

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

“ESTUDO E APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE RMN
HR-MAS E DOSY EM PLANTAS E EXTRATOS DE
PLANTAS DA ORDEM RUTALES”

Lucinéia Vizzotto*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

*** bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2004**

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

V864ea

Vizzotto, Lucinéia.

Estudo e aplicações das técnicas de RMN HR-MAS e DOSY em plantas e extratos de plantas da ordem Rutales / Lucinéia Vizzotto . -- São Carlos : UFSCar, 2005.
107 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais (química orgânica). 3. Ressonância magnética nuclear. 4. Difusão. 5. DOSY. 6. HR-MAS. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

*À minha família querida,
Ricardo e José Manoel.*

Agradecimentos

A Deus, fonte de energia infinita, que me fortalece a cada início de um novo dia.

Ao Professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pela oportunidade, orientação e conhecimentos transmitidos.

A minha família “ressonântica”: Alexandre, Andersson, Ângela, Cristina, Elisangela, Gláucia, Leila, Luciana, Mário, Neuri, Paulo e Walmir; pelo companheirismo, amizade, ensinamentos, pelos suportes... Enfim, por tornar este período digno de saudades...

Ao colega Alviclér, pelo suporte inicial com a técnica DOSY.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais: André Luiz, Adriana, Cleverson, Djalma, Patrícia, Arthur e Margareth; pelas amostras cedidas.

Aos professores do Departamento de Química, pelos ensinamentos transmitidos.

A Dra. Márcia M. M. Ferreira (Instituto de Química - UNICAMP), pelo apoio nas análises de quimiometria.

Ao Dr. Rainer Kerssebaum (Bruker Biospin), pelo suporte na implementação da técnica DOSY.

Ao Dr. Robert Thomas Willianson (Roche), pelo suporte na implementação dos pulsos WURST.

Ao Dr. Sérgio Carvalho (Centro de Citricultura de Cordeirópolis), pela concessão das folhas de *Citrus*.

Ao meu esposo, José Manoel, e a meu filho, Ricardo, pelo companheirismo em todos os momentos.

A meus pais, Nilto e Ilda, que me apóiam incondicionalmente.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

Parte I

Implementação, Otimização e Aplicação da Técnica DOSY em Misturas de Produtos Naturais

1. Considerações Gerais.....	3
1.1. Princípios da Técnica.....	4
1.1.1. Difusão e Coeficiente de Difusão.....	4
1.1.2. Pulsos de Gradiente de Campo em Experimentos de DOSY...	5
1.2. Seqüências de Pulso.....	6
1.2.1. Seqüência PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo).....	6
1.2.2. Seqüência PFGSTE (Pulsed Field Gradient Stimulated Echo)	7
1.2.3. Seqüências Multidimensionais.....	8
1.3. Principais Artefatos em Experimentos de Gradiente de Campo Pulsado.....	8
1.3.1. Artefatos Gerados Pelas Correntes de Vórtice e Pela Perturbação de B_0	9
1.3.1.1. Pulsos de Gradientes não Retangulares.....	10
1.3.1.2. Seqüências de Pulsos Especiais.....	10
1.3.1.2.1. Seqüência PFGLED (Pulsed Field Gradient Longitudinal Eddy Delay).....	10
1.3.1.2.2. Seqüência BPPSTE (Bipolar Pulse Pair Stimulated Echo).....	11
1.3.1.2.3. Seqüência BPPLIED (Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Delay).....	12
1.3.1.2.4. Seqüências GCSTE (Gradient Compensated Stimulated Echo) e GCSTESL (Gradient Compensated Stimulated Echo Spin Lock).....	12
1.3.2. Artefatos Gerados por Gradientes de Temperatura e Correntes de Convecção.....	13
1.3.3. Artefatos Gerados por Volume Incorreto da Amostra	18
1.3.4. Artefatos Gerados por Troca Química.....	18

1.3.5. Artefatos Gerados Desajustes entre Pulsos de Gradiente Seqüenciais.....	19
1.3.6. Artefatos Gerados por Ruídos de Fundo Macroscópicos e Microscópicos.....	19
1.3.7. Artefatos gerados por amortecimento da radiação.....	20
1.3.8. Artefatos gerados pela relaxação cruzada.....	21
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	23
4. Resultados e Discussão.....	25
4.1. Implementação da Técnica.....	25
4.1.1. Produção de uma Mistura Padrão.....	25
4.1.2. Ajuste dos Principais Parâmetros Experimentais.....	26
4.2. Otimização dos Métodos de Aquisição e Processamento.....	27
4.2.1. Aquisição dos Experimentos de DOSY.....	27
4.2.2. Processamento dos Espectros.....	29
4.2.2.1. Número de Pontos Processados em F_2 (SIF2).....	30
4.2.2.2. A Multiplicação Exponencial Aplicada no Eixo F_2	30
4.2.2.3. Número de Pontos Processados em F_1 (SIF1).....	32
4.2.3. Emprego do Experimento de DOSY Otimizado na Amostra Padrão.....	34
4.2.4. Emprego do Experimento de DOSY Otimizado em um extrato Pré-purificado de folhas de <i>E. febrifuga</i>	34
4.3. Implementação dos Experimentos de DOSY-COSY.....	35
4.3.1. Experimento Empregando a Amostra Padrão.....	34
4.3.2. Experimento Empregando um extrato pré-purificado de folhas de <i>E. Febrifuga</i>	34
4.4. Implementação dos Experimentos de DOSY-HSQC.....	37
4.4.1. Experimento Empregando a Amostra Padrão.....	37
4.5. Estudos na Prevenção de Artefatos em Experimentos de DOSY.....	38
4.5.1. Eficiência das Seqüências de Pulso Disponíveis na Minimização de Artefatos.....	38
4.5.2. Eficiência do Diâmetro da Sonda em Relação à Prevenção de Correntes de Convecção.....	39
4.5.2.1 Experimentos realizados à temperatura de 303 K.....	40

4.5.2.2. Experimentos realizados às temperaturas de 288 e 278 K	40
4.5.3. Efeito da Ausência do Controle da Temperatura na Produção de Artefatos.....	43
4.5.4. Efeito do Giro da Amostra.....	44
4.5.4.1. Efeito do Giro da Amostra na Presença de Correntes de Convecção.....	44
4.5.4.2. Efeito do Giro da Amostra na Ausência de Correntes de Convecção.....	45
4.5.5. Artefatos Gerados pelo Sistema de Desacoplamento em Experimentos de DOSY-HSQC.....	46
4.5.5.1. Análise de um Experimento de DOSY-HSQC Obtido com a Seqüência de desacoplamento GARP.....	46
4.5.5.2. Obtenção de um Experimento de DOSY-HSQC Acoplado.	47
4.5.5.3. Pulsos de Desacoplamento Adiabáticos – WURST.....	48
4.6. Aplicação de Experimentos de DOSY em Misturas de Produtos Naturais.....	50
4.6.1. Mistura dos Esteróides Sistosterol (4) e Estigmasterol (5).....	51
4.6.2. Mistura dos Flavonóides Luteolina (6), 3'-O-metil luteolina (7) e 3-O-metoxi-3'-O-metil luteolina (8).....	51
4.6.3. Mistura dos Flavonóides taxifolin (9) e um derivado C3-O-glicosilado (10).....	52
4.6.4. Mistura da Cumarina Linear Xantiletina (1), da Cumarina Angular 5-Metoxiseselina (11) o do Éster Propanoato de Metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (12).....	53
4.6.5. Mistura dos Alcalóides bis-5-hydroxinoracronicina (13) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (14).....	55
5. Conclusões.....	59

Parte II
Implementação, Otimização e Aplicação da Técnica
HR-MAS em Folhas de *Citrus*

6. Considerações Gerais	63
6.1. Princípios da técnica HR-MAS.....	64
6.1.1. Acoplamento Dipolar.....	64
6.1.2. Deslocamento Químico Anisotrópico.....	65
6.1.3. Tempo de Relaxação dos <i>Spins</i> Nucleares.....	65
6.1.3. O Giro no Ângulo Mágico.....	66
6.1.4. Condições Experimentais para a Realização de experimentos de HR-MAS.....	67
6.2. Aplicação da Técnica HR-MAS na Análise de Materiais Vegetais.....	67
6.2.1. Emprego da Seqüência CPMG.....	68
6.3. Análise Quimiométrica de Dados de HR-MAS.....	69
6.3.1. Análise Exploratória de Dados.....	69
6.3.1.1. Análise de Agrupamentos Hierárquicos – HCA.....	71
6.3.1.2. Análise de Componentes Principais – PCA.....	71
6.3.1.2.1. Gráfico de Escores e de Pesos.....	72
6.3.2. Classificação de Amostras ou Reconhecimento de Padrões...	73
7. Objetivos.....	75
8. Materiais e Métodos.....	75
8.1. Equipamentos e acessórios.....	75
8.2. Amostras.....	76
9. Resultados e Discussão.....	79
9.1. Implementação da Técnica.....	79
9.2. Obtenção dos Primeiros Experimentos de ¹ H HR-MAS.....	79
9.2.1. Emprego da Seqüência CPMG nas Folhas de <i>Citrus</i>	79
9.2.2. Estudo da Classificação de uma Variedade de <i>Citrus sinensis</i> Empregando Espectros de HR-MAS – Experimentos Iniciais.....	80
9.2.3. Estudo da aplicação de espectros de ¹ H HR-MAS na correlação entre substâncias presentes em folhas de <i>Citrus</i> <i>sinensis</i> , <i>Citrus limonea</i> e <i>Citrus sinensis</i> pé franco -	

Experimentos Iniciais.....	81
9.3. Otimização dos Experimentos de HR-MAS.....	82
9.3.1. Otimização do Sistema Pneumático.....	82
9.3.2. Otimização do Método de Preparo de Amostras Empregando-se Folhas de Seis Variedades de <i>Citrus sinensis</i>	82
9.4. Tratamento Quimiométrico dos dados de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS de Seis Variedades de <i>Citrus sinensis</i>	86
9.4.1. Análise Exploratória dos Dados.....	87
9.4.2. Construção de um Modelo de Classificação.....	88
9.5. Obtenção de espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS em folhas de <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limonea</i> e <i>Citrus sinensis</i> pé franco.....	89
9.5.1. Obtenção de espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS otimizados.....	89
9.6. Análise Exploratória de Espectros de ¹ H CPMG HR-MAS de folhas de <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limonea</i> e <i>Citrus sinensis</i> pé franco.....	90
9.7. Estudo de Substâncias de Defesa em Folhas de <i>Citrus spp</i>	93
10. Conclusões.....	97
12. Referências Bibliográficas.....	99
Apêndice A - Espectros de RMN de DOSY	
Apêndice B - Espectros de RMN de HR-MAS	
Apêndice C – Gráficos de Quimiometria	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS*

COSY	<i>CORrelated SpectroscopY</i>
CPMG	<i>Carr-Purcell-Meibbom-Gill sequence</i>
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo-dubleto
DOSY	<i>Diffusion Ordered SpectroscopY</i>
DSTE	<i>Double STimulated Echo</i>
EM	<i>Exponencial Multiplication</i> ; função de multiplicação exponencial
FID	<i>Free Induction Decay</i>
GARP	<i>Globally Optimized Alternating Phase Rectangular Pulse</i>
gb	Parâmetro empregado no ajuste da função Lorentziana-Gaussiana
GM	<i>Gaussian Multiplication</i> ; função de apodização Lorentziana-Gaussiana
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
lb	<i>Line Broadening</i> ; parâmetro empregado no ajuste das funções exponencial e Lorentziana-Gaussiana
LED	<i>Longitudinal Eddy Delay</i>
NS	<i>Number of Scans</i> ; número de FIDs acumulados
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PFG	<i>Pulsed Field Gradient</i>
QSINE	<i>SQuared SINE bell weighting function</i>
rf	Radiofrequência
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

s	singleto
SE	<i>Spin Echo</i>
SI	<i>Size</i> ; número de pontos utilizados no processamento do espectro
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
SINE	<i>Sine-bell weighting function</i>
<i>sl</i>	singleto largo
SSB	<i>Shifted Sine-Bell weighting factor</i>
STE	<i>STimulated Echo</i>
<i>t</i>	triplete
Te	tempo para a dissipação das correntes de vórtice
TMS	tetrametilsilano
TSPA-d ₄	ácido 2,2,3,3-d ₄ -3-trimetilsililpropiónico
WATERGATE	<i>Water Suppression by Gradient-tailored Excitation</i>
WURST	<i>Wideband, Uniform Rate and Smooth Truncation</i>

*Optou-se por manter as expressões em inglês para se evitar equívocos na tradução

LISTA DE SÍMBOLOS

B_0	campo magnético estático de um espectrômetro
D	coeficiente de difusão
F_1, F_2	dimensões de freqüência de um espectro bidimensional
g	magnitude do pulso de gradiente de campo magnético
t_1, t_2	dimensões de tempo para experimentos bidimensionais
T_d	tempo de espera entre os ciclos de pulso, tempo da reciclagem
T_1	tempo de relaxação longitudinal ou spin-rede
T_2	tempo de relaxação transversal ou spin-spin
T_{ac}	tempo de aquisição do FID
δ	deslocamento químico em ppm
δ	duração do pulso de gradiente de campo magnético
Δ	tempo de difusão
τ_p	duração do pulso de radiofreqüência
τ	tempo entre pulsos de radiofreqüência

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Seqüência PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo).....	6
FIGURA 1.2	Seqüência PFGSTE (Pulsed Field Gradient Stimulated Echo).....	7
FIGURA 1.3	Seqüência PFGLED (Pulsed Field Gradient Longitudinal Eddy Delay).....	11
FIGURA 1.4	Seqüência BPPSTE (Bipolar Pulse Pair Stimulated Echo).....	11
FIGURA 1.5	Seqüência BPPLD (Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Delay).....	12
FIGURA 1.6	Seqüência GCSTE (Gradient Compensated Stimulated Echo).....	12
FIGURA 1.7	Seqüência GCSTESL (Gradient Compensated Stimulated Echo Spin Lock).....	13
FIGURA 1.8	Seqüência de eco estimulado duplo (DSTE) com pulsos de gradiente bipolares e LED.....	17
FIGURA 1.9	Seqüência de pulsos DMSE (Double Multiple Spin-Echo) com CPMG e pulsos de gradientes bipolares.....	17
FIGURA 1.10	Seqüência de pulso PFGSE modificada para minimizar problemas com amortecimento da radiação.....	21
FIGURA 4.1	Estruturas dos compostos xantiletina (1) e limonina (2).....	25
FIGURA 4.2	Espectros de DOSY da mistura padrão processados com 32 K (a) e 64 K (b) pontos no eixo F_2	30
FIGURA 4.3	Espectros de DOSY da mistura padrão processados com multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha de: a) 1 Hz; b) 2 Hz; c) 3 Hz e d) 4 Hz.....	31
FIGURA 4.4	Espectros de DOSY da mistura padrão processados com multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha de: a) $\Delta\nu = 1$ Hz; b) $\Delta\nu = 2$ Hz; c) $\Delta\nu = 3$ Hz e d) $\Delta\nu = 4$ Hz, região de δ 6,0 a 6,4 ppm	32
FIGURA 4.5	Espectros de DOSY da mistura padrão processados com: a) 16, b) 32, c) 64 e d)128 pontos em S/F_1	33
FIGURA 4.6	Expansões da região de δ 6,0 a 6,3 ppm de espectros de DOSY da mistura padrão processados com: a) 16, b) 32, c) 64 e d)128 pontos em S/F_1	33
FIGURA 4.7	Estrutura da 7-geraniloxicumarina (3).....	36
FIGURA 4.8	Curva de decaimento de sinais da mistura padrão obtidos a	

	temperatura de 303 K; a) utilizando-se uma sonda de 5 mm e b) utilizando-se sonda de 2,5 mm.....	40
FIGURA 4.9	Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 288 K, utilizando-se sonda de 5 mm.....	41
FIGURA 4.10	Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 278 K, utilizando-se sonda de 5 mm.....	41
FIGURA 4.11	Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 288 K, utilizando-se uma sonda de 2,5 mm.....	42
FIGURA 4.12	Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 278 K, utilizando-se uma sonda de 2,5 mm.....	42
FIGURA 4.13	Decaimento dos sinais da mistura padrão, a) utilizando-se ar comprimido como fluxo de gás e b) sem a utilização de fluxo de gás	44
FIGURA 4.14	Decaimento dos sinais da mistura padrão obtidos a temperatura de 303 K, a) utilizando-se o giro da amostra e b) com a amostra parada.....	45
FIGURA 4.15	Decaimento dos sinais da mistura padrão obtidos a temperatura de 298 K; a) sem o giro da amostra e b) com o giro da amostra....	46
FIGURA 4.16	Decaimento dos sinais de hidrogênio retirado de um experimento DOSY-HSQC realizado com o sistema de desacoplamento GARP.....	47
FIGURA 4.17	Decaimento dos sinais de hidrogênio retirados de um de experimento DOSY-HSQC acoplado.....	48
FIGURA 4.18	Curva de decaimento dos sinais de hidrogênio (^1H) retirada de um experimento DOSY-HSQC, onde se utilizou pulsos adiabáticos do tipo WURST.....	49
FIGURA 4.19	Estrutura dos esteróides sistosterol (4) e estigmasterol (5).....	51
FIGURA 4.20	Estrutura dos flavonóides 4'-O-glicol luteolina (6), 3'-O-metil luteolina (7) e 3-O-metoxi-3'-O-metil luteolina (8).....	52
FIGURA 4.21	Estruturas do flavonol Taxifolin (9) e de um derivado C3-O-glicosilado (10).....	53

FIGURA 4.22	Estruturas das cumarinas xantiletina (1), 5-metoxiseselina (11) e do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (12).....	53
FIGURA 4.23	Estruturas dos alcalóides bis-5-hydroxinoracronicina (13) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (14).....	55
FIGURA 6.1	Seqüência de pulsos CPMG.....	66
FIGURA 6.2	Visão de um apagador em perspectivas baseadas em suas componentes principais: a) visão superior, PC1 x PC2; b) visão lateral, PC1 x PC3 e c) visão frontal, PC2 x PC3.....	70
FIGURA 8.1	Rotor e acessórios utilizados para o preparo de amostras submetidas à HR-MAS.....	76
FIGURA 8.2	Esquema de preparo de amostras para a técnica HR-MAS.....	77
FIGURA 9.3	Espectros de HR-MAS de uma folha de <i>Citrus</i> obtido com e sem filtro de T_2	79

LISTA DE ESPECTROS DO APENDICE A – TÉCNICA DOSY

ESPECTRO 1	Espectro de RMN de ^1H (SFO1 = 400,13 MHz) do composto 1 (xantiletina).....	A-1
ESPECTRO 2	Espectro de RMN de ^1H (SFO1 = 400,13 MHz) do composto 2 (limonina).....	A-2
ESPECTRO 3	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido à temperatura de 303 K.....	A-3
ESPECTRO 4	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão com a melhor resolução obtida na implementação da técnica.....	A-4
ESPECTRO 5	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido após a etapa de otimização dos experimentos....	A-5
ESPECTRO 6	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) de um extrato hexânico pré-purificado de folhas de <i>Esenbeckia febrífuga</i>	A-6
ESPECTRO 7	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão com 10 experimentos no eixo F_1	A-7
ESPECTRO 8	Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) da	

	mistura padrão.....	A-8
ESPECTRO 9	Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) do composto 1 (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-COSY (corte 14), com projeção interna.....	A-9
ESPECTRO 10	Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) do composto 2 (limonina) extraído do experimento DOSY-COSY (corte 9). a) região total, b) expansão da região de 1,7 a 3,3 ppm, com projeção interna.....	A-10
ESPECTRO 11	Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) de um de um extrato hexânico pré-purificado de folhas de <i>Esenbeckia febrifuga</i>	A-11
ESPECTRO 12	Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) do composto 3 (aurapteno) extraído do experimento DOSY-COSY (corte 18), com projeção interna.....	A-12
ESPECTRO 13	Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) de um composto desconhecido extraído do experimento DOSY-COSY (corte 19). a) expansão de δ 0,0 a 5,5 ppm; b) expansão de δ 0,6 a 3,5 ppm.....	A-13
ESPECTRO 14	Espectro de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) da mistura padrão.....	A-14
ESPECTRO 15	Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) do composto 1 (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 14).....	A-15
ESPECTRO 16	Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) do composto 2 (limonina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 23).....	A-16
ESPECTRO 17	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso PFGSTE.....	A-17
ESPECTRO 18	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso BPPSTE.....	A-18
ESPECTRO 19	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso PFGLED.....	A-19
ESPECTRO 20	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso BPPLIED.....	A-20

ESPECTRO 21	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão, realizado a temperatura de 303 K, utilizando-se uma sonda com 5 mm de diâmetro interno.....	A-21
ESPECTRO 22	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão, realizado a temperatura de 303 K, utilizando-se uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno.....	A-22
ESPECTRO 23	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura ambiente e com fluxo de ar comprimido.....	A-23
ESPECTRO 24	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura ambiente e sem fluxo de ar comprimido.....	A-24
ESPECTRO 25	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 303K, com o giro da amostra...	A-25
ESPECTRO 26	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 303K, sem o giro da amostra...	A-26
ESPECTRO 27	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 298 K, com o giro da amostra..	A-27
ESPECTRO 28	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 298 K, sem o giro da amostra..	A-28
ESPECTRO 29	Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) do composto 1 (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 25).....	A-29
ESPECTRO 30	Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1=400,13 e ^{13}C SFO2=100,52 MHz) do composto 1 (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 25).....	A-30
ESPECTRO 31	Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1=400,13 e ^{13}C SFO2=100,52 MHz) do composto 2 (limonina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 32). a) região de δ 1,0 a 8,0 ppm, δ b) de δ 2,2 a 3,0 ppm.....	A-31
ESPECTRO 32	ESPECTRO 32 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos esteróides sistosterol (4) e estigmasterol (5).....	A-32
ESPECTRO 33	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura	

	dos flavonóides luteolina (6), 3'-o-metil luteolina (7) e 3-O - metoxi-3'-o-metil luteolina (8), em DMSO-d ₆	A-33
ESPECTRO 34	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) mistura dos flavonóides luteolina (6), 3'-o-metil luteolina (7) e 3-o-metoxi-3'-o-metil luteolina (8), em MeOH-d ₄	A-34
ESPECTRO 35	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos flavonóides taxifolin (9) e um derivado C3-O-glicosilado (10).....	A-35
ESPECTRO 36	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura da cumarina linear xantiletina (1), da cumarina angular 5-metoxiseselina (11) o do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (12).....	A-36
ESPECTRO 37	Expansões do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura da cumarina linear xantiletina (1), da cumarina angular 5-metoxiseselina (11) o do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (12) a) região de δ 8,0 a 5,3 a ppm e b) região de δ 4,0 a 1,4 ppm.....	A-37
ESPECTRO 38	Expansões da região de δ 1,4 a 4,0 ppm do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura da cumarina linear xantiletina (1), da cumarina angular 5-metoxiseselina (11) o do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (12); a) corte inferior e b) corte superior.....	A-38
ESPECTRO 39	Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos alcalóides bis-5-hydroxinoracronicina (13) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (14).....	A-39
ESPECTRO 40	Expansões do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos compostos bis-5-hydroxinoracronicina (13) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (14), a) região de δ 3,50 a 3,76 ppm e b) região de δ 0,2 a 2,0 ppm.....	A-40
ESPECTRO 41	Expansão do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos compostos bis-5-hydroxinoracronicina (13) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (14), região de δ 6,2 a 8,0 ppm.....	A-41

LISTA DE ESPECTROS DO APÊNDICE B – TÉCNICA HR-MAS

ESPECTROS 1	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> de variedade desconhecida.....	B-1
ESPECTROS 2	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Hamlim.	B-2
ESPECTRO 3	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Natal.....	B-2
ESPECTROS 4	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Pêra.....	B-3
ESPECTROS 5	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Valência Folha Lisa.....	B-3
ESPECTROS 6	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Valência Folha Murcha.....	B-4
ESPECTROS 7	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Westin...	B-4
ESPECTROS 8	Expansão da região de δ 2,7 a 0,4 ppm de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus sinensis</i> das variedades: a) Pêra, Natal, Hamlim e desconhecida e b) Westin, Valência Folha Murcha, Valência Folha Lisa e desconhecida.....	B-5
ESPECTROS 9	Expansão da região de δ 6,0 a 3,0 ppm de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de <i>Citrus sinensis</i> das variedades a) Pêra, Natal, Hamlim e desconhecida e b) Westin, Valência Folha Murcha, Valência Folha Lisa e desconhecida.....	B-6
ESPECTROS 10	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i>	B-7
ESPECTROS 11	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus limonea</i>	B-8

ESPECTROS 12	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de <i>Citrus sinensis</i> pé franco.....	B-8
ESPECTROS 13	Expansões das região de a) δ 6,0 a 3,0 ppm e b) δ 2,7 a 0,4 ppm de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus limonea</i> , <i>Citrus sinensis</i> e <i>Citrus sinensis</i> pé franco.....	B-9
ESPECTROS 14	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus sinensis</i> maceradas em N_2	B-10
ESPECTROS 15	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus sinensis</i> moídas em moinho criogênico.....	B-11
ESPECTROS 16	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Westin..	B-11
ESPECTROS 17	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Natal....	B-12
ESPECTROS 18	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Valência Murcha.....	B-12
ESPECTROS 19	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Hamlim.	B-13
ESPECTROS 20	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> de variedade desconhecida.....	B-13
ESPECTROS 21	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Pêra....	B-14
ESPECTROS 22	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> da variedade Valência Lisa.....	B-14
ESPECTROS 23	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i>	B-15
ESPECTROS 24	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de <i>Citrus limonea</i>	B-16
ESPECTROS 25	Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13	

	MHz) de três folhas de <i>Citrus sinensis</i> pé franco.....	B-16
ESPECTROS 26	Espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de seis folhas de <i>Citrus sinensis</i>	B-17
ESPECTROS 27	Espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de seis folhas de <i>Citrus limonea</i>	B-17
ESPECTROS 28	Espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de seis folhas de <i>Citrus sinensis</i> pé franco.....	B-18
ESPECTRO 29	Espectro de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus spp</i> (coletadas em 17/07/02) jovem sob o ataque de pulgões; jovem após o ataque de pulgões; jovem e velha sadias.....	B-19
ESPECTRO 30	Expansão de espectros de RMN de ¹ H HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus spp</i> (coletadas em 17/07/02) jovem sob o ataque de pulgões; jovem após o ataque de pulgões e folhas jovem e velha sadias; a) região de δ 7,4 a 6,8 ppm e b) região de δ 4,5 a 3,0 ppm.....	B-20
ESPECTRO 31	Espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus spp</i> jovens sob o ataque de pulgões e coletadas dias 17/07/02 e 27/08/03.....	B-21
ESPECTRO 32	Expansão dos espectros de RMN de ¹ H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de <i>Citrus spp</i> jovens sob o ataque de pulgões e coletadas dias 17/07/02 e 27/08/03; a) região de δ 7,40 a 6,80 ppm e b) região de δ 4,7 a 2,7 ppm	B-22
ESPECTRO 33	Espectro de RMN de COSY HR-MAS (¹ H, SFO1 = 400,13 MHz) de folha de <i>Citrus spp</i> jovem sob ataque de pulgões....	B-23
ESPECTRO 34	Expansões de espectro de RMN de COSY HR-MAS (¹ H, SFO1 = 400,13 MHz) de folha de <i>Citrus spp</i> jovem sob ataque de pulgões: a) região de δ 8,2 a 6,4 ppm; b) região de δ 5,5 a 1,8 ppm.....	B-24
ESPECTRO 35	Espectro de RMN de HSQC HR-MAS (¹ H SFO1 = 400,13 e ¹³ C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de <i>Citrus spp</i> jovem sob ataque de pulgões.....	B-25
ESPECTRO 36	Expansões de espectro de RMN de HSQC HR-MAS (¹ H SFO1 = 400,13 e ¹³ C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de	

	<i>Citrus spp</i> jovem sob ataque de pulgões: a) região de δ 7,35 a 6,85 ppm; b) região de δ 3,40 a 2,68 ppm.....	B-26
ESPECTRO 37	Espectro de RMN de HMBC HR-MAS (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de <i>Citrus spp</i> jovem sob ataque de pulgões.....	B-27
ESPECTRO 38	Expansões do espectro de RMN de HSQC HR-MAS (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de <i>Citrus spp</i> jovem sob ataque de pulgões: a) região de δ 7,50 a 6,75 ppm; b) região de δ 3,40 a 2,65 ppm.....	B-28

LISTA DE GRÁFICOS DO APÊNDICE C – QUIMIOMETRIA

GRÁFICO 1	Gráfico de escores de PC1 x PC2 das seis variedades de <i>Citrus</i> , região de δ 3,0 a 5,6 ppm.....	C-1
GRÁFICO 2	Gráfico de variáveis versus matriz X reconstruída após a normalização dos dados.....	C-1
GRÁFICO 3	Gráfico de escores de PC1 (36,4%) versus PC4 (6,3%, variância cumulativa de 75,2%) obtido sem a seleção de variáveis.....	C-2
GRÁFICO 4	Gráfico do índice de variáveis versus poder de modelagem com variáveis selecionadas de 0 a 0,5.....	C-2
GRÁFICO 5	Gráfico de pesos de PC2 versus PC3, com seleção das variáveis com pesos próximos a zero.....	C-3
GRÁFICO 6	Gráfico de escores de PC1 (47,0%) versus PC3 (12,8%, variância cumulativa de 72,5%) obtido após seleção de variáveis.....	C-3
GRÁFICO 7	Gráfico de escores de PC1 (48,5%) versus PC3 (10,4%, variância cumulativa de 74,7%) obtido sem <i>outlier</i>	C-4
GRÁFICO 8	Gráfico de HCA.....	C-4
GRÁFICO 9	Gráfico do índice de variáveis versus resposta (expansão da região da 1 ^o a 165 ^o variável.....	C-5
GRÁFICO 10	Gráfico do índice de variáveis versus resposta - expansão da região da 680 ^o a 860 ^o variável.....	C-5

RESUMO

ESTUDO E APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE RMN HR-MAS E DOSY EM PLANTAS E EXTRATOS DE PLANTAS DA ORDEM RUTALES. O presente trabalho relata a implementação e a aplicação de duas técnicas relativamente recentes em RMN - DOSY e HR-MAS – como ferramentas na análise de produtos naturais em mistura e em folhas de *Citrus*, respectivamente. O trabalho iniciou-se com a técnica DOSY, em que uma mistura conhecida de dois produtos naturais foi empregada para implementar a técnica e otimizar os experimentos de DOSY, DOSY-COSY e DOSY-HSQC. Posteriormente, foram realizados experimentos de DOSY em um conjunto de misturas de produtos naturais, no qual a aplicabilidade da técnica foi avaliada. A segunda parte do trabalho foi realizada com a técnica HR-MAS, que se iniciou com sua implementação, teve continuidade com a otimização das condições experimentais e foi finalizada com a avaliação de sua potencialidade como uma ferramenta na análise de folhas intactas de *Citrus*. Para isto a técnica foi avaliada quanto à distinção entre seis variedades de *Citrus sinensis*, à indicação de substâncias de defesa presentes em *Citrus sinensis* enxertado em *Citrus limonea* e à detecção e identificação de substâncias de defesa presentes em folhas de *Citrus spp* sob o ataque de pragas.

ABSTRACT

STUDY AND APPLICATION OF HR-MAS AND DOSY NMR TECHNIQUES IN PLANTS AND PLANTS EXTRACT FROM RUTALES ORDER. This work describes the implementation of two recent techniques in NMR - DOSY e HR-MAS – as a tool for the analysis of natural products mixture and in leaves of *Citrus*, respectively. The work begun with the technique DOSY, in which a known mixture of two natural products was employed to implement the technique and optimise the experiments of DOSY, DOSY-COSY and DOSY-HSQC. After that, the DOSY experiments was employed in a group of natural products mixtures, in which the technique applicability was assessed. The second part of the work was carried out by the implementation of HR-MAS technique with the experimental conditions optimisation and the technique evaluation in the study of *Citrus* leaves. The evaluation of the technique was carried out by the distinction among six *Citrus sinensis* varieties, as the indicator for the defence substances present in leaves of *Citrus sinensis* grafted in *Citrus limonea* and the detection and identification of the defence substances in leaves of *Citrus spp* under the plague attack.

PARTE I

IMPLEMENTAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DOSY EM MISTURAS DE PRODUTOS NATURAIS

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A medida de coeficientes de difusão translacional (D) por RMN tem se tornado uma ferramenta útil e poderosa para a análise de misturas complexas, principalmente por não demandar uma separação química prévia. Dentre as técnicas utilizadas para medir a difusão por RMN, a espectroscopia ordenada por difusão ou DOSY (Diffusion Ordenated Spectroscopy), se destaca por fornecer as informações de uma maneira facilmente analisada, possibilitando uma visão global dos tamanhos de partículas em uma amostra e a detecção de impurezas.

A técnica DOSY foi originalmente criada devido à necessidade de um método analítico não invasivo, capaz de identificar componentes moleculares em misturas e caracterizar simultaneamente os tamanhos de agregados e outras estruturas presentes¹. Desde o seu desenvolvimento ela vem sendo sujeita a diversos estudos (como o desenvolvimento de seqüências de pulsos mais sofisticadas^{2,3,4,5,6,7,8,9}, de métodos para eliminar artefatos experimentais^{10,11,12,13} e de melhorias no sistema de tratamento de dados^{14,15,16,17,18,19}), que viabilizaram os avanços em seu desempenho.

Devido aos crescentes avanços, a técnica DOSY vem sendo aplicada na análise de uma ampla extensão de misturas complexas, tais como em extratos de tecidos²⁰, polímeros^{21,22}, combustíveis²³, substâncias húmicas^{6,24,25}, alimentos^{26,27} e complexos metálicos²⁸. Os experimentos de DOSY também são amplamente utilizados em outras finalidades, como no estudo da formação de complexos^{29,30,31}, da determinação da distribuição do tamanho de partículas^{32,33,34} e de massa molecular de compostos poliméricos^{35,36,37}, no estudo do equilíbrio^{32,33} e da troca química^{38,39,40}, na análise de interações^{41,42,43,44,45}, além do próprio fenômeno da difusão⁴⁶.

Devido suas características, a técnica DOSY representa uma ferramenta em potencial para o estudo de produtos naturais em mistura, como os compostos contidos em frações pré-purificadas, pois dispensam o isolamento físico, o que demanda tempo e trabalho. Os experimentos de DOSY são também uma alternativa para a análise de compostos instáveis aos métodos de purificação ou onde o isolamento é impraticável.

1.1. Princípios da Técnica

1.1.1. Difusão e Coeficiente de Difusão

A difusão é o processo pelo qual a matéria é transportada de uma parte do sistema para outra como o resultado de um movimento molecular aleatório⁴⁷.

A velocidade de migração de uma partícula é medida pelo seu fluxo, J , que é a quantidade com que esta partícula atravessa uma unidade de área por unidade de tempo⁴⁸. A difusão de matéria é o número de moléculas que atravessa uma superfície de controle por metro ao quadrado por segundo (no sistema internacional de unidades, SI)⁴⁸. O fluxo de matéria difundindo paralelamente a um eixo de um recipiente, ao eixo z , por exemplo, é proporcional ao gradiente da concentração nesta direção:

$$J (\text{matéria}) \propto \frac{dN}{dz} \quad \text{eq. 1}$$

onde N é o número de partículas na unidade de volume.

O valor positivo de J significa um fluxo positivo ao longo do eixo z . Como o fluxo de matéria tem o sentido da concentração maior para a menor, J é positivo se a relação dN/dz é negativa. Portanto, o coeficiente de proporcionalidade da equação 1 deve ser negativo:

$$J (\text{matéria}) = - D \frac{dN}{dz} \quad \text{eq. 2}$$

onde a constante D é o coeficiente de difusão, cuja unidade internacional é apresentada em $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Os valores típicos de coeficientes de difusão em líquidos, em temperaturas moderadas (de 25 a 30°C), vão desde $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (para polímeros com pesos moleculares elevados) até $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (para moléculas pequenas em soluções pouco viscosas)⁴⁹.

A equação de Stokes-Einstein fornece a dependência do coeficiente de difusão (D) de uma partícula esférica em relação ao seu raio hidrodinâmico (r_s), a temperatura (T) e a viscosidade (η) da solução⁵⁰ (onde k_B é a constante de Boltzmann).

$$D = k_B T / 6\pi\eta r_s \quad \text{eq. 3}$$

Se uma molécula em solução for considerada como uma partícula esférica, seu raio hidrodinâmico estará sujeito às contribuições de fatores como a solvatação, as interações e os estados de agregação das moléculas, e o valor de seu coeficiente de difusão fornecerá informações sobre as propriedades relacionadas ao seu volume molecular^{29,45,50,51}.

1.1.2. Pulsos de Gradiente de Campo em Experimentos de DOSY

Para se realizar experimentos com PFG é necessária uma sonda equipada com uma bobina geradora de gradiente e um amplificador de gradiente. O gradiente de campo é gerado pela aplicação de uma corrente na bobina específica, invertendo-se a corrente aplicada, inverte-se também a polaridade do gradiente. Os campos máximos de aplicação dos gradientes de campo são de aproximadamente 0,5 T/m (50 G/cm), embora a força de gradiente utilizada freqüentemente seja menor⁵².

Os experimentos de DOSY são formados por uma série de experimentos de DOSY unidimensionais que diferem entre si pela amplitude (g) dos pulsos de gradiente aplicados, que é aumentada gradativamente ao longo dos experimentos. O aumento do gradiente de campo corresponde a uma maior atenuação na intensidade dos sinais, que diminuem exponencialmente ao longo dos experimentos. Uma vez que esta relacionada com o seu coeficiente de difusão, a velocidade com que este o decaimento ocorre é igual para todos os sinais da molécula. Quanto maior a velocidade do decaimento dos sinais, maior o coeficiente de difusão da molécula.

A aplicação da transformada inversa de Laplace deste conjunto de dados origina o espectro de DOSY; um espectro pseudobidimensional, onde os sinais de RMN 1D são apresentados em uma dimensão e a distribuição ordenada do coeficiente de difusão (D) em outra.

O valor do coeficiente de difusão de cada substância pode ser obtido facilmente pela correlação com seus sinais de RMN, assim como todos os sinais de uma molécula podem ser identificados inequivocamente (mesmo estando em mistura) através da correlação com o valor de seu coeficiente de difusão.

1.2. Seqüências de Pulso

1.2.1. Seqüência PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo)

A abordagem mais simples para se realizar uma medida de difusão é a que emprega a seqüência de pulso de Stejskal e Tanner, conhecida como PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo). A seqüência PFGSE é baseada na introdução de dois pulsos de gradientes de campo idênticos, inseridos em cada período τ , na seqüência de eco de spin de Hahn (figura 1.1).

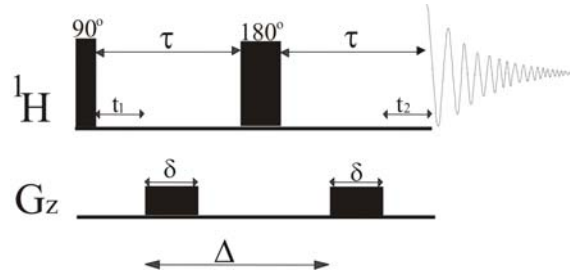


Figura 1.1 - Seqüência PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo)

Se os pulsos de gradiente não fossem aplicados, o pulso de rf de 180° iria refocar a evolução dos deslocamentos químicos e o sinal detectado seria atenuado somente pela relaxação transversal (T_2), ocorrida durante o período 2τ . Quando os pulsos de gradiente são aplicados, a refocagem completa do sinal, desconsiderando as perdas por T_2 , só ocorre se o campo magnético local experimentado por um spin for idêntico durante a aplicação do primeiro e do segundo pulso. Ou seja, a refocagem total somente será obtida se os spin permanecerem na mesma localização física durante o período de difusão (Δ)⁵² (figura 1.1).

Se a molécula se difundir durante o período de difusão, afastando-se da sua posição inicial, o campo magnético local que ela estará sujeita durante o segundo pulso de gradiente (de recuperação da fase) não será igual ao primeiro (de perda da fase), e somente uma refocagem parcial do sinal irá ocorrer. Ao final do experimento, o sinal detectado será atenuado pela distância que a molécula moveu-se durante o período Δ , que é ditado pelo seu coeficiente de difusão (D)⁵⁰.

A intensidade observada do sinal (I) para um experimento PFGSE é obtida pela equação:

$$I = I_0 \exp(-2\tau/T_2 - (\gamma g \delta)^2 D (\Delta - \delta/3)) \quad \text{eq. 4}$$

Onde I_0 é a intensidade do sinal quando a força do gradiente é zero (logo após o pulso de 90°), τ o intervalo entre pulsos de rf, T_2 o tempo de relaxação transversal,

γ a constante giromagnética do núcleo em estudo, D o coeficiente de difusão da molécula, Δ o intervalo para a difusão, δ e g são a duração e a amplitude do pulso de gradiente, respectivamente.

Como os valores de γ e T_2 são iguais em todos os experimentos e os valores de δ e Δ são conhecidos, o valor de D pode ser obtido através de um gráfico de $\ln(I/I_0)$ em função de $(\gamma g \delta)^2$, que fornece uma reta cuja inclinação é proporcional ao coeficiente de difusão de cada espécie⁵².

Como visto, realizando-se vários experimentos de PFGSE com δ e Δ constantes e variando-se a porcentagem da força do gradiente (g), é possível obter o valor do coeficiente de difusão de uma molécula⁵⁰. Entretanto, por fornecer a mesma informação de uma maneira mais direta, os experimentos de DOSY são usualmente empregados no estudo da difusão.

A seqüência PFGSE é limitada pelas perdas de magnetização que ocorrem devido à relaxação transversal (T_2), o que pode levar a degradações significativas da relação sinal/ruído em moléculas com T_2 curto.

1.2.2. Seqüência PFGSTE (Pulsed Field Gradient Stimulated Echo)

Na seqüência PFGSTE (figura 1.2), a magnetização é mantida longitudinalmente (alinhada ao eixo z) durante o período de difusão.

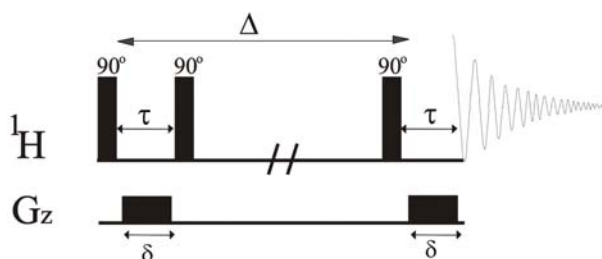


FIGURA 1.2 – Seqüência PFGSTE (Pulsed Field Gradient Stimulated Echo)

Na seqüência PFGSTE, um segundo pulso de rf de 90° transfere a magnetização para o eixo $-z$. Ao final do período de difusão (Δ) a magnetização é retornada ao plano transversal ($x-y$) por um terceiro pulso de 90° e a recuperação da coerência da magnetização é obtida pelo segundo pulso de gradiente.

A principal desvantagem da seqüência PFGSTE é que a metade do sinal em potencial é perdida após a aplicação do segundo pulso de 90° , somente a componente y (M_y) ou a componente x (M_x) da magnetização retorna para o eixo $\pm z$, o outro componente é destruído por um pulso de gradiente ou por um ciclo de fases apropriado¹².

Apesar disso, como na maioria das moléculas o tempo T_1 é maior ou igual ao tempo T_2 , os benefícios da seqüência PFGSTE se sobrepõem a sua desvantagem e ela é empregada na maioria das medidas de difusão⁵³.

1.2.3. Seqüências Multidimensionais

Em experimentos DOSY tridimensionais, ou pseudo 3D, a coordenada de difusão é adicionada aos experimentos de RMN 2D convencionais, permitindo atribuir em planos os sinais de correlação de cada substância difusora. Eles também fornecem as projeções unidimensionais da substância selecionada, obtendo-se assim um espectro de RMN ^1H da substância pura, apesar desta se encontrar fisicamente em uma mistura^{7,8,53}.

1.3. Principais Artefatos em Experimentos de Gradiente de Campo Pulsado

Segundo Antalek¹² existem cinco pré-requisitos para a obtenção de um bom conjunto de dados para um experimento de DOSY: a) o registro excelente das ressonâncias, ou seja, o emprego de um número de pontos apropriado na aquisição dos sinais de RMN; b) nenhuma distorção de fase ou alargamento do sinal devido à aplicação dos pulsos de gradiente; c) uma boa diferenciação entre as curvas de decaimento dos sinais entre compostos distintos; d) nenhum artefato da linha de base e e) um decaimento exponencial puro. Entretanto, o cumprimento destes pré-requisitos nem sempre é fácil, pois os experimentos de DOSY são sensíveis a vários artefatos.

Existem essencialmente três fatores que originam artefatos em experimentos de difusão: a falta de homogeneidade do gradiente de campo, as correntes de vórtice e as de convecção¹². Contudo, existem outros artefatos que podem prejudicar os experimentos de difusão, como os gerados pela troca química, por desajustes entre pulsos de gradiente seqüenciais, pelos ruídos de

fundo e pelo amortecimento da radiação. Embora menos comuns, eles também poderão afetar a medida do coeficiente de difusão ou a habilidade para diferenciar componentes dentro de uma mistura.

1.3.1. Artefatos Gerados Pelas Correntes de Vórtice e Pela Perturbação de B_0

As correntes de vórtice são originadas em qualquer meio condutor próximo a um local onde ocorra uma variação do campo magnético. Em um espectrômetro de ressonância, as correntes de vórtice (ou *eddy currents*) são geradas nos ambientes condutores que circundam a bobina do gradiente devido à aplicação de pulsos de gradiente. Dependendo da força do pulso de gradiente aplicado, são gerados distúrbios no campo magnético que podem causar severas deformações na linha base, degradando a resolução dos sinais e impedindo a aquisição de um espectro com uma resolução satisfatória^{2,12,52}.

A utilização de bobinas de gradiente ativamente blindadas é o meio mais efetivo para reduzir os efeitos das correntes de vórtice. A proteção consiste basicamente na inclusão de uma segunda bobina de gradiente ao redor da primeira, dirigida pela mesma corrente e sendo desenhada de tal forma que o campo gerado fora da região da amostra cancele aquele produzido pela bobina interna. O resultado final é o gradiente de campo dentro da amostra, mas não fora, portanto não estimulando correntes de vórtice nos arredores⁵².

Mesmo sendo consideravelmente reduzidos pelo emprego de bobinas blindadas, os efeitos residuais das correntes de vórtice ainda podem afetar os experimentos de difusão, principalmente quando é necessário utilizar pulsos de gradiente fortes⁵⁴. Isto torna aconselhável o emprego de seqüências de pulsos que incorporam abordagens para eliminar tais efeitos². As abordagens mais difundidas são a introdução de um intervalo de tempo para a dissipação dos efeitos das correntes de vórtice e a substituição dos pulsos de gradiente retangulares e monopolares por pulsos bipolares e com um intervalo maior de ascensão e queda.

1.3.1.1. Pulsos de Gradientes Não Retangulares

Como a severidade dos problemas gerados pelas correntes de vórtices é proporcional a intensidade da corrente elétrica aplicada com o tempo

$(dI/dt)^{54}$, uma maneira encontrada de reduzir seus efeitos foi diminuir o tempo de subida e descida dos pulsos de gradiente. Por isso, uma das abordagens mais empregadas para se minimizar os efeitos das correntes de vórtice é empregar pulsos de gradiente modulados, com formatos de ascensão e queda mais suaves, como os do tipo senoidal ou trapezoidal.

1.3.1.2. Seqüências de Pulsos Especiais

As seqüências de pulso usualmente empregadas em experimentos de DOSY são as derivadas da seqüência PFGSTE que contêm modificações para eliminar os artefatos provenientes das correntes de vórtice, tais como: a substituição dos pulsos retangulares por pulsos com ascensão e queda brandas (que diminuem os efeitos causados pela elevação e queda rápida dos pulsos de gradiente), a introdução de uma seqüência LED (que permite que as perturbações decaiam antes do início da aquisição) e a substituição dos pulsos de gradiente monopolares por pulsos bipolares (que permite empregar pulsos de gradiente com metade da potência). Estas abordagens podem ser empregadas isoladamente ou em conjunto em uma mesma seqüência².

1.3.1.2.1. Seqüência PFGLED (Pulsed Field Gradient Longitudinal Eddy Delay)

A seqüência de pulsos LED (Longitudinal Eddy-current Delay) introduz um tempo (T_e) na seqüência de PFGSTE no qual a magnetização é mantida longitudinalmente por meio de um pulso de rf de 90° . Este tempo é empregado para que as perturbações do campo B_0 , que surgem após a aplicação do segundo pulso de gradiente, decaiam integralmente até o início da aquisição⁵⁵. Após o período T_e , um segundo pulso de rf de 90° retorna a magnetização para o plano xy antes do início da aquisição.

A figura 1.3 apresenta a seqüência de pulsos de eco estimulado com a inserção do tempo para dissipação das correntes de vórtice, PFGLED.

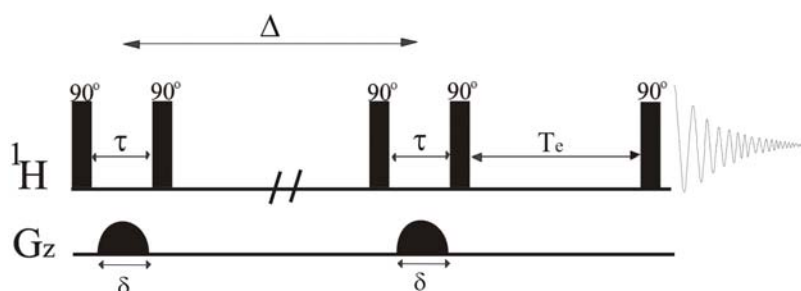


FIGURA 1.3 – Seqüência PFGLED (Pulsed Field Gradient Longitudinal Eddy Delay)

1.3.1.2.2. Seqüência BPPSTE (Bipolar Pulse Pair Stimulated Echo)

A seqüência LED não é eficaz para dissipar as perturbações que afetam o experimento no período da difusão, principalmente quando a potência dos pulsos de gradiente for alta. A perturbação neste período pode ser minimizada pela substituição do pulso de gradiente de duração δ por um conjunto de pulsos contendo dois pulsos de gradiente de duração $\delta/2$ com polaridades invertidas e intercalados com um pulso de rf de 180° (figura 1.4). Este “sanduíche de pulsos” equivale a um pulso de gradiente de duração δ com a polaridade do segundo pulso de gradiente do “sanduíche”, sendo que as correntes de vórtice geradas pelo primeiro pulso de gradiente são canceladas pelos efeitos do segundo pulso, cuja polaridade é inversa, que é aplicado após poucos milissegundos⁵⁶.

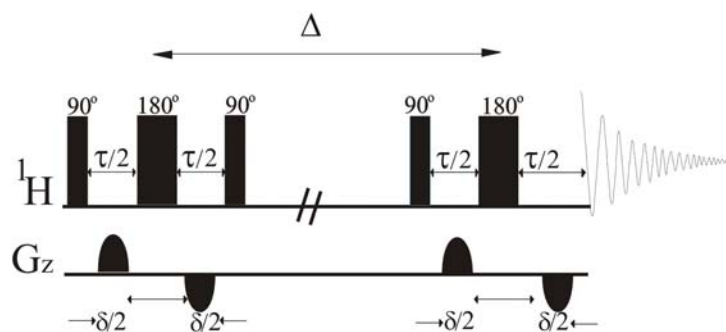


FIGURA 1.4 – Seqüência BPPSTE (Bipolar Pulse Pair Stimulated Echo)

1.3.1.2.3. Seqüência BPPLIED (Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Delay)

A seqüência BPPLIED é uma modificação da seqüência básica PFGSTE que reúne as vantagens do emprego de pares de pulsos bipolares e as da seqüência LED (figura 1.5), minimizando os efeitos das correntes de vórtice em toda a extensão do experimento.

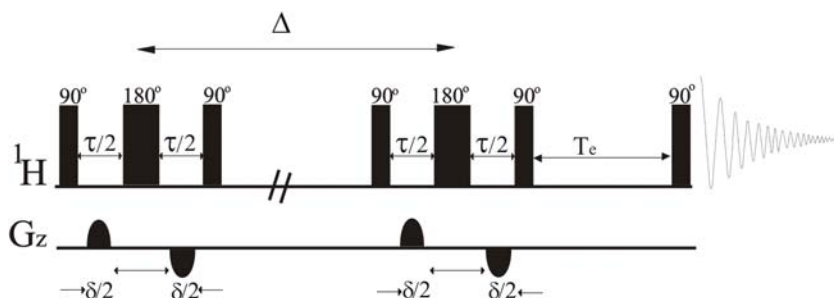


FIGURA 1.5 – Seqüência BPPLIED (Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Delay)

1.3.1.2.4. Seqüências GCSTE (Gradient Compensated Stimulated Echo) e GCSTESL (Gradient Compensated Stimulated Echo Spin Lock)

As seqüências de gradiente compensado de eco estimulado (GCSTE, figura 1.6) e de gradiente compensado de eco estimulado com trava de spin, (GCSTESL, figura 1.7) também empregam pulsos de gradientes anti-fásicos para minimizar os efeitos das correntes de vórtice, porém eles ficam posicionados no período de difusão (Δ), o que elimina a necessidade do pulso de rf de 180° para a refocagem².

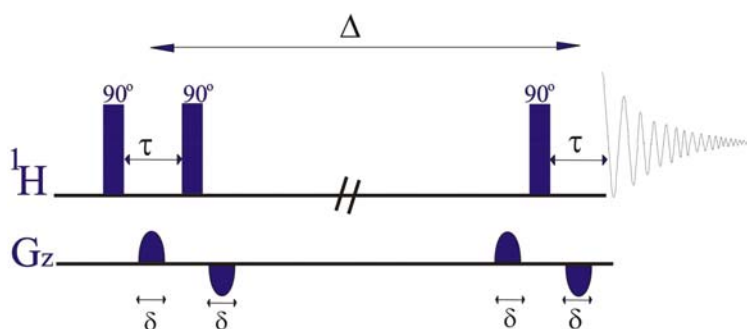


FIGURA 1.6 – Seqüência GCSTE (Gradient Compensated Stimulated Echo)

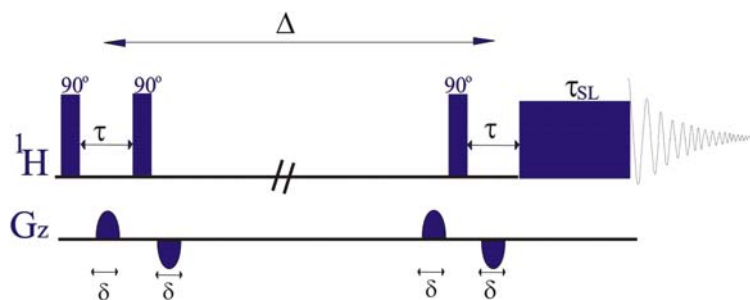


FIGURA 1.7 – Seqüência GCSTESL (Gradient Compensated Stimulated Echo Spin Lock)

As principais vantagens das seqüências GCSTE e GCSTESL em relação à seqüência bipolar com pulsos de rf de 180° (BPPSTE ou BPPLD) são a simplicidade e a economia no ciclo de fase². Contudo, a seqüência GCSTE está sujeita a anomalias de fase geradas por sistemas de spins acoplados fortemente (o que é eliminado nas seqüências bipolares com pulso de rf 180°). A seqüência GCSTESL emprega pulsos de “trava de spin” (*spin lock*) para eliminar tais efeitos, mas está sujeita aos efeitos provocados pelo aquecimento.

1.3.2. Artefatos Gerados por Gradientes de Temperatura e Correntes de Convecção

As correntes de convecção térmica são fluxos originados em uma solução por gradientes internos de temperatura. As diferenças de densidade resultantes propiciam o movimento de subida do líquido menos denso das camadas externas e inferiores e o deslocamento do líquido mais denso (no caso, menos aquecido) das camadas internas e superiores⁴. O oposto ocorre também possível em amostras resfriadas.

O efeito do fluxo convectivo pode ser particularmente prejudicial em experimentos de difusão, pois a circulação resultante do material da amostra resulta no movimento físico dos spins, o que interfere na formação dos ecos de spin e na quantidade de magnetização refocalizada⁴. Dependendo da velocidade da convecção, a perturbação do comportamento ideal da curva de decaimento dos sinais levará ao aumento do valor do coeficiente de difusão medido e a origem de sinais com amplitudes negativas¹².

O início da convecção em um fluido em descanso contido em um tubo cilíndrico na posição vertical é determinado por um único parâmetro adimensional, γ :

$$\gamma = \frac{g\alpha}{\nu k} r^4 T' \quad \text{eq. 5}$$

em que g é a aceleração da gravidade, α é o coeficiente de expansão do volume térmico de um fluido, $\nu = \eta/\rho$ é a viscosidade cinemática (η é a viscosidade absoluta e ρ é a densidade), $k = k/(\rho C_p)$ é sua difusibilidade térmica (k é a condutividade térmica e C_p a capacidade de aquecimento específico a pressão constante), r é o raio interno do tubo e $T' = \Delta T/d$ é o gradiente de temperatura ao longo do eixo do cilindro (ΔT é a diferença de temperatura através do fluido da coluna de altura $d \approx r$). A convecção tem início quando γ excede um valor crítico (γ_c), que depende da condutividade térmica das paredes do tubo (quanto mais condutoras, maior o valor de γ_c)⁵⁷.

Apesar das correntes de convecção representarem uma fonte de erros grave em medidas de difusão, existem várias medidas práticas que podem ser adotadas para eliminá-las ou minimizar seus efeitos. A seguir estão descritas algumas abordagens comumente empregadas na literatura, assim como algumas sugestões de como fazê-lo.

a) ajuste da temperatura

Sempre que possível, é recomendável trabalhar em temperaturas amenas, pois isto diminui a probabilidade de originar gradientes de temperatura na amostra. O ajuste da temperatura mais próximo à ambiente pode representar uma grande diferença na velocidade de convecção, principalmente quando solventes pouco viscosos estão sendo empregados.

b) ajuste do fluxo de gás

Como a convecção pode ser induzida pelo sistema de controle da temperatura da amostra (que é usualmente realizado por um fluxo de ar comprimido ou algum tipo de gás alimentado através da base da sonda), a troca térmica entre o fluxo de gás e a amostra deve ser eficaz. Se esta condição não for alcançada, são criados gradientes de temperatura ao longo do tubo da amostra, o que pode causar o surgimento de convecção térmica.

