

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ULTRARRÁPIDA:
IMPLEMENTAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES**

Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

Q3r

Queiroz Júnior, Luiz Henrique Keng.

Ressonância magnética nuclear ultrarrápida :
implementação, desenvolvimento e aplicações / Luiz
Henrique Keng Queiroz Júnior. -- São Carlos : UFSCar,
2011.

156 f.

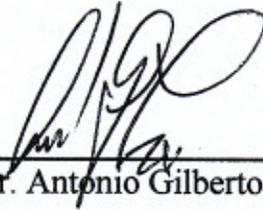
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Química orgânica. 2. Ressonância magnética nuclear
ultrarrápida. 3. CLAE-RMN. 4. Algoritmo de processamento.
I. Título.

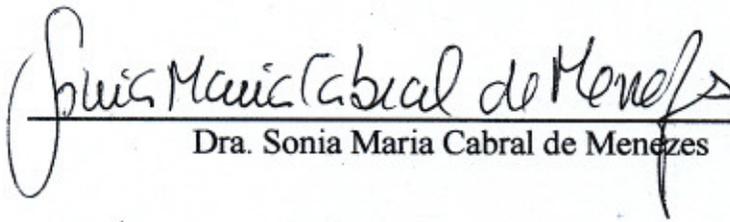
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

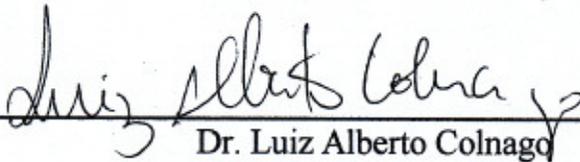
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior**, realizada em 24 de novembro de 2011:*



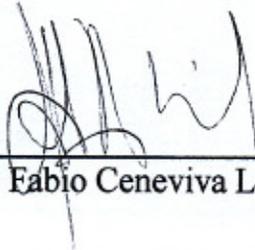
Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



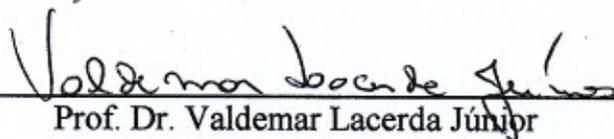
Dra. Sonia Maria Cabral de Menezes



Dr. Luiz Alberto Colnago



Prof. Dr. Fabio Ceneviva Lacerda Almeida



Prof. Dr. Valdemar Lacerda Júnior

Dedico este trabalho
aos meus pais, Sebastião (*In memoriam*) e Maria Tereza,
e à minha esposa Darlene.

A sabedoria é árvore que dá vida a quem a abraça; quem a ela se apegar será abençoado. (Provérbios 3:18)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amar e me conceder forças, ânimo e esta grande oportunidade.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pela orientação, confiança, incentivo e ensinamentos, que foram de suma importância para o aprimoramento de minha formação científica e profissional.

Ao Dr. Patrick Giraudeau, por seu apoio fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Por fornecer sequências de pulsos, automações e ter aberto as portas do seu laboratório na “Université de Nantes”, momento este em que pude aprender um pouco mais a respeito dos fundamentos básicos requeridos para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Herrera Fernández, por ter aberto as portas do seu laboratório na “Universidad Complutense de Madrid”, quando pude adquirir maior conhecimento a respeito da metodologia ultrarrápida. Estendo ainda meus agradecimentos a toda sua equipe técnica e alunos, em especial a Zulay, Lola e Marién, que me apoiaram e ajudaram em todos os instantes que precisei.

Ao Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, pelas ricas discussões, conselhos e ensinamentos, e por sua pronta solicitude nas diversas vezes que precisei de sua ajuda.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, por todo apoio, contribuições e ensinamentos muito importantes para a minha formação e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdemar Lacerda Júnior (UFES), pela ajuda com os cálculos teóricos.

Aos amigos dos laboratórios de RMN, Produtos Naturais, Síntese de Produtos Naturais, Espectrometria de Massas, que me ajudaram e contribuíram para que as dificuldades enfrentadas fossem minimizadas.

Aos amigos Murilo e Claudimar pela amizade e companheirismo muito importantes para mim, e por terem sido minha segunda família assim que cheguei a São Carlos.

Aos técnicos do laboratório de RMN Paulo e Luciana, pelo apoio e auxílios prestados.

Aos demais funcionários e técnicos do DQ-UFSCar.

Aos meus pais Sebastião (*In memoriam*) e Maria Tereza, por todo o apoio e cuidado para comigo, e pelos esforços que sempre fizeram para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

A minha esposa Darlene, por todo carinho, cuidado e apoio fundamentais em todos os momentos e, em especial, por todo amor, companheirismo e dedicação para com nossa nova família.

Aos meus irmãos André, Adriano, Leninha e Laila, por toda ajuda, apoio e força em todos os momentos.

Aos amigos e colegas que me auxiliaram e compartilharam comigo importantes momentos neste período.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ATF	Ácido TriFluoracético
ATMA	Automatic Tuning and MAtching
B_{ef}	Campo magnético efetivo
B_0	Campo magnético principal
B_1	Campo magnético oscilante induzido pelo pulso de rf
B3LYP	B3LYP - Terceira revisão do método de Becke, usando funcional de correlação de Lee-Yang-Parr
C	Constante que relaciona o grau de codificação espacial z com a extensão da evolução t_1
cc-pVDZ	Correlação consistente polarizada Double Zeta
cc-pVTZ	Correlação consistente polarizada Triple Zeta
CL	Cromatografia Líquida
CLAE-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
COSY	<i>CO</i> rrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
COSY-UR	Experimento COSY no modo ultrarrápido
UV-DAD	Detector ultravioleta com arranjo de diodos
DFT	Density Functional Theory
DQD	Digital Quadrature Detection
E	Energia do sistema
EFS	Extração em Fase Sólida
EPI	Imagem Eco-Planar
FID	Decaimento livre de indução
G_a	Gradiente de campo magnético aplicado durante a aquisição
GB	Gaussian-Broadening
G_e	Gradiente de campo magnético aplicado na excitação
GIAO	Orbitais Atômicos com a inclusão de Gauge
GTO	Orbitais do tipo Gaussian
G_p	Gradiente de purga

G_z	Gradiente de campo magnético na direção z
\hat{H}	Operador Hamiltoniano
HBMC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMBC-UR	Experimento HMBC no modo ultrarrápido
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
HSQC-UR	Experimento HSQC no modo ultrarrápido
Hz	Hertz
I	Número quântico do momento angular de spin nuclear
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
KUP	Keng Ultrafast Processing
LYP	Lee-Yang-Parr
LB	Lorentzian-Broadening
m	Número quântico magnético correspondente ao estado de spin
M_0	Vetor que representa a magnetização resultante
MBPT	Teoria da perturbação de muitos corpos
MC	Mecânica Clássica
MeOD	Metanol-D4
MHz	MegaHertz
MP	Møller-Plesset
MP2	Møller-Plesset de 2 ^a ordem
MQ	Mecânica Quântica
NBO	Natural Bond Orbital
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NS	N.º de varreduras
Q	Fator de adiabaticidade
QSINE	Função de apodização seno quadrado
R	Coeficiente de correlação linear
rf	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN nD	Ressonância Magnética Nuclear multidimensional
RMN-UR	Ressonância Magnética Nuclear Ultrarrápida
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear bidimensional

STO	Orbitais do tipo Slater
SW	Janela espectral
SSB	Fator de mudança da função seno
TD	N.º de pontos do domínio de tempo
TF	Transformada de Fourier em uma dimensão
TF-2D	Transformada de Fourier bidimensional
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	TOTAL Correlation Spectroscopy
t_p	Tempo de duração do pulso
t_1	Tempo de evolução indireta dos spins
t_2	Tempo de evolução direta dos spins
ΔO	Incremento constante do <i>offset</i> nos pulsos seletivos
γ	Constante magnetogírica
$\gamma_a G_a$	Gradiente na aquisição
$\gamma_e G_e$	Gradiente na excitação
ν	Frequência de Larmor em Hertz
ρ	Densidade eletrônica
Ψ	Função de onda que descreve o elétron
$\omega(z)$	Frequência de Larmor na direção z

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de hidrogênio.....	42
TABELA 2 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de carbono.....	43
TABELA 3 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de COSY convencional..	44
TABELA 4 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos HSQC convencional.....	45
TABELA 5 - Parâmetros espectrais de aquisição utilizados na calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR.....	47
TABELA 6 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de COSY-UR.....	49
TABELA 7 - Parâmetros de aquisição adicionais utilizados nos experimentos de COSY-UR.....	51
TABELA 8 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de HSQC-UR.....	52
TABELA 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (ppm) calculados e experimentais para o composto 7	103
TABELA 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) calculados e experimentais para o composto 7	103
TABELA 11 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (ppm) calculados e experimentais para o composto 14	104
TABELA 12 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) calculados e experimentais para o composto 14	105
TABELA 13 - Energia de interação (kcal/mol) entre orbitais naturais de ligação (NBO) para o acetal (7) e o hemiacetal (11).....	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação gráfica da regra de Fleming para motores aplicada na RMN.....	05
FIGURA 2 - Representação gráfica do pulso de rf de alta potência (a) e o perfil de excitação (b)	05
FIGURA 3 - Representação gráfica do pulso de rf de baixa potência (a) e o perfil de excitação (b)	06
FIGURA 4 - Perfil de excitação do pulso CHIRP não suavizado (a) e suavizado (b)..	08
FIGURA 5 - Representação gráfica de um gradiente de campo pulsado crescente na direção +z.....	09
FIGURA 6 - Protocolo básico para a realização de um experimento de RMN 2D.....	12
FIGURA 7 - Representação gráfica de uma série de FIDs organizados em sete ponteiros.....	13
FIGURA 8 - Representação gráfica de uma matriz de dados de um experimento de RMN bidimensional (2D)	13
FIGURA 9 - Representação gráfica da evolução ao longo de t1 após TF em t2 (a) e o espectro de RMN 2D correspondente após TF em t1 (b).....	14
FIGURA 10 - Representação de um esquema básico para a realização de um experimento de RMN-UR.....	15
FIGURA 11 - Esquema de excitação seletiva discreta proposto por Frydman e colaboradores.....	16
FIGURA 12 - Representação gráfica das fatias excitadas sequencialmente e os respectivos tempos de evolução distintos.	16
FIGURA 13 - Representação esquemática de excitação contínua com codificação da amplitude (a), da fase com um eco de spin (b) e da fase com duplo eco de spin (b,c).....	18

FIGURA 14 - Representação esquemática da decodificação dos sinais na RMN-UR, onde um par bipolar de gradientes é aplicado N2 vezes, durante toda a aquisição, para amostrar adequadamente o espaço k.....	20
FIGURA 15- Representação gráfica da formação do espaço k oriundo do esquema de aquisição, baseado na EPI, utilizado na RMN ultrarrápida.....	21
FIGURA 16 - Representação esquemática da comparação entre o esquema de aquisição de um experimento de RMN 2D tradicional (a) e ultrarrápida (b)	21
FIGURA 17 - Espectro 2D HSQC-UR da D-glicose, cujos anômeros rebatidos para dentro da janela têm indicado os valores dos deslocamentos químicos reais.....	23
FIGURA 18 - Cinética da mutarrotação da D-glicose em água. Concentração relativa obtida pelo cálculo do volume relativo dos picos cruzados anoméricos no espectro de HSQC-UR, plotada em função do tempo.....	24
FIGURA 19 - Possíveis reações entre anidridos tríflicos e cetonas.....	24
FIGURA 20 - Série de 6 experimentos de HMBC-UR com os picos cruzados do reagente 1, intermediário 2 e produto 3.....	25
FIGURA 21 - Espectros individuais de TOCSY-UR do 1-bromonaftaleno, 3,5-dibromobenzeno e dibenzoilmetano.....	28
FIGURA 22 - Série de 20 experimentos de TOCSY-UR registrados no decorrer da corrida.....	28
FIGURA 23 - Sequência de pulsos do experimento COSY tradicional utilizada nos estudos de implementação realizados neste trabalho.....	44
FIGURA 24 - Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento HSQC tradicional utilizada nos estudos de implementação realizados neste trabalho.....	45
FIGURA 25 - Representação esquemática da sequência de pulsos para calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR.	47
FIGURA 26 - Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento	

COSY-UR utilizada nos estudos de implementação realizados neste trabalho.....	49
FIGURA 27 - Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento COSY-UR com pré-saturação utilizada nos estudos de CLAE-RMN realizados neste trabalho.....	51
FIGURA 28 - Representação esquemática da sequência de pulsos Sequência de pulsos do experimento HSQC-UR, baseado no esquema de codificação espacial em tempo constante proposta por Pelupessy.....	52
FIGURA 29 - Representação esquemática da sequência de pulsos para calibração dos gradientes requeridos na etapa de codificação dos experimentos de RMN-UR. O bloco tracejado é incluído para calibração dos pulsos formatados.....	58
FIGURA 30 - Representação do perfil de excitação obtido da sequência de pulsos na Figura 1 (sem o bloco tracejado), possibilitando a calibração da intensidade do gradiente, sem (a) e com (b) a correção de fase.....	59
FIGURA 31 - Representação da imagem do perfil de amplitude e fase do pulso smoothed chirp, utilizado na etapa de codificação, com as respectivas especificações deste pulso.....	60
FIGURA 32 - Representação do perfil de excitação obtido da sequência de pulsos na Figura 1 (incluindo o bloco tracejado) com a correção de fase, permitindo a calibração da potência do pulso formatado antes de realizar os experimentos ultrarrápidos.....	61
FIGURA 33 - Representação da sequência de pulsos do experimento COSY-UR, baseado no esquema de codificação espacial, em tempo constante, proposta por Pelupessy.....	62
FIGURA 34 - Representação da evolução spins ao longo da aquisição utilizando gradientes de intensidades +35,00 G/cm e -35,00 G/cm.....	63
FIGURA 35 - Representação da evolução dos spins ao longo da aquisição utilizando gradientes de intensidades +35,00 G/cm e -35,01 G/cm.....	64
FIGURA 36 - Espectro de COSY tradicional da amostra de 1-bromohexano (1)	

realizado com 6 varreduras e 128 incrementos em t1, num tempo total de 30 minutos.....	65
FIGURA 37 - Espectro de COSY-UR da amostra de 1-bromohexano realizado numa única varredura, cuja aquisição total durou 70 ms.....	65
FIGURA 38 - Espectro de COSY tradicional da amostra de Levamisol (2) realizado com 6 varreduras e 128 incrementos em t1, num tempo total de 30 minutos.....	67
FIGURA 39 - Espectro de COSY-UR da amostra de Levamisol realizado numa única varredura, cuja aquisição total durou 70 ms.....	68
FIGURA 40 - Espectro de COSY tradicional da amostra de Levamisol ampliado até a região de 7,80 ppm.....	69
FIGURA 41 - Representação dos ecos positivos e negativos formados durante a aquisição, dos quais somente três ecos positivos estão dentro da janela espectral na dimensão ultrarrápida.....	69
FIGURA 42 - Representação da ação dos gradientes antes e depois da etapa de mistura. (a) Antes da mistura o ecos se deslocam em direções opostas e (b) depois desta etapa eles se movem na mesma direção.....	70
FIGURA 43 - Representação da sequência de pulsos do experimento HSQC-UR, baseado no esquema de codificação espacial em tempo constante proposta por Pelupessy.....	71
FIGURA 44 - Espectro de HSQC tradicional da amostra de 1-bromohexano (1) realizado com 8 varreduras e 128 incrementos em t1, num tempo total de 58 minutos.....	73
FIGURA 45 - Espectro de HSQC-UR do 1-bromohexano realizado com 8 varreduras, cuja aquisição total de cada experimento durou 135 ms. O sinal marcado foi rebatido para dentro da janela. A duração total do experimento foi de 41s.....	73
FIGURA 46 - Espectro de HSQC tradicional da glicose (3) realizado com 8 varreduras e 128 incrementos em t1, num tempo total de 58 minutos.....	74
FIGURA 47 - Espectro de HSQC-UR da glicose realizado com 8 varreduras, cuja	

aquisição total de cada experimento durou 135 ms. Os sinais marcados foram rebatidos para dentro da janela. A duração total do experimento foi de 41s.....	75
FIGURA 48 - Representação esquemática da separação dos dados provenientes dos gradientes positivos e negativos em arquivos distintos.....	77
FIGURA 49 - Fluxograma das principais etapas envolvidas na execução do pacote <i>kup</i> de processamento de dados de RMN-UR.....	78
FIGURA 50 - Comandos utilizados para a declaração das variáveis globais.....	79
FIGURA 51 - Comandos para o carregamento dos parâmetros de aquisição.....	80
FIGURA 52 - Comandos para determinar os valores de O1, O2 e da janela espectral.....	81
FIGURA 53 - Comandos para verificação do modo de digitalização.....	82
FIGURA 54 - Comandos para verificação do n.º de repetições do bloco de aquisição.....	82
FIGURA 55 - Comando para determinar o tipo e a localização do arquivo dos dados.....	83
FIGURA 56 - Comando para determinar o número de pontos.....	84
FIGURA 57 - Comando para criar o subdiretório dos dados positivos.....	84
FIGURA 58 - Comandos para configurar alguns parâmetros de processamento.....	85
FIGURA 59 - Função da biblioteca <i>kuplib</i> para extrair os dados positivos.....	85
FIGURA 60 - Fórmulas estruturais dos flavonoides que constituem a mistura submetida à separação cromatográfica no sistema CLAE-RMN.....	89
FIGURA 61 - Espectros de RMN de ¹ H da região aromática e as respectivas estruturas dos flavonoides estudados neste trabalho.....	90
FIGURA 62 - Regiões aromáticas dos espectros de RMN-UR COSY individuais dos flavonoides utilizados neste estudo.....	90

FIGURA 63 - Cromatograma ($\lambda = 244$ nm) obtido para a mistura dos flavonoides 4 , 5 e 6 , com eluição isocrática ACN/H ₂ O (45:55) e volume de injeção de 5 μ L.....	92
FIGURA 64 - Cromatograma ($\lambda = 244$ nm) obtido para a mistura dos flavonoides 4 , 5 e 6 , com eluição isocrática ACN/H ₂ O (45:55) e volume de injeção de 100 μ L.....	93
FIGURA 65 - Regiões aromáticas dos espectros de RMN-UR COSY adquiridos ao longo da separação cromatográfica da mistura dos flavonoides naringina, epicatequina e naringenina num sistema CLAE-RMN no modo fluxo contínuo.....	94
FIGURA 66 - Esquema reacional da hidrólise do acetal 7 , catalisada pelo ATF.....	97
FIGURA 67 - Proposta mecanística da reação de hidrólise do acetal 7 , catalisada pelo ATF.....	98
FIGURA 68 - Espectro de RMN de ¹ H adquirido no decorrer da reação de hidrólise, com sinais correspondentes ao acetal 7 , produto 14 e ATF.....	100
FIGURA 69 - Espectros de HSQC-UR adquiridos no decorrer da reação de hidrólise do acetal 7	101
FIGURA 70 - Gráficos de correlação entre os dados experimentais e teóricos de deslocamentos químicos de ¹³ C (a) e ¹ H (b) do composto 7	104
FIGURA 71 - Gráficos de correlação entre os dados experimentais e teóricos de deslocamentos químicos de ¹³ C (a) e ¹ H (b) do composto 14	105
FIGURA 72 - Orbital NBO $\sigma^*_{C(2)-H(2)}$ do hemiacetal 11	107

RESUMO

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ULTRARRÁPIDA: IMPLEMENTAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES. O trabalho em questão destaca a implementação, desenvolvimento e aplicação da técnica de Ressonância Magnética Nuclear Ultrarrápida (RMN-UR), proposta por Frydman e colaboradores. Por meio desta técnica, é possível realizar experimentos multidimensionais numa única varredura, reduzindo dessa forma, drasticamente, o tempo de aquisição, que pode durar uma fração de segundo. É apresentado um protocolo prático, que foi otimizado para implementação dos primeiros experimentos de RMN 2D COSY e HSQC ultrarrápidos realizados no Brasil, e ao que se sabe no hemisfério Sul. Este processo envolve desde a calibração de pulsos e gradientes, até a configuração do esquema específico de aquisição relativo a esta técnica. Além disso, alguns aspectos operacionais importantes são discutidos visando contribuir ainda mais para que futuras implementações sejam realizadas de maneira segura e eficiente. Também como parte deste estudo foi desenvolvido um programa em linguagem de programação C, para o processamento em tempo real (1 segundo) dos dados de RMN-UR, e este foi incorporado ao programa computacional de aquisição e processamento dos dados de RMN da empresa Bruker - TopSpin® versão 3.0. Foram realizados ainda dois estudos aplicando os experimentos de RMN-UR. O primeiro trata-se da identificação em tempo real de uma mistura de 3 flavonoides (epicatequina, naringenina e naringina) submetida à separação cromatográfica, num sistema CLAE-RMN no modo fluxo contínuo. Experimentos de COSY-UR foram realizados ao longo de toda corrida cromatográfica, sendo possível obter os espectros 2D correspondentes de cada flavonoide e acompanhar com sucesso a separação destes no decorrer do tempo. A segunda aplicação foi o monitoramento da reação de hidrólise do acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano. O intermediário hemiacetal desta reação possui curta duração, sendo portanto de difícil identificação via RMN tradicional. Por isso, foram realizados experimentos de HSQC-UR durante todo o desenvolvimento da reação e, por meio destes, foi possível caracterizar a presença do intermediário hemiacetal. A correlação atribuída a este foi confirmada através de cálculos quânticos de deslocamento químico de RMN de ^1H e ^{13}C e dos NBOs (*Natural Bonding Orbital*).

ABSTRACT

ULTRAFAST NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE: IMPLEMENTATION, DEVELOPMENT AND APPLICATIONS. This work highlights the implementation, development and application of the Ultrafast Nuclear Magnetic Resonance (UF-NMR) technique, proposed by Frydman and co-workers. Through this technique, it is possible to perform multidimensional experiments in a single scan, thus reducing the experiment time drastically, which can be a fraction of second. This study shows a practical protocol, which was optimized for the implementation of the first ultrafast 2D NMR COSY and HSQC experiments performed in Brazil and, to our knowledge, in the southern hemisphere. This process involves the setting of several parameters from the initial calibration of encoding gradients and pulses, to the setting of a specific acquisition scheme required by the technique. Furthermore, some important operational aspects are discussed in order to contribute, even more, to future implementations to be carried out safely and efficiently. Also, as part of this study, a software in C language was developed to obtain the real-time processing (1 second) of the UF-NMR data, and this was incorporated in the Bruker software for the acquisition and processing of NMR data - TopSpin[®] version 3.0. Finally, two studies were also performed using the UF-NMR experiments. The first one was the real-time identification of a mixture of flavonoids (epicatechin, naringenin and naringin), which underwent on-flow chromatographic separation, in a commercial HPLC-NMR system. UF-COSY experiments were performed during the chromatographic run, so that it was possible to obtain the 2D NMR spectra related to each flavonoid and to successfully follow their separation over the course of time. The second application was the monitoring of the hydrolysis reaction of the 2-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxolane acetal. The hemiacetal intermediate of this reaction has a short lifetime, being difficult to identify by conventional NMR. Therefore, HSQC-UR experiments were performed during the reaction development, thus, it was possible to characterize the presence of the hemiacetal intermediate. This assignment was confirmed by quantum calculation of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts and of the NBOs (*Natural Bonding Orbital*).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 - INTRODUÇÃO.....	2
1.1 - Ressonância Magnética Nuclear.....	2
1.1.1 - Fundamentos.....	2
1.1.2 - Pulsos de rf.....	4
1.1.2.1 - Pulso duro.....	5
1.1.2.2 - Pulso mole.....	6
1.1.2.3 - Pulso adiabático.....	7
1.1.3 - Gradiente de campo pulsado.....	9
1.1.4 - Funções de apodização.....	10
1.1.5 - RMN bidimensional.....	12
1.1.5.1 - Esquema geral.....	12
1.1.5.2 - Aplicações.....	14
1.2 - Ressonância Magnética Nuclear Ultrarrápida.....	15
1.2.1 - Método de excitação discreta.....	16
1.2.2 - Método de excitação contínua.....	17
1.2.2.1 - Codificação modulada pela fase com duplo eco de spin.....	18
1.2.3 - Aquisição/decodificação dos dados.....	19
1.3 - Estudos de Processos Dinâmicos via RMN-UR.....	22
1.3.1 - Estudo cinético da mutarrotação da D-glicose.....	22
1.3.2 - Mecanismo de reação orgânica.....	24
1.3.3 - Monitoramento de separação cromatográfica em tempo real.....	26
1.4 - Química Computacional.....	29
1.4.1 - Métodos de estrutura eletrônica.....	29

1.4.1.1 - DFT (Teoria do Funcional de Densidade).....	30
1.4.1.2 - MØller-Plesset.....	31
1.4.2 - Conjunto de bases.....	32
1.4.3 - Cálculos de propriedades de RMN.....	33
1.4.4 - Cálculos de NBO (<i>Natural Bond Orbital</i>).....	34
1.5 - Linguagem de programação C.....	34
2 - OBJETIVOS.....	37
3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	39
3.1 - Materiais e equipamentos.....	39
3.2 - Preparo das amostras.....	40
3.3 - Aquisição e processamento dos experimentos de RMN.....	42
3.3.1 - Experimentos 1D de hidrogênio.....	42
3.3.2 - Experimentos 1D de carbono.....	42
3.3.3 - Experimentos de COSY convencional.....	43
3.3.4 - Experimentos de HSQC convencional.....	45
3.3.5-Calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR.....	46
3.3.6 - Experimentos de COSY-UR.....	48
3.3.7 - Experimentos de COSY-UR com pré-saturação.....	50
3.3.8 - Experimentos de HSQC-UR.....	52
3.4 - Condições cromatográficas.....	54
3.5 - Cálculos teóricos.....	54
3.6 - Desenvolvimento do algoritmo de processamento.....	55
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 - Implementação dos experimentos de RMN-UR.....	57
4.1.1 - Calibração dos gradientes e pulsos de codificação.....	57
4.1.2 - Implementação do experimento COSY-UR.....	61
4.1.3 - Implementação do experimento HSQC-UR.....	71
4.2 - Desenvolvimento de um algoritmo para processamento.....	76
4.2.1 - KUP - <i>Keng Ultrafast Processing</i>	78

4.2.1.1 - Declaração das bibliotecas e variáveis.....	79
4.2.1.2 - Carregamento dos parâmetros de aquisição.....	80
4.2.1.3 - Configuração dos valores de O1, O2 e da janela espectral segundo o tipo do experimento.....	80
4.2.1.4 - Verificação do modo de digitalização.....	81
4.2.1.5 - Verificação do número de repetições bloco de aquisição.....	82
4.2.1.6 - Localização do arquivo dos dados adquiridos.....	83
4.2.1.7 - Determinação do número de pontos.....	83
4.2.1.8 - Criação do subdiretório dos dados positivos.....	84
4.2.1.9 - Configuração dos parâmetros de processamento.....	84
4.2.1.10 - Extração dos dados positivos.....	85
4.2.1.11 - Processamento dos dados positivos.....	86
4.2.1.12 - Processamento dos dados negativos.....	87
4.3 - Aplicações desenvolvidas com o uso da RMN-UR.....	88
4.3.1 - Identificação em tempo real de uma mistura de flavonoides num sistema CLAE-RMN.....	88
4.3.1.1 - Seleção dos compostos da mistura.....	89
4.3.1.2 - Otimização dos parâmetros do COSY-UR.....	90
4.3.1.3 - Otimização das condições cromatográficas.....	91
4.3.1.4 - Acompanhamento da separação cromatográfica dos flavonoides via COSY-UR.....	93
4.3.2 - Monitoramento em tempo real de uma reação orgânica via RMN-UR.....	96
4.3.2.1 - Reação de hidrólise de acetais.....	96
4.3.2.2 - Otimização dos parâmetros do HSQC-UR.....	99
4.3.2.3 - Monitoramento da reação de hidrólise.....	99
4.3.2.4 – Cálculos teóricos de RMN e NBO.....	102
5 - CONCLUSÃO.....	110
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
APÊNDICES	

INTRODUÇÃO

1 - Introdução

1.1 - Ressonância Magnética Nuclear

Ao analisarmos o panorama histórico da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é possível notar uma acentuada evolução desde os primeiros registros deste fenômeno até os tempos atuais.

No fim do século XIX, Zeeman verificou que os núcleos de certos átomos comportavam-se estranhamente quando submetidos a um campo magnético. Ele demonstrou que a linha azul do cádmio, sob influência de um forte campo magnético externo, desdobrava-se em 3 linhas equidistantes¹. Em 1938, Rabi et al.² registraram a primeira observação do que viria a ser conhecido como a RMN. Eles constataram que para um valor bem definido de radiofrequência, o feixe de radiação produzido pelas moléculas em estudo sofria um desvio após absorver energia. Contudo, o que ainda não se sabia era que a RMN também podia ser observada em materiais de fase condensada. Foi então que nos anos 40, este fenômeno teve sua aplicação expandida para materiais nos estados líquido e sólido através dos experimentos de Bloch et al.³ e Purcell et al.⁴.

Outro marco na história da RMN foi a década de 70, na qual a fronteira imposta pelos experimentos unidimensionais (RMN 1D) foi rompida pelo surgimento dos experimentos bidimensionais^{4,5} e de imagem^{6,7}. As décadas que se seguiram foram marcadas pelo desenvolvimento de diferentes metodologias, visando ampliar ainda mais o alcance desta poderosa ferramenta.

1.1.1 - Fundamentos

O fenômeno conhecido como RMN ocorre quando núcleos com momento angular de spin, diferente de zero (ex.: ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O), são submetidos a um campo magnético estático e perturbados com um segundo campo magnético de natureza oscilatória⁹. A estes núcleos estão associados um momento angular e um momento magnético, e ambos os momentos estão relacionados por meio de um fator magnetogírico γ , que é característico de cada núcleo, conhecido como constante magnetogírica⁹.

Assim como o efeito observado por Oersted¹⁰ em correntes elétricas, a rotação do núcleo carregado positivamente criará um pequeno campo magnético, fazendo com que esse núcleo se comporte como uma pequena barra magnética. Esta, por sua vez, quando submetida ao torque imposto por um campo magnético estático, dará origem a um movimento circular em torno deste campo, conhecido como precessão. A força do campo magnético aplicado é diretamente proporcional à taxa (ν) na qual a precessão ocorrerá, também chamada frequência de Larmor, como podemos ver na equação seguinte:

$$\nu = -\gamma B_0 \quad (1.1)$$

onde ν é a frequência de Larmor em Hertz (Hz), γ corresponde à $(\gamma/2\pi)$ e B_0 é o campo magnético estático ao qual o núcleo está submetido^{9,11}.

Os núcleos em precessão irão se alinhar no mesmo sentido ou contrários ao campo magnético principal, ocupando assim os diferentes estados de energia ou de spin m , determinados pelo número quântico do momento angular de spin nuclear I , segundo a relação $[2I + 1]$ (1.2). Com relação a esses estados de energia, também chamado estados de Zeeman, temos dois conceitos importantes a destacar¹².

Primeiramente, as transições entre esses níveis podem ser estimuladas pela absorção de energia aplicada na forma de radiação eletromagnética. De acordo com as regras de seleção da mecânica quântica, as transições de dipolos magnéticos permitidas são do tipo $\Delta m = \pm 1$. Logo, para que uma transição permitida entre estes estados ocorra, é necessário que a frequência da onda eletromagnética emitida coincida com a frequência de precessão do núcleo em questão¹¹, o que nos leva a seguinte equação:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 \quad (1.3)$$

onde ΔE é a energia requerida para que a transição (excitação) ocorra, e \hbar a constante de Planck dividida por 2π .

Um segundo conceito importante é a respeito do vetor, paralelo ao eixo z, que representa a magnetização inicial (M_0), que consiste na resultante do pequeno excesso populacional existente no estado de spin de menor energia. A magnitude deste vetor está intimamente ligada a sensibilidade da espectroscopia de

RMN, e é diretamente proporcional ao já referido excesso populacional. Este pode ser determinado, no equilíbrio, por meio da distribuição de Boltzmann. Para um núcleo de spin $\pm 1/2$, temos a seguinte relação:

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\Delta E/k_B T} \quad (1.4)$$

onde N_{α} e N_{β} representam o número de núcleos com orientação paralela e antiparalela em relação a B_0 , respectivamente, k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura em Kelvin^{9,11,12}.

Partindo destes fundamentos básicos, podemos avançar para a análise das diferentes formas existentes de manipularmos essas ditas transições, de modo a extrair do núcleo a informação que desejamos. Essas manipulações são feitas através de uma importante ferramenta da espectroscopia de RMN: o pulso de radiofrequência (rf).

1.1.2 - Pulsos de rf

Na unidade chamada de transmissor de rf o pulso é gerado e pode ter sua fase modificada, conforme as instruções existentes na sequência de pulsos. Este processo se inicia no sintetizador de frequência, que produz um pulso de rf de baixa potência (da ordem de mW), passando então por um atenuador e, por fim, pelo amplificador de rf. O amplificador possui um valor fixo de amplificação, portanto, se quisermos aplicar um pulso de baixa potência, o atenuador localizado entre o sintetizador e o amplificador tem um papel crucial, pois irá atenuar o sinal antes de encaminhá-lo ao amplificador. Desse modo, o pulso de rf sairá do transmissor com a potência requerida e será encaminhado para a sonda¹².

O pulso de rf consiste num componente eletromagnético com frequência definida, e é aplicado no plano perpendicular a B_0 . Esta irradiação de rf corresponde a um campo magnético B_1 que, segundo a regra de Fleming¹³, produz um torque perpendicular tanto a B_0 quanto a B_1 (Figura 1). Esse torque irá deslocar o vetor M_0 , na direção do plano x-y, num ângulo de rotação θ , que é diretamente proporcional à amplitude e duração do pulso de rf¹¹.

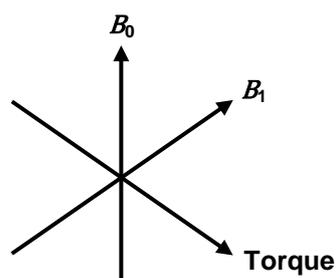


Figura 1. Representação gráfica da regra de Fleming para motores aplicada na RMN.

Desde as últimas décadas, diferentes tipos de pulso foram desenvolvidos, e de acordo com o tipo de informação desejada utilizam-se os pulsos mais adequados. Dentre os mais utilizados atualmente, podemos destacar nesse texto três tipos.

1.1.2.1 - Pulso duro

O pulso duro, também conhecido como *hard pulse*, é de curta duração. Nesta situação, segundo o Princípio da Incerteza de Heisenberg, o transmissor de rf não ficará ligado tempo suficiente para gerar uma oscilação com frequência fundamental exata. Com isso, um pulso duro é capaz de excitar não somente uma frequência específica, mas sim uma ampla faixa de frequência, que o caracteriza como um pulso não seletivo^{11,12}.

A frequência central do pulso é conhecida como "em ressonância", enquanto que as demais (*offset*) estão na condição "fora de ressonância". O tempo de duração do pulso (t_p) é inversamente proporcional à largura de banda de excitação do pulso (Figura 2)^{11,12}.

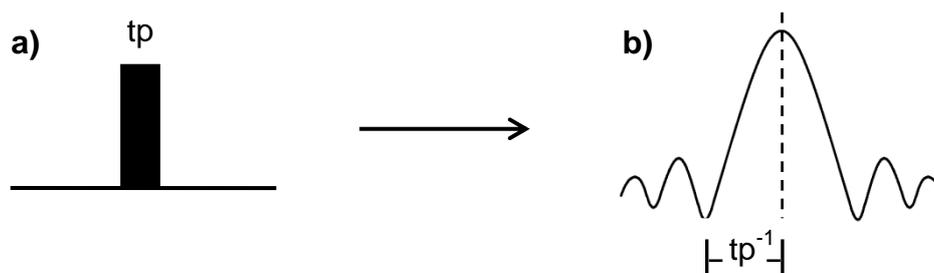


Figura 2. Representação gráfica do pulso de rf de alta potência (a) e o perfil de excitação (b).

1.1.2.2 - Pulso mole

O pulso mole, também chamado de *soft pulse*, é gerado por uma descarga de energia de baixa potência e longa duração. Neste caso, o transmissor de rf ficará ligado por tempo suficiente para que produza uma onda de rf com frequência fundamental bem definida, isto é, esse tipo de pulso excitará seletivamente apenas uma pequena faixa de frequência^{11,12}.

Este pulso é classificado como seletivo, e sua largura de banda de excitação mantém a mesma relação citada anteriormente para o pulso duro, com o tp (Figura 3)^{11,12}.

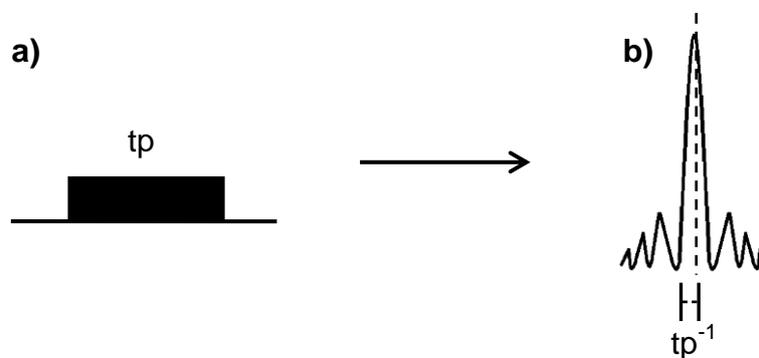


Figura 3. Representação gráfica do pulso de rf de baixa potência (a) e o perfil de excitação (b).

Um problema associado a este tipo de pulso é que mesmo para picos distantes da frequência de referência do pulso, poderá ser formada magnetização tanto em y quanto em x . Ao observarmos o formato do perfil de excitação correspondente, verificamos que este decai lentamente e possui uma série de batimentos com vários pontos de nulo e de máximo, que explicam a origem do problema citado anteriormente^{11,12}.

Diferentes tipos de pulsos têm sido desenvolvidos com intuito de resolver este problema. Estes se baseiam em geral no princípio que envolve a criação de pulsos com perfis de excitação de formatos específicos, de tal forma que sejam ligados e desligados suavemente. Esses pulsos são chamados de pulsos formatados¹².

Dentre os pulsos formatados mais utilizados atualmente, podemos destacar um tipo especial que é bastante aplicado quando o experimento que desejamos realizar requer a inversão dos spins: o pulso adiabático.

1.1.2.3 - Pulso adiabático

O pulso adiabático é aplicado de modo a executar a varredura (ou *scan*) não somente de um único valor de frequência, mas sim de uma faixa de frequências^{11,14}.

Um detalhe importante a respeito desta varredura, é que ela precisa ser suficientemente lenta, para permitir que o vetor de magnetização M_0 siga a trajetória do campo magnético efetivo atuante nos spins (B_{ef}), mas rápida o suficiente para impedir que as relaxações transversal e longitudinal entrem em ação. Devido ao fato do pulso adiabático ser aplicado num tempo muito menor do que as constantes de relaxação, nos referimos a este tipo de pulso como sendo de passagem rápida adiabática. Assim, é atingida a chamada condição de adiabática^{11,14}:

$$\left| \frac{d\theta}{dt} \right| \ll |\gamma B_{ef}| = \omega_{ef} \quad (1.5)$$

onde θ é o ângulo de rotação em relação ao eixo z, proporcionado pelo pulso. A condição adiabática representada na equação 1.5, significa que a frequência de precessão de M_0 em torno da direção de B_{ef} (ω_{ef}) tem de ser muito maior do que a velocidade com que B_{ef} muda de direção ($\frac{d\theta}{dt}$) em relação ao eixo x. Tal condição garante que o vetor M_0 seja guiado pelo campo B_{ef} durante a execução do pulso e, ao final desta os spins experimentem a inversão requerida.

