão Cremoso Directly in Commercial Packages Using Time Domain NMR Relaxometry and Chemometrics. **MDPI Molecules**, v.27, n.4434, p. 01-05, 2022. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35889306/>. Access in 07 fev.2023.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. **Review of Scientific Instruments**. v.29, p. 688-691, 1958. Available in: <https://www.semanticscholar.org/paper/Modified-Spin%E2%80%90Echo-Method-for-Measuring-Nuclear-Meiboom-Gill/087d3b45c4d528d7f13f16f79710ffcb13ed295f>. Access in: 07 feb. 2023.

MORAES, B. T.; COLNAGO, L. A. Noninvasive analyses of food products using low-field time- domain NMR: A review of relaxometry methods. **Brazilian Journal of Physics**, v.323, p. 01-06, 2022. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13538-022-01055-1>. Access in: jan. 15, 2023.

NASCIMENTO, C. **Ressonância magnética nuclear**. São Paulo: Blucher, 2016.

VENANCIO, T. et al. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**. v. 173, n. 1, p. 34-39, 2005.

WIKIMEDIA COMMONS. File:Nmr fid good shim.svg. 2020. Available in: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nmr\\_fid\\_good\\_shim.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nmr_fid_good_shim.svg). Access in: feb. 10, 2023.