Se for necessário aquecer ou resfriar a amostra, é importante que o fluxo de gás que passa pela sonda contenha capacidade térmica suficiente para manter a temperatura constante através da amostra⁵⁷. Se não for o caso, o simples aumento do fluxo do gás poderá ser suficiente para eliminar os gradientes de temperatura (tomando-se o cuidado de não deslocar verticalmente o tubo ou produzir vibrações na amostra). Dependendo do desenho da sonda, um fluxo de 10 a 15 L/min deve ser adequado¹².

c) emprego de solventes viscosos

Em contraste com o fenômeno da difusão, que depende do tamanho molecular e da viscosidade entre outros fatores, a convecção é primariamente uma função da viscosidade da solvente⁵⁸. Sendo assim, o uso de solventes mais viscosos pode ser uma alternativa para se evitar as correntes de convecção, uma vez que quando utilizados é necessário um gradiente de temperatura maior para dar início ao fluxo convectivo.

d) decréscimo do diâmetro ou e/ou da altura da amostra

A redução do volume da amostra também pode minimizar o surgimento das correntes de convecção, uma vez que quanto menor seu volume, maior a probabilidade da troca térmica ser efetiva em toda a solução. Por exemplo, os tubos padrões de 5 mm de diâmetro podem ser substituídos por tubos capilares, que utilizam um volume muito menor de amostra. Além do diâmetro do tubo, é recomendável também reduzir a altura da amostra tão baixa quanto possível (ou seja, até o ponto que não comprometa a resolução¹²).

Os dois maiores custos desta abordagem são a diminuição da relação sinal/ruído devido a maior distância do tubo em relação à bobina da sonda e a eventual necessidade de se reduzir o volume da amostra (quanto esta não pode ser concentrada em um volume menor). O problema com a distância pode ser resolvido com o emprego de micro sonda, já o custo da redução do volume da amostra deve ser considerado em relação ao benefício da eliminação das correntes de convecção.

e) giro da amostra

Girar a amostra pode ser uma das abordagens mais simples a ser tomada para amenizar ou eliminar os efeitos da convecção. Devido às forças de

Coriolis, o giro do tubo sobre o seu eixo tem um efeito fortemente estabilizante no estado condutivo do sistema, de forma que apenas uma rotação lenta pode suprimir a convecção⁵⁷. Porém, as conseqüências do emprego do giro da amostra em experimentos com PFG dependem da estabilidade com que é realizado.

Para evitar que artefatos sejam adicionados ao experimento devido à instabilidade do giro, é altamente recomendado que ele seja empregado apenas para minimizar os artefatos causados pela convecção, ainda assim, assegurando-se que tubos de RMN com uma qualidade alta (retos, com bordas e tampas intactas e na altura padrão) sejam empregados.

f) emprego de seqüências de pulsos com compensação da convecção

A natureza ordenada da convecção torna possível empregar seqüências de pulsos que compensem seus efeitos. Considerando que as correntes de convecção forneçam um fluxo laminar constante durante o intervalo de difusão da seqüência de pulso, as seqüências de duplo eco ou eco estimulado de spin por gradiente de campo pulsado são hábeis para suprimir os artefatos causados pela de convecção. Elas partem do princípio de que há uma dependência entre as fases dos pulsos com a velocidade das correntes de convecção, de tal maneira que a dependência gerada no primeiro par de gradientes é cancelada pelo segundo par⁵⁷.

A seqüência de eco estimulado de spin por gradiente duplo (DSTE) com pulsos de gradiente bipolares e LED⁵⁵ (figura 1.8) é um exemplo de seqüência que elimina os efeitos das correntes de convecção, além de outros efeitos indesejáveis, como os das correntes de vórtice.

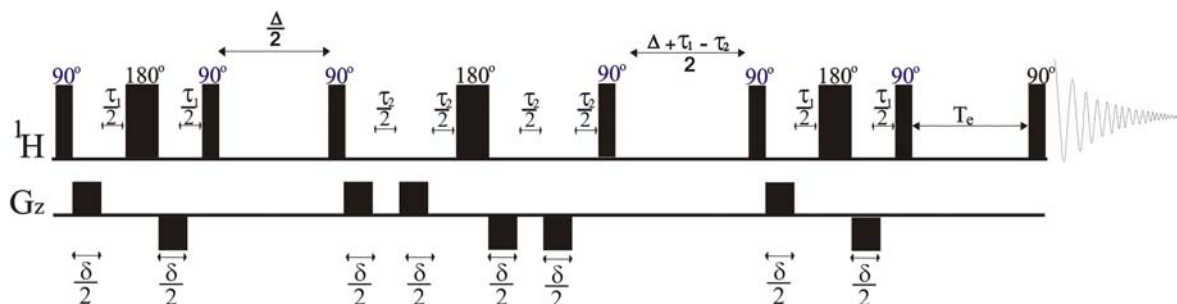


Figura 1.8. Seqüência de eco estimulado duplo (DSTE) com pulsos de gradiente bipolares e LED

Em uma outra abordagem, ZHANG *et al.*¹³ incorporaram a seqüência CPMG (Carr-Purcell-Melboom-Gill) e gradientes bipolares à seqüência de duplo eco de spin por gradiente (DMSE). Com essa associação é possível determinar o coeficiente de difusão de metabólitos pequenos em biofluidos na temperatura fisiológica (37 °C).

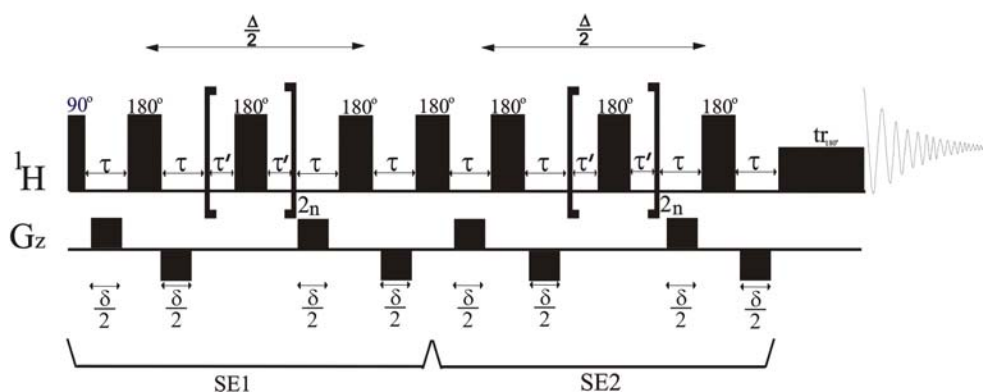


FIGURA 1.9 - Seqüência de pulsos DMSE (Double Multiple Spin-Echo) com CPMG e pulsos de gradientes bipolares

As desvantagens no uso de seqüência de pulsos com compensação de convecção são devido a sua incapacidade de suprimir os efeitos de fluxos turbulentos, à maior sensibilidade à sintonização da sonda (*tunnig e maching*) e aos erros de calibração de pulsos, e ao ciclo de fase duplo (o que requer um tempo de aquisição total maior)¹³.

d) emprego de pulsos de desacoplamento adiabáticos

O efeito do desacoplamento de $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ requer uma potência de irradiação bastante alta, o que pode causar o aquecimento direto na amostra e um aumento drástico na velocidade de convecção⁵⁷.

Uma vez que o ajuste do fluxo de gás é incapaz de compensar o aquecimento irregular causado pelo desacoplamento⁵⁷, o emprego de seqüências de desacoplamento tradicionais (como a GARP) representa um problema para a realização dos experimentos de DOSY-HSQC ou de DOSY-HMQC⁸.

Uma abordagem eficaz para obter espectros de HSQC desacoplados e sem aquecer demasiadamente a amostra é empregar pulsos de desacoplamento adiabáticos, como os do tipo WURST⁸. Eles fornecem aquecimento modesto em relação aos pulsos convencionais, que deturpam a medida de difusão.

1.3.3. Artefatos Gerados por Volume Incorreto da Amostra

A diferença de susceptibilidade entre o ar e a solução, que ocorre na interface da amostra, gera artefatos que prejudicam o experimento⁵⁹, mas que podem ser eliminados simplesmente pelo ajuste adequado do volume da amostra.

1.3.4. Artefatos Gerados pela Troca Química

A troca química pode causar sérias distorções nos sinais e levar a severas perdas de sensibilidade, além de interpretações errôneas em experimentos de difusão ordenada⁴⁰. Isso pode ocorrer, por exemplo, em hidrogênios que possuem o mesmo deslocamento químico, mas que estão associados com duas espécies moleculares distintas em solução. Se os coeficientes de difusão para as espécies forem suficientemente diferentes, no espectro de difusão poderão ser observadas duas correlações distintas. Entretanto, se os hidrogênios das duas espécies trocarem muitas vezes durante o período da difusão, é obtida uma única correlação (com um coeficiente de difusão médio) para os dois sinais³⁹.

O efeito do fenômeno da troca química no espectro de DOSY irá depender da velocidade de troca, do período de difusão, da diferença dos coeficientes de difusão das moléculas e das populações dos sítios envolvidos³⁸.

Os artefatos gerados pela troca química podem ser eliminados pelo uso de seqüências que utilizam pulsos de gradiente bipolares, como as seqüências BPPSTE ou BPPLIED, que refocalizam o deslocamento químico e possibilitam um sinal de eco puro⁴⁰.

1.3.5. Artefatos Gerados por Desajustes entre Pulsos de Gradiente Seqüenciais

Em experimentos que empregam pulsos de gradiente de campo, a área efetiva do primeiro pulso de gradiente (relativo à perda de fase) deve ajustar-se exatamente com a do segundo pulso (relativo à recuperação da fase). Do contrário, um erro extremamente pequeno entre os pulsos de gradiente irá resultar em uma distorção de fase residual, causando perdas na intensidade do sinal do eco¹⁰. Dependendo da força do gradiente aplicado, os distúrbios provocados podem ser severos a ponto de serem confundidos com os provocados pelos efeitos causados pelas das correntes de vórtice.

A presença de artefatos gerados por desajustes entre pulsos de gradientes seqüenciais pode ser comprovada pela realização de medidas em uma substância com difusão livre e com um coeficiente de difusão muito pequeno, como polímeros de alto peso molecular. Para isso, um experimento deve ser realizado empregando-se os mesmos valores experimentais ajustados para uma amostra com um coeficiente de difusão mais elevado. Se a curva resultante do decaimento dos sinais for significativamente atenuada e ocorrer distorções de fase nos sinais, pode-se assumir que há desajustes entre pulsos de gradiente e possivelmente também problemas de movimentação e/ou vibração da amostra¹⁰.

Os pulsos de gradientes retangulares apresentam problemas de reprodução quando em seqüência, sendo esta dificuldade elevada pelo aumento da magnitude ou da duração dos pulsos de gradientes. Já os pulsos de gradiente formatados, como os senoidais, fornecem tempos de elevação e queda menores, o que possibilita que o amplificador de corrente gere pulsos de gradientes mais reprodutíveis. Desta maneira, a substituição de pulsos retangulares por pulsos formatados pode ser suficientes para eliminar os artefatos causados por desajustes entre pulsos de gradiente seqüências.

1.3.6. Artefatos Gerados por Ruídos de Fundo Macroscópicos e Microscópicos

Idealmente, os únicos gradientes de campo presentes durante a realização de uma seqüência de PFG devem ser os gradientes constantes, propositadamente aplicados. Entretanto, na prática, o campo magnético B_0 nunca

é perfeito e é comum a presença de gradientes internos não homogêneos⁵⁴, que dão origem aos ruídos de fundo.

Os ruídos de fundo provocados por gradientes não homogêneos podem ser de origem microscópica ou macroscópica. Os de origem microscópica são gerados pelas bobina principal e de gradiente⁶⁰, pelo ajuste inadequado da homogeneidade de campo, por materiais em suspensão⁵⁴, entre outros. Como o principal prejuízo ao experimento é a diminuição do tempo de relaxação transversal (T_2), os efeitos dos ruídos de fundo de origem microscópica podem ser eliminados com o emprego de pulsos de rf para refocalizar o efeito da defasagem⁵⁴.

Os ruídos de fundo de origem macroscópica são os gerados por diferenças da susceptibilidade magnética na região da bobina (como o efeito menisco), o que provoca alterações na curva de decaimento dos sinais⁶¹. A solução ideal para eliminar ruídos de gradiente macroscópicos é utilizar tubos que minimizem as diferenças de susceptibilidade na região de detecção, como os tubos com *shigame*. Entretanto, o emprego de seqüências de pulsos que contenham pulsos de gradientes bipolares pode minimizar seus efeitos, desde que os ruídos sejam constantes durante o experimento.

1.3.7. Artefatos Gerados pelo Amortecimento da Radiação

O amortecimento da radiação pode ocorrer onde o magnetismo nuclear é suficientemente forte para que a corrente que induz na bobina da sonda seja grande o suficiente para perturbar sua própria movimentação⁶³. A manifestação mais comum deste efeito é o alargamento excessivo da linha dos sinais intensos (freqüentemente dezenas de hertz), como o sinal da água em uma solução aquosa. Entretanto, uma variedade de efeitos pode ser observada, tais como anomalias na largura de linha e erros fase dos sinais⁶³.

As medidas de DOSY para a análise de amostras concentradas são importantes na calibração de sistemas de gradiente de campo pulsado, onde o principal método para calibrar a força do campo magnético é realizar um experimento de PFGSE em um material em que o coeficiente de difusão tenha sido determinado corretamente por outro meio. Como tais materiais são geralmente líquidos puros, são, portanto, susceptíveis ao amortecimento da radiação⁶³. Os erros sistemáticos na amplitude dos picos causados pelo

amortecimento da radiação também afetam o potencial dos experimentos de DOSY em discriminar entre espécies baseadas em diferenças muito pequenas de coeficientes de difusão. Este efeito pode comprometer a análise de amostras que contenham espécies com múltiplas concentrações⁶³.

Para permitir que a magnetização detectada seja reduzida o bastante para evitar o amortecimento da radiação é preciso manter a magnetização transversa defasada e reduzir a magnetização longitudinal⁶¹. Para isso são necessárias seqüências que permitam que a magnetização transversa fique espacialmente codificada durante o maior tempo possível, como na seqüência abaixo, em que os tempos t_1 e t_2 e o primeiro pulso de rf foram suprimidos (figura 1.10)⁶¹.

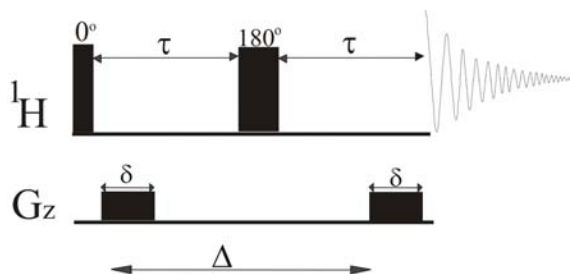


FIGURA 1.10 – Seqüência de pulso PFG modificada para minimizar problemas com amortecimento da radiação.

1.3.8. Artefatos Gerados pela Relaxação Cruzada

Em experimentos de PFGSTE, durante o tempo de difusão a magnetização dos spins que não interagem entre si é influenciada somente pela relaxação longitudinal (T_1), gerando usualmente um decaimento exponencial único dos sinais. Entretanto, os spins com relaxação dipolar cruzada possuem um comportamento mais complexo e os sinais sob este efeito podem dar origem a um decaimento não exponencial com o acréscimo do tempo de difusão. Como este comportamento é mais comum em sistemas de difusão restrita, os resultados obtidos na presença de núcleos com relaxação cruzada podem ser interpretados erroneamente⁶⁴. Para inibir os efeitos gerados pela relaxação cruzada é recomendável empregar seqüências que utilizem pulsos de rf de 180° , em que a evolução dos deslocamentos químicos é refocalizada⁶⁴.

2. OBJETIVOS

A primeira parte do estudo foi dedicada à técnica DOSY e teve como objetivos principais a sua implementação e a avaliação de sua potencialidade como ferramenta auxiliar na elucidação estrutural de substâncias em mistura oriundas de produtos naturais. Os objetivos específicos visaram a otimização dos experimentos de DOSY, a implementação dos experimentos de DOSY-COSY e DOSY-HSQC, o estudo para a minimização de artefatos em experimentos de DOSY 2D e 3D e o emprego da técnica em misturas de produtos naturais, em diferentes condições.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker de 9,4 Tesla, modelo DRX400 (400,13 MHz para frequência do hidrogênio). As amostras foram solubilizadas em 0,6 ml ou em 0,06 ml de solvente deuterado, conforme a sonda empregada. Os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais do padrão tetrametilsilano (TMS).

Os experimentos de DOSY foram obtidos empregando-se sondas com 5 mm e 2,5 mm de diâmetro interno, com detecção no modo inverso e equipadas com bobinas geradoras de gradientes de campo na coordenada z (campo máximo de 53,5 Gauss.mm⁻¹). Salvo quando enunciado, todos os experimentos foram realizados a temperatura de 298,0 K, que foi estabilizada por uma unidade de temperatura variável, modelo B-VT 2000, e um sensor tipo termopar, modelo T. Foram empregados fluxos de ar comprimido (em temperaturas superiores a 303 K) e de nitrogênio líquido (em temperaturas inferiores a 303 K).

Salvo na etapa da implementação da técnica, todas as medidas de difusão foram obtidas empregando-se larguras espectrais (SW) de 1000 Hz, pulso de gradiente para a eliminação das magnetizações remanescentes na dimensão xy (*spoil*) com duração de 1,1 ms e intervalos de recuperação do gradiente (τ_d), de dissipação das correntes de vórtice (T_e) e de difusão (Δ) de 0,1, 5 e 100 ms, respectivamente. A rampa do gradiente foi ajustada entre 2 (1,07 G.mm⁻¹) a 95 % (50,8 G.mm⁻¹) da potência total do amplificador do gradiente, em intervalos

eqüidistantes. O tempo de aplicação do pulso de gradiente ($\delta/2$) foi ajustado para que cerca de 5% da intensidade dos sinais permanecesse ao final do experimento.

O processamento dos espectros de DOSY foi realizado inicialmente utilizando-se o macro ILT e posteriormente o software XWINNMR, versão 3.0. Os principais parâmetros empregados estão apresentados nas legendas das figuras.

A escala do coeficiente de difusão está apresentada na forma logarítmica, ou seja, um valor apresentado como $\log D = - 8,95$, por exemplo, significa que $D = 1,12 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. A precisão de cada valor de difusibilidade foi determinada pela largura de cada sinal na dimensão da difusão.

Uma vez que os valores de D foram empregados apenas para distinguir sinais de RMN de compostos em misturas, o eixo do coeficiente de difusão não foi calibrado, apenas referenciado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Implementação da Técnica

O estudo com a técnica DOSY foi iniciado com a implementação da técnica, que ocorreu quando os softwares de aquisição e processamento atuais ainda não estavam disponíveis comercialmente. Como não havia um procedimento pré-estabelecido para a aquisição de experimentos de DOSY, os primeiros experimentos foram realizados buscando ajustar os principais parâmetros experimentais. Uma mistura conhecida (intitulada como mistura padrão) foi empregada como referência.

4.1.1. Produção de uma Mistura Padrão

A mistura padrão foi preparada empregando-se dois produtos naturais com estruturas conhecidas e volumes moleculares bastantes distintos. A mistura escolhida foi de uma cumarina, a xantiletina (**1**) e de um limonóide, a limonina (**2**, figura 4.1). Com esta abordagem buscou-se garantir uma diferença entre os coeficientes de difusão observável em experimentos de DOSY e confirmar a eficiência da distinção através de sinais de RMN ^1H previamente atribuídos.

A mistura foi inicialmente obtida solubilizando-se 12 mg da substância **1** e 8,6 mg da substância **2** em 0,6 mL de CDCl_3 . Em experimentos posteriores foram empregadas outras misturas (relatadas posteriormente), com concentrações e proporções distintas.

A atribuição dos sinais de RMN de ^1H (espectros 1 e 2, páginas A-1 e A-2) dos compostos **1** e **2** foi realizada em comparação com a literatura^{65,66} e está apresentada na tabela 1.

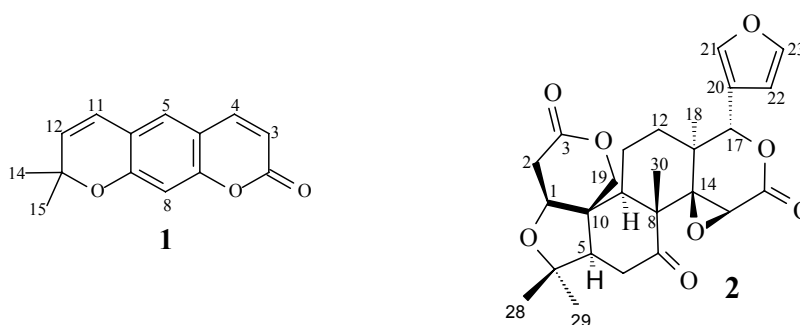


FIGURA 4.1 – Estruturas dos compostos xantiletina (**1**) e limonina (**2**)

TABELA 1 – Atribuição dos sinais de RMN de ^1H dos compostos **1** e **2**

H	Xantiletina ⁶⁵ (1)	Limonina ⁶⁶ (2)
	δ (ppm) J (Hz)	δ (ppm) J (Hz)
1		4,03 1H s/
2 α		2,67 1H dd (16,8; 2,0)
2 β		2,97 1H dd (16,8; 3,8)
3	6,22 1H d (9,5)	
4	7,57 1H d (9,5)	
5	7,05 1H s	2,23 1H dd (16,0; 3,2)
6 β		2,86 1H dd (14,4; 16,0)
6 α		2,47 1H dd (14,4; 3,2)
8	6,72 1H s	
9		2,55 1H dd (12,4; 2,9)
11	6,34 1H d (10)	1,86 2H m
12	5,69 1H d (10)	1,50 2H m
14	1,47 3H s	
15	1,47 3H s	4,05 1H, s
17		5,47 1H s
18		1,17 3H s
19a		4,77 1H d (13)
19b		4,47 1H d (13)
21		7,40 1H t (1,8)
22		6,34 1H dd (1,8; 1,0)
23		7,41 1H m
28		1,29 3H s
29		1,18 3H s
30		1,08 3H s

4.1.2. Ajuste dos Principais Parâmetros Experimentais

Os primeiros experimentos com a técnica DOSY foram obtidos ajustando-se três parâmetros: tempo de difusão, Δ (intervalo entre a aplicação dos pulsos de perda e recuperação da coerência), percentagem da força do gradiente de campo, g , e tempo de aplicação do gradiente de campo, δ . Os valores foram modificados buscando obter curvas de decaimento exponenciais e espectros de DOSY com coeficientes de difusão distintos para os compostos **1** e **2**. O processamento dos espectros foi realizado com uma versão preliminar do software atual, um macro intitulado ILT (Inverse Laplace Transformation).

Os primeiros experimentos foram realizados a temperatura de 303 K e empregando-se uma sonda de 5 mm de diâmetro interno. Estas condições propiciaram correntes de convecção na amostra, o que impossibilitou que

quaisquer ajustes entre Δ , g e δ demonstrasse bons resultados, como pode ser observado em um dos espectros de DOSY obtidos (espectro 3, página A-3).

Apenas após o decréscimo da temperatura para 298 K foi possível obter um espectro de DOSY com uma resolução satisfatória, em que os sinais de RMN de ^1H dos compostos **1** e **2** puderam ser correlacionados corretamente com seus respectivos coeficientes de difusão.

No espectro resultante (espectro 4, página A-4) foi possível obter valores de D distintos para o composto **1** ($\log D = -8,95 \pm 0,01$ ou $D = 1,12 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) e **2** ($\log D = -9,15 \pm 0,01$ ou $D = 7,08 \pm 0,16 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). São também observados valores de D diferenciados para o sinal TMS e de resíduos de clorofórmio, de acetona e de impurezas oriundas do isolamento do composto **2** ($\delta = 0,9, 2,3$ e $5,4$ ppm).

4.2. Otimização dos Métodos de Aquisição e de Processamento

Após a obtenção de um espectro de DOSY com uma resolução satisfatória, a etapa de implementação da técnica foi concluída e a etapa de otimização dos experimentos de DOSY foi iniciada. A disponibilidade de *softwares* de aquisição e processamento mais sofisticados tornou possível otimizar os experimentos de DOSY e implementar os experimentos de DOSY-COSY e de DOSY-HSQC.

4.2.1. Aquisição dos Experimentos de DOSY

A modificação mais significativa na aquisição dos experimentos de DOSY foi ao modo do ajuste da curva de decaimento dos sinais. A partir desta etapa apenas o tempo de aplicação do gradiente (δ) foi ajustado para cada amostra, sendo que o tempo de difusão (Δ) foi mantido fixo em 100 ms e a rampa de gradiente (g) foi ajustada entre 2 a 95% do gradiente máximo ($53,5 \text{ G} \cdot \text{mm}^{-1}$)

Abaixo estão relatados os procedimentos básicos empregados atualmente para o ajuste dos experimentos de DOSY:

1) obtenção de um espectro de hidrogênio com uma resolução satisfatória

Os sinais sobrepostos de moléculas distintas representam uma limitação da técnica, uma vez que a curva de decaimento de tais regiões espectrais não descreve um decaimento exponencial único (é misto do comportamento das curvas obtidas para os sinais isolados) e, dependendo do grau de sobreposição dos sinais, fornecem valores de D errôneos ou mesmo impossibilitam sua diferenciação.

Portanto, obter uma boa resolução para os sinais de hidrogênio (idealmente verificada pelo sinal do TMS) é essencial para os experimentos de DOSY, uma vez que este procedimento diminui a probabilidade de sobreposições de sinais.

2) calibração do pulso de rádio-freqüência e cálculo do valor do tempo de relaxação longitudinal

A calibração do valor do pulso de rf para a amostra em estudo (ao invés do emprego do valor ajustado para uma mostra padrão) e a estimativa do tempo de relaxação longitudinal (T_1) são importantes para otimizar a relação sinal/ruído. Os valores corretos dos pulsos de rf permitem também manipular os spins ao longo da seqüência com maior precisão, o que garante, por exemplo, que toda a magnetização se localize no plano xy após o pulso inicial de rf de 90° .

Estimar o valor do tempo de relaxação longitudinal, T_1 , é importante para garantir que a maioria da magnetização retorne para o equilíbrio antes do início do próximo ciclo. Para isso, os valores de tempo de aquisição (T_{ac}) e de reciclagem (T_d) são ajustado de forma que, somados, correspondam de três a cinco vezes o valor de T_1 .

3) obtenção de dois experimentos de DOSY unidimensionais, ajustados com 2% e 95% da percentagem total do gradiente

O tempo de aplicação do gradiente (δ) deve ser ajustado para cada amostra, o que pode ser realizado com eficiência empregando-se dois experimentos de DOSY 1D, com 2% e 95% do gradiente máximo (g), respectivamente. Estas percentagens correspondem à percentagem inicial e final a que os experimentos de DOSY 1D estarão sujeitos, as percentagens intermediárias dependem do número de experimentos de DOSY 1D ajustados.

Para que a curva de decaimento dos sinais seja observada integralmente, o valor de δ deve ser ajustado de forma que apenas cerca de 5% da intensidade dos sinais permaneça no segundo espectro (com 95% de g) em relação ao primeiro. Caso contrário, os sinais podem decair totalmente antes ou depois do último experimento, e, em ambos os casos, a resolução do espectro de DOSY sairá prejudicada.

4) ajuste do número de pontos na aquisição e obtenção do experimento de DOSY

O número de pontos de dados adquiridos no eixo do hidrogênio (TDF_2) também é importante para a resolução do espectro de DOSY. O valor empregado deve garantir que todas as ressonâncias sejam digitalizadas corretamente, principalmente quando sinais de moléculas distintas estão muito próximos.

5) ajuste dos demais parâmetros

Os últimos parâmetros ajustados para a obtenção do experimento de DOSY são o número de experimentos empregados no eixo F_1 (TDF_1), o tempo de reciclagem (T_d) e o número de aquisições acumuladas em cada ciclo (NS).

O valor empregado em TDF_1 corresponde ao número de experimentos de DOSY 1D que irão formar a curva de decaimento dos sinais. Quanto maior este número, mais definida será a curva de decaimento (a diferença de intensidade dos sinais entre cada experimento será menor) e melhor será a resolução do espectro de DOSY. A escolha do valor de TDF_1 está relacionada com a resolução necessária no eixo do coeficiente de difusão. Em geral, quanto maior o valor de TDF_1 , melhor a resolução do espectro de DOSY, entretanto, a partir de um certo valor (de 32 a 64), elevá-lo não resulta em melhorias no espectro, apenas aumenta o tempo do experimento. Nestes casos, é preferível incrementar os valores de outros parâmetros, como T_d ou NS.

Na prática, os valores de TDF_1 , T_d , NS devem ser ajustados conforme as características de cada amostra e a disponibilidade do equipamento. Basicamente, quando a diferença estrutural entre as espécies difusoras é grande e a concentração baixa, os valores de NS e T_d têm prioridade. Caso contrário, prioriza-se o valor de TDF_1 . Nos casos intermediários, deve-se buscar um compromisso entre os valores de TDF_1 , T_d e NS.

4.2.2. Processamento dos Espectros

Como qualquer outro experimento de RMN, os parâmetros de processamento também podem ser empregados para melhorar a resolução dos espectros de DOSY. Neste trabalho três parâmetros foram avaliados quanto à influência da resolução dos espectros: o número de pontos empregados no processamento de ambos os eixos (SIF_1 e SIF_2) e o fator de multiplicação exponencial (lb) para o eixo F_1 . Os diversos processamentos foram analisados empregando-se um experimento adquirido com 64 K de pontos em F_2 (TD F_2) e com 16 pontos em F_1 (TD F_1).

4.2.2.1. Número de Pontos Processados em F_2

O processamento do eixo F_2 pode ser realizado com ou sem *zero filling*, ou seja, o valor de SI utilizado no processamento pode ser maior ou igual ao valor empregado na aquisição ($SI \geq TD$). Neste estudo foi observado que o emprego do *zero filling* não influenciou significativamente a resolução do espectro de DOSY (figura 4.2), apenas na velocidade do processamento dos espectros.

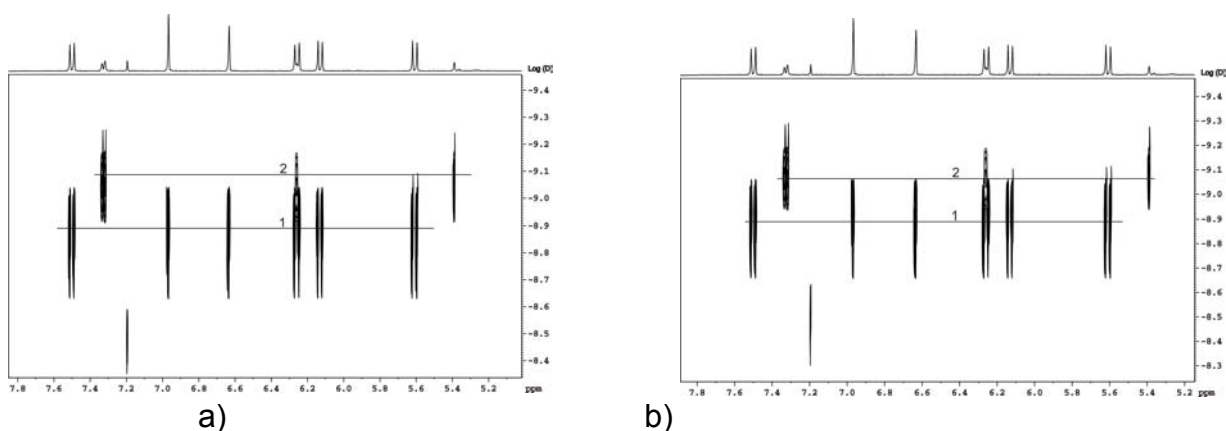


FIGURA 4.2 - Espectros de DOSY da mistura padrão processados com 32 K (a) e 64 K (b) pontos no eixo F_2

Devido a pouca diferença da resolução e a economia de tempo, optou-se por empregar 32 K (não empregar o *zero filling*) no processamento dos espectros de DOSY.

4.2.2.2. A Multiplicação Exponencial Aplicada no Eixo F_2

A multiplicação exponencial é um processamento matemático empregado para aumentar a relação sinal/ruído dos espectros de RMN, entretanto, com o custo do aumento da largura de linha dos sinais.

Em espectros de DOSY, o aumento do fator de multiplicação exponencial (lb) pode ser empregado para definir melhor as correlações (figura 4.3).

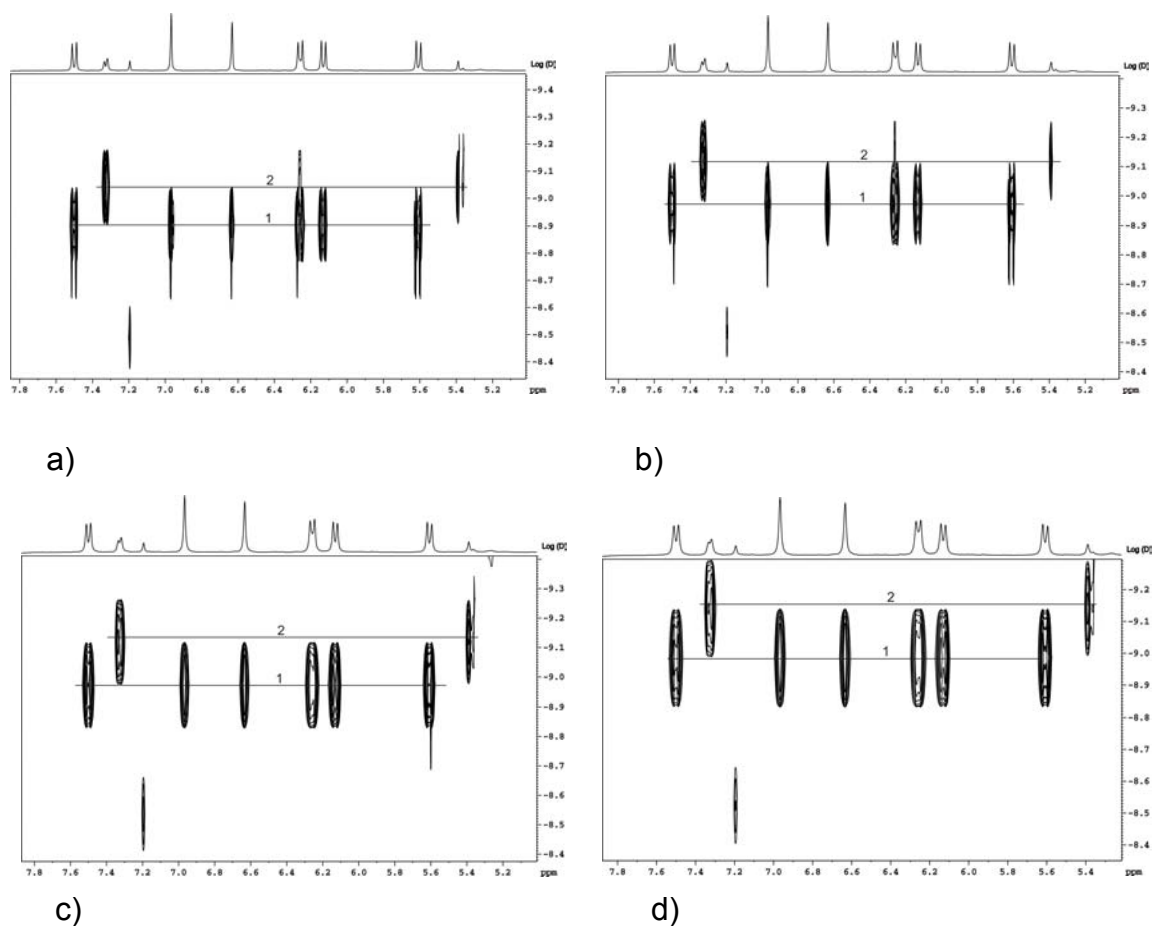


FIGURA 4.3. Espectros de DOSY da mistura padrão processados com multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha (lb) de: a) 1 Hz; b) 2 Hz; c) 3 Hz e d) 4 Hz.

Como pode ser observado na figura 4.3, conforme o fator de multiplicação exponencial é aumentado, as correlações ficam mais bem definidas. Contudo, a multiplicação exponencial pode mascarar algum sinal e prejudicar a interpretação do espectro. Em δ 6,34 ppm, por exemplo, o alargamento de linha de um sinal do composto **1** faz com que ele se sobreponha a um sinal do

composto **2**, que possui o mesmo deslocamento químico, e que a correlação seja perdida (figura 4.4).

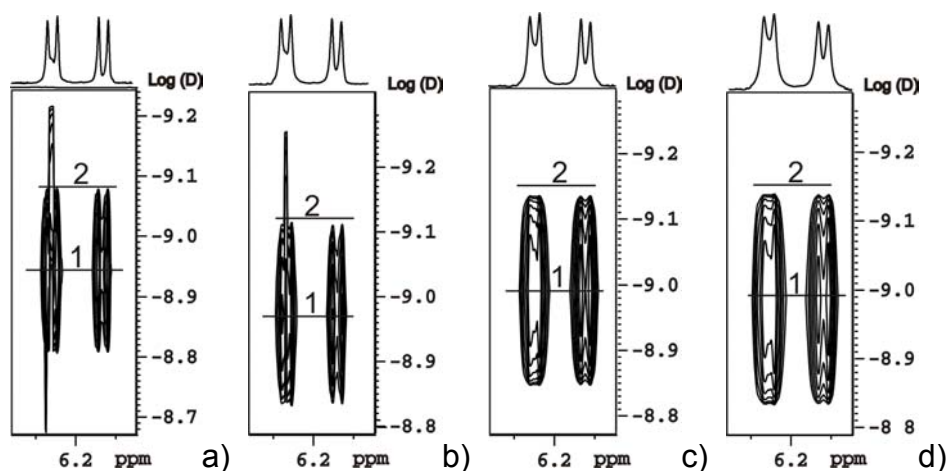


FIGURA 4.4. Espectros de DOSY da mistura padrão processados com multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha de: a) $l_b = 1$ Hz; b) $l_b = 2$ Hz; c) $l_b = 3$ Hz e d) $l_b = 4$ Hz, região de δ 6,0 a 6,4 ppm

A multiplicação exponencial pode ser empregada no processamento de espectros de DOSY para definir as correlações, mas com cautela, pois as informações nas regiões de sobreposição de sinais podem ser comprometidas.

4.2.2.3. Número de Pontos Processados em F_1

No processamento dos espectros de DOSY também é possível aumentar o número de pontos em F_1 , ou seja, processar o espectro com um número maior de pontos que o empregado na aquisição. Para isso são utilizados valores múltiplos do número de experimentos adquiridos em F_1 , ou seja, do número de experimentos de DOSY 1D que formam a curva de decaimento.

O aumento do valor de SIF_1 melhora a separação dos sinais de compostos com D distintos, entretanto piora a resolução das correlações. Este efeito pode ser verificado nos espectros da figura 4.4, que foram processados com o mesmo número de pontos (16), com o dobro (32), o triplo (64) e o quádruplo (128) do número de pontos adquiridos em F_1 .

Na figura 4.5 pode ser verificado que o aumento do número de pontos em F_1 distinguiu melhor as correlações, ou seja, aumentou a distância entre as correlações dos compostos **1** e **2**, mas a resolução das correlações

piorou, conforme pode ser verificado na expansão da região de δ 6,0 a 6,3 ppm (figura 4.5).

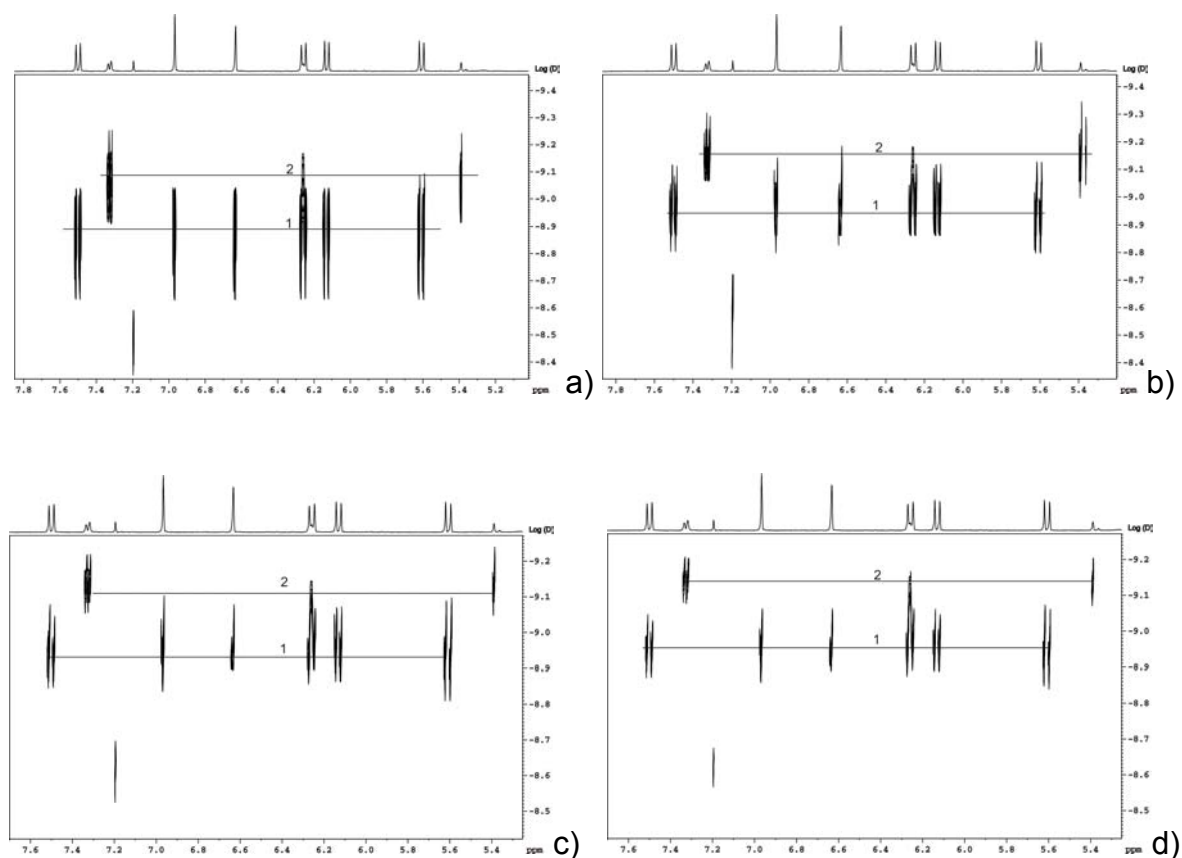


FIGURA 4.5. Espectros de DOSY da mistura padrão processados com: a) 16, b) 32, c) 64 e d)128 pontos em SIF_1

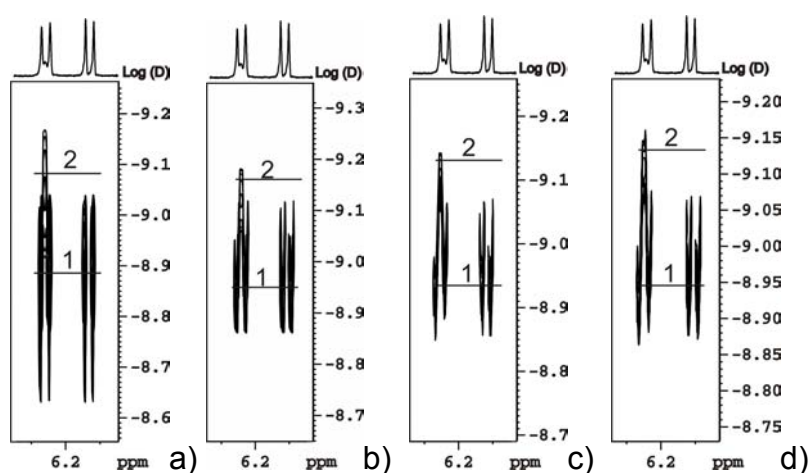


FIGURA 4.6. Expansões da região de δ 6,0 a 6,3 ppm de espectros de DOSY da mistura padrão processados com: a) 16, b) 32, c) 64 e d)128 pontos em SIF_1

O ajuste deste parâmetro de processamento foi o que apresentou a menor relação custo/benefício, ou seja, a perda na resolução das correlações foi pequena frente ao ganho na distinção dos sinais. A região de sobreposição dos sinais também não foi prejudicada.

O aumento do valor de SIF1 pode ser muito útil nos experimentos de DOSY 3D e em espectros de mistura de produtos naturais, entretanto não foi aplicado nos espectros de DOSY da amostra padrão, uma vez que estes foram sujeitos apenas a estudos comparativos.

4.2.3. Emprego do Experimento de DOSY Otimizado na Amostra Padrão

A implementação de novos procedimentos de aquisição dos dados e do processamento dos espectros melhorou significativamente a resolução dos espectros de DOSY da mistura padrão. Comparando-se o melhor espectro obtido na fase de implementação da técnica (espectro 4, página A-4) e após a otimização (espectro 5, página A-5) observa-se uma melhora significativa, principalmente na separação dos sinais no eixo do coeficiente de difusão.

4.2.4. Emprego do Experimento de DOSY Otimizado um Extrato Pré-purificado de folhas de *E. febrifuga*

Uma vez estando a técnica implementada e otimizada, ela foi aplicada em uma mistura “natural”; uma amostra obtida de um extrato hexânico pré-purificado de folhas de *Esenbeckia febrifuga*⁶⁷.

O espectro de DOSY resultante (espectro 6, página A-6) apresentou uma resolução suficiente para distinguir os sinais de dois compostos principais, com $\log D$ de $-8,78 \pm 0,01$ ($D = 1,66 \pm 0,04 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) e de $-8,90 \pm 0,01$ ($D = 1,26 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), assim como de alguns compostos minoritários com coeficientes de difusão menores.

Correlacionando os sinais com $\log D = -8,78$ com os sinais de RMN de ^1H da mistura pode ser constatado que os seguintes sinais pertencem a mesma molécula: dois dubletos em $\delta 6,25$ ppm ($J 9,6$ Hz) e $\delta 7,64$ ppm ($J 9,6$ Hz), um duplo dubleto em $\delta 6,80$ ppm ($J 8,4; 2,0$ Hz), um dubleto em $\delta 7,36$ ppm ($J 8,4$ Hz) e outro em $\delta 6,85$ ppm ($J 2$ Hz) e três singletos, situados em $\delta 1,75$, $1,66$ e

1,60 ppm. Em $\log D = -8,90$ são correlacionados sinais de RMN de ^1H nas regiões de δ 0,1 a 0,9 ppm, de δ 0,9 -1.1 ppm, de δ 1,4 a 1,6 e 1,8 a 2,4 ppm, além de sinais mais desblindados em δ 5,35 e 4,7 ppm.

4.3. Implementação dos Experimentos de DOSY-COSY

4.3.1. Experimento Empregando a Amostra Padrão

Como os experimentos de 3D DOSY demandam um tempo experimental maior, as principais condições de aquisição foram otimizadas empregando-se experimentos de DOSY e COSY separadamente. O experimento de DOSY foi obtido com dez pontos em TDF_1 (espectro 7, página A-7) e o de COSY com 64 pontos (espectro 8, página A-8). Os valores ajustados nestes experimentos foram empregados no experimento de DOSY-COSY (em um tempo experimental de 12 horas) que apresentou uma resolução suficiente para fornecer as correlações das substâncias **1** e **2** isoladamente.

No plano correspondente ao espectro de COSY (espectro 9, página A-9) da substância xantiletina (**1**) podem ser observadas as correlações entre os hidrogênios H-3 e H-4 (δ 6,2 e 7,6 ppm) e H-11 e H-12 (δ 6,3 e 5,7 ppm) e o sinal das metilas na diagonal (δ 1,5 ppm). No corte correspondente ao espectro de COSY (espectros 10, página A-10) da substância limonina (**2**) são observados as correlações entre os hidrogênios H-19 (δ 4,8 e 4,5 ppm), H-2 (δ 2,7 e 3,0 ppm), H-6 axial e equatorial (δ 2,9 e 2,5 ppm) e H-6 axial e H-5 (δ 2,9 e 2,2 ppm).

4.3.2. Experimento Empregando um Extrato Pré-purificado de folhas de *E. febrifuga*

Além da mistura padrão, um experimento de DOSY-COSY também foi realizado em uma amostra (26,5 mg) de um extrato hexânico de pré-purificado de folhas de *E. febrifuga*⁶⁷. Para o planejamento foi realizado um experimento de COSY com 64 experimentos em TDF_1 , que forneceu um espectro com resolução satisfatória (espectro 11, página A-11). Os parâmetros para o eixo da difusão foram ajustados conforme o experimento de DOSY já realizado para esta amostra (espectro 6, página A-6).

O experimento de DOSY-COSY resultante tornou possível extrair espectros de COSY contendo as correlações dos dois compostos principais isoladamente. A partir do experimento de COSY do composto majoritário (espectro 12, página A-12) e da comparação com a literatura⁶⁷ foi possível confirmar a estrutura do composto majoritário como pertencente a 7-geraniloxicumarina (**3**), conhecida como aurapteno (figura 4.7).

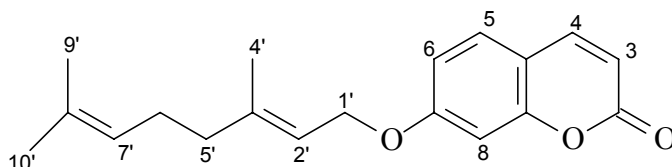


Figura 4.7 - Estrutura da 7-geraniloxicumarina (**3**)

No espectro podem ser observadas as correlações dos hidrogênios aromáticos H-3 (6,25 ppm) com H-4 (δ 7,64 ppm) e de H-6 (δ 6,85 ppm) com H-5 (δ 7,36 ppm) e com H-8 (δ 6,82 ppm). Assim como os hidrogênios metilênicos alílicos ligados a um carbono oxigenado H-1' (δ 4,60 ppm) correlacionando-se com o hidrogênio vinílico H-2' (δ 5,47 ppm) e os hidrogênios metilênicos alílicos H-5'e H-6' (δ 2,11 ppm) com o hidrogênio vinílico H-7' (δ 5,08 ppm).

TABELA 2 – Atribuição dos sinais de RMN de ^1H do composto **3**

H	δ (ppm)	n ^o de H	multiplicidade	J (Hz)
3	6,25	1	<i>d</i>	9,6
4	7,64	1	<i>d</i>	9,6
5	7,36	1	<i>d</i>	8,5
6	6,85	1	<i>dd</i>	8,5; 2,4
8	6,80	1	<i>d</i>	2,4
1'	4,60	2	<i>d</i>	6,6
2'	5,47	1	<i>t</i>	6,6
4'	1,75	3	<i>s</i>	-
5'	2,11	2	<i>sl</i>	-
6'	2,11	2	<i>sl</i>	-
7'	5,08	1	<i>m</i>	-
9'	1,60	3	<i>s</i>	-
10'	1,66	3	<i>s</i>	-

Devido a baixa concentração da substância minoritária, em $\log D = -8,9$, e a presença de grande quantidade de sinais, muitas constantes de acoplamento não puderam ser determinadas pelo espectro de COSY (espectros

13, página A-13). As correlações observadas foram de um dubleto em δ 5,34 ppm (4,9 Hz) com um sinal em δ 1,96 ppm (multiplicidade não determinada), um hepteto em δ 3,53 ppm (4,1; 10,2; 15 Hz) com um sinal entre δ 2,29 a 2,34 ppm (multiplicidade não determinada). Na região mais congestionada observam-se as seguintes correlações: em δ 1,99 ppm com sinais em δ 1,13 ppm, em δ 1,95 ppm com sinais em δ 1,51 ppm, δ 1,84 ppm com sinais em δ 1,05 e 1,48 ppm, em δ 1,82 ppm com sinais em δ 1,25 ppm, δ 1,52 ppm com sinais em δ 1,11 ppm, em δ 1,45 ppm com sinais em δ 0,9 ppm.

4.4. Implementação dos Experimentos de DOSY-HSQC

4.4.1. Experimento Empregando a Amostra Padrão

Para o planejamento do experimento de DOSY-HSQC foi realizado um experimento de HSQC com 64 incrementos em TDF_1 , que apresentou uma resolução satisfatória (espectro 14, página A-14). As condições experimentais utilizadas para o eixo da difusão foram as mesmas empregadas no experimento de DOSY da página A-7.

O experimento de DOSY-HSQC resultante apresentou uma resolução baixa no eixo do coeficiente de difusão, o que impossibilitou selecionar os planos contendo todas as correlações das substâncias **1** e **2** separadamente. Com a resolução alcançada foi possível selecionar um corte contendo as correlações da substância **1** (espectro 15, página A-15) e apenas as correlações mais intensas da substância **2** (espectro 16, página A-16).

No espectro de HSQC obtido para a substância **1** são observadas as correlações para os carbonos C-3 (δ 113 ppm), C-4 (δ 144 ppm), C-5 (δ 127 ppm), C-22 (δ 110 ppm). A sobreposição dos sinais de H-11, do composto **1**, e H-22, do composto **2**, prejudicou a discriminação dos coeficientes de difusão para esta região espectral, o que resultou em uma correlação pouco intensa para o carbono C-11 (δ 121 ppm).

No espectro de HSQC obtido para a substância **2** são observadas apenas as correlações para os carbonos C-15 (δ 54 ppm), C-18 (δ 21 ppm), C-22 (δ 110 ppm) e C-29 (δ 21 ppm).

A etapa de otimização dos experimentos de DOSY e da implementação dos experimentos de DOSY-COSY e DOSY-HSQC foi concluída com êxito. A implementação de procedimentos de aquisição e de processamento mais adequados, assim como de softwares de aquisição e processamento mais sofisticados, melhorou significativamente a resolução dos espectros de DOSY e possibilitou a obtenção espectros de COSY e de HSQC editados pela difusão.

4.5. Estudos na Prevenção de Artefatos em Experimentos de DOSY

Para que a técnica DOSY seja bem sucedida na análise de misturas de produtos naturais, os experimentos de DOSY devem ser obtidos livres das possíveis fontes de perturbação, ou dos artefatos experimentais, das quais estão sujeitos. Por isso, apesar da técnica já ter sido implementada e otimizada na etapa anterior, antes de estudar sua aplicação em um maior número de misturas de produtos naturais, uma etapa adicional foi realizada especialmente para minimizar eventuais artefatos experimentais.

O estudo foi direcionado para a escolha mais adequada para determinadas condições, tais como: a seqüência de pulso; a sonda (dentre as duas disponíveis); a temperatura da solução e o giro ou não da amostra. Neste estudo foi também avaliada uma seqüência de desacoplamento para a obtenção de experimentos de DOSY-HSQC livre de artefatos originados por correntes de convecção.

A obtenção de mais material permitiu empregar uma mistura padrão mais concentrada (com 16 mg da substância **1** e 13 mg da substância **2** em 0,6 mL de CDCl_3).

4.5.1. Eficiência das Seqüências de Pulso Disponíveis na Minimização de Artefatos

As seqüências de pulsos disponíveis são derivadas da seqüência de pulsos básica PFGSTE, com modificações que visam minimizar potenciais artefatos. A seqüência BPPLIED tem sido usada neste trabalho por ser mais

completa, entretanto sua eficiência em relação às demais não tinha sido testada ainda.

Com este objetivo foram realizados quatro experimentos, empregando-se a seqüência de pulso básica, PFGSTE (figura 1.2, página 6), a seqüência com pulsos bipolares, BPPSTE (figura 1.4, página 10), a seqüência com tempo para dissipação das correntes de vórtice, PFGLED (figura 1.3, página 9), e a que reúne todas as abordagens, BPPLIED (figura 1.5, página 10). Os experimentos foram realizados em seqüência, mantendo os mesmos parâmetros de aquisição e ajustando-se somente o valor do pulso de gradiente (δ).

Comparando-se a resolução das correlações dos espectros resultantes, verifica-se que a introdução do tempo para a dissipação das correntes de vórtices (espectro 19, página A-19) foi mais eficaz em relação à introdução dos pulsos bipolares (espectro 8, página A-8). O que indica que, para a potência de pulso utilizada, a perturbação gerada pelos pulsos de gradientes antes do período da aquisição foi maior que a gerada pelo uso de pulsos de gradientes durante o período de difusão.

Apesar do emprego de pulsos bipolares não ter apresentado melhorias em relação à seqüência básica (espectro 17, página A-17), o espectro que utiliza a seqüência com ambas as abordagens, pulsos bipolares e o tempo para a dissipação das correntes de vórtice (BPPLIED), foi a que apresentou a melhor resolução das correlações (espectro 20, página A-20).

Estes resultados confirmam que, dentre as seqüências disponíveis, a seqüência BPPLIED é a que apresenta os melhores resultados para a amostra padrão. Como as demais amostras de produtos naturais estudadas possuem características semelhantes, a seqüência BPPLIED foi utilizada nos outros experimentos.

4.5.2. Eficiência do Diâmetro da Sonda em Relação à Prevenção de Correntes de Convecção

Entender o comportamento das correntes de convecção nas amostras em relação ao volume e a temperatura da solução é importante para o planejamento experimental. A disponibilidade de duas sondas com diâmetros distintos, de 5 e 2,5 mm, permitiu avaliar os efeitos das correntes de convecção

em amostras com volumes de 0,6 e 0,06 mL, respectivamente, em temperaturas superiores e inferiores à temperatura ambiente.

4.5.2.1. Experimentos Realizados a Temperatura de 303 K

A figura 4.8 apresenta as curvas de decaimento de sinais da mistura padrão obtidas à temperatura de 303 K. Na figura 4.7a o experimento foi realizado empregando-se a sonda de 5 mm de diâmetro interno e na figura 4.7b a sonda de 2,5 mm.

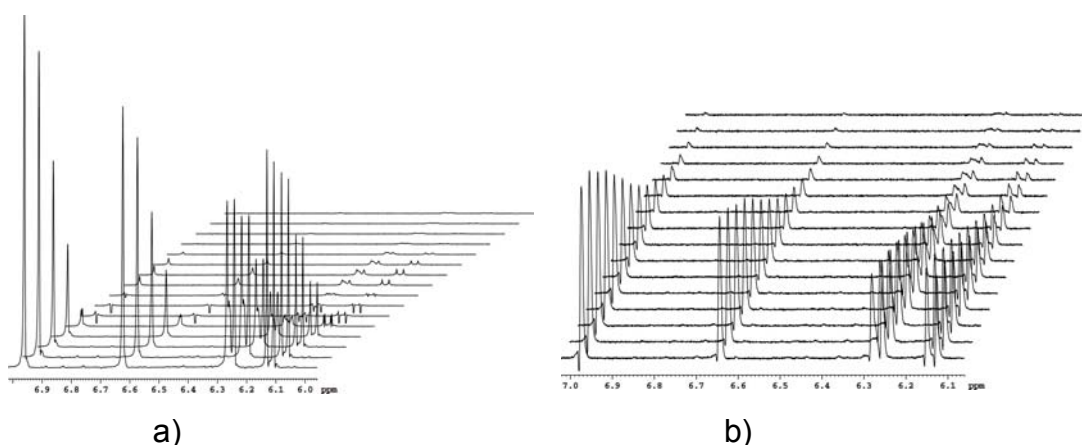


FIGURA 4.8 – Curva de decaimento de sinais da mistura padrão obtidos a temperatura de 303 K; a) utilizando-se a sonda de 5 mm e b) utilizando-se a sonda de 2,5 mm

As curvas de decaimento e a resolução dos espectros de DOSY resultantes de ambos os experimentos (espectros 21 e 22, páginas A-21 e A-22) foram prejudicadas pelas correntes de convecção. Entretanto, o efeito foi muito menor quando a sonda de 2,5 mm foi empregada, o que melhorou significativamente a resolução no eixo da difusão.