A variável que reflete o grau de satisfação da condição adiabática é o fator de adiabaticidade Q ^{11,14}:

$$Q = \frac{\omega_{ef}}{|d\theta/dt|} \quad (1.6)$$

Levando em consideração o fato de que a varredura do pulso adiabático passa pela condição "em ressonância", isto é, quando o *offset* é zero, a equação que descreve o fator de adiabaticidade nesta condição (Q_0) é^{11,14}:

$$Q_0 = \frac{\omega_1^2}{|d\Omega/dt|} \quad (1.7)$$

onde ω_1 é a frequência de precessão dos spins "em ressonância", e $\frac{d\Omega}{dt}$ corresponde à taxa de variação do *offset* em função do tempo.

Ao relacionarmos a equação 1.5 com a 1.6 e 1.7, vemos que este fator tem que ser significativamente maior do que 1, para que a condição adiabática seja satisfeita. Na prática, geralmente trabalha-se com valores em torno de 3 e 5¹¹.

É importante salientarmos que uma grande vantagem deste tipo de pulso é que a inversão que ele propicia contempla precisamente uma ampla faixa de frequência, o que o torna bastante útil em experimentos que envolvem núcleos com largas bandas de frequência. Outra vantagem é que uma vez alcançada a condição adiabática, a inversão ocorrerá precisamente mesmo que haja inhomogeneidades no campo magnético induzido pelo pulso, ou que a potência deste não esteja corretamente ajustada. Por isso, vale ressaltar que ao calibrar esses pulsos deve-se tomar muito cuidado para não danificarmos a sonda, pois ainda que o valor da potência esteja muito acima do mínimo requerido, observaremos a mesma precisão na inversão dos spins¹¹.

Dentre os diversos pulsos adiabáticos desenvolvidos nas últimas décadas, um dos mais utilizados é chamado pulso CHIRP. Este pulso é o mais simples dentre os adiabáticos, apresenta um perfil de excitação retangular e realiza uma varredura de frequência linear. Para minimizar uma possível violação da condição adiabática no CHIRP por conta de um perfil exclusivamente retangular, é utilizada uma suavização nas bordas do perfil de excitação do pulso, motivo pelo qual geralmente refere-se a este pulso como *smoothed* CHIRP ou CHIRP suavizado. Os perfis de excitação de ambos os pulsos estão exemplificados na Figura 4, e descritos mais detalhadamente na seção 4.1.1 (Figura 31 - pg. 60)^{11,15}.



Figura 4. Perfil de excitação do pulso CHIRP não suavizado (a) e suavizado (b).

Assim como os pulsos de rf, um outro tipo de pulso é bastante útil e comumente aplicado em diversas sequências de pulsos utilizadas atualmente. Estamos nos referindo ao gradiente de campo pulsado.

1.1.3 - Gradiente de campo pulsado

O gradiente de campo pulsado é gerado pela bobina de gradiente, que geralmente está localizada da sonda, mas também pode ser parte integrante do magneto. Por esta bobina passa uma corrente elétrica que induz a formação de um campo magnético, cuja intensidade varia linearmente de acordo com a posição espacial. O sentido do fluxo da corrente elétrica é controlado, assim como a sua quantidade. Com isso, podemos modificar tanto a intensidade quanto o sentido do gradiente de campo formado. As bobinas de gradiente podem ser desenvolvidas de modo a produzir este gradiente de campo em todas as direções^{12,15}.

A aplicação de um gradiente de campo cria uma variação linear do campo magnético principal sentido pelas moléculas, induzindo assim a uma dispersão de frequência com dependência espacial (Figura 5).

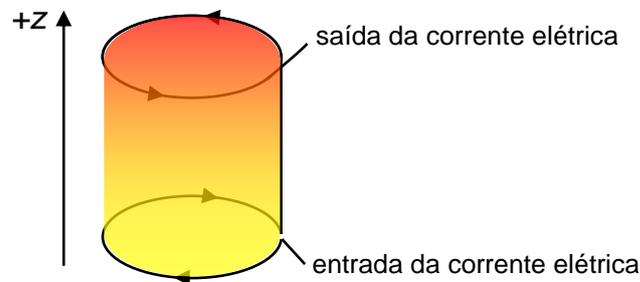


Figura 5. Representação gráfica de um gradiente de campo pulsado e crescente na direção +z.

Da mesma forma que o campo magnético apresenta essa dependência espacial, a frequência de Larmor também varia conforme a posição. Podemos descrever essa relação para um pulso de gradiente aplicado na direção z, por exemplo, como:

$$\omega(z) = \omega_0 - \gamma G_z \quad (1.8)$$

onde $\omega(z)$ é a frequência de Larmor na posição z , e G_z representa o campo magnético gerado pelo gradiente. Pouco tempo depois da aplicação do pulso há uma defasagem completa dos spins, ocasionando então a perda da coerência, ou seja, a rede de magnetização se torna nula. Entretanto, podemos recuperar a coerência pela aplicação de outro gradiente que, com magnitude e direção apropriadas, induzirá a formação de um eco conhecido como eco de gradiente^{12,15}.

O pulso de gradiente de campo é bastante utilizado em experimentos que requerem, por exemplo, a seleção de coerência ou mesmo para realizar a excitação espacialmente seletiva dos spins, conforme detalharemos posteriormente.

1.1.4 - Funções de apodização

Uma importante manipulação dos dados que antecede a transformada de Fourier (TF) é a aplicação de funções de apodização, que conferem maior peso a algumas partes específicas do FID (decaimento livre de indução), a fim de melhorar a resolução ou mesmo a relação sinal/ruído do espectro^{11,15}. O processo de apodização envolve a multiplicação de cada ponto n no domínio de tempo (P_n) que compõe o FID por um fator (F_a) determinado conforme a função escolhida:

$$P'_n = F_a P_n \quad (1.9)$$

onde P'_n é o novo valor do ponto P_n apodizado¹⁵.

As funções de apodização que promovem um aumento da porção central e final do FID propiciam uma melhor resolução espectral, uma vez que essa operação amplia o tempo de decaimento do sinal. Já as funções que atuam aumentando o peso das regiões do FID onde o sinal é significativamente maior do que o ruído, reduzindo desse modo a intensidade do ruído, promovem uma melhoria na sensibilidade, haja vista que a relação sinal/ruído do espectro é aumentada^{11,15}.

É importante salientar o compromisso existente entre resolução e sensibilidade, pois, em geral, um aumento na sensibilidade ocasionará a diminuição da resolução e vice-versa. Assim, a função de apodização ideal a ser utilizada dependerá dos objetivos específicos de cada problema em questão.

Dentre as funções de apodização mais utilizadas, podemos destacar:

• **Multiplicação exponencial (EM):** a função de apodização exponencial é utilizada para aumentar a sensibilidade^{11,15}, e o fator de multiplicação é dado por¹⁶:

$$F_a = \exp\left(-\frac{(n-1)LB\pi}{2SW}\right) \quad (1.10)$$

onde n é o número do ponto no domínio de tempo, SW a janela espectral e LB o fator de alargamento de linha exponencial.

• **Multiplicação Gaussiana (GM):** a função de apodização gaussiana possibilita uma melhoria na resolução espectral^{11,15}, e o fator de multiplicação neste caso corresponde a¹⁶:

$$F_a = \exp((-at) - (-bt^2)) \quad (1.11)$$

onde t se refere ao tempo de aquisição, enquanto que as variáveis a e b correspondem a:

$$a = LB\pi \quad \text{e} \quad b = -\frac{a}{2GBt} \quad (1.12)$$

sendo GB o fator de alargamento de linha Gaussiano.

• **Função seno (sine):** a função de apodização seno é utilizada para aumentar a resolução espectral, e apesar de possibilitar um aumento significativo da resolução, ela causa uma diminuição expressiva da sensibilidade e, por isso, evita-se o uso desta em experimentos unidimensionais, sendo aplicada majoritariamente em experimentos bidimensionais^{11,15}. O fator de multiplicação para esta função é dado por¹⁶:

$$F_a = \text{seno}((\pi - FI)(t'/t) - FI) \quad (1.13)$$

onde SSB é o fator de mudança da função seno e t se refere ao tempo de aquisição, enquanto t' e FI correspondem a:

$$0 < t' < t \quad \text{e} \quad FI = \pi/SSB \quad (1.14)$$

• **Função seno quadrado (qsine):** a função de apodização seno quadrado é semelhante à função seno e também propicia um aumento da resolução espectral. Contudo, a seno quadrado atua mais eficientemente nas extremidades do FID, se comparada a função seno^{11,15}. O fator de multiplicação é descrito matematicamente como¹⁶:

$$F_a = \text{seno}((\pi - FI)(t'/t) - FI)^2 \quad (1.15)$$

1.1.5 - RMN bidimensional

O esquema inicial de realização de experimentos de RMN bidimensional (RMN 2D) foi proposto teoricamente por Jeener⁵ na então *Ampere Summer School* em 1971. Neste evento estava presente o primeiro aluno de pós-graduação de Richard Robert Ernst. Ele assistiu a apresentação desta inovadora proposta e levou-a até o conhecimento de Ernst, que alguns anos depois reportou a primeira realização de um experimento de RMN 2D⁶. As décadas seguintes foram marcadas pelo desenvolvimento de diferentes metodologias, visando ampliar ainda mais o alcance desta poderosa ferramenta.

1.1.5.1 - Esquema geral

Conceitualmente, e independentemente dos núcleos analisados, os experimentos de RMN 2D são norteados pelas seguintes etapas básicas: preparação, evolução, mistura e detecção (Figura 6)¹⁷.

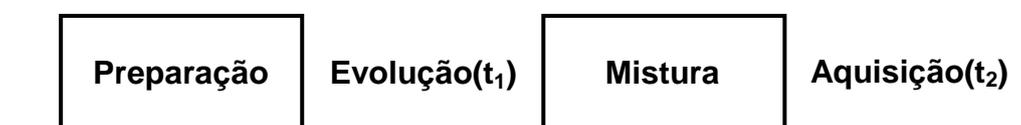


Figura 6. Representação de um esquema básico para a realização de um experimento de RMN 2D.

Na etapa de preparação ocorre a excitação dos spins e pode também incluir instruções para supressão de sinais indesejados. Na mistura podem ser aplicados pulsos e/ou tempos de espera de acordo com a informação requerida pela sequência de pulsos. A aquisição dos dados é similar a correspondente para um experimento de RMN 1D, onde o decaimento livre de indução (FID) dos spins é registrado num gráfico que relaciona a amplitude deste decaimento com o tempo. Cada um desses FIDs representa a primeira dimensão (domínio de tempo t_2)¹⁷.

O período de evolução representa uma etapa crucial para a formação da segunda dimensão. Esta dimensão é formada por uma série de FIDs que, após acumulados, serão organizados em diferentes linhas ou experimentos (Figura 7).

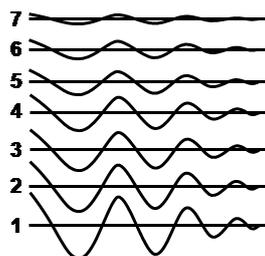


Figura 7. Representação gráfica de uma série de FIDs organizados em sete experimentos.

Ao iniciar a varredura de um novo experimento o valor de t_1 é incrementado parametricamente e, com isso, é possível monitorar a evolução indireta no domínio t_1 . Portanto, na matriz de dados bidimensional cada experimento corresponde a um valor diferente de t_1 , e o conjunto destes experimentos compõe a segunda dimensão (Figura 8).

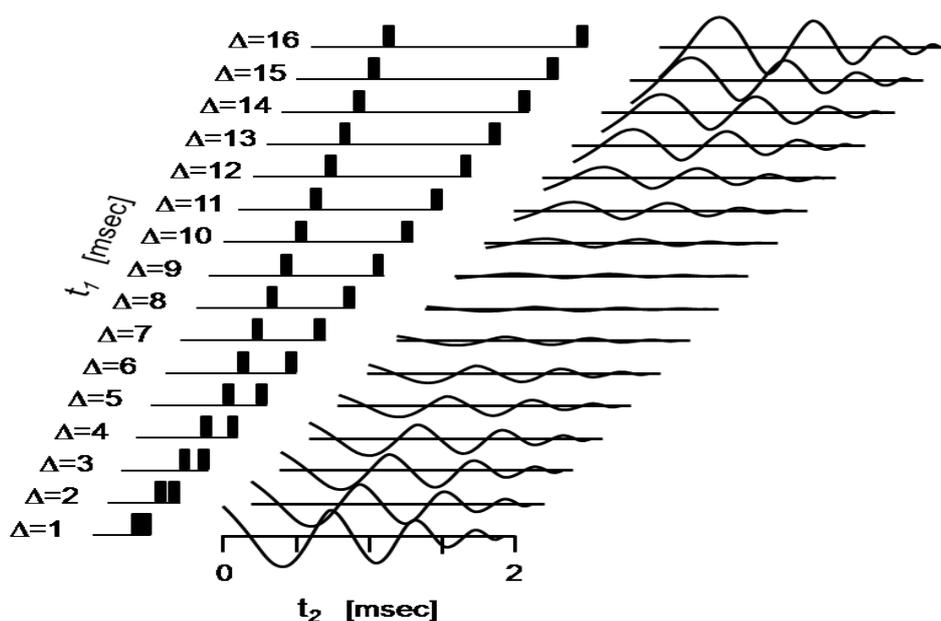


Figura 8. Representação gráfica de uma matriz de dados de um experimento de RMN bidimensional (2D).

Aplicando a transformada de Fourier (TF) em t_2 , pode-se observar a evolução dos sinais de RMN ao longo do domínio t_1 . Por fim, ao aplicarmos uma segunda TF agora em t_1 , obtém-se as correlações descritas por ambos os domínios de tempo (Figura 9).

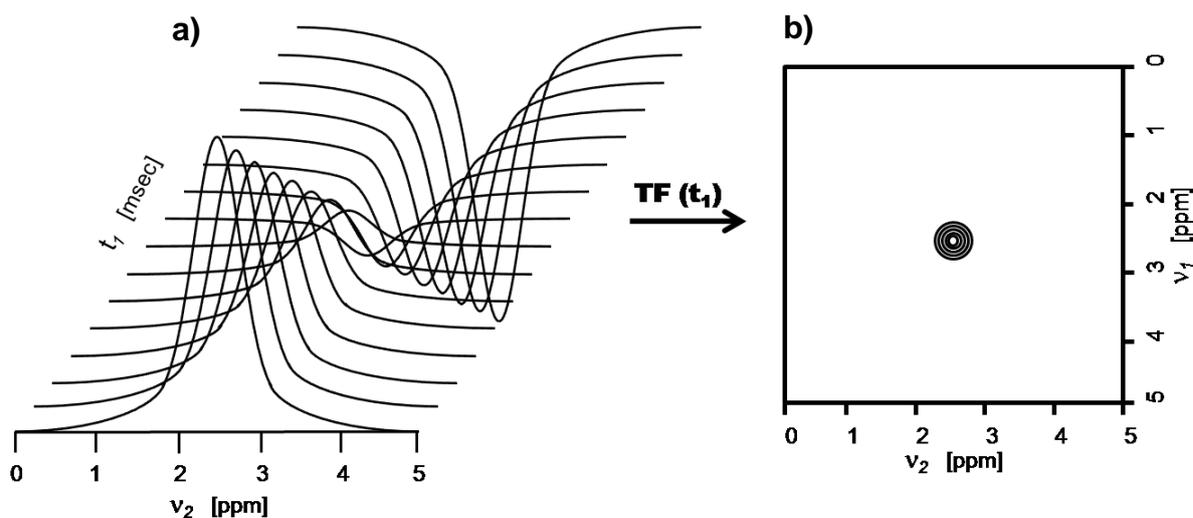


Figura 9. Representação gráfica da evolução ao longo de t_1 após TF em t_2 (a) e o espectro de RMN 2D correspondente após TF em t_1 (b).

Na realidade, os programas computacionais para processamento utilizam a transformada de Fourier bidimensional (TF-2D), que realizará as transformações descritas acima sequencialmente (primeiro TF em t_2 e depois em t_1)^{12,17}.

1.1.5.2 - Aplicações

A RMN 2D possibilita a realização de experimentos homonucleares, tais como: COSY, TOCSY, NOESY, entre outros. Os experimentos do tipo heteronuclear também são contemplados por esta técnica, dentre os quais podemos destacar: HMQC, HSQC, HMBC, dentre outros^{11,12}. Esses experimentos de RMN 2D podem ser aplicados em diferentes tipos de estudos, como por exemplo a determinação estrutural de compostos, verificação da qualidade de alimentos e para traçar perfis metabólicos, etc^{9,11}.

Contudo, apesar de todo esse progresso, os experimentos tradicionais de RMN 2D continuam associados a um elevado número de varreduras, a fim de amostrar adequadamente o domínio t_1 , levando a longos tempos de duração (entre algumas dezenas de minutos a muitas horas). Esta limitação cria não somente restrições de tempo, mas também limitam os experimentos de RMN

multidimensional (RMN nD) em estudos de fenômenos dinâmicos que ocorram numa curta escala de tempo, ou mesmo com técnicas hífenadas com a RMN.

Diversas metodologias foram propostas para contornar essa limitação e permitir a obtenção de espectros de RMN multidimensional em uma menor escala de tempo¹⁸⁻²³, dentre as quais e em especial, destaca-se a proposta feita por Frydman e colaboradores²⁴, conhecida como "RMN ultrarrápida" (RMN-UR), que permite a realização destes experimentos numa única varredura, com tempo total de aquisição da ordem de milissegundos.

1.2 - Ressonância Magnética Nuclear Ultrarrápida

A abordagem dos experimentos de RMN-UR difere da utilizada na RMN multidimensional tradicional, principalmente quanto a evolução dos spins e também no que se refere a aquisição dos dados. Em termos gerais, a realização de um experimento de RMN-UR envolve as etapas descritas na figura abaixo:

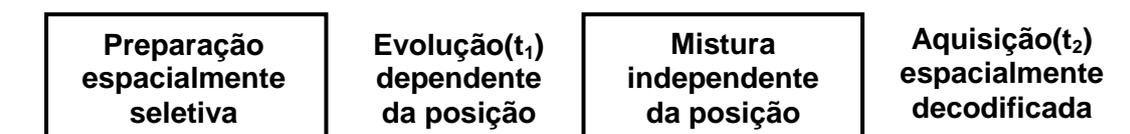


Figura 10. Representação de um esquema básico para a realização de um experimento de RMN-UR.

A etapa de preparação que no protocolo tradicional envolve a excitação uniforme dos spins, agora passa a utilizar a excitação espacialmente seletiva, também referida como codificação espacial. Isso é possível através da aplicação simultânea do gradiente de campo pulsado e do pulso de rf. Enquanto o pulso de gradiente faz com que a frequência de Larmor varie conforme a posição (Equação 1.8), o pulso de rf propicia a excitação dos spins de acordo com suas respectivas frequências. Logo, cada spin é excitado num tempo diferente e, dessa forma, cada um deles está submetido a um tempo de evolução (t_1) distinto²⁴.

O processo de mistura ocorre da mesma forma que o tradicional, isto é, sem dependência espacial. Já na etapa de aquisição, ocorre a decodificação das informações através de um esquema baseado na técnica de Imagem Eco-Planar(EPI)⁸.

1.2.1 - Método de excitação discreta

Inicialmente, os experimentos de RMN-UR foram propostos utilizando o protocolo de codificação espacial discreta²⁴. Neste esquema de excitação (Figura 11), ao invés de utilizar um único pulso, um trem de pulsos seletivos e consecutivos é aplicado na presença de pares de gradientes bipolares alternados ($\pm G_e$).

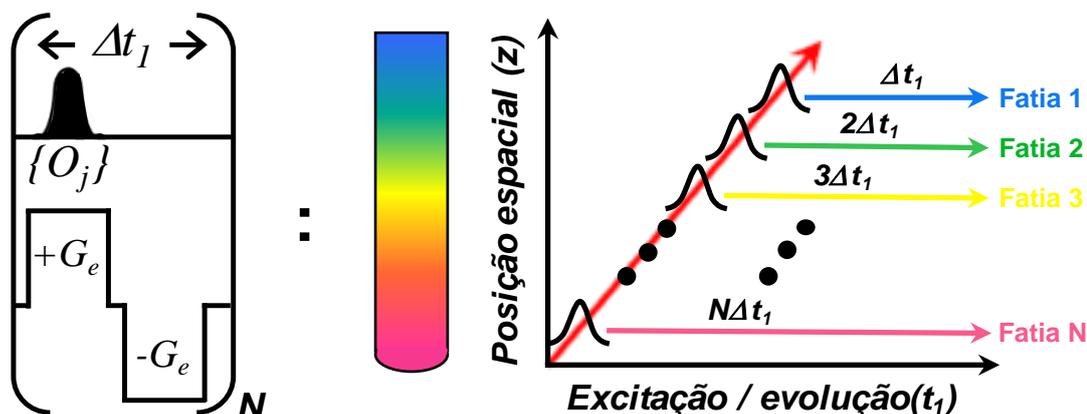


Figura 11. Esquema de excitação seletiva discreta proposto por Frydman e colaboradores²⁴.

Com isso, os spins da amostra ficam como que divididos em “fatias” e à medida que uma “fatia” é excitada as anteriores já estão evoluindo, sendo cada uma dessas “fatias” submetida a um tempo de evolução (t_1) diferente (Figura 12).

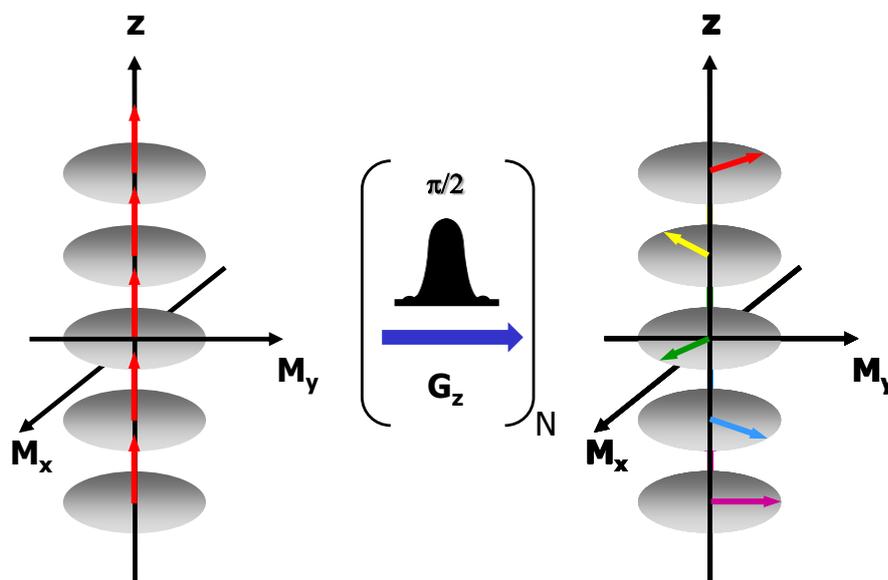


Figura 12. Representação gráfica das “fatias” excitadas sequencialmente e os respectivos tempos de evolução distintos.

A evolução de fase com dependência espacial dos spins surge da combinação das frequências de ressonância e do fato delas serem dependentes da

posição espacial e do uso de pulsos de rf com frequência variada²⁵. Esta evolução interna pode ser descrita como:

$$\phi_e(z) = C\Omega_1(z - z_0) \quad (1.16)$$

onde $\phi_e(z)$ indica a fase na posição z , Ω_1 representa a frequência de ressonância no referencial rotativo, e C é uma constante, ajustável pelos parâmetros de aquisição, que relaciona o grau de codificação espacial z com a extensão da evolução t_1 :

$$C = \frac{\Delta t_1}{\Delta z} = \frac{\Delta t_1 \gamma_e G_e}{\Delta O}, \quad \Delta O = |O_{i+1} - O_i| \quad (1.17)$$

onde Δt_1 é variação do tempo entre a aplicação de pulsos sucessivos, $\gamma_e G_e$ a força do gradiente na excitação e ΔO corresponde ao incremento constante do *offset* nos pulsos seletivos.

Entretanto, existem algumas desvantagens associadas ao esquema de codificação discreta. A primeira delas é a necessidade de uma comutação rápida dos gradientes, cuidadosamente sincronizada com o pulso de rf. Também existem os efeitos produzidos nos spins "fora de ressonância", em especial os deslocamentos de Bloch-Siegert²⁶, que podem tornar a evolução do deslocamento químico não linear em relação ao eixo z . A segunda desvantagem é o fato de ser impossível excitar a amostra completamente, salvo se os pulsos utilizados possuírem perfis de excitação perfeitamente retangulares²⁷. Ademais, a aplicação do esquema (Figura 11) leva ao aparecimento de picos fantasmas (*ghost peaks*) no domínio indireto²⁸.

1.2.2 - Método de excitação contínua

Para contornar essas limitações foram propostos diversos esquemas de codificação contínua visando substituir o esquema discreto, todos eles baseados na aplicação de pulsos com varreduras contínuas e em conjunto com gradientes bipolares.

O conceito comum nestas propostas é que a excitação ocorre de maneira contínua, já a codificação pode ser em função da amplitude²⁹ ou da fase^{27,30} (Figura 13).

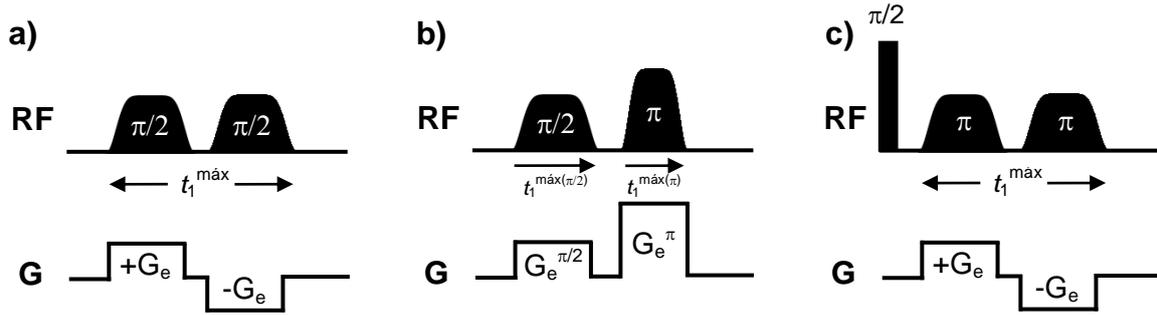


Figura 13. Representação esquemática de excitação contínua com codificação da amplitude (a), da fase com um eco de spin (b) e da fase com duplo eco de spin (b,c).

Neste trabalho, será detalhado somente o esquema de excitação contínua proposto por Pelupessy²⁷, que é uma das abordagens mais eficientes em termos de sensibilidade e resolução, utilizando a codificação da fase com duplo eco de spin.

1.2.2.1 - Codificação modulada pela fase com duplo eco de spin

O método proposto por Pelupessy²⁷ baseia-se na codificação modulada pela fase utilizando um duplo eco de spin (Figura 12c). Inicialmente, é aplicado um pulso não seletivo de 90° para levar o vetor magnetização M_0 para o plano transversal. Em seguida, um pulso adiabático de inversão com varredura linear de frequência é aplicado simultaneamente a um pulso de gradiente. O pulso adiabático propicia uma inversão precisa dos spins, porém quando utilizamos este pulso para induzir a refocagem, como neste caso, podem surgir diversas distorções de fase³¹. Além disso, a defasagem induzida ($\phi(z)$) apresenta dependência quadrática³² em relação ao termo z :

$$\phi(z) = \frac{(\Omega_1 + \gamma_e G_e z)^2 t_e^\pi}{\Delta\omega} \quad (1.18)$$

onde t_e^π corresponde ao tempo de duração do pulso adiabático e $\Delta\omega$ à faixa de frequência do pulso adiabático.

Para eliminar esse termo quadrático e as distorções de fase citadas, é aplicado um segundo pulso adiabático com varredura de frequência similar ao primeiro, juntamente com um gradiente de mesma amplitude e sentido oposto ao primeiro. Isso garante que os spins evoluam somente em função do deslocamento

químico, e não em função deste acrescido do efeito do gradiente de campo local. Por fim, a defasagem dos spins neste ponto ($\phi'(z)$) pode ser descrita como:

$$\phi'(z) = \frac{4t_e^\pi \Omega_1 \gamma_e G_e z}{\Delta O} \quad (1.19)$$

Através da equação 1.12, podemos notar que após o segundo pulso adiabático a defasagem é diretamente proporcional à posição. O termo $4t_e^\pi$ é igual ao dobro do tempo de duração dos pulsos adiabáticos, e indica que esta codificação com tempo constante é duas vezes mais eficiente quanto à evolução se comparada à codificação em tempo real. Além disso, este tempo total de evolução ($4t_e^\pi$) compensa a reduzida evolução efetiva associada ao fato de que, a faixa de frequência do pulso adiabático deve ser maior do que a criada pelos gradientes a fim de excitar uniformemente toda a amostra²⁷.

É importante ressaltar que tanto o pulso duro quanto os adiabáticos utilizados nesta etapa têm de ser precisamente calibrados. Do contrário, pode ocorrer uma diminuição significativa da sensibilidade dos experimentos de RMN-UR.

1.2.3 - Aquisição/decodificação dos dados

O esquema de aquisição utilizado na RMN-UR, baseado na EPI⁸, fundamenta-se na decodificação dos dados através da aplicação de pulsos bipolares de gradiente de campo ($\pm G_a$), após a etapa de mistura, para refocar a defasagem induzida durante a codificação espacial. Isto leva à formação de um eco cuja posição é diretamente proporcional à frequência de ressonância codificada^{33,34} e dada por:

$$k = \int_0^{t_2} \gamma_a G_a(t) dt \quad (1.20)$$

onde k é o número de onda dependente do gradiente, ou seja, representa a posição na qual a defasagem criada pela excitação seletiva é completamente removida pelo efeito de refocalização do gradiente³³.

O valor de k se refere à posição do eco e, por isso, após o processamento do espectro de RMN-UR, os valores adquiridos das frequências dos núcleos não estão corretamente ajustados. Por isso, é necessário realizar a

calibração da frequência de um sinal conhecido, para que então as demais frequências tenham seus respectivos valores ajustados corretamente, pois a posição dos ecos é diretamente proporcional à frequência de ressonância dos núcleos codificados especialmente. A cada par bipolar de gradiente aplicado dois conjuntos opostos de ecos são formados (Figura 14).

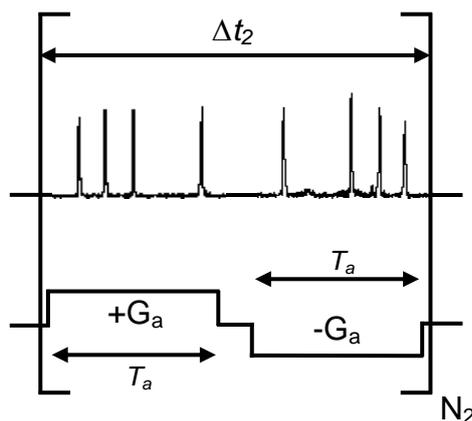


Figura 14. Representação esquemática da decodificação dos sinais na RMN-UR, onde um par bipolar de gradientes é aplicado N_2 vezes, durante toda a aquisição, para amostrar adequadamente o espaço k .

Numa analogia com os experimentos de RMN multidimensional tradicional, o número de repetições do bloco de aquisição (N_2) corresponderia ao número de pontos utilizados no domínio de tempo indireto t_1 . Com a refocagem dos spins ocorrendo várias vezes temos a formação dos sucessivos ecos que compõem a primeira dimensão (ν_1), também chamada de dimensão ultrarrápida, que é obtida diretamente sem a necessidade de aplicar a transformada de Fourier. Estes ecos sucessivos estão sujeitos a evolução em função de t_2 (ν_2), possibilitando assim que a frequência interna em t_2 (ν_2) também seja monitorada, compondo então a segunda dimensão também chamada de dimensão convencional³³. A fase desta evolução é descrita como:

$$\phi = k \cdot z + t_2 \cdot \nu_2 \quad (1.21)$$

Esta evolução na presença de gradientes bipolares ($\pm G_a$) pode ser representada como uma trajetória em zig-zag no espaço k (Figura 15), que para uma correta digitalização exige um *dwell time* curto o suficiente (em torno de $1,0 \mu\text{s}$) para

permitir a caracterização de maneira sequencial tanto do comportamento de k quanto de t_2 ³³.

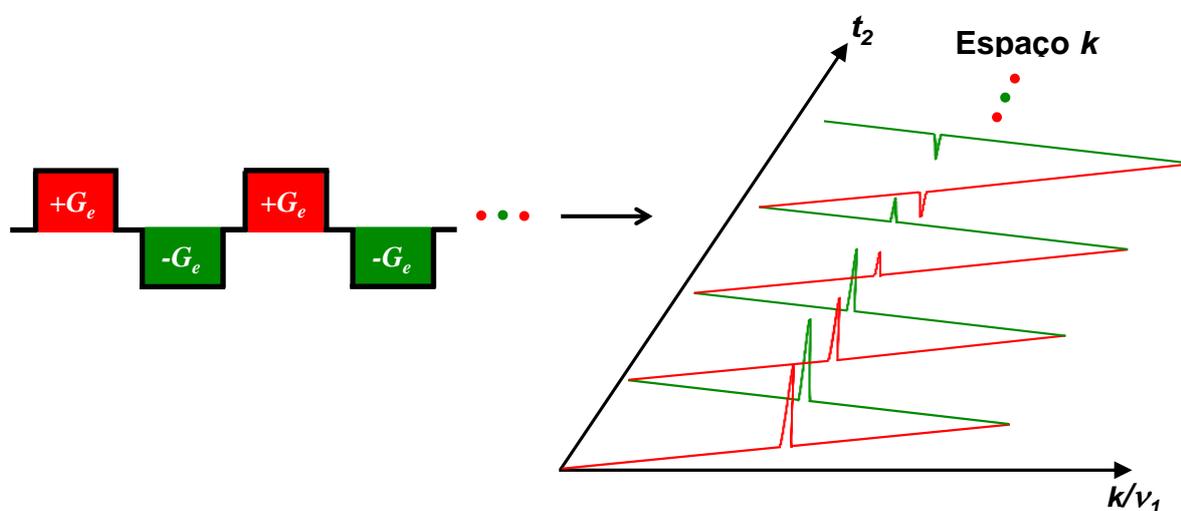


Figura 15. Representação gráfica da formação do espaço k oriundo do esquema de aquisição, baseado na EPI⁸, utilizado na RMN ultrarrápida.

Portanto, diferentemente das várias varreduras requeridas na RMN 2D tradicional (Figura 16a), na RMN-UR numa única varredura é formado o espaço k , e com isso o espectro de RMN 2D (Figura 16b).

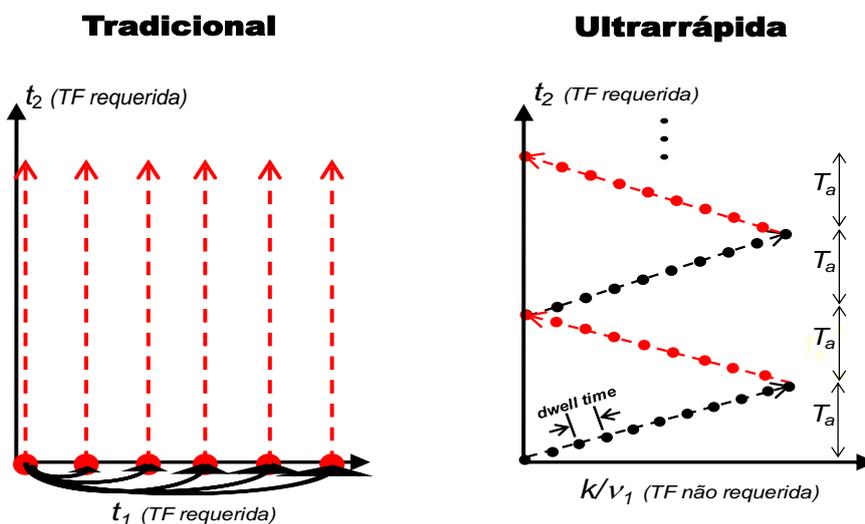


Figura 16. Representação esquemática da comparação entre o esquema de aquisição de um experimento de RMN 2D tradicional (a) e ultrarrápida (b).

1.3 - Estudos de Processos Dinâmicos via RMN-UR

No esquema de aquisição de experimentos de RMN nD está implícita a necessidade de muitas varreduras com o incremento dos tempos de espera. Conforme citado anteriormente, isto implica em elevados tempos de aquisição, assim como no possível aparecimento de muitos ruídos na dimensão t_1 , pois os incrementos requeridos tornam estes experimentos bastante sensíveis às instabilidades ocorridas ao longo do tempo³⁵. Tais desvantagens limitam muito a aplicação de experimentos de RMN convencional em estudos de processos dinâmicos de curta duração, como, por exemplo, os da ordem de milissegundos.

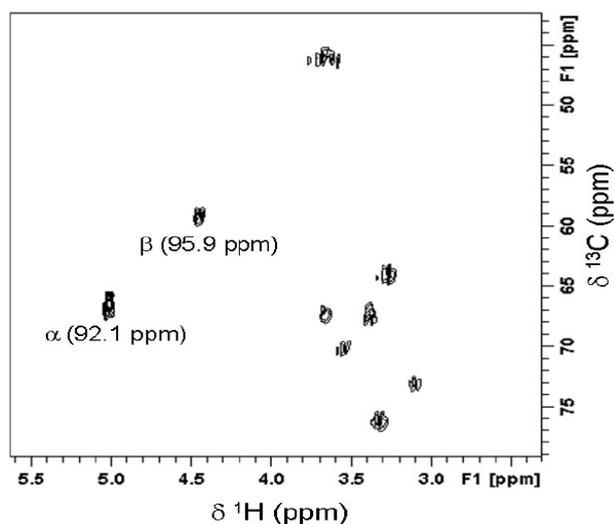
Com o surgimento dos experimentos de RMN-UR²⁴, essa fronteira imposta aos fenômenos de curta duração foi superada, ampliando ainda mais o número de ferramentas passíveis de serem utilizadas em estudos conformacionais³⁶ e de mecanismos de reações orgânicas^{37,38}, monitoramento de separações cromatográficas em tempo real³⁹, dentre outros.

1.3.1 - Estudo cinético da mutarrotação da D-glicose

Ao dissolvermos a α -D-glicose em solução tem início um processo conhecido como mutarrotação, no qual os compostos anômeros apresentam interconversão. No caso de açúcares cíclicos esta interconversão ocorre entre as formas anoméricas α e β . Normalmente, os estudos cinéticos via RMN deste fenômeno são confinados a serem realizados em solventes deuterados³⁸, haja vista que os picos dos solventes podem afetar muito a precisão do estudo. Por exemplo, se usarmos água não deuterada, os sinais dos prótons anoméricos são diretamente afetados pelo sinal da água, e mesmo uma pré-saturação deste sinal não resolveria completamente o problema.

