

CIRCULAR TÉCNICA

ISSN 1413-9545
dezembro, 1996

Número 3/96

ANÁLISE DO TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES POR RMN

Luiz Alberto Colnago



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (016) 274 2477 - Fax: (016) 272 5958

ANÁLISE DO TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES POR RMN.

Luiz Alberto Colnago¹

Introdução

O conhecimento do teor de óleo em sementes e grãos é indispensável para procedimentos de seleção genética de variedades de milho, soja, amendoim etc., com alto teor de óleo, para se conhecer o potencial de produção dos grãos em agroindústrias de refinamento de óleo, para avaliar o valor energético dos alimentos, entre outros usos. A metodologia clássica de determinação do teor de óleo em sementes e grãos consiste em secá-los até peso constante, moagem até pó bem fino, extração exaustiva com solventes orgânicos em extratores soxhlet e evaporação do solvente até peso constante. Nesse método, o óleo é considerado como o material solúvel no solvente e não apenas os triglicerídeos. Esse é um processo demorado e que destrói as amostras analisadas.

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido um método alternativo a essa medida, apresentando as seguintes vantagens: rapidez da análise (segundos), não destrói a amostra (a análise pode ser repetida na mesma amostra), não precisa de preparação sofisticada, o que pode prescindir o uso de produtos químicos adicionais, as análises podem ser realizadas em tecidos vegetais "in vivo" (o que permite usar as próprias sementes analisadas em projetos de melhoramento genético) e os resultados da análise podem ser coletados, processados e armazenados diretamente em microcomputador.

¹ Farmacêutico - Embrapa Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento da Instrumentação Agropecuária. CNPDIA, São Carlos SP, CP741, CEP 13560-970

As análises quantitativas do teor de óleo em sementes por RMN começaram na década de 60, com os aparelhos de onda contínua, que analisam o teor de óleo em sementes em alguns minutos. Esse tempo de análise foi reduzido a alguns milissegundos com a introdução dos aparelhos pulsados, que são os mais usados hoje em dia.

Esta circular contém as informações básicas necessárias aos usuários da técnica de RMN para que possam entender os princípios e as principais fontes de erros a que estão sujeitas essas análises do teor de óleo em sementes.

Princípios de RMN

A RMN é um fenômeno que pode ser observado com qualquer isótopo que contém o spin total $I > 0$. Isso só não ocorre para isótopos com número par de prótons e nêutrons, como o C^{12} e o O^{16} , por exemplo. Os isótopos que contêm número ímpar de prótons e/ou nêutrons podem ser observados, e a maioria dos elementos tem pelo menos um isótopo com essa configuração. O mais usado é o de hidrogênio (H^1), por ter alta sensibilidade e abundância natural. O hidrogênio, por exemplo, é usado para medir o teor de óleo, neste trabalho. Alguns outros exemplos de isótopos de interesse agropecuário são o C^{13} , N^{14} , N^{15} , O^{17} , F^{19} , Al^{27} e P^{31} .

O fenômeno de RMN ocorre quando se coloca a amostra em um campo magnético B_0 e os spins nucleares passam a precessionar em torno da direção desse campo (fig. 1) com uma frequência angular ω_0 (frequência de Larmor). A precessão é um movimento igual ao observado em um pião. Assim como o pião, o spin nuclear tem um movimento de rotação em torno do seu próprio eixo e um movimento de menor frequência em torno da direção do campo magnético, que é o movimento de precessão. A frequência de precessão dos núcleos é proporcional ao campo magnético B_0 e à razão giromagnética γ ($\omega = \gamma B_0$), onde γ é uma

constante para cada isótopo. A condição de ressonância ocorre quando se aplica uma frequência igual à frequência de precessão do núcleo, e por ressonância os spins absorvem energia.