4.5.2.2. Experimentos Realizados às Temperaturas de 288 e 278 K

Visto que a sonda de 2,5 mm é menos sensível a gradientes de temperatura em temperaturas altas e que poderia ser uma alternativa para experimentos de DOSY também em temperaturas baixas, sua eficiência em relação à sonda de 5 mm também foi testada em temperaturas inferiores a temperatura ambiente, à 288 e 278 K.

Na fase de implementação da técnica já haviam sido realizados dois experimentos com a amostra padrão, empregando-se a sonda de 5 mm e

temperaturas de 288 e 278 K. Eles não foram apresentados anteriormente devido a baixa resolução obtida para os espectros, entretanto são muito oportunos neste estudo para demonstrar os efeitos das correntes de vórtice em temperaturas baixas.

No experimento realizado a 288 K, foi obtido uma curva de decaimento bem acentuada (figura 4.9a), o que refletiu em um espectro de DOSY com uma resolução baixíssima (figura 4.9b). A diminuição da temperatura a 278 K provocou danos adicionais na linha de base, como pode ser visto no decaimento (figura 4.10a) e no espectro de DOSY resultante (figura 4.10b).

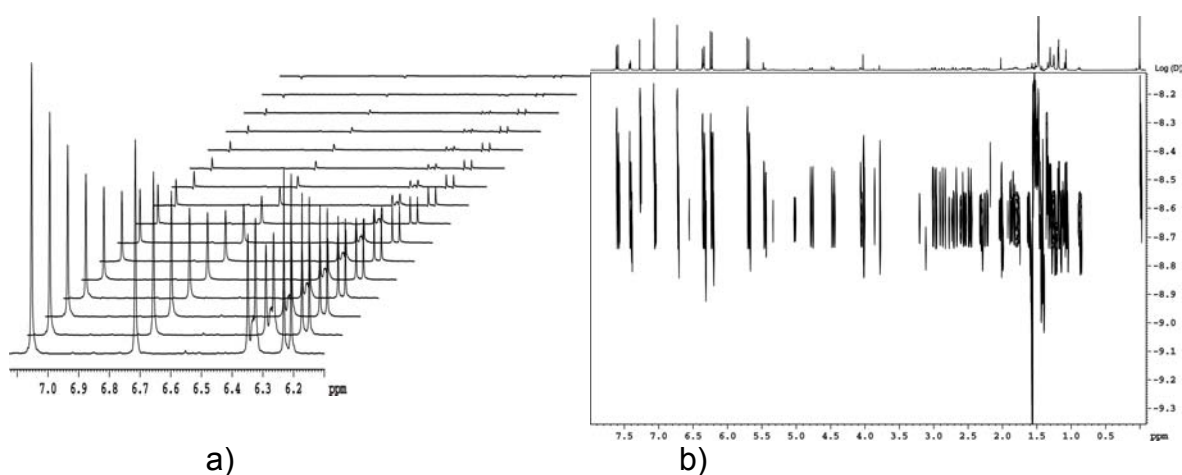


Figura 4.9 – Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 288 K, utilizando-se sonda de 5 mm

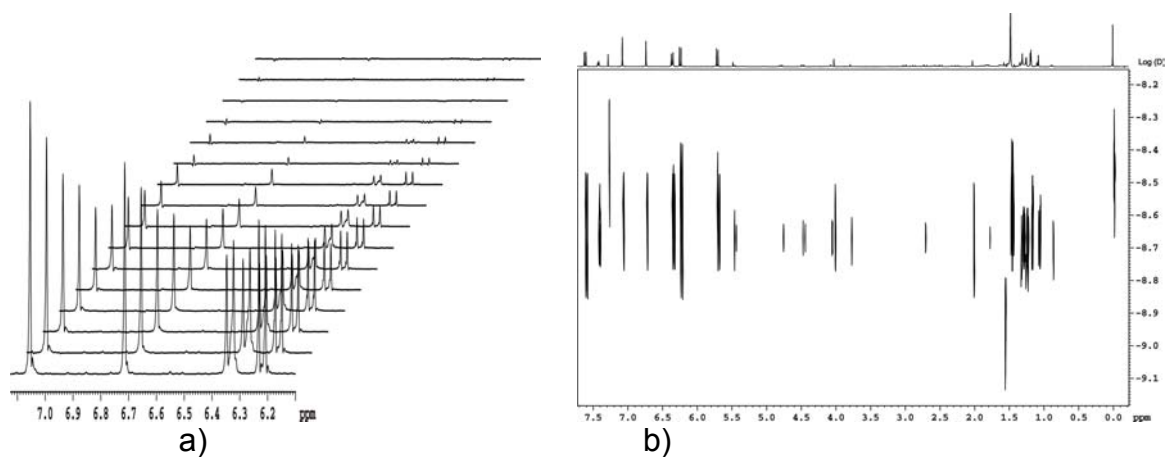


Figura 4.10 – Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 278 K, utilizando-se sonda de 5 mm

Quando os experimentos foram realizados sob as mesmas temperaturas, mas empregando a sonda de 2,5 mm, os efeitos das correntes de vórtice não foram observados. Em ambos os experimentos o decaimento dos sinais foi normal e os espectros de DOSY resultantes apresentaram resoluções satisfatórias (figuras 4.11 e 4.12).

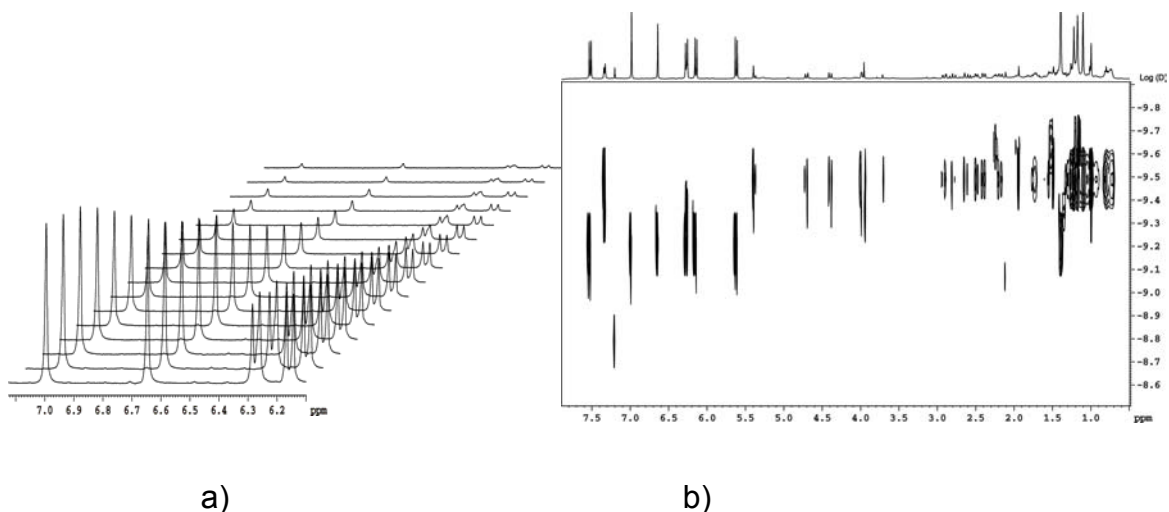


Figura 4.11 – Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 288 K, utilizando-se uma sonda de 2,5 mm

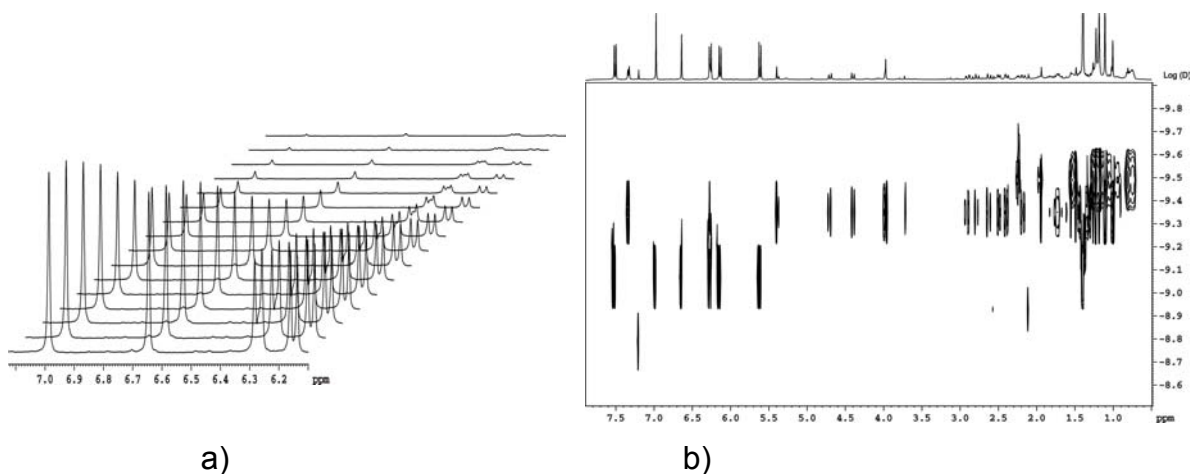


Figura 4.12 – Decaimento dos sinais da mistura padrão (a) e espectro de DOSY (b) obtidos a temperatura de 278 K, utilizando-se uma sonda de 2,5 mm

Exceto a temperatura e o tempo de aplicação do pulso de gradiente ($\delta = 1,4$ ms), os experimentos foram realizados sob as mesmas condições de aquisição e processamento empregados para o espectro 22 (página A-22).

O estudo do volume da amostra sob diferentes temperaturas demonstrou que o emprego de uma sonda com um diâmetro menor pode ser uma alternativa viável para a obtenção de experimentos de DOSY em temperaturas extremas.

4.5.3. Efeito da Ausência do Controle da Temperatura na Produção de Artefatos

O controle de temperatura em 303 K e acima pode ser realizado empregando-se o ar comprimido como fluxo de gás. Abaixo deste valor, é necessário empregar nitrogênio gasoso, o que torna a realização do experimento mais trabalhoso e demorado. Para realizar experimentos na sonda de 5 mm e ao mesmo tempo evitar problemas com correntes de convecção (devido ao aquecimento da amostra), a maneira mais prática é realizar o experimento sem o controle da temperatura.

Em experimentos realizados sem o controle da temperatura, pode-se empregar duas abordagens; em uma a amostra fica sujeita a um fluxo de ar comprimido e em outra a amostra não fica sujeita a nenhum fluxo. O emprego do fluxo de ar comprimido tem a desvantagem de fazer com que a amostra fique sujeita às variações da temperatura ambiente, principalmente se o experimento for longo. Por outro lado, a ausência um fluxo de gás deixa a amostra mais vulnerável ao aquecimento gerado pelos pulsos de gradiente, pois não oferece nenhuma troca térmica na região da bobina.

Neste estudo, foram realizados dois experimentos de DOSY para analisar a viabilidade da realização de experimentos de DOSY sem o controle de temperatura, sendo que no primeiro a amostra ficou sujeita ao fluxo de ar comprimido e no segundo não ficou sujeita a nenhum fluxo.

Em ambos os experimentos, as curvas decaimento dos sinais não apresentaram artefatos (figura 4.13), e os espectros de DOSY resultantes (espectros 23 e 24, páginas A-23 e A-24) apresentaram resoluções satisfatórias.

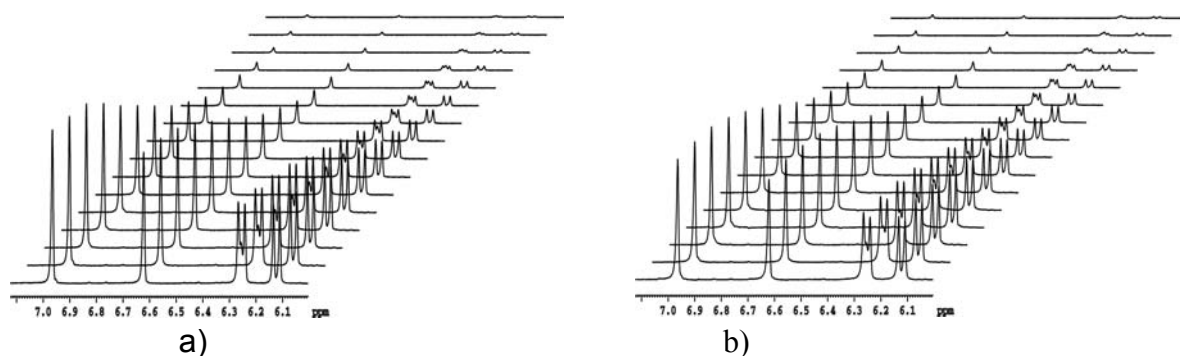


FIGURA 4.13 - Decaimento dos sinais da mistura padrão, a) utilizando-se ar comprimido como fluxo de gás e b) sem a utilização de fluxo de gás

Entretanto, a resolução do espectro de DOSY se mostrou levemente superior quando o fluxo de ar comprimido foi empregado (espectro 23). Como os dois experimentos foram obtidos sob as mesmas condições, o resultado indica que o aquecimento provocado pelos pulsos de gradiente é mais prejudicial ao experimento que a variação da temperatura devido ao fluxo de gás.

Ao final deste estudo pode ser observado que um experimento de DOSY suporta bem uma pequena oscilação de temperatura sem grandes prejuízos à resolução, principalmente considerando-se que o volume da solução era grande (0,6 mL) e que o solvente era pouco viscoso (CDCl_3).

4.5.4. Efeito do Giro da Amostra

Visando esclarecer a influência do giro da amostra, tanto na prevenção, quanto na produção de artefatos, foram realizados experimentos de DOSY na ausência e na presença de correntes de convecção, com e sem o giro da amostra.

4.5.4.1. Efeito do Giro da Amostra na Presença de Correntes de Convecção

Dois experimentos de DOSY foram realizados para analisar a influência do giro da amostra quanto aos efeitos das correntes de vórtice. No primeiro experimento a amostra foi girada (20 Hz) e no segundo não, em ambos foram utilizadas a sonda de 5 mm de diâmetro interno e a temperatura 303 K.

A curva de decaimento dos sinais resultante do experimento em que a amostra foi girada (figura 4.14a) apresentou um comportamento mais adequado em relação à obtida sem o giro da amostra (figura 4.14b). O experimento

realizado com a amostra girando resultou em um decaimento exponencial, mas com distorções na linha de base. No experimento em que a amostra não foi girada a curva de decaimento apresentou um comportamento oscilatório, em que os sinais decaíram totalmente, inverteram a fase e recuperaram-na durante o período de difusão.

Em concordância com as curvas de decaimento obtidas, o espectro de DOSY obtido do experimento em que a amostra foi girada apresentou uma resolução muito melhor (espectro 25 e 26, página A-25 e A-26).

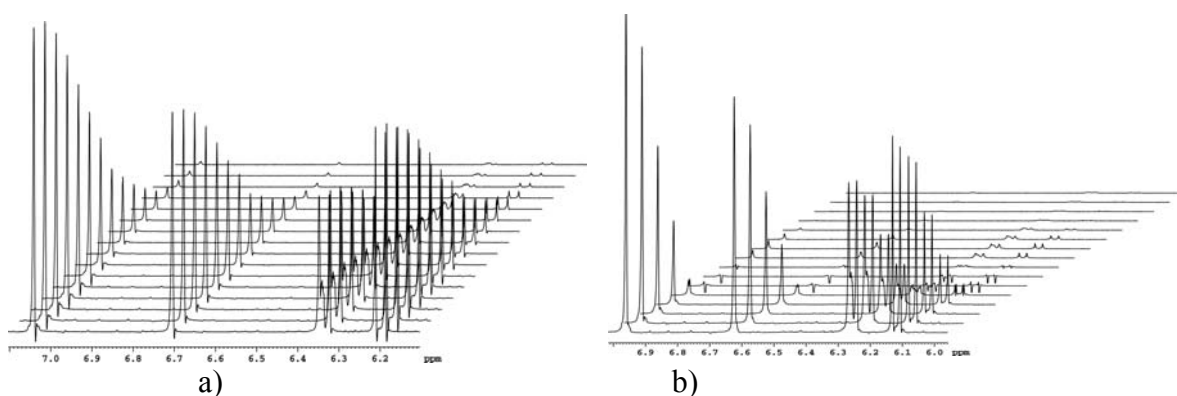


FIGURA 4.14 - Decaimento dos sinais da mistura padrão obtidos a temperatura de 303 K; a) utilizando-se o giro da amostra e b) com a amostra parada

4.5.4.2. Efeito do Giro da Amostra na Ausência de Correntes de Convecção

Para analisar o efeito do giro da amostra na ausência das correntes de convecção, foram realizados outros dois experimentos de DOSY, novamente com e sem o giro da amostra (figura 4.15).

Nas curvas de decaimento dos sinais resultantes pôde ser observado que, quando empregado em experimentos livre de correntes de convecção, o giro da amostra prejudica os experimentos de DOSY. Ao invés de um comportamento exponencial (figura 4.15 a), o giro da amostra fez com que a curva de decaimento apresentasse um comportamento ondulatório (figura 4.15 b), o que prejudicou muito a resolução do espectro resultante (espectros 27 e 28, páginas A-27 e A-28).

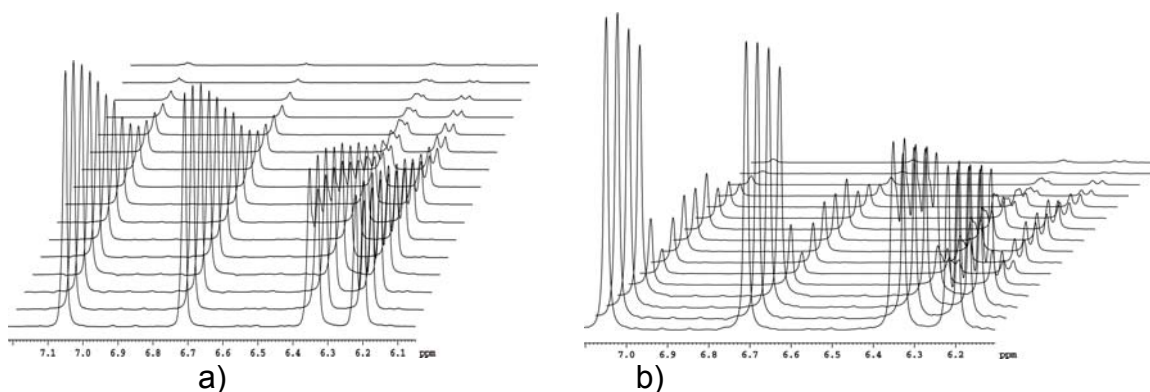


FIGURA 4.15 – Decaimento dos sinais da mistura padrão obtidos a temperatura de 298 K; a) sem o giro da amostra e b) com o giro da amostra

Ao final deste estudo, fica esclarecido que o emprego do giro da amostra só é indicado em experimentos sujeitos às correntes de convecção, pois minimiza os artefatos gerados. Entretanto, o giro é contra indicado nos demais casos, pois introduz artefatos experimentais e prejudica o experimento de DOSY.

4.5.5. Artefatos Gerados pelo Sistema de Desacoplamento em Experimentos de DOSY-HSQC

O sistema de desacoplamento dos sinais de $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ empregado na etapa de implementação dos experimentos de DOSY-HSQC prejudicou significativamente o experimento. Desta forma, para otimizar os experimentos de DOSY-HSQC foi necessário encontrar uma abordagem em que as correlações heteronucleares do experimento HSQC fossem obtidas sem interferir na medida da difusão.

Com este objetivo este estudo analisou três abordagens: a) o emprego do sistema de desacoplamento GARP; b) a ausência de desacoplamento e c) o emprego de pulsos de desacoplamento adiabáticos.

4.5.5.1. Análise de um Experimento de DOSY-HSQC Obtido Com a Seqüência de Desacoplamento GARP

Na etapa da implementação dos experimentos de DOSY-HSQC foi empregada uma seqüência de desacoplamento heteronuclear padrão para experimentos de HSQC: a seqüência GARP (Globally-optimised alternating

phase, rectangular pulse). Esta sequência emprega pulsos compostos para realizar o desacoplamento dos spins de carbono (^{13}C) dos de hidrogênio (^1H).

Os pulsos compostos são um conjunto de pulsos com fase e duração variáveis, cujo resultado corresponde ao mesmo ângulo de rotação de pulso de rf desejado, mas com maior tolerância aos erros. Em seqüências de desacoplamento, os pulsos compostos substituem os pulsos de rf de 180° e fornecem o desacoplamento em uma região espectral maior, sem a necessidade de aumentar excessivamente a potência dos pulsos de rf⁵², o que aqueceria demasiadamente a amostra. Mesmo empregando pulsos compostos, a seqüência GARP permite um aquecimento residual da amostra, que não interfere nos experimentos de HSQC convencionais, mas é suficiente para prejudicar a medida de difusão nos experimentos de DOSY-HSQC.

Devido a este aquecimento, os primeiros resultados com experimentos de DOSY-HSQC não foram totalmente satisfatórios (espectros 15 e 16, páginas A-15 e A-16). O gradiente de temperatura resultante do período de desacoplamento foi suficiente para alterar a curva de decaimento dos sinais (figura 4.16), e as correntes de convecção resultantes fizeram com que os sinais decaíssem totalmente nos primeiros cinco experimentos, apesar de terem sido ajustados para decair ao longo de dez. Esta perturbação inviabilizou a medida de difusão e, em conseqüência, o experimento de DOSY-HSQC.

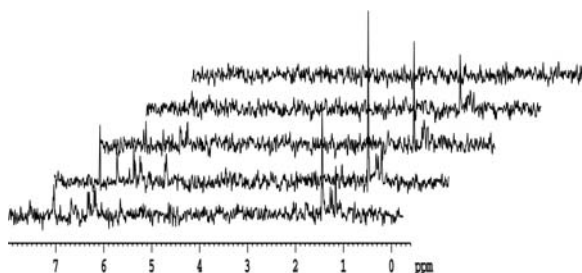


Figura 4.16 – Decaimento dos sinais de hidrogênio retirado de um experimento de DOSY-HSQC realizado com o sistema de desacoplamento GARP.

4.5.5.2. Obtenção de um Experimento de DOSY-HSQC Acoplado

Devido a dificuldades na implementação de pulsos de desacoplamento adiabático, a primeira abordagem para otimizar os experimentos de DOSY-HSQC foi não empregar pulsos de desacoplamento. A aquisição de mais material tornou possível empregar uma mistura padrão mais concentrada, o

que aumentou a relação sinal/ruído (o que contrapõe o efeito causado pelo acoplamento) e a viabilidade do experimento.

O experimento resultante apresentou uma curva de decaimento com um comportamento mais adequado, em que os sinais de hidrogênio (figura 4.17) decaíram exponencialmente ao longo dos dez experimentos ajustados em TDF1.

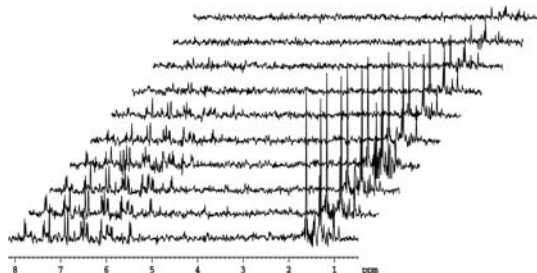


Figura 4.17 - Decaimento dos sinais de hidrogênio retirados de um de experimento DOSY-HSQC acoplado

Apesar da curva de decaimento dos sinais ter apresentado um comportamento satisfatório, o eixo do coeficiente de difusão apresentou uma resolução baixa, permitindo obter separadamente apenas as correlações de HSQC para o composto **1** (espectro 29, página A-29). No entanto, a correlação para o C-11 foi obtida com uma intensidade igual as demais.

4.5.5.3. Pulsos de Desacoplamento Adiabáticos - WURST

Uma abordagem eficaz para obter espectros de HSQC desacoplados e sem aquecer demasiadamente a amostra é empregar pulsos de desacoplamento adiabáticos, como os do tipo WURST⁶⁸. Os pulsos adiabáticos minimizam o aquecimento da amostra porque, ao invés de serem aplicados em uma frequência única, realizam uma “varredura” de frequências. Nesta varredura, o campo de rf efetivo B_{ef} (experimentado pelos spins ao longo do plano +z) traça um arco, que se inicia no plano +z, passa através do plano x-y, (na condição de ressonância) e se finaliza ao longo do plano -z. Quando a varredura das frequências é suficientemente lenta, a condição adiabática é alcançada e a inversão da magnetização ocorre⁵².

Os pulsos do tipo WURST (*Wideband, Uniform Rate and Smooth Truncation*) já foram empregados em experimentos de DOSY-HMQC⁸ para minimizar os artefatos provocados pelo desacoplamento. A implementação de

uma seqüência de HSQC unidimensional (invigsnd1d), especificamente para calibrar as potências de pulsos de desacoplamento, tornou possível ajustar a potência dos pulsos adiabáticos WURST e empregá-los em um experimento de DOSY-HSQC.

Para aumentar a viabilidade de se observar as correlações do composto **2**, foi preparada uma mistura padrão com uma proporção aproximadamente igual para os compostos **1** (8 mg) e **2** (14 mg). Devido sua menor solubilidade em CDCl_3 , nos estudos anteriores o composto **2** (limonina) havia sido empregado em menor proporção na mistura.

O emprego dos pulsos adiabáticos do tipo WURST resultou em uma curva de decaimento dos sinais com um comportamento aproximadamente exponencial (figura 4.18) até o sétimo experimento (dos dez ajustados).

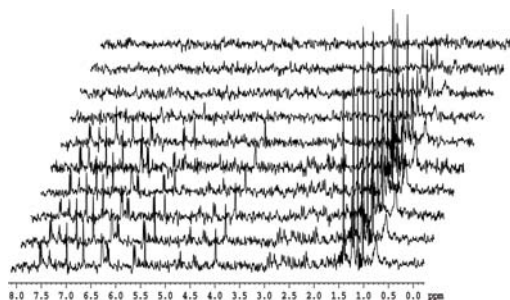


Figura 4.18 – Curva de decaimento dos sinais de hidrogênio retirada de um experimento DOSY-HSQC, onde se utilizou pulsos adiabáticos do tipo WURST.

Apesar de ainda apresentar artefatos gerados pelo aquecimento, o emprego dos pulsos adiabáticos proporcionou uma resolução suficiente para obter espectros de HSQC editados por difusão para os compostos **1** (espectro 30, página A-30) e **2** (espectro 31, página A-31). O emprego de uma amostra com maior proporção do composto **2** também contribuiu para melhorar o resultado.

No espectro de HSQC obtido para a substância **1** são observadas todas as correlações. A correlação para o hidrogênio H-11, que havia sido obtida em uma intensidade muito pequena (espectro 15, página A-15), apresentou intensidade semelhante às demais.

No espectro de HSQC obtido para a substância **2** são observadas as correlações para os carbonos C-1 (δ 80 ppm), C-2 (δ 36 ppm), C-5 (δ 61 ppm) e C-6 (δ 36 ppm), C-9 (δ 48 ppm), C-15 (δ 54 ppm), C-17 (δ 78 ppm), C-18 (δ 21

ppm), C-19 (δ 66 ppm), C-21 (δ 142 ppm), C-22 (δ 110 ppm), C-23 (δ 143 ppm), C-28 (δ 30 ppm), C-29 (δ 21 ppm) e C-30 (δ 18 ppm).

Das três abordagens de desacoplamento de $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ analisadas neste estudo, a que empregou os pulsos de desacoplamento adiabático se mostrou mais apropriada. O aquecimento da amostra provocado pela seqüência GARP inviabilizou o experimento de DOSY e o desdobramento dos sinais de ^1H , causado pelo acoplamento com os núcleos de ^{13}C , diminuiu significativamente a relação sinal/ruído, e também prejudicou a medida da difusão. O emprego de uma proporção aproximadamente equimolar dos compostos **1** e **2** também contribuiu para o aumento da resolução, uma vez que todos os sinais puderam ser ajustados dentro do intervalo dinâmico (a razão entre o maior e o menor sinal detectável no processo de digitalização do FID⁵²).

Neste estudo foi constatado que, além do sistema de desacoplamento, a amostra empregada é um fator primordial para o sucesso de experimentos de DOSY-HSQC. A mistura problema deve apresentar uma grande diferença estrutural entre seus componentes (ou seja, entre seus coeficientes de difusão) e estar concentrada, pois a relação sinal/ruído dos sinais de hidrogênio provenientes de experimentos de HSQC é inerentemente baixa.

4.6. Aplicação de Experimentos de DOSY em Misturas de Produtos Naturais

Com a pesquisa realizada até o momento foi possível implementar e otimizar os experimentos de DOSY, obtendo espectros da maneira apropriada e livre de artefatos. Na etapa final do estudo de DOSY esta experiência foi aplicada em misturas de produtos naturais da ordem Rutales, visando estudar seu potencial como técnica de análise nesse tipo de mistura.

O estudo empregou alguns tipos de misturas para relacionar a eficiência da técnica em relação às diferenças no volume molecular, no número e no grau de sobreposição dos sinais das moléculas em mistura.

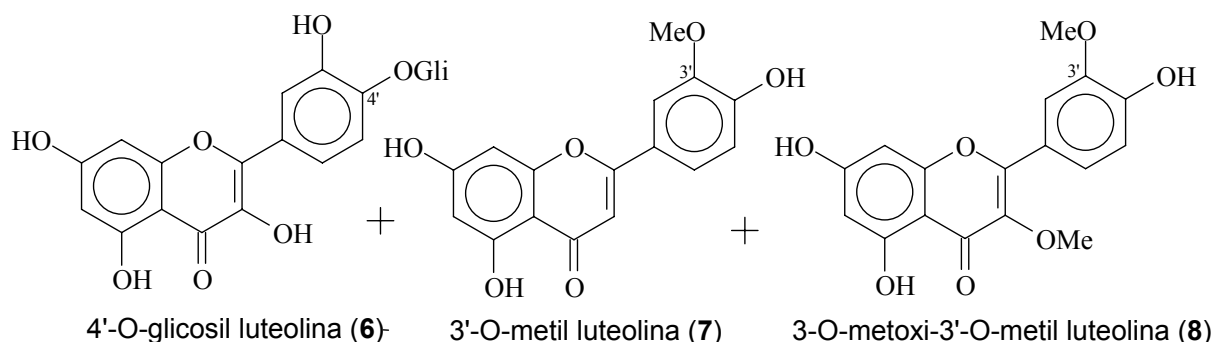


Figura 4.20 – Estrutura dos flavonóides 4'-O-glicol luteolina (**6**), 3'-O-metil luteolina (**7**) e 3-O-metoxi-3'-O-metil luteolina (**8**)

Para analisar se esta diferença entre volumes moleculares fornece coeficientes de difusão distintos o suficiente para serem observados em espectros de DOSY, foram realizados dois experimentos. O primeiro foi realizado empregando-se DMSO- d_6 como solvente e o segundo MeOH- d_4 .

O experimento de DOSY realizado com a mistura em DMSO- d_6 não apresentou sinais distintos para o composto **6** (espectro 33, página A-33). Entretanto, devido à baixa resolução e a grande sobreposição dos sinais de hidrogênio, este experimento não foi considerado conclusivo e o experimento foi refeito com a mistura solubilizada em MeOH- d_4 . A substituição do solvente forneceu uma melhora significativa na resolução dos sinais de hidrogênio, porém não tornou possível diferenciar os coeficientes de difusão dos compostos em mistura (espectro 34, página A-34).

Nesta análise foi possível constatar que a diferença estrutural entre os flavonóides **6**, **7** e **8**, aliada ao elevado grau de sobreposição de sinais, não permite que os sinais de RMN de 1H dos três compostos sejam diferenciados por espectros de DOSY.

4.6.3. Mistura dos Flavonóides Taxifolin (**9**) e um derivado C3-O-glicosilado (**10**)

Para analisar se uma mistura contendo um número menor de compostos poderia apresentar resultados mais satisfatórios, foi realizado um experimento de DOSY em uma amostra (13,7 mg) contendo o flavononol taxifolin (**9**) e um derivado C3-O-glicosilado (**10**) (figura 4.21).

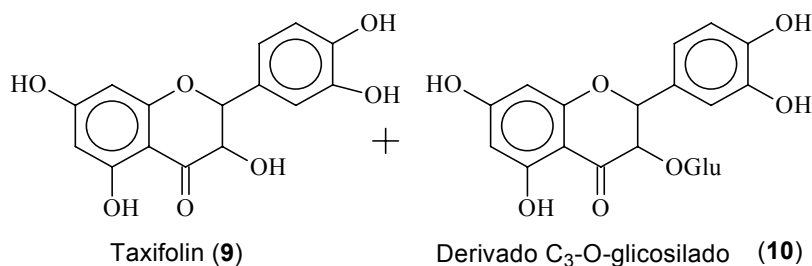


FIGURA 4.21 – Estruturas do flavanol Taxifolin (9) e de um derivado C₃-O-glicosilado (10)

O emprego de uma mistura com menor número de constituintes não forneceu melhorias nos resultados obtidos anteriormente. Novamente não foi possível diferenciar os coeficientes de difusão dos flavonóides 9 e 10 empregando-se um experimento de DOSY (espectro 35, página A-35).

4.6.4. Mistura da Cumarina Linear Xantiletina (1), da Cumarina Angular 5-Metoxiseselina (11) o do Éster Propanoato de Metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil] (12)

Como o grau de sobreposição de sinais se mostrou um fator determinante, buscou-se avaliar se misturas de moléculas com poucas sobreposições de sinais poderiam apresentar resultados mais satisfatórios. Para este fim foi empregada uma amostra (37,6 mg) contendo a mistura de uma cumarina linear, a xantiletina (1), uma cumarina angular, a 5-metoxiseselina (11), e um éster derivado do ácido cinâmico, o propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil] (12) (figura 4.22, tabela 3).

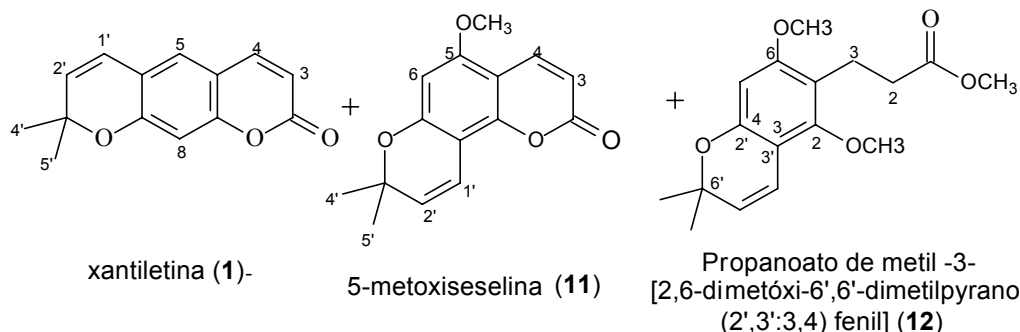


FIGURA 4.22 – Estruturas das cumarinas xantiletina (1), 5-metoxiseselina (11) e do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil] (12)

TABELA 3 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H das cumarinas xantiletina (**1**), 5-metoxiseselina (**11**) e do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6,6'-dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (**12**)

H	Xantiletina ⁶⁵	5-metoxiseselina ⁶⁶	Éster ⁶⁷
	(1)	(11)	(12)
	δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ (ppm) <i>J</i> (Hz)
1'	6,34 <i>d</i> (9,6)	6,79 <i>d</i> (10,0)	
2			2,75 <i>t</i> (7,5)
2'	5,69 <i>d</i> (9,6)	5,57 <i>d</i> (10,0)	
3	6,22 <i>d</i> (9,2)	6,12 <i>d</i> (9,6)	2,87 <i>t</i> (7,5)
4	7,59 <i>d</i> (9,2)	7,95 <i>d</i> (9,6)	
4'	1,46 <i>s</i>	1,46 <i>s</i>	6,49 <i>d</i> (10,0)
5	7,05 <i>s</i>		6,19 <i>s</i>
5'	1,46 <i>s</i>	1,46 <i>s</i>	5,48 <i>d</i> (10,0)
6		6,20 <i>s</i>	
7'			1,42 <i>s</i>
8	6,72 <i>s</i>		
8'			1,42 <i>s</i>
1-OCH ₃			3,68 <i>s</i>
2-OCH ₃			3,73 <i>s</i>
5-OCH ₃		3,89 <i>s</i>	
6-OCH ₃			3,76 <i>s</i>

Com o grau de diferença estrutural e de sobreposição dos sinais de RMN de ^1H obtido para os compostos **1**, **11** e **12** foi possível obter um espectro de DOSY com uma resolução satisfatória (espectro 36, página A-36), onde foi possível correlacionar corretamente a maioria dos sinais de RMN de ^1H com os respectivos coeficientes de difusão.

Traçando-se uma reta na região de δ 8,0 a 5,4 ppm (espectro 37a, página A-37) pode-se distinguir claramente os sinais das três substâncias. Tomando-se como referência o centro do sinal, as correlações dos compostos **1**, **11** e **12** cortam o eixo de difusão em $\log D = -8,84 \pm 0,01$, $-8,90 \pm 0,01$ e $-8,94 \pm 0,01$, respectivamente. Ou seja, a cumarina linear **1** apresentou o coeficiente de difusão maior ($D = 1,44 \pm 0,04 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), seguida pela cumarina angular **11** ($D = 1,26 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) e o derivado do ácido cinâmico **12** ($D = 1,15 \pm 0,02 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), em concordância com o volume molecular espacial que cada molécula ocupa em solução.

Na região de δ 6,20 a 6,18 ppm (espectro 37b, página A-37) houve uma sobreposição parcial de dois singletos das moléculas **11** e **12** (referentes aos

hidrogênios H-6 e H-5, respectivamente), o que fez com que estes sinais apresentassem coeficientes de difusão distintos dos demais sinais.

Na região de δ 3,9 a 1,4 ppm (espectros 38, página A-38) a maioria dos sinais também pôde ser atribuída corretamente. Entretanto, onde ocorreu a sobreposição dos hidrogênios H-4' das cumarinas **1** e **11** (em δ 1,46 ppm), a correlação forneceu um log D intermediário, em $-8,86 \pm 0,01$ ou $D = 1,38 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

O estudo desta mistura comprovou que os experimentos de DOSY podem ser bem sucedidos em mistura de produtos naturais com pouca diferenciação estrutural, entretanto, nas regiões de sinais sobrepostos a análise ainda fica comprometida.

4.6.5. Mistura dos Alcalóides Bis-5-hydroxinoracronicina (**13**) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (**14**)

Para analisar a diferença estrutural necessária para que as sobreposições de sinais não prejudiquem a análise espectral por DOSY, foi realizado um experimento de DOSY em uma amostra (9,3 mg) contendo a mistura de dois compostos com grande diferença de volume molecular; o alcalóide bis acridônico **13** e o alcalóide acridônico preniado **14** (figura 4.23, tabela 4).

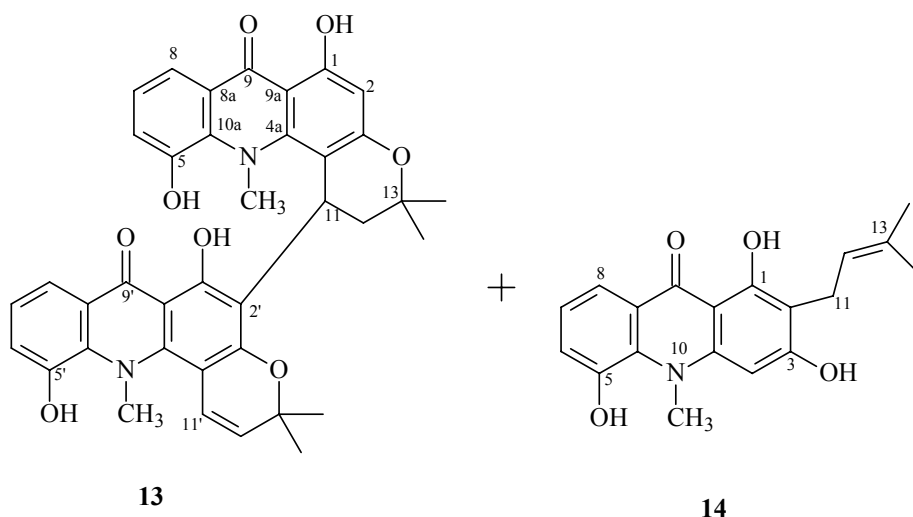


FIGURA 4.23 – Estruturas dos alcalóides bis-5-hydroxinoracronicina (**13**) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (**14**)

TABELA 4 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H dos alcalóides bis-5-hydroxinoracronicina (**13**) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (**14**)

H	Alcalóide 13 ⁷¹		Alcalóide 14 ⁷²	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
1-OH	14,03	1H s	14,25	1H s
2	6,18	1H s		
4			6,31	1H s
6	6,90	1H <i>d</i> (8,0)	7,28	1H <i>d</i> (8,0)
7	6,99	1H <i>t</i> (8,0)	7,16	1H <i>t</i> (8,0)
8	7,60	1H <i>d</i> (8,0)	7,75	1H <i>d</i> (8,0)
10-NCH ₃	3,66	3H s	3,69	1H s
11	5,08	2H <i>dd</i> (7,0; 12,0)	3,53	2H <i>d</i> (6,0)
12	1,96	<i>tl</i> (12,0)	5,40	1H <i>sl</i>
13a-CH ₃	1,56	3H s	1,78	3H s
13b-CH ₃	1,48	3H s	1,69	3H s
1'-OH	15,42	1H s		
6'	7,34	1H <i>d</i> (8,0)		
7'	7,24	1H <i>t</i> (8,0)		
8'	7,87	1H <i>d</i> (8,0)		
10'-NCH ₃	3,58	3H s		
11'	6,41	1H <i>d</i> (8,0)		
12'	5,24	1H <i>d</i> (8,0)		
13'a-CH ₃	1,10	3H s		
13'b-CH ₃	0,40	3H s		

O espectro de DOSY da mistura dos alcalóides **13** e **14** (espectro 39, página A-39) apresentou uma resolução satisfatória, de forma que a maioria dos sinais pode ser correlacionada corretamente. Traçando-se uma reta perpendicular ao eixo do coeficiente de difusão, aproximadamente no centro das correlações, obtém-se os valores de $\log D = -8,98 \pm 0,01$ ($D = 1,05 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) para o alcalóide **13** e de $\log D = -8,85 \pm 0,01$ ($D = 1,41 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) para o alcalóide **14** (espectro 39 e 40, páginas A-39 e A-40).

Nesta mistura, a sobreposição parcial dos sinais não prejudicou a atribuição correta dos coeficientes de difusão. A região de δ 7,22 a 7,30 ppm, por exemplo, apresenta uma sobreposição parcial de um tripleto centrado em δ 7,24 ppm (H-7'), pertencente ao alcalóide **13**, com um dubleto centrado em 7,28 ppm (H-6), pertencente ao alcalóide **14**. Uma expansão do espectro (espectro 41a, página A-41) permite observar que a parte do sinal que não está totalmente sobreposta pode ser correlacionada corretamente, enquanto que a parte

totalmente sobreposta (correlação central) fornece um D intermediário, em $\log D = -8,90$ ou $D = 1,26 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e não permite uma correlação conclusiva.

Ao final deste estudo foi possível constatar que: a) as sobreposições parciais de sinais comprometem a análise em misturas com menor diferença entre seus volumes moleculares, como para o caso das cumarinas **1**, **11** e do éster **12**; b) em misturas de duas moléculas com praticamente o dobro de volume molecular, como é o caso da mistura dos alcalóides **13** e **14**, as sobreposições parciais não prejudicam a análise e c) a sobreposição total dos sinais prejudica a análise mesmo em mistura de moléculas com grande diferença estrutural.

Ao final do estudo foi possível concluir que os espectros de DOSY podem ser empregados como uma ferramenta na discriminação de sinais de RMN de ^1H de produtos naturais em misturas. Entretanto, para que o experimento seja bem sucedido é necessário que as moléculas possuam volumes moleculares distintos e que apresentem poucas sobreposições de sinais.

5. CONCLUSÕES

No estudo com a técnica DOSY constatou-se que é possível empregar espectros de DOSY, DOSY-COSY e DOSY-HSQC no estudo de misturas de substâncias oriundas de produtos naturais. Entretanto, alguns requisitos devem ser observados: inicialmente é necessário adquirir e processar os experimentos de uma maneira adequada, de forma que os experimentos sejam otimizados e que eventuais problemas com artefatos experimentais sejam evitados; finalmente é imprescindível que as substâncias em mistura possuam algum grau de diferenciação estrutural e que apresentem poucas sobreposições entre sinais de RMN de ^1H . A última requisição pode ser eliminada nos experimentos de DOSY-COSY e DOSY-HSQC, embora o emprego de soluções concentradas torne-se imprescindível.

PARTE II

IMPLEMENTAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA HR-MAS EM FOLHAS DE *CITRUS*

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A técnica de RMN HR-MAS ou High Resolution Magic Angle Spinning (“Giro no Ângulo Mágico com Alta Resolução”) é empregada no estudo de amostras semi-sólidas. Ela combina as vantagens típicas de RMN do estado sólido e no estado líquido, pois ao mesmo tempo em que reduz os principais inconvenientes ligados a manipulação da amostra, como ocorre em RMN de sólidos, também fornece uma resolução espectral semelhante à de líquidos⁷³.

A técnica HR-MAS emergiu como uma ferramenta para solucionar dificuldades analíticas da química orgânica de síntese de fase sólida, como a análise direta de moléculas orgânicas solvatadas e presas a resinas na fase sólida, seu emprego possibilitou obter espectros de RMN de amostras heterogêneas e parcialmente fluidas com uma resolução semelhante à de líquidos⁵².

Atualmente a técnica HR-MAS já se tornou padrão para a análise direta de entidades ligadas a resinas^{74,75,76,77,78} e foi estendida para uma série de amostras semi-sólidas, como em tecidos animais^{79,80,81} vegetais^{82,83}, alimentos^{73,84,85}, em moléculas de grande massa molecular^{86,87,88,89,90} e na química combinatorial⁹¹. Também representa uma ferramenta poderosa quando aliada a outras técnicas de RMN^{92,93} ou a técnicas de análises matemáticas^{73,84,85}.

O principal requisito para uma amostra ser considerada semi-sólida é que as moléculas tenham algum grau de mobilidade. No caso de uma resina como um sólido puro ou um polímero, a mobilidade necessária é alcançada quando um solvente é adicionado para inchar a amostra. Esta condição já é satisfeita para tecidos animais e vegetais, pois a água contida nas células permite uma certa mobilidade dos metabólicos, fazendo com que uma folha fresca, por exemplo, possa ser analisada *in natura* através da técnica de HR-MAS.

A técnica HR-MAS também possui a vantagem de ser muito sensível, possibilitando detectar componentes com concentração abaixo de 1 μM em uma mistura⁹⁴. Ela requer, por exemplo, poucos minutos para registrar sinais de RMN de ^1H de compostos presentes em material vegetal em poucos microgramas⁸². Além disso, desde que a sonda de HR-MAS possua em sua configuração um gradiente de campo magnético, é também possível realizar a maioria dos experimentos bidimensionais convencionais com exatamente as

mesmas seqüências de pulsos empregadas em RMN de líquidos. O consumo de tempo e a resolução resultante também são comparáveis⁸³.

6.1. Princípios da Técnica HR-MAS

Quando amostras semi-sólidas são analisadas usando a RMN, a resolução espectral é severamente limitada por fatores relacionados ao movimento molecular restrito, tais como o acoplamento dipolar e o deslocamento químico anisotrópico. A heterogeneidade física também contribui para o alargamento dos sinais e o aumento do tempo experimental^{94,52}.

A base da técnica HR-MAS é a redução drástica das larguras de linha e o aumento significativo da qualidade do espectro produzido pelo giro rápido no ângulo de 54,74°. Quando uma amostra semi-sólida é girada no ângulo mágico em velocidades altas (de 3 a 5 KHz), os efeitos do acoplamento dipolar e do deslocamento químico anisotrópico são drasticamente diminuídos, assim como os efeitos da diferença de susceptibilidade magnética na amostra^{83,95}.

6.1.1. Acoplamento Dipolar

O acoplamento dipolar (D) consiste no fenômeno no qual os spins nucleares interagem magneticamente através do espaço, ou seja, sem o intermédio de nenhum outro átomo ou de elétrons⁹⁶. O efeito do acoplamento dipolar depende da posição relativa entre dois núcleos. Em uma determinada posição, o campo magnético gerado pelo *spin* de um núcleo pode reforçar (vetores no mesmo sentido) ou diminuir (vetores no sentido oposto) a força campo magnético aplicado que o núcleo vizinho está sujeito⁹⁵. Este campo magnético flutuante no qual os spins ficam sujeitos (B_{loc}) implica na obtenção de uma extensa banda de freqüências para um único núcleo.

O efeito do acoplamento dipolar é dependente do movimento rotacional das moléculas que estão interagindo e do conseqüente tempo do campo flutuante ao qual estão sujeitos. Em amostras que possibilitam o movimento molecular livre (como em líquidos não viscosos), o movimento molecular rápido e isotrópico das moléculas faz com que os efeitos do acoplamento dipolar sejam anulados⁹⁵. Em amostras semi-sólidas a mobilidade molecular é restrita, o que faz com que os efeitos dos acoplamentos dipolares sejam observados nos espectros.

6.1.2. Deslocamento Químico Anisotrópico

O deslocamento químico de um determinado núcleo é produzido pelos elétrons que o blindam em relação ao campo magnético aplicado. Como a distribuição eletrônica em ligações químicas é inerentemente não simétrica ou anisotrópica, o campo magnético experimentado pelo núcleo (e seu deslocamento químico) também se torna anisotrópico, ou seja, dependente da orientação da ligação em relação ao campo magnético estático (\mathbf{B}_0)⁵².

O movimento aleatório da molécula em solução faz com que apenas uma única frequência média – a frequência isotrópica - seja observada para cada local distinto quimicamente. Já em amostras com restrição de movimento são observados deslocamentos químicos diferentes para núcleos correspondentes, produzidos devido às diversas orientações das moléculas em relação ao campo magnético principal (\mathbf{B}_0). Este fenômeno origina os deslocamentos químicos anisotrópicos.

6.1.3. Tempo de Relaxação dos Spins Nucleares

Como a movimentação molecular é fundamental no processo de relaxação, a restrição do movimento molecular que ocorre em amostras semi-sólidas interfere diretamente nos tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) dos núcleos⁵².

A relaxação longitudinal T_1 (ou spin-rede) é o processo de perda de magnetização, ou de retorno à posição de equilíbrio, que ocorre ao longo do eixo z, sendo a energia transmitida ao meio ambiente na forma de aquecimento⁵². Uma vez que a emissão natural desta energia é muito lenta, ela deve ser estimulada através dos campos magnéticos oscilantes que cercam os spins. Quando esta oscilação ocorre na frequência correta, na frequência de Larmor, a energia térmica é dissipada e a relaxação longitudinal (T_1) ocorre⁹⁶.

O requerimento fundamental para a relaxação longitudinal de um núcleo com spin meio é a presença de um campo magnético flutuante dependente do tempo na frequência de Larmor. Quando o movimento molecular é restringido, torna-se mais difícil para os campos magnéticos oscilantes alcançar a frequência de Larmor e a velocidade de relaxação longitudinal diminui⁵².

A relaxação transversal T_2 (ou spin-spin) é o processo de perda de magnetização que ocorre no plano x - y . Ela ocorre devido às perdas de coerência de fase dos vetores de magnetização quando os spins estão sujeitos a campos magnéticos diferenciados. Tal diferença no campo magnético é causada, principalmente, pela falta de homogeneidade do campo magnético estático (\mathbf{B}_0) ou pelos campos magnéticos locais (\mathbf{B}_{loc}), que são oriundos das interações intra e intermoleculares na amostra.

Para a maioria dos núcleos com spin meio e com um movimento molecular rápido (por exemplo, de moléculas pequenas e em soluções não viscosas) é principalmente a falta de homogeneidade de \mathbf{B}_0 que contribui para a relaxação transversal. Já em moléculas com movimento molecular restrito, são as interações moleculares as maiores responsáveis pela relaxação transversal e para o conseqüente alargamento das linhas de ressonância⁵². Muito embora, a heterogeneidade física em amostras semi-sólidas também possa contribuir para o alargamento dos sinais devido à diferença de suscetibilidade magnética na região da bobina.

6.1.4. O Giro no Ângulo Mágico

A diferença entre os campos magnéticos locais (\mathbf{B}_{loc}) experimentados por spins nucleares equivalentes é o que faz com que o acoplamento dipolar contribua para o alargamento dos sinais. Os campos magnéticos locais estão relacionados ao momento magnético dos spins segundo a equação $\mathbf{B}_{loc} = \pm \mu_S r_{IS}^{-3} (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1)$, onde o \mathbf{B}_{loc} corresponde ao campo magnético local experimentado por um núcleo I e gerado por um núcleo S, μ_S ao momento magnético do núcleo S, r_{IS} à distância intermolecular, θ ao ângulo entre o vetor intermolecular e o campo \mathbf{B}_0 e o sinal \pm à orientação dos spins em relação ao campo aplicado⁹⁵.

Assim como o acoplamento dipolar, o deslocamento químico anisotrópico também é dependente de $3 \cos^2 \theta - 1$, sendo θ o ângulo entre o campo magnético \mathbf{B}_0 e o eixo principal em que o deslocamento químico é definido⁹⁵. Quando θ é igual a $54,74^\circ$, o termo $3 \cos^2 \theta - 1$ torna-se zero, portanto se a amostra for girada a $54,74^\circ$ (o ângulo mágico) em relação ao campo magnético principal (\mathbf{B}_0), os efeitos do acoplamento dipolar e do deslocamento

químico anisotrópico podem ser eliminados, assim como os da descontinuidade da susceptibilidade magnética e dos tempos de relaxação.

Para que a rotação no ângulo mágico supere totalmente os efeitos do deslocamento químico anisotrópico, a frequência de rotação deve ser ao menos comparável ao deslocamento por anisotropia⁹⁵ (em torno de 5 KHz para amostras semi-sólidas).

6.1.5. Condições Experimentais para Realização de Experimentos de HR-MAS

Os experimentos de HR-MAS não requerem potências elevadas ou as técnicas especiais usadas em NMR de sólidos verdadeiros⁹⁴. A configuração necessária para o espectrômetro é a mesma empregada em RMN de líquidos, inclusive as mesmas seqüências de pulsos. Os únicos equipamentos adicionais necessários para realizar experimentos de HR-MAS são uma sonda específica e uma unidade pneumática, que possibilita girar a amostra com a frequência necessária (em torno de 5 KHz). Para aumentar a homogeneidade de B_0 e a estabilidade do giro são empregados também rotores e acessórios específicos para o preparo da amostra, que a conferem uma geometria esférica.

Para realizar experimentos de HR-MAS com gradiente de campo é necessário que a sonda de HR-MAS seja equipada com uma bobina geradora de gradiente. Em sondas de HR-MAS o campo aumenta ao longo do ângulo mágico e é uniforme através de cada plano perpendicular ao eixo de rotação. Este arranjo permite que o gradiente não seja modulado pela rotação da amostra⁸⁰.

6.2. Aplicação da Técnica HR-MAS na Análise de Materiais Vegetais

Por ser essencialmente uma amostra semi-sólida, as células vegetais possuem uma movimentação molecular que possibilita sua análise direta por HR-MAS. Os primeiros trabalhos empregando-se HR-MAS em material vegetal datam do final da década de noventa.

Em 1.997, Gil *et al.*⁹⁰ apresentaram o primeiro experimento bidimensional com MAS envolvendo material vegetal; proteínas de trigo hidratadas. Os espectros de MAS 2D foram obtidos com uma resolução alta o

suficiente para possibilitar o assinalamento espectral correto e a extração de informações conformacionais úteis.

Em 1.998, Broberg *et al.* ilustraram a utilidade da técnica HR-MAS como uma ferramenta analítica no estudo do metabolismo e de compostos de baixa massa molecular em algas vermelhas⁸². Posteriormente, em 2.000, identificaram e quantificaram alguns metabólitos de baixa massa molecular⁸³.

Ainda em 1.998, Sacco *et al.*⁷³ iniciaram o emprego da técnica em alimentos ao realizar experimentos de ^1H HR-MAS em amostras de farinhas de trigo. Em 2.000 Gil *et al.*⁸⁴ utilizaram espectros de HR-MAS para a análise das variações composicionais durante o amadurecimento de mangas, empregando frutas intactas.

6.2.1. Emprego da Seqüência CPMG

Quando o objetivo da análise de materiais vegetais for observar os sinais de moléculas pequenas, torna-se necessário eliminar os sinais provenientes dos componentes rígidos de membranas e da parede celular, que possuem tempos curtos de relaxação transversal (T_2) e fornecem sinais alargados.

A seqüência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill, figura 6.1) pode ser empregada para eliminar os sinais provenientes de moléculas com T_2 curto e possibilitar a análise dos sinais de moléculas menores. Esta seqüência faz com que a magnetização seja mantida no plano x-y através de sucessivos pulsos de 180° , seguidos por intervalo de tempo τ , até que os spins com valores menores de T_2 tenham relaxado. O espectro é então adquirido contendo apenas as ressonâncias de interesse.

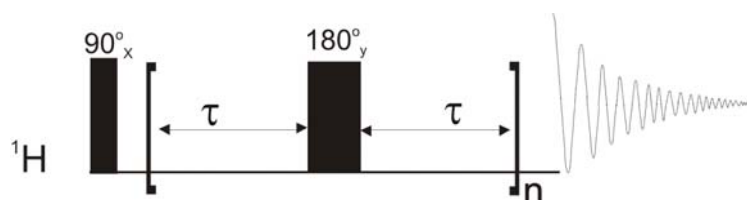


Figura 6.1. Seqüência de pulsos CPMG

6.3. Análise Quimiométrica em Dados de HR-MAS

A quimiometria é uma área da química que emprega métodos estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos e extrair o máximo de informação analisando dados químicos⁹⁷.

A HR-MAS é uma ferramenta atrativa para análises quimiométricas de amostras semi-sólidas, uma vez que é uma técnica sensível, fornece espectros com boa resolução e uma grande quantidade de informações em uma única medida rápida. Em 1998, Sacco *et al.*⁷³ aplicou a análise quimiométrica em dados espectrais de ¹H HR-MAS para a determinação da origem geográfica de amostras de farinhas de trigo. O emprego da técnica mostrou-se altamente factível por não necessitar de nenhum pré-tratamento (o que permite a melhor reprodutibilidade dos resultados), despende pouco tempo experimental e principalmente por garantir uma resolução suficiente para distinguir mais de oitenta picos. Posteriormente, espectros de ¹H HR-MAS também foram aplicados na caracterização de variedades e determinação da origem geográfica de semolina de trigos produzidos em diferentes regiões da Itália⁸⁵.

Dentre as técnicas quimiométricas mais utilizadas em conjunto com a RMN está a análise exploratória de dados e a classificação de amostras. A primeira mais comumente representada pelas análises por PCA (Principals Component Analysis) e a segunda por SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy)⁹⁸.

6.3.1. Análise Exploratória de Dados

A análise exploratória de dados se destina a agrupar amostras que possuam determinadas características em um mesmo grupo e distinguí-las das amostras com características diferentes. Ela também auxilia na identificação de amostras não usuais ou que não seguem o padrão das demais (também chamados de *outliers*).

Em uma análise exploratória, algoritmos matemáticos reduzem os conjuntos de dados grandes e complexos para conjuntos de interpretação mais simples. Estes cálculos apontam as informações importantes em poucas variáveis derivadas do conjunto de dados originais, como as correlações existentes entre amostras e/ou variáveis independentes⁹⁹.