Recentemente, Giraudeau e colaboradores³⁶ reportaram um estudo cinético da mutarrotação da D-glicose em água não deuterada, utilizando o experimento de RMN 2D HSQC, no qual os sinais dos hidrogênios anoméricos não são afetados pelo sinal da água. Entretanto, como o equilíbrio é alcançado em aproximadamente três (3) h³⁹, realizar este experimento no modo convencional impossibilitaria um monitoramento mais preciso da cinética da mutarrotação, já que

o tempo de aquisição seria elevado. Logo, o estudo em questão foi realizado utilizando o experimento de HSQC no modo ultrarrápido (HSQC-UR), onde com somente 16 varreduras (82 segundos) foi possível obter o espectro 2D (Figura 17).

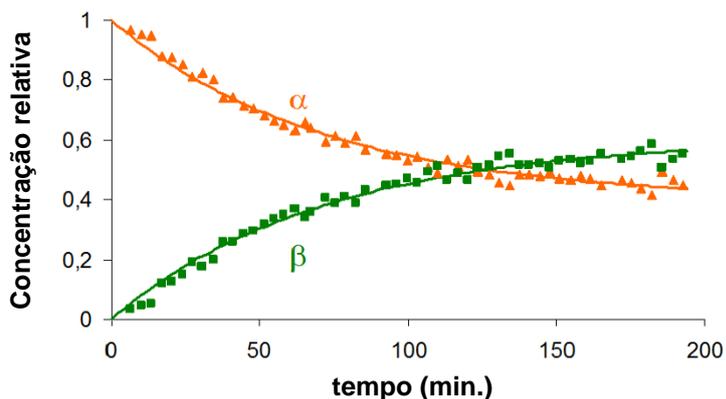


Reproduzido com permissão da ref. 36. Direitos autorais 2011 Simplex Academic Publishers.

Figura 17. Espectro de RMN 2D HSQC-UR da D-glicose, cujos anômeros rebatidos para dentro da janela indicam os valores dos deslocamentos químicos reais.

Os sinais dos prótons anoméricos na figura 17 (95,9 e 92,1 ppm) foram rebatidos na dimensão ultrarrápida, através do ajuste dos gradientes aplicados antes e depois da etapa de mistura⁴².

Após a dissolução da D-glicose em água não deuterada, foi realizada uma série de experimentos de HSQC-UR intercalados a cada três (3) minutos, de modo a caracterizar corretamente a mutarrotação. As concentrações relativas de ambos anômeros foram ajustadas a um modelo matemático de cinética de primeira ordem. Os resultados experimentais e do modelo em questão apresentaram uma excelente correlação (Figura 18), ilustrando assim uma potencialidade da RMN-UR nos estudos dinâmicos em tempo real.



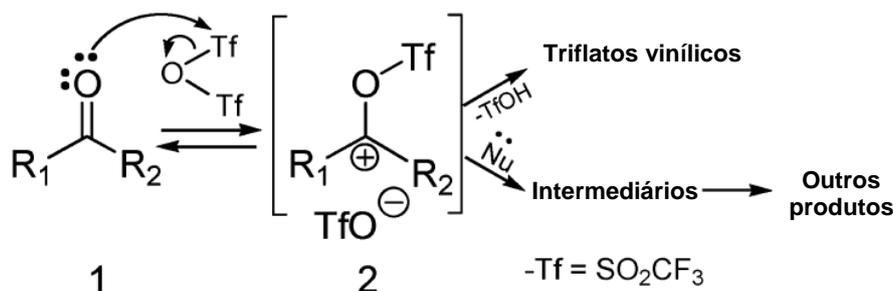
Reproduzido com permissão da ref. 36. Direitos autorais 2011 Simplex Academic Publishers.

Figura 18. Gráfico da cinética da mutarrotação da D-glicose em água. Concentração relativa obtida pelo cálculo do volume relativo dos picos cruzados anoméricos no espectro de HSQC-UR, representada em função do tempo.

1.3.2 - Mecanismo de reação orgânica

Outra aplicação da RMN-UR é o monitoramento de reações orgânicas em tempo real. Recentemente, Herrera e colaboradores³⁸ realizaram um estudo sobre o mecanismo envolvido na síntese de alquilpirimidinas a partir de cetonas alifáticas.

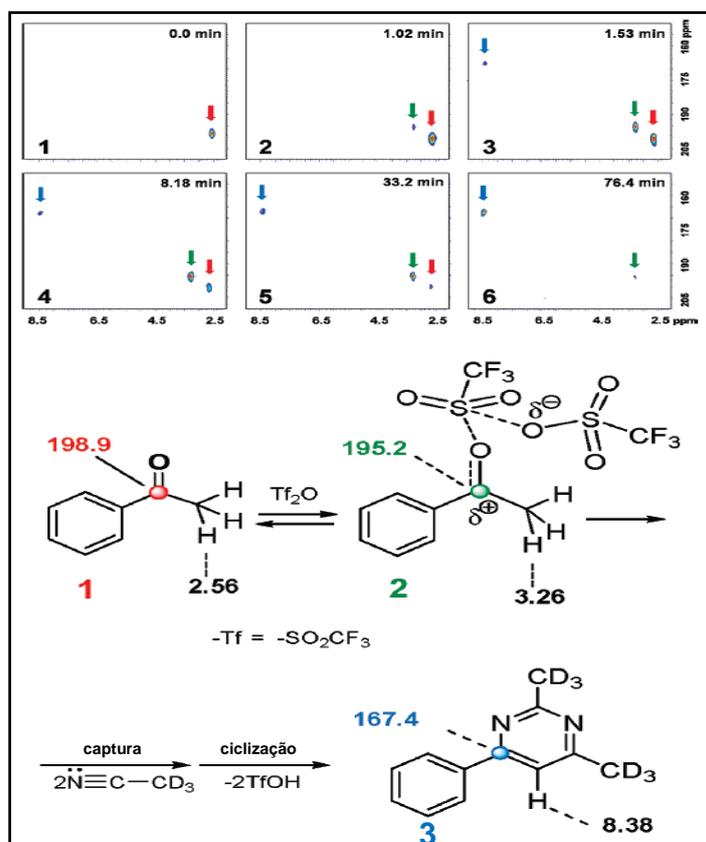
Os mecanismos envolvidos nas reações de compostos carbonílicos e anidridos trifluormetanossulfônicos ou tríflicos (Tf_2O) é bastante conhecida, e a proposta mais aceita indica a formação de um carbocátion (**2**) de vida média com um tempo muito curto, oriundo do ataque eletrofílico do anidrido tríflico no oxigênio carbonílico (**1**). Dependendo das condições da reação e/ou da natureza do composto carbonílico, o intermediário **2** pode levar à formação de triflatos vinílicos ou mesmo a outros produtos (Figura 19).



Adaptado com permissão da ref. 38. Direitos autorais 2010 American Chemical Society.

Figura 19. Esquema reacional de possíveis reações entre anidridos tríflicos e cetonas.

No estudo em questão, os reagentes utilizados foram acetofenona com carbonila marcada (^{13}C) e acetonitrila- d_3 . A evolução do carbono carbonílico foi monitorada através do experimento de HMBC no modo ultrarrápido (HMBC-UR), acompanhando duas janelas diferentes devido à limitação em termos de janela espectral da RMN-UR⁴². Os experimentos foram realizados a cada 10s durante 1h e 52min, resultando num total de 438 experimentos. Dentre estes, 6 experimentos foram selecionados e possibilitaram o monitoramento (150-210 ppm ^{13}C ; 2-9 ppm ^1H) da evolução do carbono carbonílico, conforme pode ser verificado na figura 20.



Adaptado com permissão da ref. 38. Direitos autorais 2010 American Chemical Society.

Figura 20. Esquema da série de 6 experimentos de HMBC-UR com os picos cruzados do reagente **1**, intermediário **2** e produto **3**.

O espectro HMBC-1 correspondente à condição inicial que antecede a adição de Tf_2O , mostra um pico cruzado (198,9-2,56 ppm) referente ao acoplamento dos hidrogênios metílicos com o carbono carbonílico da acetofenona **1**. Após a adição de Tf_2O , ocorreu no HMBC-2 uma ligeira mudança na posição do pico cruzado de **1**, e observou-se o aparecimento de um novo pico cruzado (195,2 - 3,26 ppm) associado ao intermediário **2**, com base em dados da literatura^{43,44} e pelo valor

do deslocamento químico calculado pelo programa ACD/Laboratories 8.00 Release. Este sinal apresentou aumento e diminuição da intensidade no decorrer da reação, o que segundo os autores condiz com seu caráter de intermediário.

O pico cruzado referente à pirimidina **3** (167,4-8,38 ppm) surgiu no espectro HMBC-3 e teve sua intensidade aumentada até o fim do monitoramento (HMBC-6). Foi possível observar também que o pico relativo à acetofenona **1** diminuiu gradativamente (HMBC-1 a HMBC-5) até desaparecer no HMBC-6, restando neste somente o pico de baixa intensidade do intermediário **2**, e o referente ao produto **3** de intensidade elevada.

Outra janela (120-180 ppm ^{13}C ; 2-9 ppm ^1H) foi monitorada e, através desta foi possível verificar a presença de uma mistura de outros dois intermediários. Com isso, foi possível evidenciar o grande potencial que o experimento de HMBC-UR possui para monitorar uma reação orgânica, e fornecer informações importantes tanto de cunho mecanístico quanto estrutural da evolução do centro reativo.

1.3.3 - Monitoramento de separação cromatográfica em tempo real

Atualmente, inúmeros estudos de misturas complexas contendo compostos com atividade biológica utilizam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para separação e/ou purificação destes. Por vezes, a técnica CLAE é utilizada juntamente com técnicas espectroscópicas e/ou espectrométricas, sendo estas associações conhecidas como técnicas hifenadas⁴⁴, dentre as quais destaca-se a separação via cromatografia líquida (CL) aliada à Ressonância Magnética Nuclear (RMN)⁴⁵.

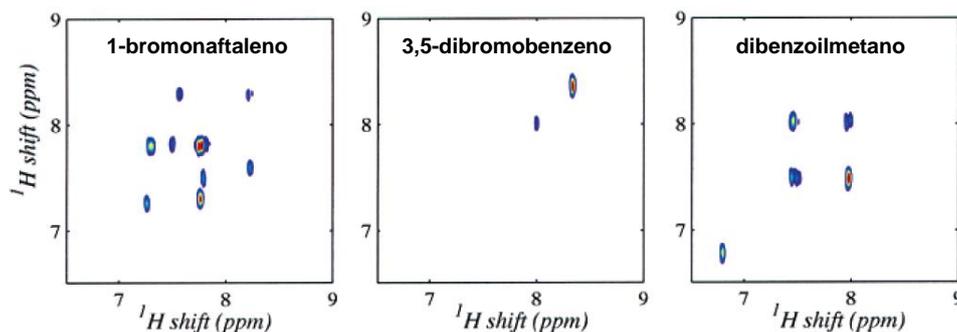
Na técnica CLAE-RMN a análise pode ser feita em modo contínuo (*on-flow*), com a realização de uma série de experimentos de ^1H à medida que os compostos vão eluindo da coluna, ou no modo estático (*stop-flow*). Neste último, o pico selecionado previamente é encaminhado ao espectrômetro de RMN, e quando estiver localizado na região de detecção a corrida cromatográfica é interrompida e a análise espectroscópica é realizada. Ainda tratando do modo estático, outra alternativa é utilizar um dispositivo pós-coluna de extração em fase sólida (EFS), onde as frações podem ser coletadas individualmente logo após a eluição, concentradas em cartuchos com adsorventes apropriados e analisadas uma a uma através da RMN^{47,48}.

Mesmo não permitindo o acompanhamento em tempo real da separação cromatográfica, e necessitando muitas vezes de um conjunto de equipamentos mais sofisticados, o modo parado é geralmente mais utilizado do que o contínuo. Isto se deve ao fato de permitir a realização de experimentos de RMN 2D, propiciando assim um estudo estrutural mais completo das substâncias separadas, além de permitir a realização de vários experimentos. Para a execução de experimentos de RMN 2D tradicionais, temos que considerar o elevado número de varreduras e dos experimentos na dimensão t_1 , o que, implicará num tempo de análise mais elevado do que simples experimentos de RMN de ^1H , sendo esta uma das razões principais para a escolha do modo estático. Entretanto, este modo apresenta um problema que pode comprometer os possíveis bons resultados, pois quando uma corrida cromatográfica é interrompida, se o analito eluído for de um pico largo, ele poderá contaminar os próximos picos devido ao efeito de difusão dentro da própria célula de fluxo do espectrômetro⁴⁷.

Visando contornar a limitação do CL-RMN no modo contínuo e permitir a obtenção de espectros de RMN 2D, Frydman e colaboradores³⁹ realizaram um estudo com experimentos de RMN-UR, para investigar se seria possível acompanhar as separações cromatográficas em tempo real de uma mistura de 3 compostos: 1-bromonaftaleno, 3,5-dibromobenzeno e dibenzoilmetano.

Por não disporem de um equipamento acoplado CLAE-RMN, eles modificaram uma sonda de 5 mm, fabricada pela empresa Bruker, e instalaram uma célula centrada na posição da bobina de detecção do espectrômetro, fazendo com que houvesse uma conexão de entrada e saída do fluxo advindo de uma coluna de vidro.

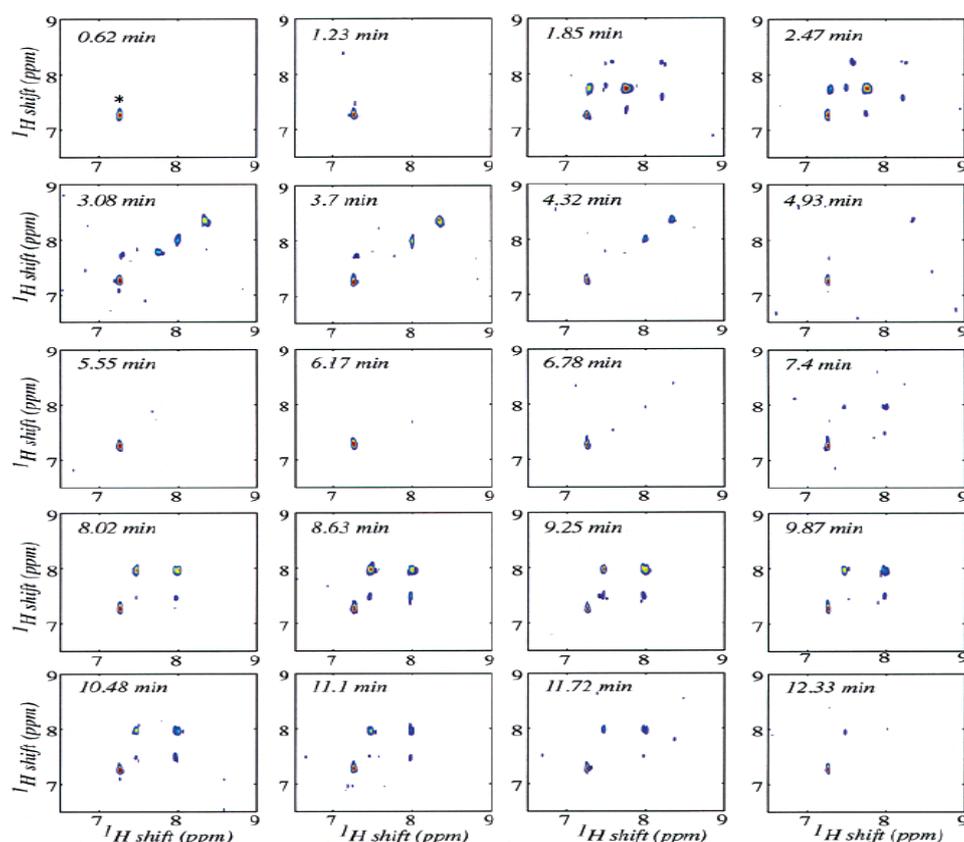
Inicialmente, foram feitos alguns experimentos de TOCSY ultrarrápido (TOCSY-UR) para caracterizar os sinais de cada um dos compostos em estudo (Figura 21).



Adaptado com permissão da ref. 39. Direitos autorais 2004 American Chemical Society.

Figura 21. Representação de espectros individuais de TOCSY-UR do 1-bromonaftaleno, 3,5-dibromobenzeno e dibenzoilmetano.

Como esta separação envolveu tempos de retenção da ordem de minutos, foi possível realizar experimentos de TOCSY-UR com 8 varreduras utilizando fase cíclica, e intercalados por um tempo de reciclagem de 4 segundos, de modo a aumentar a relação sinal/ruído. Com isso, foram coletados 30 espectros durante a corrida cromatográfica, dentre os quais 20 foram destacados conforme a figura 22.



Adaptado com permissão da ref. 39. Direitos autorais 2004 American Chemical Society.

Figura 22. Representação da série de 20 experimentos de TOCSY-UR registrados no decorrer da corrida.

Ao analisar a série de espectros apresentados na figura 22, foi possível observar padrões característicos das correlações esperadas à medida que a eluição ocorria, e estas foram surgindo e desaparecendo gradualmente ao longo do tempo, comprovando assim a viabilidade do uso de experimentos de RMN-UR para o acompanhamento de separações cromatográficas em tempo real.

1.4 - Química Computacional

Com o intuito de explicar a dinâmica dos átomos e dos sistemas nucleares, a partir de 1900, foram desenvolvidas diversas teorias que se enquadram numa denominação comum: “Mecânica Quântica” (MQ).

A teoria proposta no ano de 1900 pelo alemão Max Planck foi uma propulsão inicial para o surgimento desse novo ramo científico¹. Planck propôs que as emissões atômicas para uma determinada frequência não ocorrem de forma contínua, como indicariam as Leis Clássicas da Física, mas em pequenos pacotes, que só podem ser emitidos quando a energia disponível para isso atinge valores que são múltiplos inteiros de um certo valor mínimo dado pelo produto da frequência, em questão, por uma constante h que se tornou conhecida desde então como constante de Planck⁴⁹. Tais pacotes de energia foram chamados de *quanta*, o plural da palavra latina *quantum*, que possui o mesmo radical de “quantos” ou “quantidade”. Desde então sucessivas teorias, tal como a do efeito fotoelétrico de Einstein⁵⁰, foram desenvolvidas e contribuíram indispensavelmente para a consolidação da MQ, como sendo uma ferramenta de extensivas aplicações em diversos campos científicos, e não destinada ao fracasso fora dos domínios do átomo.

1.4.1 - Métodos de estrutura eletrônica

Os métodos de estrutura eletrônica da matéria se fundamentam na MQ e possibilitam uma descrição detalhada da distribuição eletrônica nas moléculas, tendo em vista que os elétrons são partículas muito leves, o que impossibilita uma descrição correta através da Mecânica Clássica (MC). O objetivo principal desses métodos é propiciar a resolução da equação de Schrödinger independente do tempo:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1.22)$$

onde E representa a energia do sistema, \hat{H} é o operador Hamiltoniano e Ψ é a função de onda que descreve o elétron. Nos métodos aqui tratados é utilizada uma importante simplificação, tanto conceitual quanto computacional, pela introdução de modelos independentes de partículas, onde o movimento de um elétron é considerado independente da dinâmica de todos os outros elétrons⁵¹.

1.4.1.1 - DFT (Teoria do Funcional de Densidade)

O método DFT foi desenvolvido em 1964 por Hohenberg e Kohn⁵², que demonstraram ser possível determinar a energia eletrônica do estado fundamental, através da densidade eletrônica ρ . Se pensarmos numa função de onda para um sistema de N elétrons que contém $4N$ variáveis, sendo 3 espaciais e uma coordenada de spin, a medida que a complexidade da função cresce exponencialmente com o número de elétrons, a densidade eletrônica tem o mesmo número de variáveis, tendo em vista que a densidade é o quadrado da função de onda, integrado sobre $N-1$ coordenadas eletrônicas e cada densidade de spin só depende de 3 coordenadas espaciais. A grande questão é que apesar de cada densidade resultar numa diferente energia do estado fundamental não havia, até o teorema de Hohenberg-Kohn ser elaborado, um funcional (uma rotina de execução para produzir um número através de uma função) que conectasse estas duas quantidades. O método DFT possibilita a conexão entre a densidade eletrônica com a energia^{52,53}.

Os primeiros métodos DFT buscavam expressar todos os componentes da energia como um funcional da densidade eletrônica, mas por ter baixo desempenho os métodos baseados na função de onda tiveram maior preferência. Em 1965, Kohn e Sham sugeriram que a energia cinética do elétron podia ser calculada a partir de um conjunto auxiliar de orbitais, usados para representar a densidade eletrônica. Para que a eficiência do método DFT aumentasse foram desenvolvidos métodos de gradientes corrigidos ou métodos generalizados de gradiente. Dentre as várias formas de funcionais de gradientes corrigidos a versão mais utilizada é a desenvolvida por Lee, Yang e Parr (LYP)⁵⁴, que é submetido a um

tratamento matemático conhecido como correção de gradiente de Becke⁵⁵, de forma que o conjunto formado por esses três parâmetros passa a ser chamado B3LYP.

A vantagem do método DFT frente a muitos outros, dá-se através do fato de que neste método o número de variáveis se mantém constante independentemente do número de elétrons, o que não ocorre, por exemplo, no método de Hartree-Fock, no qual as funções de onda tornam-se mais complexas na medida em que o número de elétrons do sistema aumenta. Além disso, podemos citar que o método DFT leva em consideração as relações eletrônicas existentes nas moléculas^{52,53}.

Os grandes avanços em termos de precisão para aplicações químicas, propiciados pelas contribuições, em especial, de W. Kohn e J. A. Pople renderam a estes dois cientistas o prêmio Nobel em Química no ano de 1998⁵⁶.

1.4.1.2 - MØller-Plesset

A formulação perturbativa mais popular é a teoria de perturbação de Rayleigh-Schrödinger, e tem como ideia central dividir o Hamiltoniano em uma parte principal que possui autofunções conhecidas (Hamiltoniano não perturbado) e uma parte restante, chamada perturbação. A energia exata é obtida da soma de infinitas contribuições de perturbação, chamadas perturbações de diversas ordens. Uma teoria que deriva desta primeira é a teoria de perturbação de Møller-Plesset (MP), também conhecida como teoria de perturbação de muitos corpos (MBPT), que baseia-se na de Rayleigh-Schrödinger porém com o uso da partição do Hamiltoniano eletrônico proposta por MP. Dentre as aproximações mais utilizadas na MBPT estão a de ordem 2 (MP2), 3 (MP3) ou 4 (MP4)⁵⁸.

Embora a teoria de perturbação seja um método bastante usado, circunstâncias existem em que a série de perturbação é divergente. Um esquema alternativo, capaz de fornecer a energia de correlação eletrônica de modo eficiente é o método de “coupled cluster” (cc). O método cc foi inicialmente desenvolvido por Coester e Kümmel na década de 50 para estudos relacionados a fenômenos físicos nucleares, mas para a química quântica ganhou uma importância maior depois que Cizek e Paldus, na década de 60, reformularam o método para incluir a correlação eletrônica em átomos e moléculas. De modo geral, ele trata um sistema de muitos elétrons separando-o em vários aglomerados (“clusters”) com poucos elétrons. Feito

isso, calculam-se as interações entre os elétrons de um mesmo aglomerado e depois entre diferentes aglomerados⁵⁸.

1.4.2 - Conjunto de bases

Um conjunto de funções usado para descrever matematicamente os orbitais de um composto químico é chamado de conjunto de bases. Expandir uma função desconhecida, como a de um orbital molecular, num conjunto de funções conhecidas não seria uma aproximação se o conjunto de bases fosse completo. Entretanto, um conjunto de bases completo significa que um infinito número de funções precisa ser usado, o que não é possível nos cálculos atuais. A escolha correta do conjunto de bases tanto em termos de precisão quanto ao de tempo de cálculo, é extremamente importante⁵¹.

Dois tipos de funções de base comumente utilizados em cálculos de estrutura eletrônica são os orbitais do tipo Slater (STO) e orbitais do tipo Gaussian (GTO). Os STOs e os GTOs podem ser utilizados juntos para formar uma base completa, entretanto é necessário um número maior de GTOs, em comparação ao de STOs, para alcançar certo nível precisão^{57,58}.

Uma nova implementação de conjunto de bases foi obtida dobrando o número de gaussianas em relação ao conjunto mínimo, produzindo a base do tipo Double Zeta (DZ). O termo zeta é derivado da letra grega ζ (zeta) que representa o expoente da função de base STO. Uma base DZ faz uso de 2 funções s (1s e 1s') para hidrogênio, 4 funções s (1s, 1s', 2s e 2s') e 2 conjuntos de funções p (2p e 2p') para os elementos do 1º período da tabela periódica, e assim sucessivamente. Isso confere uma descrição mais apurada e precisa, por exemplo, da distribuição eletrônica que é diferente em diferentes direções. Tendo em vista que os orbitais internos não sofrem influência tão significativa em comparação aos orbitais de valência, atualmente, o dobro de orbitais raramente é considerado. Desse modo, uma variação da base DZ é geralmente utilizada, na qual somente é considerado o dobro do número de orbitais de valência, gerando assim um conjunto de base de valência dividida (VDZ). Analogamente também há a Triple Zeta (TZ), Quadruple Zeta (QZ) e Quintuple Zeta (5Z). Quanto maior for o expoente da função de base STO, maior também será a precisão dos cálculos, aumentando para tal o tempo de cálculo⁵⁸.

Outro tipo de função de base muito importante é a base de correlação consistente (cc), conhecida como de Dunning, na qual há a recuperação da energia de correlação dos elétrons de valência. Além disso, esta base não possui algumas restrições apresentadas pelas bases anteriormente descritas, sendo dessa forma mais flexíveis, porém computacionalmente mais custosas. Dentre as bases de Dunning mais utilizadas estão a cc-pVDZ (correlação consistente polarizada de valência *Double Zeta*)⁵⁹ e cc-pVTZ⁶⁰ (correlação consistente polarizada de valência *Triple Zeta*).

1.4.3 – Cálculos de propriedades de RMN

Os cálculos de propriedades RMN são realizados em termos da teoria da perturbação descrita por Ramsey. Propriedades como a constante de acoplamento, susceptibilidade magnética e deslocamento químico (obtido através do tensor de blindagem) podem ser calculadas através de modelos teóricos, nos quais o campo magnético externo é tratado como uma perturbação⁶¹.

Quando descrevemos o campo magnético externo, é apropriado escrevermos o potencial vetorial magnético (A) como:

$$A(r) = \frac{1}{2} \mathbf{B} \times (r - R_0) \quad (1.23)$$

Na equação 1.16 R_0 é a origem *gauge*, que representa o ponto zero do vetor potencial. Geralmente, a origem *gauge* do vetor potencial magnético é tomada como o centro de massa do sistema, mas com a mudança da origem deste vetor podem ser desenvolvidos diferentes modelos teóricos. Dentre os modelos utilizados para realizar cálculo de propriedades de RMN, o mais utilizado para esse tipo de cálculo é o GIAO (*Gauge Independent Atomic Orbital*)^{62,63}, que define para cada átomo, independentemente, uma origem do potencial vetorial do campo magnético externo.

1.4.4 – Cálculos de NBO (*Natural Bond Orbital*)

O cálculo do orbital natural de ligação (NBO) toma por base a densidade eletrônica entre os átomos para descrever os orbitais das ligações moleculares. Estas ligações são descritas segundo o padrão de pares eletrônicos da teoria de Lewis, e os orbitais de ligação são computados a partir dos orbitais naturais híbridos, de modo a representarem a densidade eletrônica máxima⁵⁸.

O NBO pode descrever uma ligação σ ou π , e para cada NBO ligante formado há também a formação do correspondente antiligante. O cálculo do NBO também envolve a análise das interações entre NBOs ligantes e antiligantes que constituem um sistema eletrônico doador-aceitador. Essas interações são mensuradas através da energia de estabilização ou delocalização de segunda ordem ($\Delta E^{(2)}$), e quanto maior for o valor desta energia maior também será a interação doador-aceitador eletrônico. É importante destacar que também é possível avaliar interações não ligantes com esta teoria⁵⁸.

1.5 - Linguagem de programação C

O C é uma linguagem de programação genérica, imperativa, estruturada e padronizada pela Organização Internacional para Padronização (ISO). Ela foi criada por Dennis Ritchie nos laboratórios da empresa AT&T Bell para superar as limitações da linguagem B (criada por Ken Thompson) e, posteriormente, utilizada para reescrever o sistema operacional UNIX, que se tornou um dos primeiros sistemas operacionais desenvolvidos em linguagem diferente de *assembly*^{64,65}.

A linguagem C possui características tanto de baixo quanto de alto nível, o que confere ao C uma grande versatilidade e contribuiu para que se tornasse uma das linguagens mais amplamente utilizadas de todos os tempos⁶⁶, sendo possível com ela desenvolver sistemas operacionais e diversos tipos de programas como de comunicação, automação industrial, gerenciadores de banco de dados, e até mesmo programas voltados para a solução de problemas em estatística, matemática, física, química, dentre outras áreas⁶⁷. Além disso, vários

programas voltados para a aquisição e/ou processamento de dados de RMN fazem uso do C como uma de suas linguagens básicas.

Um programa em C é escrito numa linguagem lógica que é compreendida pelo programador, mas não diretamente pela máquina. Por isso, é necessário que antes da execução o programa seja compilado, que nada mais é do que ser traduzido para a linguagem de máquina. Grande parte dos sistemas operacionais atuais possui compiladores C e, com isso, um código escrito num sistema pode com pouca ou mesmo nenhuma alteração ser compilado e executado normalmente em outro sistema que possua tal compilador. Isso confere uma característica de portabilidade que é marcante nesta linguagem⁶⁵.

Vale ressaltar que o C influenciou a criação de várias linguagens de programação, dentre as quais podemos citar a conhecida C++, inicialmente derivada do C para suportar a programação utilizando orientação a objetos⁶⁸.

OBJETIVOS

2 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

1. Implementar e otimizar as sequências de pulso de COSY e HSQC no modo ultrarrápido (COSY-UR e HSQC-UR), nos espectrômetros de RMN do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar, visando assim descrever um protocolo detalhado para implementação destes experimentos.

2. Desenvolver um algoritmo em linguagem de programação C e incorporá-lo ao programa computacional do próprio espectrômetro, de modo a permitir o processamento dos dados de RMN-UR, e conseqüentemente a obtenção dos espectros em tempo real.

3. Realizar a identificação em tempo real de uma mistura dos flavonoides: epicatequina, naringenina e naringina, submetida à separação cromatográfica num sistema CLAE-RMN em modo de fluxo contínuo, através da realização de experimentos de RMN 2D COSY-UR.

4. Monitorar a reação de hidrólise do acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano com o experimento de RMN HSQC-UR, a fim de inferir a respeito do mecanismo da reação por meio da identificação de intermediário(s).

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3 - Procedimentos Experimentais

3.1 - Materiais e equipamentos

a) Espectrômetros de RMN

Os estudos de implementação e monitoramento de reação foram realizados no laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar, nos seguintes equipamentos:

- Espectrômetro Bruker Avance III - 9,4 Tesla, cujas frequências para ^1H e ^{13}C são 400,15 MHz e 100,62 MHz, respectivamente. A sonda utilizada foi a modelo *SmartProbe*TM para tubos com diâmetro de 5 mm, sendo esta equipada com uma bobina de gradiente de campo no eixo z (50 G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*). A bobina de detecção mais interna pode ser sintonizada para observar tanto ^{19}F quanto outros núcleos que esteja na faixa de ^{31}P e ^{15}N . Já a bobina mais externa é sintonizada para ^1H tanto no modo observação quanto no desacoplamento. Esta sonda foi projetada para permitir detectar de forma direta os núcleos X ($^{31}\text{P} - ^{15}\text{N}$).

- Espectrômetro Bruker Avance III - 9,4 Tesla, com frequências para ^1H e ^{13}C iguais a, respectivamente, 400,13 MHz e 100,62 MHz. Equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI - *Broadband Inverse*) para tubos com diâmetro de 5 mm, sendo munida de uma bobina de gradiente de campo no eixo z (50 G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*).

b) Sistema CLAE-RMN

Cromatógrafo líquido de alta eficiência AGILENT TECHNOLOGIES 1200 SERIES, contendo uma bomba quaternária com degaseificador G1322A, um detector ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) G1315D e um auto injetor G1329A. Utilizou-se uma coluna Kromasil 100-5-C18 (5 μm , 100 \AA , 25 cm x 4.6 mm) do fabricante AkzoNobel. O controle do cromatógrafo foi realizado através do software HyStar 3.2.

Este sistema cromatográfico está acoplado a um espectrômetro Bruker Avance III – 14,1 Tesla, com frequências para ^1H e ^{13}C iguais a 600,23 MHz e 150,93 MHz, respectivamente. Equipado com uma sonda criogênica TCI (Triple-resonance Cryprobe Inverse) de 5 mm, na qual as bobinas de ^1H e ^{13}C e o pré-amplificador são refrigerados por hélio, permitindo um aumento significativo da sensibilidade, que nesse caso é 4 vezes maior em comparação à sensibilidade das sondas convencionais. Esta sonda possui uma bobina de gradiente de campo no eixo z (53 G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*). Para permitir o acoplamento CLAE-RMN foi instalado o acessório *CryoFIT*TM, que é inserido na sonda e possui capilares, nas extremidades, que são conectados ao CLAE, além de possuir uma cela de detecção com um volume total de 60 μL .

c) Outros

Para efetuar a pesagem dos compostos estudados foi utilizada uma balança analítica digital Bioprecisa (modelo FA-2104N) com precisão de 0,1 mg.

3.2 - Preparo das amostras

a) Solventes deuterados

Os solventes deuterados utilizados nas análises de RMN foram:

- **Óxido de deutério (D_2O):** comercializado pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) com pureza de 99,9%.
- **Clorofórmio-D (CDCl_3):** comercializado pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) com pureza de 99,8%.
- **Metanol-D4 (MeOD):** comercializado pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) com pureza de 99,8%.

b) Amostras para implementação

As amostras padrão utilizadas na implementação dos experimentos de RMN-UR foram de H₂O/D₂O (90:10 – 600 µL) e de 1-bromohexano (200 µL em 400 µL de CDCl₃) comercializado pela Merck KGaA, com pureza igual a 99%.

Também foram preparadas amostras de dois compostos comerciais para testar os experimentos implementados: Levamisol (pureza ≥ 99%) - Sigma-Aldrich (10,0 mg em 600 µL de MeOD) e D-(+)-glicose (pureza ≥ 99,5%) - Sigma-Aldrich (220,0 mg em 600 µL de D₂O).

c) Mistura de flavonoides

Para efetuar o estudo da identificação em tempo real no sistema CLAE-RMN, a mistura dos flavonoides naringenina (pureza ≥ 95%) - Sigma-Aldrich, naringina (pureza ≥ 95%) - Sigma-Aldrich, e epicatequina (pureza ≥ 98%) - Sigma-Aldrich foi preparada contendo 10,0 mg de cada um deles. Estes foram solubilizados em 1 mL de acetonitrila/água (ACN/H₂O) na proporção 45:55.

d) Reação de hidrólise

Para realizar o estudo de monitoramento de reação orgânica foi utilizado o acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano (40,0 mg em 600 µL de CDCl₃), ao qual foram adicionados 50 µL de ácido trifluoracético anidro. A reação deste estudo foi realizada a 25°C.

Para obtermos os dados experimentais de RMN do produto desta reação, foram realizados experimentos de RMN 1D de ¹H e ¹³C do p-nitrobenzaldeído (5,0 mg em 600 µL de CDCl₃) comercializado pela Sigma-Aldrich com pureza de 98%.

O acetal citado anteriormente foi sintetizado e fornecido pela mestranda Fabiane Aparecida Batalha dos Santos (DQ-UFSCar), orientada pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, que também forneceu o ácido trifluoracético anidro e o p-nitrobenzaldeído.

3.3 - Aquisição e processamento dos experimentos de RMN

3.3.1 - Experimentos 1D de hidrogênio

Os espectros de RMN de ^1H foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com a sonda *SmartProbe*TM, adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ^1H (*zg*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros utilizados na aquisição estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de hidrogênio.

Parâmetro	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW)	12,0 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	6,82 s
N.º de varreduras (NS)	8
Duração do pulso de 90° (p1)	8,25 µs
Frequência central do pulso (O1P)	6,0 ppm
Tempo de relaxação (d1)	1,0 s

Em seguida, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI), a fase (*apk*) e a linha de base (*abs*) foram corrigidas automaticamente.

3.3.2 - Experimentos 1D de carbono

Os espectros de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com a sonda *SmartProbe*TM, adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um pulso duro para ^{13}C com ângulo de rotação de 30° e desacoplamentos de ^1H considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros utilizados na aquisição estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de carbono.

Parâmetro	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo (TD)	32.768
Janela espectral (SW)	240,0 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	0,68 s
N.º de varreduras (NS)	1024
Duração do pulso de 30° (¹³ C)	4,95 µs
Frequência central do pulso (O1P)	100,0 ppm
Tempo de relaxação (d1)	0,1 s
Programa de desacoplamento (CPDPRG)	waltz16
Duração do pulso de 90° para desacoplamento	90 µs

Em seguida, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 32.768 pontos (SI), a fase (apk) e a linha de base (abs) foram corrigidas automaticamente.

3.3.3 - Experimentos de COSY convencional

As correlações homonucleares ¹H-¹H foram obtidas através dos experimentos de COSY, que foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com a sonda *SmartProbe*TM, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 23 (*cosygpqf*).

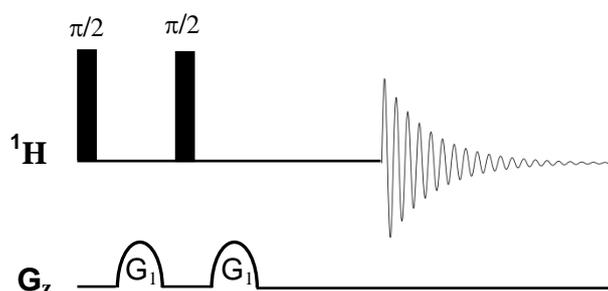


Figura 23: Representação esquemática da Sequência de pulsos do experimento COSY tradicional utilizada nos estudos de implementação realizados neste trabalho.

Os parâmetros de aquisição utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de COSY convencional.

Parâmetro	Valor
N. ^o de pontos do domínio de tempo direto (TDF2)	4.096
N. ^o de pontos do domínio de tempo indireto (TDF1)	128
Janela espectral do domínio direto (SW2)	12,0 ppm
Janela espectral do domínio indireto (SW1)	12,0 ppm
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2)	0,37 s
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1)	0,01 s
N. ^o de varreduras (NS)	6
Duração do pulso de 90° (p1)	8,75 μs
Frequência central do pulso (O1P)	6,0 ppm
Tempo de relaxação (d1)	2,0 s
Tempo máximo de duração da evolução indireta	22,87 ms
Duração do gradiente G ₁	1,0 ms
Amplitude do gradiente G ₁	+5,0 G/cm

Em seguida, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (SIF2) e 512 pontos em F1 (SIF1),

utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos. A fase foi ajustada manualmente.

3.3.4 - Experimentos de HSQC convencional

As correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C foram obtidas através de experimentos de HSQC, que foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,13 MHz para ^1H equipado com a sonda BBI, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 24 (*hsqcetgp*).