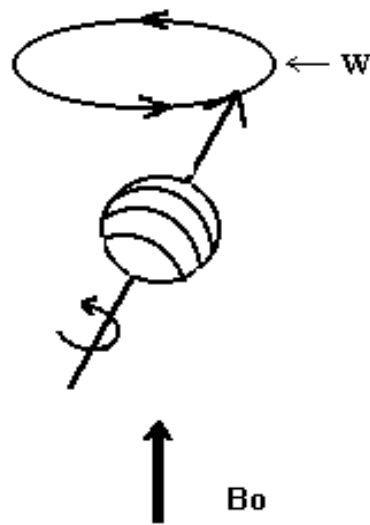


Figura 1. Diagrama do movimento de precessão do spin em torno do campo magnético B_0 .

Nos espectrômetros pulsados, satisfaz-se a condição de RMN com a aplicação de um pulso de curta duração e alta potência na região da frequência de precessão (ω). O pulso gera uma banda em torno da frequência aplicada, que excita automaticamente toda a região espectral a ser analisada. Após o pulso, os spins excitados retornam ao estado fundamental, induzindo um sinal conhecido como FID (Free Induction Decay), que contém todas as frequências espectrais sobrepostas. O FID (fig.2) é o sinal da variação de amplitude do sinal de RMN em função do tempo.

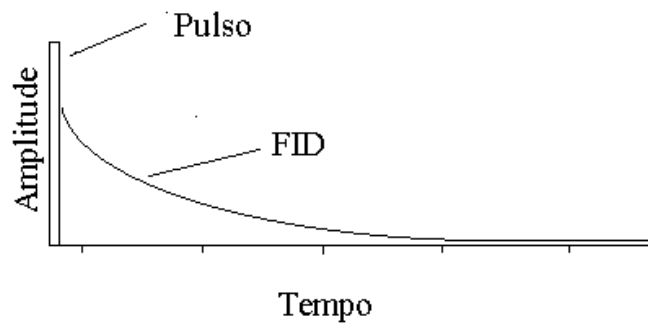


Figura 2. Espectro de RMN (FID) obtido com espectrômetro pulsado.

A técnica de pulso conta, também, com a seqüência de eco de spin para obter o sinal de RMN (fig.3). Essa técnica consiste de dois pulsos (um de 90 graus e um de 180 graus), separados por um intervalo de tempo τ . Nessa técnica aparece um FID após o primeiro pulso, e ocorre um eco do sinal de RMN após o segundo pulso, a um tempo igual à separação entre os pulsos.

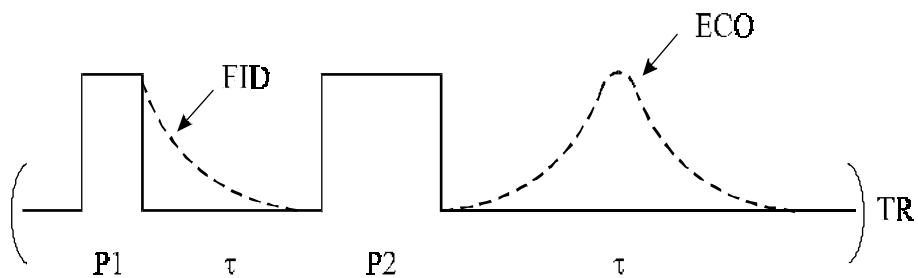


Figura 3. Seqüência de pulsos da técnica de spin-eco com P1, o primeiro pulso (90 graus), P2, o segundo pulso (180 graus), τ , o intervalo entre pulsos e TR, o tempo de repetição da seqüência de pulsos. O sinal após P1 é o FID e após P2 é o eco.

Tanto a intensidade do FID quanto a do eco são proporcionais à concentração de hidrogênio da amostra e podem ser usadas na determinação do teor de óleo em sementes.

Análise do teor de óleo

As análises quantitativas com os espectrômetros de RMN pulsados se baseiam na correlação que existe entre a intensidade do sinal do FID ou eco e a concentração do produto a ser analisado. Como a RMN é uma técnica comparativa, é necessário fazer uma calibração entre a intensidade do sinal de RMN e a concentração de amostras padrões. Com a curva de calibração (assim como em outros métodos analíticos), obtém-se a concentração de uma substância em uma amostra desconhecida somente com a medida da intensidade do seu sinal de RMN.