Através de uma análise exploratória é possível checar a qualidade dos dados originais (por ex. checar a presença de amostras que não seguem um determinado padrão); determinar seu conteúdo de informação (por ex. determinar as informações mais relevantes) e localizar com precisão as medidas chaves (por ex. quais variáveis definem melhor algum grupo)⁹⁹. Por isso, ela é geralmente empregada quando não há conhecimento no que diz respeito a tendências, grupos ou relações⁹⁸.

O primeiro passo para toda análise multivariada é a definição do problema, que começa por determinar a natureza do trabalho; se é um problema exploratório, de classificação ou uma combinação destes fatores. O segundo passo é conhecer o melhor possível sobre os procedimentos que originaram os dados, por exemplo: como e quando eles foram gerados; se existe alguma informação prévia pertinente (por ex. como as amostras foram estocadas); se as medidas mais recentes são diferentes das realizadas anteriormente; se o desempenho instrumental variou durante o processo de aquisição da amostra, etc.

Os dados geralmente são organizados em um único arquivo, ou seja, uma única matriz original \mathbf{X} . A matriz \mathbf{X} é construída por n amostras e m variáveis ($n \times m$), construindo uma matriz de dados onde cada amostra corresponde a uma linha e cujos elementos são os valores das variáveis medidas. Em um conjunto de dados de RMN, as amostras são os espectros e as variáveis são os pontos em que o espectro foi processado (SI).

Após os dados terem sido organizados em uma matriz, é possível realizar a visualização dos dados brutos. A visualização dos dados em conjunto pode apontar características importantes, muitas vezes parte da informação desejada pode ser obtida pela simples análise visual dos espectros.

Antes de realizar a análise exploratória em dados de RMN é importante atribuir o mesmo peso para todas as variáveis, caso contrário os picos mais intensos do espectro irão mascarar a influência dos sinais menos intensos e a análise poderá ficar comprometida. Por isso, usualmente os dados de RMN são auto-escalados⁹⁸ antes do início da análise exploratória.

Efetuada estas primeiras etapas, inicia-se a análise exploratória propriamente dita, que pode ser realizada através da análise de agrupamentos

hierárquicos ou HCA (Hierarchical Cluster Analysis) ou da análise dos componentes principais ou PCA (Principal Component Analysis).

6.3.1.1. Análise de Agrupamentos Hierárquicos – HCA

O principal objetivo da HCA é apresentar os dados de maneira que se enfatize o agrupamento natural, o que pode focar amostras ou variáveis. O agrupamento de amostras revela similaridades entre as amostras, enquanto o agrupamento das variáveis localiza as relações entre variáveis. Os dados são apresentados na forma de dendogramas, o que facilita o reconhecimento de tais categorias.

6.3.1.2. Análise de Componentes Principais – PCA

A Análise de Componentes Principais é uma ferramenta de visualização poderosa, assim como a HCA, ela pode representar relações entre amostras e entre variáveis, mas também fornece um meio de reduzir a dimensionalidade dos dados. Ou seja, é um método de transformar dados complexos e ressaltar as informações mais relevantes, por isso é usualmente mais empregada em dados de RMN para auxiliar a visualização de fenômenos e/ou tendências em conjuntos de espectros que não são óbvios a olho nu⁹⁸. A técnica tenta melhorar a visualização destas informações agrupando as variáveis que estão altamente correlacionadas em novas variáveis chamadas de Componentes Principais.

As Componentes Principais (PCs) reduzem a dimensionalidade de um conjunto de dados de forma que as informações relevantes fiquem condensadas nas primeiras componentes principais e as irrelevantes ou aleatórias nas últimas⁹⁹. Estes novos eixos são ortogonais entre si (completamente não correlacionadas) e construídos em ordem decrescente da quantidade de variância que descrevem. Sendo assim, a primeira componente principal (PC1) descreve maior variância do que as componentes subseqüentes (PC1 > PC2 > PC3...). A variância está relacionada com a quantidade de informação dos dados originais que é descrita pelas componentes principais.

Um objeto concreto pode ser empregado para exemplificar como são determinadas as componentes principais de um conjunto de dados. Se as idéias de um eixo de variâncias máximas e reduções da dimensionalidade forem

aplicadas a um apagador, por exemplo, o comprimento do apagador seria sua primeira componente principal (PC1), pois é o eixo que detém o maior número de informações sobre o objeto (variância máxima). O segundo eixo (perpendicular ao primeiro) seria o da largura do apagador e corresponderia a segunda componente principal (PC2). Finalmente, o terceiro eixo (perpendicular aos dois primeiros) seria relativo a altura do apagador e corresponderia a terceira componente principal (PC3).

Por conseguinte, se um apagador fosse reduzido a uma visão planar, a visão superior (PC1 x PC2, figura 6.2a) seria a mais informativa, seguida das visões lateral (PC1 x PC3, figura 6.2b) e frontal (PC2 x PC3, figura 6.2c). Sendo assim, o gráfico da variância versus componentes principais permite determinar o número de componentes principais necessário para descrever uma certa percentagem do sistema em estudo.

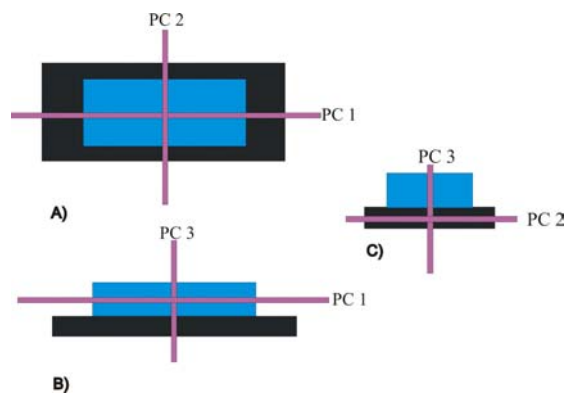


Figura 6.2 – Visão de um apagador em perspectivas baseadas em suas componentes principais: a) visão superior, PC1 x PC2; b) visão lateral, PC1 x PC3 e c) visão frontal, PC2 x PC3

6.3.1.2.1. Gráfico de Escores e de Pesos

Quando uma matriz de dados originais (\mathbf{X}) é decomposta pelo PCA, resulta no produto de duas outras matrizes, a matriz de escores S (de *scores*) e a transposta da matriz de pesos L (de *loadings*): $\mathbf{X} = S \cdot L^T$.

Nos gráficos de escores podemos obter informações importantes a respeito das interações entre as amostras. No gráfico de pesos é possível saber quais variáveis são as mais importantes e que contribuem para cada componente principal.

Como não é possível estudar espectros com muitas dimensões de uma só vez, a informação contida nas componentes principais é visualizada em

subespaços de duas dimensões. Em um gráfico de escores de PC1 versus PC2, por exemplo, todos os espectros são traçados no gráfico como pontos em suas coordenadas ao longo de PC1 e PC2⁹⁸.

Os gráficos de pesos descrevem a relação entre as variáveis no novo espaço do componente principal e o espaço espectroscópico original. Estes gráficos fornecem uma ligação entre a interpretação estatística e espectroscópica dos fenômenos no conjunto⁹⁸.

6.3.2. Classificação de Amostras ou Reconhecimento de Padrões

Quando o objetivo da análise quimiométrica é diferenciar as amostras entre categorias, isso é um problema de classificação ou reconhecimento de padrões. Neste tipo de análise as categorias são agrupadas através da aproximação de amostras que apresentem características em comum conforme determinadas variáveis. A preocupação principal é com qual precisão é possível distinguir entre categorias e quais variáveis são as mais importantes para a distinção.

Dentre os métodos de classificação de amostra, o método SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) é conhecido por sua aplicação no reconhecimento de padrões químicos¹⁰⁰. Neste método, um conjunto de dados com classes conhecidas, chamado de conjunto de treinamento, é submetido a uma análise de componentes principais, em que o número necessário de PCs para descrever cada classe é determinado. As amostras de cada classe ficam contidas em uma hiper-caixa, em que os limites são definidos com o nível de confiança desejado⁹⁷.

O conjunto de dados de treinamento é então empregado como modelo para a classificação de amostras cujas classes são desconhecidas. Para classificar uma nova amostra, suas propriedades são analisadas em relação a cada classe do conjunto de dados de treinamento. A atribuição da amostra problema em determinada classe é realizada baseando-se na projeção da mesma no espaço dos escores e sua distância das fronteiras da classe em questão. Se os modelos não tiverem poder de discriminação suficiente, a amostra pode ser membro de mais de uma classe. O outro extremo também pode acontecer, quando a amostra é anômala em relação ao conjunto de treinamento, neste caso ela não pertence a nenhuma das classes⁹⁷.

7. OBJETIVOS

A segunda parte da pesquisa foi dedicada à técnica HR-MAS, cujo objetivo principal foi avaliar sua potencialidade quando aplicada diretamente em folhas de *Citrus*. Para isso foram realizados três estudos. No primeiro estudo o objetivo foi avaliar a potencialidade da técnica quanto à distinção entre seis variedades de *Citrus sinensis*, empregando espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS. O segundo estudo teve como objetivo avaliar o emprego de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS na pesquisa por substâncias de defesa em *Citrus sinensis* pé franco oriundas de *Citrus limonea*. O objetivo do terceiro estudo foi realizar experimentos de HR-MAS bidimensionais e avaliar sua potencialidade na determinação estrutural de potenciais substâncias de defesa em folhas de *Citrus spp.*

Nos dois primeiros estudos os dados de RMN de ^1H CPMG HR-MAS foram submetidos a um tratamento quimiométrico, em que técnicas de análise exploratória de dados e de classificação de amostras foram empregadas.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. Equipamentos e acessórios

Todos os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker de 9,4 Tesla, modelo DRX400 (400,13 MHz para frequência do hidrogênio). As medidas de HR-MAS foram realizadas empregando-se uma sonda específica para HR-MAS, equipada com bobinas para a detecção de ^1H e ^{13}C e para gerar gradientes de campo magnético. Uma unidade pneumática e um fluxo de ar comprimido com pressão superior a 6 bar foram empregados para a manutenção do giro da amostra em 5 KHz. As análises foram realizadas em rotores de zircônio de 4 mm de diâmetro externo, equipados com um intercalador hemi-esférico de Teflon.

A figura 8.1 apresenta o rotor e os acessórios empregados no preparo das amostras submetidas à HR-MAS: a amostra fica contida entre a extremidade côncava do rotor (1) e um intercalador hemi-esférico (2). O intercalador possui um orifício para que o excesso de água (ou de amostra) seja expelido, por isso um micro parafuso (3) é rosqueado ao intercalador para fixá-lo

e garantir que a amostra não seja expelida devido ao giro. Uma tampa seccionada (4) é empregada para permitir que o rotor gire com a velocidade e precisão necessária. Um parafuso de colo longo (5) auxilia na inserção e retirada no intercalador. O palito de fósforo, disposto horizontalmente acima do parafuso, foi utilizado como referência às dimensões dos demais objetos da figura.

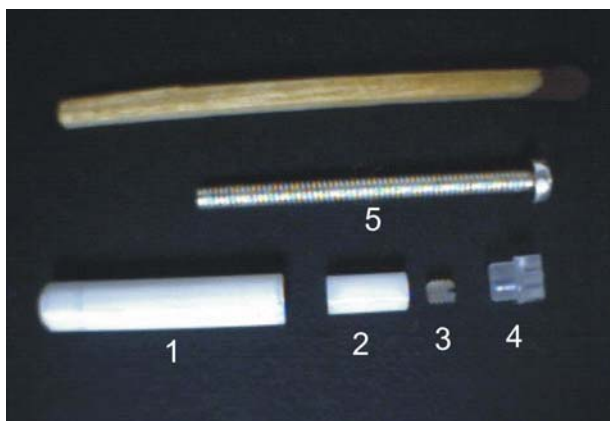


Figura 8.1 – Rotor e acessórios utilizados para o preparo das amostras submetidas à HR-MAS

8.2. Amostras

As folhas das seis variedades de *Citrus sinensis* em estudo foram coletadas no Centro de Citricultura de Cordeirópolis, sendo retiradas de espécimes plantadas na mesma data e de ramos localizados aproximadamente na mesma altura das plantas. Da mesma forma, as folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis pé franco* foram coletadas no mesmo local e com data aproximada de plantio.

Na etapa da implementação da técnica, as amostras foram obtidas a partir de alíquotas retiradas das folhas com o auxílio de um vazador circular, evitando-se coletar as ramificações da nervura central da folha. Para cada folha foram retiradas três alíquotas de um centímetro de diâmetro, que foram repicadas separadamente com um bisturi antes de serem inseridas no rotor. Para cada alíquota foi obtido um espectro de RMN HR-MAS, obtendo espectros em triplicata para cada folha analisada.

A figura 8.2 retrata esquematicamente como as amostras foram preparadas para a medida de HR-MAS. Assim que a amostra foi transferida para o rotor (a), o intercalador hemisférico foi inserido com o auxílio do parafuso de

colo longo (b). Após o excesso de amostra ter sido retirado, o micro parafuso foi rosqueado ao intercalador (c) e a tampa seccionada foi ajustada ao rotor (d).

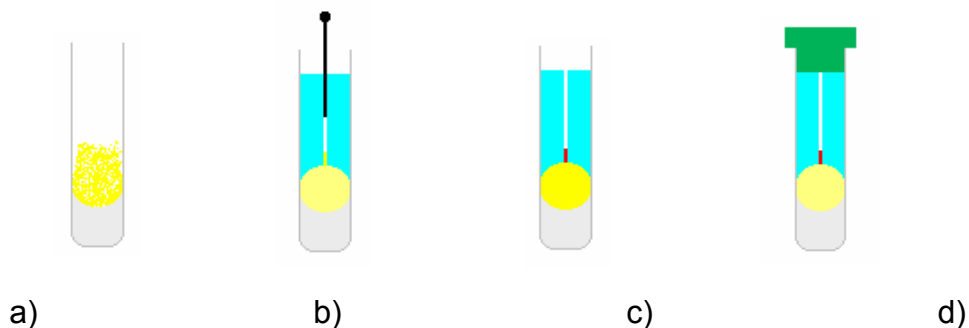


Figura 8.2 – Esquema de preparo de amostras para a técnica HR-MAS

Em todas as amostras foram adicionadas gotas de uma solução de TSPA-d₄ em D₂O (0,5 mg/mL). O sinal fornecido pela substância TSPA-d₄ foi utilizado para a calibração do espectro e para avaliar a qualidade da medida espectral, sendo a resolução espectral medida utilizando a sua largura a meia altura. O solvente deuterado, D₂O, foi empregado para ajustar a homogeneidade do campo magnético principal.

Nas folhas de *Citrus* submetidas à moagem foi utilizado um moinho criogênico da marca spex certiprep, do tipo 6750 Freezer Mill. Foram realizados dois ciclos de moagem. No primeiro ciclo, as amostras foram pré-congeladas e moídas por dois minutos e, após um intervalo de um minuto, elas foram moídas novamente por mais dois minutos.

O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado com dois programas específicos: Pirouette, versão 2.7 e Amix-Viewer (versão 3.14, Bruker, Karlsruhe, 2002).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Implementação da Técnica

O maior requerimento para a implementação da técnica HR-MAS foi relacionado ao desenvolvimento de um método de preparo de amostra (relatado em materiais e métodos) e à implementação dos equipamentos responsáveis pelo funcionamento da técnica, que inicialmente constou de: uma unidade de controle pneumática para o giro do ângulo mágico, injeção e ejeção da amostra e de um compressor de ar com potência suficiente para manter uma pressão estável em 6 Bar.

9.2. Obtenção dos Primeiros Experimentos de ^1H HR-MAS

9.2.1. Emprego da Seqüência CPMG nas Folhas de *Citrus*

Para analisar moléculas pequenas em folhas frescas de *Citrus* é necessário que alguns sinais sejam eliminados, como é o caso do sinal da água e das macromoléculas presentes nas células vegetais. Com este objetivo, todos os experimentos de ^1H HR-MAS foram realizados com filtro de T_2 e com a pré-saturação do sinal da água, utilizando-se uma seqüência de CPMG modificada com a inserção da seqüência zgpr.

A figura 9.1 apresenta dois espectros de HR-MAS obtidos de uma folha de *Citrus* com e sem o emprego da seqüência CPMG. A diferença entre a largura de linha dos sinais obtida nos dois espectros revela claramente a necessidade do uso da seqüência CPMG para se observar sinais de moléculas pequenas.

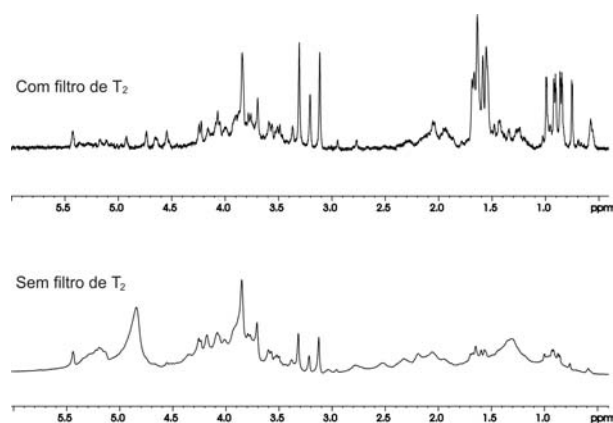


Figura 9.1 – Espectros de RMN de ^1H de HR-MAS de uma folha de *Citrus* obtido com e sem filtro de T_2

9.2.2. Estudo da Classificação de uma Variedade de *Citrus sinensis* Empregando Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS – Experimentos Iniciais

Em determinados casos, a avaliação das características morfológicas de folhas não permite uma classificação inequívoca entre variedades distintas de *Citrus sinensis*. Como a técnica HR-MAS pode ser aplicada diretamente em folhas, ela pode fornecer espectros que contenham informações relevantes o suficiente para discriminar entre variedades de *Citrus* distintas. Para analisar esta possibilidade, foi realizado um estudo que visou a classificação de um espécime de *Citrus sinensis* de variedade não determinada entre uma das seguintes variedades: Pêra, Valência folha lisa, Valência Folha murcha, Natal, Hamlim e Westin.

A primeira etapa do estudo foi analisar se os espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS continham informações suficientes para distinguir as variedades de *Citrus sinensis* e se as informações eram reprodutíveis em uma mesma folha. Para isso foram obtidos espectros em triplicata para cada variedade de *Citrus*, sendo que as amostras foram retiradas de uma mesma folha. Todos os experimentos foram realizados sob as mesmas condições de aquisição e de processamento, que estão apresentados no espectro 1, página B-1.

Na análise dos espectros resultantes (espectros 1 a 7, páginas B-1 a B-4) inicialmente foi averiguado se havia reprodutibilidade entre as triplicatas. Para isso considerou-se o deslocamento químico, a intensidade relativa e a largura de linha dos sinais presentes. Foi observado que, em geral, os sinais de RMN de ^1H estavam presentes em todas as triplicadas e com o mesmo deslocamento químico, mas a largura de linha e a intensidade dos sinais variaram entre a maioria das replicatas.

Para verificar se existia algum padrão de sinais característico, ou *finger prints*, nas variedades de *Citrus* em estudo, um espectro de cada triplicata foi comparado com os demais. A análise dos espectros (espectros 8, página B-5) não identificou nenhum sinal, ou conjunto de sinais, que pudesse relacionar indubitavelmente a amostra de variedade desconhecida com alguma amostra de variedade determinada.

Como as triplicatas dos espectros foram pouco reprodutivas e o número de experimentos realizados foi pequeno, os resultados obtidos não foram

considerados conclusivos. Para finalizar o estudo, em uma etapa posterior, as condições de aquisição dos experimentos de HR-MAS foram otimizadas e novos experimentos foram obtidos.

9.2.3. Estudo da aplicação de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS na correlação entre substâncias presentes em folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco

O isolamento clássico de compostos é empregado em estudos fitoquímicos que almejam encontrar substâncias ou classes de substâncias que expliquem a maior resistência às pragas de espécimes de *Citrus sinensis* enxertadas em *Citrus limonea*, em relação a espécimes *Citrus sinensis* não enxertadas. Como a técnica HR-MAS pode fornecer espectros de RMN diretamente de folhas de *Citrus*, ela é uma ferramenta em potencial para direcionar ou auxiliar o estudo fitoquímico clássico na busca de substâncias específicas.

Para analisar a potencialidade da técnica neste contexto foi realizado um estudo obtendo-se experimentos de RMN de ^1H CPMG HR-MAS diretamente em folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco (*Citrus sinensis* enxertado sobre *Citrus limonea*). O material vegetal foi coletado no mesmo local e com idades e condições de cultivo semelhantes. O procedimento de preparo da amostra foi o mesmo realizado no estudo das variedades de *Citrus*, visto que os dois estudos foram desenvolvidos paralelamente.

As triplicatas dos espectros de *Citrus sinensis* (espectros 10, página B-7) e de *Citrus limonea* (espectros 11, página B-8) apresentaram uma boa reprodutibilidade de sinais. Somente os espectros de *Citrus sinensis* pé franco (espectros 12, página B-8) apresentaram sinais com intensidades distintas, na região de δ 3,0 a 4,3 ppm.

Quando se comparou um espectro de cada triplicata foi observado que na região de δ 4,5 a 4,8 ppm a intensidade dos sinais é diferente para cada *Citrus* e que em δ 0,6 a 1,3 ppm os sinais de *Citrus limonea* são bastante distintos dos sinais de *Citrus sinensis*. Apesar disso, não foram observados sinais

presentes em *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco e ausentes em *Citrus sinensis* que sugestionasse a presença alguma substância de defesa em comum. presentes em *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco e ausentes em *Citrus sinensis* que sugestionasse a presença alguma substância de defesa em comum.

9.3 Otimização dos Experimentos de HR-MAS

A otimização dos experimentos de HR-MAS baseou-se primeiramente na otimização do sistema pneumático, fator primordial para a manutenção do giro na velocidade necessária para se obter espectros reprodutivos e com alta resolução. Além disso, nesta etapa foram avaliadas novas formas de preparo das amostras de *Citrus*, buscando tornar os experimentos mais reprodutivos e a amostragem mais representativa.

9.3.1. Otimização do Sistema Pneumático

A etapa de otimização dos experimentos de HR-MAS foi iniciada com o aperfeiçoamento do sistema pneumático. Um dos problemas que originava a instabilidade do giro foi resolvido com o conserto na unidade pneumática, que vinha apresentando problemas. A substituição de peças defeituosas do compressor de ar e do pressostato por um sistema mais eficiente, possibilitou a manutenção da pressão de ar comprimido entre 6 a 8 bar. Uma válvula reguladora de fluxo foi introduzida próxima a entrada da unidade, para que este se mantivesse constante durante todo o experimento.

Todas estas modificações contribuíram para a otimização do sistema pneumático e para que o giro da amostra permanecesse estável em 5 KHz. Além disso, um sistema de secagem (formado ou uma coluna de vidro contendo sílica gel e peneira molecular) foi inserido no sistema de ar comprimido para desumidificá-lo e manter a unidade pneumática e a sonda livres de umidade.

9.3.2. Otimização do Método de Preparo de Amostras Empregando-se Folhas de Seis Variedades de *Citrus sinensis*

Uma vez ajustado o sistema pneumático, a segunda etapa para a otimização dos experimentos de HR-MAS foi estabelecer um método mais adequado para o preparo das amostras de *Citrus*, uma vez que o sistema

empregado inicialmente não foi muito eficaz quanto a forma de empacotamento da amostra ou quanto a representatividade da amostragem.

Visando a otimização do método de preparo das amostras, tanto quanto à eficiência no empacotamento da amostra no rotor, quanto à representatividade da amostragem, foram avaliados quatro novos métodos, sendo eles: a) por maceração em nitrogênio líquido; b) por moagem em moinho criogênico; c) por amostragem e empacotamento de discos inteiros e d) por amostragem e empacotamento de discos picados.

Nesta etapa do trabalho foram amostradas três folhas de *Citrus* para cada variedade. Como os espectros das triplicatas estão apresentados em um mesmo gráfico, eles foram intitulados de A (posição inferior), B (posição intermediária) e C (posição superior) para facilitar a discussão. A resolução espectral discutida no texto refere-se ao valor da largura de linha a meia altura do sinal da substância padrão (TSPA-d₄).

a) preparo da amostra por maceração em nitrogênio líquido

A primeira tentativa para aprimorar a método de preparo das amostras foi a maceração das folhas em nitrogênio líquido. com este procedimento buscou-se aumentar a representatividade da amostragem e melhorar o empacotamento da amostra através da diminuição do tamanho das partículas de folhas. Para preparar cada amostra uma folha inteira (apenas a nervura central foi retirada) foi macerada em nitrogênio líquido. As fibras remanescentes foram excluídas para não prejudicar o empacotamento da amostra.

Os primeiros experimentos foram realizados visando encontrar uma alíquota de amostra que fornecesse um espectro com uma relação sinal/ruído satisfatória, contudo, sem prejudicar o empacotamento da amostra (espectros 14, página B-10). O espectro A apresentou uma relação sinal/ruído satisfatória, mas uma resolução baixa (16,6 Hz), o que indica que a quantidade de material foi elevada. A resolução dos sinais melhorou com a diminuição da quantidade de amostra (espectro B: 7,4 Hz), entretanto a relação sinal/ruído piorou significativamente. Com 13 mg de amostra, o espectro C apresentou ambos, resolução e relação sinal/ruído satisfatória (6,5 Hz), portanto esta quantidade de amostra foi considerada ideal para ser empregada nas demais medidas.

Apesar do estudo ter encontrado uma quantidade adequada de material vegetal para as alíquotas, o método de preparo de amostras por folhas maceradas não foi considerado satisfatório devido à necessidade da separação manual das fibras.

b) preparo da amostra por moagem em moinho criogênico

Para manter as vantagens observadas com a maceração das folhas e eliminar sua desvantagem (a permanência de fibras), as folhas de *Citrus* foram moídas em moinho criogênico, o que possibilitou pulverizar as folhas frescas.

Com este método de preparo foram realizados três experimentos, empregando-se 13 mg de material vegetal como alíquota. Os espectros resultantes apresentaram resoluções bastante satisfatórias (em torno 3 Hz), entretanto as relações de sinal/ruído variaram significativamente (espectros 15, página B-11). Acredita-se que tal discrepância tenha sido originada pela perda de material durante o preparo das amostras, principalmente quando o intercalador foi inserido no rotor. A diminuição da intensidade dos sinais na região de δ 0,5 a 2,8 ppm também representou uma desvantagem deste método de preparo de amostra. Portanto, apesar de fornecer espectros com resoluções altamente satisfatórias, o método foi considerado inconveniente para este estudo.

c) preparo da amostra por discos inteiros

Na etapa de implementação da técnica, as alíquotas de amostras foram retiradas das folhas na forma de “discos” de 1 cm de diâmetro, portanto representavam apenas uma região da folha. O tamanho das partículas de folhas (que foram picadas manualmente) também dificultou o empacotamento adequado da amostra. Para diminuir estes inconvenientes, avaliou-se um método de preparo de amostras em que seis discos de folhas, com 2,9 mm de diâmetro, são inseridos inteiros e sobrepostos dentro do rotor.

Com esta abordagem buscou-se melhorar a reprodutibilidade dos espectros através do emprego do mesmo empacotamento para todas as amostras. Além disso, a necessidade de diminuir o diâmetro dos “discos” de folhas (de 1 cm para 2,9 mm) apresentou-se como outra vantagem, pois a folha pôde ser amostrada em seis lugares distintos.

Com este método foram analisadas três variedades de *Citrus*: Westin; Natal e Valência Folha Murcha. Os primeiros experimentos foram realizados com folhas da variedade Westin. Os espectros resultantes (espectros 16, página B-11) apresentaram resoluções satisfatórias e uma boa reprodutibilidade entre as triplicatas (espectro A: 6,3 Hz; espectro B: 5,4 Hz e espectro C: 6,7 Hz).

Nos experimentos seguintes, realizados com folhas de *Citrus* das variedades Natal e Valência Folha Murcha, foram constatados problemas no empacotamento das amostras. Em relação às amostras de *Citrus* da variedade Natal (espectros 17, página B-12), foi possível realizar apenas dois experimentos com discos sobrepostos (espectro A: 8,2 Hz e B: 8,4 Hz). No terceiro experimento não foi possível estabilizar o giro da amostra, as folhas tiveram de ser retiradas do rotor e picadas (espectro C: 7,5 Hz). A reprodutibilidade dos espectros finais foi considerada satisfatória.

Os primeiros experimentos realizados com as folhas da variedade Valência Folha Murcha foram realizados com discos de folhas sobrepostos (espectros 18, página B-12). O terceiro experimento teve de ser realizado com a amostra picada, novamente devido a dificuldades na estabilização do giro da amostra. Tanto as resoluções espectrais, quanto a reprodutibilidade entre as triplicatas dos espectros resultantes foram consideradas satisfatórias (A: 4,7 Hz e B: 6,0 Hz, C: 5,8 Hz)

Apesar de ter apresentado resultados satisfatórios inicialmente, este método não se mostrou adequado devido às dificuldades na sobreposição dos discos no rotor.

c) preparo da amostra por discos picados.

Na avaliação anterior, a amostragem realizada com seis discos de 2,9 mm de diâmetro se mostrou apropriada, entretanto, o empacotamento por discos inteiros não. Devido a isso, o preparo das amostras foi realizado com discos de 2,9 mm picados.

Com este método foram realizados experimentos em triplicatas das variedades Hamlim, desconhecida, Pêra e Valência Lisa. O critério de re-empacotamento da amostra ou da repetição do experimento foi largura do sinal do padrão, quando esta se mostrou maior que 10 Hz.

Todos os espectros (espectros 19, página B-13) da variedade Hamlim foram obtidos com resoluções satisfatórias (A: 3,5 Hz; B: 4,3 Hz; C: 6,0 Hz), sem a necessidade de re-empacotar ou refazer as amostras. Entretanto, a reprodutibilidade da relação sinal/ruído para esta triplicata foi menor que as demais. Já os espectros de *Citrus* da variedade desconhecida (espectros 20, página B-13), apresentaram ambas, resoluções (A: 4,3 Hz; B: 4,5 Hz e C: 3,7 Hz) e reprodutibilidade satisfatórias.

Em relação às amostras da variedade Pêra (espectros 21, página B-15) e Valência Folha Lisa (espectros 21, página B-14) alguns experimentos tiveram que ser refeitos para obter as resoluções necessárias (A: 9,8; B: 6,5 Hz; C: 7,1 Hz e A: 8,6; B: 5,4 Hz e C: 8,0, respectivamente). A reprodutibilidade dos espectros foi considerada satisfatória das duas triplicatas.

Ao final desta etapa, foi possível obter espectros em triplicata, obtidos de três folhas distintas para cada variedade de *Citrus*. Os experimentos foram realizados em condições otimizadas, ou seja, com o giro constante e com o controle adequado da resolução dos espectros. Desta forma, os resultados foram mais confiáveis. Entretanto, não foi encontrado um método ideal de preparo de amostra, ou seja, em que: a) um empacotamento adequado da amostra fosse obtido facilmente; b) que propiciasse resolução e relações sinal/ruído satisfatórias e reprodutíveis; c) cuja amostragem representasse toda a folha e d) que não alterasse os sinais. Dentre os métodos avaliados, o último se mostrou mais adequado, pois tornou possível aumentar a representatividade da amostragem e obter espectros com resolução e relação sinal/ruído satisfatórias.

Comparando-se visualmente as triplicatas de todas as variedades, não são observados, a olho nu, padrões de sinais característicos para cada variedade.

9.4. Tratamento Quimiométrico dos Dados de RMN de ^1H CPMG HR-MAS de Seis Variedades de *Citrus sinensis*

Neste trabalho os dados espectroscópicos obtidos para as seis variedades de *Citrus sinensis* foram submetidos a um tratamento quimiométrico, utilizando o software Amix-Viewer (versão 3.1), visando à busca de padrões de sinais característicos para cada variedade.

9.4.1. Análise Exploratória dos Dados

A análise exploratória dos dados foi realizada através da técnica de Análise dos Componentes principais (PCA). Os dados dos espectros obtidos de uma única folhas e de três folhas distintas foram organizados em uma única matriz, composta por 36 espectros (2 tipos de medidas x 3 replicatas x 6 variedades).

No programa Amix-Viewer as variáveis são formadas por *buckets*, que abrangem um determinado conjunto de pontos de dados integrados, cuja largura é ajustável pelo operador. Neste trabalho foram empregados *buckets* com largura de 0,04 ppm. Utilizou-se a soma das intensidades dos sinais como modo de integração e a intensidade total do espectro como modo de escalamento (o valor da integral de cada *bucket* foi dividido pela somatória das integrais de todos os *buckets*).

Nos gráficos de escores as amostras correspondem aos espectros, sendo denominadas pelas letras iniciais e números de 1 a 6, que correspondem as triplicatas da primeira e da segunda fase do trabalho, respectivamente. Alguns experimentos foram repetidos e apresentam uma numeração superior.

Os espectros foram analisados em três regiões distintas: selecionando-se toda a região de sinais (de δ 0,5 a 5,6 ppm), apenas a região alifática (de δ 0,5 a 3,0 ppm) e apenas a região dos açúcares (de δ 3,0 a 5,6 ppm). A região de δ 4,75 a 5,4 ppm, que contém resquícios de sinal da água, não foi incluída nos cálculos. A análise de componentes principais indicou, através do gráfico de escores de PC1 versus PC2 (gráfico 1, página C-1), a região de δ 3,0 a 5,6 ppm como a que possibilita um melhor agrupamento entre as amostras, ainda que os grupos estejam parcialmente sobrepostos.

A análise exploratória dos dados tornou possível constatar que os espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS obtidos de folhas de *Citrus* contêm informações suficientes para agrupar as amostras de uma mesma variedade, sendo a região de δ 3,0 a 5,6 ppm a mais relevante para este agrupamento. Entretanto, através da análise não foi possível selecionar uma região espectral capaz de agrupar todas as amostras de uma mesma variedade de *Citrus* e distingui-las das demais nos gráficos de escores.

9.4.2. Construção de um Modelo de Classificação

Para que a classificação possa ser realizada é necessário que um conjunto de espectros descreva um estado bem definido, sendo assim utilizado como um modelo supervisionado para que outros espectros possam ser testados quanto pertencerem ao modelo ou não, sendo assim classificados. Isso implica que um ou mais modelos de PCA tenham sido construídos e que agora possam ser usados para calcular em qual extensão um novo espectro pode pertencer a um ou outro modelo⁹⁸.

No programa de quimiometria utilizado, a classificação é baseada nos mesmos parâmetros e tabela de *buckets* usada para a análise de PCA⁹⁸, sendo que a amostra pode ser encaixada em quatro possíveis resultados: 1) dentro do modelo (se ajusta bem dentro do modelo); 2) fora do elipsóide de confiança (próxima à margem de 95% de confiança), 3) significativamente fora do espaço do modelo (logo após a linha de 95% de confiança) ou 4) totalmente fora do modelo.

O conjunto de dados resultante da análise de PCA foi empregado como modelo de classificação com o objetivo de classificar as amostras de folha de *Citrus* de variedade desconhecida. Uma vez que na versão atual do programa Amix⁹⁸ pode-se usar somente um modelo por vez para a classificação, foram construídos seis modelos, um para cada variedade. Os espectros da variedade desconhecida foram então submetidos aos modelos de classificação.

Como resultado da análise, os espectros se ajustaram dentro do modelo (resultado 1) em todas as análises, indicando que o conjunto de dados utilizado não foi capazes de distinguir suficientemente as características das variedades de *Citrus* para serem empregados como modelo.

Ao final do estudo da potencialidade da técnica HR-MAS quanto à distinção de variedades de *Citrus sinensis* foi constatado que: a) a análise visual dos espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS de folhas de *Citrus sinensis* não possibilita distinguir entre variedades distintas destes *Citrus*; b) a análise quimiométrica destes dados é capaz de identificar regiões espectrais características entre espectros de uma mesma variedade e c) o agrupamento entre espectros da mesma classe e a distinção entre as classes (amostras de uma mesma variedade) é ainda insuficiente para que os dados obtidos possam ser empregados como um modelo de classificação.

Apesar da análise quimiométrica ter permitido um maior refinamento na pesquisa por *finger prints* nos espectros analisados, os resultados indicaram que os espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS obtidos não fornecem informações suficientes para distinguir entre variedades distintas de *Citrus sinensis*.

9.5. Obtenção de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS em folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco

Esta etapa do trabalho visa confirmar os resultados obtidos anteriormente para no estudo de folhas *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco (ou seja, *Citrus sinensis* enxertado em *Citrus limonea*) através da obtenção de um número maior de experimentos e de um tratamento quimiométrico dos dados obtidos.

9.5.1. Obtenção de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS otimizados

Nesta etapa do trabalho foram obtidas duas triplicatas de espectros de RMN de ^1H HR-MAS para cada *Citrus*, já nas condições experimentais otimizadas. A primeira triplicata foi obtida de três folhas distintas de cada *Citrus* e a segunda de seis. Na primeira triplicata cada amostra foi preparada com seis discos (de 2,9 mm de diâmetro) de folhas, que foram retirados de uma mesma folha e em seguida picados.

Os espectros resultantes (espectros 23 a 25, páginas B-15 e B-16) obtiveram resoluções satisfatórias para os três *Citrus*; *sinensis* (A: 7,8 Hz; B: 7,3 Hz e C: 4,5 Hz), *limonea* (A: 5,0 Hz; B: 5,8 Hz e C: 4,7 Hz) e *sinensis* pé franco (A: 6,2 Hz; B: 7,9 Hz e C: 6,7 Hz). A reprodutibilidade das triplicatas em relação às intensidades dos sinais foi menor que a observada anteriormente. Isto é compatível com o fato que, ao invés de uma, três folhas distintas foram amostradas. Apesar disto, as triplicatas mantiveram o mesmo padrão de sinais.

Na segunda triplicata a amostragem foi realizada em seis folhas distintas para cada *Citrus*. Para que a amostragem fosse mais representativa todas as folhas foram picadas individualmente, sendo 1/8 de cada folha

reservada. Todo o material reservado foi reunido e três alíquotas, de 13 mg cada, foram retiradas e empregadas como amostras.

Os espectros (espectros 26 a 28, páginas B-17 a B-18) das triplicatas de seis folhas de *Citrus sinensis* (A: 4,5 Hz; B: 6,7Hz e C: 4,9 Hz), de *Citrus limonea* (A: 5,6 Hz; B: 5,0 Hz e C: 3,9 Hz) e de *Citrus sinensis* pé franco obtiveram resoluções satisfatórias (A: 4,8 Hz; B: 7,8 Hz e C: 6,7 Hz).

A reprodução da intensidade dos sinais obtida para as três triplicatas foi menor que para as triplicatas anteriores. O que pode ter sido ocasionado pela maior representatividade da amostragem (uma vez que a alíquota foi retirada de seis folhas) e ao tamanho das partículas de folhas. Provavelmente, se as folhas estivessem moídas a reprodutibilidade entre as triplicatas seria maior.

9.6. Análise Exploratória de Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS de folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco

Como a análise exploratória de dados pode evidenciar eventuais regiões espectrais em comum entre *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco espectros, que não tenha sido observada pela análise visual, os dados espectroscópicos obtidos no estudo anterior foram submetidos a uma análise de PCA e de HCA.

As triplicatas dos espectros foram organizadas em uma única matriz, contendo 16 K pontos reais cada. No programa de quimiometria utilizado (Pirouette), o número de pontos empregados no processamento do espectro corresponde ao número de variáveis. Após a remoção das regiões de ruídos, a matriz de dados original se tornou uma matriz de 28 x 920, contendo 920 variáveis (pontos de dados) e 28 amostras (espectros). Para que todos os sinais espectrais tivessem o mesmo peso, independente da área do sinal, todos os espectros foram auto-escalados.

Apesar do reduzido número de pontos utilizado no processamento, no gráfico das variáveis versus matriz \mathbf{X} reconstruída (gráfico 2, página C-1), pode ser observado claramente que o número de pontos empregados foi suficiente para representar corretamente todos os sinais dos espectros.

A análise exploratória foi realizada inicialmente com a análise de PCA. Nos gráficos resultantes, as amostras de *Citrus sinensis*, *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco, estão denominadas como *lasem*, *limão* e *laenx*. Os números que acompanham os nomes correspondem, em ordem crescente, às triplicatas da primeira, segunda e terceira fase do trabalho. A classe *lasem* (*Citros sinensis*) apresenta dez amostras porque a análise exploratória também foi utilizada para evidenciar, dentre dois espectros aparentemente anômalos, qual se comporta como *outlier*.

O primeiro processamento foi realizado com os dados totais (toda a matriz **X**). O gráfico de escores de PC1 versus PC4 resultante (gráfico 3, página C-2) resultou em um bom agrupamento das amostras de *Citrus limonea*, *Citrus sinensis* pé franco e *Citrus sinensis*. Ou seja, empregando-se todas as variáveis, as regiões espectrais, foi possível distinguir os três grupos de *Citrus*.

Por esta simples análise pode-se observar que espectros de RMN de ^1H de HR-MAS de folhas de *Citrus limonea*, *Citrus sinensis* pé franco e *Citrus sinensis* fornecem com informações suficientes para distingui-los entre si. Entretanto, para que os sinais, ou grupo de sinais, responsáveis por esta característica sejam evidenciados é necessário fazer uma seleção de variáveis.

No programa utilizado, esta análise pode ser realizada empregando-se gráficos específicos que indicam a importância de cada variável, como os gráficos de poder de modelagem e de pesos. No gráfico de pesos as variáveis estão dispostas segundo seu peso para a formação dos componentes principais, se a variável não é importante seu peso é próximo a zero, portanto ela também pode ser excluída. O gráfico de poder de modelagem qualifica as variáveis segundo sua capacidade de modelar os grupos, as que tem baixo poder de modelagem se localizam perto de zero e pouco contribuem. Por isso, elas podem ser excluídas sem prejudicar a análise.

A seleção de variáveis foi inicialmente realizada pelo gráfico de poder de modelagem, em que as variáveis de poder menor (de 0 a 0,5) foram excluídas (gráfico 4, página C-2). Uma segunda seleção de variáveis foi realizada empregando-se o gráfico de pesos dos componentes principais PC2 e PC3, em que as variáveis com pesos próximos a zero foram excluídas (gráfico 5, página C-3).

É esperado que, após a eliminação das variáveis de menor contribuição, uma nova análise de PCA resulte em um agrupamento melhor entre as amostras e que apenas as variáveis importantes para este agrupamento permaneçam. Este comportamento foi observado para o espectro de escores (gráfico 6, página C-3) resultante após a seleção de variáveis. Além de estarem mais agrupados, a quantidade de informação sobre os dados originais se concentrou nos primeiros PCs, representando, com apenas três componentes principais, aproximadamente a mesma porcentagem de informação anteriormente representada por quatro componentes.

Muitas vezes a análise de componentes principais também evidencia amostras com comportamento anômalo; as amostras *outliers*, que prejudicam o agrupamento das demais amostras. Se a amostra for realmente uma *outlier*, ao ser retirada do conjunto de dados o agrupamento das demais amostras se tornará melhor.

No gráfico de escores obtido após seleção de variáveis (gráfico 6, página C-3) a amostra *larsem4* parece se comportar como uma *outlier*, por isso ela foi retirada do conjunto de dados e a análise de PCA foi refeita. O novo conjunto forneceu um gráfico de escores de PC1 versus PC3 com um excelente agrupamento entre as classes de *Citrus* (gráfico 7, página C-4).

Ao ser submetida a uma análise hierárquica de agrupamentos (HCA), a matriz de dados ofereceu o agrupamento correto para todas as amostras (gráfico 8, página C-4), o que corrobora com os resultados obtidos com o PCA.

As regiões espectrais que mais contribuíram para o agrupamento entre as amostras são as regiões amarelas, nos gráficos 9 e 10 (página C-5), que representam o índice de variáveis versus resposta. Nos espectros de hidrogênio estas regiões correspondem às regiões de δ 4,5 a 4,8 ppm e de δ 1,3 a 0,65 ppm.

Ao final do estudo da potencialidade da técnica HR-MAS como uma ferramenta para direcionar ou auxiliar o estudo fitoquímico clássico na busca de substâncias de defesa, foi constatado que: a) na análise visual dos espectros podem ser observadas regiões espectrais características nos três *Citrus*, b) a análise quimiométrica confirma a presença e identifica as regiões espectrais responsáveis pelo agrupamento de amostras de *Citrus limonea*, de *Citrus sinensis* e de *Citrus sinensis* pé franco; c) os espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS das folhas dos *Citrus* analisados não contêm informações que possam indicar a

presença de substâncias de defesa em comum entre *Citrus limonea* e *Citrus sinensis* pé franco; d) tanto nos gráficos de HCA, quanto nos de PCA, o agrupamento não evidenciou alguma relação de similaridade entre as amostras de *Citrus limonea* e de *Citrus sinensis* pé franco.

9.7. Estudo de Substâncias de Defesa em Folhas de *Citrus spp*

O último estudo da aplicação da técnica HR-MAS em folhas de *Citrus* teve como objetivo analisar a presença de substâncias de defesas em folhas de *Citrus spp* sob o ataque de pulgões do gênero *Toxoptera citricidus*. Este estudo foi realizado em duas etapas, na primeira foram obtidos espectros de RMN de ^1H HR-MAS de diferentes folhas do espécime de *Citrus spp* sob o ataque de pragas, na segunda foram realizados experimentos de HR-MAS bidimensionais em uma única folha sob o ataque dos pulgões.

O primeiro experimento foi realizado em uma folha jovem que estava sendo atacada por pulgões. No espectro resultante (espectros 29, página B-19) foi verificada a presença de sinais mais intensos nas regiões aromáticas (de δ 6,5 a 7,5 ppm) e alifáticas (de δ 2,0 a 3,5 ppm), o que sugeriu a presença de substâncias atuando como agentes de defesa da planta. Para confirmar esta possibilidade foi realizado um estudo comparativo entre folhas do mesmo espécime de *Citrus spp*. Para isso foram obtidos espectros de RMN de ^1H HR-MAS de uma folha jovem e sadia, de uma folha jovem anteriormente atacada por pulgões e de uma folha velha e sadia. Os espectros foram então comparados com o obtido para a folha jovem sob o ataque dos pulgões (espectro 29, página B-19).

O estudo comparativo confirmou que os dubletos localizados em δ 6,91 e 7,31 ppm e os singletos em δ 2,78, 3,11, 3,20, 3,27 e 3,30 e 3,37 ppm estão presentes em todas as folhas analisadas, entretanto, são significativamente mais intensos apenas na folha jovem sob o momento do ataque de pragas (espectro 30, página C-20). Isso sugere que estes sinais pertençam a uma ou mais substâncias produzidas pela planta como meio de defesa e que não esteja sendo apenas inoculadas pela praga no momento do ataque.

Este resultado pôde ser confirmado aproximadamente um ano após, quando o mesmo espécime de *Citrus spp* estava sob um novo ataque de pulgões do gênero *Toxoptera citricidus*. O espectro resultante apresentou os mesmos sinais característicos observados na primeira folha analisada (espectros 31 e 32,

páginas B-21 e B-22). Uma vez que foram observados em folhas e em épocas distintas, o resultado corrobora com a hipótese de que os sinais intensificados pertençam à uma ou mais substâncias de defesa da planta. Na tentativa de identificar tal(is) substâncias, foram também realizados experimentos de COSY (espectro 33, página B-23), HSQC (espectro 34, página B-24) e HMBC (espectro 35, página B-25) HR-MAS. Em relação aos sinais de interesse, os espectros de forneceram as correlações relatadas na tabela 6:

Tabela 6. Valores de deslocamento químico e de correlações de nJ ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ e nJ ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ de espectros de RMN HR-MAS obtidos de uma folha de *Citrus spp* sob o ataque de pragas

${}^1\text{H}$ CPMG	COSY	HSQC	HMBC
	δ ppm; J Hz	δ ppm	δ ppm
7,31	6,9 (8,0)	130,9	144,1; 115,9
6,93	7,3 (8,0)	118,1	119,5
3,37	-	51,9	-
3,30	-	55,2	64,6; 34,1; 55,5
3,26	-	56,8	-
3,20	-	56,7	42,2; 55,5
3,11	-	47,9	40,4; 64,7, 55,5
2,78	-	35,2	42,7

Os espectros de RMN de ${}^1\text{H}$ CPMG HR-MAS realizados nas folhas sob o ataque de pragas indicaram a presença de sinais mais intensos na região aromática e na região alifática do espectro, indicando o aumento da concentração de uma ou mais substâncias. Entretanto, no espectro de HMBC (espectro 35, página B-25) não foram observadas correlações entre as regiões aromáticas e alifáticas que sugerissem que os sinais possam pertencer a uma mesma substância.

O acoplamento em *orto* (8,0 Hz) dos dois dubletos da região aromática pode pertencer a uma molécula contendo um anel aromático dissubstituído nas posições *para*, ou tetra substituído, em que dois hidrogênios guardam a posição *orto* entre si. No entanto, a presença de apenas duas correlações mais intensas do espectro de HMBC (em δ 144,1 e 119,5 ppm), que

são características de acoplamentos em *meta*, sugere um sistema aromático simetricamente disubstituído.

Tais correlações sugerem ainda que o sistema aromático possua os grupamentos amino e carboxilato guardando a posição *para* entre si¹⁰¹ (figura 9.4), uma vez que a correlação em δ 144,1 ppm é compatível com os efeitos de desproteção causados por um grupamento amino ligado diretamente a um carbono aromático e por um grupamento carboxilato ligado na posição *para* a este. Da mesma forma, a correlação em δ 119 ppm é compatível com valores de carbonos aromáticos desprotegidos por um grupo carboxilato ligado diretamente e protegidos por um grupo amino ligado na posição *para*.

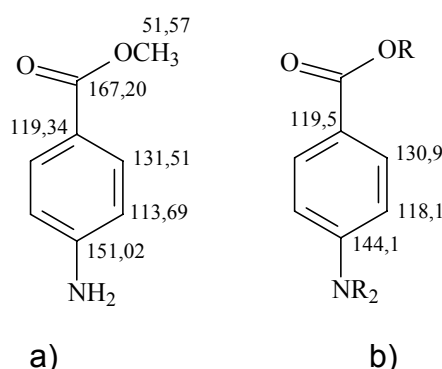


Figura 9.4 – Estruturas do éster *p*-aminobenzóico (a) e de um composto derivado (b) e valores de $\delta^{13}\text{C}$ da literatura (a) e experimentais (b)

As informações retiradas dos experimentos na região alifática não permitiram propor uma estrutura condizente com os sinais intensificados da região alifática, apenas sugerir a presença de alguns grupos funcionais:

a) os sinais de RMN de ^1H CPMG HR-MAS intensificados na região de δ 3,11 a 3,37 ppm correlacionam-se diretamente (1J ^1H - ^{13}C) com sinais de ^{13}C na região de δ 51,9 a 56,8 ppm, o que é compatível com a presença de metoxilas alifáticas e/ou de carbonos metínicos ligados à aminas¹⁰¹. As correlações de nJ H - ^{13}C observadas no experimento de HMBC nesta mesma região indicam a possível presença de carbonos quaternários ligados a hidroxilas (δ 64,6 ppm), a aminas substituídas ou a nitrogênios de amidas (δ 55,5 ppm), a carbonilas ou carboxilas (δ 42,2 ppm) e a carbonos totalmente substituídos (δ 34,1 ppm).

b) o sinal de RMN de ^1H CPMG HR-MAS mais protegido, em δ 2,78 ppm, correlaciona-se diretamente (1J ^1H - ^{13}C) com um sinal em δ 35,2 ppm e a longa distância (nJ ^1H - ^{13}C) com um sinal em δ 42,7 ppm. Tais correlações

sugerem a presença de carbonos metílicos ou metilênicos ligados a nitrogênio de amidas correlacionando-se a distância com um carbono quaternário ligado a carbonilas ou carboxila¹⁰¹.

Apesar de não ter sido possível atribuir os sinais da(s) substância(s) produzidas em maior quantidade em folhas jovens de *Citrus spp* sob o ataque de pulgões (devido à necessidade de um número maior de informações espectrais), este trabalho demonstrou que a técnica é capaz de evidenciar um fenômeno puntual que ocorre em folhas de *Citrus*. Uma vez que este tipo de “reação” da planta dificilmente poderá ser observado por um estudo tradicional (de extração e isolamento), a técnica evidencia-se como uma ferramenta exclusiva para este estudo e em estudos análogos.

Além disso, o trabalho também demonstrou que é possível obter espectros de COSY, HSQC e HMBC de amostras semi-sólidas com resoluções satisfatórias, ou seja, próximas às obtidas para RMN de líquidos. Deve ser ainda considerado que os experimentos apresentados podem ser otimizados (por exemplo, pelo emprego de seqüências de pulsos que eliminem melhor o sinal da água ou de folhas com um menor teor de água), fornecendo espectros com um número maior de correlações.

10. CONCLUSÕES

O trabalho evidenciou que a técnica HR-MAS pode ser empregada como uma ferramenta para a análise direta de folhas de *Citrus*, tanto em estudos comparativos, quanto na identificação de substâncias.

A técnica foi capaz de fornecer espectros de RMN de ^1H com informações suficientes para distinguir entre folhas de duas espécies de *Citrus* (*Citrus sinensis* e *Citrus limonea*) e entre *Citrus* de uma mesma espécie com formas de plantios diferenciadas (*Citrus sinensis* e *Citrus sinensis* pé franco).

Quando aplicada em folhas de *Citrus spp* sob o ataque de pulgões do gênero *Toxoptera citricidus* a técnica possibilitou evidenciar a presença de uma ou mais substâncias produzidas em resposta e no momento do ataque, fornecendo indícios das substâncias em questão, através de experimentos de HR-MAS 1D e 2D.

A técnica HR-MAS só não se mostrou uma ferramenta eficaz na diferenciação inequívoca entre variedades de *Citrus sinensis*, ainda que auxiliada por uma análise quimiométrica.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MORRIS, K. F. & JOHNSON, C. S. "Diffusion-ordered 2-dimensional nuclear-magnetic-resonance spectroscopy". *Journal of the American Chemical Society*, **114**(8): 3139, 1992.
2. PELTA, M. D.; BARJAT, H.; MORRIS, G. A.; DAVIS, L. & HAMMOND, S. "Pulse sequences for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy (HR-DOSY)". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **36**, 706, 1998.
3. JERSCHOW, A. & MÜLLER, N. "Suppression of convection artifacts in stimulated-echo diffusion experiments. Double-stimulated-echo experiments". *Journal of Magnetic Resonance*, **125**, 372, 1997.
4. JERSCHOW, A. & MÜLLER, N. "Convection compensation in gradient enhanced nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Journal of Magnetic Resonance*, **132**, 13, 1998.
5. SØRLAND, G. H., SELAND, J. G., KRANE, J. & ANTHONSEN, H. W. "Improved convection compensating pulsed field gradient spin-echo and stimulated-echo methods". *Journal of Magnetic Resonance*, **142**, 323, 2000.
6. DIXON, A. M. & LARIVE, C. K. "Modified pulsed-field gradient NMR experiments for improved selectivity in the measurement of diffusion coefficients in complex mixtures: application to the analysis of the Suwannee River fulvic acid". *Analytical Chemistry*, **69**, 2122, 1997.
7. DONGUI, W. U.; CHEN, A. & JOHNSON, C. S., JR. "Three-Dimensional Diffusion-Ordered NMR spectroscopy: The Homonuclear COSY-DOSY Experiment". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **121**, 88, 1996.
8. BARJAT, H.; MORRIS, G. A. & SWANSON, A. G. "A three-dimensional DOSY-HMQC experiment for the high-resolution analysis of complex mixtures". *Journal of Magnetic Resonance*, **131**, 131, 1998.
9. NILSSON, M.; GIL, A.M.; DELGADILLO, I. & MORRIS, G. A., "Improving pulse sequences for 3D diffusion-ordered NMR spectroscopy: 2DJ-IDOSY", *Analytical Chemistry*, **76** (18): 5418, 2004.
10. PRICE, W. S.; HAYAMIZU, K.; IDE, H.; ARATA, Y., "Strategies for diagnosing and alleviating artifactual attenuation associated with large gradient pulses in PGSE NMR diffusion measurements". *Journal of Magnetic Resonance Series*, **139**, 205, 1999.
11. ESTURAU, N.; SANCHEZ-FERRANDO, F.; GAVIN, J. A.; ROUMESTAND, C.; DELSUC, M. & PARELLA, T. "The use of sample rotation for minimizing convection effects in self-diffusion NMR measurements". *Journal of Magnetic Resonance*, **153**, 48, 2001.

12. ANTALEK, B. "Using Pulsed Gradient Spin Echo NMR for Chemical Mixture Analysis: How to Obtain Optimum Results". *Concepts in Magnets Resonance*, **14**, 225, 2002.
13. ZHANG, Z; LI, C; YE, C. & LIU M. "Determination of molecular self-diffusion coefficient using multiple spin-echo NMR spectroscopy with removal of convection and background gradient artifacts". *Analytical Chemistry*, **73**, 3528, 2001.
14. GOSTAN, T.; BRUN, E.; TRAMESEL, D.; PRIGENT, Y., DELSUC, M. & GUIDAS, B. "The Integrated DOSY Acquisition/Processing Module for Topspin NMR Software" *Bruker Report* **154**, 18, 2004.
15. EADS, C. D. & NODA, I. "Generalized correlation NMR spectroscopy". *Journal of the American Chemical Society*, **124**(6): 1111, 2002.
16. WINDIG, W. & ANTALEK, B. "Resolving Nuclear Magnetic Resonance Data of Complex Mixtures by three-way methods: Examples of chemical solutions and the human brain". *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, **46**, 207, 1999.
17. HUO, R.; WEHRENS, R.; BUYDENS, L. M. C. "Improved DOSY NMR data processing by data enhancement and combination of multivariate curve resolution with non-linear least square fitting" *Journal of Magnetic Resonance*, 169 (2): 257, 2004.
18. EILERTSEN, J. L.; HALL, R. W.; SIMERAL, L. S.; BUTLER, L. G. "Tools and strategies for processing diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy (DOSY) of a broad featureless resonance: an application to methylaluminozane (MAO)", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**:(6) 1574, 2004.
19. HUO, R. WEHRENS, J., VAN DUYNHOVEN VAN, J. & BUYDENS, L. M. C. "Assessment of techniques for DOSY NMR processing", *Analytica Chimica Acta*, **490**, 231, 2003.
20. BARJAT, H.; MORRIS, G. A.; SMART, S.; SWANSON, A. G. & WILLIAMS, S. C. R. "High-Resolution Diffusion-Ordered 2D Spectroscopy (HR-DOSY) – a new tool for the analysis of complex mixtures". *Journal of Magnetic Resonance Series B*, **108**, 170, 1995.
21. LEON, C. M.; GORKOM, V. & HANCEWICZ, T. M. "Analysis of DOSY and GPC-NMR experiments on polymers by multivariate curve resolution". *Journal of Magnetic Resonance*, **130**(1): 12, 1998.
22. JAYAWICKRMA, D. A.; LARIVE, C. K.; MCCORD, E. F. & ROE, D. C. "Polymer additives mixture analysis using pulsed field gradient NMR spectroscopy". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **36**, 755, 1998.
23. KARPUR, G. S.; FINDEISEN, M. & BERGER, S. "Analysis of hydrocarbon mixtures by diffusion-ordered NMR spectroscopy". *Fuel*, **79**, 1347, 2000.