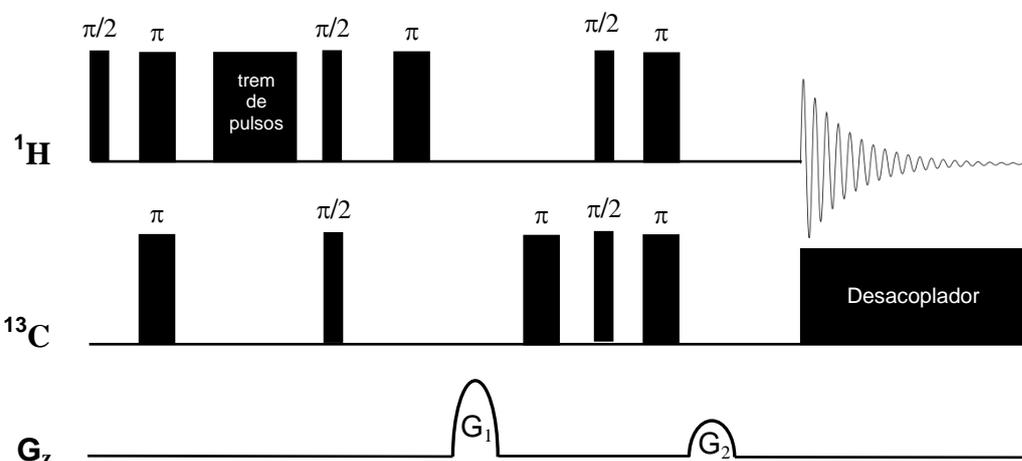


Figura 24: Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento HSQC tradicional utilizada nos estudos de implementação realizados neste trabalho.

Os parâmetros de aquisição utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de HSQC convencional.

Parâmetro	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo direto (TDF2)	4.096
N.º de pontos do domínio de tempo indireto (TDF1)	128
Janela espectral do domínio direto (SW2)	14,0 ppm
Janela espectral do domínio indireto (SW1)	240,0 ppm

Continuação da tabela 4

Parâmetro	Valor
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2)	0,183 s
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1)	0,003 s
N.º de varreduras (NS)	8
Duração do pulso de 90° (¹ H)	8,00 µs
Duração do pulso de 90° (¹³ C)	15,00 µs
Frequência central do pulso no canal de ¹ H (O1P)	6,0 ppm
Frequência central do pulso no canal de ¹³ C (O2P)	99,0 ppm
Tempo de relaxação (d1)	2,0 s
Tempo de espera – INEPT (1/4J)	1,72 ms
Tempo máximo de duração da evolução indireta	2,63 ms
Duração do gradiente G ₁	1,0 ms
Amplitude do gradiente G ₁	+40,00 G/cm
Duração do gradiente G ₂	1,0 ms
Amplitude do gradiente G ₂	+10,00 G/cm

Os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (SIF2) e 512 pontos em F1 (SIF1), utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos. A fase foi ajustada manualmente.

3.3.5 - Calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR

A calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR foi realizada no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com a sonda *SmartProbe*TM, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 25.

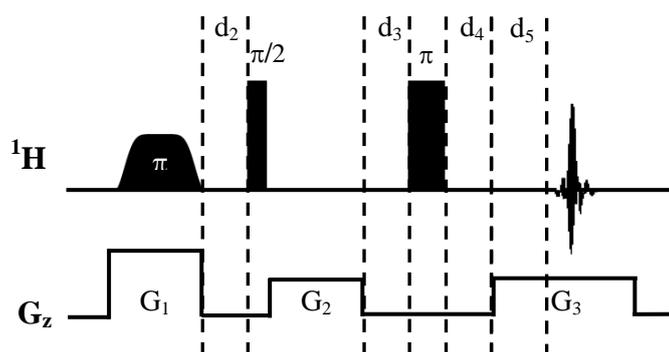


Figura 25: Representação esquemática da sequência de pulsos para calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR.

Os parâmetros espectrais de aquisição utilizados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros espectrais de aquisição utilizados na calibração dos pulsos e gradientes da etapa de excitação dos experimentos de RMN-UR.

Parâmetro	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo (TD)	2984
Janela espectral (SW)	300,0 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	10 ms
N.º de varreduras (NS)	1
Duração do pulso de 90º (p1)	8,75 µs
Frequência central do pulso (O1P)	4,8 ppm
Largura do pulso formatado	60 kHz
Forma do pulso formatado	<i>Smoothed Chirp</i>
Suavização do pulso formatado	10%
Duração do pulso formatado (p11)	15 ms
Potência calibrada do pulso formatado (SPW1)	794,33 mW
Tempo de relaxação (d1)	2,0 s
Tempo de espera d ₂	1,0 ms
Tempo de espera d ₃	1,0 ms
Tempo de espera d ₄	1,0 ms

Continuação da tabela 5

Parâmetro	Valor
Tempo de espera d_5	4,3 ms
Duração do gradiente G_1	15,0 ms
Amplitude do gradiente G_1 (GPZ0)	+6,77 G/cm
Duração do gradiente G_2 (d_2)	10,0 ms
Amplitude do gradiente G_2 (GPZ1)	+4,00 G/cm
Duração do gradiente G_3 (d_5)	14,3 ms
Amplitude do gradiente G_3 (GPZ2)	+4,00 G/cm

Para o processamento dos dados foi aplicando uma transformada de Fourier com 2984 pontos e utilizando uma função de apodização com $LB = -20$ Hz e $GB = 0,5$. A fase foi ajustada manualmente e o valor de correção encontrado foi de 70.000° .

3.3.6 - Experimentos de COSY-UR

As correlações homonucleares 1H - 1H foram obtidas através dos experimentos de COSY-UR, que foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para 1H equipado com a sonda *SmartProbe*TM, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 26.

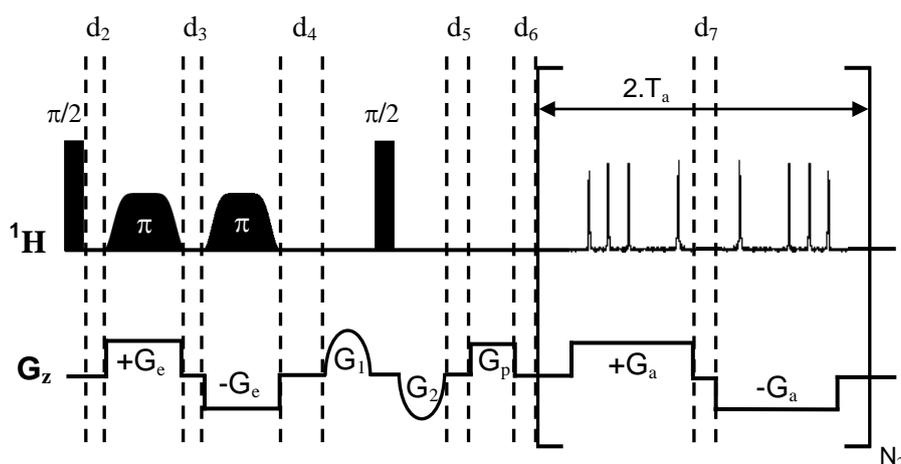


Figura 26: Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento COSY-UR utilizada nos estudos de implementação realizados neste trabalho.

Os parâmetros de aquisição utilizados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de COSY-UR.

Parâmetro	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo direto (TDF2)	131.072
N.º de pontos do domínio de tempo indireto (TDF1)	1
Janela espectral do domínio direto (SW2)	1666,0 ppm
Janela espectral do domínio indireto (SW1)	indiferente
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2)	0,065 s
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1)	indiferente
N.º de varreduras (NS)	1
N ₂ (I3)	128
Duração do pulso de 90° (p1)	8,75 µs
Frequência central do pulso (O1P)	2,1 ppm
Largura do pulso formatado	60 kHz
Forma do pulso formatado	<i>Smoothed Chirp</i>
Suavização do pulso formatado	10%
Duração do pulso formatado (p11)	15 ms

Continuação da tabela 6

Parâmetro	Valor
Tempo de espera d_2	10,0 μs
Tempo de espera d_3	20,0 μs
Tempo de espera d_4	30,0 μs
Tempo de espera d_5	10,0 μs
Tempo de espera d_6	20,0 μs
Tempo de espera d_7	20,0 μs
Duração do gradiente G_e	15,0 ms
Amplitude do gradiente G_e (GPZ0)	$\pm 6,77$ G/cm
Duração do gradiente G_1 (p23)	1,0 ms
Amplitude do gradiente G_1 (GPZ23)	+45,00 G/cm
Duração do gradiente G_2 (p26)	1,0 ms
Amplitude do gradiente G_2 (GPZ26)	+45,00 G/cm
Duração do gradiente G_p (d25)	400,0 μs
Amplitude do gradiente G_p (GPZ25)	-10,0 G/cm
Duração do gradiente $+G_a$ (d20)	236,0 μs
Amplitude do gradiente $+G_a$ (GPZ2)	+35,00 G/cm
Duração do gradiente $-G_a$ (d20)	236,0 μs
Amplitude do gradiente $-G_a$ (GPZ3)	-35,01 G/cm

Em seguida, os dados foram processados por meio de um pacote de processamento (*ufpg*) criado pelo Dr. Patrick Giraudeau, utilizando uma função de apodização na dimensão ultrarrápida (LB = -50,0 Hz e GB = 0,5) e também na dimensão tradicional (LB = -8,0 Hz e GB = 0,08).

3.3.7 - Experimentos de COSY-UR com pré-saturação

Os experimentos de COSY-UR com pré-saturação foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 600,23 MHz para ^1H equipado com uma criosonda

TCl, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 27.

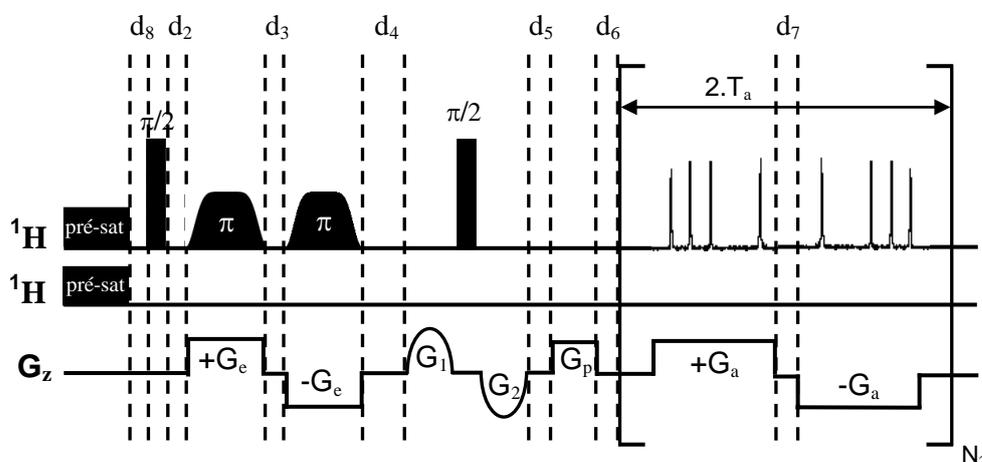


Figura 27: Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento COSY-UR com pré-saturação utilizada nos estudos de CLAE-RMN realizados neste trabalho.

Os parâmetros de aquisição são idênticos aos descritos para os experimentos de COSY-UR (Seção 3.3.6), salvo pela inclusão de alguns parâmetros para pré-saturação dos sinais dos solventes, conforme descritos na tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de aquisição adicionais utilizados nos experimentos de COSY-UR.

Parâmetro	Valor
Duração do pulso de pré-saturação no canal 1 (d1)	6,0 s
Potência do pulso de pré-saturação no canal 1 (PLW9)	0,1 mW
Duração do pulso de pré-saturação no canal 2 (d1)	6,0 s
Potência do pulso de pré-saturação no canal 2 (PLW12)	0,1 mW
Tempo de espera d ₈	43,0 μs

O processamento foi realizado da mesma forma descrita para os experimentos de COSY-UR (Seção 3.3.6).

3.3.8 - Experimentos de HSQC-UR

As correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C foram obtidas através de experimentos de HSQC-UR, que foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,13 MHz para ^1H equipado com a sonda BBI, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 28.

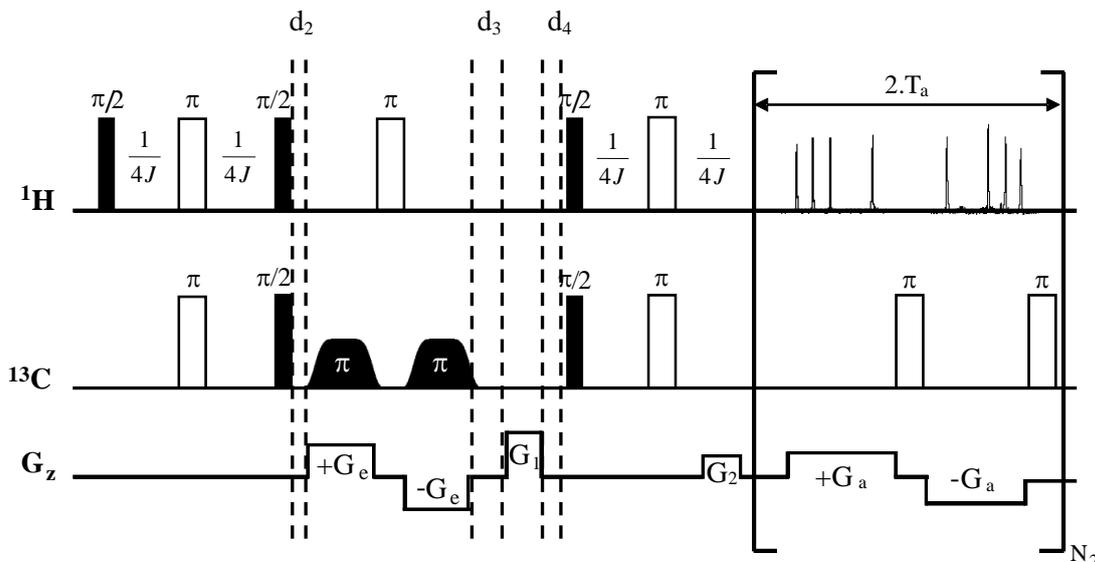


Figura 28: Representação esquemática da sequência de pulsos do experimento HSQC-UR, baseado no esquema de codificação espacial em tempo constante proposta por Pelupessy²⁷.

Os parâmetros de aquisição utilizados estão descritos na tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de HSQC-UR.

Parâmetro	Valor
N.º de pontos do domínio de tempo direto (TDF2)	131.072
N.º de pontos do domínio de tempo indireto (TDF1)	1
Janela espectral do domínio direto (SW2)	1666,0 ppm
Janela espectral do domínio indireto (SW1)	indiferente
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2)	0,065 s
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1)	indiferente
N.º de varreduras (NS)	8

Continuação da tabela 8

Parâmetro	Valor
N ₂ (I3)	128
Duração do pulso de 90° (¹ H) – (p1)	8,75 μs
Duração do pulso de 90° (¹³ C) – (p3)	13,0 μs
Frequência central do pulso (¹ H) – (O1P)	2,0 ppm
Frequência central do pulso (¹³ C) – (O2P)	25,0 ppm
Largura do pulso formatado	60 kHz
Forma do pulso formatado	<i>Smoothed Chirp</i>
Suavização do pulso formatado	10%
Duração do pulso formatado (p7)	15 ms
Tempo de espera d ₂	10,0 μs
Tempo de espera d ₃	10,0 μs
Tempo de espera d ₄	10,0 μs
Tempo de espera – INEPT (1/4J)	1,72 ms
Duração do gradiente G _e	15,0 ms
Amplitude do gradiente G _e (GPZ0)	±20,00 G/cm
Duração do gradiente G ₁ (d14)	650,0 μs
Amplitude do gradiente G ₁ (GPZ4)	+30,00 G/cm
Duração do gradiente G ₂ (d15)	650,0 μs
Amplitude do gradiente G ₂ (GPZ5)	+7,50 G/cm
Duração do gradiente +G _a (p15)	236,0 μs
Amplitude do gradiente +G _a (GPZ15)	+35,00 G/cm
Duração do gradiente -G _a (p15)	236,0 μs
Amplitude do gradiente -G _a (GPZ16)	-35,01 G/cm

Em seguida, os dados foram processados por meio de um pacote de processamento (*ufpg*) criado pelo Dr. Patrick Giraudeau, utilizando uma função de apodização na dimensão ultrarrápida (LB = -50,0 Hz e GB = 0,5) e também na dimensão tradicional (LB = -8,0 Hz e GB = 0,08).

3.4 - Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando modo reverso de eluição, fase móvel constituída da mistura isocrática de acetonitrila/água (ACN:H₂O) na proporção 45:55, sendo H₂O uma mistura 50:50 de H₂O/D₂O, com vazão de 0,4 mL/min. e monitorando o comprimento de onda de 244 nm. O volume de injeção da amostra foi de 100 µL.

3.5 - Cálculos teóricos

Para a realização do estudo teórico do acetal, intermediário e do produto final da reação de hidrólise, foi utilizado um computador configurado com um processador AMD Phenom II X4 8403.2 GHz, memória de 4,0Gb DDR3 e HD de 500Gb, operando no sistema operacional Linux - distribuição openSUSE 11.3. As estruturas dos compostos foram desenhadas no programa GaussView 4.1.2⁷⁶, assim como os orbitais NBO também foram visualizados neste programa computacional. Após isso foi realizada a otimização destas no programa GAUSSIAN 03⁷⁷, usando o método MP2. O conjunto de bases cc-pVDZ foi usado para as otimizações das geometrias.

Todos os cálculos de tensores de blindagem de RMN e NBO foram feitos utilizando como entrada as estruturas otimizadas, com o nível de teoria B3LYP e usando o método GIAO. O conjunto de funções de base aplicado para realizar estes cálculos foi o cc-pVTZ, sendo as bases de correlação consistente (cc) geradas através da recuperação da energia de correlação dos elétrons de valência. O efeito do solvente clorofórmio foi incluído em todos os cálculos teóricos realizados utilizando o modelo contínuo polarizável (PCM).

Os tensores de blindagem de RMN calculados foram convertidos em deslocamentos químicos (δ), considerando os tensores de blindagem de ¹H e de ¹³C calculados do TMS no mesmo nível de teoria. Os valores calculados dos tensores de blindagem (deslocamentos químicos) de RMN de ¹H e de ¹³C foram então comparados com os valores experimentais.

3.6 - Desenvolvimento do algoritmo de processamento

Para desenvolver um algoritmo de processamento dos dados de RMN-UR em linguagem de programação C, foi utilizado um computador configurado com um processador Intel Core i7 930 2.80 GHz, memória de 8,0 GB DDR4 e HD 1,0 Tera, operando no sistema operacional Linux - distribuição openSUSE 11.3. O software TopSpin 3.0, versão Linux, foi instalado neste computador para realizar os testes de implementação necessários.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Implementação dos experimentos de RMN-UR

Na literatura é possível encontrarmos os mais variados tipos de artigos a respeito da promissora técnica RMN-UR, que vão desde estudos sobre a sensibilidade⁶⁹, resolução⁷⁰, forma de linha⁷¹ e janela espectral^{42,72}, até aplicações em processos dinâmicos⁷³, análises quantitativas⁷⁴ ou mesmo no acoplamento da Polarização Dinâmica Nuclear com a RMN⁷⁵. Contudo, a implementação deste tipo de experimento não é tarefa trivial, e alguns erros passíveis de serem cometidos neste procedimento podem ocasionar danos irreversíveis à sonda de rf.

Por isso, no presente capítulo será descrito o protocolo que otimizamos e utilizamos para implementar os experimentos de RMN-UR nos espectrômetros do laboratório de RMN do DQ-UFSCar, discutindo ainda os principais cuidados a serem tomados na realização deste procedimento. As sequências de pulsos de RMN-UR utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Dr. Patrick Giraudeau (*Université de Nantes*).

4.1.1 - Calibração dos gradientes e pulsos de codificação

Para os experimentos de RMN-UR, uma etapa muito importante é a excitação espacialmente seletiva. Primeiramente, é necessário calibrar os gradientes de excitação e, com isso, determinar a dispersão de frequência induzida por estes. A próxima etapa é a calibração dos pulsos de excitação de modo que "coincidam" com a dispersão de frequência criada pelos gradientes. Na verdade, a largura de pulso deve ser ligeiramente superior a esta dispersão para garantir que toda a amostra seja excitada, pois devido à natureza do pulso adiabático suavizado a amplitude máxima não é alcançada instantaneamente após a aplicação deste, mas somente alguns instantes depois e após o término do crescimento inicial gradativo da amplitude, conforme ilustrado na figura 4b (pg. 8).

Para uma calibração inicial, deve ser utilizada uma amostra com somente uma frequência de ressonância e, por isso, utilizamos H₂O em D₂O na

proporção 90:10. A sequência de pulsos utilizada na calibração dos gradientes e pulsos de codificação está representada graficamente conforme a figura 29.

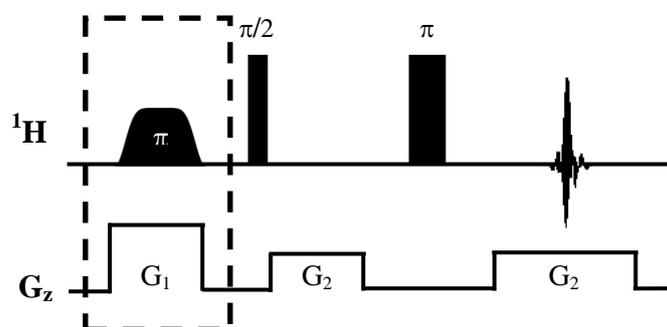


Figura 29: Representação esquemática da sequência de pulsos para calibração dos gradientes requeridos na etapa de codificação dos experimentos de RMN-UR. O bloco tracejado é incluído para calibração dos pulsos formatados.

Na sequência de pulsos da figura 29 a primeira etapa, delimitada por um retângulo tracejado, envolve a aplicação de um pulso adiabático concomitantemente a um pulso de gradiente de campo, o que resulta numa excitação espacialmente seletiva dos spins de maneira contínua. Já os demais blocos são responsáveis por induzir a formação de um eco de spin, que possibilita a obtenção do perfil de excitação da amostra.

Inicialmente o bloco tracejado foi desativado ajustando a potência do pulso de excitação seletiva para 0,0 W, e a do gradiente G_1 para 0,0 G/cm. Realizou-se então a calibração da dispersão de frequência induzida pelos gradientes, utilizando o bloco restante da sequência de pulsos (Figura 29).

O gradiente G_2 não possui um valor fixo, podendo ser configurada com amplitude diferente de 4,0 G/cm, porque ele somente servirá como uma referência para um determinado valor de dispersão de frequência, e que, será posteriormente ajustado conforme a largura do pulso de excitação utilizado. O valor do tempo requerido para ligar o gradiente foi ajustado, e o experimento repetido algumas vezes até que o eco gerado estivesse corretamente posicionado no centro da janela espectral, conforme pode ser visto na figura 30.

Para o processamento dos dados aplicou-se uma função de apodização com LB (*Lorentzian-Broadening*) de -20 Hz e GB (*Gaussian-Broadening*) igual a 0,5, ou seja, na posição central da janela de aquisição. Por fim, uma transformada de Fourier foi realizada e o perfil de excitação da amostra obtido

(Figura 30a). Contudo, devido à dispersão de frequência induzida pelos gradientes tornou-se necessária uma ampla correção de fase de primeira ordem (70.000°), seguida de uma pequena correção de ordem zero, para obtermos uma imagem simétrica deste perfil (Figura 30b).

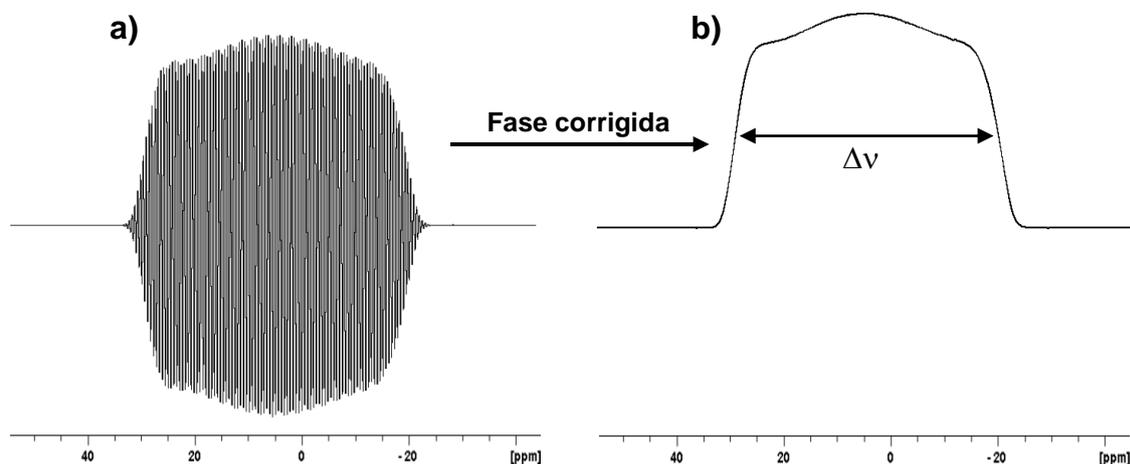


Figura 30: Representação do perfil de excitação obtido da sequência de pulsos na Figura 1 (sem o bloco tracejado), possibilitando a calibração da intensidade do gradiente, sem (a) e com (b) a correção de fase.

A largura a meia altura ($\Delta\nu$) do perfil de excitação (Figura 30b) corresponde à dispersão de frequência induzida pelo gradiente G_2 , que pode ser descrita matematicamente como:

$$\Delta\nu = \gamma G_2 L \quad (1.24)$$

onde γ é a constante magnetogírica do núcleo detectado e L representa o comprimento da região de detecção da bobina. No nosso caso, um gradiente G_2 de 4,0 G/cm induziu uma dispersão de frequência de 31.905,5 Hz.

Para que a realização de um experimento de RMN-UR seja bem sucedida, a amplitude do pulso de gradiente tem de ser ajustada, de modo a induzir uma dispersão de frequência muito maior que a faixa de deslocamento químico dos spins em questão. Isso garante que todas as frequências de ressonância serão igualmente localizadas numa dada posição z . Como a amplitude do gradiente tem relação diretamente proporcional com a dispersão induzida, utilizou-se uma amplitude de 6,77 G/cm (parâmetro G_1 - Figura 29) para induzir uma dispersão de

frequência de aproximadamente 54.000,0 Hz, valor bem superior à faixa de deslocamento químico normalmente associada aos núcleos de hidrogênio.

Por razões citadas anteriormente, a largura do pulso de codificação espacial precisa ser um pouco maior do que a dispersão de frequência induzida. Por isso, na calibração do pulso adiabático de codificação um pulso formatado do tipo *smoothed chirp* foi criado (Figura 31) com 10% de suavização, duração de 15 ms e uma faixa de frequência de 60.000 Hz, valor este 10% maior que a dispersão previamente calibrada.

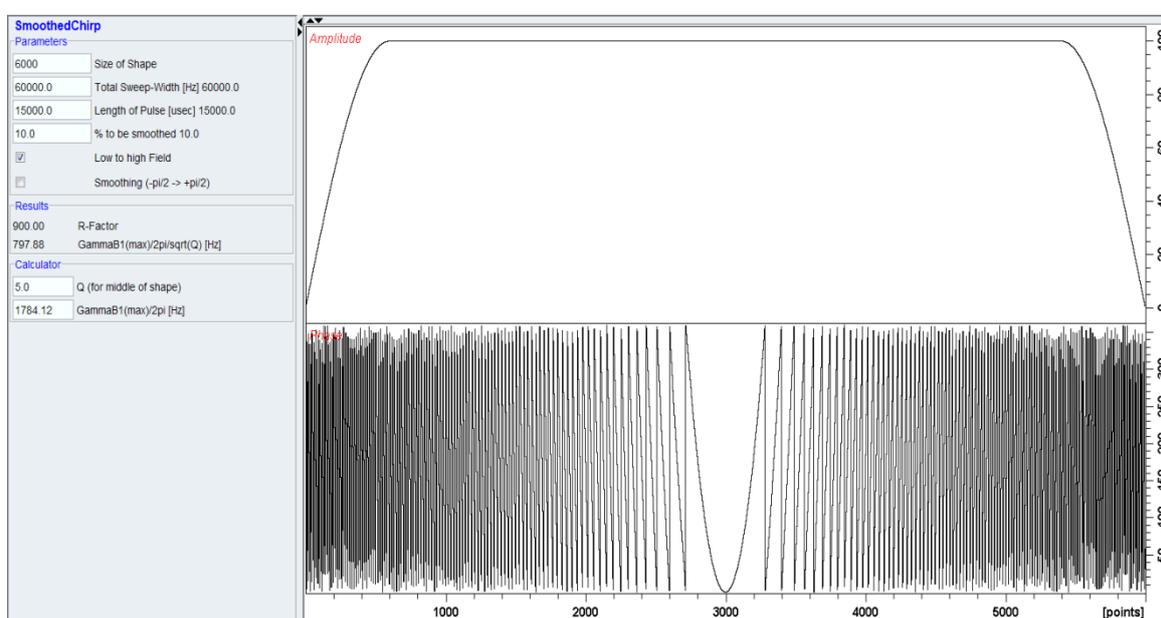


Figura 31: Representação da imagem do perfil de amplitude e fase do pulso *smoothed chirp*, utilizado na etapa de codificação, com as respectivas especificações deste pulso.

A etapa de calibração do pulso (Figura 29 - bloco tracejado) foi então ativada e partindo de 0,1 mW a potência do pulso formatado foi aumentada parametricamente. Acompanhou-se minuciosamente a inversão e ao ser obtida a inversão completa do perfil de excitação conforme figura 32, certificou-se que o pulso estava corretamente calibrado e a potência usada foi de 794,33 mW.

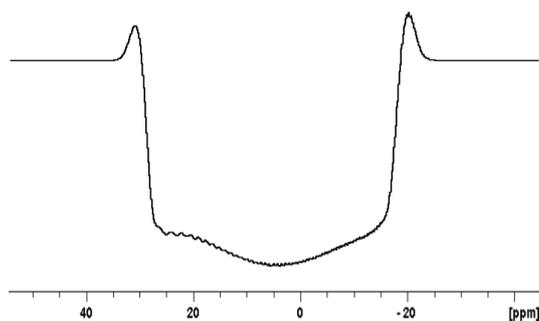


Figura 32: Representação do perfil de excitação obtido da sequência de pulsos na Figura 1 (incluindo o bloco tracejado) com a correção de fase, permitindo a calibração da potência do pulso formatado antes de realizar os experimentos ultrarrápidos.

É importante ressaltar que esta etapa requer muita atenção e cuidado, pois devido à natureza do pulso adiabático mesmo que a potência configurada seja superior à requerida para uma inversão completa, o perfil visualizado continuará mostrando-se invertido, podendo dar a impressão errônea de que o processo de inversão ainda está ocorrendo. Como a duração do pulso formatado utilizado é longa (15 ms), uma potência com valor acima do necessário poderá causar danos irreversíveis a sonda.

4.1.2 – Implementação do experimento COSY-UR

A partir da calibração do gradiente e do pulso de codificação, procedeu-se a implementação do experimento de RMN homonuclear 2D COSY-UR. Conforme discutido anteriormente, a abordagem de codificação espacial em tempo constante, proposta por Pelupessy²⁵, é uma das mais eficientes em termos de sensibilidade e resolução, sendo esta, portanto, adotada neste trabalho. A sequência de pulsos utilizada para realização deste experimento é ilustrada na figura 33.

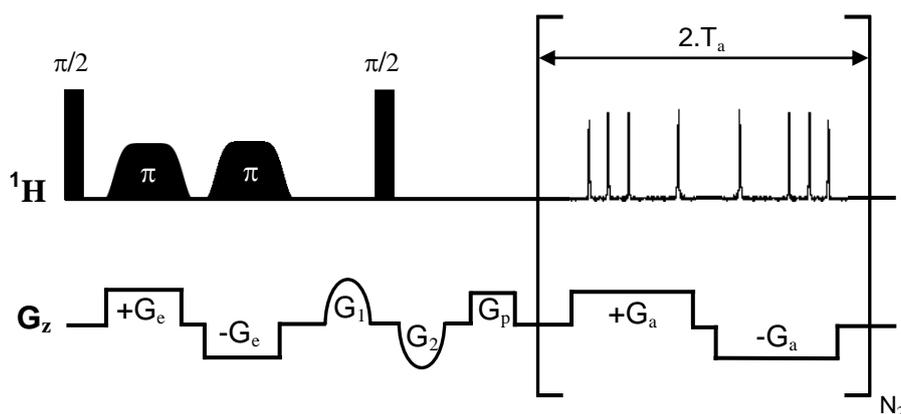


Figura 33: Representação da sequência de pulsos do experimento COSY-UR, baseado no esquema de codificação espacial, em tempo constante, proposta por Pelupessy²⁵.

A sequência de pulsos acima inicia com um pulso não seletivo $\pi/2$, seguido do bloco de codificação espacial em tempo constante, no qual dois pulsos adiabáticos são aplicados juntamente com um par bipolar de gradientes (G_e), proporcionando a codificação espacial dos spins. Após o primeiro pulso formatado a fase dos spins tem dependência quadrática em z (Equação 1.16, p. 17), sendo portanto necessária a aplicação de um segundo pulso na presença de um gradiente oposto para remover esta dependência e tornar as posições em z dos spins linearmente proporcionais às frequências de ressonância.

Prosseguindo na sequência de pulsos temos a etapa de mistura, que é a mesma utilizada em experimentos de COSY 2D tradicionais, e também a etapa de seleção de coerência através de gradientes (G_1 e G_2) antes e depois da mistura. Um gradiente de purga (G_p) é usado com o intuito de alterar a posição dos ecos na dimensão ultrarrápida, a fim de centralizá-los na janela passível de ser observada. A amplitude de G_p tem de ser ajustada manualmente e pode ser tanto positiva quanto negativa, dependendo somente da posição dos ecos na dimensão ultrarrápida. Por fim, utilizando um esquema de aquisição baseado na EPI⁸, um par bipolar de gradientes de aquisição (G_a) é aplicado durante $2xT_a$, para refocar a defasagem induzida pela etapa de codificação espacial, resultando na formação de sucessivos ecos de acordo com as distintas frequências de precessão dos núcleos. Este processo é repetido N_2 vezes, possibilitando assim a amostragem completa do espaço k numa única varredura.

Para a realização do experimento COSY-UR, os parâmetros dos pulsos e gradientes de codificação utilizados foram os mesmos determinados anteriormente na etapa de calibração. O número de pontos (NP) configurado para todos os experimentos de RMN-UR é determinado pela razão entre a duração total da etapa de aquisição e o intervalo de tempo de amostragem dos pontos - *dwell time* (dw):

$$NP = [((d_{Ga} + t_r) \cdot 2) \cdot N_2] / dw \quad (1.25)$$

onde d_{Ga} é a duração do gradiente de aquisição (G_a), t_r o tempo de recuperação do G_a e N_2 o número de repetições do bloco de aquisição.

Após a realização do primeiro experimento COSY-UR para uma amostra de 1-bromohexano, verificou-se a ocorrência de um efeito conhecido como *shearing*, ocorrido durante a aquisição, causado por uma não linearidade dos gradientes positivos e negativos. Estes gradientes são desligados e religados num tempo muito curto (20 μ s) e, com isso, a aquisição decorrente dos gradientes negativos não é precisamente a oposta dos positivos. Como resultado disso, é possível observar um deslocamento linear da posição dos picos no decorrer da aquisição (Figura 34). É importante destacar que este efeito permite identificar possíveis imperfeições nas unidades de gradiente, como é o caso quando esse deslocamento da posição dos ecos apresenta-se de forma não linear.

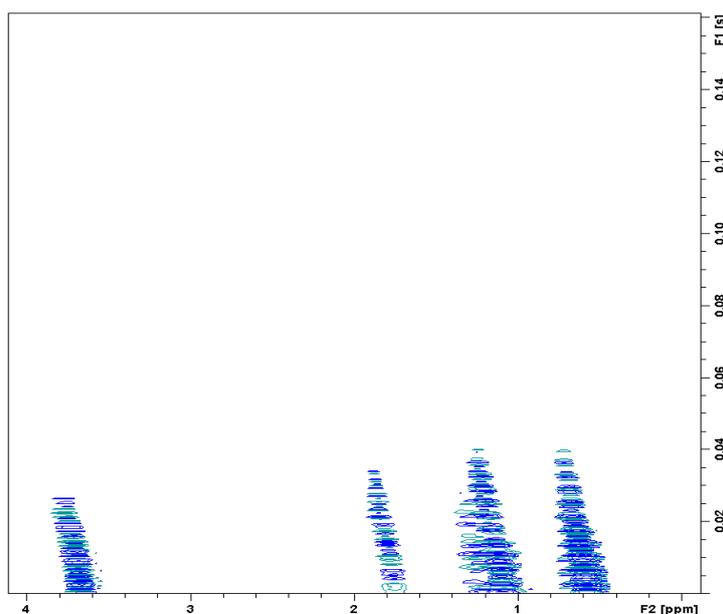


Figura 34: Representação da evolução spins ao longo da aquisição utilizando gradientes de intensidades +35,00 G/cm e -35,00 G/cm.

Este efeito provoca a perda de resolução no espectro e, por isso, precisa ser corrigido quer seja via processamento ou na própria aquisição. Experimentalmente o que pode ser feito é ajustar minuciosamente a amplitude do gradiente negativo, de forma a remover a distorção causada pelo efeito *shearing*, obtendo assim um perfil de evolução dos spins ao longo da aquisição semelhante ao encontrado na figura 35. Para os experimentos COSY-UR que realizamos, a amplitude ideal encontrada para o gradiente negativo foi de -35,01 G/cm, valor este que confirma o carácter minucioso deste ajuste.

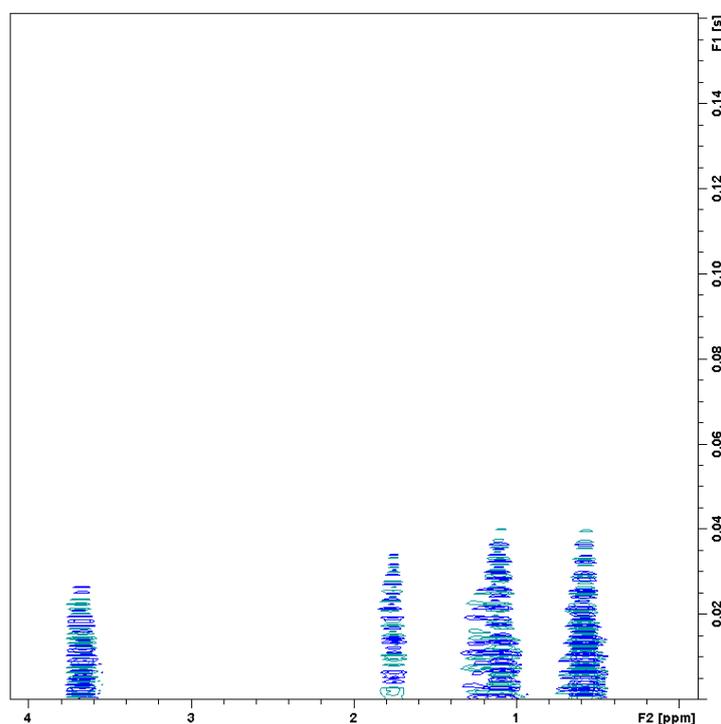


Figura 35: Representação da evolução dos spins ao longo da aquisição utilizando gradientes de intensidades +35,00 G/cm e -35,01 G/cm.