No caso de se determinar a presença de um dos componentes de uma amostra heterogênea, como a do teor de óleo em sementes, usam-se as diferenças de tempo de relaxação entre os vários constituintes da amostra que contém hidrogênio, para que se obtenha somente a intensidade do sinal do óleo. Na fig.4 tem-se um diagrama de como usar as diferenças de tempo de relaxação para separar o sinal do óleo dos outros principais constituintes das sementes que contêm hidrogênio, que são as proteínas, os carboidratos e a água.

Os sinais dos materiais sólidos (proteínas e carboidratos) ou de baixa mobilidade, como a água de hidratação, que têm tempo de relaxação (representado por T_2) curto, decaem rapidamente (alguns microssegundos), enquanto que os da água livre e óleo, que têm T_2 longo, decaem mais lentamente (alguns milissegundos). Essas diferenças podem ser observadas na fig.4. Assim, para analisar os componentes líquidos mede-se a intensidade do FID ou eco após o completo decaimento do sinal dos sólidos. Pode-se, também, eliminar o sinal da água secando-se completamente as sementes ou com desidratação parcial em

torno de 5% de umidade, onde o tempo de relaxação da água é bem mais curto que o do óleo. Com isso, só o óleo contribui para o sinal de RMN após alguns milissegundos.

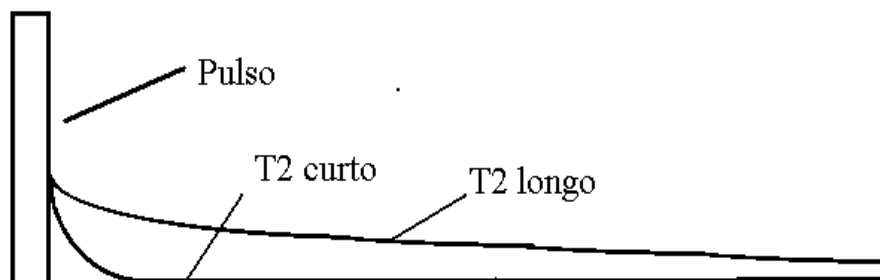


Figura 4. Decaimento do sinal de RMN com T_2 curto, como de proteínas, carboidratos e água de hidratação, e decaimento com T_2 mais longo, como água livre e óleo em sementes.

Um eco típico do óleo em sementes de soja obtido no espectrômetro desenvolvido está na fig.5. Esse sinal é registrado pelo computador após o segundo pulso (fig.3), a aproximadamente 3 milissegundos.

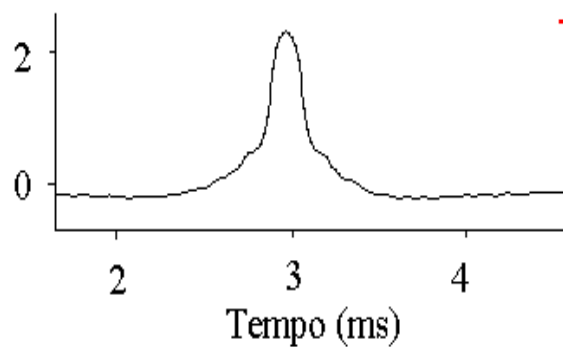


Figura 5. Sinal de RMN (eco) de uma semente de soja, com a amplitude expressa em unidade arbitrária.

Para determinar o teor de óleo das sementes por RMN é preciso fazer uma curva de calibração entre a intensidade do sinal de RMN (eco) e o teor de óleo de amostras padrões.