24. MORRIS, K. F.; CUTAK, B.; DIXON, A. & LARIVEC. K. "Resolution of diffusion coefficient distributions in humic and fulvic acids by means of diffusion ordered NMR spectroscopy". *Analytical Chemistry*, **71**(23): 5315, 1999.
25. SIMPSON, A.; KINGERY, W. L.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E. & KERSSEBAUM R. "Separation of structural components in soil organic matter by diffusion ordered spectroscopy". *Environmental Science & Technology*, **35**(22): 2001.
26. GIL, A. M.; DUARTE, I. CABRITA, E.; GOODFELLOW, B.J.; SPRAUL, M. & KERSSEBAUM, R. "Exploratory Applications of Diffusion Ordered Spectroscopy to Liquid Foods: an Aid Towards Spectral Assignment". *Analytica Chimica Acta* **506** (2): 215, 2004.
27. GOSTAN, T.; MOREAU, C.; JUTEAU, A.; GUICHARD, E. & DELSUC, M. A. "Measurement of Aroma Compound Self-Diffusion in Food Models by DOSY" *Magnetic Resonance in Chemistry*, **42** (6): 496, 2004.
28. Pescitelli G, Di Bari L, Salvadori P, "Multiple solution species of titanium(IV) 1,1'-Bi-2-naphtholate elucidated by NMR and CD spectroscopy", *Organometallics* **23** (18): 4223, 2004.
29. DIAZ, M. D. & BERGER, S. "Studies of the complexation of sugars by diffusion-ordered NMR spectroscopy", *Carbohydrate Research*, **329**(1): 1, 2000.
30. LIN, M.; JAYAWICKRAMA, R. R. A.; DELVISCIO, J. A. & LARIVE C. K. "Nuclear-magnetic-resonance spectroscopic analysis of the selective complexation of the cis and trans isomers of phenylalanylproline by beta-cyclodextrin". *Analytica Chimica Acta*, **307**(2-3): 449, 1995.
31. VIEL, S.; MANNINA, L. & SEGRE, A. "Detection of a π - π Complex by Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY)". *Tetrahedron Letters*, **43**, 2515, 2002.
32. CHEN, A. D.; WU, D. H. & JOHNSON, C. S. "Determination of the binding isotherm and size of the bovine serum albumin-sodium dodecyl-sulfate complex by diffusion-ordered 2D NMR". *Journal of Physical Chemistry*, **99**(2): 828, 1995.
33. JOHNSON, C. S, JR. & HINTON D. P. "Diffusion ordered 2D spectroscopy of phospholipid vesicles: determination of vesicles size distributions, *Journal Physical Chemistry*, **97**, 9064, 1993.
34. KOHLMANN, O.; STEINMETZ, W. E.; MAO, X. A.; WUELFING W. P.; TEMPLETON, A. C.; MURRAY, R. W. & JOHNSON, C. S. "NMR diffusion, relaxation, and spectroscopic studies of water soluble, monolayer-protected gold nanoclusters". *Journal of Physical Chemistry B*, **105**(37): 8801, 2001.
35. CHEN, A.; WU, D. H. & JOHNSON, C. S. Determination of molecular-weight distributions for polymers by diffusion-ordered NMR". *Journal of the American Chemical Society*, **117**(30): 7965, 1995.

36. MORRIS, K. F. & JOHNSON, C. S.; "Resolution of discrete and continuous molecular-size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR-spectroscopy". *Journal of The American Chemical Society*, **115**(10): 4291, 1993.
37. VIEL, S.; CAPITANI, D.; MANNINA, L. & SEGRE, A. "Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: A Versatile Tool for the Molecular Weight Determination of Uncharged Polysaccharides" *Biomacromolecules*, **4**, 1843, 2003.
38. CABRITA, E. J.; BERGER, S.; BRÄUER, P. & KÄRGER, J. "High-Resolution DOSY NMR with Spins in Different Chemical Surroundings: Influence of Particle Exchange". *Journal of Magnetic Resonance*, **157**, 124, 2002.
39. JOHNSON, J. C. S. "Effects of chemical exchange in diffusion-ordered 2D NMR spectra". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **102**, 214, 1993.
40. CHEN, A.; JOHNSON, C. S.; LIN, M. & SHAPIRO, M. J. "Chemical exchange in diffusion NMR experiments". *Journal of the American Chemical Society*, **120**(35): 9094, 1998.
41. MALLIAVIN, T. E.; LOUIS, V. & DELSUC, M. A. "The DOSY experiment provides insights into the protegrin-lipid interaction". *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, **95**(2): 178, 1998.
42. BORGES, R. B; LAVERDE, A.; PORTO, A. L. M. & MARSAIOLI, A. J. "HR-DOSY and sulfoxide enantiomeric discrimination by cyclodextrin". *Spectroscopy-An International Journal*, **14**(4): 203, 2000.
43. Hodge, P.; Monvisade, P.; Morris, G. A. & Preece, I. "A novel NMR method for screening soluble compound libraries" *Chemical communications*, 239, 2001.
44. LAVERDE, A. J.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FUJIWARA, F. Y. & MARSAIOLI, A. J. "An NMR Tool for Cyclodextrin Selection In Enantiomeric Resolution By High-Performance Liquid Chromatography". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **40**, 433, 2002.
45. KARPUR, G. S.; CABRITA, E. J. & BERGER, S. "The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy". *Tetrahedron Letters*, **41**, 7181, 2000.
46. ZHAO, T. J & BECKHAM, H. W. "Direct synthesis of cyclodextrin-rotaxanated poly(ethylene glycol)s and their self-diffusion behavior in dilute solution", *Macromolecules*, **36** (26): 9859, 2003.
47. CRANK, J., *The mathematics of diffusion*, Oxford University 2^o ed., Oxford University Press, London, 1975.
48. ATKINS, P. W.; *Physical Chemistry*, Oxford university Press, 6st edition, 1998.
49. SOUZA, A. A. & LAVERDE, A. J. "Aplicação da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear para Estudos de Difusão Molecular em Líquidos: A Técnica DOSY". *Química Nova*, **25**(6) 1022, 2002.

50. PRICE, W. S. "Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: part I. Basic theory". *Concepts in Magnetic Resonance*, **9**, 299, 1997.
51. WILLIAMSON, R. T.; CHAPIN, E. L.; CARR, A. W.; GILBERT, J. R.; GRAUPNER, P. R.; LEWER, P.; MCKAMEY, P.; CARNEY, J. R. & GERWICK, W. H. "New diffusion-edited NMR experiments to expedite the dereplication of known compounds from natural product mixtures". *Organic Letters*, **2**(3): 289, 2000.
52. CLARIDGE, T. D. W., *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 19, Oxford, Pergamon, 1999.
53. JERSCHOW, A. & MÜLLER, N. "3D Diffusion-Ordered TOCSY for Slowly, Diffusing Molecules". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **123**, 222, 1996.
54. PRICE, W. S. "Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: part II. Experimental Aspects". *Concepts in Magnetic Resonance*, **10**, 197-237, 1998.
55. GIBBS, S. J. & JOHNSON, C. S. "A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents". *Journal of Magnetic Resonance*, **93**(2): 395, 1991.
56. SØRLAND, G. H., SELAND, J. G., KRANE, J. & ANTHONSEN, H. W. "Improved convection compensating pulsed field gradient spin-echo and stimulated-echo methods". *Journal of Magnetic Resonance*, **142**, 323, 2000.
57. LOUNILA, J.; OIKARINEN, K.; INGMAN, P. & JOKISAARI J. "Effects of thermal convection on NMR and their elimination by sample rotation". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **118**, 50, 1996.
58. LOENING, N. M. & KEELER, J. "Measurement of convection and temperature profiles in liquid samples". *Journal of Magnetic Resonance*, **139**(2): 334, 1999.
59. WU, D. H.; WOODWARD, W. S. & JOHNSON, C. S. "A sample spinner for vibration-sensitive liquid-state experiments with application to diffusion-ordered 2D NMR". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **104**(2): 231, 1993.
60. HAKANSSON, B.; JONSSON, B.; LINSE, P. & SODERMAN, O. "The influence of a nonconstant magnetic-field gradient on PFG NMR diffusion experiments. A Brownian-dynamics computer simulation study". *Journal of Magnetic Resonance*, **124**, 343, 1997.
61. PRICE, W. S.; STILBS, P.; JONSSON, B. & SODERMAN, O. "Macroscopic background gradient and radiation damping effects on high-field PGSE NMR diffusion measurements". *Journal of Magnetic Resonance*, **150**(1): 49, 2001.
62. BROEKAERT, P.; VLASSENBROEK, A.; JEENER, A.; LIPPENS, G. & WIERUSZESKI, J.-M. "Observation and selective suppression of the dipolar-field effects in 2D NMR in liquids in homogeneous fields". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **120**, 97, 1996.

63. CONNELL, M. A.; DAVIS, A. L.; KENWRIGHT, A. M. & MORRIS, G. A. "NMR measurements of diffusion in concentrated samples: avoiding problems with radiation damping", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378** (6): 1568, 2004.
64. DVINSKIKH, S. V.; & FURO I. "Cross-relaxation effects in stimulated-echo-type PGSE NMR experiments by bipolar and monopolar gradient pulses". *Journal of Magnetic Resonance*, **146**(2): 283, 2000.
65. LIMA, J. E. S. Química e atividade Antimicrobiana de *Pilocarpus Riedeliamus* (Rutaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 1996. Tese de doutoramento, 152 p.
66. BIAVATTI, M. W. Química e bioatividade de *Raulinoa erchinata* (Rutaceae) espécie endêmica do Vale do Itajaí. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2001. Tese de doutoramento, 123 p.
67. CARMIM, A. L. Potencial de *Esenbeckia febrifuga* e *Zanthoxylum riedelianum* como fonte de substâncias para o controle de doença de Chagas e leishmaniose. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2003. Tese de doutoramento, 82p.
68. KUPCE, E & FREEMAN, R. "An adaptable NMR broadband decoupling scheme", *Chemical Physics Letters*, **250**, 523, 1996.
69. WU, T. S.; KUOH, C. S.; FURAKAWA, H. "Acridone alkaloids and a coumarin from *Citrus grandis*", *Phytochemistry*, **22** (6), 1493, 1983.
70. CORRÊA, D. B.; GOTTLIEB, O. R. & PÁDUA, A. P. "Dihydrocinnamic Acids from *Hortia Badinii*". *Phytochemistry*, **14**, 1975, 2059.
71. TAKEMURA, Y.; WADA, M.; JU-ICHI, M. & FURUKAWA, H. "A new dimeric acridone alkaloid from *Citrus paradisi* MACF", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **46**(4), 693, 1998.
72. WENIGER, B.; UM, B.; VALENTIN, A.; ESTRADA, A.; LOBSTIEN, A.; ANTON, R.; MAILLÉ, M. & SAUVAIN, M. "Bioactive acridone alkaloids from *Swinglea glutinosa*", *Journal of Natural Products*, **64**, 1221, 2001.
73. SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E. & GHELLI, S. "Preliminary Investigation on the Characterization of Durum Wheat Flours Coming from some Areas of South Italy by Means of ¹H High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4242, 1998.
74. WARRASS, R. & LIPPENS, G. "Quantitative monitoring of solid phase organic reactions by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy". *Journal of Organic Chemistry*, **65**(10): 2946, 2000.
75. BIANCO, A., FURRER, J., LIMAL, D., GUICHARD, G., ELBAYED, K., RAYA, J., PIOTTO, M. & BRIAND, J.P. "Multistep synthesis of 2,5-diketopiperazines on

different solid supports monitored by high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy". *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2**(6): 681, 2000.

76. MEISSNER, A.; BLOCH, P.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. & SORENSEN, O. W. "Reduction of inhomogeneous line broadening in two-dimensional high-resolution MAS NMR spectra of molecules attached to swelled resins in solid-phase synthesis". *Journal of the American Chemical Society*, **119**(7): 1787, 1997.

77. RUHLAND, T.; ANDERSEN, K. & PEDERSEN, H. "Selenium-linking strategy for traceless solid-phase synthesis: Direct loading, aliphatic C-H bond formation upon cleavage and reaction monitoring by gradient MAS NMR spectroscopy". *Journal of Organic Chemistry*, **63**(25): 9204, 1998.

78. KEIFER, P. A.; BALTUSIS, L.; RICE, D. M.; TYMIAK, A. A. & SHOOLERY, J. N. "A Comparison Of NMR Spectra Obtained for Solid-Phase-Synthesis Resins Using Conventional High-Resolution, Magic-Angle-Spinning and High-Resolution Magic-Angles-Spinning Probes". *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **119**, 65, 1996.

79. WEYBRIGHT, P.; MILLIS, K.; CAMPBELL, N.; CORY, D. G. & SINGER, S. "Gradient, high-resolution, magic angle spinning H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact cells". *Magnetic Resonance in Medicine*, **39**(3): 337, 1998.

80. MILLIS, K.K.; MAAS, W. E.; CORY, D. G. & SINGER, S. "Gradient, high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue". *Magnetic Resonance in Medicine*, **38**(3): 399, 1997.

81. HENG, L. L.; CHANG, I. W.; SMITH, B. L. & GONZALEZ, G. "Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy". *Journal of Magnetic Resonance*, **135**(1): 194, 1998.

82. BROBERG, A.; KENNE, L. & PEDERSEN, M. "In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Planta*, **206**(2): 300, 1998.

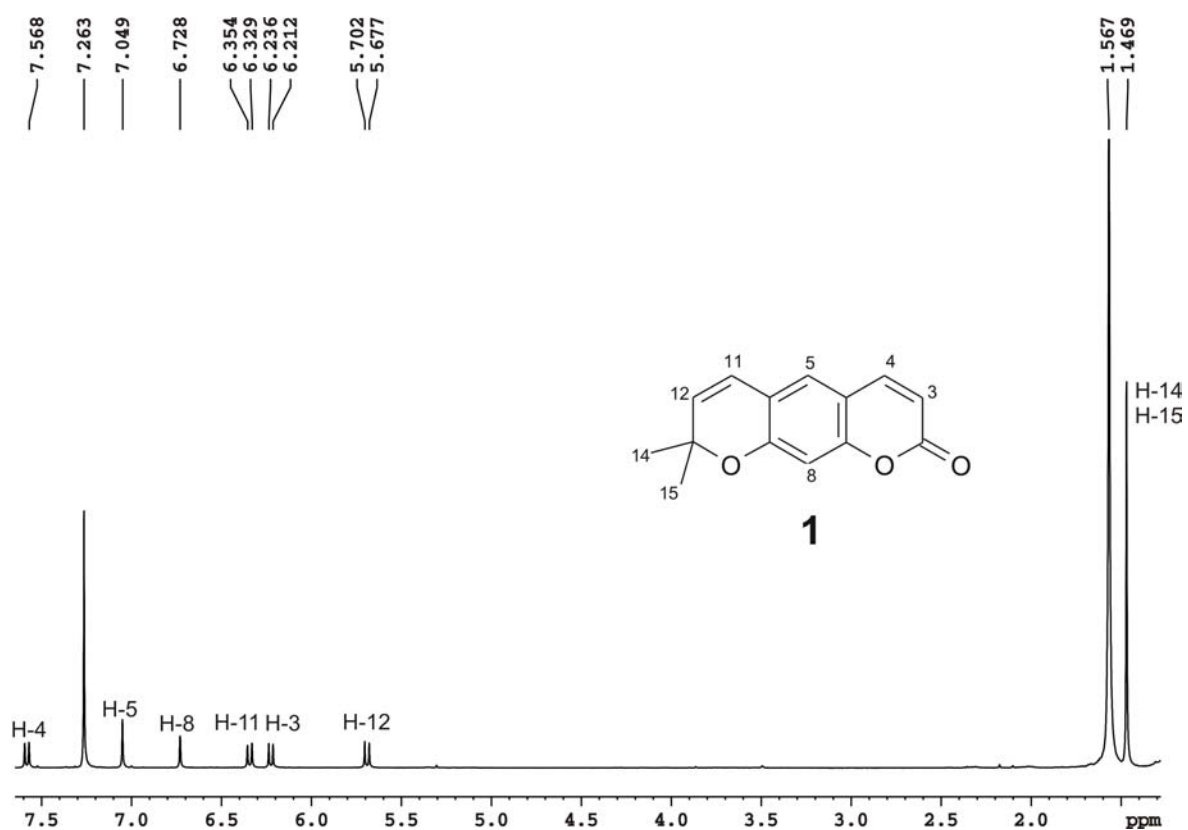
83. BROBERG, A. & KENNE, L. "Use of High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for in Situ Studies of Low-Molecular-mass Compounds in Red Algae". *Analytical Biochemistry*, **284**, 367, 2000.

84. GIL, A. M.; DUARTE, I.F.; DELGADILLO, I.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E. & SPRAUL, M. "Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(5): 1524, 2000.

85. BRESCIA, M. A.; DI MARTINO, G.; FARES, C.; DI FONZO, N.; PLATANI, C.; GHELLI, S.; RENIERO, F. & SACCO, A. "Characterization of Italian durum wheat semolina by means of chemical analytical and spectroscopic determinations". *Cereal Chemistry*, **79**(2): 238, 2002.

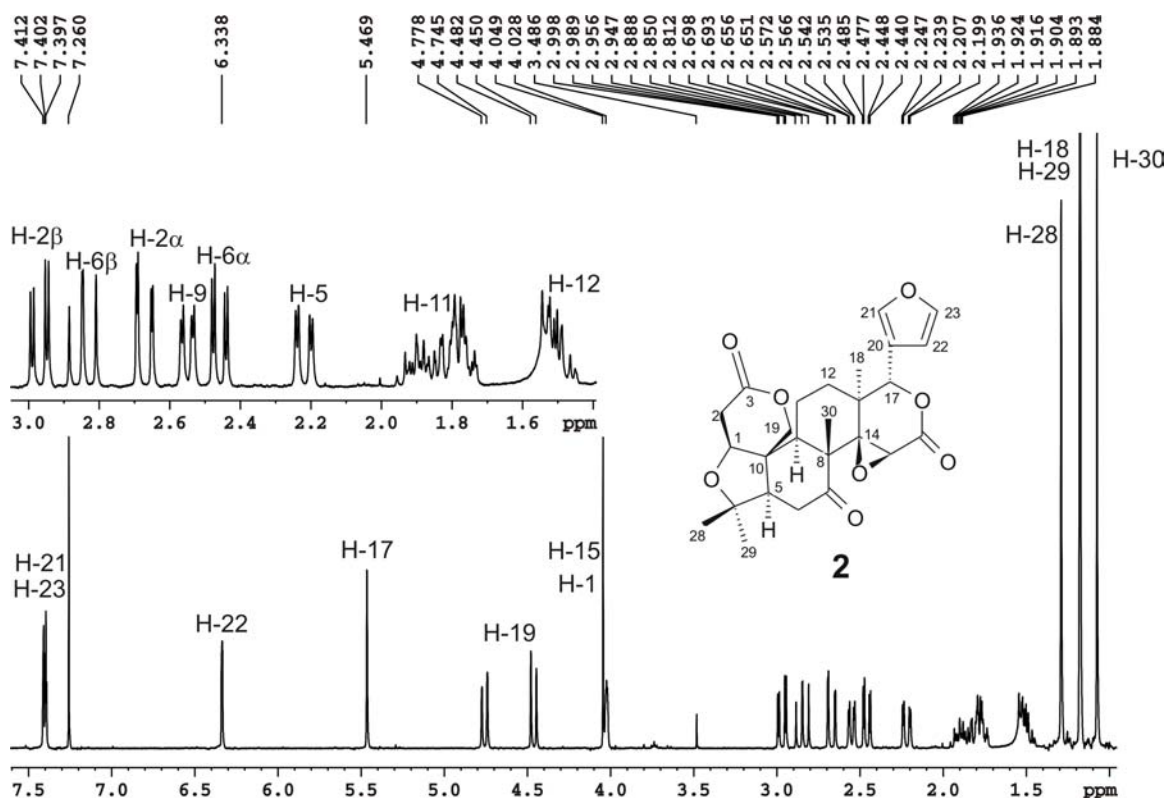
86. ELBAYED, K.; BOURDONNEAU, M.; FURRER, J.; RICHERT, T.; RAYA, J.; HIRSCHINGER, J. & PIOTTO, M. "Origin of the residual NMR linewidth of a peptide bound to a resin under magic angle spinning". *Journal of Magnetic Resonance*, **136**(1): 127, 1999.
87. ALBERTI, E.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M.; GILBERT, S. M.; TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. & GIL, A. M. "A high resolution H-1 magic angle spinning NMR study of high-M-r subunit of wheat glutenin". *Biopolymers*, **58**(1): 33, 2001.
88. JACHYMEK, W.; NIEDZIELA, T.; PETERSSON, C.; LUGOWSKI, C.; CZAJA, J & KENNE, L. "High-resolution magic-angle spinning NMR investigation of the O-specific polysaccharides in native lipopolysaccharides and directly on the surface of living bacteria". *Biochemistry*, **38**(36): 11788, 1999.
89. ZHOU, Z.; SAYER, B. G.; HUGHES, D. W.; STARK, R. E. & EPAND, R. M. "Studies of phospholipid hydration by high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance". *Biophysical Journal*, **76**(1): 387, 1999.
90. GIL, A. M.; ALBERTI, E.; TATHAM, A. S.; BELTON, P. S.; HUMPFER, E. & SPRAUL, M. "Magic Angle Spinning NMR Study of the Hydration of the Wheat Seed Storage Protein Omega-Gliadins". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **35**, S101, 1997.
91. SHAPIRO, M. J. & GOUNARIDES, J. S. "High Resolution MAS-NMR in Combinatorial Chemistry". *Biotechnology and Bioengineering (Combinatorial Chemistry)*, **71**(2): 130, 2000/2001.
92. CHIN, J. A.; CHEN, A. D. & SHAPIRO M. J. "SPEEDY: Spin-Echo Enhanced Diffusion Filtered Spectroscopy. A New Tool for High Resolution MAS NMR". *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2**(3): 293, 2000.
93. CHIN, J. A.; CHEN, A. & SHAPIRO M. J. "Improved High-Resolution Diffusion Filtered ¹H MAS NMR". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**, 782, 2000.
94. GARROD, S.; HOLMES, E.; HUMPFER, E. & SPRAUL, M. "HR-MAS: a new tool for semisolid samples". *Bruker Report*, **146**, 18, 1998.
95. SANDERS, J. K. M. & HUNTER, B., *Modern NMR Spectroscopy, a guide for chemists*, Oxford University Press, 1st edition, 1987.
96. KEMP, W., *NMR in Chemistry, a Multinuclear Introduction*, The Macmillan Press LTD, 1st edition, 1986.
97. Ferreira, M. C. Márcia, *Quimiometria*, notas de aula, 2.002.
98. Manual do software AMIX-VIEWER para análise quimiométrica, versão 3.1. Bruker, Karlsruhe, 2002.
99. Manual do software PIROUETTE, para análise quimiométrica, versão 3.02. Infometrix, Woodinville, 1990-2001.

100. BRERETON, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Wiley, 2003.
101. PRETSH E. & SIMOM W.; *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*, Springer-Verlag, 2nd edition, 1989.
102. DEWICK P. M.; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, 1997.



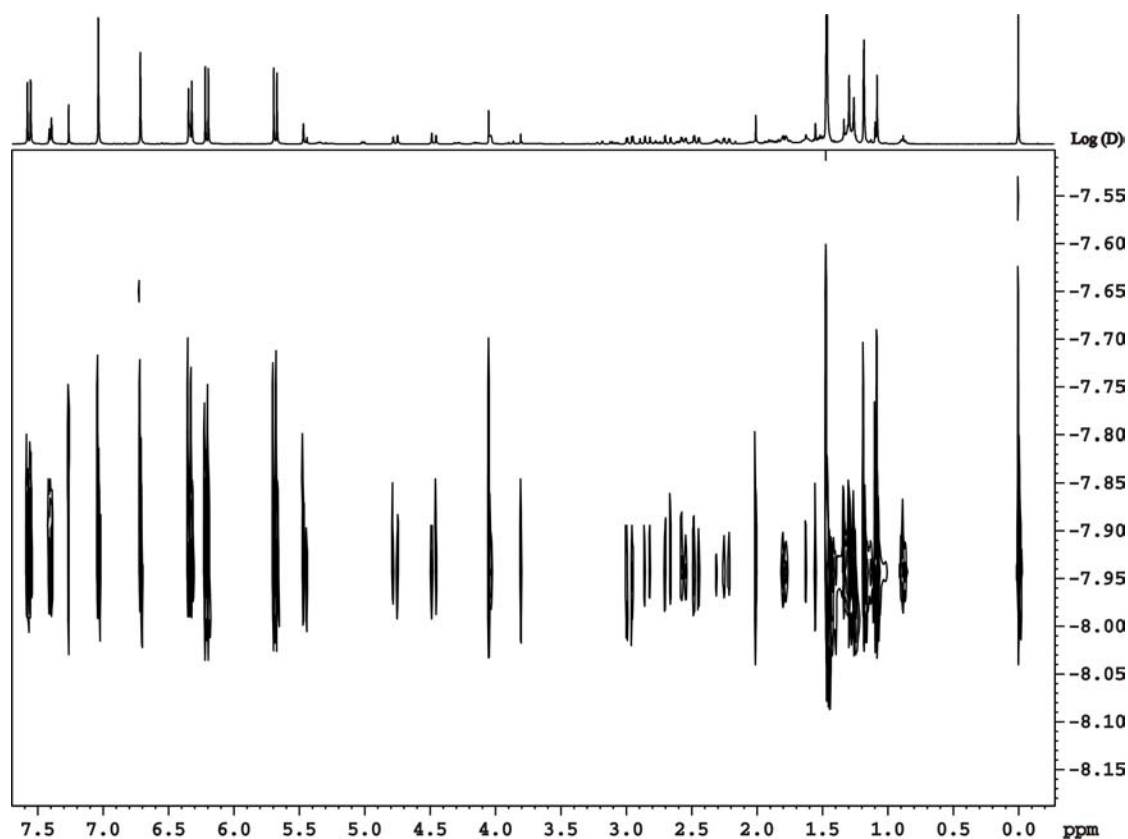
ESPECTRO 1 - Espectro de RMN de ¹H (SFO1 = 400,13 MHz) do composto **1** (xantiletina)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso ZG, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 0,1 s e duração do pulso de rf (90°) de 8,3 μ s. Foram acumulados 8 FIDs e empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.



ESPECTRO 2 - Espectro de RMN de ^1H (SFO1 = 400,13 MHz) do composto **2** (limonina)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso ZG, com largura espectral em F_2 de 3360,21Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 0,1 s, duração do pulso de rf (90°) de 8,3 μs . Foram acumulados 8 FIDs e empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

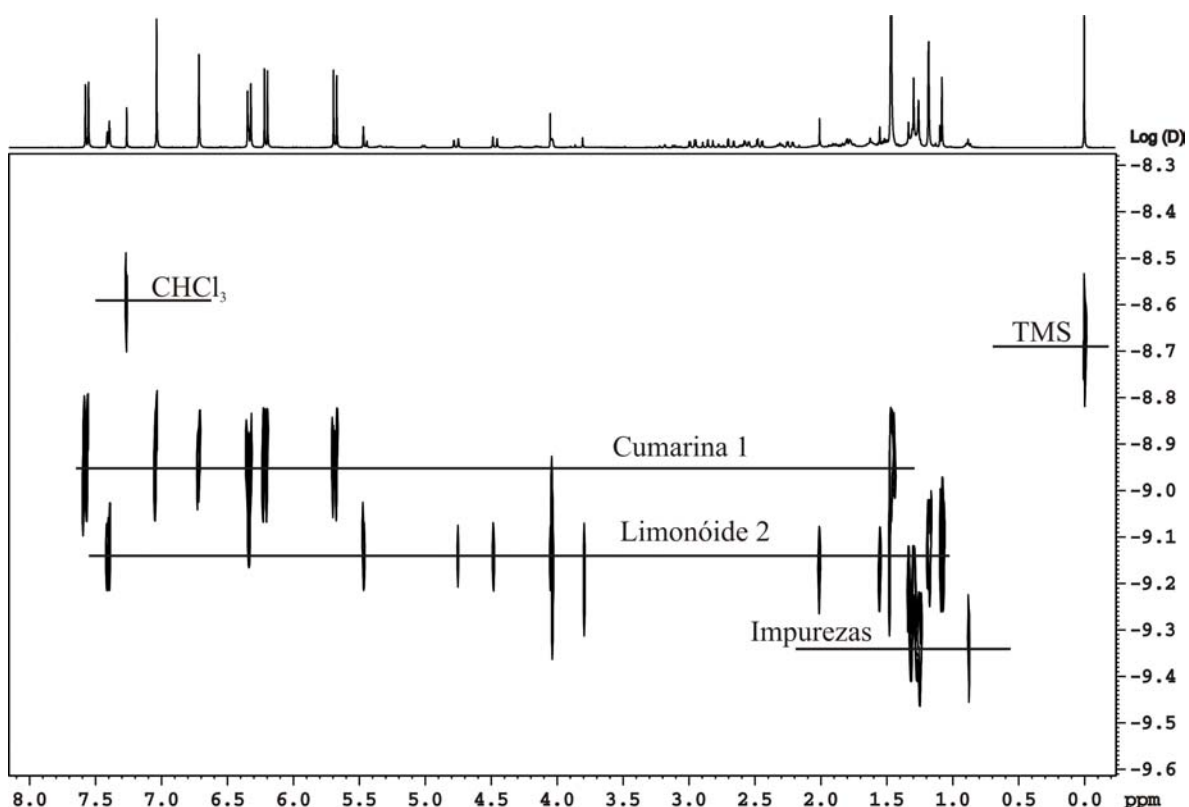


ESPECTRO 3 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido à temperatura de 303 K

O espectro foi obtido a temperatura de 303 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGS2S, com largura espectral em F_2 de 4280 Hz, tempo de aquisição de 7,6 s, tempo de reciclagem de 1,5 s, duração do pulso de rf (90°) de 8,3 μ s e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 .

Os demais parâmetros foram ajustados como: pulso para destruir as magnetizações remanescentes nas dimensões xy (*spoil*) de 2 ms, intervalo após a aplicação dos pulsos de gradiente de 1,5 ms, tempo de difusão de 50 ms, tempo para a dissipação das correntes de vórtice de 5 ms e rampa do gradiente de 2 a 45%. Foram empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

O processamento foi realizado com o macro ILT, empregando-se 64 K pontos em F_2 e 32 em F_1 .

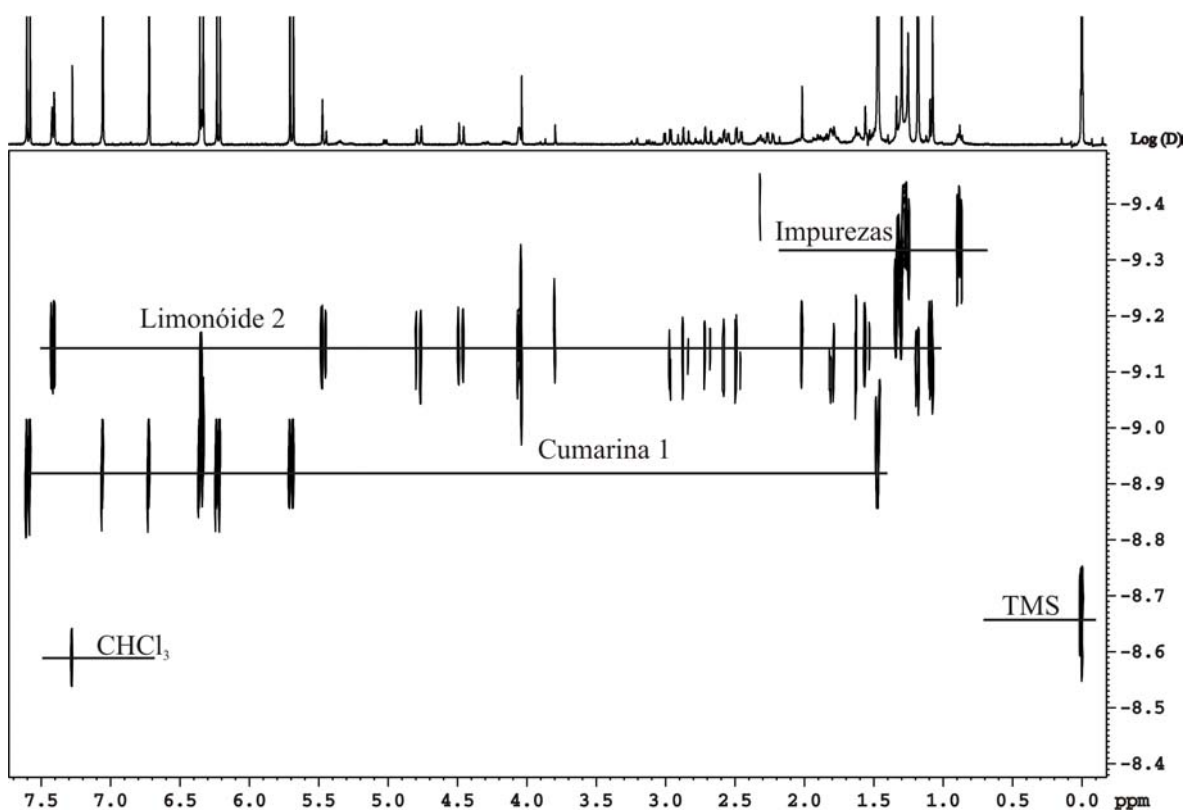


ESPECTRO 4 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão com a melhor resolução obtida na implementação da técnica

O espectro foi obtido a temperatura de 298 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGS2S, com largura espectral em F_2 de 4280 Hz, tempo de aquisição de 7,6 s, tempo de reciclagem de 1,5 s, duração dos pulsos de rf (90°) de 8,3 μ s e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 .

Os demais parâmetros foram ajustados como se segue: pulso para destruir as magnetizações remanescentes nas dimensões xy (*spoil*) de 2 ms, intervalo após a aplicação dos pulsos de gradiente de 1,5 ms, tempo de difusão de 50 ms, tempo para dissipação das correntes de vórtice de 5 ms e rampa do gradiente de 2 a 95%. Foram empregados CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna

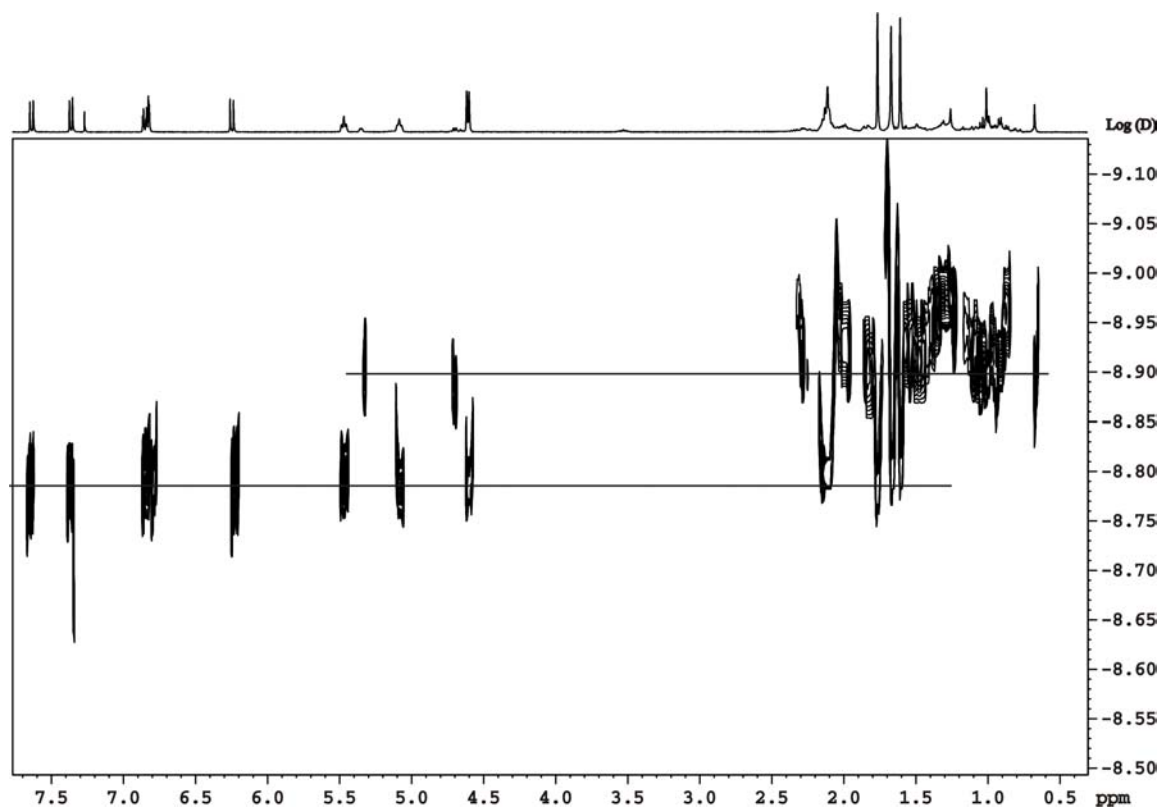
O processamento foi realizado com o macro ILT, empregando-se 64 K pontos em F_2 e 32 em F_1 .



ESPECTRO 5 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido após a etapa de otimização dos experimentos

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 11 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 6,9 μ s e de gradiente de 1,8 ms. Foram acumulados 16 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna.

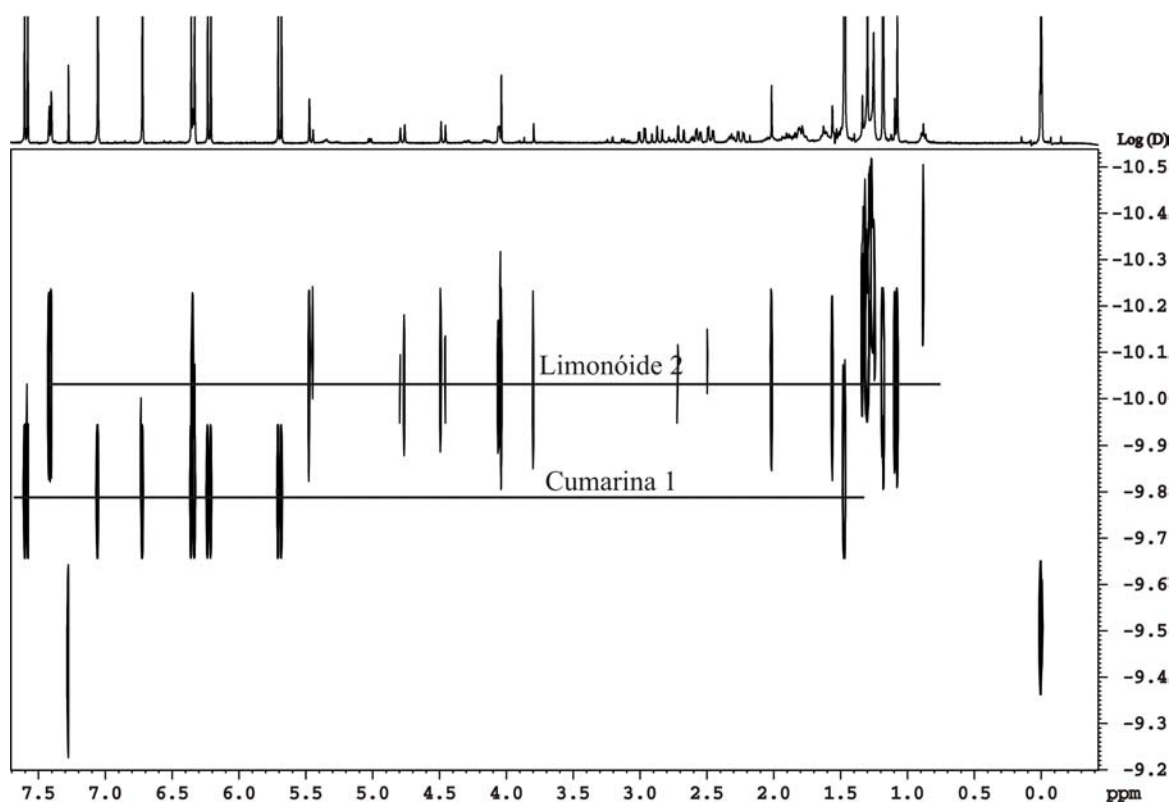
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 6 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) de um extrato hexânico pré-purificado de folhas de *Esenbeckia febrifuga*

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 4032.26 Hz, tempo de aquisição de 8,1 s, tempo de reciclagem de 2,8 s, duração do pulso de rf (90°) de 10 μ s e de gradiente de 1,8 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 16 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

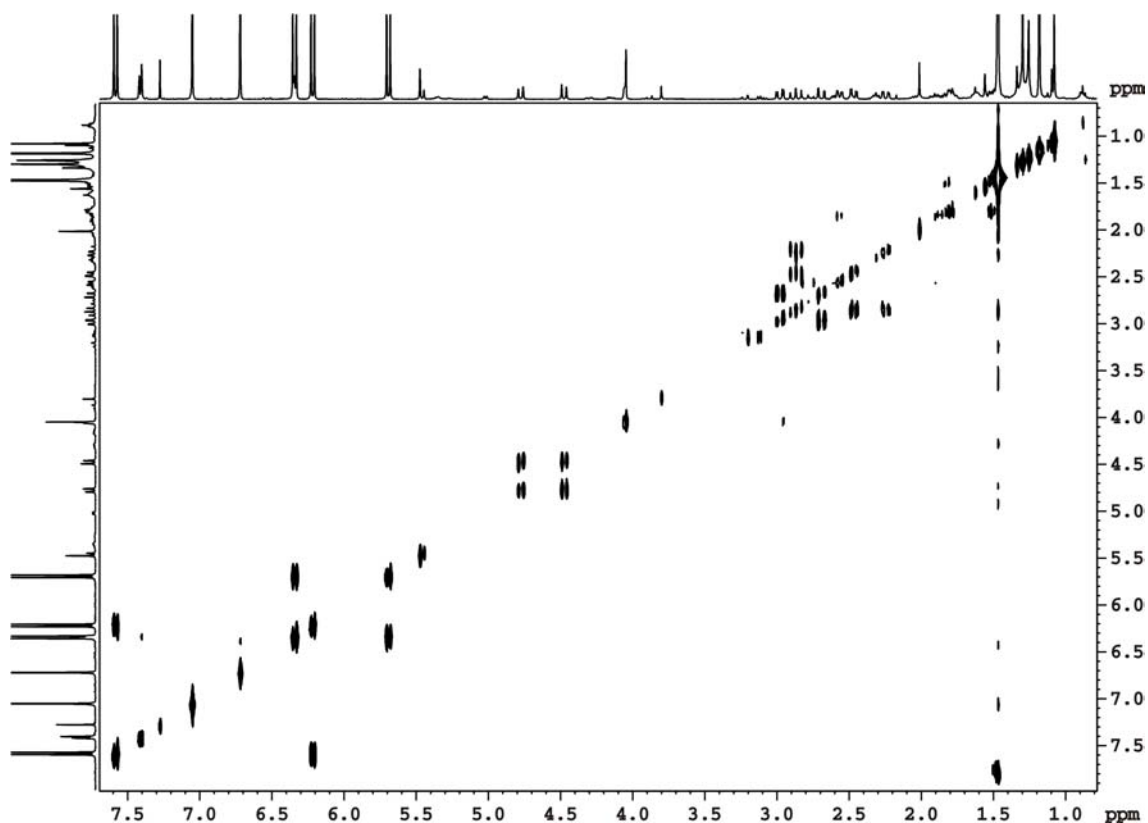
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 16 no eixo F_1 .



ESPECTRO 7 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão realizada com 10 experimentos no eixo F_1

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 6,2 s, duração do pulso de rf (90°) de 6,9 μ s e de gradiente de 1,8 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 10 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

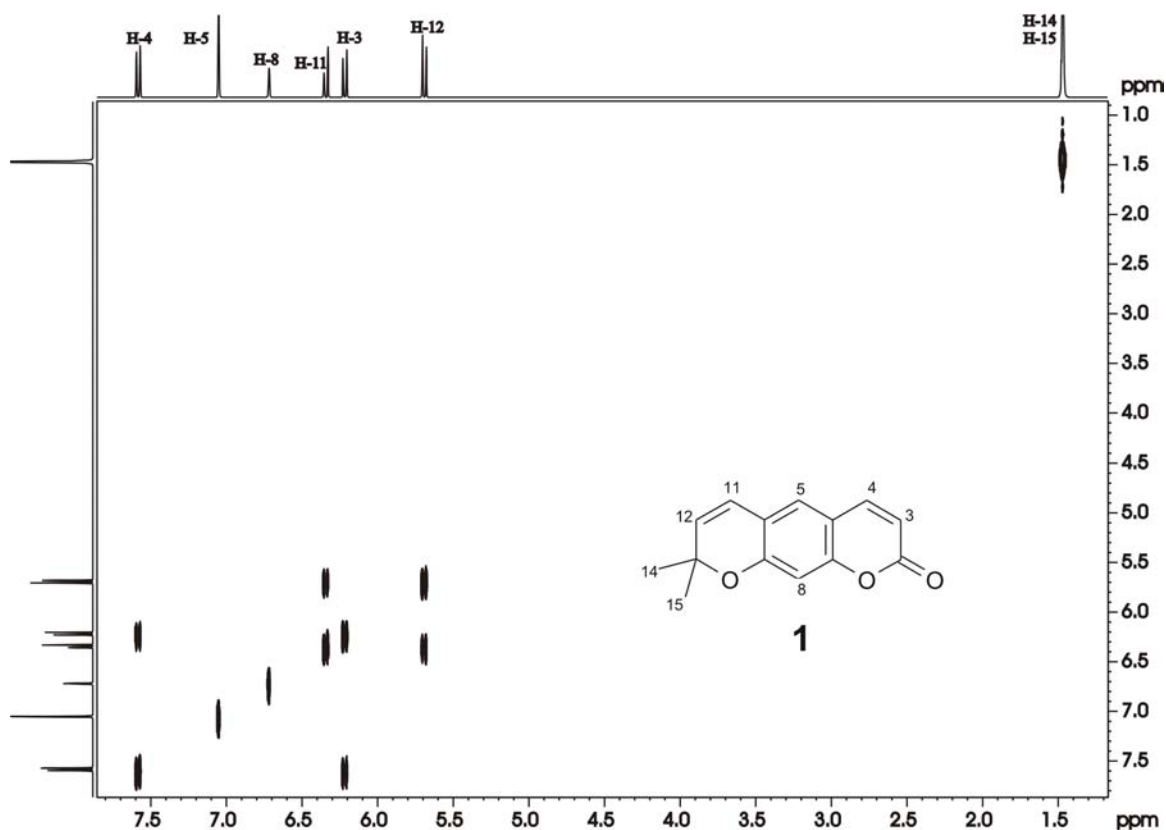
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 16 no eixo F_1 .



ESPECTRO 8. Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso COSYGS, com 2 K pontos digitalizados em F_2 , largura espectral em F_2 e F_1 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 0,61 s, tempo de reciclagem de 1,5 s, duração do pulso de rf (90°) de 6,9 μs e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 64 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

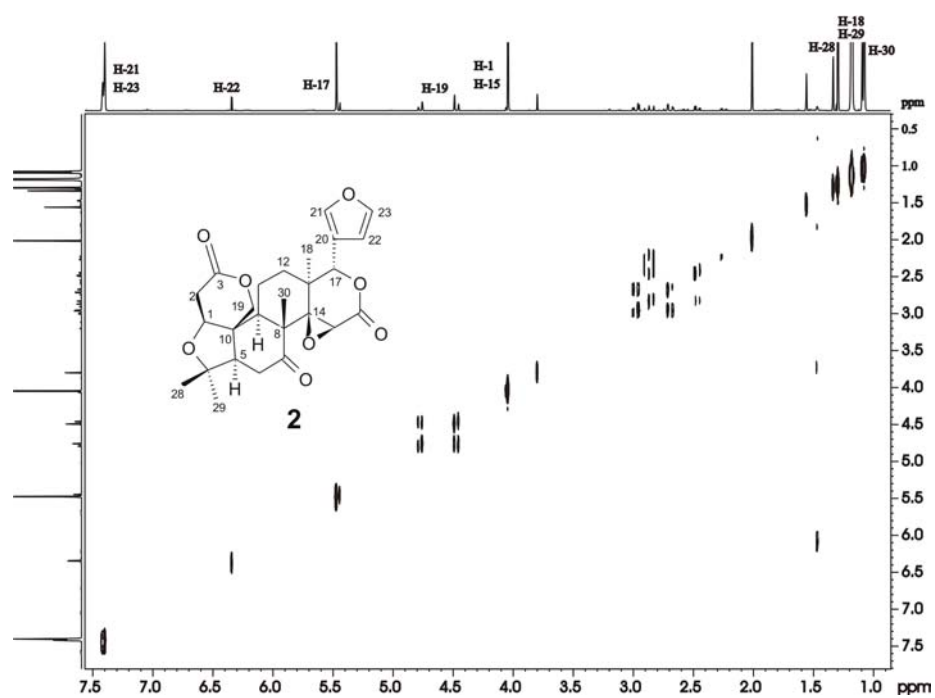
No processamento foram utilizados 2 K pontos em F_2 e F_1 e empregada a função de apodização seno-sino, com lb de 1 para o eixo F_2 e lb de 0,3 e gb de 0,1 para o eixo F_1 .



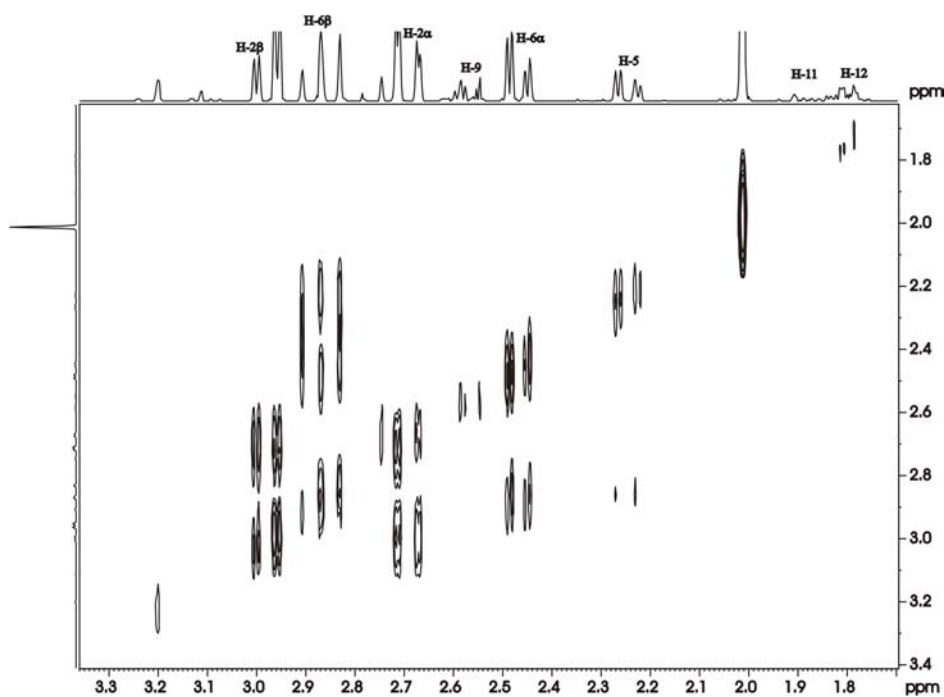
ESPECTRO 9 - Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) do composto **1** (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-COSY (corte 14), com projeção interna.

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGPCO2S3D, com 2 K pontos digitalizados em F_3 , largura espectral em F_3 e em F_1 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 0,61 s, tempo de reciclagem de 6,1 s, duração dos pulsos de rf (90°) de 6,9 μs e de gradiente de 1,8 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 10 e 64 experimentos para os eixos F_2 e F_1 , respectivamente. Foram utilizados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

No processamento foram utilizados 2 K, 16 e 2 K pontos em F_3 , F_2 e F_1 , respectivamente, sendo empregada a função de apodização seno-sino, com lb de 1 para o eixo F_2 e lb de 0,3 e gb de 0,1 para o eixo F_1 .

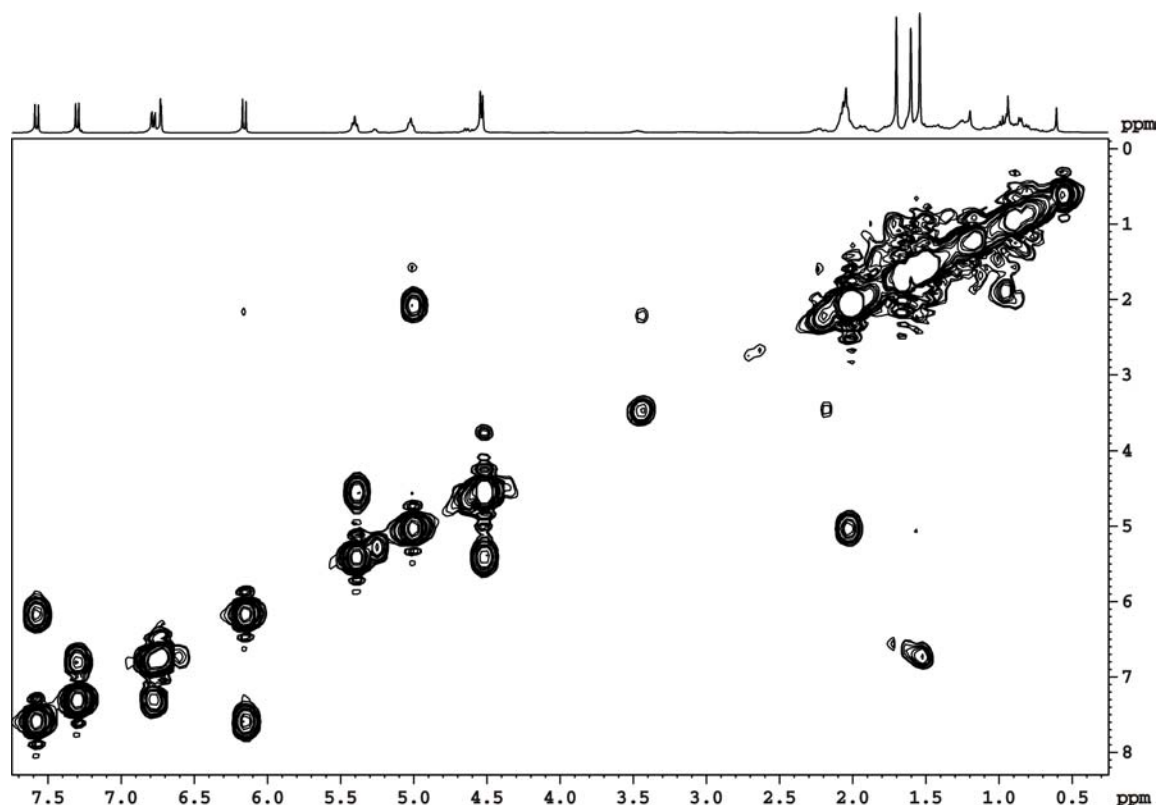


a)



b)

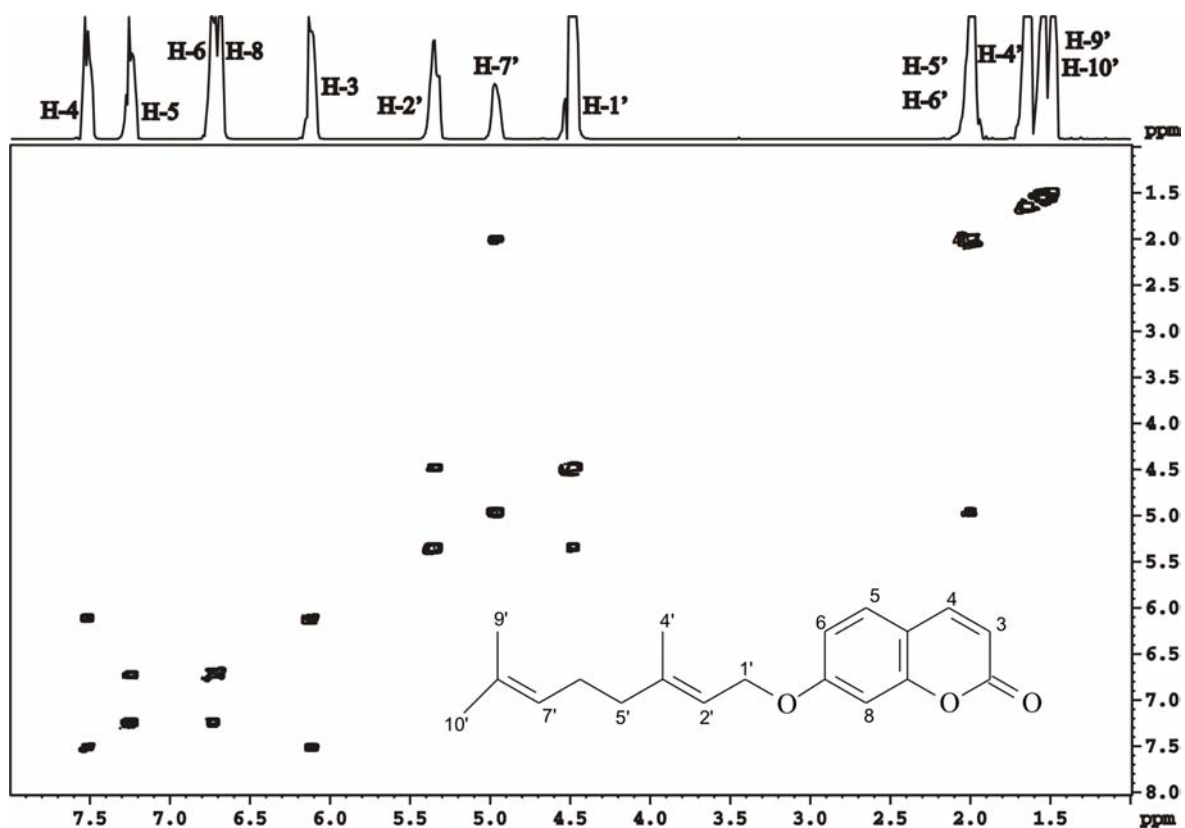
ESPECTROS 10 – Espectros de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) do composto **2** (limonina) extraído do experimento DOSY-COSY (corte 9); a) região total, b) expansão da região de δ 3,3 a 1,7 ppm, com projeção interna.