O processamento de todos os espectros ultrarrápidos deste trabalho foi realizado através de um conjunto de programas desenvolvido pelo Dr. Patrick Giraudeau (*Université de Nantes*) para o programa TopSpin[®]. A rotina de processamento é realizada no modo de magnitude, inclui o preenchimento com zeros e o uso da função de apodização (LB = -8 Hz e GB = 0,08) na dimensão tradicional, assim como na dimensão ultrarrápida (LB = -50 Hz e GB = 0,5).

O espectro de COSY-UR do 1-bromohexano apresentado na figura 37, foi realizado num tempo total de 70 ms, ao passo que o COSY tradicional (Figura 36) para este composto foi adquirido em 30 min.

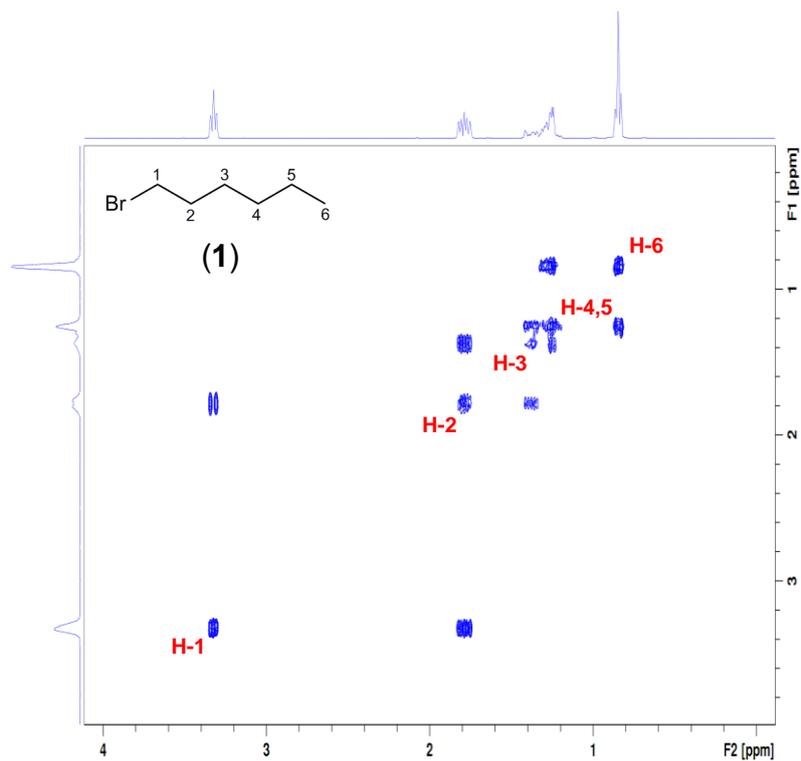


Figura 36: Espectro de COSY tradicional da amostra de 1-bromohexano (1) realizado com 6 varreduras e 128 incrementos em t_1 , num tempo total de 30 minutos.

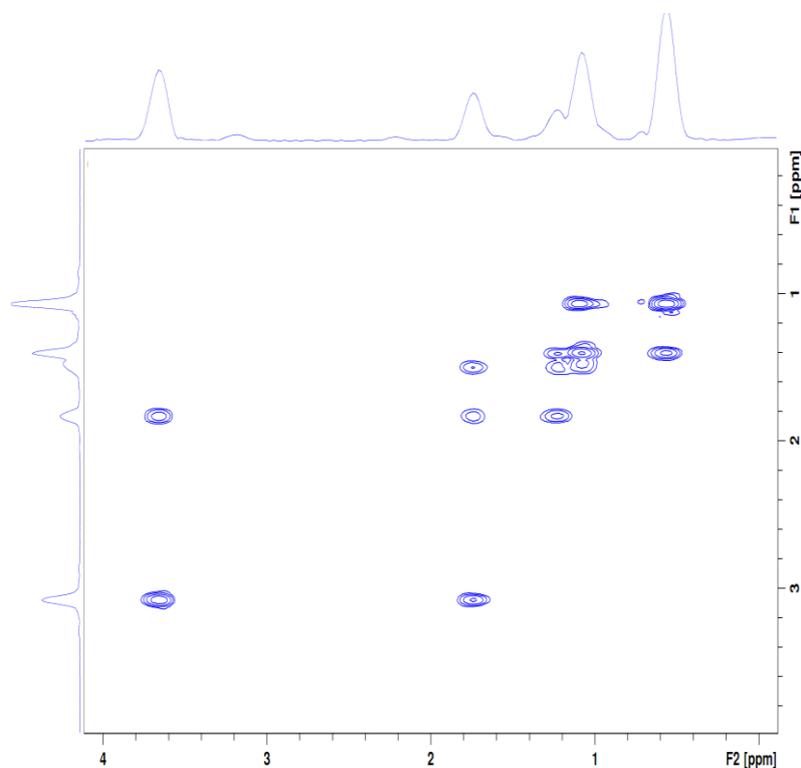


Figura 37: Espectro de COSY-UR da amostra de 1-bromohexano realizado numa única varredura, cuja aquisição total durou 70 ms.

Ambos os espectros (Figuras 36 e 37) apresentam as mesmas correlações homonucleares, confirmando assim a eficiência do experimento de COSY-UR e da implementação deste.

Todavia, é possível notar que os eixos do espectro ultrarrápido (Figura 37) não estão corretamente calibrados, conforme o esperado para este tipo de experimento. Isto se deve ao fato de que a rotina de processamento utilizada não faz o ajuste automático das diferentes janelas espectrais na dimensão tradicional (SW_2) e ultrarrápida (SW_1), que podem ser descritas matematicamente²⁹ como:

$$SW_2 = 1/(2T_a) \quad (1.26)$$

$$SW_1 = (R\gamma_a G_a T_a)/(2\gamma_e G_e) \quad (1.27)$$

onde R é dado pelo quociente entre a largura do pulso formatado e o tempo de duração deste pulso.

Ao que sabemos até o momento, nenhum pacote de processamento realiza a correção das janelas espectrais de maneira automática e, por isso, este ajuste tem de ser feito manualmente. Para se efetuar a correção, a distância entre dois picos conhecidos é medida no espectro de RMN 1D de ^1H . Mede-se então a distância, em ambos os eixos (F1 e F2), entre os mesmos picos no espectro de COSY-UR.

Os quocientes obtidos entre o valor medido no espectro 1D e os valores determinados no 2D correspondem, respectivamente, aos fatores de correção das janelas espectrais. A multiplicação destes fatores pela largura da janela espectral em F1 e F2 resulta nos valores corretos da largura dessas janelas para o referido experimento.

Após realizar o ajuste citado acima, os valores corrigidos da largura das janelas espectrais em F1 e F2 foram, respectivamente, 4,87 ppm e 3,37 ppm. Desde que nenhuma variável das equações 1.26 e 1.27 seja alterada, uma vez realizado esse procedimento o valor da largura das janelas espectrais continua corretamente ajustado para os demais experimentos.

Na Figura 39 apresentamos outro experimento COSY-UR realizado agora para uma amostra do composto comercial Levamisol, cujos parâmetros de aquisição foram idênticos aos utilizados para obter o espectro ultrarrápido do 1-bromohexano, exceto o valor da frequência central que neste caso foi de 4,5 ppm.

Destacamos novamente o curto tempo para aquisição do espectro ultrarrápido (70 ms), em comparação aos 30 min. requeridos para obtenção do espectro equivalente via COSY tradicional (Figura 38).

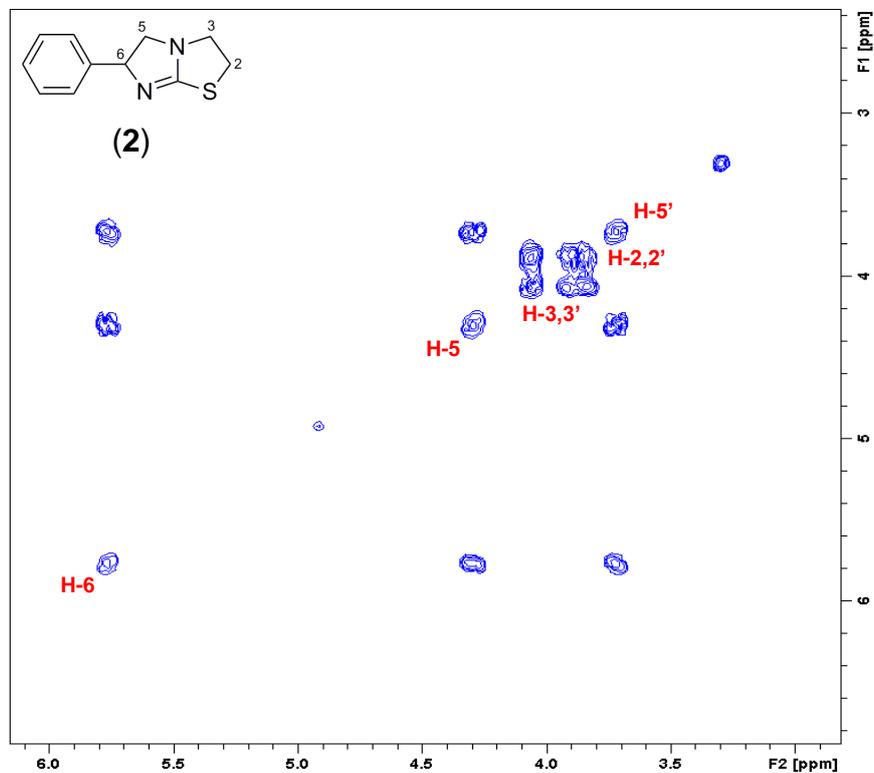


Figura 38: Espectro de COSY tradicional da amostra de Levamisol (2) realizado com 6 varreduras e 128 incrementos em t_1 , num tempo total de 30 minutos.

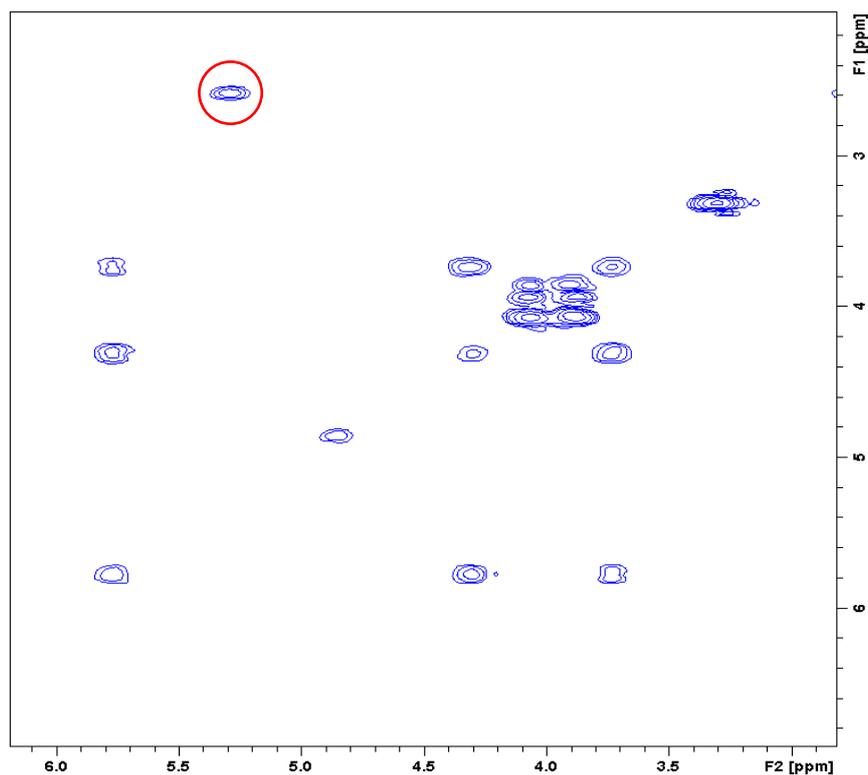


Figura 39: Espectro de COSY-UR da amostra de Levamisol realizado numa única varredura, cuja aquisição total durou 70 ms.

Novamente foi possível confirmar a eficiência do experimento COSY-UR, uma vez que praticamente as mesmas correlações foram observadas em ambos os espectros, tradicional e ultrarrápido. Na verdade, o espectro mostrado na figura 39 apresenta apenas uma correlação não encontrada no espectro da figura 38 e, além disso, anormalmente esta correlação não possui correspondente na diagonal do espectro ultrarrápido. Contudo, este sinal não se trata de um ruído ou algo do tipo, e sua origem pode ser mais bem compreendida ao analisarmos o espectro de COSY tradicional do Levamisol, expandido até a região dos sinais de hidrogênios aromáticos (Figura 40).

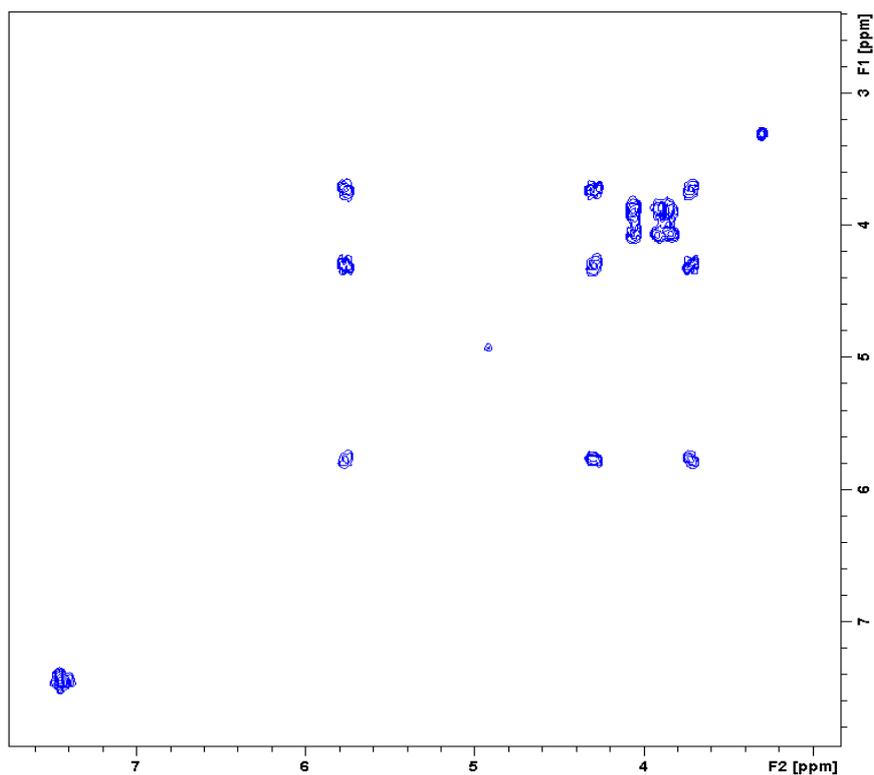


Figura 40: Espectro de COSY tradicional da amostra de Levamisol ampliado até a região de 7,80 ppm.

No espectro da figura 40 podemos identificar a presença de um pico intenso na diagonal e na região dos ^1H aromáticos. É exatamente este pico que observamos destacado no espectro da figura 39 e que, neste caso, foi rebatido (*fold back*) para dentro da janela espectral.

Segundo verificamos na equação 1.27, a janela na dimensão ultrarrápida é limitada pela intensidade dos gradientes de aquisição, sendo a largura espectral para núcleos de ^1H de poucos ppm em grande parte das sondas comumente utilizadas. Com isso, por vezes um ou mais sinais ficam fora da janela observável nos experimentos de RMN-UR, como ilustrado na figura 41.

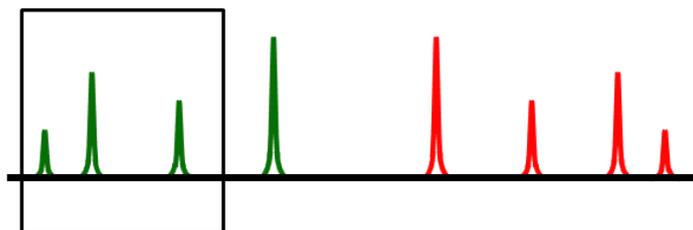


Figura 41: Representação dos ecos positivos e negativos formados durante a aquisição, dos quais somente três ecos positivos estão dentro da janela espectral na dimensão ultrarrápida.

Entretanto, para certos estudos pode ser de fundamental importância monitorar sinais que estejam além da pequena janela passível de ser observada nos experimentos de RMN-UR. Visando contornar essa limitação foi proposto recentemente⁴², um método baseado na aplicação de gradientes antes e depois da etapa de mistura, que possibilita um aumento no número de sinais observáveis na dimensão ultrarrápida. O princípio envolvido nesta proposta é que antes da etapa de mistura os sinais encontram-se modulados pela fase, e ao aplicarmos um gradiente neste ponto, os ecos positivos e negativos se deslocam em direções opostas (Figura 42a), ao passo que quando um gradiente é executado após a etapa de mistura, ou seja a modulação é pela amplitude, os ecos se movem na mesma direção (Figura 42b).

Este método de rebatimento foi utilizado no experimento COSY-UR para o Levamisol e permitiu que o sinal dos hidrogênios aromáticos fosse rebatido precisamente para dentro da janela espectral observada (Figura 39), utilizando uma amplitude para G_1 de -12,5 G/cm e G_2 de 2,5 G/cm.

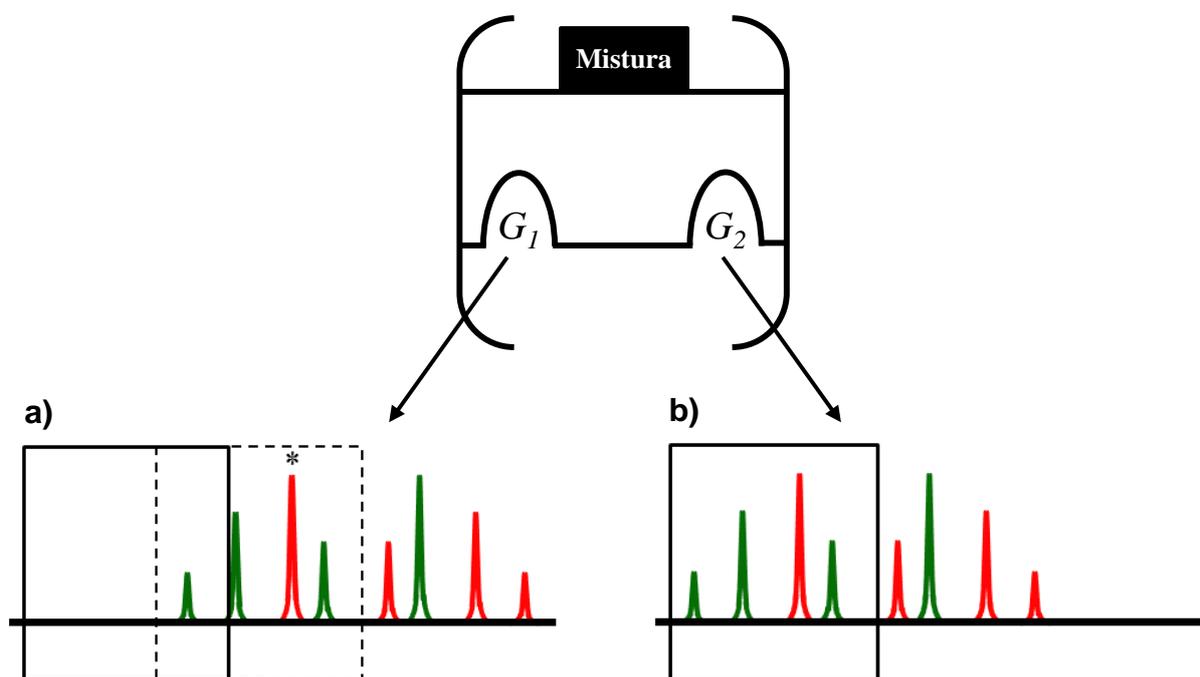


Figura 42: Representação da ação dos gradientes antes e depois da etapa de mistura. (a) Antes da mistura o ecos se deslocam em direções opostas e (b) depois desta etapa eles se movem na mesma direção.

4.1.3 – Implementação do experimento HSQC-UR

Após a implementação com sucesso do experimento COSY-UR, iniciou-se então a do experimento heteronuclear HSQC-UR 2D. A sequência de pulsos utilizada nesta implementação (Figura 43) também se baseia no esquema de codificação espacial proposto por Pelupessy, e que nesse caso é realizada no canal do ^{13}C . Portanto, para contemplar a ampla faixa espectral do núcleo de ^{13}C utilizou-se uma maior amplitude dos gradientes de codificação.

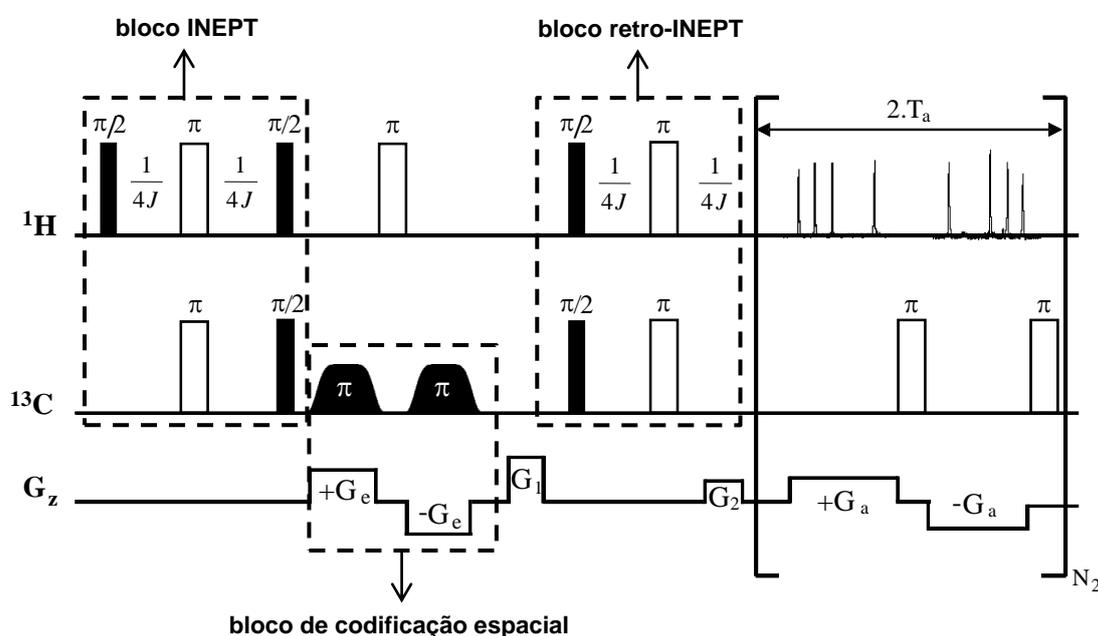


Figura 43: Representação da sequência de pulsos do experimento HSQC-UR, baseado no esquema de codificação espacial em tempo constante proposta por Pelupessy²⁷.

A sequência de pulsos acima possui vários blocos similares aos de um experimento HSQC 2D tradicional. Primeiramente, é aplicado um bloco INEPT (*InSensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) que permite um aumento da sensibilidade dos núcleos de ^{13}C pela transferência de polarização dos núcleos de ^1H . Em seguida, a codificação espacial é realizada no canal do ^{13}C para possibilitar a evolução dependente da posição destes núcleos, e no meio deste período um pulso de 180° é aplicado no canal do ^1H com o intuito de refocar os acoplamentos J_{CH} . Após a realização de um bloco retro-INEPT, com a finalidade de transferir a magnetização dos núcleos de ^{13}C (intensificados pela sequência INEPT) para os de

^1H , o sinal é então detectado no canal do ^1H . Os ecos observados durante a aplicação dos gradientes de aquisição correspondem ao espectro de ^{13}C , enquanto o espectro de ^1H é obtido a partir da dimensão do espaço k . Ainda tratando da aquisição, o desacoplamento dos núcleos de ^{13}C é realizado através de pulsos duros de 180° . É importante ressaltar que estes pulsos têm de ser precisos e cuidadosamente calibrados, pois como eles são aplicados repetidas vezes durante a aquisição (256 vezes em 65 ms, no nosso caso), uma potência acima da requerida por estes pulsos poderá até mesmo danificar a sonda de rf, caso este já ocorrido em outro laboratório numa sonda criogênica durante este processo de implementação e otimização do experimento.

Para a realização do experimento HSQC-UR foi utilizado o mesmo pulso formatado do COSY-UR, porém com maior amplitude dos gradientes de codificação, para que a dispersão de frequência induzida por estes abrangesse toda a ampla faixa espectral dos núcleos de ^{13}C . Os gradientes aplicados para a aquisição foram idênticos aos empregados nesta etapa no experimento COSY-UR (valores com a correção do efeito *shearing*).

Inicialmente, o experimento de HSQC-UR foi aplicado à amostra de 1-bromohexano, cujo espectro é apresentado na figura 45. Neste caso a duração total de cada experimento ultrarrápido foi de 135 ms, todavia para realizar a ciclagem de fase requerida para uma seleção de coerência mais eficiente e também por questões de sensibilidade, foram acumuladas 8 varreduras ($d1 = 5\text{s}$) deste experimento, resultando num tempo total do experimento de 41s. Com isso, o espectro foi obtido em menos de 1 minuto e mostrou as mesmas correlações observadas no espectro de HSQC tradicional realizado para a mesma amostra em 58 minutos (Figura 44).

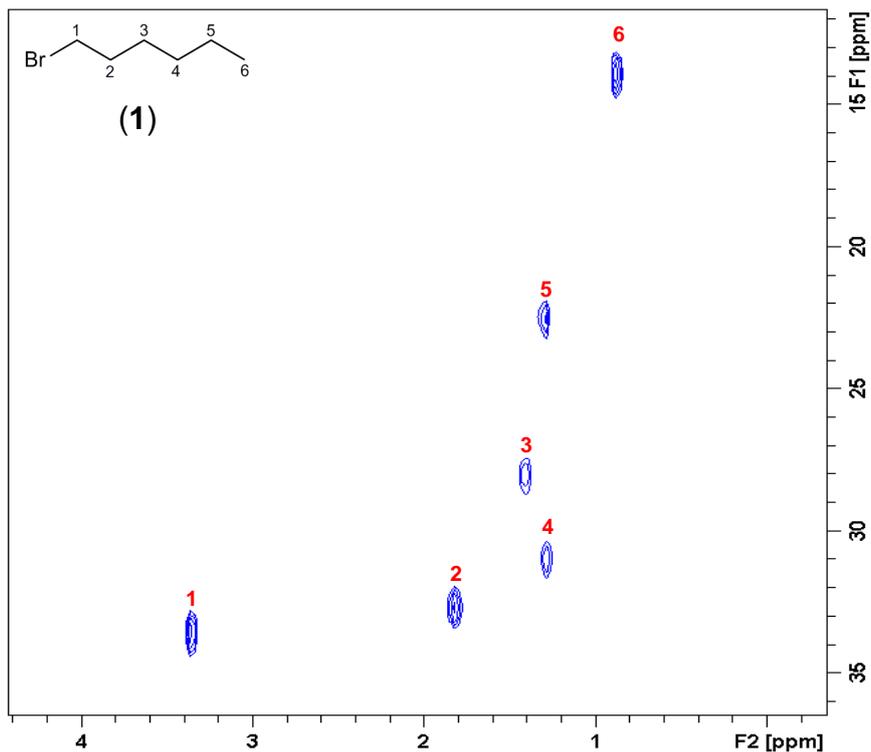


Figura 44: Espectro de HSQC tradicional da amostra de 1-bromohexano (1) realizado com 8 varreduras e 128 incrementos em t_1 , num tempo total de 58 minutos.

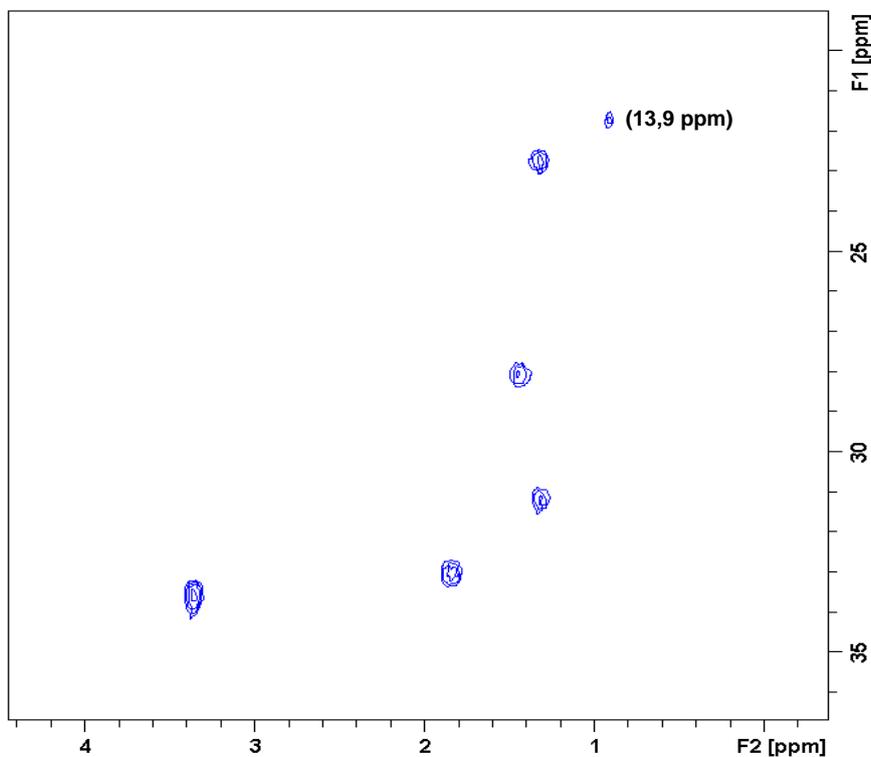


Figura 45: Espectro de HSQC-UR do 1-bromohexano realizado com 8 varreduras, cuja aquisição total de cada experimento durou 135 ms. O sinal marcado foi rebatido para dentro da janela. A duração total do experimento foi de 41s.

Devido ao fato da janela espectral na dimensão do ^{13}C ser limitada a somente algumas dezenas de ppm, tornou-se necessário utilizar o princípio de rebatimento para que a correlação em 13,9 ppm (^{13}C) pudesse ser observada juntamente com as demais num mesmo espectro.

Alterando somente a frequência central do pulso ($F2 = 4,3$ ppm; $F1 = 68,08$ ppm) e a amplitude dos gradientes G_1 (-36,59 G/cm) e G_2 (-14,31 G/cm), foi realizado o experimento de HSQC-UR para uma amostra de D-glicose. O espectro proveniente desta aquisição (Figura 47) mostra as mesmas informações contidas no espectro tradicional de HSQC da D-glicose (Figura 46), e um resultado importante obtido foi o fato de que no espectro ultrarrápido da figura 39 apresenta não somente um sinal rebatido para dentro da janela, mas sim dois (92,1 e 95,9 ppm). Esse fato destaca ainda mais a potencialidade do uso do princípio de rebatimento descrito anteriormente e para monitorar sinais que estejam fora da janela observável.

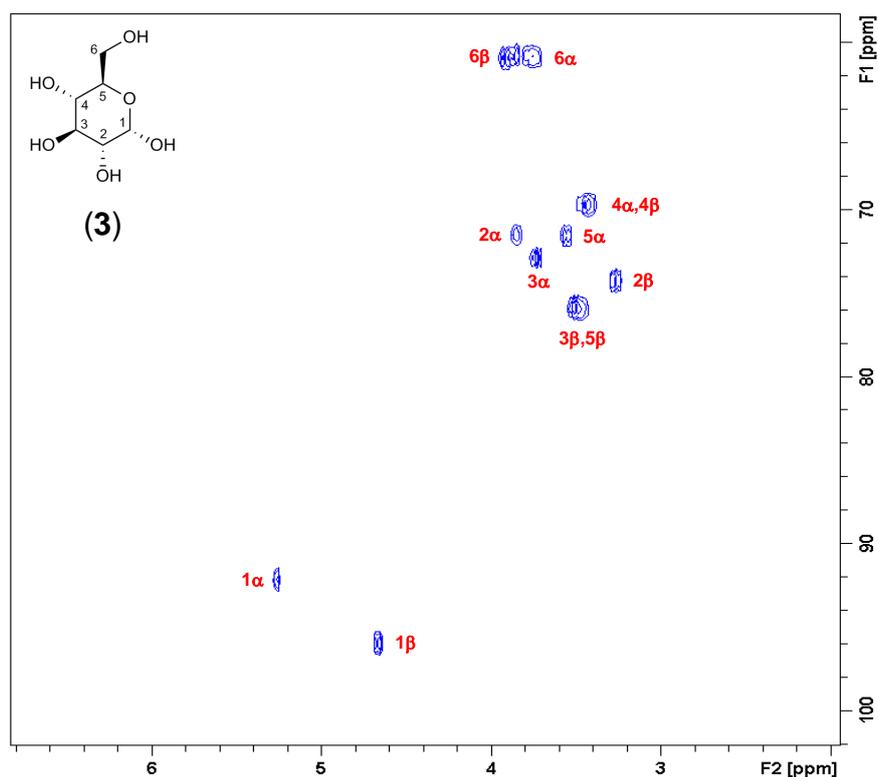


Figura 46: Espectro de HSQC tradicional da glicose (3) realizado com 8 varreduras e 128 incrementos em t_1 , num tempo total de 58 minutos.

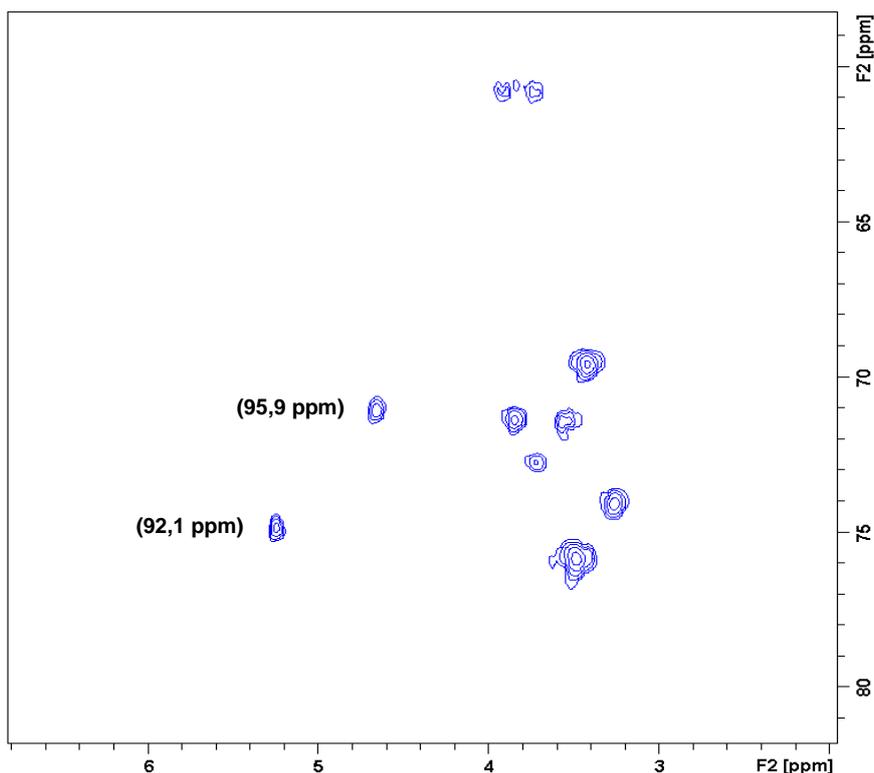


Figura 47: Espectro de HSQC-UR da glicose realizado com 8 varreduras, cuja aquisição total de cada experimento durou 135 ms. Os sinais marcados foram rebatidos para dentro da janela. A duração total do experimento foi de 41s.

Esses experimentos mostraram a potencialidade da técnica ultrarrápida, e que, a sua implementação e otimização dos parâmetros de aquisição e processamento são viáveis para obtermos experimentos com os mesmos resultados (correlações ^1H - ^{13}C e ^1H - ^1H) em frações de segundos. Ressaltamos que na otimização dos gradientes pulsados, vários cuidados apontados no texto merecem atenção.

4.2 – Desenvolvimento de um algoritmo para processamento

Os dados de RMN-UR requerem um processamento específico que, até o momento, é realizado utilizando algoritmos desenvolvidos para programas matemáticos como o MATLAB[®] e, ao que se sabe, há somente um pacote existente para um programa de aquisição e processamento do próprio espectrômetro, que nesse caso trata-se do TopSpin[®]. Em geral, a principal desvantagem associada a estes pacotes é o tempo requerido para o processamento do espectro.

Quando o processamento é realizado numa plataforma como o MATLAB[®], pelo fato da aquisição não ser realizada no mesmo programa do processamento, torna-se necessário que após a finalização do experimento o usuário realize manualmente o seguinte conjunto de operações: abra a janela do MATLAB[®], inicie o algoritmo de processamento, defina quais foram os principais parâmetros de aquisição, escolha a localização do arquivo com os dados, “carregue” este arquivo, defina alguns parâmetros de processamento (como o preenchimento com zeros), escolha quais dados serão processados (positivo e/ou negativo) e, por fim, após alguns segundos o espectro é obtido.

Já no pacote desenvolvido para o TopSpin[®], boa parte dessas operações é realizada automaticamente, sendo preciso apenas definir os parâmetros de processamento (como o uso de funções de apodização). Contudo, tanto no caso do MATLAB[®] quanto no do TopSpin[®], trabalhando no sistema operacional Linux e num computador de última geração, todas as etapas para o processamento levam, em média, de 30 a 60 segundos para serem concluídas. Se estivermos operando num sistema Windows[®] esse tempo é de no mínimo 60 segundos, podendo se estender até 120 segundos.

A etapa do processamento onde ocorre a separação dos dados provenientes dos gradientes positivos e negativos é a que demanda maior tempo para ser completamente executada, especialmente no pacote do TopSpin[®], sendo esta a principal responsável pela elevada duração deste processo. Estes dados são armazenados sequencialmente no decorrer da aquisição, porém para serem processados de maneira distinta eles têm de ser extraídos do arquivo original, e separados em diferentes novos arquivos (Figura 48).

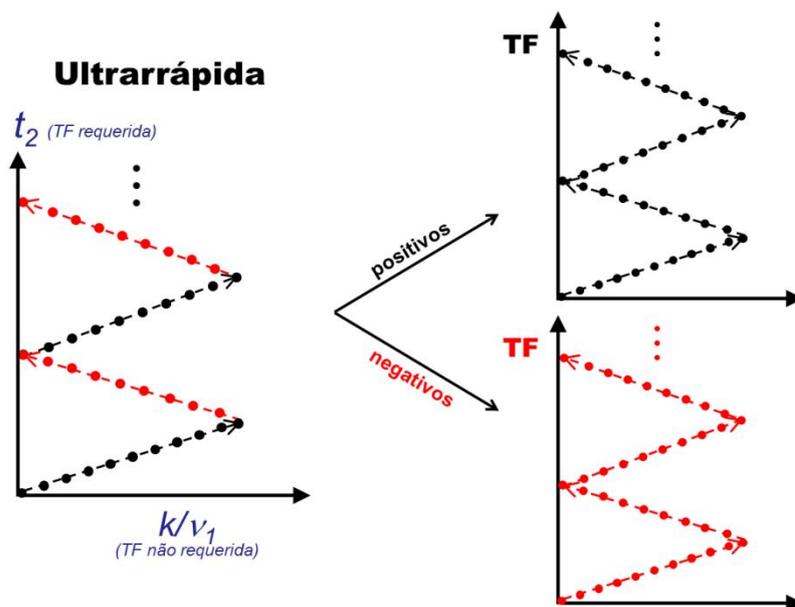


Figura 48: Representação esquemática da separação dos dados provenientes dos gradientes positivos e negativos em arquivos distintos.