Na fig. 6 foi montada uma curva de calibração (procedimento 1, do item IV) com 5 amostras de soja, retiradas de lote de sementes cujo teor de óleo foi determinado pelo método de soxhlet. Com essa curva de calibração, que deve ser obtida em todos os períodos de análise, pode-se determinar a quantidade de óleo nas sementes somente com a medida da amplitude do seu sinal de RMN (procedimentos 2 e 3).

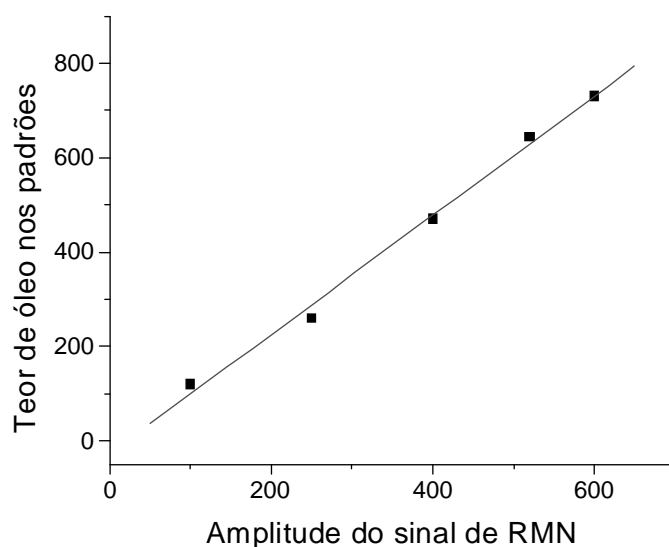


Figura 6. Curva de calibração entre o sinal de RMN e o teor de óleo em sementes (mg).

Para se saber o teor de óleo nas sementes analisadas é preciso calcular a porcentagem do óleo determinado pela medida de RMN com o peso da amostra usada. No espectrômetro desenvolvido, todos esses procedimentos são realizados

automaticamente e o operador tem que inserir somente os teores de óleos das amostras padrões e os pesos das amostras a serem analisadas, uma vez que o software realiza todos os cálculos.

Esses mesmos procedimentos são usados para determinar o teor de umidade em alimentos, a razão sólido-líquido em margarinas, entre muitas outras aplicações. O uso de RMN de baixa resolução em laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade deverá se expandir com a capacitação dos usuários e a disponibilidade desses equipamentos, uma vez que é uma técnica não-destrutiva, rápida, quase sem preparo prévio da amostra e com todas as facilidades de ser assistida por computadores, que permitem a redução de erros e direto arquivamento dos dados.

O espectrômetro de RMN pulsado

Para entender as possíveis fontes de erros de operação é apresentada a descrição do funcionamento de um espectrômetro pulsado. Os espectrômetros de RMN são constituídos, basicamente, de um ímã, um transmissor, uma sonda e um receptor (fig.7).

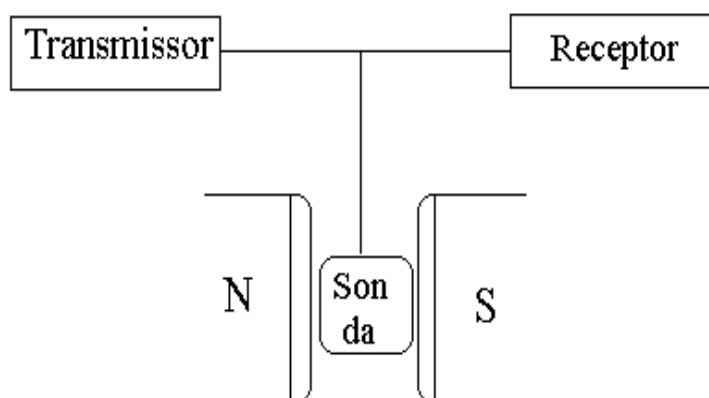


Figura 7. Diagrama em bloco simplificado de um espectrômetro de RMN.