ESPECTRO 11 - Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) de um extrato hexânico pré-purificado de folhas de *Esenbeckia febrifuga*

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso COSYGS, com 2 K pontos digitalizados em F_2 , largura espectral em F_2 e F_1 de 4032,26 Hz, tempo de aquisição de 0,51 s, tempo de reciclagem de 1 s, duração do pulso de rf (90°) de 10 μs e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 16 FIDs e realizados 64 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

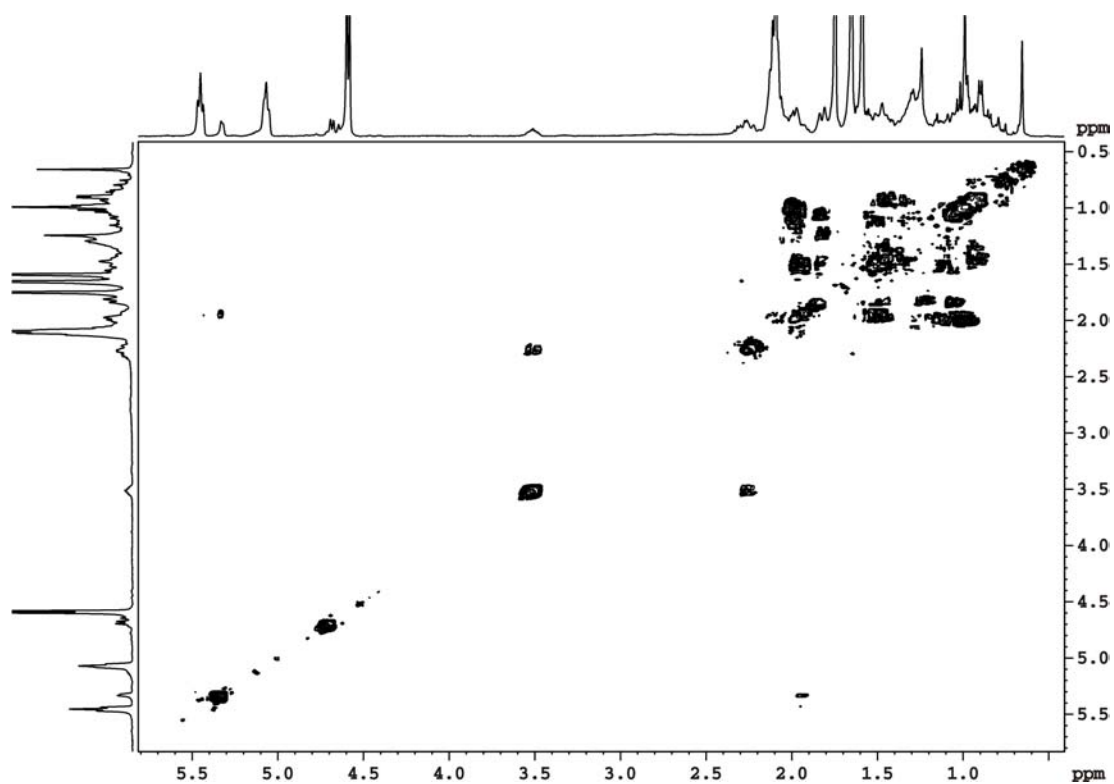
No processamento foram utilizados 2 K pontos em F_2 e F_1 e empregada a função de apodização seno-sino, com lb de 1 para o eixo F_2 e lb de 0,3 e gb de 0,1 para o eixo F_1 .



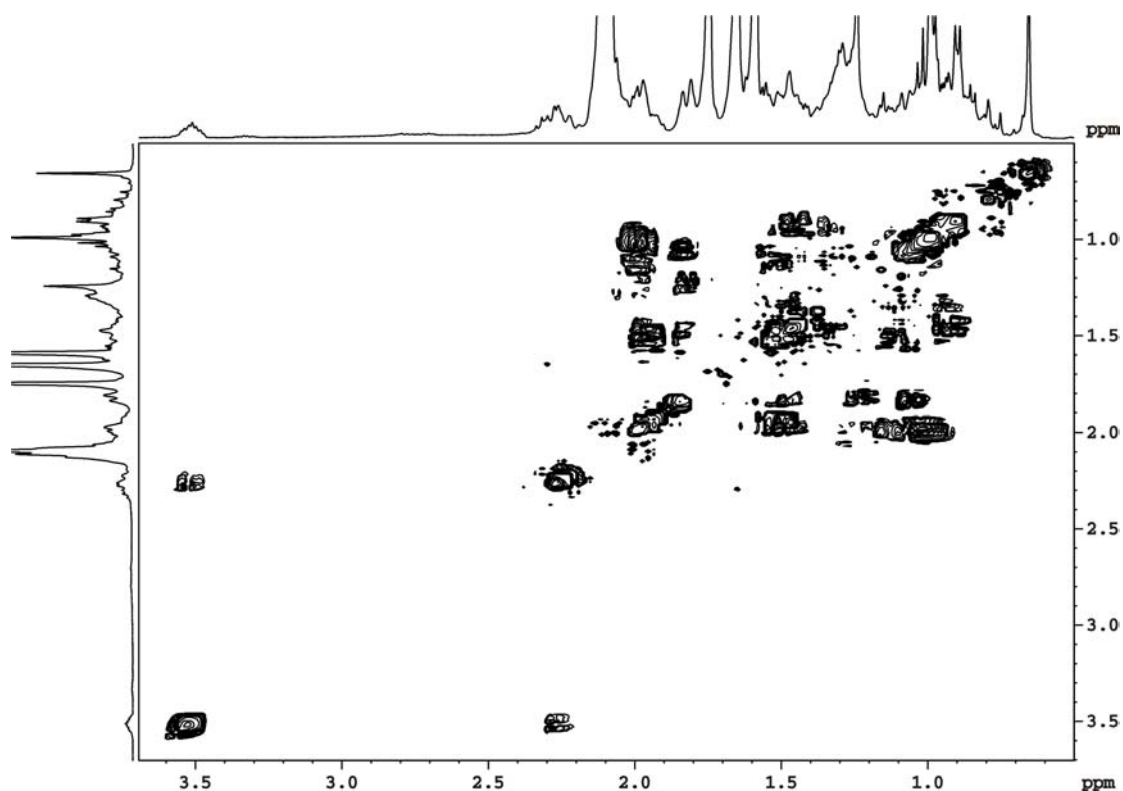
ESPECTRO 12 - Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) do composto **3** (aurapteno) extraído do experimento DOSY-COSY (corte 18), com projeção interna.

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGPCO2S3D, com 2 K pontos digitalizados em F_3 , largura espectral em F_3 e em F_1 de 4032,26 Hz, tempo de aquisição de 0,51 s, tempo de reciclagem de 3,9 s, duração dos pulsos de rf (90°) de 10 μs e de gradiente de 1,8 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 16 e 128 experimentos para os eixos F_2 e F_1 , respectivamente, sendo utilizados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

No processamento foram utilizados 2 K, 32 e 2 K pontos em F_3 , F_2 e F_1 , respectivamente, sendo empregada a função de apodização seno-sino, com lb de 1 para o eixo F_2 e lb de 0,3 e gb de 0,1 para o eixo F_1 .

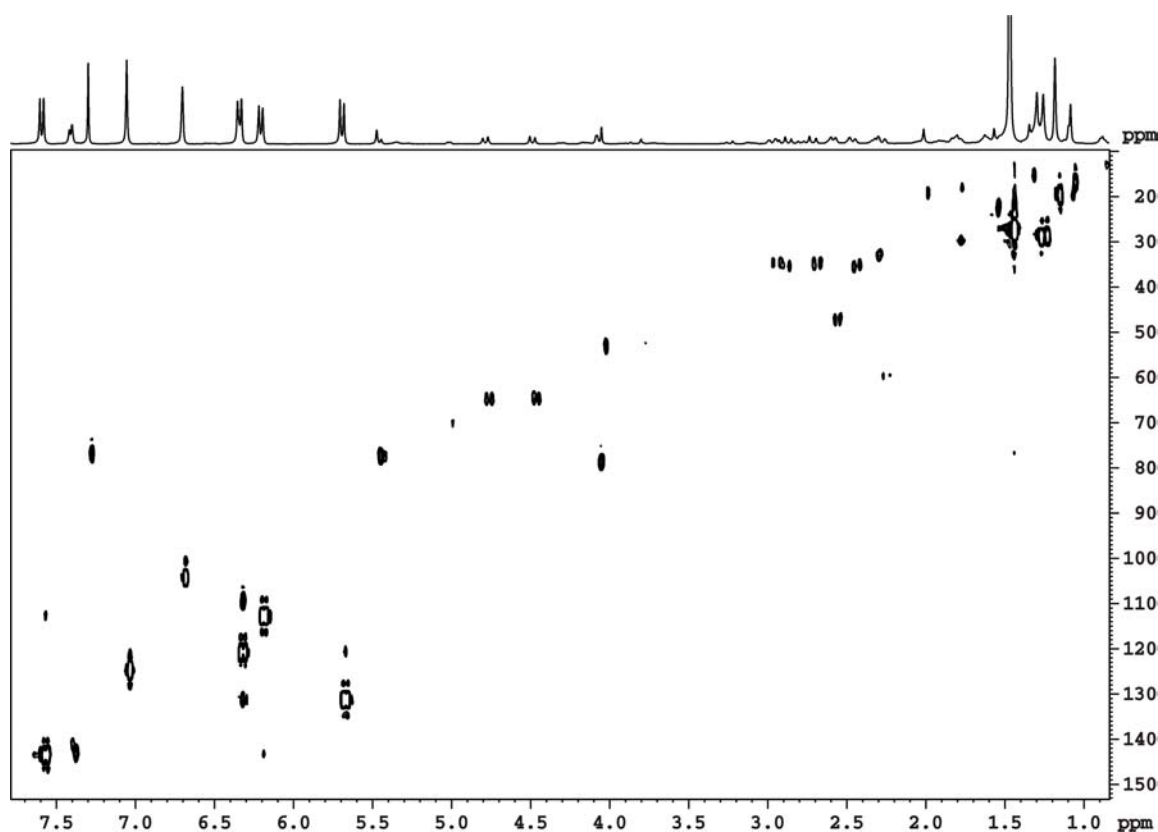


a)



b)

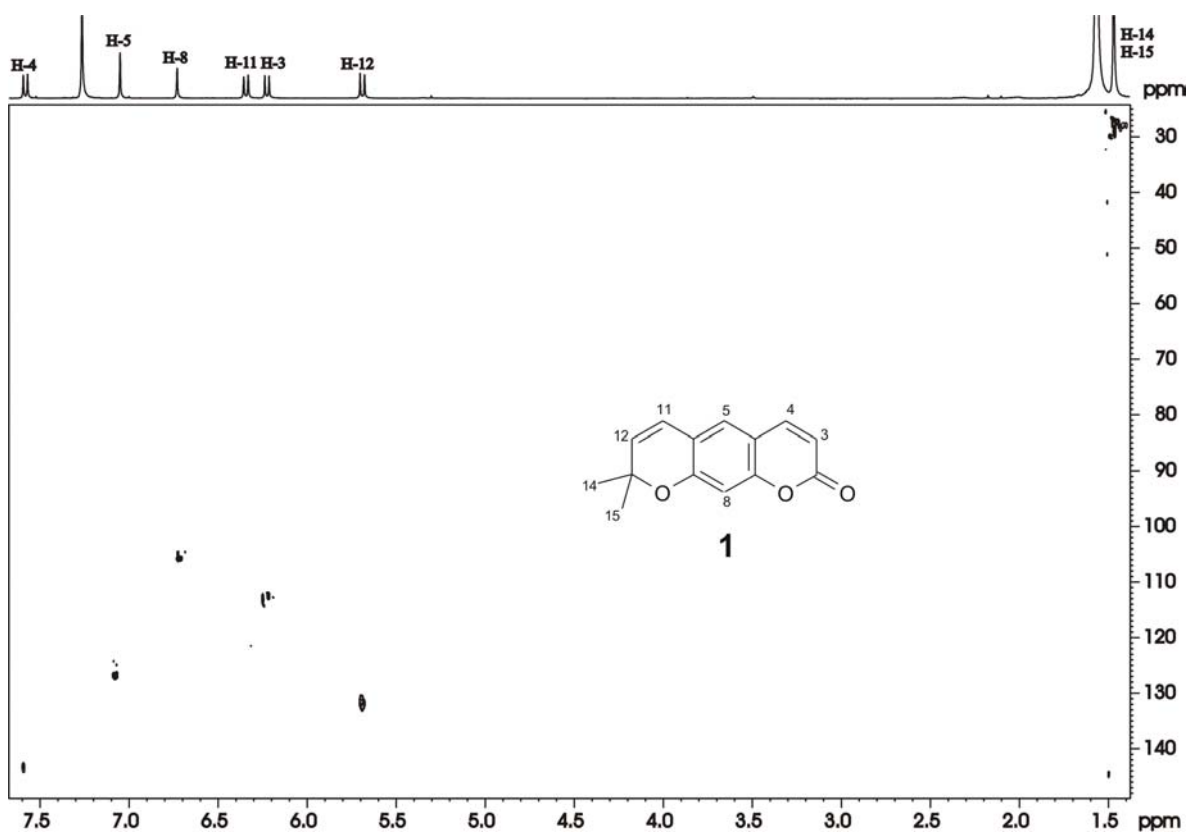
ESPECTROS 13 – Espectro de RMN de COSY (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) de um composto desconhecido extraído do experimento DOSY-COSY (corte 19); a) região total e b) expansão da região de δ 0,6 a 3,5 ppm.



ESPECTRO 14 - Espectro de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) da mistura padrão

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso INVETGSSI, com 1 K pontos digitalizados em F_2 (TDF2), larguras espectrais de 3360,21 Hz em F_2 e de 18112,17 Hz em F_1 , de aquisição de 0,15 s, tempo de reciclagem de 1,2 s, tempo de saturação do sinal dos hidrogênios ligados ao ^{12}C de 70 μs , duração dos pulsos de rf (90°) de 6,9 μs e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 64 e experimentos no eixo F_1 . Foram utilizados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

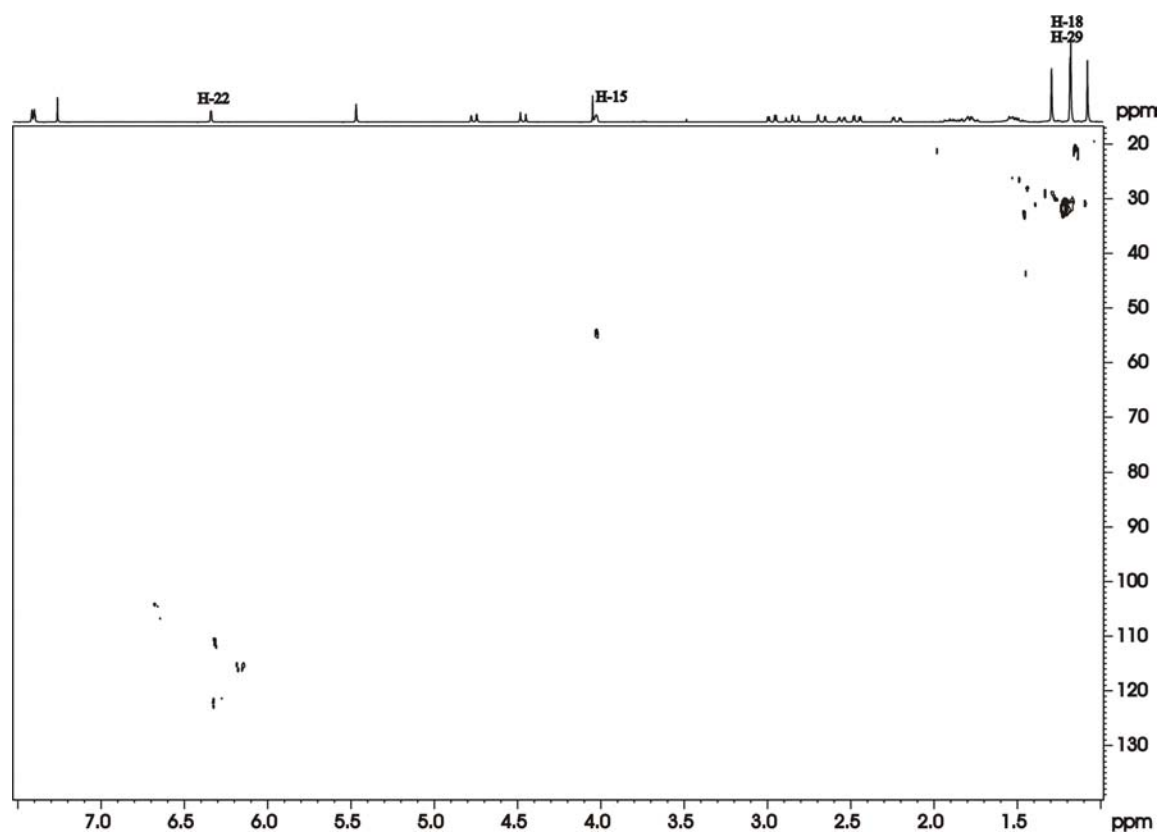
No processamento foram utilizados 1 K pontos em F_2 e F_1 e empregada a função de apodização seno-sino elevado ao quadrado, com fator de deslocamento de 3 para ambos os eixos.



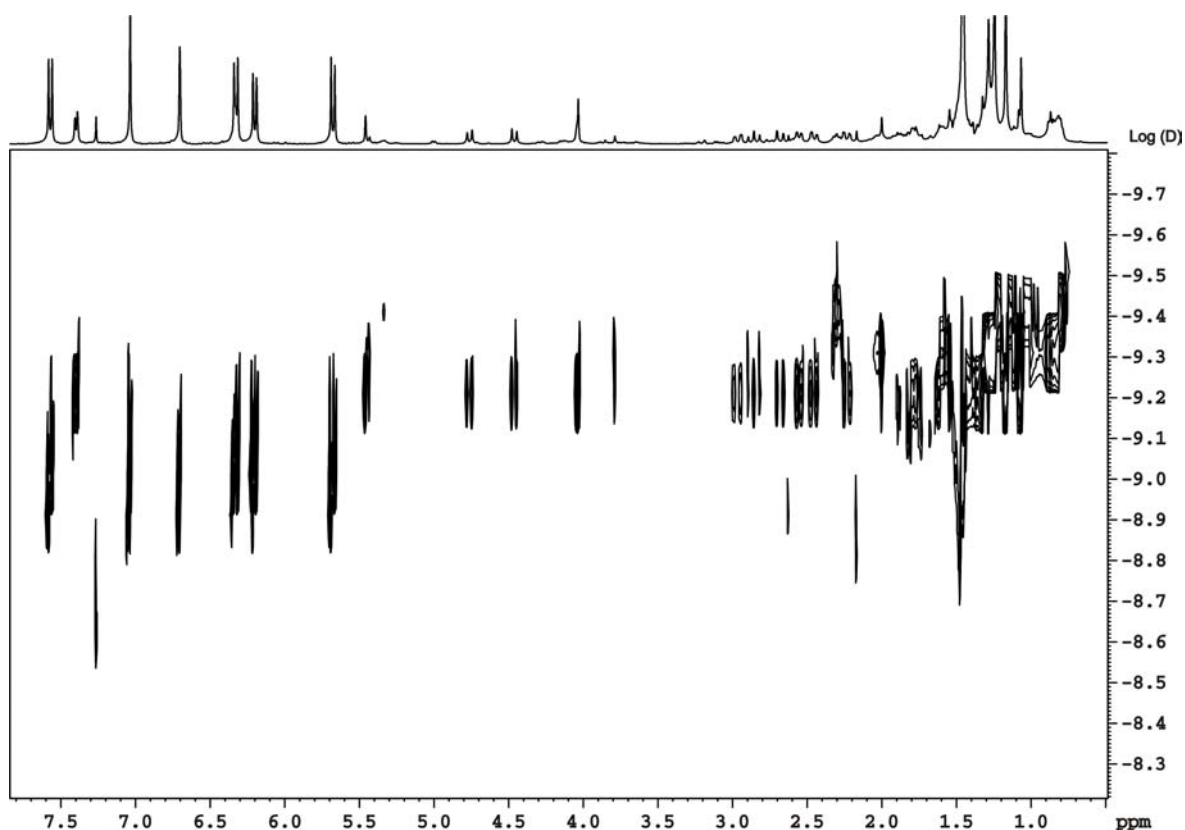
ESPECTRO 15 - Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) do composto **1** (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 14)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGPII2S3D, com 1 K pontos digitalizados em F_3 , larguras espectrais em F_3 e em F_1 de 3360,21 Hz e 18111,7 Hz, respectivamente, tempo de aquisição de 0,15 s, tempo de reciclagem de 4,6 s, tempo de saturação do sinal dos hidrogênios ligados ao ^{12}C de 70 μs , duração dos pulsos de rf (90°) de 6,9 μs e de gradiente de 1,8 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 10 e 64 experimentos para os eixos F_2 e F_1 , respectivamente. Foram utilizados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

No processamento foram utilizados 1 K, 32 e 1 K pontos em F_3 , F_2 e F_1 e respectivamente, sendo empregada a função de apodização seno-sino elevado ao quadrado, com fator de deslocamento de 3 para os eixos F_3 e F_1 .



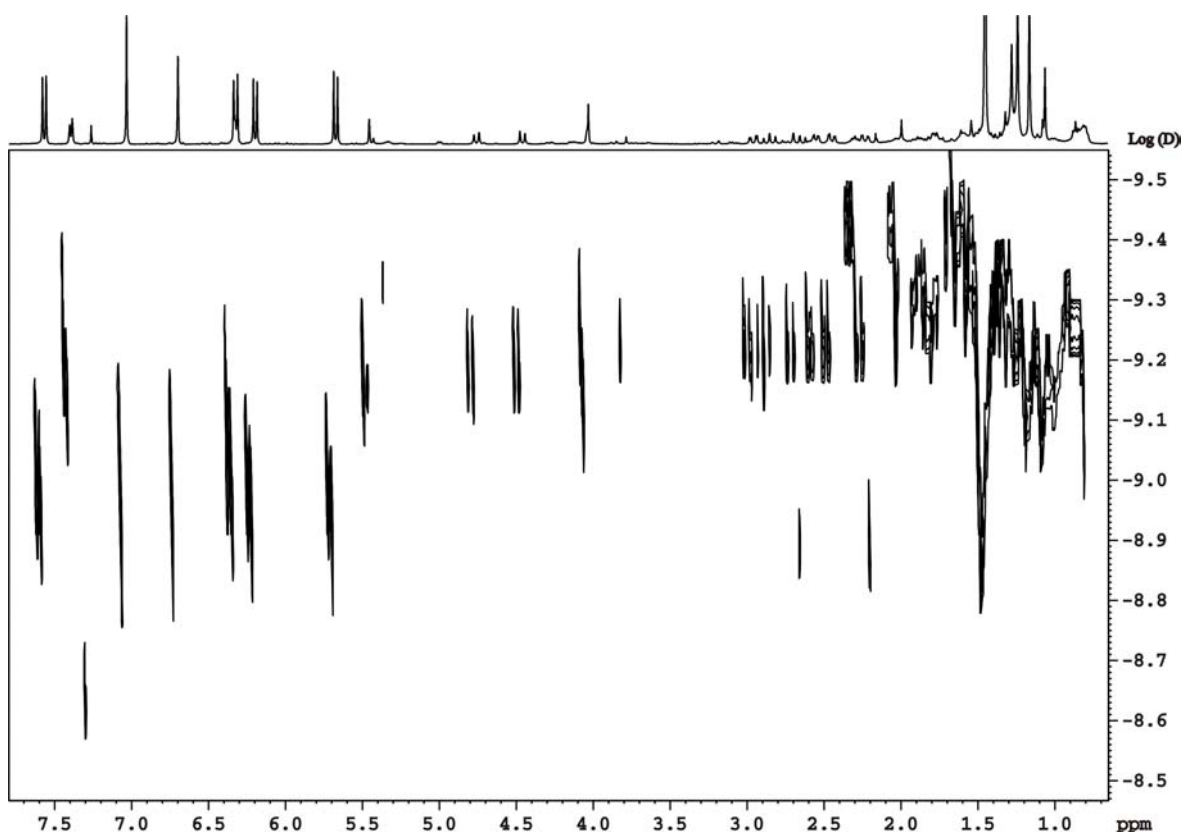
ESPECTRO 16 - Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) do composto **2** (limonina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 23)



ESPECTRO 17 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso PFGSTE

O espectro foi obtido empregando-se uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno, o programa de pulso STEBPGP1S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 6,3 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 7,4 μ s e de gradiente de 2,5 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 16 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

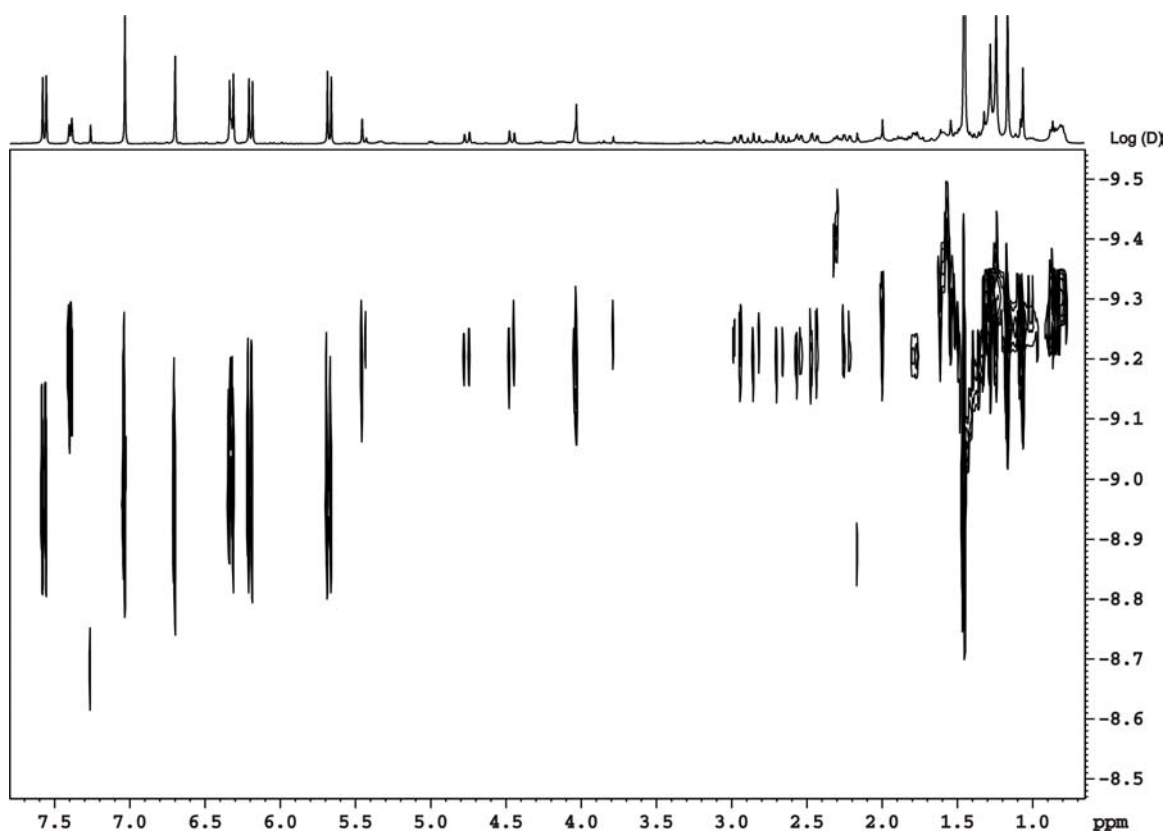
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 16 no eixo F_1 .



ESPECTRO 18 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso BPPSTE

O espectro foi obtido empregando-se uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno, o programa de pulso STEBPGP1S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 6,3 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 7,4 μ s e de gradiente de 1,1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 16 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

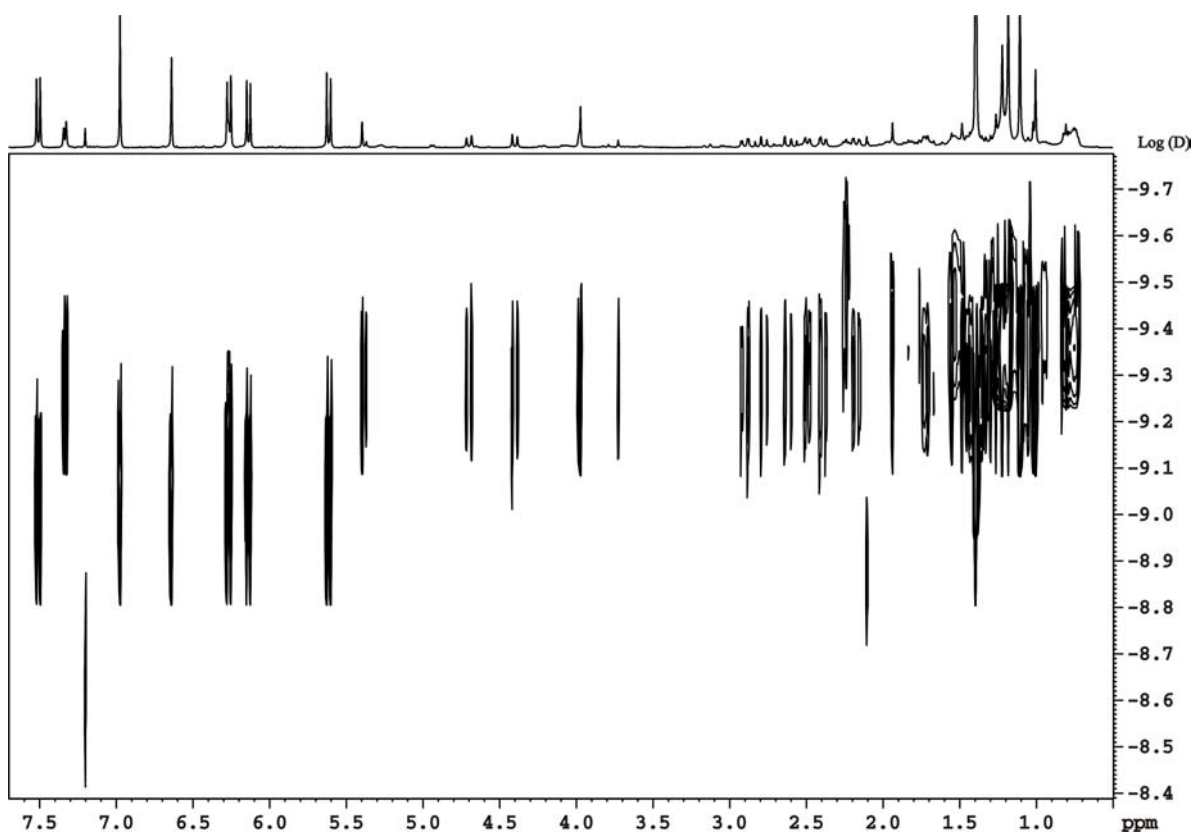
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 16 no eixo F_1 .



ESPECTRO 19 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso PFGLED

O espectro foi obtido empregando-se uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno, o programa de pulso LEDGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 6,3 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 7,4 μ s e de gradiente de 2,0 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 16 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

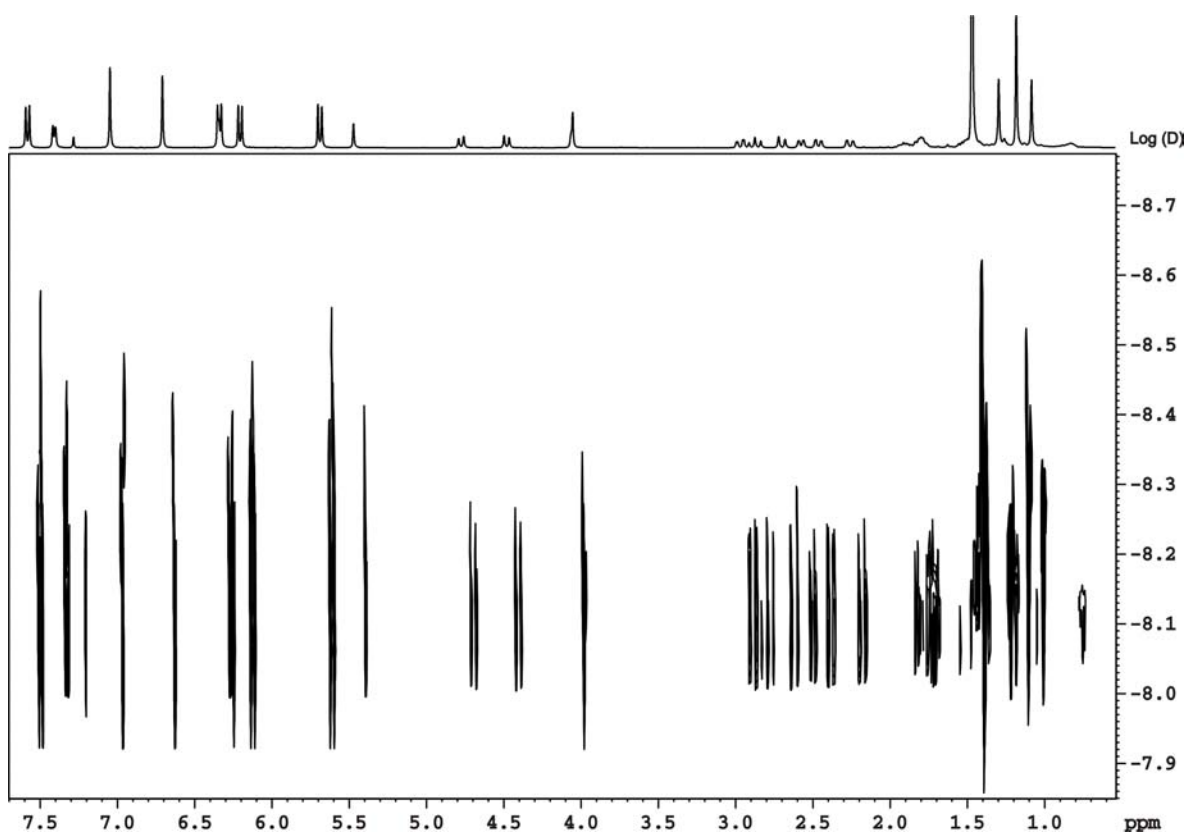
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 16 no eixo F_1 .



ESPECTRO 20 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido utilizando-se o programa de pulso BPPLED

O espectro foi obtido empregando-se uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno, o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 6,3 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 7,4 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 16 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

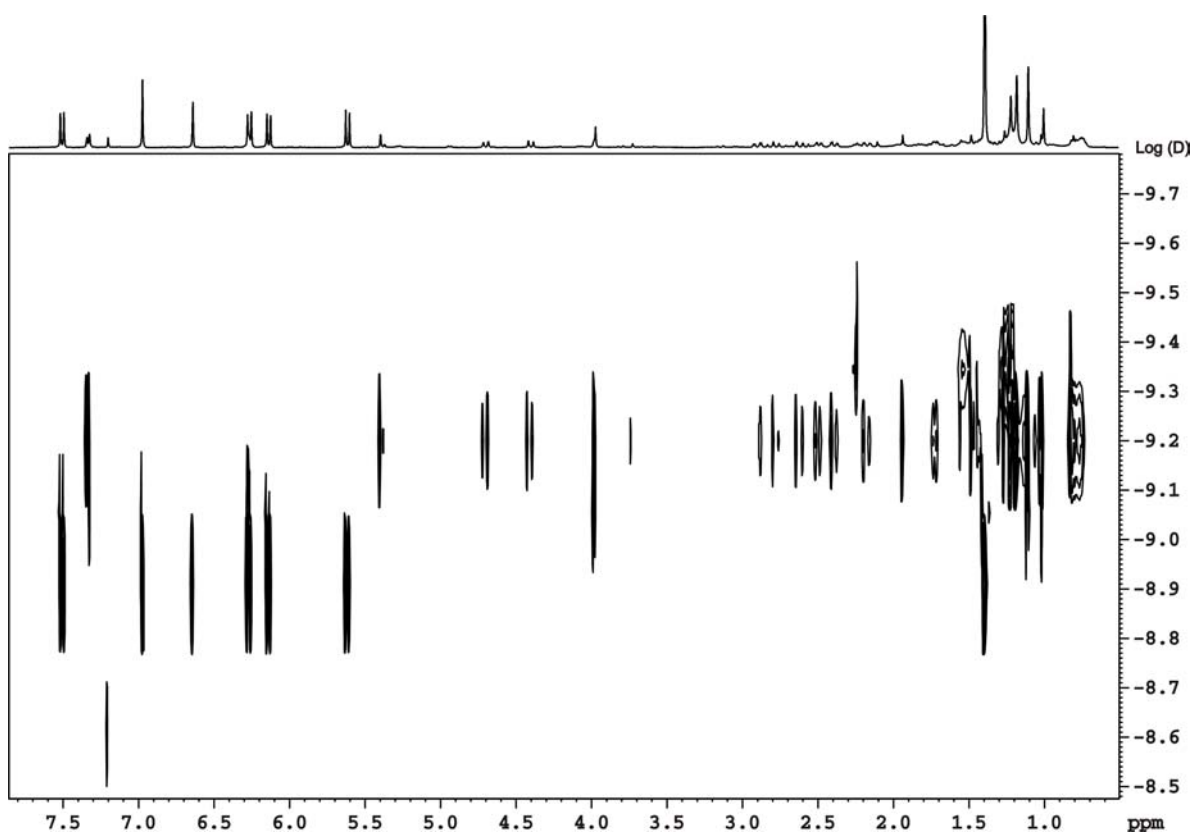
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 16 no eixo F_1 .



ESPECTRO 21 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão, realizado a temperatura de 303 K, utilizando-se uma sonda com 5 mm de diâmetro interno.

O espectro foi obtido à temperatura de 303 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,3 μ s e de gradiente de 1,1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

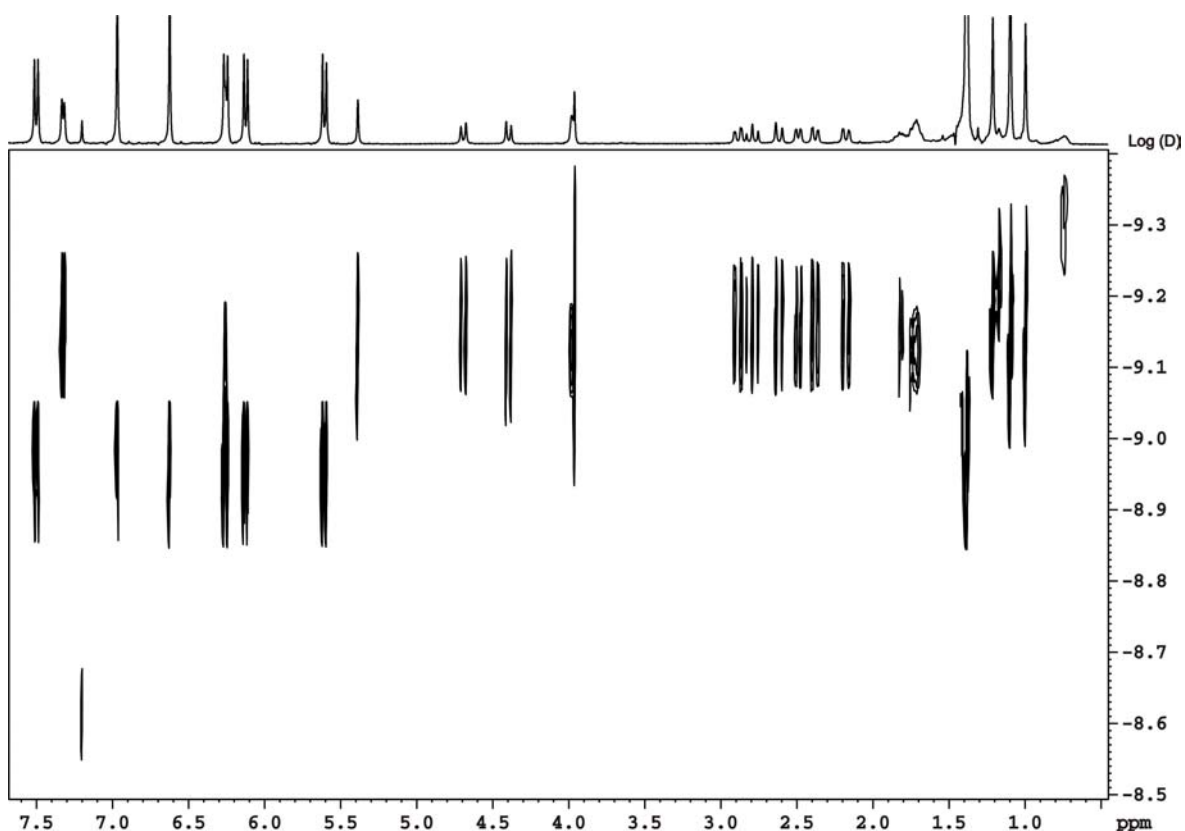
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 22 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão, realizado a temperatura de 303 K, utilizando-se uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, uma sonda com 2,5 mm de diâmetro interno, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 7,4 μ s e de gradiente de 1,1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

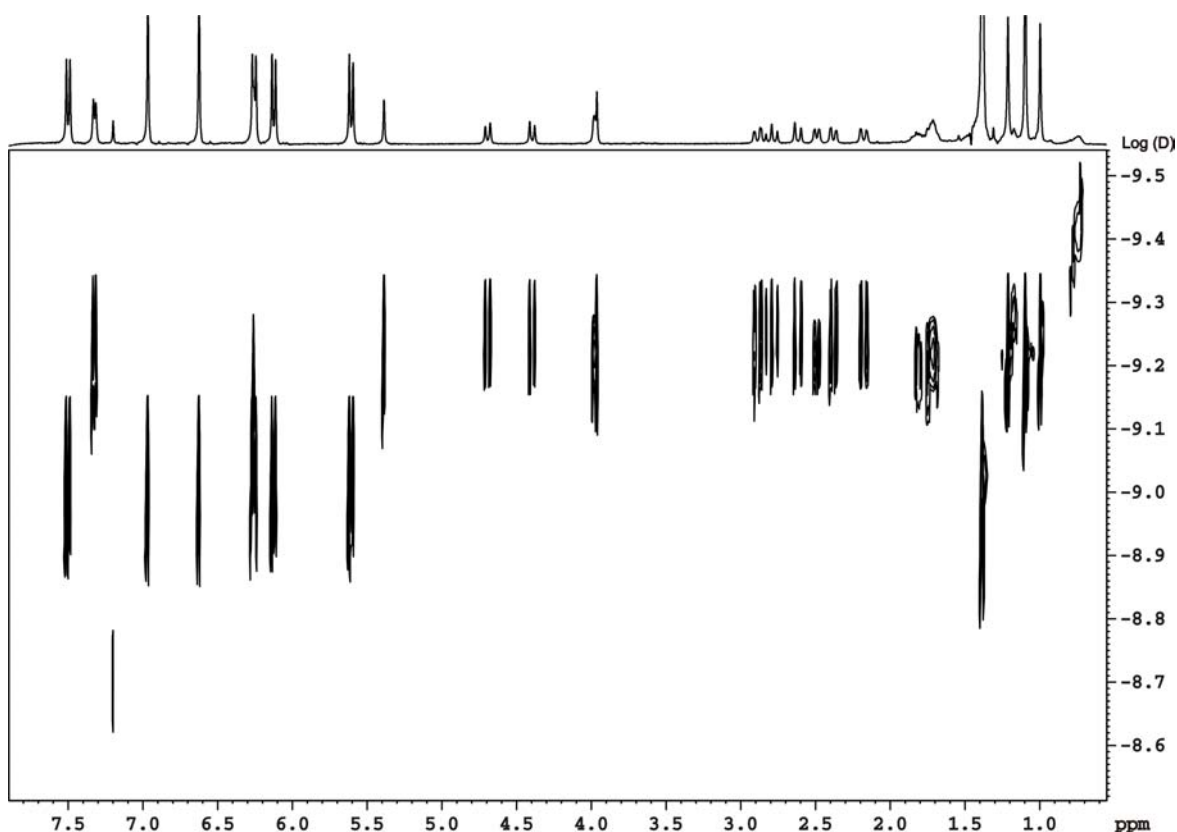
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 23 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura ambiente e com fluxo de ar comprimido

O espectro foi obtido à temperatura de 297,4 (\pm 0,2) K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

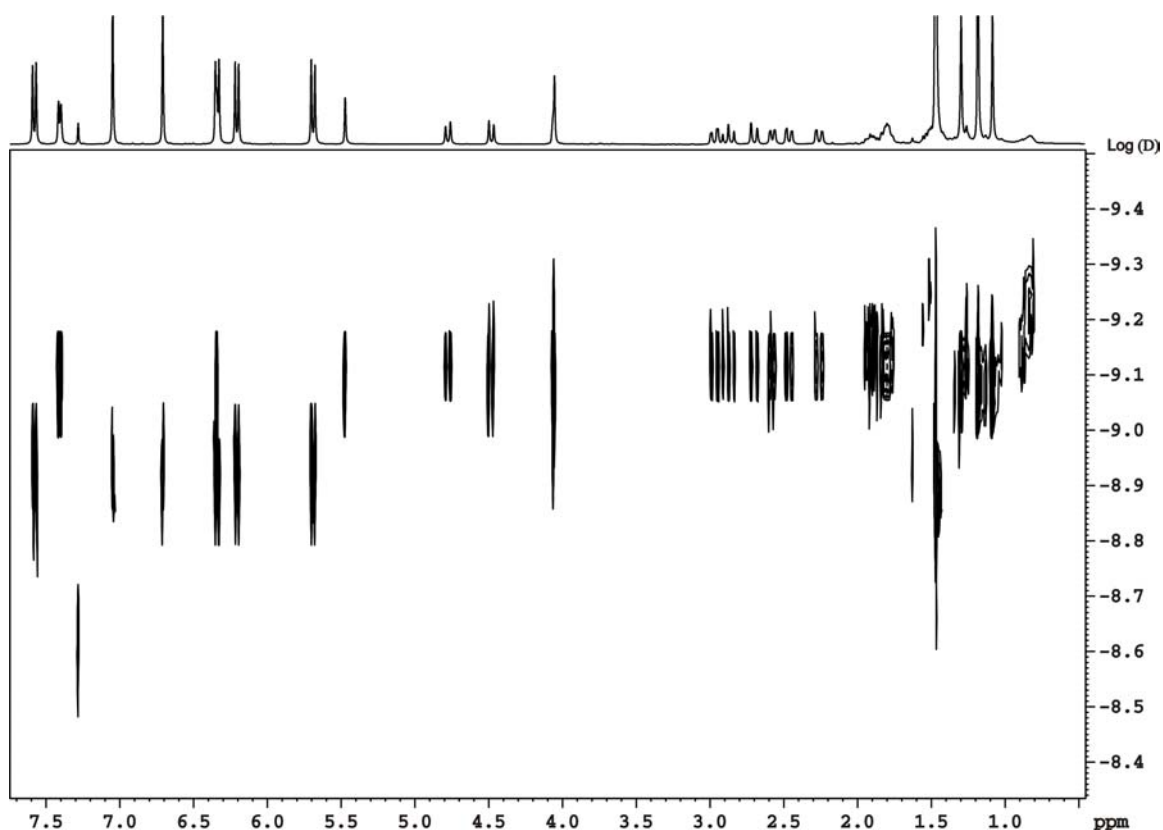
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 24 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura ambiente e sem fluxo de ar comprimido

O espectro foi obtido à temperatura de 297,5 (\pm 0,1) K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

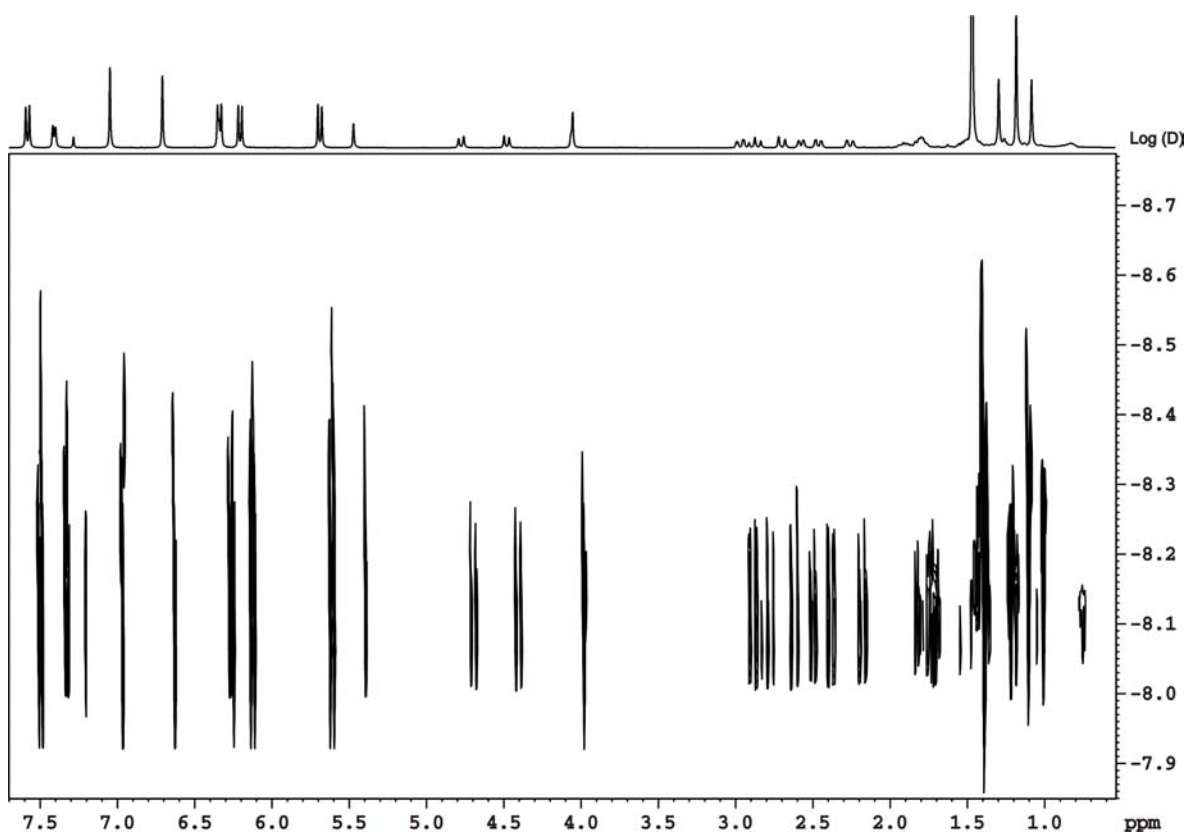
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 25 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 303K, com o giro da amostra

O espectro foi obtido à temperatura de 303 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

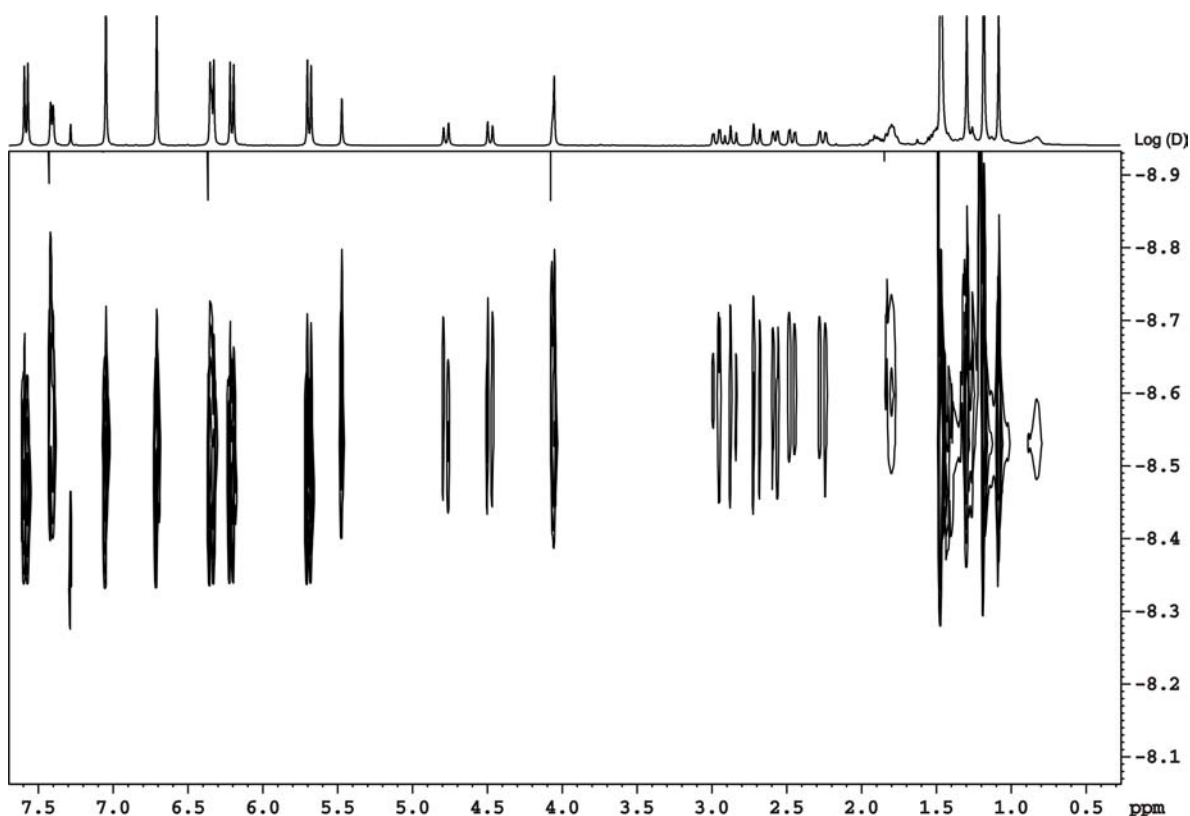
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 26 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 303K, sem o giro da amostra.