Neste trabalho, foram realizados aproximadamente 2000 experimentos até que o primeiro espectro de RMN-UR pudesse ser obtido com sucesso. O tempo total requerido para a execução destes experimentos foi de 5 minutos e 40 segundos, enquanto que o processamento destes dados teve duração total de 33 horas e 20 minutos. Esses valores indicam que, em média, o tempo requerido pelo processamento foi 353 vezes maior do que o para aquisição, e tal fato contribui para distanciar mais os experimentos de RMN-UR da realidade dos experimentos de RMN multidimensional de rotina. Além disso, este longo tempo de espera para o processamento, em comparação ao tempo da aquisição, torna o processo de implementação da RMN-UR uma etapa ainda mais exaustiva do que normalmente esta já o é.

Com isso, essa limitação atual dos pacotes de processamento nos instigou a buscar desenvolver um algoritmo para processamento em tempo real dos dados de RMN-UR, e que pudesse ser inserido no próprio programa computacional do espectrômetro de RMN.

4.2.1 – KUP - Keng Ultrafast Processing

O problema da separação dos dados positivos e negativos foi solucionado na linguagem de programação C, que por possuir capacidade de acesso à memória em baixo nível, permite que as operações necessárias para o processamento dos dados de RMN sejam realizadas numa velocidade superior, se comparada às operações executadas pelos pacotes de processamento disponíveis atualmente.

O pacote de processamento desenvolvido foi intitulado KUP - Keng Ultrafast Processing, e possui um arquivo principal *kup* e um secundário *kuplib* que corresponde a uma biblioteca de funções acessada continuamente ao longo da execução do arquivo *kup*. As principais etapas bem como um escopo geral da sequência de operações realizadas pelo pacote de processamento *kup* estão descritas na figura 49.



Figura 49: Fluxograma das principais etapas envolvidas na execução do pacote *kup* de processamento de dados de RMN-UR.

Os principais códigos e funções, bem como a sintaxe da linguagem de programação C utilizada são descritos nos tópicos a seguir.

4.2.1.1 – Declaração das bibliotecas e variáveis

Assim como a estrutura geral encontrada em qualquer programa computacional desenvolvido em linguagem C, o *kup* inicia com a declaração das bibliotecas e variáveis que serão utilizadas. Neste caso, algumas bibliotecas como *stdio.h* e *string.h* são implicitamente incluídas no programa durante a compilação realizada no próprio TopSpin®, já o arquivo cabeçalho *kuplib* é declarado explicitamente no *kup* através do comando “*#include <inc/kuplib>*”(sem aspas). Em seguida, é necessário declarar quais são as variáveis globais por meio dos comandos a seguir (Figura 50).

```

25 char ir[PATH_MAX], us1[PATH_MAX];
26 char PROBH[PATH_MAX], lpwg[16]="11", lprg[16];
27 char iRaw_PathName[PATH_MAX];
28 char oRaw_PathName[PATH_MAX];
29 char nuc_2[1],nuc_c[]="off",nuc_h[]="1H", alltest[]="all", gtest[]="gradset",
    stest[]="shearing", zefftest[]="eef";
30 int Parmode, 17, TD1_T, TDI, TD2R, NSI, lpok, vdta, vdtype=4, expn, dmod, dda,
    ftmod, nuc_test;
31 float dH=4257.6, dC=1070.5 , dN=431.6, dX=dH;
32 float GradOk, GradStr=GradValue, GradEX, offs_1, offs_2, lb, dP=60.0, lacq=1.8;
33 double dda_d, swh_1, swh_2, sw_1, sw_2, o1_p, o2_p;

```

Figura 50: Comandos utilizados para a declaração das variáveis globais.

Na figura 50 estão descritas todas as variáveis globais utilizadas pelo *kup*, sendo estas responsáveis por armazenar caracteres (*char*), números inteiros (*int*) e números reais, também chamados de números de ponto flutuante, com média (*float*) e alta (*double*) precisão. Algumas dessas variáveis estão inicialmente vazias (ex.: Figura 50 – linha 33), enquanto outras apresentam valores predeterminados como, por exemplo, os módulos das constantes magnetogíricas para os núcleos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N (Figura 50 – linha 31).

4.2.1.2 – Carregamento dos parâmetros de aquisição

Com as variáveis globais já declaradas parte-se então para o carregamento de alguns parâmetros de aquisição (Figura 51), que são essenciais para as etapas seguintes do processamento, tais como o número de pontos digitalizados e o do experimento correspondente (Figura 51 – linhas 37 e 44).

```
35  FETCHPARS("l 3",&l7)
36  FETCHPAR("PARMODE",&Parmode)
37  FETCHPARS("TD",&TDI)
38  FETCHPARS("NS",&NSI)
39  FETCHPARS("PROBHD",&PROBH)
40  FETCHPARS("DTYPA",&vdta)
41  FETCHPARS("DIGMOD",&dmod)
42  FETCHPARS("FT_mod",&ftmod)
43  FETCHPAR("LB",&lb)
44  expn=expno;
```

Figura 51: Comandos para o carregamento dos parâmetros de aquisição.

Todas as variáveis carregadas segundo os comandos encontrados na figura 51 se mantêm inalteradas durante a execução do *kup*. Duas das variáveis mais importantes destacadas acima são o PARMODE e o DIGMOD, que correspondem a dimensão de aquisição do experimento (1D, 2D, 3D, ...) e ao modo de digitalização dos dados (analógico ou digital), respectivamente. Os valores dessas duas variáveis são verificados e, de acordo com estes o processamento segue por caminhos distintos conforme será detalhado posteriormente.

4.2.1.3 – Configuração dos valores de O1, O2 e da janela espectral segundo o tipo do experimento

Como um novo diretório é criado para incluir os dados positivos e negativos, os valores de O1, O2 e da janela espectral não estão inicialmente corretos, por isso torna-se preciso carregar algumas variáveis com os valores reais conforme o tipo do experimento (Figura 52).

```
116  FETCHPARS ("O1P", &o1_p)
117  FETCHPARS ("NUC2", &nuc_2)
118  if ((strcmp(nuc_c, nuc_2)==0) || (strcmp(nuc_h, nuc_2)==0))
119  {
120      o2_p=o1_p;
121      swh_2=1692.620;
122      swh_1=1588.206;
123      sw_2=4.2299;
124      sw_1=3.9690;
125  }
126  else
127  {
128      nuc_test=1;
129      FETCHPARS ("O2P", &o2_p)
130      swh_2=2455.568;
131      swh_1=1953.125;
132      sw_2=24.4038;
133      sw_1=4.8812;
134  }
```

Figura 52: Comandos para determinar os valores de O1, O2 e da janela espectral.

Primeiramente, a frequência central do pulso no primeiro canal de rf (O1P) e o valor do núcleo no segundo canal (NUC2) são carregados (Figura 52 – linhas 116 e 117). Em seguida, uma condição é verificada e se o experimento for homonuclear (^1H) utilizando um ou mesmo dois canais, o valor de O2 é igualado ao de O1 e a janela espectral (em F2 e F1) é ajustada para os valores predeterminados, em ppm e Hertz (Figura 52 – linhas 118 a 125). No caso do experimento ser heteronuclear: a variável sinalizadora *nuc_test* é igualada a 1, o valor da frequência central do pulso no segundo canal de rf é configurado, e a janela espectral tanto no domínio direto quanto no indireto tem seus valores carregados conforme definição prévia (Figura 52 – linhas 126 a 134).

É importante ressaltar que os valores de O1 e O2 são configurados automaticamente de acordo com os parâmetros da aquisição, já a janela espectral tem de ser calculada manualmente (Seção 4.1.2) e os valores corretos incluídos nas linhas correspondentes.

4.2.1.4 – Verificação do modo de digitalização

Uma etapa importante é a da verificação do modo de digitalização, pois se o filtro utilizado for analógico o sinal de RMN começa a ser adquirido a partir do ponto zero do FID. Entretanto, no caso do filtro digital os primeiros pontos dos dados

adquiridos são sempre zero, sendo preciso descontar estes pontos quando da separação dos dados positivos e negativos. Isto é possível ao fazermos uso do parâmetro *group delay*, que informa o número de pontos iniciais que são iguais a zero. Na figura 53 encontramos os comandos que realizam esta operação: se o filtro for digital, o número de pontos a serem excluídos é dado pela fórmula contida na linha 141, já se o filtro for analógico nenhum ponto precisará ser excluído na análise do arquivo dos dados adquiridos.

```

138  if (dmod==1)
139  {
140      FETCHPARS("GRPDLY",&dda_d)
141      dda=(2*dda_d+0.5);
142  }
143  else
144  {
145      dda=0;
146  }

```

Figura 53: Comandos para verificação do modo de digitalização.

4.2.1.5 – Verificação do número de repetições do bloco de aquisição

O número de repetições do bloco de aquisição neste trabalho é dado pelo parâmetro “L3”, contudo diferentes variáveis para descrever este número podem ser usadas por quem escreve as sequências de pulsos. Por isso, é necessário verificar se a variável carregada no início do *kup* (17) corresponde de fato a este número de repetições, o que pode ser feito através dos comandos contido na figura 54.

```

157  if (17 < 32)
158  {
159      GETSTRING("Which variable did you set for acquisition loop? (11, 12, 13, ...)",lpwg)
160      lpok=LoopGet(lpwg);
161      sprintf(lprg,"1 %d",lpok);
162      FETCHPARS(lprg,&l17)
163  }

```

Figura 54: Comandos para verificação do n.º de repetições do bloco de aquisição.

Se o valor da variável 17 for menor do que 32, isso indica que certamente esta não corresponde ao número de repetições em questão. Nesse caso, surge na tela uma janela que possibilita ao operador informar qual é o

parâmetro correto, e com o auxílio de uma função da biblioteca *kuplib* este será então carregado corretamente na variável citada acima.

4.2.1.6 – Localização do arquivo dos dados adquiridos

Os experimentos de RMN-UR podem ser realizados tanto no modo 1D quanto em nD. Logo, o comando abaixo (Figura 55 – linha 167) tem a função de verificar se o experimento foi adquirido como 1D (arquivo *fid*) ou nD (arquivo *ser*) e, após isso, determinar a localização do arquivo que contém os dados brutos adquiridos. Este comando faz com que o processamento possa ser realizado em arquivos *fid* ou *ser*, diferentemente dos pacotes de processamento existentes atualmente, que foram desenvolvidos exclusivamente para experimentos no modo 1D ou nD, o que contribui para uma abrangência ainda maior da aplicabilidade do pacote *kup*.

```
165 // set the original raw data path
166
167 strcpy(iRaw_PathName, ACQUPATH(Parmode ? "ser":"fid"));
```

Figura 55: Comando para determinar o tipo e a localização do arquivo dos dados.

4.2.1.7 – Determinação do número de pontos

Outro parâmetro importante de ser levado em consideração é o número de pontos no domínio direto. No caso do domínio indireto este valor é dado pelo dobro do número de repetições do bloco de aquisição (Figura 56 – linha 177), já que a cada bloco dois gradientes bipolares são utilizados. De posse deste valor realiza-se o cálculo do número de pontos no domínio direto, correspondente a cada gradiente aplicado (Figura 56 – linha 181). Estes dados são essenciais para a etapa de separação dos dados positivos e negativos, por serem indicadores diretos da quantidade de informação a ser extraída do arquivo *fid* ou *ser*.

```
175 //set total TDF1
176
177 TD1_T = 17*2;
178
179 //set real size of TDF2
180
181 TD2R=TDI/TD1_T;
```

Figura 56: Comando para determinar o número de pontos.

4.2.1.8 – Criação do subdiretório dos dados positivos

Quando os dados positivos são extraídos do arquivo original da aquisição eles podem ser inseridos num arquivo que irá sobrepor o original. Porém isso não é recomendado, pois além de uma possível perda da informação dos dados negativos, caso seja necessário realizar outro processamento, também não será possível dispor do arquivo de aquisição original. Por isso, é preciso que um novo subdiretório seja criado (Figura 57) para que os novos arquivos possam ser armazenados sem comprometer a integralidade dos primeiros.

```
183 // create positive directory
184
185 DATASET(us1,expn*10+1,1,disk,user)
```

Figura 57: Comando para criar o subdiretório dos dados positivos.

O comando acima (Figura 57 – linha 185) cria um novo subdiretório para os dados positivos, cujo diretório principal terá nome similar ao do adquirido acrescido dos caracteres “_US”. Todos os diretórios que contém espectros processados via *kup* possuem esse acréscimo como forma de diferenciá-los do diretório original de aquisição.

4.2.1.9 – Configuração dos parâmetros de processamento

Após a criação do diretório na seção anterior, os principais parâmetros de processamento têm de ser configurados (Figura 58). Dentre estes podemos destacar o número de pontos do domínio de tempo (TD) e a quantidade de dados processados (SI), cujo valor tem relação direta com o nível de preenchimento com

zeros utilizado. Os valores de janela espectral são configurados segundo as variáveis carregadas na seção 4.2.1.3.

```

214 STOREPAR("TD",TDI/TD1_T)
215 STOREPARS("TD",TDI/TD1_T)
216 STOREPAR1("TD",TD1_T/2)
217 STOREPAR1S("TD",TD1_T/2)
218 STOREPAR("NS",NSI)
219 STOREPARS("NS",NSI)
220 STOREPAR("SI",(TDI/(TD1_T*2)))
221 STOREPARS("SI",(TDI/(TD1_T*2)))
222 STOREPAR1("SI",(2*TD1_T))
223 STOREPAR1S("SI",(2*TD1_T))
224 STOREPAR("SWH",swh_2)
225 STOREPARS("SWH",swh_2)
226 STOREPAR1("SWH",swh_1)
227 STOREPAR1S("SWH",swh_1)
228 STOREPAR("PKNL",0)
229 STOREPARS("PKNL",0)

```

Figura 58: Comandos para configurar alguns parâmetros de processamento.

Por fim, o parâmetro que indica se os primeiros pontos dos dados a serem processados são iguais a zero (PKNL) é configurado com o valor *false*, já que o novo arquivo de dados foi preenchido com informações já descontando os pontos zeros incluídos pelo filtro digital.

4.2.1.10 – Extração dos dados positivos

A etapa de extração dos dados positivos é uma das mais importantes e um diferencial do *kup*, pois esta é a parte do processamento que consome mais tempo nos pacotes criados para até o momento. Para realizá-la é utilizada a função *FidProc_Pos* (Figura 59 – linha 242), da biblioteca *kuplib*, cujas variáveis de entrada são a localização do arquivo dos dados adquiridos, o caminho do arquivo *ser* que conterà somente os dados positivos, o número de repetições do bloco de aquisição, o tipo de dados adquiridos (*int*, *float* ou *double*), o número de pontos correspondente a cada gradiente aplicado e o número de pontos iniciais iguais a zero.

```

240 // separate positive
241
242 FidProc_Pos(iRaw_PathName,oRaw_PathName,l7,vdtypa,TD2R,dda);

```

Figura 59: Função da biblioteca *kuplib* para extrair os dados positivos.

A função descrita no parágrafo anterior realiza as operações de extração dos dados positivos e inserção destes num novo arquivo de modo sequencial, permitindo assim que essa operação seja realizada num tempo inferior a um (1) segundo, independentemente do sistema operacional trabalhado. Maiores detalhes a respeito dessa operação podem ser obtidos analisando a biblioteca *kuplib* completa na última seção (Apêndices) deste trabalho.

4.2.1.11 – Processamento dos dados positivos

Finalizada a extração dos dados positivos, parte-se então para o processamento do espectro de RMN-UR. Essa etapa envolve uma extensa série de linhas de comandos, cujas operações realizadas serão descritas resumidamente nesta seção.

Primeiramente, no caso de ser preciso verificar se está ocorrendo *shearing*, o comando para processamento requer este argumento, sendo preciso digitar “*kup shearing*” (sem aspas). Dessa forma, o algoritmo realiza todos os procedimentos descritos anteriormente, porém não é aplicada a transformada de Fourier (TF) no domínio indireto. Na realidade, apesar dos dados no domínio direto já estarem em frequência no arquivo *ser*, é necessário aplicar uma TF neste domínio, em seguida uma função de apodização. Por fim, efetua-se uma TF inversa para que o espectro com a evolução dos spins ao longo da aquisição possa ser mostrado na tela. Isto ocorre porque para o TopSpin® o arquivo *ser* contém somente informações no domínio de tempo, que são plotadas após algum tipo de tratamento destes dados.

Contudo, com a realização de uma TF seguida de uma TF inversa, o eixo F2 estaria em tempo e não em frequência, como esperado. Logo, é necessário alterar os valores do modo da TF aplicada e da unidade do eixo F2, de modo induzir forçosamente o TopSpin® a apresentar esse eixo em unidade de frequência.

Se o *shearing* já tiver sido verificado, digitando apenas “*kup*” (sem aspas) a etapa descrita acima é desconsiderada. Nesse caso, uma TF no domínio direto é aplicada para transpor os dados do arquivo *ser* para a janela do espectro processado. Uma função de apodização e, na sequência, uma TF indireta são aplicadas somente nos dados processados. Finalmente, é aplicada no domínio indireto uma TF e a unidade do eixo F2 é convertida de tempo para frequência

utilizando a mesma metodologia citada no parágrafo anterior. Ao final desta etapa, o espectro de RMN-UR devidamente ajustado e processado é plotado automaticamente na tela através do comando “VIEWDATA”, finalizando por completo o processamento dos dados positivos em menos de um (1) segundo.

4.2.1.12 – Processamento dos dados negativos

Grande parte das análises realizadas com experimentos de RMN-UR leva em consideração, principalmente, os dados adquiridos pelos gradientes positivos. Entretanto, em alguns casos o processamento dos dados provenientes dos gradientes negativos também é requerido e, por isso, o espectro destes dados também pode ser obtido com o *kup*, sendo necessário apenas digitar “*kup all*” (sem aspas). Esta opção resultará em espectros dos dados positivos e negativos.

O processamento dos dados negativos ocorre de forma similar ao dos positivos, sendo criado um subdiretório distinto, configurados os principais parâmetros de processamento, extraídos os dados do arquivo de aquisição bruto e, por último, realizadas as operações de processamentos dos dados negativos, culminando assim num espectro de RMN-UR corretamente processado em aproximadamente um (1) segundo.

Assim, tem-se o protocolo para o desenvolvimento do algoritmo para processamento dos dados de RMN-UR, intitulado *kup*, tendo sido abordados os principais códigos e funções deste pacote baseado na linguagem de programação C, bem como a função de cada um destes no decorrer do processamento. Através deste novo pacote, os espectros de RMN-UR podem ser processados em tempo real, o que representa uma importante contribuição no campo de desenvolvimento da RMN-UR, aproximando um pouco mais os experimentos de RMN-UR da realidade dos experimentos de RMN multidimensional rotineiros. Ademais, como ainda é requerida a realização de vários experimentos até que todos os parâmetros sejam devidamente ajustados, esse processamento ágil colabora para que tanto o processo de implementação quanto de aplicação dos experimentos de RMN-UR sejam menos exaustivos do que o são até o presente momento.

4.3 – Aplicações desenvolvidas com o uso da RMN-UR

4.3.1 – Identificação em tempo real de uma mistura de flavonoides num sistema CLAE-RMN

A técnica hifenada CLAE-RMN, conforme mencionado anteriormente, é uma ferramenta muito poderosa, sendo aplicada em diversas pesquisas que vão desde a análise de produtos naturais⁷⁸ a estudos metabólicos⁷⁹. Apesar da potencialidade do uso desta técnica no modo fluxo contínuo, o modo mais utilizado é o estático, uma vez que permite a realização de experimentos de RMN 2D tradicionais, normalmente não associados ao modo contínuo devido ao tempo de aquisição dos experimentos.

Uma alternativa para a obtenção de correlações de RMN 2D num tempo reduzido é a espectroscopia de Hadamard, que já foi utilizada com sucesso⁸⁰ num sistema CLAE-RMN no modo fluxo contínuo. Entretanto, essa metodologia requer um conhecimento prévio das ressonâncias estudadas, o que limita muito a generalidade de aplicação desta.

Um estudo recente utilizando a RMN-UR³⁹ indicou a viabilidade do uso desse tipo de experimento no acompanhamento em tempo real da separação cromatográfica de uma mistura, submetida a um sistema CL-RMN. Contudo, além do fato de trabalharem somente com um solvente não hidrogenado, por não disporem na época de um equipamento CLAE, os autores fizeram uso de uma coluna de vidro clássica. Tais condições estão bem distantes das utilizadas rotineiramente em sistemas CLAE-RMN, não comprovando assim a aplicabilidade dos experimentos de RMN-UR na hifenação CLAE-RMN em fluxo contínuo.

Com intuito de investigar a viabilidade da aplicação da RMN-UR num sistema CLAE-RMN no modo fluxo contínuo, em condições rotineiras, desenvolvemos numa mistura de produtos naturais similares o estudo apresentado a seguir.

4.3.1.1 – Seleção dos compostos da mistura

Inicialmente, foram procurados três produtos naturais com estruturas básicas semelhantes para compor uma mistura que se aproximasse mais da realidade dos analitos comumente estudados. Com isso, foram escolhidos os flavonoides naringina (**4**), epicatequina (**5**) e naringenina (**6**), cujas fórmulas estruturais se encontram na figura 60, que por possuírem estruturas aromáticas similares constituem um bom exemplo de mistura para ser submetido no sistema CLAE-RMN no modo fluxo contínuo.

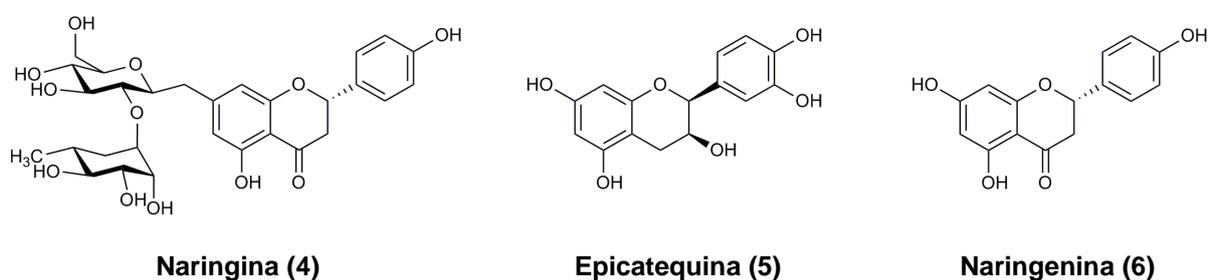


Figura 60: Fórmulas estruturais dos flavonoides que constituem a mistura submetida à separação cromatográfica no sistema CLAE-RMN.

Ao analisarmos os espectros de RMN de ^1H da região aromática destes flavonoides (Figura 61), é possível notar que os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios dos anéis benzênicos estão restritos a uma faixa de aproximadamente 1,5 ppm, o que é bom do ponto de vista da RMN-UR, uma vez que o seu uso é restrito a termos uma janela espectral pequena, devido a limitação dada pela amplitude dos gradientes aplicados. Outra questão importante é que os flavonoides **4**, **5** e **6** apresentam espectros de RMN de ^1H distintos na região aromática, assim como os tempos de retenção no cromatograma da mistura, o que permite que estes compostos sejam caracterizados via RMN-UR à medida que forem eluindo do cromatógrafo líquido de alta eficiência.

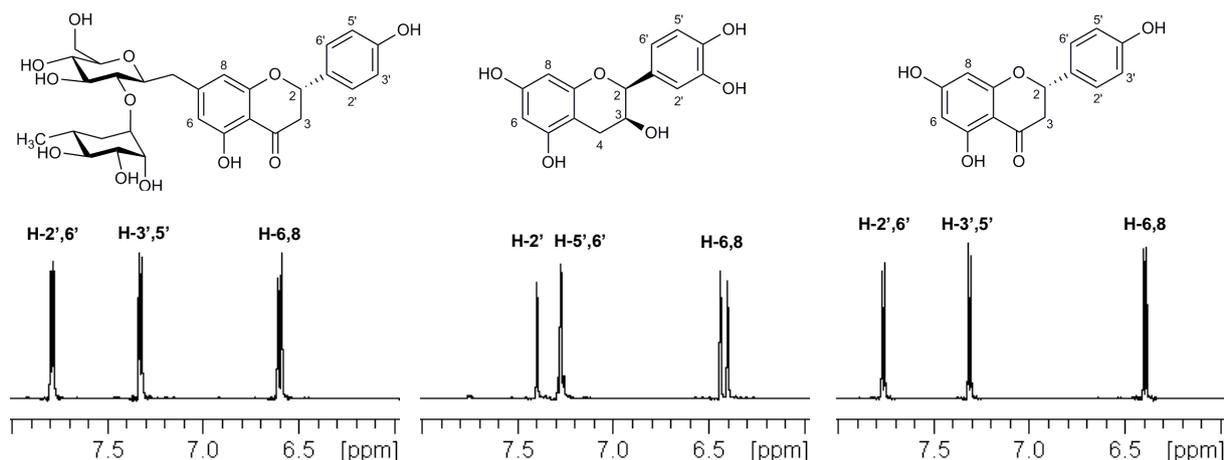


Figura 61: Espectros de RMN de ^1H da região aromática e as respectivas estruturas dos flavonoides estudados neste trabalho.

4.3.1.2 – Otimização dos parâmetros do COSY-UR

Os experimentos de RMN-UR foram realizados utilizando uma sequência de pulsos de COSY-UR similar à descrita na figura 26. As principais mudanças feitas nesta sequência foram a inclusão de gradientes para seleção de coerência (*single quantum*) no bloco de codificação espacial, e o uso de onda contínua nos canais F1 e F2 para realizar a pré-saturação dos sinais dos solventes. Os parâmetros de aquisição destes experimentos foram configurados segundo os valores otimizados previamente (Tabela 6), com exceção do valor da frequência central do pulso que foi, neste caso, de 7,0 ppm. Os espectros individuais de COSY-UR dos flavonoides estão dispostos na figura 62.

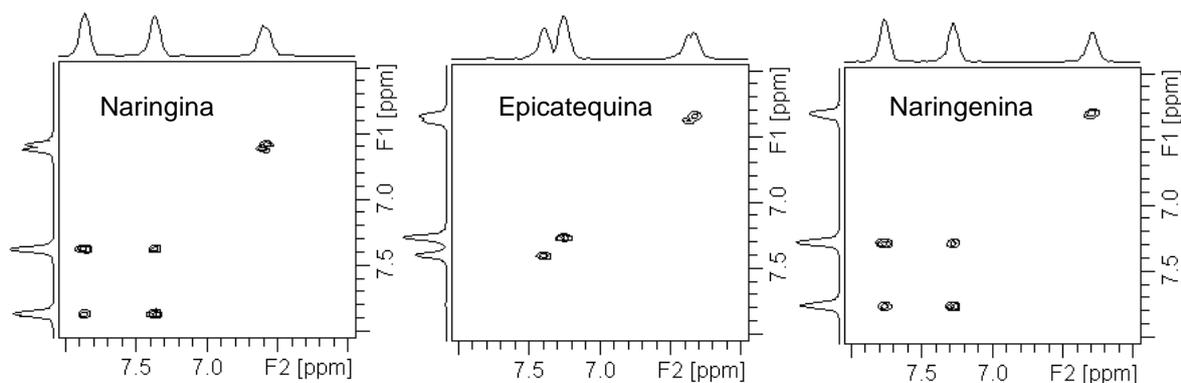


Figura 62: Regiões aromáticas dos espectros de RMN-UR COSY individuais dos flavonoides utilizados neste estudo.

Tratando das condições experimentais do COSY-UR, os parâmetros de aquisição utilizados propiciaram a obtenção de uma janela espectral de aproximadamente 2,0 ppm. Esse pequeno valor está associado ao fato de que num campo magnético maior a faixa de frequência a ser codificada aumenta, e como o valor da amplitude máxima do gradiente do espectrômetro de 14,1 T (53 G/cm) é muito próximo ao do equipamento de 9,4 T (50 G/cm), ao trabalharmos num campo magnético maior sem utilizarmos um gradiente com amplitude também superior, o valor da janela espectral acessível será menor em comparação ao obtido num campo magnético menor.

Embora fosse possível expandir a janela espectral até 3,0 ppm, bastando somente aplicar os gradientes de decodificação com amplitude máxima, isso exigiria o limite máximo dos recursos de gradiente da criosonda. Em função disso, visando reduzir o desgaste do equipamento de gradiente e também pela largura de 2,0 ppm ser suficiente para contemplar os sinais monitorados na região aromática em questão, esta expansão da janela espectral foi desconsiderada.

Ainda sobre os experimentos COSY-UR, foi testado o princípio do rebatimento de sinais na dimensão ultrarrápida, com o intuito de monitorar os sinais de uma outra janela (3,0 a 4,5 ppm) juntamente com os da região aromática. No entanto, os sinais residuais dos solventes pré-saturados foram intensos o suficiente para distorcer os sinais dos hidrogênios dos flavonoides, comprometendo assim todo o espectro de COSY-UR quanto o rebatimento foi utilizado.

4.3.1.3 – Otimização das condições cromatográficas

Finalizada a definição dos parâmetros do COSY-UR, partiu-se então para a otimização das condições da separação cromatográfica. No caso do sistema CLAE-RMN utilizado, o acoplamento do CLAE com espectrômetro de RMN é intermediado pela unidade *cryofit*TM que possui uma cela de detecção de 60 µL. Por recomendação da empresa fabricante, não foi utilizado nenhum tipo de ácido na fase móvel, pois isto poderia comprometer a integridade física da cela. Outro ponto importante a ser considerado é que dependendo do solvente escolhido para compor a fase móvel, ele poderá interferir diretamente na janela espectral observada na RMN-UR, uma vez que os sinais intensos do solvente, quando presentes na janela observada, causam distorções nos sinais do analito. Além disso, vale ressaltar que

uma mistura ideal deve apresentar os picos no cromatograma com largura superior a duração do experimento de RMN-UR, de modo a garantir que a concentração não varie significativamente ao longo da aquisição do experimento.

Como na eluição gradiente pode haver mudanças nos deslocamentos químicos dos sinais de RMN, a fase móvel com eluição isocrática foi escolhida preferencialmente em relação ao modo gradiente. Com isso, a melhor condição para a separação cromatográfica encontrada foi a fase móvel com eluição isocrática ACN/H₂O – 45:55. Foram realizadas ainda injeções individuais dos flavonoides, o que permitiu determinar o tempo de retenção correspondente a cada um deles (Figura 63).

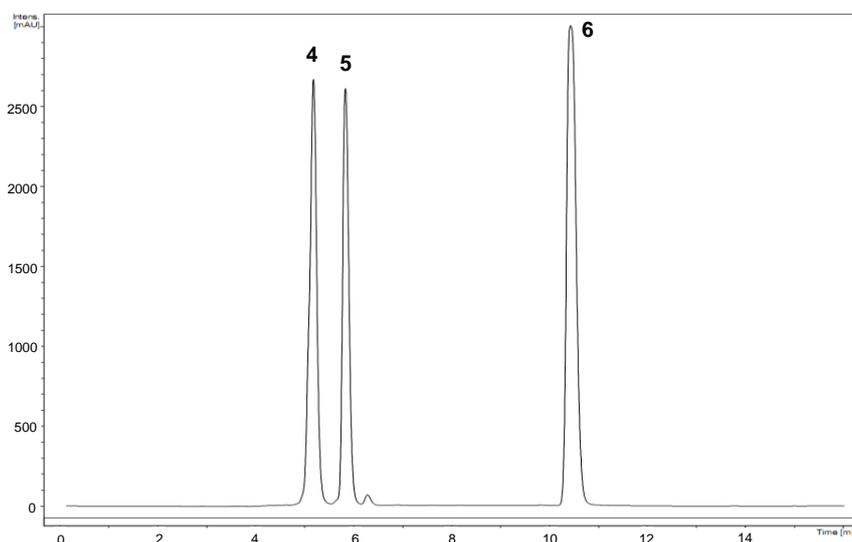


Figura 63: Cromatograma ($\lambda = 244$ nm) obtido para a mistura dos flavonoides **4**, **5** e **6**, com eluição isocrática ACN/H₂O (45:55) e volume de injeção de 5 μ L.

Um aspecto importante a destacar, é que foram realizados testes utilizando fases móveis ternárias para alterar a seletividade e proporcionar uma maior separação dos dois primeiros picos (Figura 63). Porém, a pré-saturação dos sinais de ¹H dos três solventes não foi eficiente, afetando assim substancialmente a resolução dos espectros de COSY-UR e, por isso, essa abordagem foi desconsiderada neste estudo.

Após a otimização tanto dos parâmetros dos experimentos COSY-UR quanto das condições cromatográficas, iniciou-se a corrida cromatográfica no CLAE à medida que os espectros de COSY-UR foram sendo adquiridos continuamente.

Uma vazão de 0,4 mL/min. foi escolhida para aumentar o tempo de residência dos analitos na cela de detecção.

4.3.1.4 – Acompanhamento da separação cromatográfica dos flavonoides via COSY-UR

A fim de realizar os experimentos de RMN-UR com fase cíclica, para uma supressão mais eficiente dos sinais do solvente e por questões de sensibilidade, foram efetuadas duas varreduras para cada experimento e para cada uma delas o tempo de recuperação foi de 6 s. Desse modo, um espectro de COSY-UR foi adquirido a cada 12 s, no decorrer da corrida cromatográfica. Ao ser injetado no CLAE um volume de 100 μ L os compostos **4** e **5** coeluíram, como podem ser observados no cromatograma da figura 64.

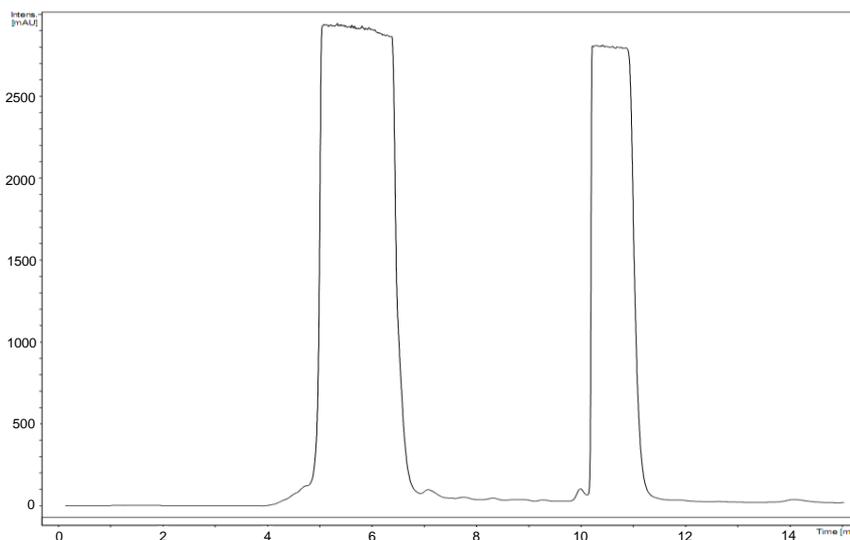


Figura 64: Cromatograma ($\lambda = 244$ nm) obtido para a mistura dos flavonoides **4**, **5** e **6**, com eluição isocrática ACN/H₂O (45:55) e volume de injeção de 100 μ L.

Os principais espectros de COSY-UR obtidos durante o monitoramento da separação cromatográfica estão organizados sequencialmente na figura 65.

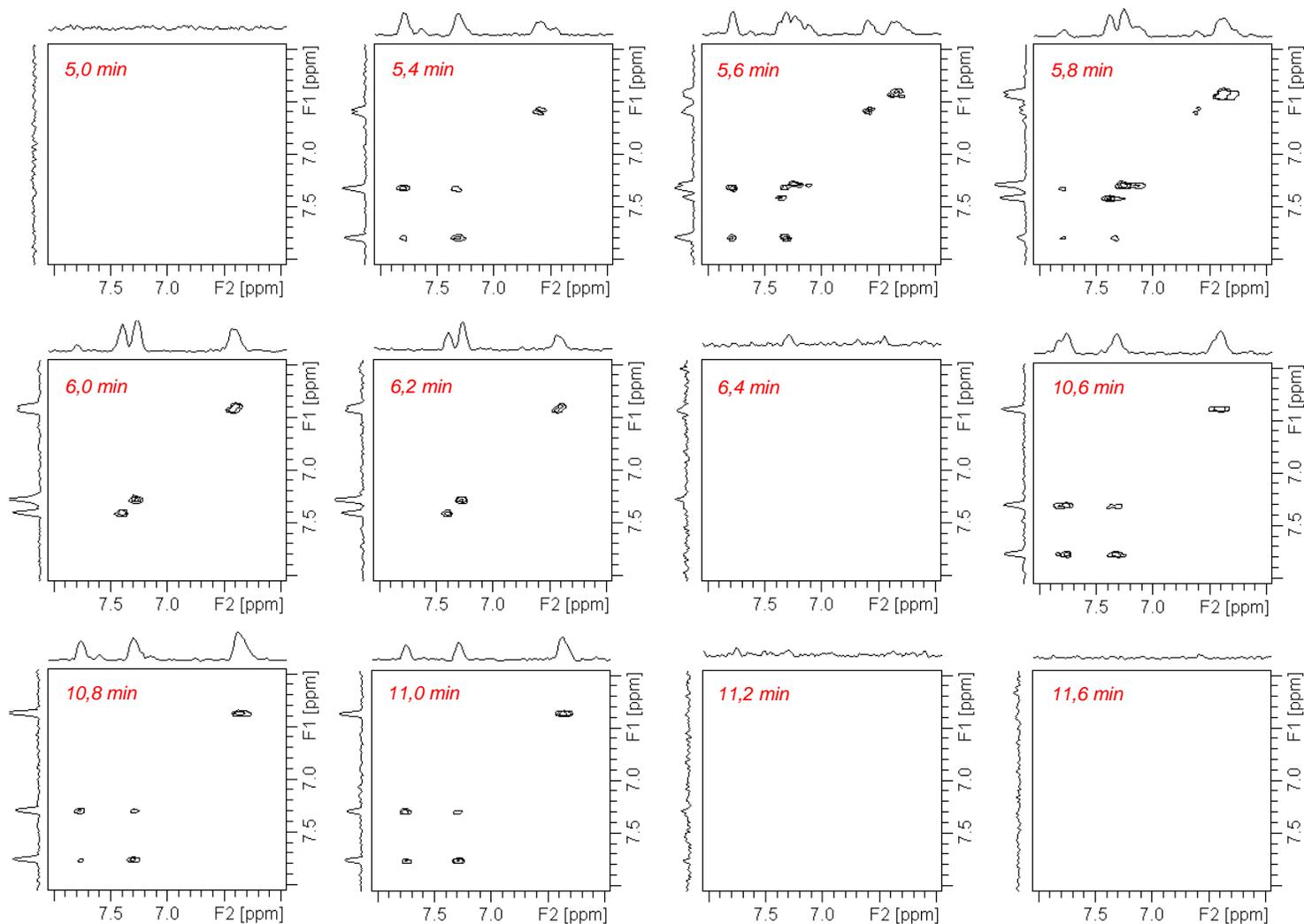


Figura 65: Regiões aromáticas dos espectros de RMN-UR COSY adquiridos ao longo da separação cromatográfica da mistura dos flavonoides naringina, epicatequina e naringenina num sistema CLAE-RMN no modo fluxo contínuo.