O ímã tem a função de determinar a frequência de precessão dos spins e, conseqüentemente, a frequência de ressonância do aparelho. Nos espectrômetros de baixo campo, para a análise quantitativa do teor de óleo são usados ímãs permanentes construídos com Alnico V ou ímãs de terras raras (SmCo, Ni-Fe-B). Os campos magnéticos (B) usados variam de 0,06 a 0,9 Tesla, que correspondem a uma frequência de ressonância para o H¹ de 2,5 a 40 MHz. O aparelho de RMN desenvolvido pela EMBRAPA-CNPDIa usa um ímã de aproximadamente 0,23 Tesla, com a frequência de ressonância em 10 MHz. Esses ímãs são altamente sensíveis à temperatura e por isso são mantidos aquecidos à temperatura em torno de 35 graus, com bom isolamento térmico, e devem ser instalados em salas climatizadas, com pouca variação de temperatura. A variação da temperatura do ímã causa a instabilidade do sinal do aparelho de RMN, o que pode levar a resultados errôneos e à repetição da curva de calibração a curto intervalo de tempo.

O transmissor tem a função de emitir a frequência de rádio, que entra em ressonância com os spins em precessão. Os principais cuidados que se deve ter com o transmissor são: usar uma largura do pulso (Tp) curta o suficiente para excitar linearmente toda a região espectral de interesse. Para isso o tempo de duração do pulso tem de ser bem menor que o inverso da largura da região a ser irradiada. Outro cuidado é não repetir o pulso rapidamente, pois isso pode saturar o sinal e originar erro de intensidade.

A sonda é onde as ondas de rádio vindas do transmissor são convertidas em campo magnético oscilante para a indução das transições dos spins nucleares da amostra. A sonda, também, é o sensor que capta o sinal de RMN; por isso, deve estar bem sintonizada e casada com o receptor e transmissor e deve-se tomar cuidado para não usar volume de amostra maior que o volume da bobina detectora.

O receptor tem a função de amplificar e detectar o sinal vindo da sonda. Esse sinal é, então, armazenado e processado em

computador. O principal cuidado que se deve tomar com o receptor é: que o ganho seja suficiente para que se tenha a maior intensidade de sinal sem atingir o fundo de escala do conversor analógico digital. Além disso, a análise por RMN está sujeita a erros devido ao operador, como erros de pesagens, determinação incorreta das concentrações das amostras padrões, entre outros.

Na fig.8 tem-se uma foto do aparelho de RMN desenvolvido pelo CNPDIA e na fig.9 a primeira tela do programa, com os módulos de aquisição, programador de pulsos, filtros, sintetizador e análise. Também contém a tela com um eco, na parte superior à esquerda, e a transformada de Fourier, na tela inferior, bem como os principais parâmetros de controle do espectrômetro.



Figura 8. Foto do espectrômetro pulsado para análise quantitativa.