O espectro foi obtido à temperatura de 303 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

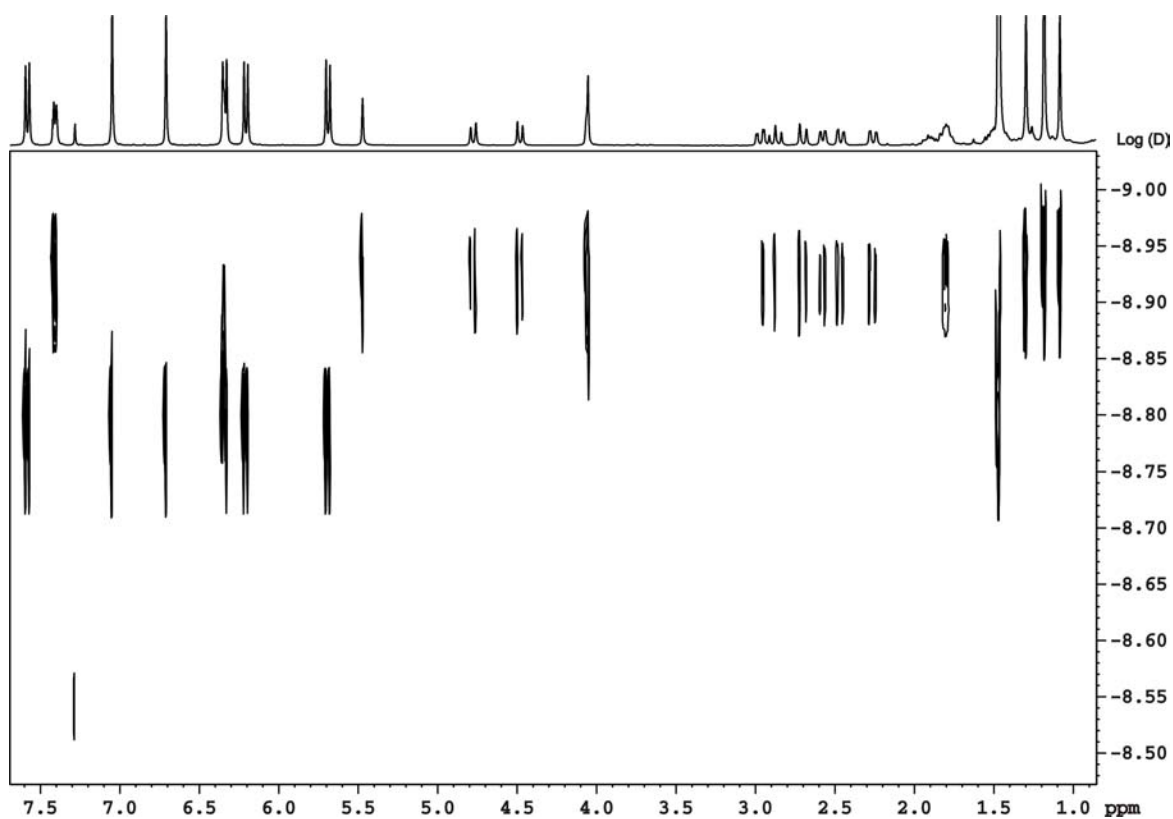
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 27 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 298 K, com o giro da amostra

O espectro foi obtido à temperatura de 298 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

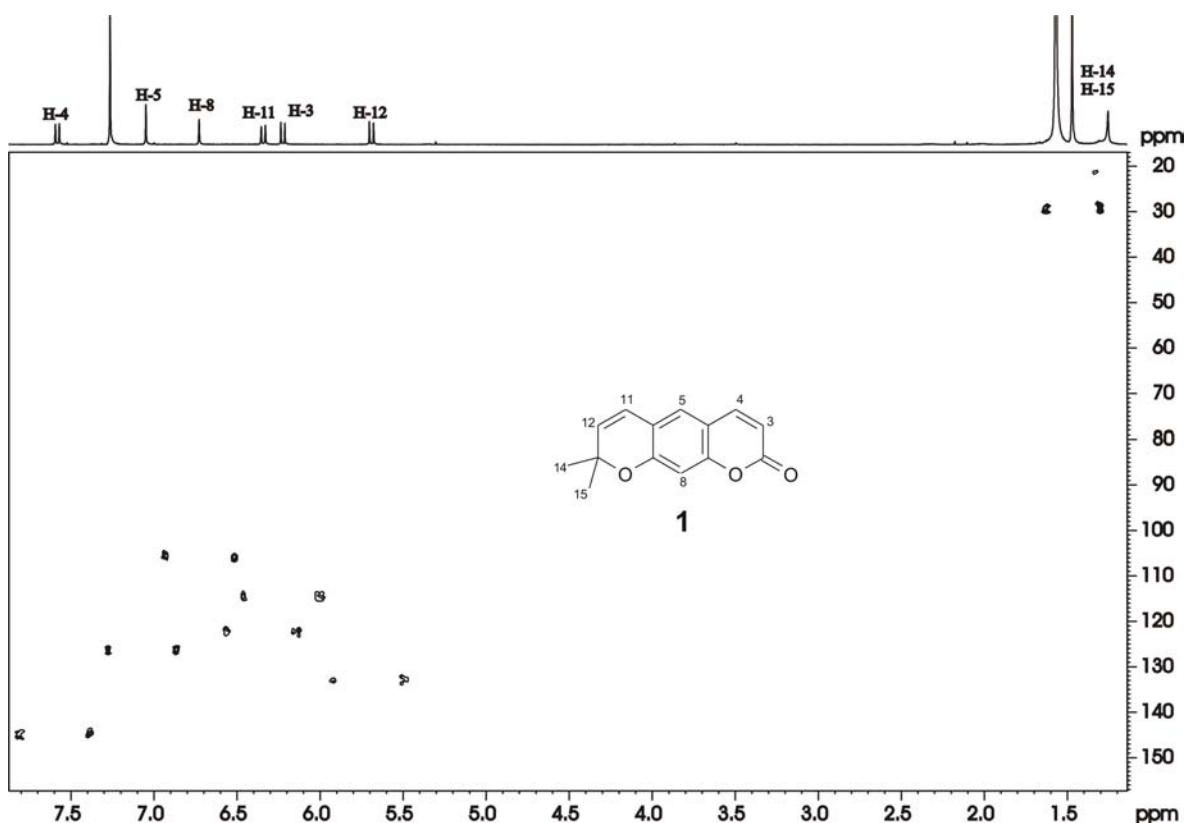
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 28 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura padrão obtido a temperatura de 298 K, sem o giro da amostra

O espectro foi obtido à temperatura de 298 K, empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3360,21 Hz, tempo de aquisição de 9,8 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,0 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

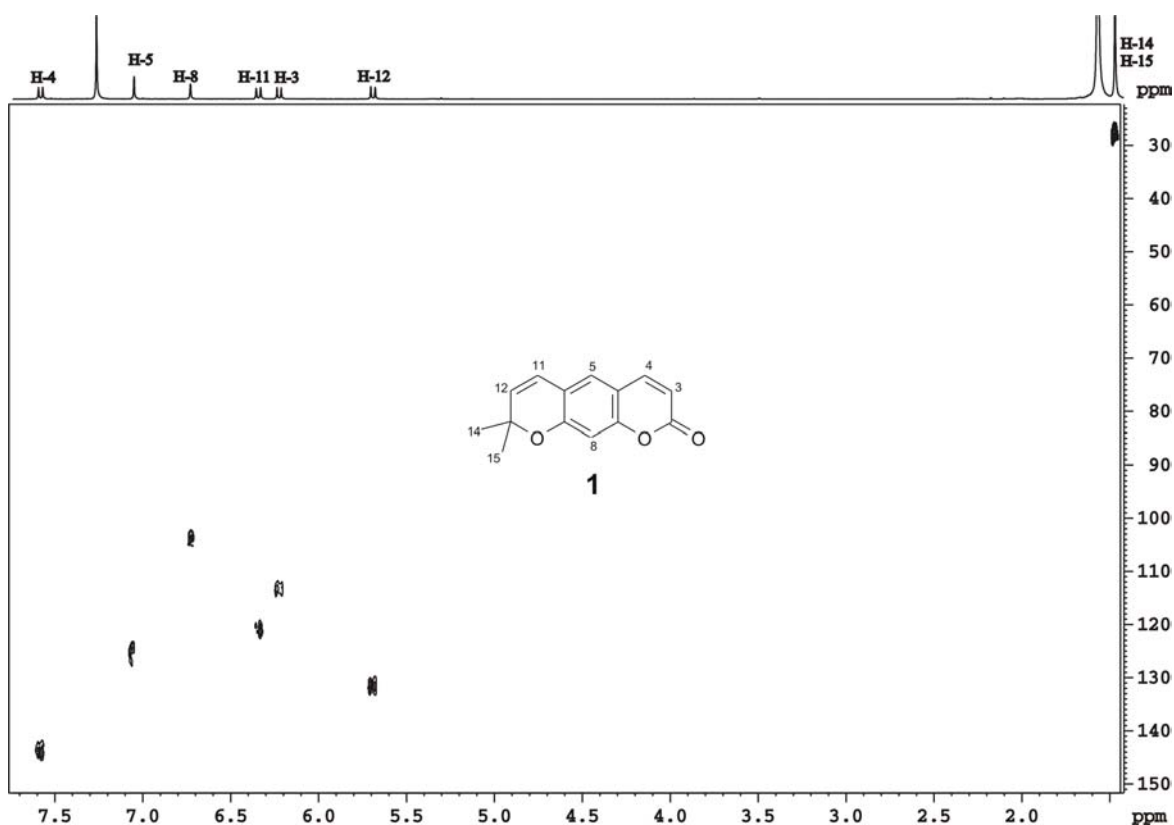
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 29 - Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) do composto **1** (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 25)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGPII2S3D, com 1 K pontos digitalizados em F_3 , larguras espectrais em F_3 e em F_1 de 3360,21 Hz e 18111,7 Hz, respectivamente, tempo de aquisição de 0,15 s, tempo de reciclagem de 8,6 s, duração dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μs e de gradiente de 1,0 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 12 e 64 experimentos para os eixos F_2 e F_1 , respectivamente. Foram utilizados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

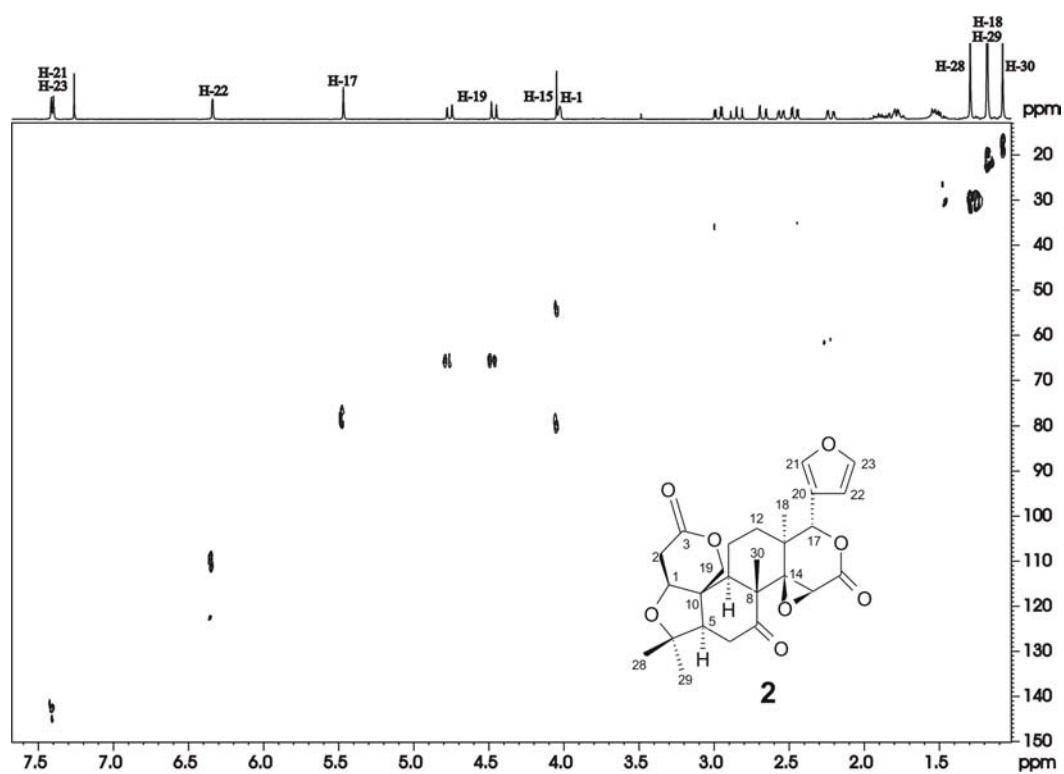
No processamento foram utilizados 1 K, 32 e 1 K pontos em F_3 , F_2 e F_1 e respectivamente, sendo empregada a função de apodização seno-seno elevado ao quadrado, com fator de deslocamento de 3 para os eixos F_3 e F_1 .



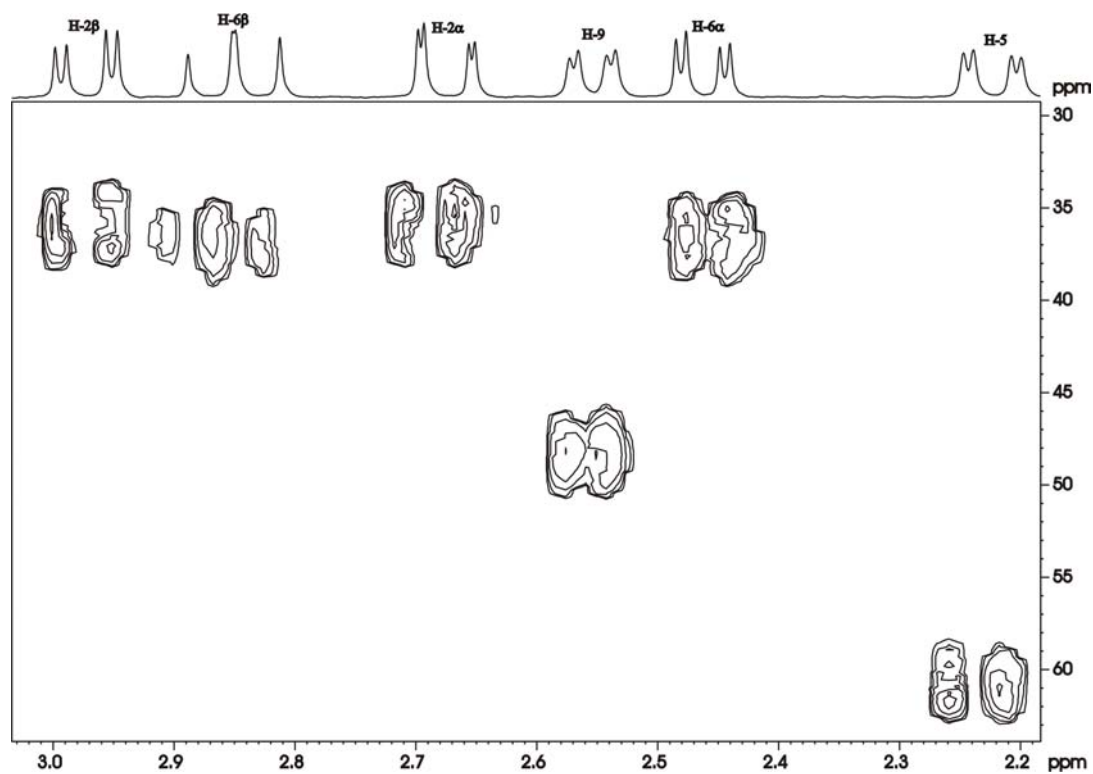
ESPECTRO 30 - Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1=400,13 e ^{13}C SFO2=100,52 MHz) do composto **1** (xantiletina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 25)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGPII2S3D, com 1 K pontos digitalizados em F_3 , larguras espectrais em F_3 e em F_1 de 3360,21 Hz e 18111,7 Hz, respectivamente, tempo de aquisição de 0,15 s, tempo de reciclagem de 4,6 s, tempo de saturação do sinal dos hidrogênios ligados ao ^{12}C de 1 ms, duração dos pulsos de rf (90°) de 8,5 μs e de gradiente de 1,0 ms. Foram acumulados 32 FIDs e realizados 10 e 64 experimentos para os eixos F_2 e F_1 , respectivamente. Foram utilizados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

No processamento foram utilizados 1 K, 32 e 1 K pontos em F_3 , F_2 e F_1 e respectivamente, sendo empregada a função de apodização seno-seno elevado ao quadrado, com fator de deslocamento de 3 para os eixos F_3 e F_1 .

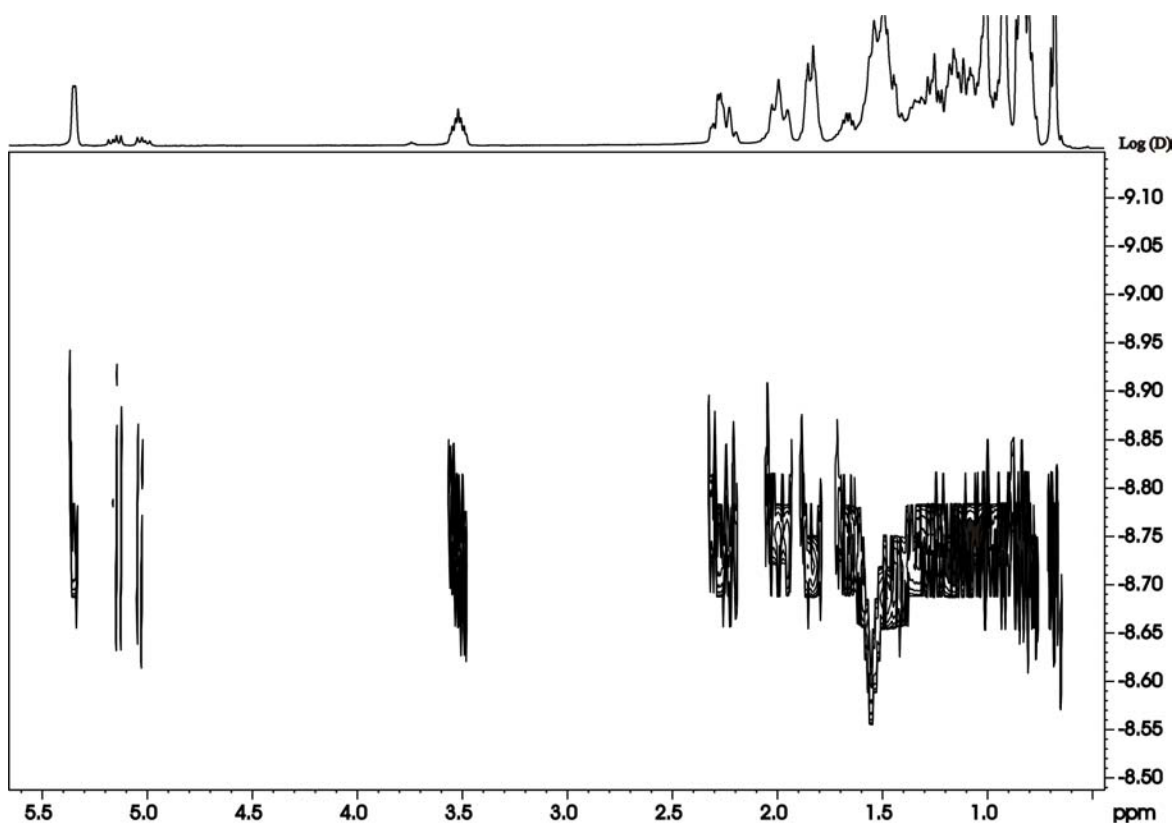


a)



b)

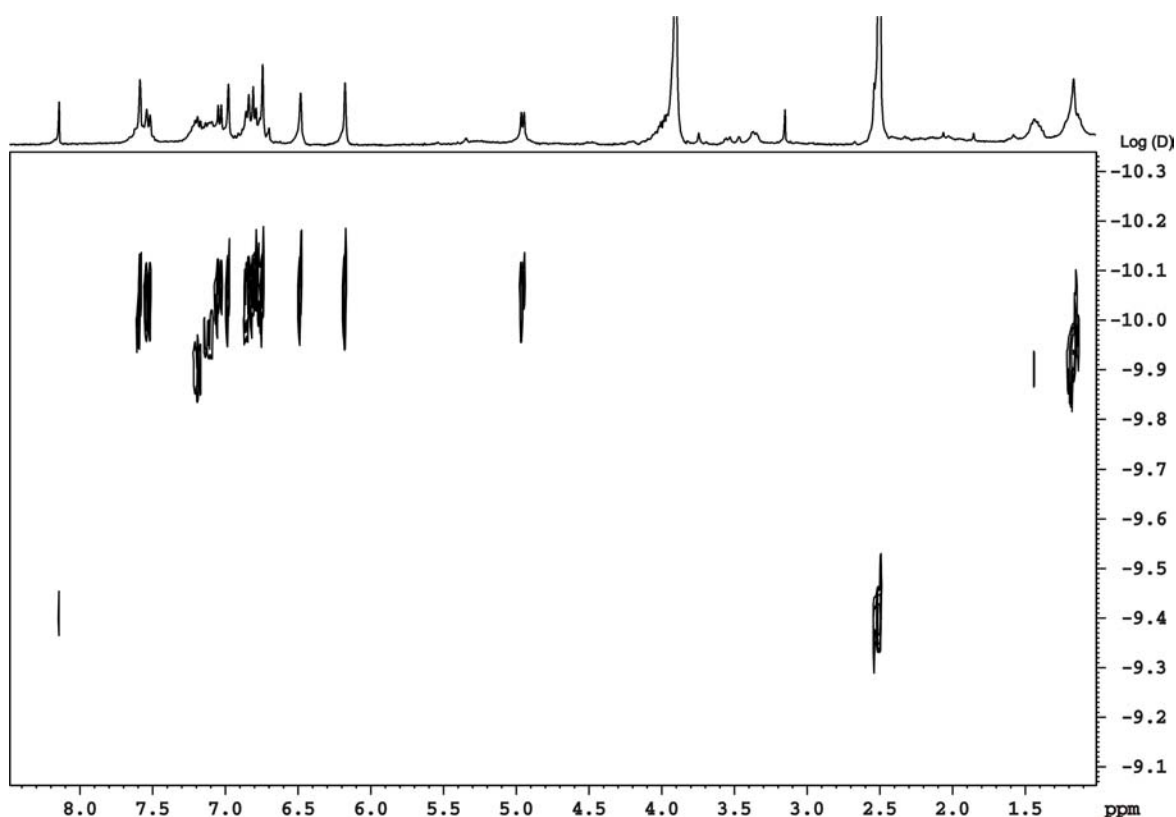
ESPECTRO 31 - Espectro de RMN de HSQC (^1H SFO1=400,13 e ^{13}C SFO2=100,52 MHz) do composto **2** (limonina) extraído de um experimento de DOSY-HSQC (corte 32). a) região de δ 1,0 a 8,0 ppm, δ b) de δ 2,2 a 3,0 ppm.



ESPECTRO 32 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos esteróides β -sistosterol (4) e estigmasterol (5)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3238,34 Hz, tempo de aquisição de 5,1 s, tempo de reciclagem de 2,2 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,0 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 64 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

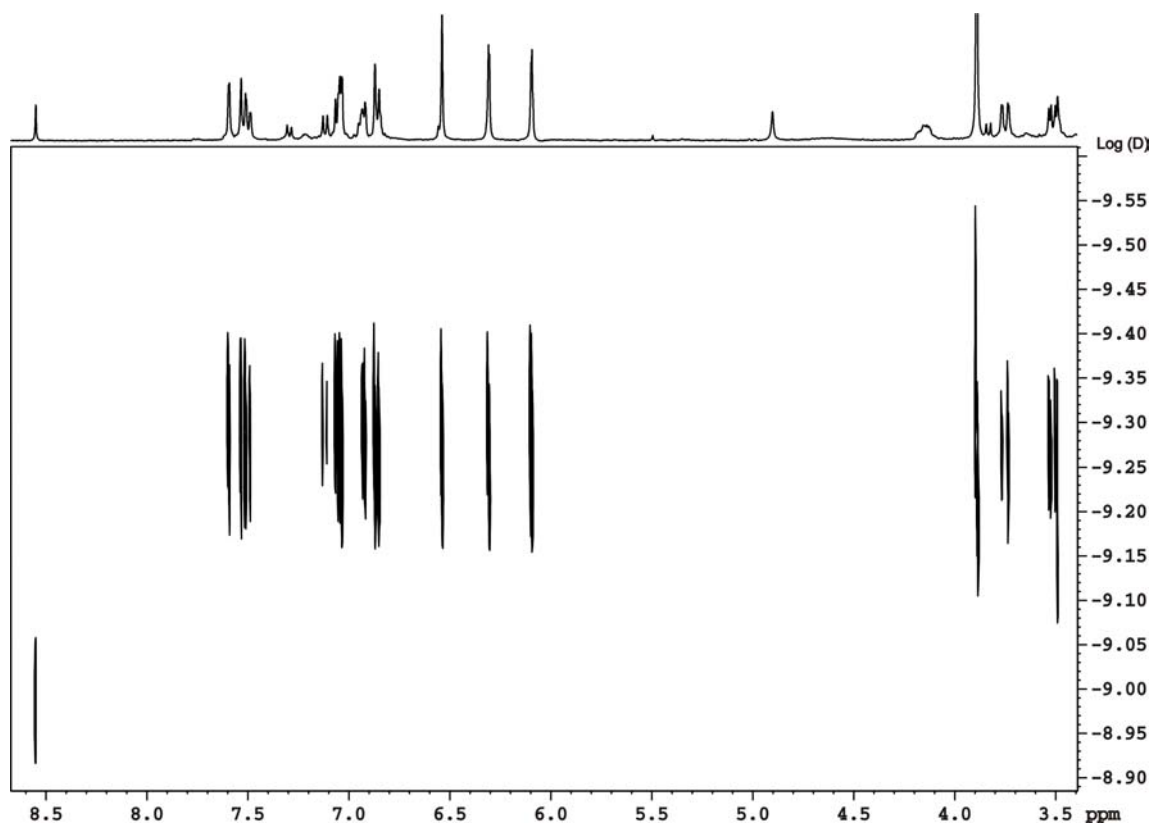
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 64 no eixo F_1 .



ESPECTRO 33 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos flavonóides luteolina (**6**), 3'-o-metil luteolina (**7**) e 3-o-metoxi-3'-o-metil luteolina (**8**), em DMSO-d₆.

O espectro foi obtido empregando-se uma sonda de 2,5 mm de diâmetro interno, o programa de pulso STEBPGP1S19, com largura espectral em F_2 de 3980,84 Hz, tempo de aquisição de 4,1 s, tempo de reciclagem de 1s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 6,8 μ s e de gradiente de 2,5 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados DMSO-d₆ como solvente e TMS como referência interna.

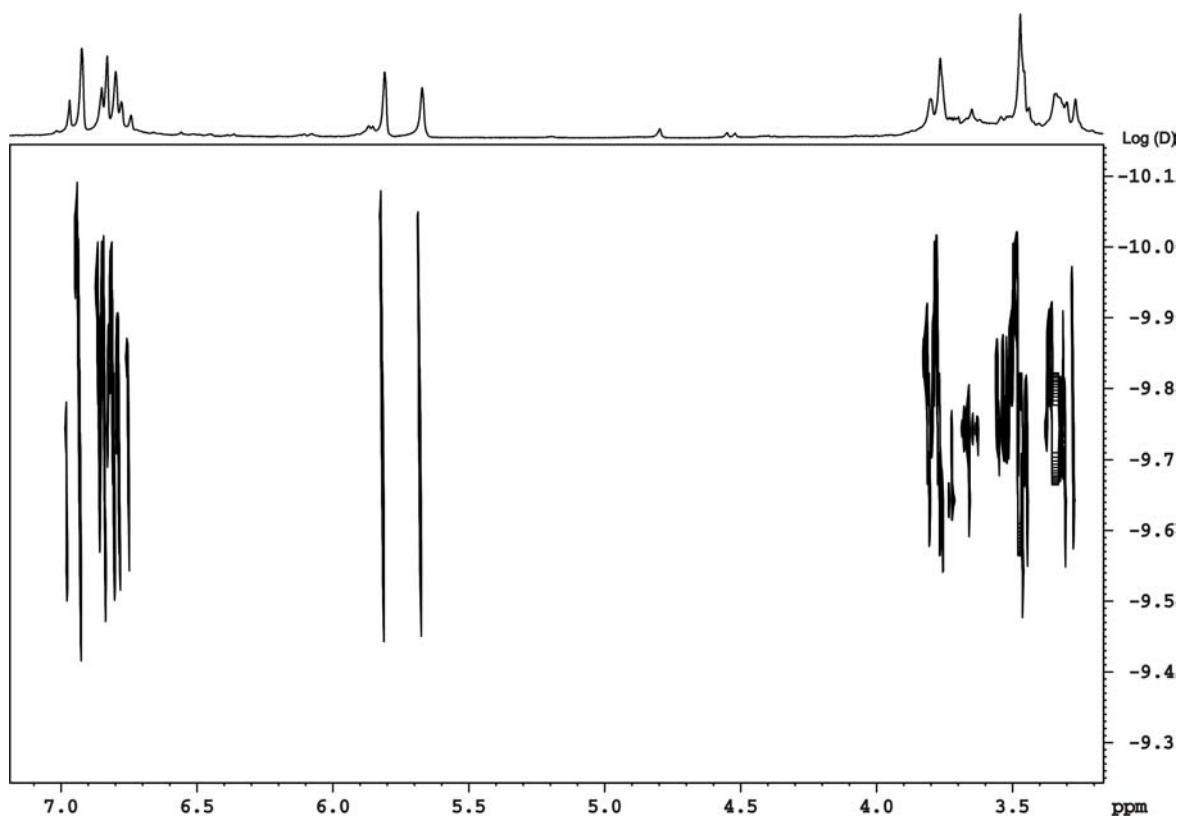
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 34 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) mistura dos flavonóides luteolina (**6**), 3'-o-metil luteolina (**7**) e 3-o-metoxi-3'-o-metil luteolina (**8**), em MeOH-d₄

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3955,69 Hz, tempo de aquisição de 8,3 s, tempo de reciclagem de 0,1 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,3 ms. Foram acumulados 16 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados MeOH-d₄ como solvente e TMS como referência interna.

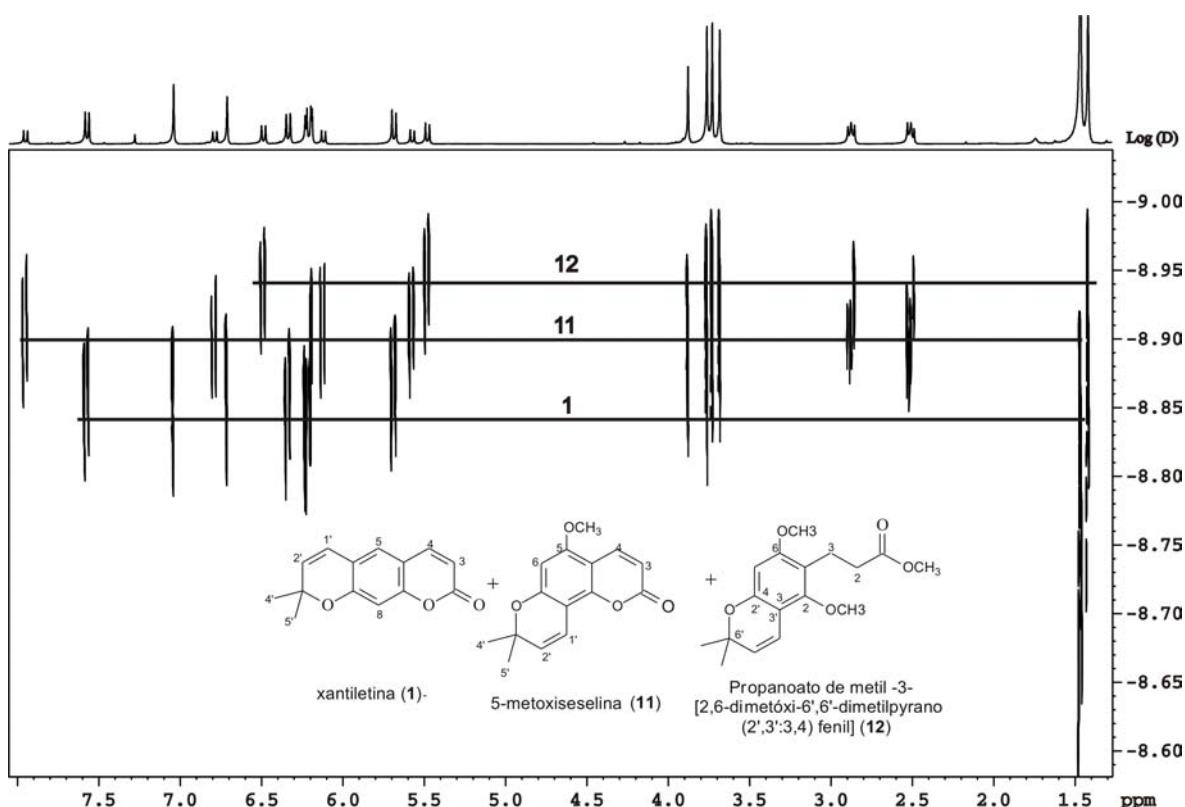
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



ESPECTRO 35 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos flavonóides taxifolin (**9**) e um derivado C3-O-glicosilado (**10**)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 4708,10 Hz, tempo de aquisição de 7,0 s, tempo de reciclagem de 0,1 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 8,5 μs e de gradiente de 2,5 ms. Foram acumulados 32 FIDs e realizados 32 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados D_2O como solvente e TMS como referência interna.

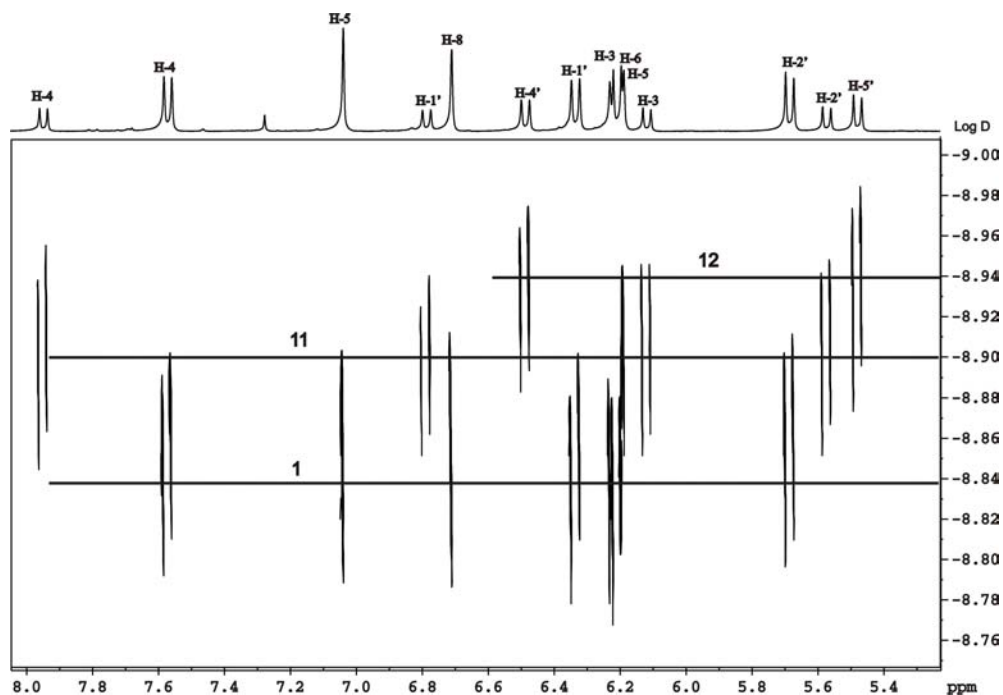
O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .



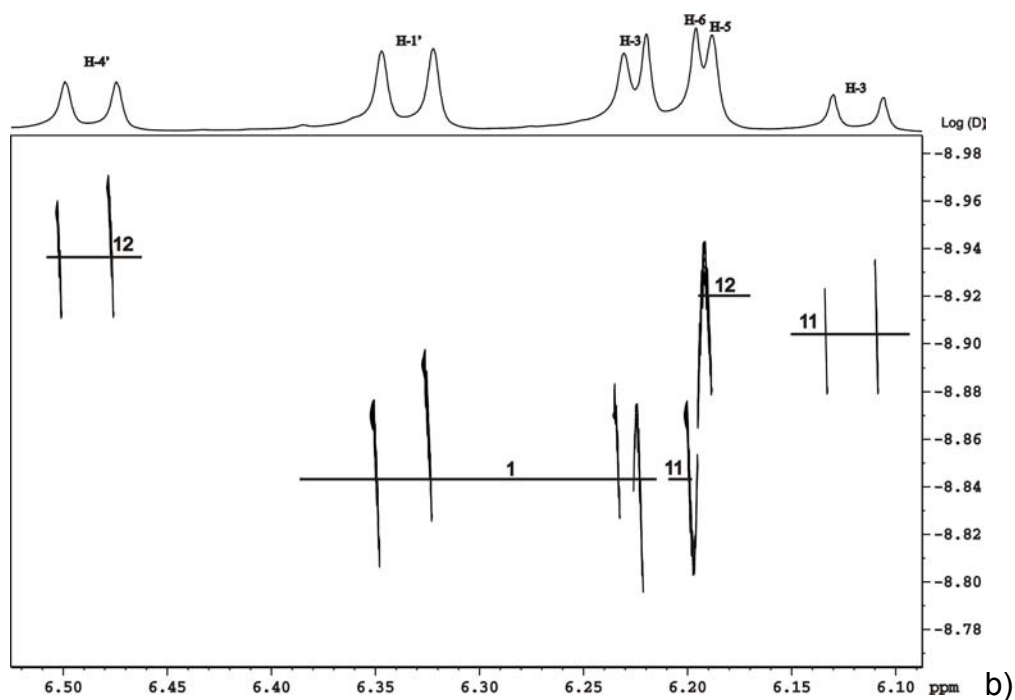
ESPECTRO 36 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura da cumarina linear xantiletina (1), da cumarina angular 5-metoxiseselina (11) o do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetóxi-6',6'-dimetilpirano (2',3':3,4)-fenil] (12)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 3698,22 Hz, tempo de aquisição de 8,9 s, tempo de reciclagem de 1 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 8,5 μ s e de gradiente de 1,2 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 64 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .

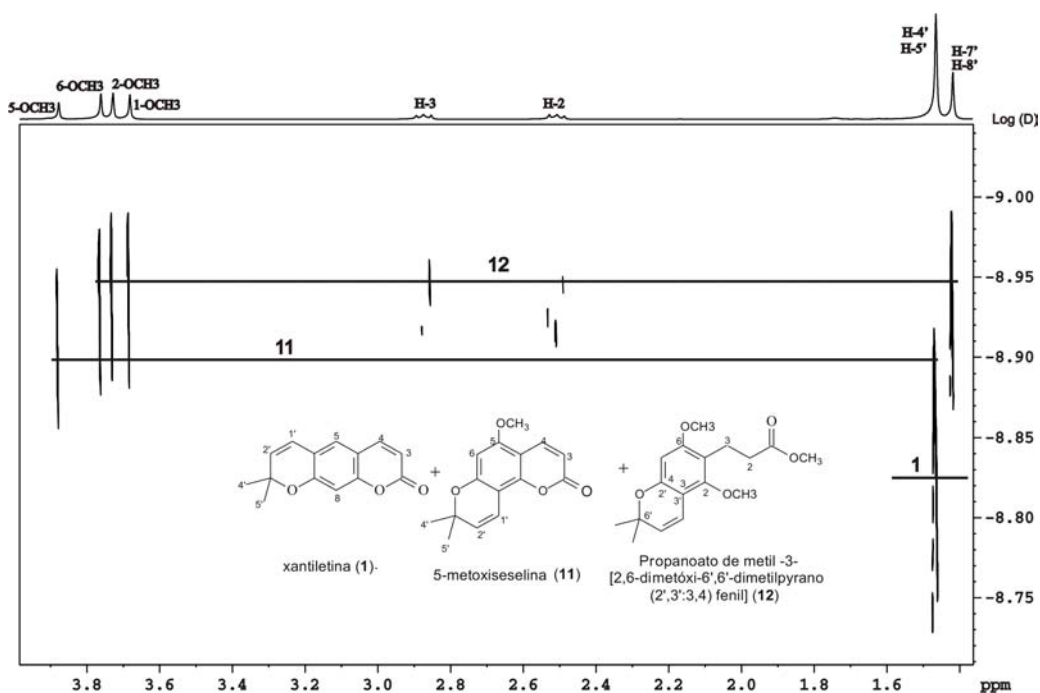


a)

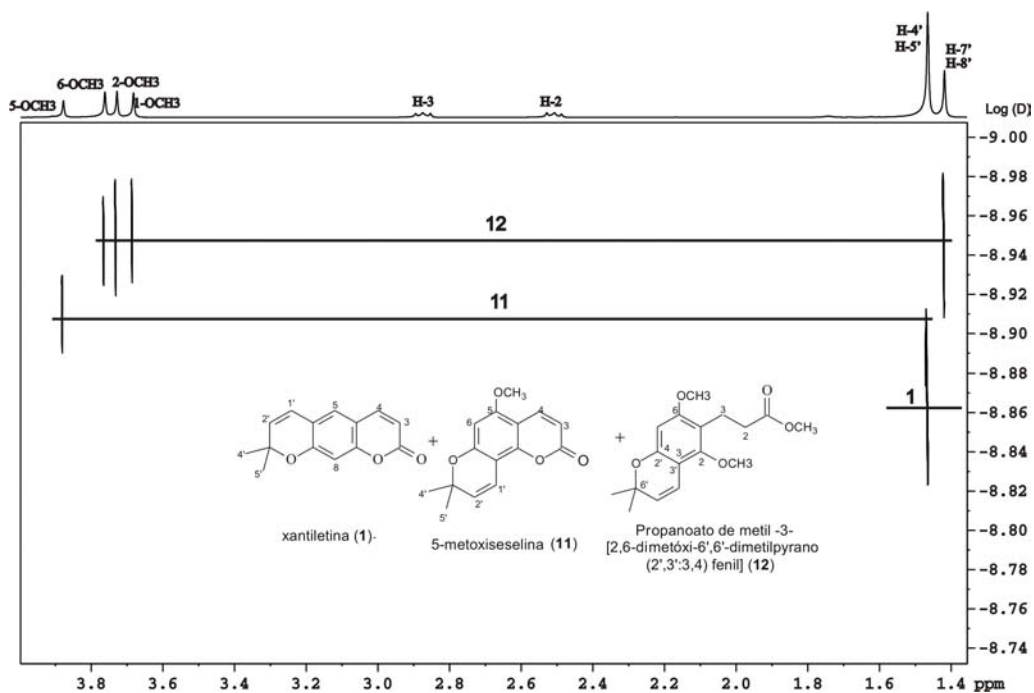


b)

ESPECTROS 37 – Expansões do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura da cumarina linear xantiletina (**1**), da cumarina angular 5-metoxiseselina (**11**) o do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'dimetilpirano (2'3':3,4)-fenil (**12**) a) região de δ 8,0 a 5,3 a ppm e b) região de δ 4,0 a 1,4 ppm.

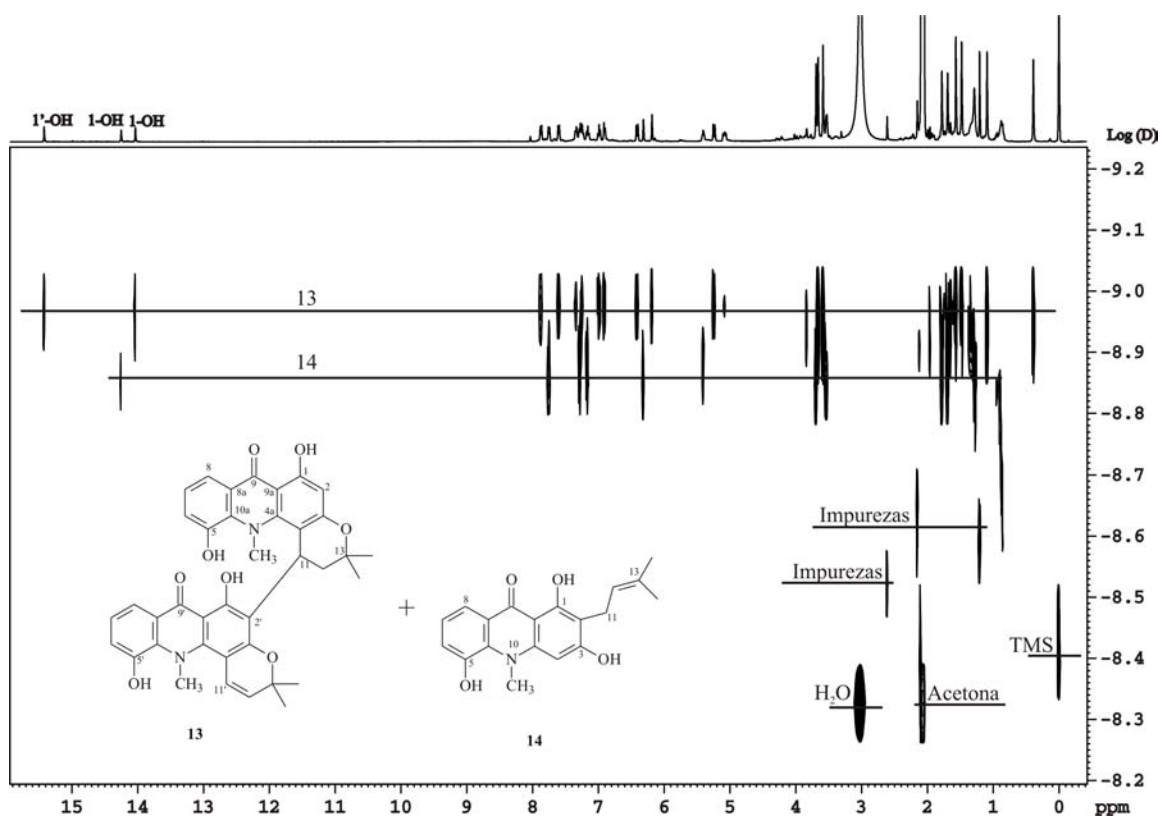


a)



b)

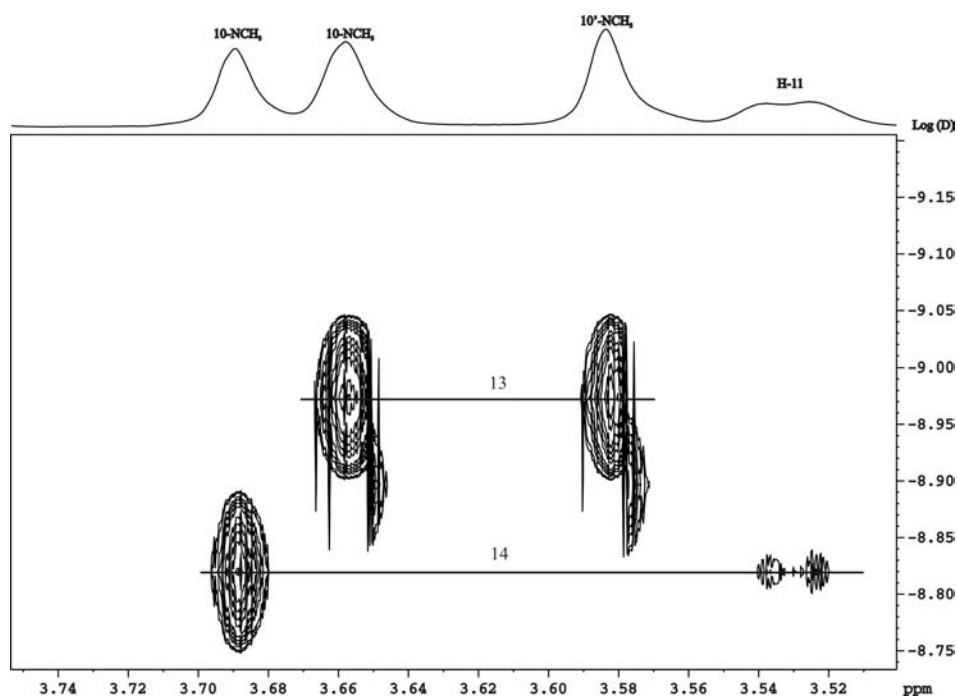
ESPECTROS 38 - Expansões da região de δ 1,4 a 4,0 ppm do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) mistura da cumarina linear xantiletina (1), da cumarina angular 5-metoxiseselina (11) o do éster propanoato de metil-3[2,6-dimetoxi-6',6'-dimetilpirano (2',3':3,4)-fenil] (12); a) corte inferior e b) corte superior.



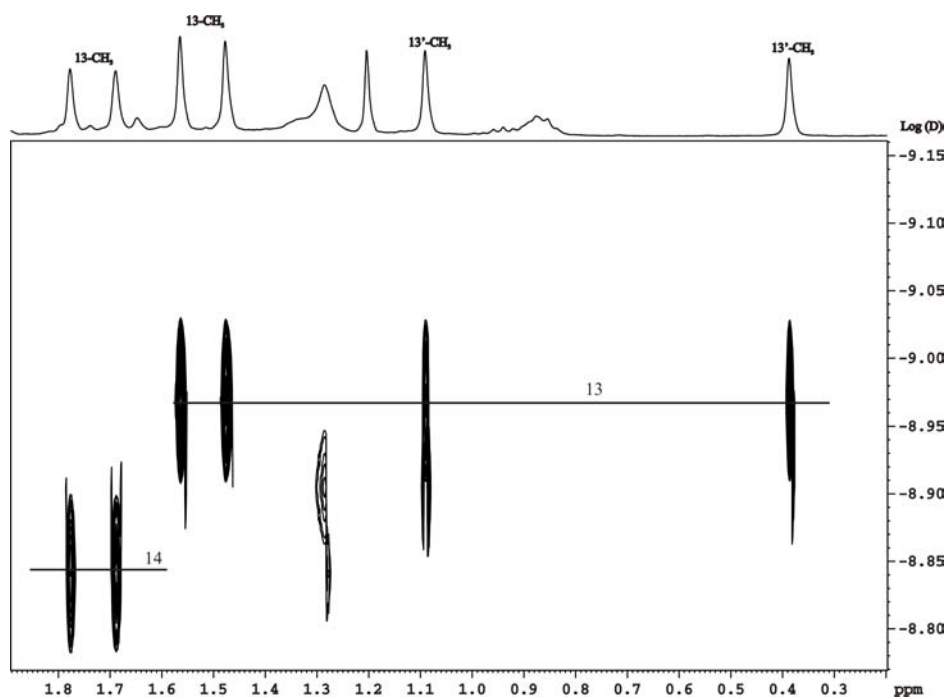
ESPECTRO 39 - Espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos alcalóides bis-5-hydroxynoracronicina (**13**) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (**14**)

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso LEDBPGP2S, com largura espectral em F_2 de 7102,27 Hz, tempo de aquisição de 4,6 s, tempo de reciclagem de 4,1 s, tempo de aplicação do pulso de rf (90°) de 9 μ s e de gradiente de 1,0 ms. Foram acumulados 16 FIDs e realizados 64 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados acetona- d_6 como solvente e TMS como referência interna.

O processamento foi realizado com 32 K pontos no eixo F_2 e 32 no eixo F_1 .

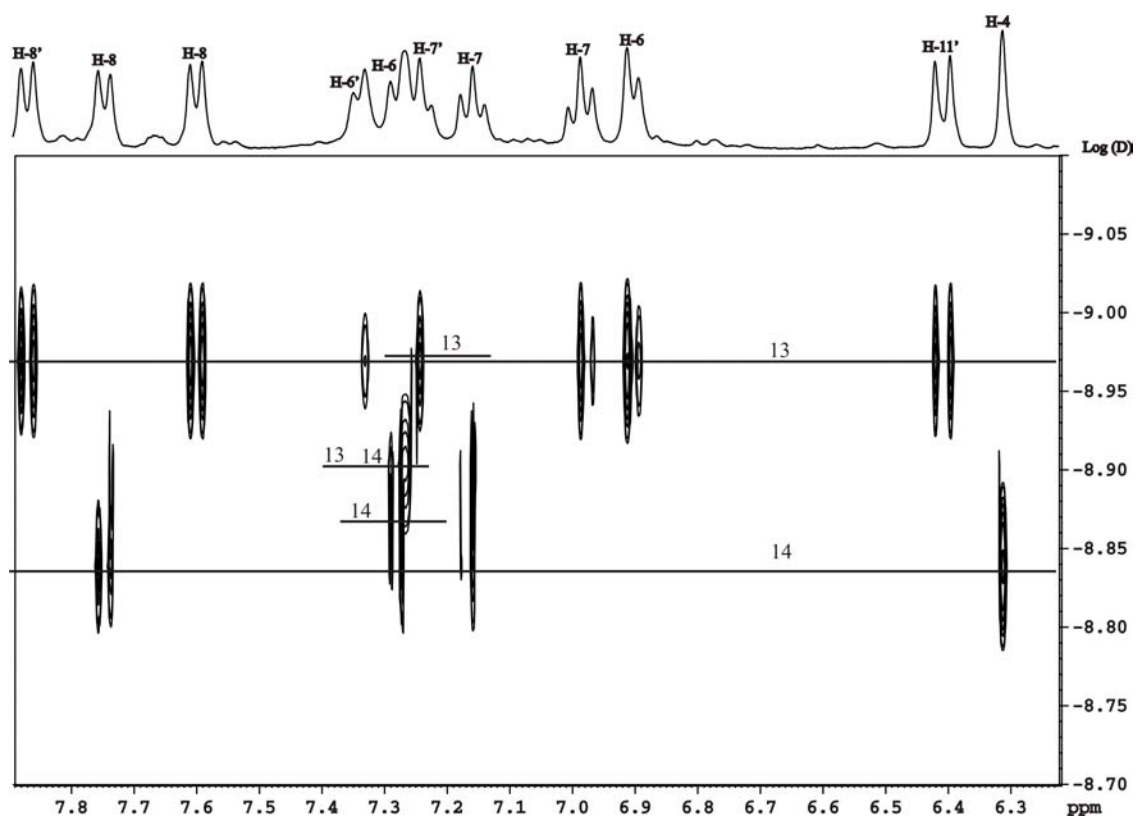


a)

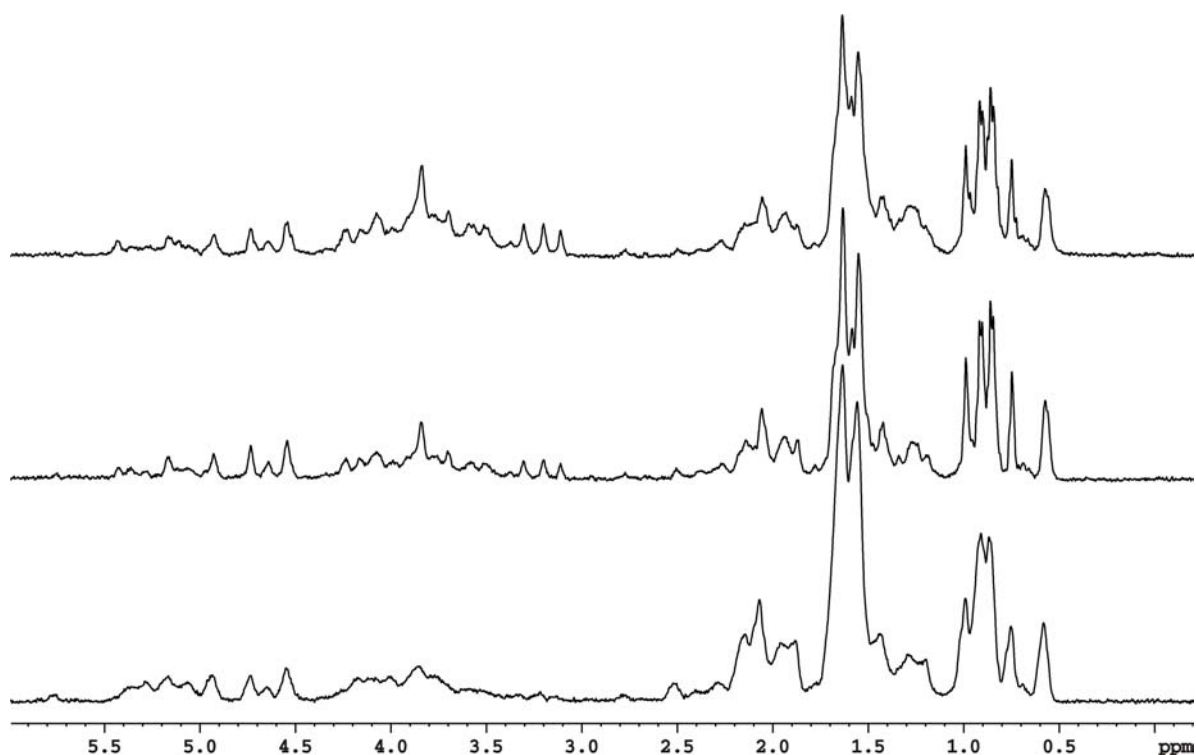


b)

ESPECTROS 40 - Expansões do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos compostos bis-5-hydroxinoracronicina (**13**) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (**14**), a) região de δ 3,50 a 3,76 ppm e b) região de δ 0,2 a 2,0 ppm.



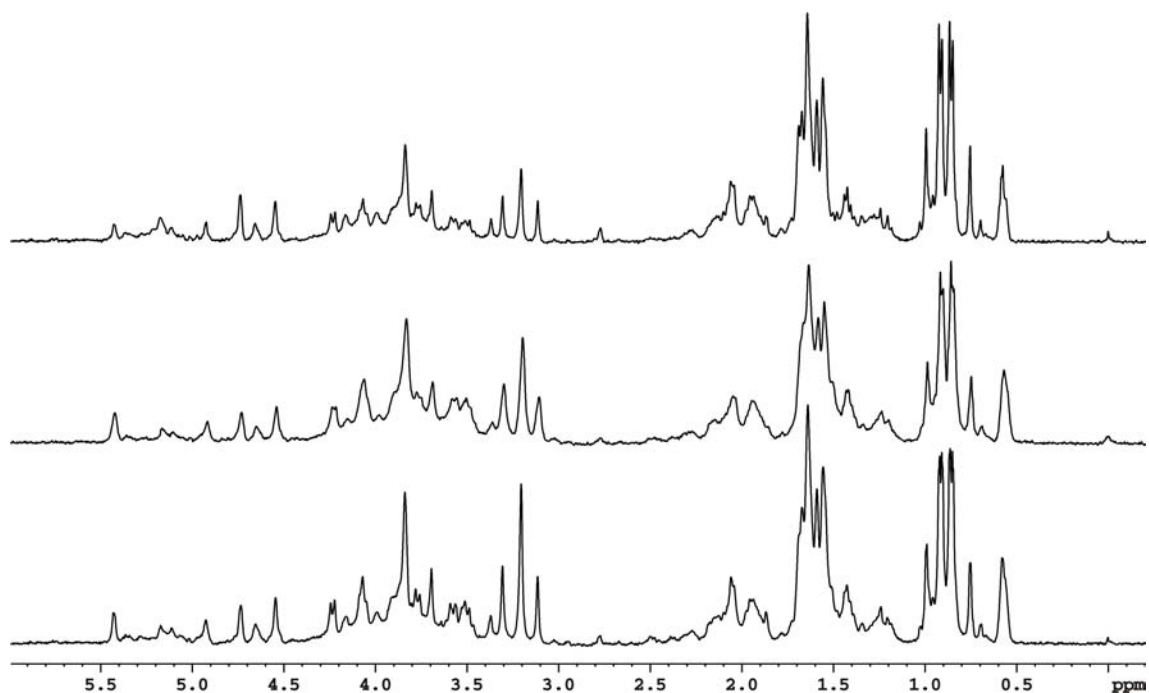
ESPECTRO 41 - Expansão do espectro de RMN de DOSY (SFO1 = 400,13 MHz) da mistura dos compostos bis-5-hydroxinoracronicina (**13**) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridone (**14**), região de δ 6,2 a 8,0 ppm



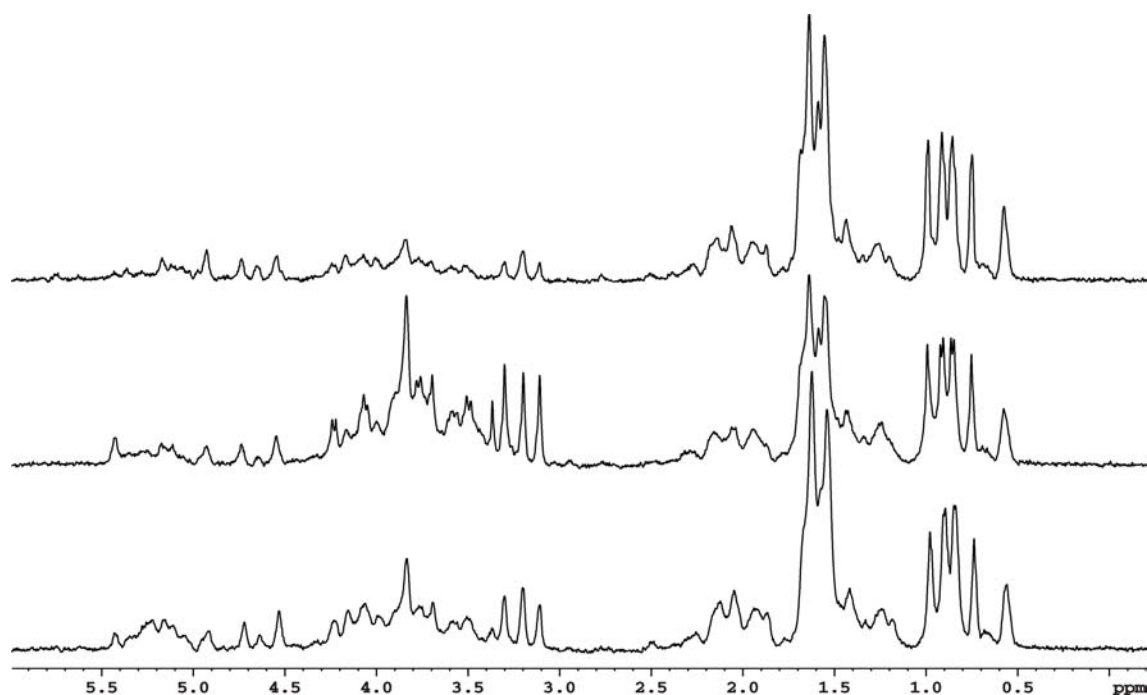
ESPECTROS 1 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* de variedade desconhecida

Os espectros foram obtidos empregando-se a seqüência de pulso CPMG com pré-saturação do sinal da água (zgpr), com tempo de eco (τ) de 1 ms, 150 ciclos (n), potência do pulso de pré-saturação de 60 dB, largura espectral de 7062,15 Hz, tempo de aquisição de 2,3 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, duração do pulso de rf de 12,25 μs . Foram acumulados 512 FIDs e empregados D_2O como solvente e TSPA- d_4 como referência interna.

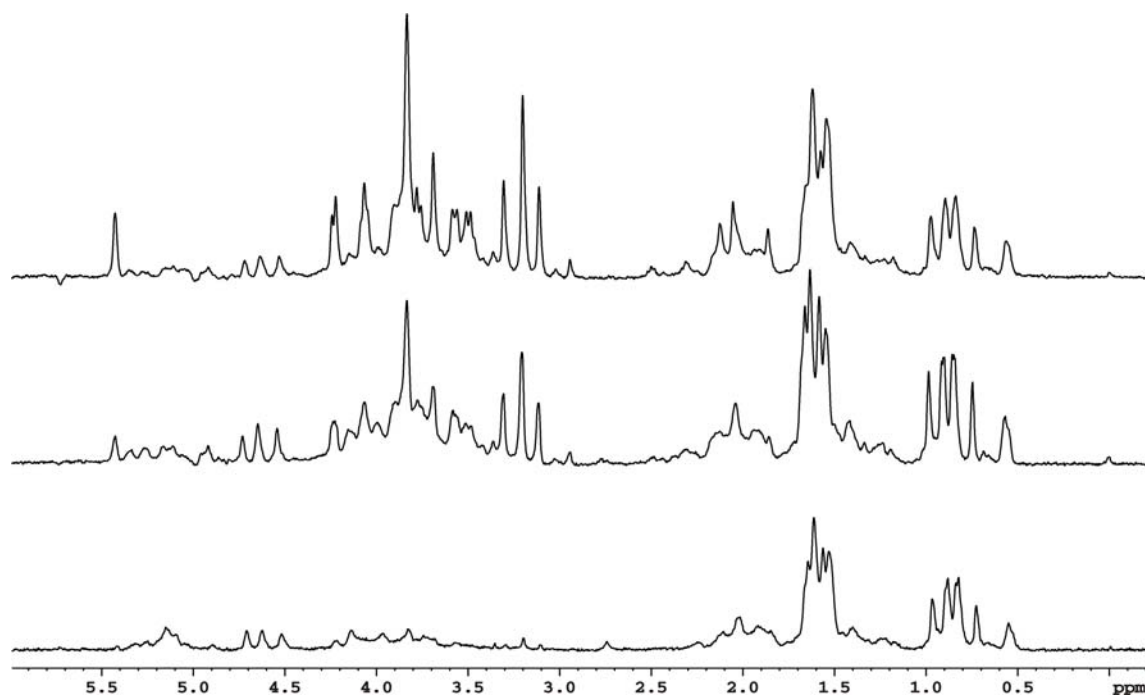
O processamento foi realizado com *zero filling* (SI = 32 K) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (lb) de 1 Hz.