Analisando a série de espectros contida na figura 65, vemos que não foi possível observar nenhum sinal no instante 5,0 min. Avançando para 5,4 min. o espectro obtido permitiu identificar o flavonoide naringina (**4**), enquanto nos instantes 5,6 e 5,8 min. temos a coeluição deste com a epicatequina (**5**), o que condiz com o já observado no cromatograma da figura 64. Nos tempos 6,0 e 6,2 min. somente foram observados os sinais de **5**, comprovando assim que mesmo os compostos **4** e **5** possuindo tempos de retenção similares e apresentando um único pico no detector UV-DAD, estes puderam ser detectados separadamente pelo monitoramento em tempo real via COSY-UR.

Já do instante 10,6 ao 11,0 min. os espectros apresentaram sinais característicos do flavonoide naringenina (**6**). Apesar dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H do composto **4** serem muito semelhantes aos do **6**, estes compostos foram nitidamente separados devido a diferença dos seus respectivos tempos de retenção. A partir de 11,2 min. até o final da corrida cromatográfica não foi observado mais nenhum sinal nos espectros de COSY-UR adquiridos.

A principal limitação encontrada no estudo apresentado foi a baixa sensibilidade dos experimentos utilizados, o que se deve principalmente ao fluxo contínuo do eluente durante a execução do experimento, especialmente durante a etapa de codificação espacial que dura 30 ms. Foram realizadas algumas corridas cromatográficas com maiores vazões, contudo isso resultou numa significativa perda de sensibilidade, confirmando assim que a vazão de 0,4 mL/min. era a ideal para este estudo.

Dessa forma, os resultados apresentados e discutidos acima comprovam a eficiência da aplicação da RMN-UR num sistema CLAE-RMN, no modo fluxo contínuo e com solventes rotineiramente utilizados em CLAE. Este é o primeiro estudo a empregar os experimentos de RMN-UR num equipamento comercial CLAE-RMN, abrindo assim várias possibilidades de aplicações.

4.3.2 – Monitoramento em tempo real de uma reação orgânica via RMN-UR

A RMN multidimensional tradicional tem aplicação limitada em estudos de mecanismos de reações, pois muitas dessas ocorrem num tempo muito inferior ao mínimo requerido para uma aquisição completa deste tipo de experimento de RMN.

Com o advento da RMN ultrarrápida estes processos de curta duração podem ser monitorados em tempo real, e alguns trabalhos recentes^{37,38} já comprovaram a eficiência da aplicação da RMN-UR em estudos mecanísticos de reações orgânicas. Muito embora tais estudos representem um importante avanço, eles ainda são limitados a compostos enriquecidos com ^{13}C e reações com intermediários de longa duração, condições estas que restringem a generalização da aplicação da RMN-UR neste tipo de estudo.

Visando expandir os limites de aplicação da RMN-UR no estudo de mecanismos de reações, realizou-se o monitoramento de uma reação de hidrólise com o experimento de RMN HSQC-UR, a fim de inferir a respeito do mecanismo da reação por meio da identificação de um intermediário de curta duração. Dessa forma utilizou-se compostos com abundância natural de ^{13}C , almejando aproximar ainda mais as condições deste estudo com as encontradas rotineiramente nos laboratórios de síntese.

4.3.2.1 – Reação de hidrólise de acetais

A reação de hidrólise, catalisada por ácido trifluoracético (ATF), do acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano foi escolhida para este estudo devido ao trabalho de parceria com o laboratório de síntese orgânica do DQ-UFSCar. A reação está esquematizada abaixo (Figura 66) onde parte do acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano (**7**), cujo carbono protegido é C-2, e leva à formação do produto p-nitrobenzaldeído (**14**).

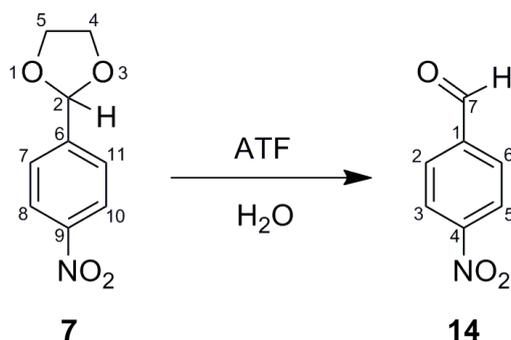


Figura 66: Esquema reacional da hidrólise do acetal **7**, catalisada pelo ATF.

A proposta mecanística desta reação⁸⁷ (Figura 67) inicia-se com a protonação de um dos oxigênios do grupo protetor (**7**), levando à formação de um intermediário com um bom grupo abandonador (**8**). A saída desse grupo conduz ao íon oxônio (**9**), o qual possui boa eletrofilicidade. Uma molécula de água atua então como um nucleófilo e ataca o intermediário **9**, gerando assim um hemiacetal protonado (**10**), que por sua vez ao ter um hidrogênio abstraído por uma segunda molécula de água, dá origem a um hemiacetal neutro (**11**). Essa etapa representa a primeira metade do processo de desproteção decorrente da hidrólise, e este último intermediário (**11**) apresenta relativamente maior estabilidade se comparado aos demais formados nas etapas anteriores.

Seguindo o mecanismo proposto na figura 67, a protonação do oxigênio do grupo protetor do intermediário **11** origina o composto **12**, que possui um bom grupo abandonador. A saída deste grupo leva à formação de um aldeído protonado (**13**) e a liberação de uma molécula de etilenoglicol. Por fim, uma molécula de água abstrai um próton do intermediário **13** gerando o produto final desprotegido p-nitrobenzaldeído (**14**), e regenerando o ácido utilizado como catalisador da reação.

4.3.2.2 – Otimização dos parâmetros do HSQC-UR

A fim de monitorar tanto os sinais de RMN dos átomos de carbono ^{13}C quanto de hidrogênio, o experimento HSQC-UR foi escolhido para acompanhar a evolução desta reação. Ademais, até o presente momento não há registros na literatura de estudos de mecanismos de reações orgânicas via HSQC-UR, sendo, portanto, um desafio adicional à comprovação da eficiência do uso deste tipo de experimento nestes casos.

Para os experimentos de HSQC-UR foi utilizada a sequência de pulsos descrita na figura 28 e os parâmetros similares aos da tabela 8. Com relação aos parâmetros de aquisição, foram feitas alterações nos valores da frequência central dos pulsos nos canais de ^1H e ^{13}C para 5,0 e 95,5 ppm, respectivamente. Também foi necessário ajustar a amplitude dos gradientes de excitação para $\pm 15,00$ G/cm, com o objetivo de aumentar ligeiramente a janela espectral na dimensão ultrarrápida, bem como dos gradientes de rebatimento G_1 para -35,00 G/cm e G_2 para -14,31 G/cm. Estes dois últimos foram otimizados para que as correlações C-H da região aromática fossem rebatidas para dentro da janela monitorada, que nesse caso foi de 2,40-7,24 ppm para ^1H e de 93,0-117,5 ppm para ^{13}C , com o intuito de monitorar a correlação do carbono protegido ao longo da evolução da reação de hidrólise. Os valores reais de deslocamento químico das correlações C-H da região aromática rebatidas são 127,6/7,65 ppm e 123,7/8,23 ppm.

4.3.2.3 – Monitoramento da reação de hidrólise

Diversos trabalhos na literatura⁷⁹⁻⁸¹ reportaram tentativas de detecção do intermediário hemiacetal, na reação de hidrólise de acetais catalisada por ácido, sem sucesso. Ainda assim, num primeiro momento efetuamos o monitoramento via experimentos de RMN de ^1H durante todo o desenvolvimento reacional numa temperatura de 25° C. Contudo, somente foram observados sinais correspondentes ao acetal **7**, produto **14** e do ATF (Figura 68). Desse modo foi confirmada a impossibilidade, já verificada nos trabalhos citados anteriormente, de detectar esse intermediário hemiacetal **11** de curta duração via RMN de ^1H tradicional.

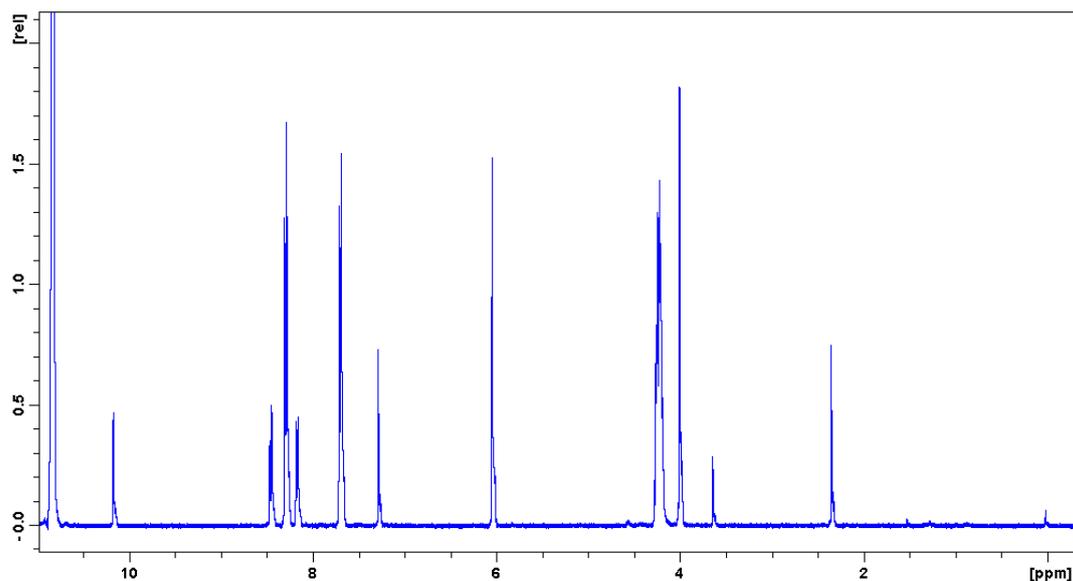


Figura 68: Espectro de RMN de ^1H adquirido no decorrer da reação de hidrólise, com sinais correspondentes ao acetal **7**, produto **14** e ATF.

Após essa primeira tentativa sem sucesso, foi realizado o monitoramento desta reação via RMN-UR. Inicialmente foi adquirido um espectro padrão somente do acetal **7** e após a adição de ácido trifluoracético a evolução da reação foi monitorada pela aquisição contínua de espectros de HSQC-UR a cada 41s. Este tempo é referente à realização de um experimento com 8 varreduras, o que tornou-se necessário por questões de sensibilidade e pela sequência de pulsos utilizar um esquema de ciclagem de fase para os pulsos de desacoplamento de ^{13}C durante a aquisição.

Os principais espectros de HSQC-UR obtidos no decurso da reação encontram-se organizados na figura 69.

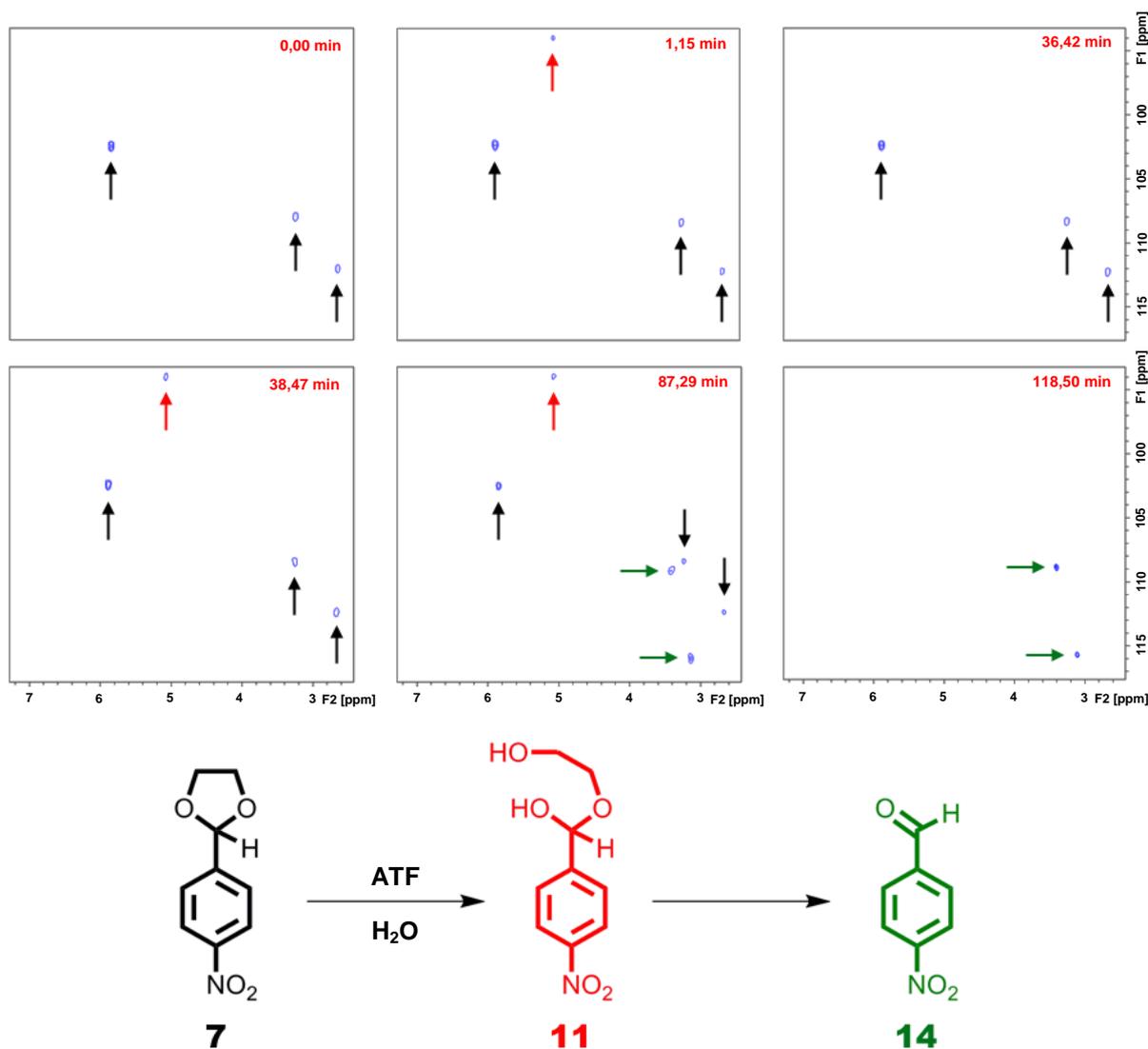


Figura 69: Espectros de HSQC-UR adquiridos no decorrer da reação de hidrólise do acetal **7**.

Analisando os espectros acima (Figura 69), antes da adição do ATF (0,00 min.) temos indicadas em preto a correlação do carbono protegido (C-2) do acetal **7** em 102,5 ppm e as outras duas correspondentes aos carbonos aromáticos (C-7,11 e C-8,10) estão rebatidas para dentro da janela espectral observável. Após 1,15 min. da adição do ATF, foi possível verificar o aparecimento de uma correlação em 94,0 ppm (5,09 ppm \rightarrow ^1H), destacada em vermelho, que com o passar do tempo foi perdendo intensidade até desaparecer por completo, como por exemplo em 36,42 min. Instantes depois esta correlação reapareceu (38,47 min.) e apresentou variação da intensidade ao longo do desenvolvimento da reação. Esta correlação foi atribuída como sendo do carbono protegido do intermediário hemiacetal **11**, e mostrou um

comportamento similar, no que se refere à variação de concentração, ao já descrito na literatura para outros intermediários³⁸.

A formação do produto **14** pôde ser evidenciada após 87,29 min. com o surgimento de duas correlações destacadas em verde, que por serem provenientes da região aromática também foram rebatidas para dentro da janela monitorada, e cujos valores reais são de 130,7/8,08 ppm e 124,5/8,40 ppm. O espectro do instante 87,29 min. nos forneceu uma constatação importante, pois nele temos correlações do acetal, do intermediário e do produto desprotegido indicados nas cores preta, vermelha e verde, respectivamente. O final da reação foi comprovado pelo espectro obtido após 118,50 min., quando somente as correlações referentes ao produto **14** puderam ser observadas. Outros espectros foram adquiridos depois deste instante, mas todos continuaram apresentando somente as correlações existentes no espectro em 118,50 min.

4.3.2.4 – Cálculos teóricos de RMN e NBO

Atualmente, os cálculos teóricos de propriedades de RMN constituem uma importante ferramenta auxiliar na realização de diversos estudos⁸¹⁻⁸³. Por isso, visando confirmar a atribuição experimental previamente realizada para a correlação do intermediário, os tensores de blindagem (deslocamentos químicos) de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **7**, **11** e **14** foram calculados. Nosso objetivo com isso foi o de verificar se estes cálculos indicariam uma blindagem ou desblindagem dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do carbono protegido do hemiacetal **11**.

Inicialmente, os cálculos foram feitos para o acetal **7** e o produto **14**, a fim de verificar se estes resultados corroborariam com os dados experimentais obtidos para estes compostos separadamente, buscando assim inferir se os cálculos teóricos descreveriam corretamente as propriedades de RMN destes compostos. Isto garantiria um grau de confiabilidade nos cálculos teóricos para a estrutura do hemiacetal **11**, cujos dados experimentais não estão disponíveis.

Os resultados obtidos para os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como os dados experimentais para o acetal **7** estão dispostos nas tabelas 9 e 10 a seguir.

Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (ppm) calculados e experimentais para o composto **7**.

Carbono(s)	Experimental	Calculado
2	102,5	108,6
4,5	65,6	66,7
6	145,1	156,4
7,11	127,6	134,9
8,10	123,7	131,3
9	148,6	157,2

Tabela 10: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) calculados e experimentais para o composto **7**.

Hidrogênio(s)	Experimental	Calculado
2	5,89	6,45
4,5	4,09	3,80
7,11	7,65	8,08
8,10	8,23	8,77

Através dos valores encontrados nas tabelas 9 e 10 é possível notar que apesar dos resultados teóricos não coincidirem com os experimentais, eles descrevem a ordem dos deslocamentos químicos de maneira similar ao observado experimentalmente. Com base nos dados apresentados, foi realizada uma análise estatística através da qual foi possível obter o valor do coeficiente de correlação linear (R), conforme consta na figura 70, com o intuito de mensurar quão correlacionados estavam os dados teóricos e experimentais.

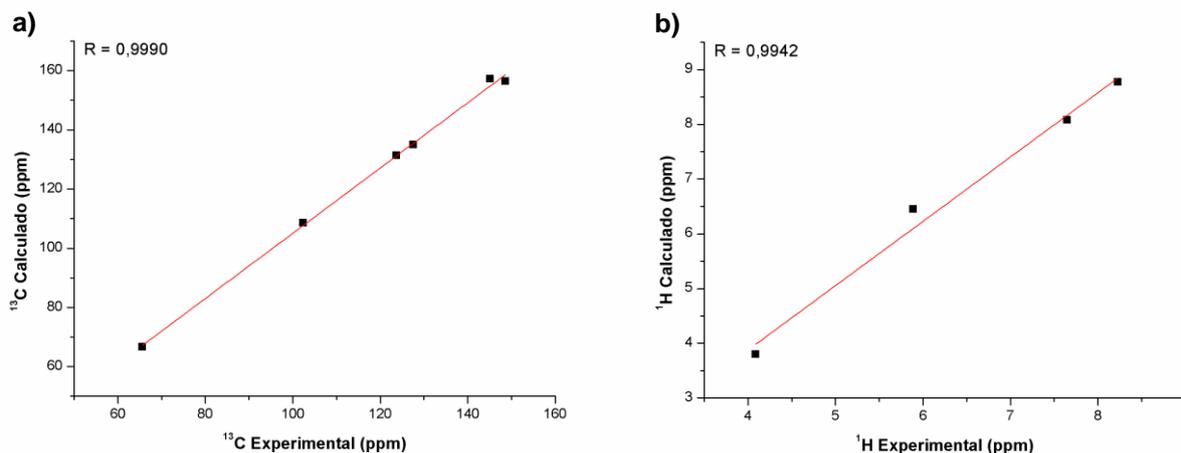


Figura 70: Gráficos de correlação entre os dados experimentais e teóricos de deslocamentos químicos de ^{13}C (a) e ^1H (b) do composto **7**.

A simples análise da localização dos pontos nos gráficos da figura 70 nos permite afirmar que existe uma boa correlação entre os dados teóricos e experimentais. Aliado a isso temos os valores do coeficiente de correlação linear (R) que tanto para ^1H quanto para ^{13}C são superiores a 0,99, indicando assim uma forte correlação teórico-experimental. Desse modo, ficou comprovado que o cálculo teórico de RMN para o acetal **7** descreveu eficientemente os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C deste composto.

Os dados calculados para o produto desprotegido **14**, assim como os deslocamentos químicos experimentais estão organizados nas tabelas 11 e 12 abaixo.

Tabela 11: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (ppm) calculados e experimentais para o composto **14**.

Carbono(s)	Experimental	Calculado
1	140,3	146,8
2,6	130,7	139,1
3,5	124,5	132,3
4	151,3	159,6
7	190,5	202,4

Tabela 12: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (ppm) calculados e experimentais para o composto **14**.

Hidrogênio(s)	Experimental	Calculado
2,6	8,08	8,51
3,5	8,40	8,97
7	10,17	10,43

Similarmente ao observado previamente para o composto **7**, os dados teóricos dispostos nas tabelas 11 e 12 mostraram-se precisos, descrevendo de modo semelhante ao observado experimentalmente a sequência dos deslocamentos químicos. Estes dados foram utilizados para a realização de uma estatística para a determinação do valor de R, tanto para os dados de RMN de ^1H quanto de ^{13}C (Figura 71).

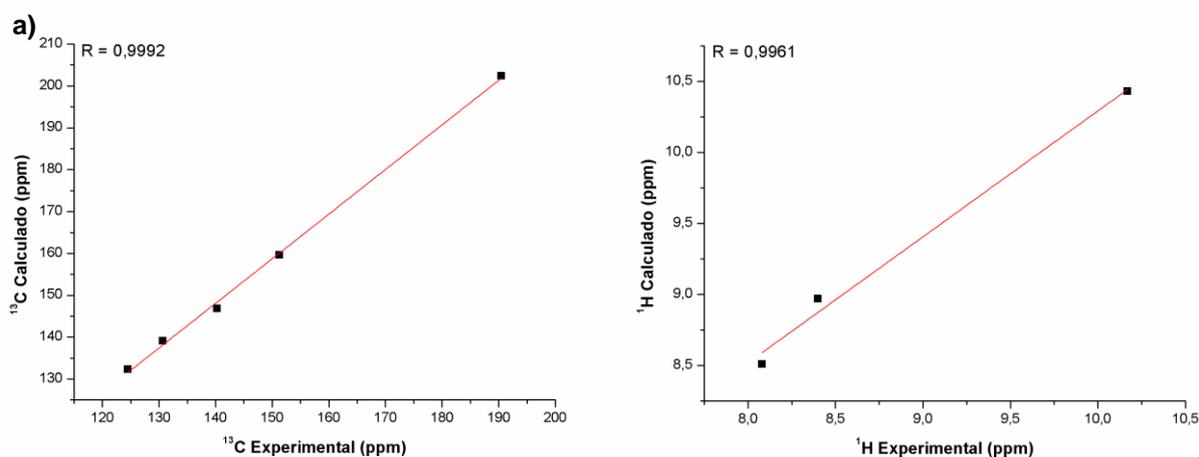


Figura 71: Gráficos de correlação entre os dados experimentais e teóricos de deslocamentos químicos de ^{13}C (a) e ^1H (b) do composto **14**.

Assim como observado para o acetal **7**, os coeficientes de correlação linear tanto para os dados de ^1H quanto de ^{13}C são superiores a 0,99 no caso do produto **14**, evidenciando dessa forma que os resultados advindos dos cálculos teóricos estão fortemente correlacionados com os experimentais. Com isso, foi possível verificar que os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C calculados via mecânica quântica, apresentaram uma excelente corroboração com os dados

atribuídos experimentalmente, confirmando assim a eficiência dos cálculos teóricos na descrição das propriedades magnéticas discutidas para o sistema em questão.

A partir desses resultados, os cálculos de RMN para o intermediário hemiacetal **11** foram realizados nas mesmas condições utilizadas para os compostos **7** e **14**.

Conforme discutido anteriormente, a correlação destacada em vermelho nos espectros da figura 69 apresenta uma blindagem do sinal de RMN de ^1H de 0,79 ppm e de ^{13}C igual a 8,5 ppm, em relação à correlação do carbono protegido do acetal **7**. Ao compararmos os resultados teóricos de **7** com os do hemiacetal **11**, a blindagem observada experimentalmente também é indicada pelos cálculos tanto para o sinal de RMN de ^1H (0,69 ppm) quanto de ^{13}C (9,1 ppm), enquanto que as correlações dos carbonos aromáticos permaneceram inalteradas segundo os cálculos de deslocamentos químicos efetuados. Esses valores de blindagem, para o carbono protegido, fornecidos pelos cálculos teóricos são muito próximos dos encontrados experimentalmente, contribuindo assim para confirmar que a correlação em vermelho na figura 69 refere-se de fato ao carbono protegido do intermediário de curta duração hemiacetal **11**.

Após esta confirmação em relação à correlação do carbono protegido, procurou-se entender quimicamente porque essa blindagem tanto de ^1H quanto de ^{13}C ocorria no hemiacetal. Para tanto, tomou-se por base o fato de que vários exemplos na literatura⁸⁴⁻⁸⁶ comprovam que algumas mudanças nos valores dos deslocamentos químicos ou mesmo de constantes de acoplamento tem relação direta com os efeitos de hiperconjugação existentes nas moléculas. No hemiacetal **11**, a principal mudança estrutural em relação ao acetal **7** é que o carbono protegido em **11** está diretamente ligado a um grupo $-\text{OR}$ e um $-\text{OH}$, e não a dois grupos $-\text{OR}$ como no composto **7**.

Por isso, foi realizado o cálculo do orbital natural de ligação (NBO) para os compostos **7** e **11**, com o objetivo de inferir sobre os efeitos de hiperconjugação existentes nestas moléculas. Foram analisadas somente as interações dos NBOs existentes entre os pares de elétrons livres dos oxigênios diretamente ligados ao carbono da proteção e o orbital sigma antiligante (Figura 72) da ligação entre o carbono protegido e seu respectivo hidrogênio ($\text{C}_2\text{-H}_2$), conforme encontrado na tabela 8. Os resultados teóricos indicaram ainda não haver interações NBO entre os pares de elétrons livres destes oxigênios e as ligações C-H do anel aromático, o que

justifica a não alteração nos valores dos deslocamentos químicos das correlações C-H dos carbonos aromáticos dos compostos **7** e **11**, descrita anteriormente.

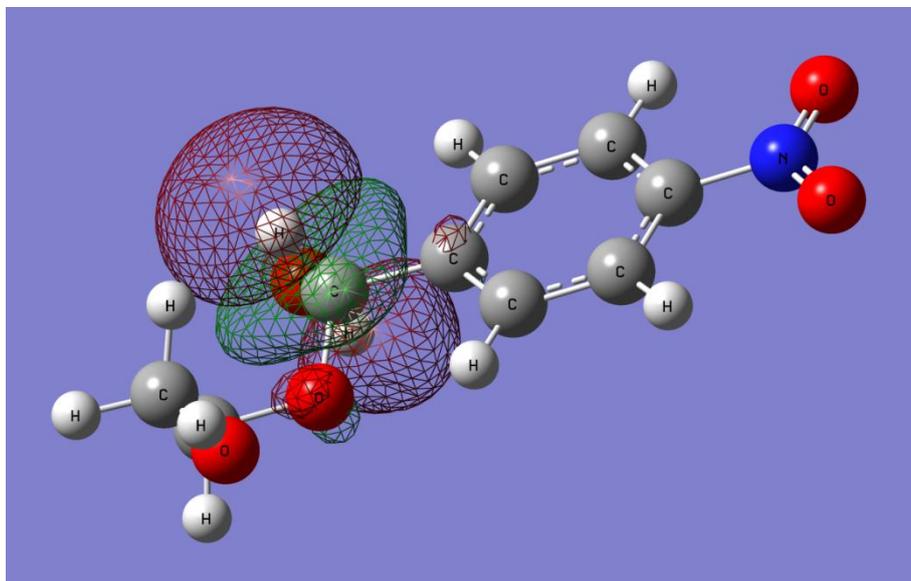


Figura 72: Orbital NBO $\sigma^*_{C(2)-H(2)}$ do hemiacetal **11**.

Tabela 13: Energia de interação (kcal/mol) entre orbitais naturais de ligação (NBO) para o acetal (**7**) e o hemiacetal (**11**).

Interação	Energia - acetal	Energia - hemiacetal
PL ¹ O ₍₁₎ → $\sigma^*_{C(2)-H(2)}$	1,84	4,34
PL ² O ₍₁₎ → $\sigma^*_{C(2)-H(2)}$	1,41	3,27
PL ¹ O ₍₃₎ → $\sigma^*_{C(2)-H(2)}$	1,87	2,05
PL ² O ₍₃₎ → $\sigma^*_{C(2)-H(2)}$	0,65	-
Total	5,77	9,66

PL¹ - par de elétrons livres 1

PL² - par de elétrons livres 2

Os dados existentes na tabela 13 indicam que a energia total de interação dos NBOs no hemiacetal é 3,89 kcal maior do que no acetal. O valor da energia de interação entre orbitais ocupados e vazios indica qual o fluxo de elétrons de uma determinada parte da molécula para outra. Quanto maior for essa energia de

interação ou de delocalização maior é a densidade eletrônica sobre a ligação que recebe este fluxo e, conseqüentemente, menor será a frequência dos núcleos.

Portanto, a maior energia de interação dos referidos NBOs no hemiacetal **11** faz com o que a densidade eletrônica ao longo da ligação C₂-H₂ (carbono protegido) seja maior neste do que no acetal **7**. Logo, como a densidade eletrônica sobre esta ligação no hemiacetal **11** é maior, os valores das frequências de precessão dos núcleos de ¹H e ¹³C que compõem a ligação serão menores em comparação aos do acetal **7**. Sendo, portanto, o efeito de hiperconjugação, mensurado através dos cálculos dos NBOs, responsável pela blindagem dos sinais observada para o hemiacetal **11**.

Neste estudo foi possível inferir a respeito do mecanismo da reação através da caracterização do intermediário de curta duração hemiacetal **11**, formado numa das etapas da hidrólise do acetal **7**. Com isso, foi comprovada a viabilidade do uso de compostos com abundância natural de ¹³C para estudos mecanísticos via RMN-UR. Este também é o primeiro registro de aplicação do experimento HSQC-UR no estudo de mecanismo de reação, expandindo desse modo ainda mais os limites de aplicação da RMN-UR.

Outro aspecto importante deste estudo é a utilização de cálculos quânticos de RMN, pois os trabalhos de mecanismos com RMN-UR desenvolvidos até o momento utilizaram programas computacionais que fazem uso somente de um banco de dados e de redes neurais, para calcular os valores de deslocamentos químicos. Este tipo de programa não leva em consideração efeitos como o de hiperconjugação, que foi essencial para a compreensão dos resultados obtidos neste estudo.

CONCLUSÃO

5 - Conclusão

Por meio deste trabalho podemos concluir que:

1. O protocolo de implementação dos experimentos de COSY-UR e HSQC-UR aqui apresentado possibilita a execução com sucesso destes experimentos, através dos quais é possível obter espectros 2D de qualidade numa fração de segundo. O referido protocolo contribui para que futuras implementações destes experimentos ocorram de forma mais segura. Vale ainda ressaltar que o laboratório de RMN do DQ-UFSCar tornou-se com isso o primeiro laboratório do Brasil e, ao que se sabe, do hemisfério Sul a implementar com sucesso os experimentos de RMN-UR.

2. O algoritmo para processamento dos dados de RMN-UR *kup* foi desenvolvido numa linguagem, que permite a sua implementação em grande parte dos programas de aquisição de dados de RMN desenvolvidos pelas empresas fabricantes de espectrômetros de RMN. Esse conjunto de programa de processamento é uma importante contribuição, uma vez que a partir de agora será possível obter os espectros de RMN-UR processados diretamente no programa do espectrômetro em pouco menos de um (1) segundo, aproximando ainda mais esta metodologia da realidade dos experimentos de RMN multidimensional convencionais.

3. É possível obtermos espectros de COSY-UR num sistema comercial CLAE-RMN, no modo fluxo contínuo. Porém, até o momento a sua viabilidade é útil somente para amostras em altas concentrações e para misturas previamente conhecidas, sendo esses os principais impedimentos para a sua ampla utilização.

4. O experimento HSQC-UR permite o acompanhamento, em tempo real, da evolução de reações orgânicas, mesmo utilizando compostos com abundância natural de ^{13}C . Isso fato amplia ainda mais o número de ferramentas passíveis de serem utilizadas em trabalhos desta natureza. O estudo do mecanismo da reação de hidrólise foi realizado com sucesso e um intermediário de curta duração pôde ser caracterizado via HSQC-UR. Os resultados provenientes dos cálculos quânticos corroboraram com os experimentais, e foram fundamentais para a compreensão dos resultados obtidos.

Finalmente, a implementação da RMN-UR no Brasil abre várias perspectivas de aplicações, e coloca o Brasil em destaque no cenário da RMN mundial, já que somos um dos poucos grupos no mundo a trabalhar com essa metodologia inovadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - Referências Bibliográficas

1. HOLLAUER, E. *Química Quântica*. 1a ed. Rio de Janeiro, LTC, 2008. 500 p.
2. RABI, I.; ZACHARIAS, J.; MILLMAN, S. & KUSCH, P. "A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment". *Phys. Rev.*, **53**(4):318, 1938.
3. BLOCH, F.; HANSEN, W. & PACKARD, M. "Nuclear Induction". *Phys. Rev.*, **69**(3-4):127, 1946.
4. PURCELL, E.; TORREY, H. & POUND, R. "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid". *Phys. Rev.*, **69**(1-2):37-38, 1946.
5. JEENER, J. *International Ampere Summer School II*. Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
6. AUE, W. P.; KARHAN, J. & ERNST, R. R. "Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance". *J. Chem. Phys.*, **64**:2229-2246, 1976.
7. LAUTERBUR, P. C. "Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance". *Nature*, **242**:190, 1973.
8. MANSFIELD, P. & MAUDSLEY, A. A. "Planar spin imaging by NMR". *J. Phys. C: Solid State Phys.*, **9**:L409, 1976.
9. JACOBSEN, N. E. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. 1a ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2007. 688 p.
10. HALLIDAY, D.; RESNICK, R. & KRANE, K. S. *Física 3*. 4a ed. Rio de Janeiro, LTC, 1996. 303 p.
11. CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 2a ed. Oxford, Elsevier, 2009. 383 p.
12. KEELER, J. *Understanding NMR Spectroscopy*. 2a ed. Chichester, John Wiley & Sons, 2010. 511 p.
13. LABORATORY, N. H. M. F. N. H. M. F. "Right and Left Hand Rules" Disponível em: <http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/java/handrules/index.html> Acessado em 17 de Julho de 2011.
14. BAUM, J.; TYCKO, R. & PINES, A. "Broadband and adiabatic inversion of a two-level system by phase-modulated pulses". *Phys. Rev. A*, **32**(6):3435-3447, 1985.
15. HOCH, J. C. & STERN, A. *NMR Data Processing*. 1a ed. New York, Wiley-Liss, 1996. 196 p.

-
16. BRUKER BioSpin *Processing Commands and References - Version 3.0*. Alemanha, 2010. 642 p.
17. CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. J.; PALMER III, A. G.; RANCE, M. & SKELTON, N. J. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*. 2a ed. London, Elsevier, 2007. 885 p.
18. BRÜSCHWEILER, R. & ZHANG, F. "Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy." *J. Chem. Phys.*, **120**(11):5253-5260, 2004.
19. KUPČE, E. & FREEMAN, R. "Projection-reconstruction technique for speeding up multidimensional NMR spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(20):6429-6440, 2004.
20. KUPČE, Ě. & FREEMAN, R. "Two-dimensional Hadamard spectroscopy". *J. Magn. Reson.*, **162**(2):300-310, 2003.
21. STERN, A. S.; LI, K.-B. & HOCH, J. C. "Modern spectrum analysis in multidimensional NMR spectroscopy: comparison of linear-prediction extrapolation and maximum-entropy reconstruction." *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(9):1982-1993, 2002.
22. MANDELSHTAM, V.; TAYLOR, H. & SHAKA, A. "Application of the filter diagonalization method to one- and two-dimensional NMR spectra". *J. Magn. Reson.*, **133**(2):304-312, 1998.
23. VITORGE, B.; BODENHAUSEN, G. & PELUPESSY, P. "Speeding up nuclear magnetic resonance spectroscopy by the use of SMALL Recovery Times - SMART NMR." *J. Magn. Reson.*, **207**(1):149-152, 2010.
24. FRYDMAN, L.; SCHERF, T. & LUPULESCU, A. "The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**(25):15858-15862, 2002.
25. FRYDMAN, L. "Single-scan multidimensional NMR". *C. R. Chimie*, **9**(3-4):336-345, 2006.
26. EMSLEY, L. & BODENHAUSEN, G. "Phase shifts induced by transient Bloch-Siegert effects in NMR". *Chem. Phys. Lett.*, **168**(3-4):297-303, 1990.
27. PELUPESSY, P. "Adiabatic single scan two-dimensional NMR spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(40):12345-12350, 2003.
28. SHROT, Y. & FRYDMAN, L. "Ghost-peak suppression in ultrafast two-dimensional NMR spectroscopy". *J. Magn. Reson.*, **164**(2):351-357, 2003.
29. SHROT, Y.; SHAPIRA, B. & FRYDMAN, L. "Ultrafast 2D NMR spectroscopy using a continuous spatial encoding of the spin interactions". *J. Magn. Reson.*, **171**(1):163-170, 2004.