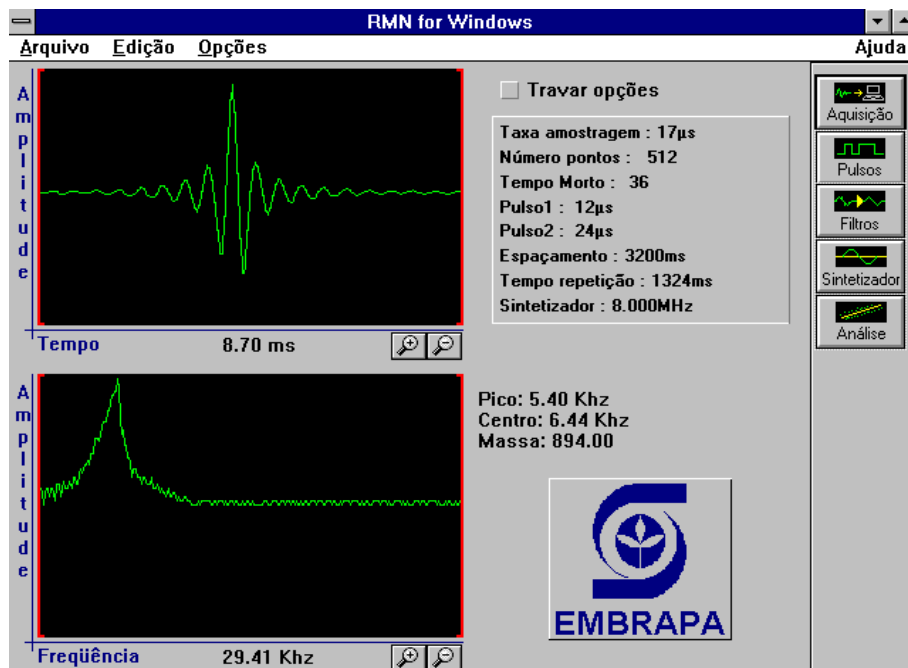


Figura 9. Tela de entrada do espectrômetro de RMN desenvolvido pela EMBRAPA-CNPDIA.

Procedimentos para análise do teor de óleo no espectrômetro de RMN desenvolvido na EMBRAPA-CNPDIA

Procedimento 1- Preparação dos padrões para determinação do teor de óleo por RMN:

- 1- Utilizar, se possível, diferentes variedades da mesma espécie, com diferentes teores de óleo;
- 2- Secar as sementes em estufa a 105 graus centígrados por 24 horas;

- 3- Determinar o teor de óleo por extração com soxhlet, o método oficial da International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC);
- 4- Preparar pelo menos 5 amostras com diferentes quantidade de óleo para montar a curva de calibração;
- 5- Calcular para cada uma das amostras padrões o teor de óleo. Esse dado entra no computador do aparelho para fazer a curva de calibração;
- 6- O volume das sementes pode variar da metade até o volume total da bobina receptora;
- 7- Colocar cada amostra padrão no aparelho. Digitar na janela do módulo de "calibração" a quantidade de óleo presente na amostra. Repetir essa operação até que todas as amostras padrões sejam analisadas e
- 8- A curva de calibração para 5 amostras tem que ter um coeficiente de variação melhor que 0,97 para ser usada nas análises. Caso contrário, repetir a calibração e verificar possíveis fontes de erro.

Procedimento 2- Preparação de grãos para análise do teor de óleo (grãos secos):

- 1- Secar as sementes em estufa por 24 horas;
- 2- Pesar um certo volume de sementes entre a metade do volume até o volume máximo da sonda;
- 3- Colocar a amostra no aparelho e fazer a análise, no módulo de análise, usando a curva de calibração recentemente preparada (procedimento 1);
- 4- Após o aparelho completar a análise, inserir o peso da amostra para que o computador calcule a porcentagem de óleo nas sementes e
- 5- Para realizar a análise de outras sementes basta repetir este procedimento nas etapas de 2 a 4.

Procedimento 3- Preparação de sementes para análise do teor de óleo com retenção do poder germinativo (sementes parcialmente desidratadas):

- 1- Preparar as amostras padrões como no procedimento 1, sem secar as sementes a 105 graus centígrados (item 2 do procedimento 1). As sementes a serem usadas como padrões e as serem analisadas devem ser desidratadas em câmara seca ou dessecador, até um teor de umidade entre 5 e 10% e
- 2- Analisar as sementes de acordo com os itens 2 a 4 do procedimento de análise do teor de óleo (procedimento 2).

Referências bibliográficas.

BELTON, P.S.; DELGADILLO, I.; GIL, A.M.; WEBB, G.A., ed. **Magnetic resonance in food science**. London: The Royal Chemistry Society, 1995.

BROSIO, E.; DI NOLA, A. Pulsed low-resolution NMR: an analytical tool in food science. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v.1, n.5, p.284-288, 1982.

COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). In: CRESTANA, S.; CRUVINEL, P.E.; MASCARENHAS, S.; BISCEGLI, C.I.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A., ed. **Instrumentação agropecuária: contribuições no limiar do novo século**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. Cap.1, p.15-50.