30. TAL, A.; SHAPIRA, B. & FRYDMAN, L. "A continuous phase-modulated approach to spatial encoding in ultrafast 2D NMR spectroscopy". *J. Magn. Reson.*, **176**(1):107-114, 2005.
31. UGURBIL, K.; GARWOOD, M.; RATH, A. R. & BENDALL, M. R. "Amplitude- and frequency/phase-modulated refocusing pulses that induce plane rotations even in the presence of inhomogeneous B1 fields". *J. Magn. Reson.*, **78**(3):472-497, 1988.
32. GIRAUDEAU, P. *Résonance Magnétique Nucléaire Bidimensionnelle Quantitative*. 1a ed. Sarrebruck, Editions Universitaires Europeennes, 2010. 184 p.
33. FRYDMAN, L.; LUPULESCU, A. & SCHERF, T. "Principles and features of single-scan two-dimensional NMR spectroscopy". *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(30):9204-9217, 2003.
34. MAZZOLA, A. A. "Ressonância magnética : princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional". *Ver. Bras. Fis. Med.*, **3**(1):117-129, 2009.
35. MEHLKOPF, A. F.; KORBEE, D.; TIGGELMAN, T. A. & FREEMAN, R. "Sources of t1 noise in two-dimensional NMR". *J. Magn. Reson.*, **58**(2):315-323, 1984.
36. GIRAUDEAU, P.; LEMEUNIER, P.; COUTAND, M.; DOUX, J.-M.; GILBERT, A.; REMAUD, G. S. & AKOKA, S. "Ultrafast 2D NMR applied to the kinetic study of D-glucose mutarotation in aqueous solution". *J. Spectrosc. Dyn.*, **1**(2):2-7, 2011.
37. HERRERA, A.; FERNÁNDEZ-VALLE, E.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, R.; MOLERO, D.; PARDO, Z. D.; SÁEZ, E. & GAL, M. "Real-Time Monitoring of Organic Reactions with Two-Dimensional Ultrafast TOCSY NMR Spectroscopy." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**(34):6274-6277, 2009.
38. HERRERA, A.; FERNÁNDEZ-VALLE, E.; GUTIÉRREZ, E. M.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, R.; MOLERO, D.; PARDO, Z. D. & SÁEZ, E. "2D Ultrafast HMBC: A Valuable Tool for Monitoring Organic Reactions." *Org. Lett.*, **12**(1):144-147, 2010.
39. SHAPIRA, B.; KARTON, A.; ARONZON, D. & FRYDMAN, L. "Real-time 2D NMR identification of analytes undergoing continuous chromatographic separation". *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(4):1262-1265, 2004.
40. RYU, K.-S.; KIM, C.; PARK, C. & CHOI, B.-S. "NMR analysis of enzyme-catalyzed and free-equilibrium mutarotation kinetics of monosaccharides". *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(30):9180-1, 2004.
41. H, N. L. B.; GROSSEL, J. M.; LOOTEN, P. & MATHLOUTHI, M. "Kinetic study of the mutarotation of D-glucose in concentrated aqueous solution by gas-liquid chromatography". *Food Chem.*, **74**(1):119-124, 2001.
42. GIRAUDEAU, P. & AKOKA, S. "A new gradient-controlled method for improving the spectral width of ultrafast 2D NMR experiments". *J. Magn. Reson.*, **205**(1):171-176, 2010.

-
43. BREITMEIER, E. & VOELTER, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. 3a ed. New York, VCH, 1987.
44. STADLER, D.; GOEPPERT, A.; RASUL, G.; OLAH, G. A.; PRAKASH, G. K. S. & BACH, T. "Chiral Benzylic Carbocations : Low-Temperature NMR Studies and Theoretical Calculations". *J. Org. Chem.*, **74**:312-318, 2009.
45. WILSON, I. D. "Hyphenated Techniques in LC and their input in Biosciences". *J. Chromatogr. B*, **748**(1):1-2, 2000.
46. KLAUS, A. *On-Line LC-NMR and Related Techniques*. 1a ed. Chichester, John Wiley & Sons, 2002. 306 p.
47. JAROSZEWSKI, J. W. "Hyphenated NMR methods in natural products research, Part 1: direct hyphenation". *Planta Med*, **71**(8):691-700, 2005.
48. JAROSZEWSKI, J. W. "Hyphenated NMR methods in natural products research, Part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation". *Planta Med*, **71**(9):795-802, 2005.
49. PLANCK, M. "Ueber das Gesetz der Energieverteilung im Normalspectrum". *Annalen der Physik*, **309**(3):553-563, 1901.
50. ARONS, A. B. & PEPPARD, M. B. "Einstein's Proposal of the Photon Concept—a Translation of the Annalen der Physik Paper of 1905". *Am. J. Phys.*, **33**(5):367-374, 1965.
51. FORESMAN, J. B. & FRISCH, A. *Chemistry with Electronic Structure Methods*. 2a ed. Pittsburgh, Gaussian Inc., 1996. 301 p.
52. HOHENBERG, P. & KOHN, W. "Inhomogeneous Electron Gas". *Phys. Rev.*, **136**(3B):864-871, 1964.
53. KOHN, W. & SHAM, L. J. "Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects". *Phys. Rev.*, **140**(4A):1133-1138, 1965.
54. LEE, C.; YANG, W. & PARR, R. G. "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density". *Phys. Rev. B*, **37**(2):785-789, 1988.
55. BECKE, A. D. "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange". *J. Chem. Phys.*, **98**(7):5648-5652, 1993.
56. PRIZE, N. "The Nobel Prize in Chemistry 1998" Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1998/ Acessado em 06 de Setembro de 2011.
57. YOUNG, D. C. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*. 1a ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2001. 408 p.

-
58. JENSEN, F. *Introduction to Computational Chemistry*. 2a ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2006. 446 p.
59. DUNNING, T. H. "Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen". *J. Chem. Phys.*, **90**(2):1007-1023, 1989.
60. KENDALL, R. A.; DUNNING, T. H. & HARRISON, R. J. "Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions". *J. Chem. Phys.*, **96**(9):6796-6806, 1992.
61. KAUPPY, M.; BÜHL, M. & MALKIN, V. G. *Calculation of NMR and EPR Parameters: Theory and Applications*. 1a ed. Verlag, Wiley-VHC, 2004. 621 p.
62. DITCHFIELD, R. "Self-consistent perturbation theory of diamagnetism". *Mol. Phys.*, **27**(4):789-807, 1974.
63. WOLINSKI, K.; HINTON, J. F. & PULAY, P. "Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations". *J. Am. Chem. Soc.*, **112**(23):8251-8260, 1990.
64. KERNIGHAN, B. W. & RITCHIE, D. M. *C Programming Language*. 2a ed. New Jersey, Prentice Hall, 1988. 274 p.
65. DAMAS, L. *A Linguagem C*. 10a ed. Rio de Janeiro, LTC, 2007. 410 p.
66. TIOBE "TIOBE Programming Community Index for August 2011" Disponível em: <http://www.tiobe.com/index.php/content/paperinfo/tpci/index.html>
Acessado em 02 de Setembro de 2011.
67. WIKIPÉDIA, A ENCICLOPÉDIA LIVRE "C (linguagem de programação)" Disponível em:
[http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=C_\(linguagem_de_programação\)&oldid=26724747](http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=C_(linguagem_de_programação)&oldid=26724747) Acessado em 02 de Setembro de 2011.
68. WIKIPÉDIA, A ENCICLOPÉDIA LIVRE "C++" Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=C++&oldid=26569704>
Acessado em 02 de Setembro de 2011.
69. GIRAUDEAU, P. & AKOKA, S. "Sources of sensitivity losses in ultrafast 2D NMR". *J. Magn. Reson.*, **192**(1):151-158, 2008.
70. GIRAUDEAU, P. & AKOKA, S. "Resolution and sensitivity aspects of ultrafast J-resolved 2D NMR spectra". *J. Magn. Reson.*, **190**(2):339-345, 2008.
71. GIRAUDEAU, P. & AKOKA, S. "Sensitivity and lineshape improvement in ultrafast 2D NMR by optimized apodization in the spatially encoded dimension." *Magn. Reson. Chem.*, **49**(6):307-313, 2011.

72. SHROT, Y. & FRYDMAN, L. "Spatial/spectral encoding of the spin interactions in ultrafast multidimensional NMR". *J. Chem. Phys.*, **131**(22):224516, 2009.
73. LEE, M.-K.; GAL, M.; FRYDMAN, L. & VARANI, G. "Real-time multidimensional NMR follows RNA folding with second resolution". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**(20):9192-9197, 2010.
74. GIRAUDEAU, P.; REMAUD, S. & AKOKA, S. "Evaluation of Ultrafast 2D NMR for Quantitative Analysis". *Anal. Chem.*, **81**(1):479-484, 2009.
75. FRYDMAN, L. & BLAZINA, D. "Ultrafast two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized solutions". *Nat. Phys.*, **3**:415-419, 2007.
76. GaussView 4, version 4.1.2, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2007.
77. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, JR., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C. & POPLE, J. A.; Gaussian 03 Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
78. EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. "LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis". *Magn. Reson. Chem.*, **43**(9):681-687, 2005.
79. AKIRA, K.; MITOME, H.; IMACHI, M.; SHIDA, Y.; MIYAOKA, H. & HASHIMOTO, T. "LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in ¹H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**(5):1091-1096, 2010.
80. ZHOU, Z.; LAN, W.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; XIA, S.; ZHU, H.; YE, C. & LIU, M. "Implementation of real-time two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy for on-flow high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, **1154**(1-2):464-468, 2007.
81. VILCACHAGUA, J. D.; DUCATI, L. C.; RITTNER, R.; CONTRERAS, R. H. & TORMENA, C. F. "Experimental, SOPPA(CCSD), and DFT Analysis of Substituent

-
- Effects on NMR Coupling Constants in Fluorobenzene Derivatives". *J. Phys. Chem. A*, **115**(7):1272-1279, 2011.
82. ABRAHAM, R. J.; LEONARD, P. & TORMENA, C. F. "A ^1H NMR and theoretical investigation of the conformations of some monosubstituted cyclobutanes". *Magn. Reson. Chem.*, **49**(1):23-29, 2011.
83. QUEIROZ JR, L. H. K.; LACERDA JR, V.; DOS SANTOS, R. B.; GRECO, S. J.; CUNHA NETO, A. & DE CASTRO, E. V. R. "NMR property calculations and experimental study of the 1,6-epoxycarvone and α -epoxypinene: a comparison of models". *Magn. Reson. Chem.*, **49**(3):140-146, 2011.
84. TORMENA, C. F.; DIAS, L. C. & RITTNER, R. "Orbital Interactions and Their Effects on ^{13}C NMR Chemical Shifts for 4,6-Disubstituted-2,2-dimethyl-1,3-dioxanes. A Theoretical Study". *J. Phys. Chem. A*, **109**(27):6077-6082, 2005.
85. CONTRERAS, R. H.; ESTEBAN, A. L.; DIEZ, E.; DELLA, E. W.; LOCHERT, I. J.; SANTOS, F. P. & TORMENA, C. F. "Experimental and Theoretical Study of Hyperconjugative Interaction Effects on NMR $^1J_{\text{CH}}$ Scalar Couplings". *J. Phys. Chem A*, **110**(12):4266-4275, 2006.
86. DUCATI, L. C.; FREITAS, M. P. & TORMENA, C. F. "The case of intramolecular hydrogen bonding, hyperconjugation and classical effects on the conformational isomerism of substituted carbonyl and thiocarbonyl compounds". *J. Mol. Struct. Theochem*, **851**(1-3):147-157, 2008.
87. SMITH, B. M. & MARCH, J. *Advanced Organic Chemistry*. 5a ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 2001. 2083 p.

APÊNDICES

PROGRAMA DE PULSO DA SEQUÊNCIA DE CALIBRAÇÃO DOS PULSOS E GRADIENTES DE CODIFICAÇÃO

```
;echograd4  
;avance-version  
;1D sequence  
;modified by Patrick Giraudeau  
;Evaluation of adiabatic excitation profile for a continuous excitation
```

```
;$CLASS=HighRes  
;$DIM=1D  
;$TYPE=  
;$SUBTYPE=  
;$COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>  
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze  
  200u UNBLKGRAD  
  200u gron0  
2 d1 groff  
  300u gron0  
p11:sp1:f1 ph10
```

```
d20
200u groff
1m pl1:f1
p1 ph1
d2 gron1
200u groff
d3
p2 ph2
d4
d5 gron2
go=2 ph31
1m groff
100u BLKGRAD
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0
ph2=0
ph10=0
ph31=0

;p1: f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;sp1: shaped pulse power level for selective excitation
;spnam1: shaped pulse for selective excitation
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : duration of refocusing gradient
;d2+d3+200u=TE
;d4 : delay adjusted for observation of echo
;d5 : acquisition gradient delay before opening receiver
;de=10u
;GPZ0 : excitation gradient [0-100]
;GPZ1 : defocusing gradient
```

;GPZ2 : refocusing gradient GPZ2=GPZ1.

PROGRAMA DE PULSO DA SEQUÊNCIA COSY-UR

```
;ufcosy
;avance-version
;spatially selective acquisition using adiabatic pulse and field gradients
;acquisition including gradient switching
;modified by Patrick Giraudeau

;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <De.incl>

1 ze
  100u UNBLKGRAD
2 d1 p11:f1
  p1 ph1
  10u gron0
  p11:sp1:f1 ph2
```

10u groff
10u gron1
p11:sp1:f1 ph4
10u groff
10u pl1:f1
d24 gron24
10u groff
10u

p23:gp23
10u
p1 ph1
10u
p26:gp26
d25 gron25
10u groff
10u
ACQ_START(ph30,ph31)
1u DWELL_GEN:f1
3 d20 gron2
 d6 groff
 d20 gron3
 d6 groff
lo to 3 times l3
rcyc=2
100u BLKGRAD
30m mc #0 to 2 F1QF(ip10, id0)
d5
exit

ph1=0
ph2=0
ph4=2
ph30=0

ph31=0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)

;sp1: shaped pulse power level for selective detection

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

;spnam1 : shaped pulse for selective detection

;d1 : relaxation delay; $1-5 * T1$

;d11 : short delay

;d12 : delay for spin echo adjusting

;GPZ0 : strength for excitation gradient [0-100]

;GPZ1 : strength for reversed excitation gradient $GPZ1 = -GPZ0$

;GPZ2 : strength for acquisition gradient [0-100]

;GPZ3 : strength for reversed acquisition gradient $GPZ3 = -GPZ2$

;NS: 1

;l3=number of loops for acquisition

PROGRAMA DE PULSO DA SEQUÊNCIA COSY-UR COM PRÉ-SATURAÇÃO

```
;ufcosy-dpr
;avance-version
;spatially selective acquisition using adiabatic pulse and field gradients
;acquisition including gradient switching
;modified by Patrick Giraudeau

;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <De.incl>

1 ze
; 20u st0
  100u UNBLKGRAD
2 30m fq1:f1
  d12 pl9:f1 pl12:f2
```

d1 cw:f1 ph29 cw:f2 ph29
 d13 do:f1 do:f2
 20u fq1:f1
 20u pl1:f1
 p1 ph1
 10u gron0
 p11:sp1:f1 ph2
 10u groff
 p20:gp20
 10u gron1
 p11:sp1:f1 ph2
 10u groff
 p21:gp21
 10u pl1:f1
 d24 gron24
 10u groff
 10u
 p23:gp23
 10u
 p1 ph1
 10u
 p26:gp26
 d25 gron25
 10u groff
 10u
 ACQ_START(ph30,ph31)
 1u DWELL_GEN:f1
 3 p15:gp15
 d6
 p15:gp16
 d6
 lo to 3 times l3
 rcyc=2
 100u BLKGRAD

```
30m mc #0 to 2 F1QF(ip10, id0)
d5
exit

ph1=0 2
ph2=1
ph29=0
ph30=0
ph31=0 2
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1: shaped pulse power level for selective detection
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;spnam1 : shaped pulse for selective detection
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11 : short delay
;d12 : delay for spin echo adjusting
;GPZ0 : strength for excitation gradient [0-100]
;GPZ1 : strength for reversed excitation gradient GPZ1 = -GPZ0
;GPZ2 : strength for acquisition gradient [0-100]
;GPZ3 : strength for reversed acquisition gradient GPZ3 = -GPZ2
;NS: 1
;l3=number of loops for acquisition
```

PROGRAMA DE PULSO DA SEQUÊNCIA HSQC-UR

```
;ufhsqc
;avance-version
;spatially selective acquisition using adiabatic pulse and field gradients
;acquisition including gradient switching
;modified by Patrick Giraudeau
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <De.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d6=d4-d15"
"d10=p20"
"d11=p21"
"p15=(td*dw)/(2*I3)-2*d17-p4"
```

1 ze
 20u st0
 100u UNBLKGRAD

2 30m
 100u
 30m pl2:f2
 d1 pl1:f1
 p1 ph0
 d4
 (center (p2 ph1) (p4 ph4):f2)
 d4
 p1 ph2
 (p3 ph3):f2
 d11
 10u gron0
 p7:sp1:f2 ph1
 10u groff
 d10
 10u
 p2 ph1
 10u
 10u gron1
 p7:sp1:f2 ph1
 10u groff
 d14 gron4 pl2:f2
 10u groff
 (p3 ph5):f2
 (p1 ph1)
 d4
 (center (p2 ph1) (p4 ph4):f2)
 d6
 d15 gron5
 10u groff
 10u

d15 gron7
10u groff
ACQ_START(ph30,ph31)
1u DWELL_GEN:f1
3 p15:gp15
d17
(p4 ph6):f2
d17
p15:gp16
d17
(p4 ph6):f2
d17 ipp6
lo to 3 times l3
rcyc=2
100u BLKGRAD
30m mc #0 to 2 F1QF(id2)
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0
ph5=0 2
ph6=0 2 0 0
ph7=1
ph8=3
ph30=0
ph31=0 2

;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1: shaped pulse power level for selective detection
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;spnam1 : shaped pulse for selective detection

```

;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11 : short delay
;d12 : delay for spin echo adjusting
;GPZ0 : strength for excitation gradient [0-100]
;GPZ1 : strength for reversed excitation gradient GPZ1 = -GPZ0
;GPZ2 : strength for acquisition gradient [0-100]
;GPZ3 : strength for reversed acquisition gradient GPZ3 = -GPZ2
;NS: 1
;l3=number of loops for acquisition

```

PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA PROCESSAMENTO DOS DADOS DE RMN-UR *KUP*

```

/* KUP - Keng Ultrafast Processing */

```

```

/*****/
/*   Short Description :                               */
/*   Program to process the Ultrafast NMR data in real-time   */
/*****/
/*   Keywords :                                         */
/*   KUP, ultrafast processing                           */
/*****/
/*   Author(s) :                                       */
/*   Name      : Luiz Keng                               */
/*   Organisation : UFSCar - Universidade Federal de Sao Carlos */
/*                                                    */
/*   Email     : professorkeng@gmail.com                */
/*****/
/*   Name      Date  Modification:                       */
/*   keng      010911  created                            */
/*****/

```

```

#include <inc/kuplib>

```

```

//variables declaration

float GradValue=50.000000;

char ir[PATH_MAX], us1[PATH_MAX];
char PROBH[PATH_MAX], lpwg[16]="l1", lprg[16];
char iRaw_PathName[PATH_MAX];
char oRaw_PathName[PATH_MAX];
char   nuc_2[1],nuc_c[]="off",nuc_h[]="1H",   alltest[]="all",   gtest[]="gradset",
stest[]="shearing", zefftest[]="eef";
int Parmode, l7, TD1_T, TDI, TD2R, NSI, lpok, vdta, vdtypa=4, expn, dmod, dda,
ftmod, nuc_test;
float dH=4257.6, dC=1070.5 , dN=431.6, dX=dH;
float GradOk, GradStr=GradValue, GradEX, offs_1, offs_2, lb, dP=60.0, lacq=1.8;
double dda_d, swh_1, swh_2, sw_1, sw_2, o1_p, o2_p;

FETCHPARS("l 3",&l7)
FETCHPAR("PARMODE",&Parmode)
FETCHPARS("TD",&TDI)
FETCHPARS("NS",&NSI)
FETCHPARS("PROBHD",&PROBH)
FETCHPARS("DTYPA",&vdta)
FETCHPARS("DIGMOD",&dmod)
FETCHPARS("FT_mod",&ftmod)
FETCHPAR("LB",&lb)
expn=expno;

// Effective Excitation Factor (EEF) calculation

if ((i_argc == 3) && (strcmp(i_argv[2],zefftest)==0))
{
// load excitation block values

    FETCHPARS("GPZ 0",&GradEX)

```

```
if (GradEX == 0)
{
    FETCHPARS("GPZ 1",&GradEX)
}

FETCHPARS("NUC2",&nuc_2)
if (strcmp("13C",nuc_2)==0)
{
    dX=dC;
}
else if (strcmp("15N",nuc_2)==0)
{
    dX=dN;
}

GETFLOAT("What is the pulse width (kHz) of the shaped pulse?",dP)
GETFLOAT("What is the length (cm) of the detection region?",lacq)

// calculation

Zeffcalc(dP,lacq,dX,GradEX,GradStr);

}

if ((i_argc == 4) && (strcmp(i_argv[2],zefftest)==0))
{

if (strcmp(i_argv[3],gtest)==0)
{
    GradOk = GradSet(PROBH,GradValue);
    KUPRec(GradOk);
    GradStr=GradOk;

// load excitation block values
```

```
    FETCHPARS("GPZ 0",&GradEX)
    if (GradEX == 0)
    {
        FETCHPARS("GPZ 1",&GradEX)
    }

    FETCHPARS("NUC2",&nuc_2)
    if (strcmp("13C",nuc_2)==0)
    {
        dX=dC;
    }
    else if (strcmp("15N",nuc_2)==0)
    {
        dX=dN;
    }

    GETFLOAT("What is the pulse width (kHz) of the shaped pulse?",dP)
    GETFLOAT("What is the length (cm) of the detection region?",lacq)

    // calculation

    Zeffcalc(dP,lacq,dX,GradEX,GradStr);

}
}

// set o1 and o2 according to the experiment

    FETCHPARS("O1P",&o1_p)
    FETCHPARS("NUC2",&nuc_2)
    if ((strcmp(nuc_c,nuc_2)==0) || (strcmp(nuc_h,nuc_2)==0))
    {
        o2_p=o1_p;
```

```
swh_2=1692.620;
swh_1=1588.206;
sw_2=4.2299;
sw_1=3.9690;
}
else
{
  nuc_test=1;
  FETCHPARS("O2P",&o2_p)
  swh_2=2455.568;
  swh_1=1953.125;
  sw_2=24.4038;
  sw_1=4.8812;
}

// test digitization mode

if (dmod==1)
{
  FETCHPARS("GRPDLY",&dda_d)
  dda=(2*dda_d+0.5);
}
else
{
  dda=0;
}

// data type of the raw data

if (vdta==2)
{
  vdtypa=8;
}
```

```
// acquisition loop verification

if (I7 < 32)
{
  GETSTRING("Which variable did you set for the acquisition loop? (I1, I2, I3,
...)",lpwg)
  lpok=LoopGet(lpwg);
  sprintf(lprg,"I %d",lpok);
  FETCHPARS(lprg,&I7)
}

// set the original raw data path

strcpy(iRaw_PathName, ACQUPATH(Parmode ? "ser":"fid"));

// set new name for processed data

strcpy (ir,name);
strcpy (us1,name);
strcat (us1,"_US");

//set total TDF1

TD1_T = I7*2;

//set real size of TDF2

TD2R=TDI/TD1_T;

// create positive directory

DATASET(us1,expn*10+1,1,disk,user)

sprintf(oRaw_PathName, "%s/%s/%d/ser", disk, name, expno);
```

```
// processing parameters

// 1d raw data

if (Parmode == 0)
{
  RPAR("kup_par","acqu")
  RPAR("kup_par","proc")
ftmod=6;
}

if (nuc_test == 1)
{
  STOREPARS("NUC1","13C")
  STOREPAR1S("NUC1","1H")
  STOREPARS("NUC2","1H")
  STOREPARS("SFO1",100.6223775)
  STOREPAR1S("SFO1",400.1320007)
  STOREPARS("SFO2",400.1320007)
  STOREPAR1("SF",400.1300000)
  STOREPAR("SF",100.6127690)
  STOREPAR1S("SF",400.1300000)
  STOREPARS("SF",100.6127690)
}

STOREPAR("TD",TDI/TD1_T)
STOREPARS("TD",TDI/TD1_T)
STOREPAR1("TD",TD1_T/2)
STOREPAR1S("TD",TD1_T/2)
STOREPAR("NS",NSI)
STOREPARS("NS",NSI)
STOREPAR("SI",(TDI/(TD1_T*2)))
STOREPARS("SI",(TDI/(TD1_T*2)))
```

```
STOREPAR1("SI",(2*TD1_T))
STOREPAR1S("SI",(2*TD1_T))
STOREPAR("SWH",swh_2)
STOREPARS("SWH",swh_2)
STOREPAR1("SWH",swh_1)
STOREPAR1S("SWH",swh_1)
STOREPAR("PKNL",0)
STOREPARS("PKNL",0)

// set offset automatically

offs_1=(o1_p+(sw_1/2));
offs_2=(o2_p+(sw_2/2));
STOREPAR("OFFSET",offs_2)
STOREPARS("OFFSET",offs_2)
STOREPAR1("OFFSET",offs_1)
STOREPAR1S("OFFSET",offs_1)

// separate positive

FidProc_Pos(iRaw_PathName,oRaw_PathName,l7,vdtypa,TD2R,dda);

// Shearing option

if ((i_argc == 3) && (strcmp(i_argv[2],stest)==0))
{
    STOREPAR1("SI",(2*TD1_T))
    STOREPAR1S("SI",(2*TD1_T))
    STOREPAR("WDW",0)
    XF2
    STOREPAR("WDW",2)
    STOREPAR("LB",lb)
    STOREPARS("LB",lb)
    STOREPAR("FT_mod",0)
```

```
XTRFP2
XIF2
STOREPAR("OFFSET",offs_2)
STOREPARS("OFFSET",offs_2)

STOREPARS("FT_mod",ftmod)
STOREPARS("AXUNIT","")
STOREPARS("SW_p",swh_2)
}
else
{
    // set parameters

STOREPAR1("STSI",TD1_T/2)
STOREPAR1S("STSI",TD1_T/2)
STOREPAR1("PH_mod",2)
STOREPAR1S("PH_mod",2)
STOREPAR1("SI",TD1_T/2)
STOREPAR("WDW",0)
XF2
STOREPAR("WDW",2)
STOREPAR("LB",lb)
STOREPARS("LB",lb/lb-1)
STOREPAR("FT_mod",0)
XTRFP2
XIF2
STOREPAR1("SI",2*TD1_T)
STOREPAR1S("SI",2*TD1_T)
STOREPAR1("STSI",0)
STOREPAR1S("STSI",0)
STOREPAR("OFFSET",offs_2)
STOREPARS("OFFSET",offs_2)

STOREPARS("FT_mod",ftmod)
```

```
STOREPARS("AXUNIT","")
STOREPARS("SW_p",swh_2)
XF1

// convert F2 from seconds to ppm and scale sw of the processed spectrum

STOREPAR1("OFFSET",offs_1)
STOREPAR1S("OFFSET",offs_1)
STOREPAR1S("SW_p",swh_1)
}

// all processing option

if ((i_argc == 3) && (strcmp(i_argv[2],alltest)==0))
{

// create negative directory

DATASET(us1,expn*10+2,1,disk,user)

sprintf(oRaw_PathName, "%s/%s/%d/ser", disk, name, expno);

// processing parameters

// 1d raw data

if (Parmode == 0)
{
RPAR("kup_par", "acqu")
RPAR("kup_par", "proc")
ftmod=6;
}

if (nuc_test == 1)
```

```

{
    STOREPARS("NUC1","13C")
    STOREPAR1S("NUC1","1H")
    STOREPARS("NUC2","1H")
    STOREPARS("SFO1",100.6223775)
    STOREPAR1S("SFO1",400.1320007)
    STOREPARS("SFO2",400.1320007)
    STOREPAR1("SF",400.1300000)
    STOREPAR("SF",100.6127690)
    STOREPAR1S("SF",400.1300000)
    STOREPARS("SF",100.6127690)
}

```

```

STOREPAR("TD",TDI/TD1_T)
STOREPARS("TD",TDI/TD1_T)
STOREPAR1("TD",TD1_T/2)
STOREPAR1S("TD",TD1_T/2)
STOREPAR("NS",NSI)
STOREPARS("NS",NSI)
STOREPAR("SI",(TDI/(TD1_T*2)))
STOREPARS("SI",(TDI/(TD1_T*2)))
STOREPAR1("SI",(2*TD1_T))
STOREPAR1S("SI",(2*TD1_T))
STOREPAR("SWH",swh_2)
STOREPARS("SWH",swh_2)
STOREPAR1("SWH",swh_1)
STOREPAR1S("SWH",swh_1)
STOREPAR("PKNL",0)
STOREPARS("PKNL",0)

```

```
// set offset automatically
```

```

offs_1=(o1_p+(sw_1/2));
offs_2=(o2_p+(sw_2/2));

```

```
STOREPAR("OFFSET",offs_2)
STOREPARS("OFFSET",offs_2)
STOREPAR1("OFFSET",offs_1)
STOREPAR1S("OFFSET",offs_1)

// separate negative

FidProc_Neg(iRaw_PathName,oRaw_PathName,l7,vdtypa,TD2R,dda);

// set parameters

STOREPAR1("STSI",TD1_T/2)
STOREPAR1S("STSI",TD1_T/2)
STOREPAR1("PH_mod",2)
STOREPAR1S("PH_mod",2)
STOREPAR1("SI",TD1_T/2)
STOREPAR("WDW",0)
XF2
REV2
STOREPAR("WDW",2)
STOREPAR("LB",lb)
STOREPARS("LB",lb/lb-1)
STOREPAR("FT_mod",0)
XTRFP2
XIF2
STOREPAR1("SI",TD1_T)
STOREPAR1S("SI",TD1_T)
STOREPAR1("STSI",0)
STOREPAR1S("STSI",0)
STOREPAR("OFFSET",offs_2)
STOREPARS("OFFSET",offs_2)

STOREPARS("FT_mod",ftmod)
STOREPARS("AXUNIT", "")
```

```
STOREPARS("SW_p",swh_2)
```

```
XF1
```

```
// convert F2 from seconds to ppm and scale sw of the processed spectrum
```

```
STOREPAR1("OFFSET",offs_1)
```

```
STOREPAR1S("OFFSET",offs_1)
```

```
STOREPAR1S("SW_p",swh_1)
```

```
}
```

```
// view data processed
```

```
DATASET(us1,expn*10+1,1,disk,user)
```

```
VIEWDATA
```

```
QUIT
```

BIBLIOTECA DE FUNÇÕES *KUPLIB* UTILIZADA PELO PROGRAMA DE PROCESSAMENTO *KUP*

```
/* C *
*****
*/

// separate positive data

void      FidProc_Pos      (char      iRaw_PathName[PATH_MAX],char
oRaw_PathName[PATH_MAX],int l7,int sdta,int TD2_R,int ddacq)
{
    FILE * iFile,* oFile;
    long lSize;
    char * buffer;
    int i;
    int TD1_UF;

    // read and create binaries files

    iFile = fopen ( iRaw_PathName , "rb" );

    if (iFile==NULL) {Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Unable to read the source file.");
exit(1);}
}
```

```
oFile = fopen ( oRaw_PathName , "wb" );

if (oFile==NULL) {Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Failed to create the file. Please, check
the access permissions."); exit(1);}

// obtain fid size

fseek (iFile , 0 , SEEK_END);
ISize = ftell (iFile);
rewind (iFile);

buffer = (char*) malloc (sizeof(char)*ISize);
if (buffer == NULL) {Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Memory error"); exit(1);}

// size of TD1UF dimension

TD1_UF = (I7*2-1);

// create ser UF files

for (i=0;i<=TD1_UF;i=i+2)
{

fseek (iFile , sdtA*TD2_R*i+sdtA*ddacq, 0);
fread (buffer,1,TD2_R*sdtA,iFile);
fwrite(buffer,1,TD2_R*sdtA,oFile);

};

// close binaries files
fclose (iFile);
fclose (oFile);
free(buffer);
```

```
return(0);
}

// separate negative data

void      FidProc_Neg      (char      iRaw_PathName[PATH_MAX],char
oRaw_PathName[PATH_MAX],int I7,int sdtA,int TD2_R,int ddacq)
{
FILE * iFile,* oFile;
long ISize;
char * buffer;
int i;
int TD1_UF;

// read and create binaries files

iFile = fopen ( iRaw_PathName , "rb" );

if (iFile==NULL) {Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Unable to read the source file.");
exit(1);}

oFile = fopen ( oRaw_PathName , "wb" );

if (oFile==NULL) {Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Failed to create the file. Please, check
the access permissions."); exit(1);}

// obtain fid size

fseek (iFile , 0 , SEEK_END);
ISize = ftell (iFile);
rewind (iFile);

buffer = (char*) malloc (sizeof(char)*ISize);
```

```
if (buffer == NULL) {Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Memory error"); exit(1);}

// size of TD1UF dimension

TD1_UF = (I7*2-1);

// create ser UF files
for (i=1;i<=TD1_UF;i=i+2)
{

fseek (iFile , sdta*TD2_R*i+sdta*ddacq, 0);
fread (buffer,1,TD2_R*sdta,iFile);
fwrite(buffer,1,TD2_R*sdta,oFile);

};

// close binaries files
fclose (iFile);
fclose (oFile);
free(buffer);

return(0);

}

// variable 'gar' is just to fix an error

float GradSet (char PROBEHD[PATH_MAX],const float GradVal)
{
FILE * Grad1, * Grad2;
long lSize;
char * var1, * var2, * var3;
char ppar[20],pser[20],gar[20],tpar[20],tser[20],phnb[20],sgsvalue[20],sgcvalue[20];
```

```
char gcp[20]="PHGMCZ",gs[20]="PHGMSZ",gar[20],tgcp[20],tgs[20];
char PHD_List[PATH_MAX], PHD_Cont[PATH_MAX], PHD_Conf[PATH_MAX],
PHD_CfG[PATH_MAX];
int i, mtest=0, gtest=0;
float fgvalue, fgvalue;

// cat the part and serial number of probe
var1 = strrchr(PROBEHD, 'Z');
sscanf(var1,"Z%[^/]/%", ppar, pser);
sprintf(PHD_List, "%s/stan/nmr/lists/probeheads", PathXWinNMRExp());

// read and create binaries files
Grad1 = fopen ( PHD_List , "r" );
if (Grad1==NULL)
{
printf("\n Error! Spectrometer configuration file was not found.");
return GradVal;
}
else

{

while (mtest == 0)

{
var2 = fgets(PHD_Cont, sizeof(PHD_Cont), Grad1);

if (var2 == NULL)

{
printf("\n Error! Your PROBE was not found in the probeheads list file.");
return GradVal;
}
}
```

```
else
{
var2 = strrchr(PHD_Cont, 'Z');
if (var2 != NULL)
{
sscanf(var2,"Z%[^/]/%s", tpar, tser);
if (strcmp(ppar,tpar) == 0 && strcmp(pser,tser) == 0)
{
var2 = strrchr(PHD_Cont, '[');
sscanf(++var2,"%[^]" , phnb);
mtest = 1;
}
}
}

}
fclose(Grad1);

sprintf(PHD_Conf, "%s/instr/probeheads/Z%s_%s_%s.par",
PathXWinNMRConf(),ppar,pser,phnb);

// read and create binaries files
Grad2 = fopen ( PHD_Conf , "r" );
if (Grad2==NULL)
{
printf("\n Error! Probe configuration file was not found.");
return GradVal;
}
else
{
while (gtest == 0)
{
```

```
var3 = fgets(PHD_CfG, sizeof(PHD_CfG), Grad2);

if (var3 == NULL)
{
    printf("\n Error! Your gradient specifications was not found in the probehead
file.");
    return GradVal;
}
else
{

var3 = strchr(PHD_CfG, '$');
if (var3 != NULL)
{
    sscanf(++var3,"%[^=]", tgcpair);
    if (strcmp(gcpair,tgcpair) == 0)
    {
        var3 = strchr(PHD_CfG, '=');
        sscanf(++var3," %s", sgcvalue);
        fgcvalue = atof(sgcvalue);
        var3 = fgets(PHD_CfG, sizeof(PHD_CfG), Grad2);
        var3 = strchr(PHD_CfG, '=');
        sscanf(++var3," %s", sgsvalue);
        fgsvalue = atof(sgsvalue);
        fclose(Grad2);
        return (fgcvalue * fgsvalue);
    }
    else if (strcmp(gspair,tgcpair) == 0)
    {
        var3 = strchr(PHD_CfG, '=');
        sscanf(++var3," %s", sgsvalue);
        fgsvalue = atof(sgsvalue);
        var3 = fgets(PHD_CfG, sizeof(PHD_CfG), Grad2);
        var3 = strchr(PHD_CfG, '=');
```

```
    sscanf(++var3," %s", sgcvalue);
    fgcvalue = atof(sgcvalue);
    fclose(Grad2);
    return (fgcvalue * fgsvalue);
}
}
}

}
return GradVal;
}
return GradVal;
}

}

int KUPRec (float number)
{
    FILE * kupfile;
    char * ver1;
    char
fixing[PATH_MAX],search[PATH_MAX],kuppath[PATH_MAX],recomp[PATH_MAX];
    char vartyp[20],varnam[20],vttest[20]="float",vntest[20]="GradValue";
    int wtest=0, k=0, cont;

    sprintf(kuppath,"%s/stan/nmr/au/src/user/kup",PathXWinNMRExp());
    kupfile = fopen ( kuppath, "r+ " );
    if (kupfile==NULL)
    {
        printf("\n Error! KUP file is not in the correct directory.");
    }
    else
```

```

{
  while (wtest == 0)
  {

    ver1 = fgets(search, sizeof(search), kupfile);
    k++;
    if (ver1 == NULL)
    {
      printf("\n Error! Your KUP file is not correct.");
      return 0;
    }
    else
    {
      sscanf(ver1,"%s %[^=]",vartyp,varnam);

      if (strcmp(vartyp,vttest) == 0 && strcmp(varnam,vntest) == 0)
      {
        rewind(kupfile);
        for (cont=1;cont<=k-1;cont++)
        {
          fgets(search, sizeof(search), kupfile);
        }
        sprintf(fixing,"float GradValue=%f;", number);
        fputs(fixing, kupfile);
        fclose(kupfile);
        sprintf(recomp,"cplbruk \"%s\"", kuppath);
        if (CPR_exec(recomp, WAIT_TERM) != NORM_TERM)
        {
          Proc_err(DEF_ERR_OPT, "Error! The current user don't have permission to
compile the KUP AU.");
          return 0;
        }
        wtest = 1;
      }
      return 0;
    }
  }
}

```

```
    }
  }
}
}

}

// function for acquisition loop verification

int LoopGet(char lpwg[30])
{
  char ltemp[10];
  char lprg[10]="l ";
  int nloop;

  sscanf(lpwg,"%s", ltemp);
  nloop = atoi(ltemp);
  strcat(lprg,ltemp);

  return(nloop);
}

// z_effective calculation

void Zeffcalc (float pw, const float l, const float dX_nuc, float Gex, const float Gstr )
{

  float Zeffr;

  //conversions

  pw = pw*1000;
  Gex = Gex*0.01;
```

```
// formula

Zeffr = ((pw)/(l*dX_nuc*Gex*Gstr));

// messages

if ((Zeffr < 1) && (Zeffr > 0))
{

    Proc_err(INFO_OPT, "Your EEF is %f.\n\nThe pulse width of excitation pulse is
lower than the frequency dispersion induced by the excitation gradient.\n\nSurely,
you're losing sensibility!", Zeffr);

}

else if ((Zeffr >= 1) && (Zeffr <1.1))
{

    Proc_err(INFO_OPT, "Your EEF is %f.\n\nThe pulse width of excitation pulse is not
enough to ensure adiabatic condition for whole sample.\n\nProbably, you're loosing
sensibility!", Zeffr);

}

else if ((Zeffr >= 1.1) && (Zeffr <=1.25))
{

    Proc_err(INFO_OPT, "Your EEF is %f.\n\nThe pulse width of excitation pulse match
with the frequency dispersion induced by the excitation gradient.\n\nYour excitation
block is in a optimum condition!", Zeffr);

}

else if (Zeffr > 1.25)
```

```
{  
  
    Proc_err(INFO_OPT, "Your EEF is %f.\n\nThe pulse width of excitation pulse is so  
much higher than the required.\n\nIt should be better decrease the pulse width!", Zeffr);  
  
}  
  
else if (Zeffr <= 0)  
{  
  
    Proc_err(INFO_OPT, "Your EEF could not be calculated.\n\nThere's something  
wrong with the acquisition parameters.\n\nPlease, check again all of them!");  
  
}  
  
return(0);  
}
```