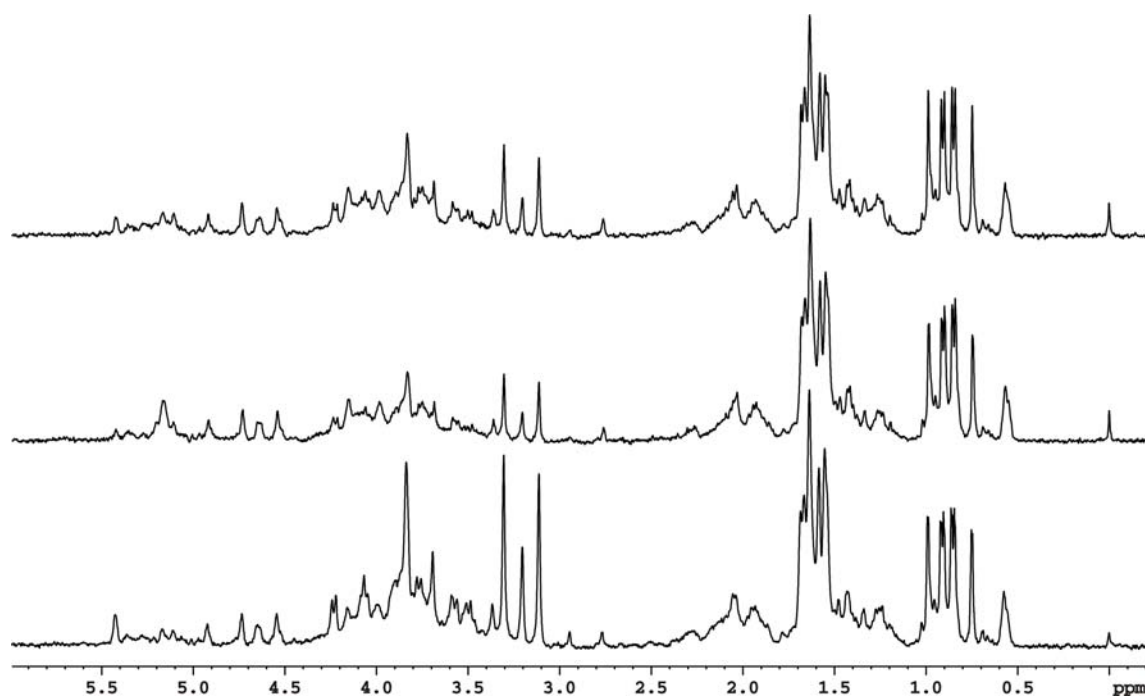
ESPECTROS 2 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* da variedade Hamlim



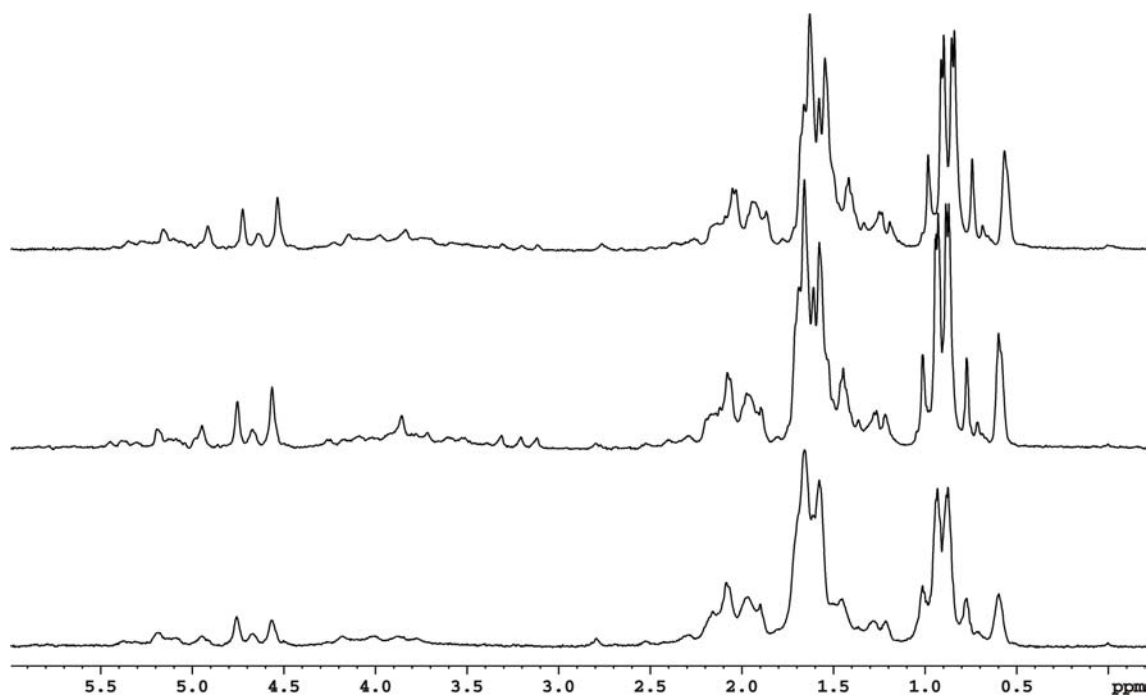
ESPECTROS 3 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* da variedade Natal



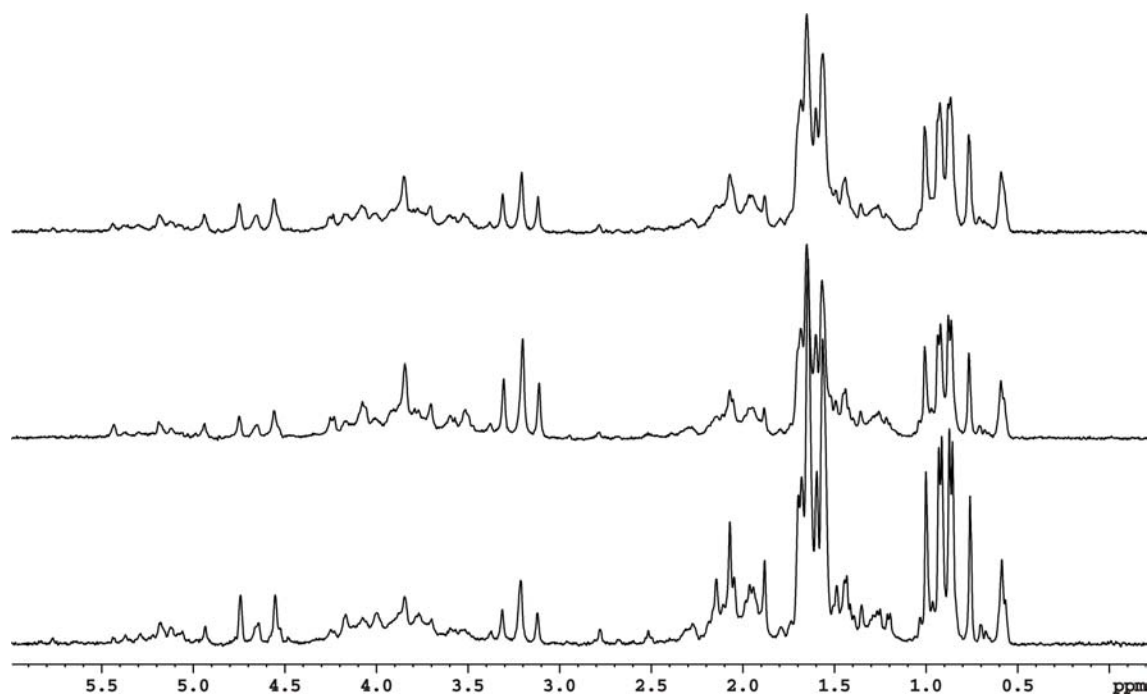
ESPECTROS 4 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01=400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* da variedade Pêra



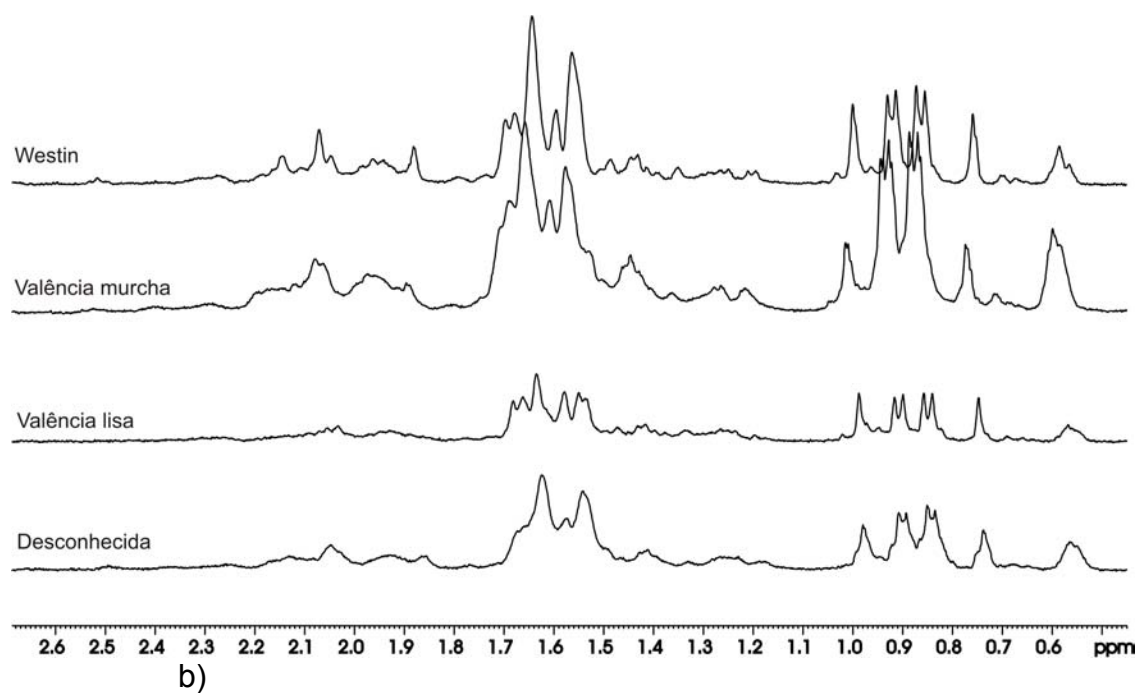
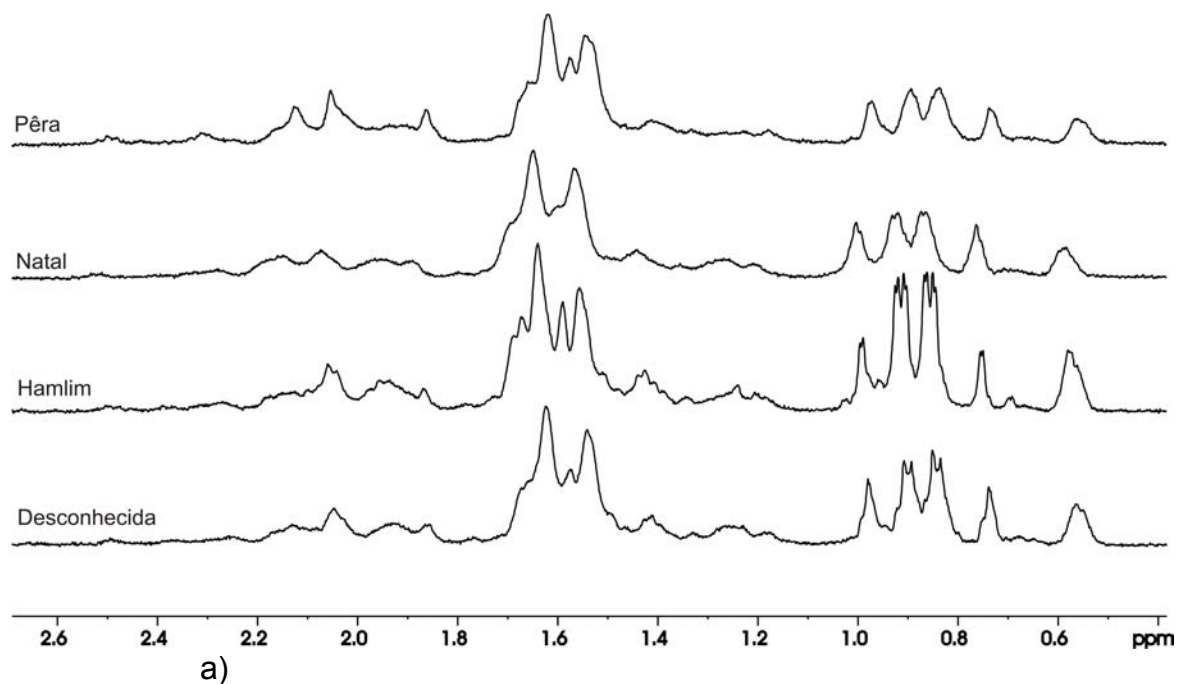
ESPECTROS 5 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01=400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* da variedade Valência Folha Lisa



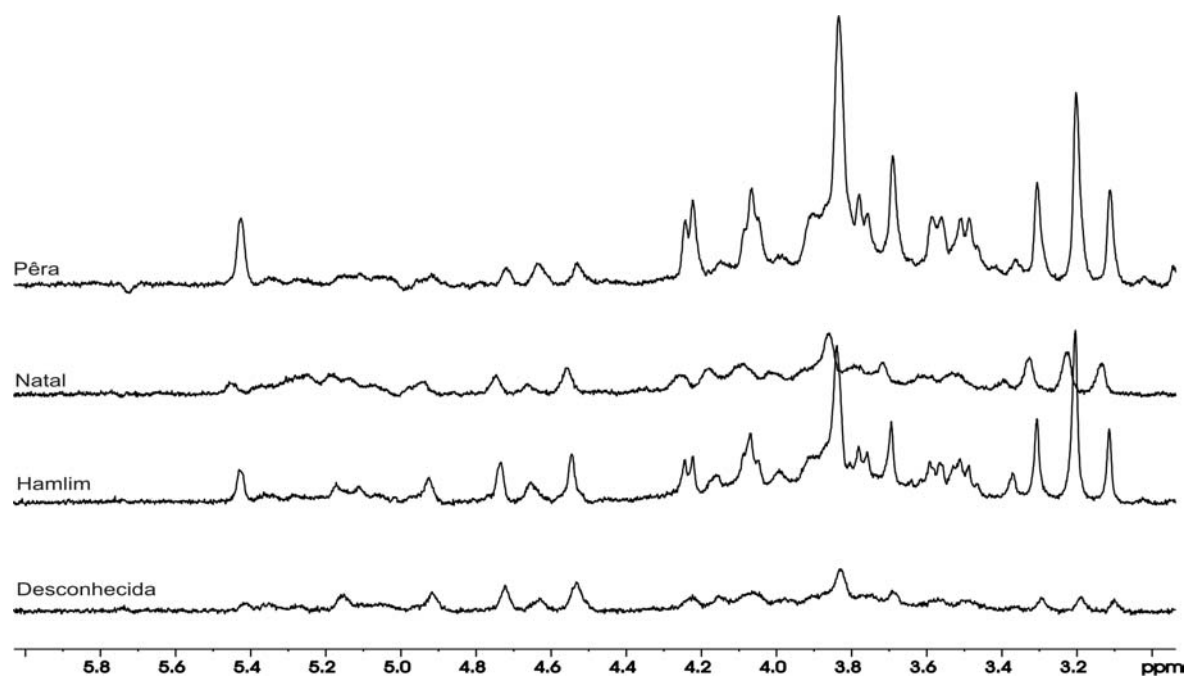
ESPECTROS 6 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* da variedade Valência Folha Murcha



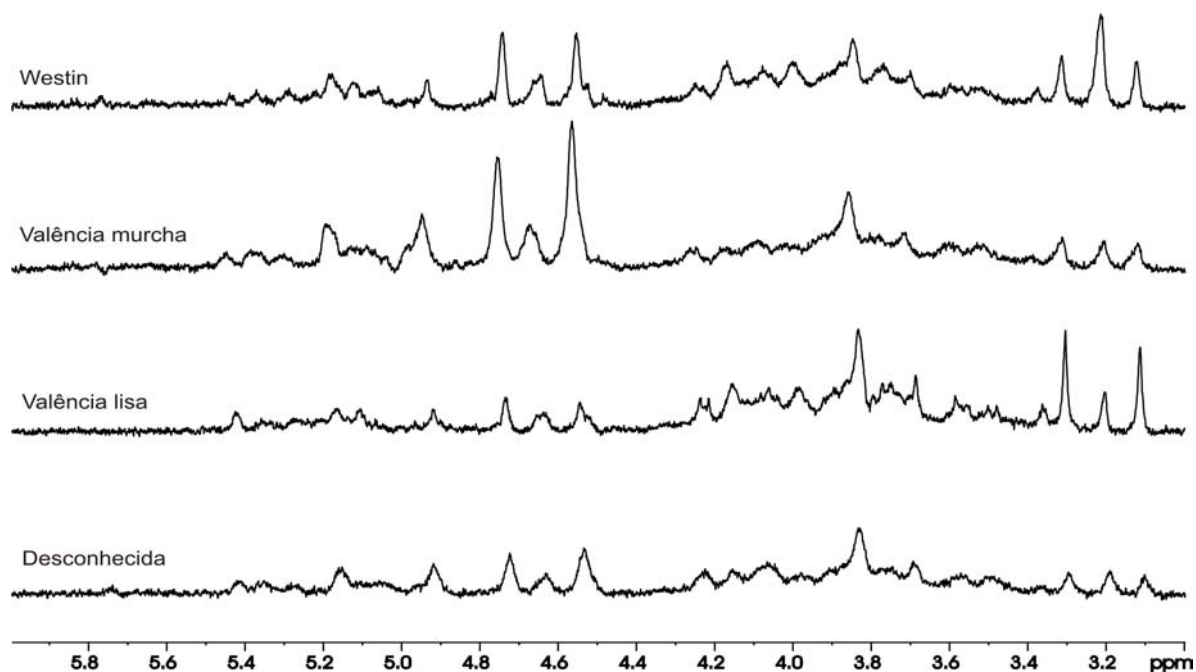
ESPECTROS 7 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* da variedade Westin



ESPECTROS 8 - Expansão da região de δ 2,7 a 0,4 ppm de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus sinensis* das variedades: a) Pêra, Natal, Hamlim e desconhecida e b) Westin, Valência Folha Murcha, Valência Folha Lisa e desconhecida

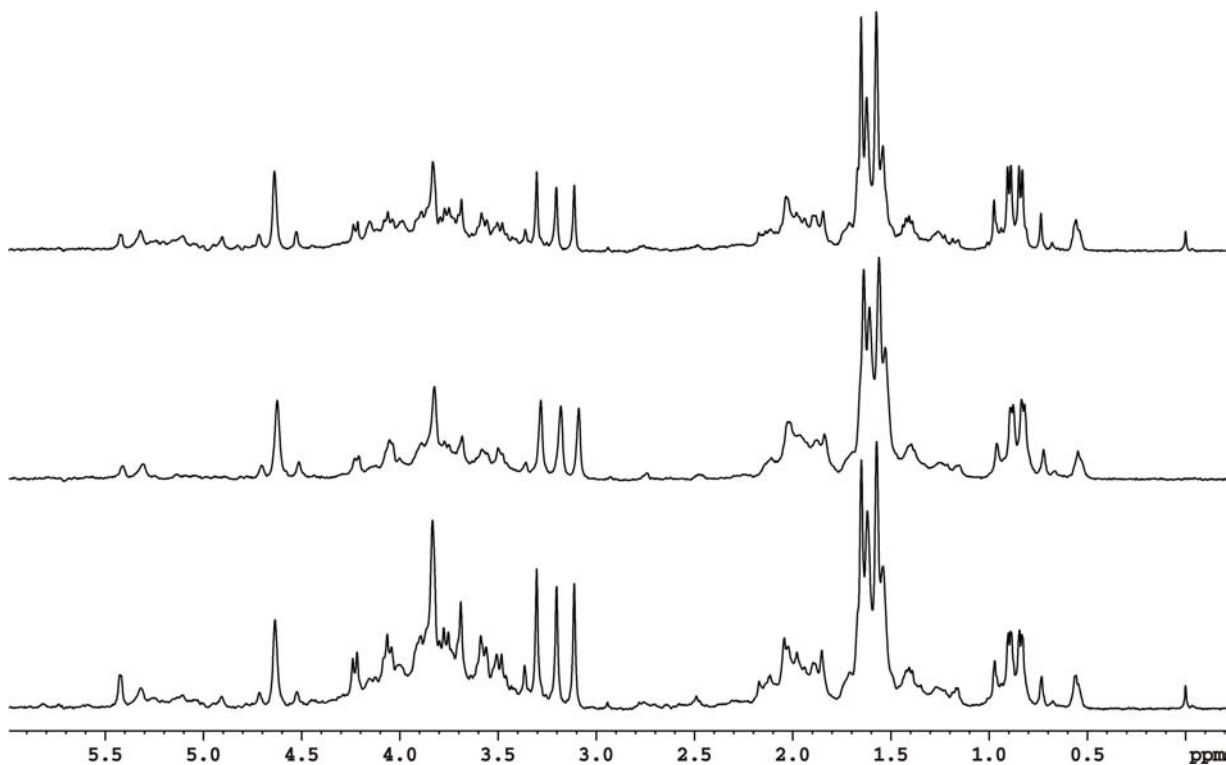


a)



b)

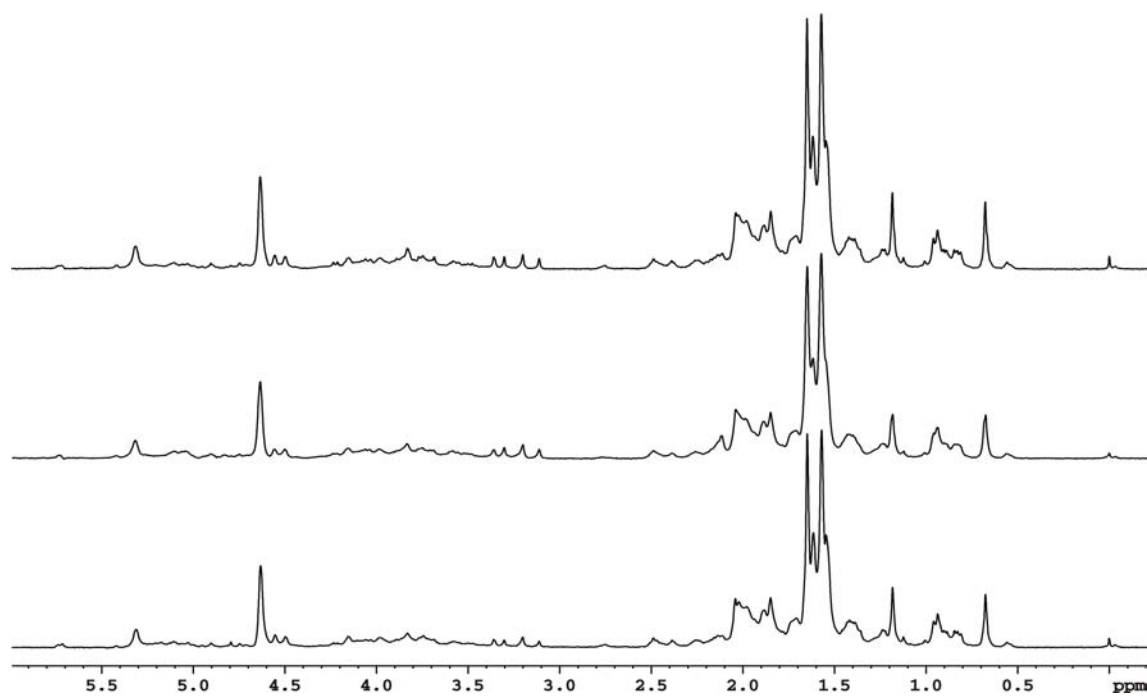
ESPECTROS 9 - Expansão da região de δ 6,0 a 3,0 ppm de espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de *Citrus sinensis* das variedades a) Pêra, Natal, Hamlim e desconhecida e b) Westin, Valência Folha Murcha, Valência Folha Lisa e desconhecida



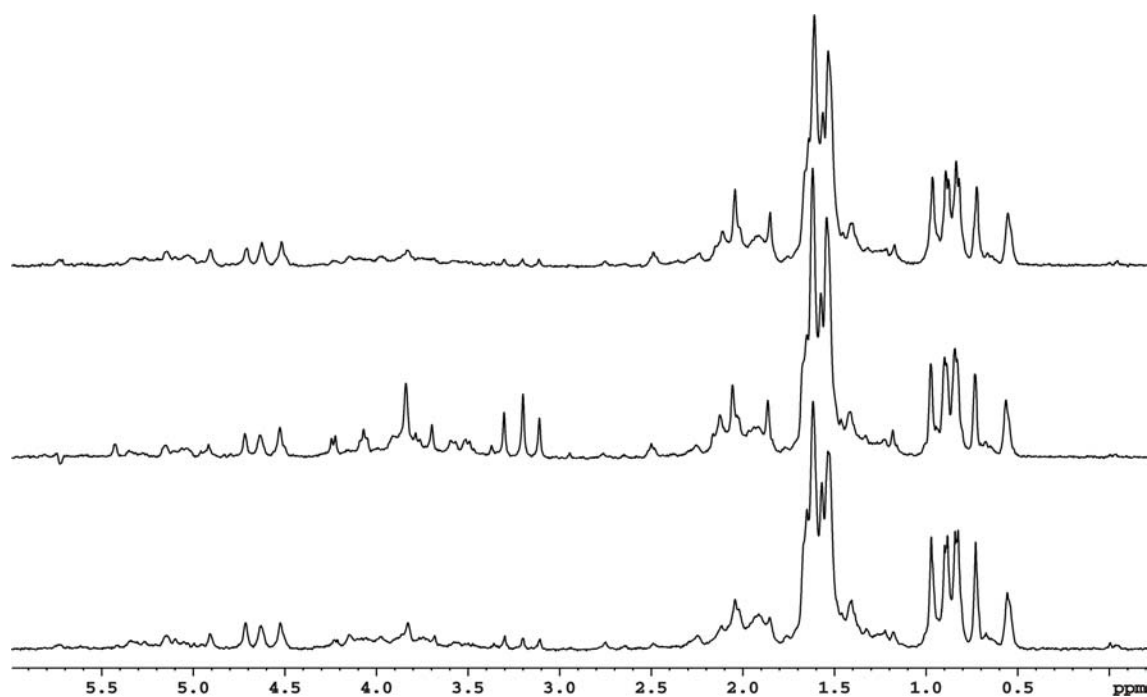
ESPECTROS 10 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis*

Os espectros foram obtidos empregando-se a seqüência de pulso CPMG com pré-saturação do sinal da água (zgpr), com tempo de eco (τ) de 1 ms, 150 ciclos (n), potência do pulso de pré-saturação de 60 dB, largura espectral de 7062,15 Hz, tempo de aquisição de 2,3 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, duração do pulso de rf de 12,25 μs . Foram acumulados 512 FIDs e empregados D_2O como solvente e TSPA- d_4 como referência interna.

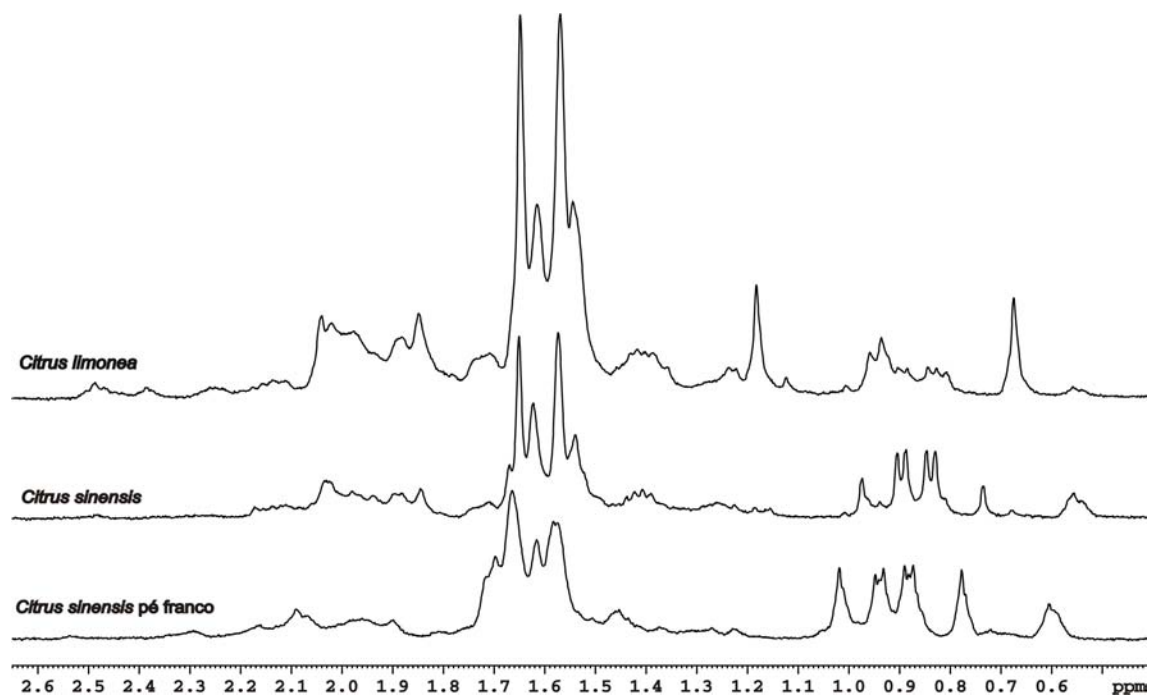
O processamento foi realizado com *zero filling* (SI = 32 K) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (lb) de 1 Hz.



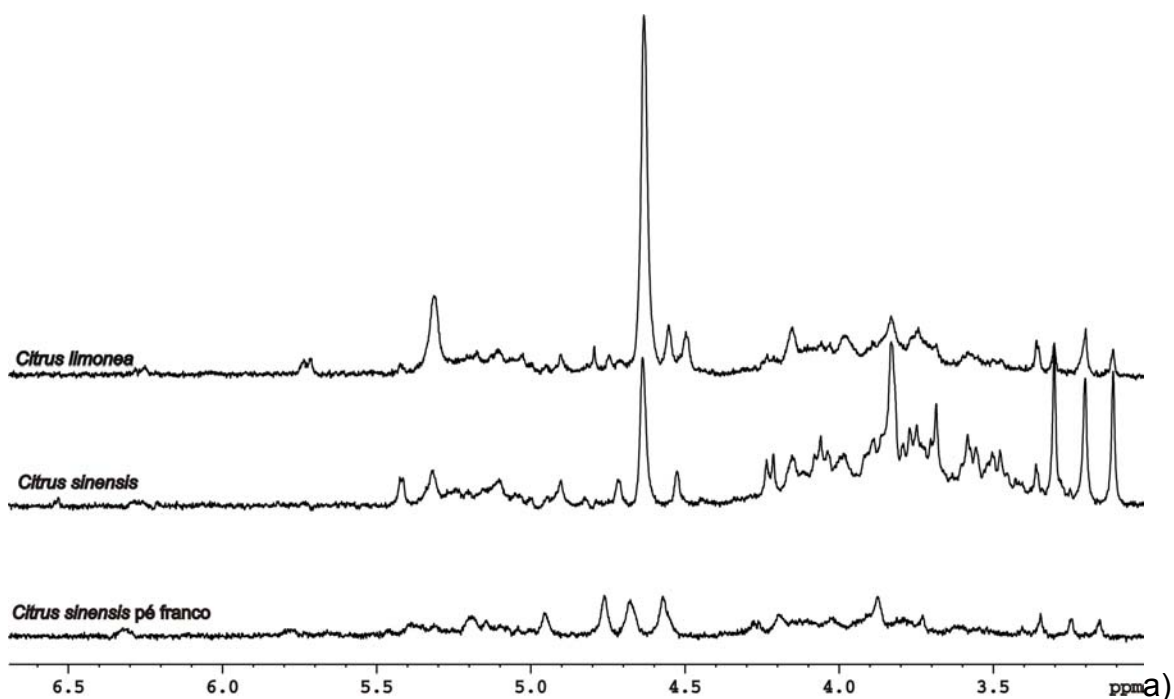
ESPECTROS 11 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus limonea*



ESPECTROS 12 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de uma folha de *Citrus sinensis* pé franco

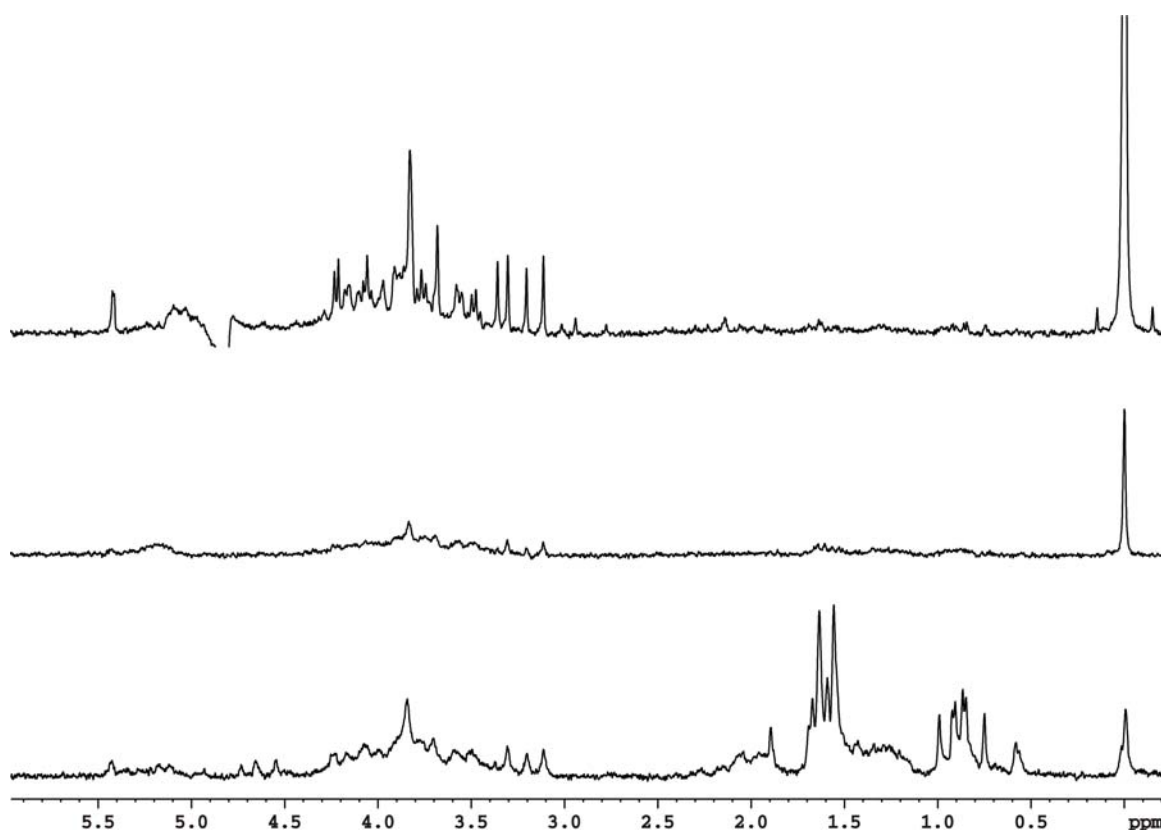


a)



b)

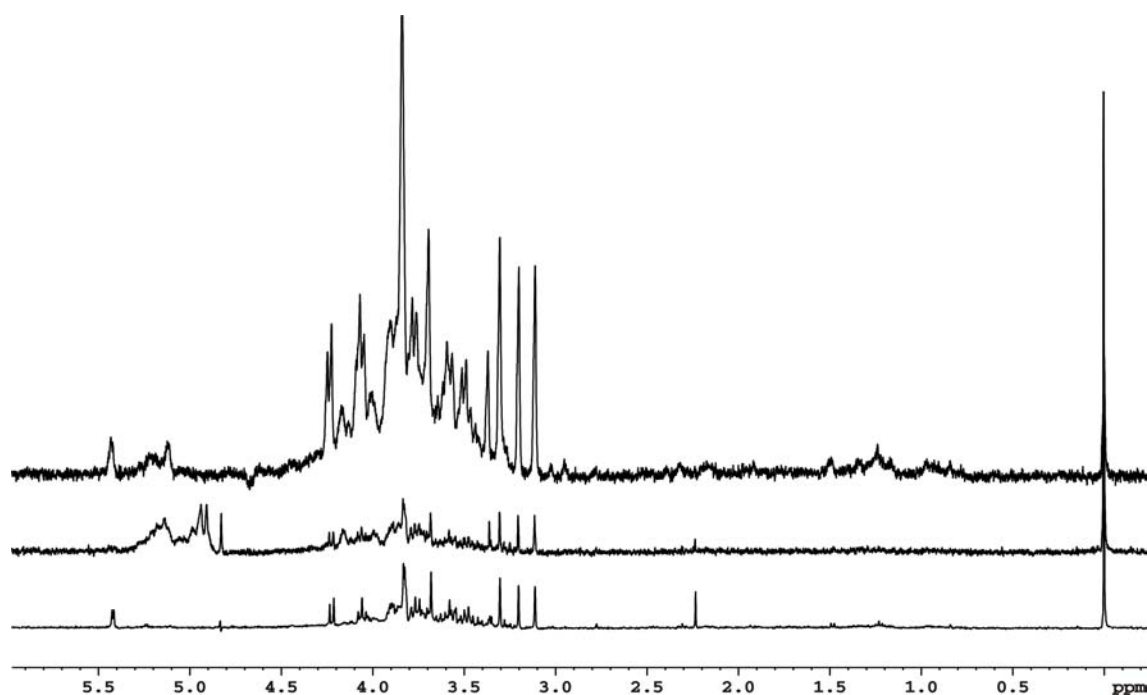
ESPECTROS 13 - Expansões das região de a) δ 6,0 a 3,0 ppm e b) δ 2,7 a 0,4 ppm de espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus limonea*, *Citrus sinensis* e *Citrus sinensis pé franco*



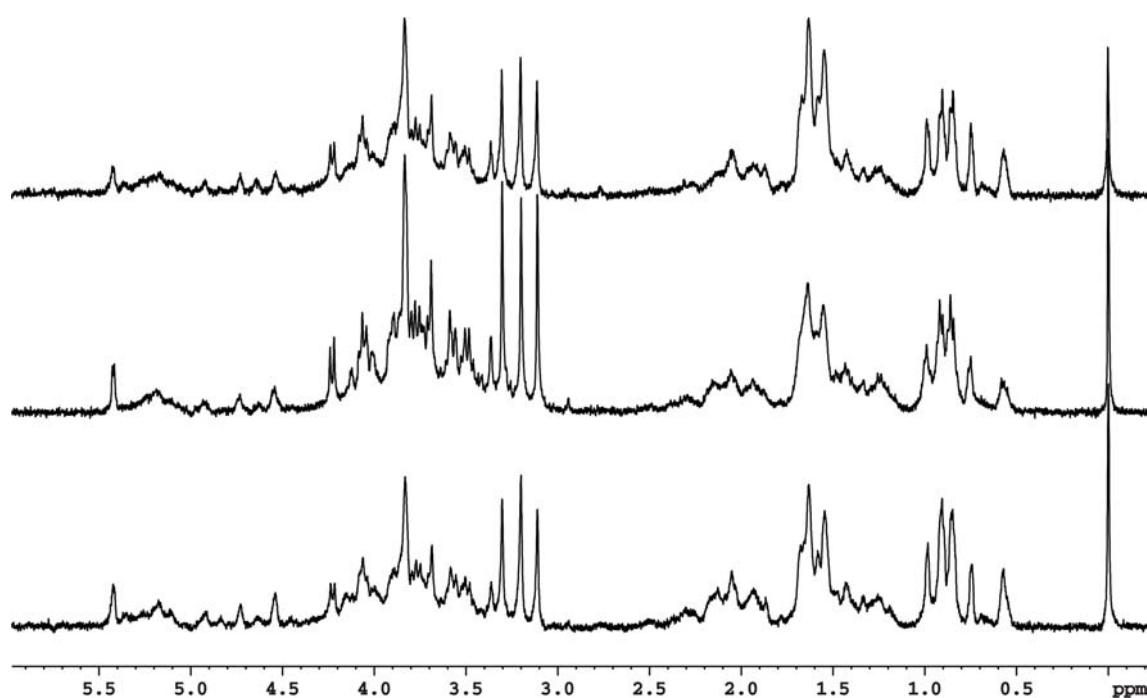
ESPECTROS 14 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus sinensis* maceradas em nitrogênio líquido

Os espectros foram obtidos empregando-se a seqüência de pulso CPMG com pré-saturação do sinal da água (zgpr), com tempo de eco (τ) de 1 ms, 150 ciclos (n), potência do pulso de pré-saturação de 60 dB, largura espectral de 7062,15 Hz, tempo de aquisição de 2,3 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, duração do pulso de rf de 12,25 μs . Foram acumulados 512 FIDs e empregados D_2O como solvente e TSPA- d_4 como referência interna.

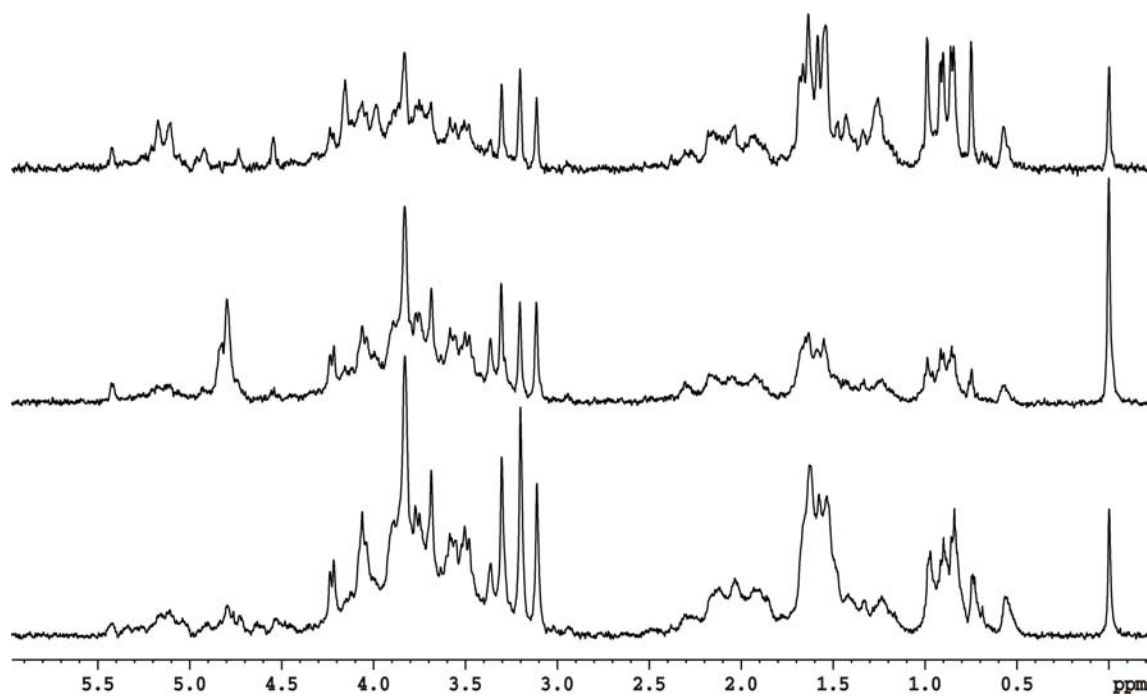
O processamento foi realizado com *zero filling* (SI = 32 K) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (lb) de 1 Hz.



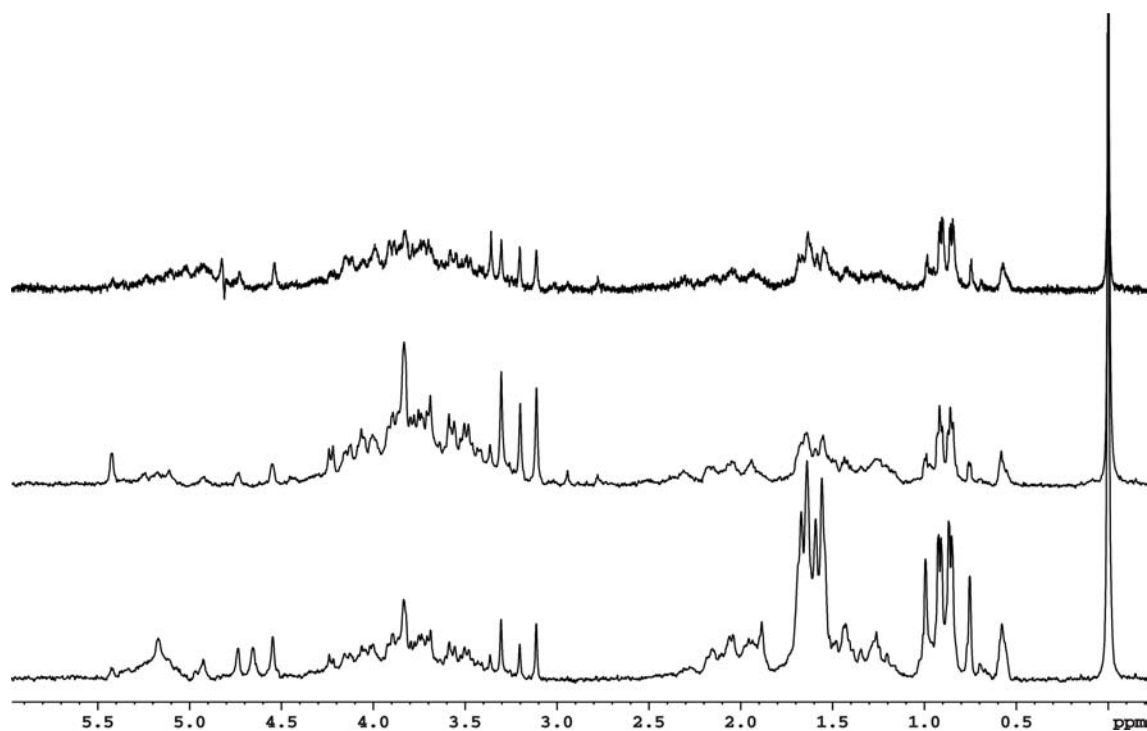
ESPECTROS 15 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus sinensis* moídas em moinho criogênico



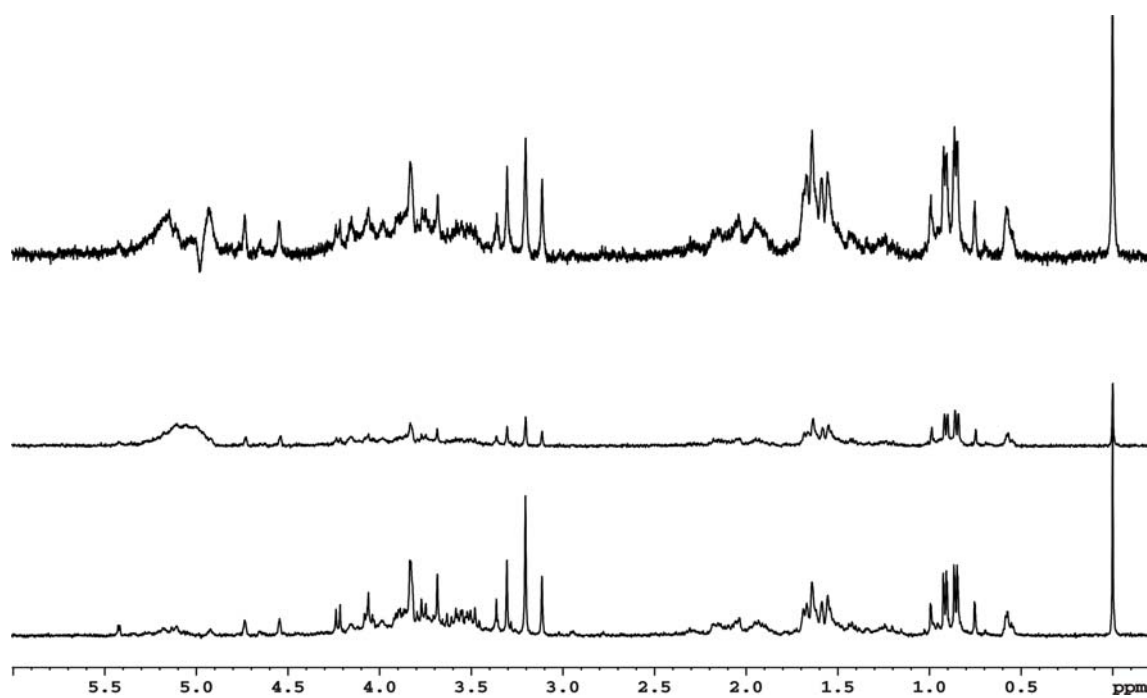
ESPECTROS 16 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* da variedade Westin



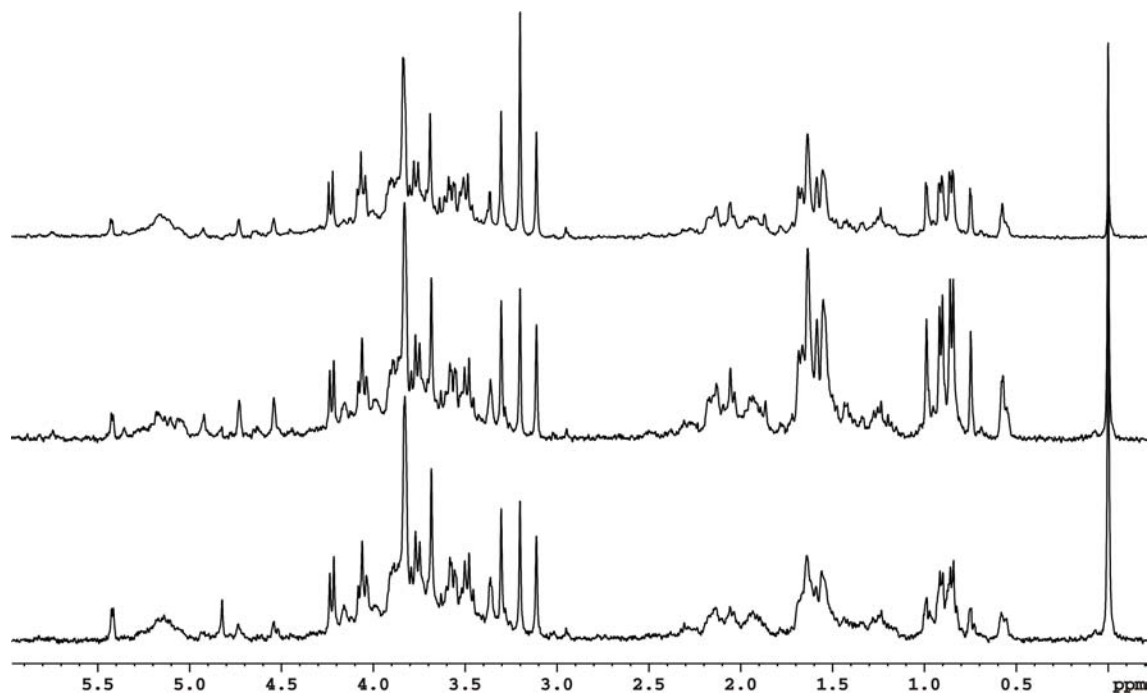
ESPECTROS 17 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* da variedade Natal



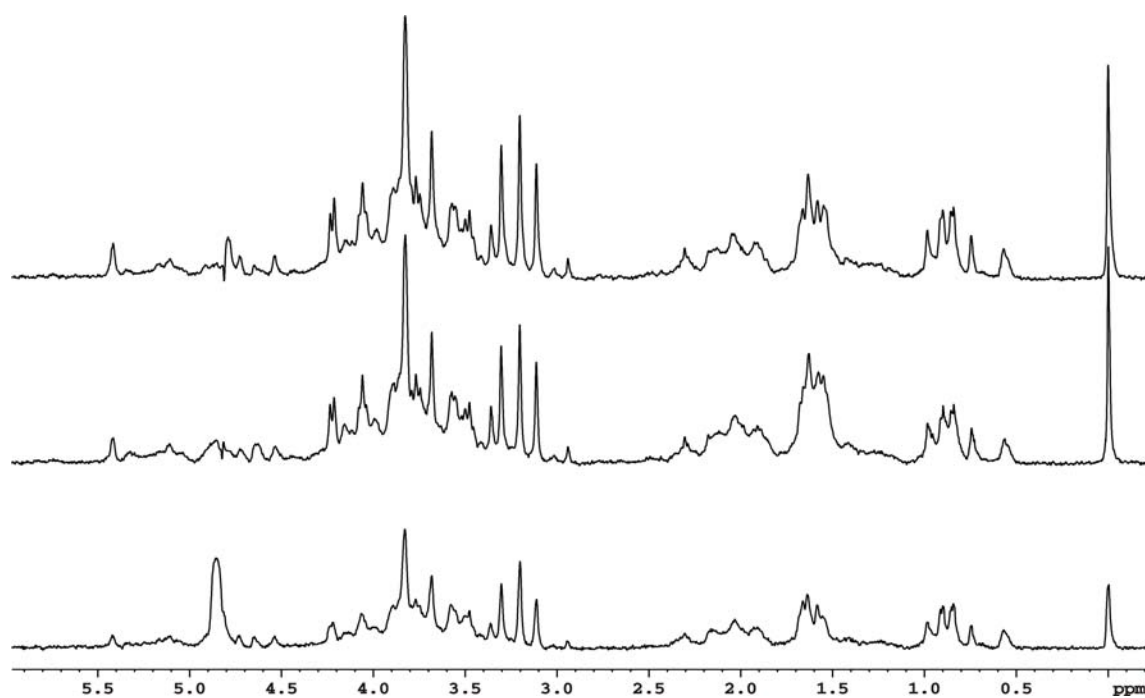
ESPECTROS 18 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* da variedade Valência Murcha



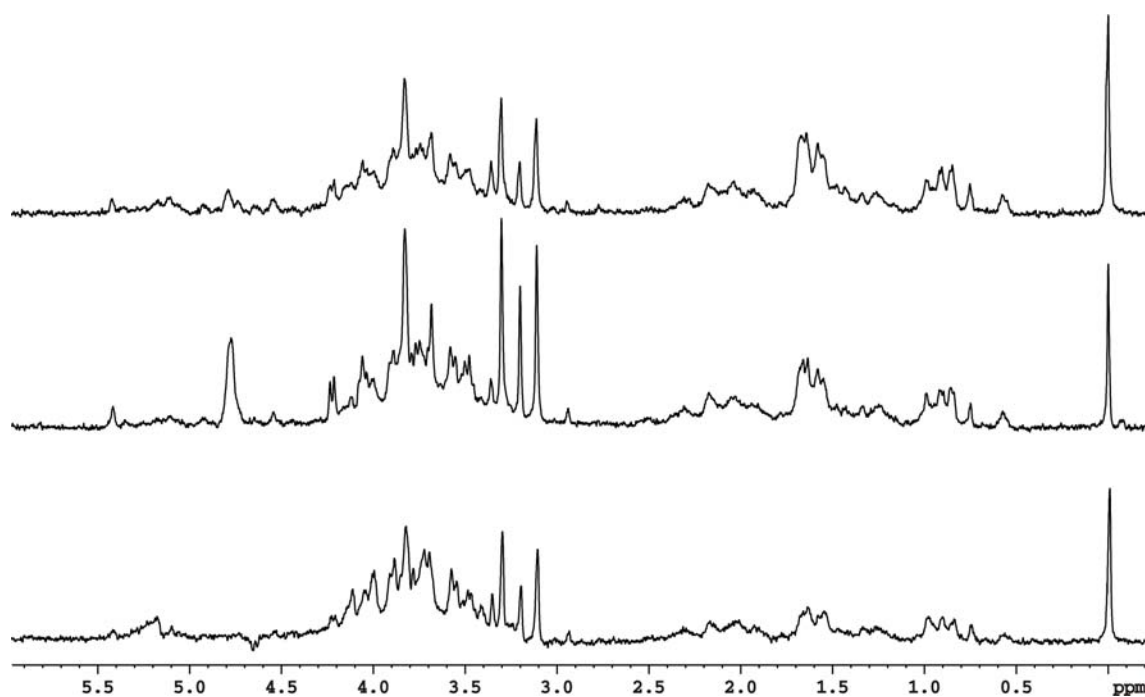
ESPECTROS 19 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* da variedade Hamlim



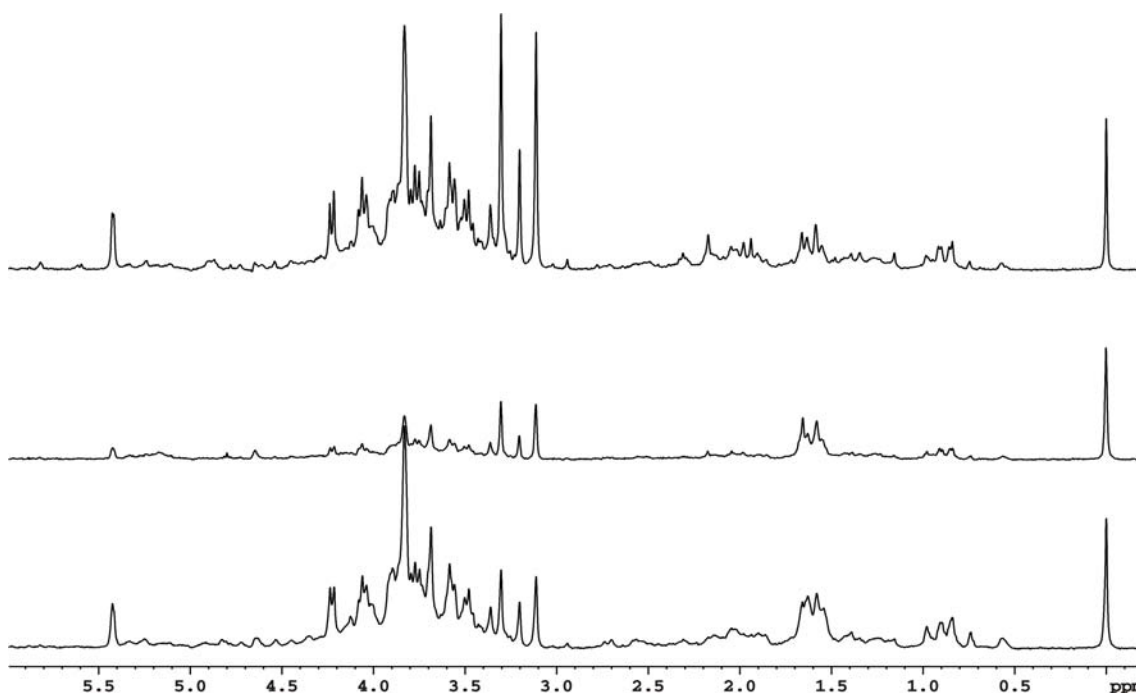
ESPECTROS 20 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* de variedade desconhecida



ESPECTROS 21 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01=400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* da variedade Pêra



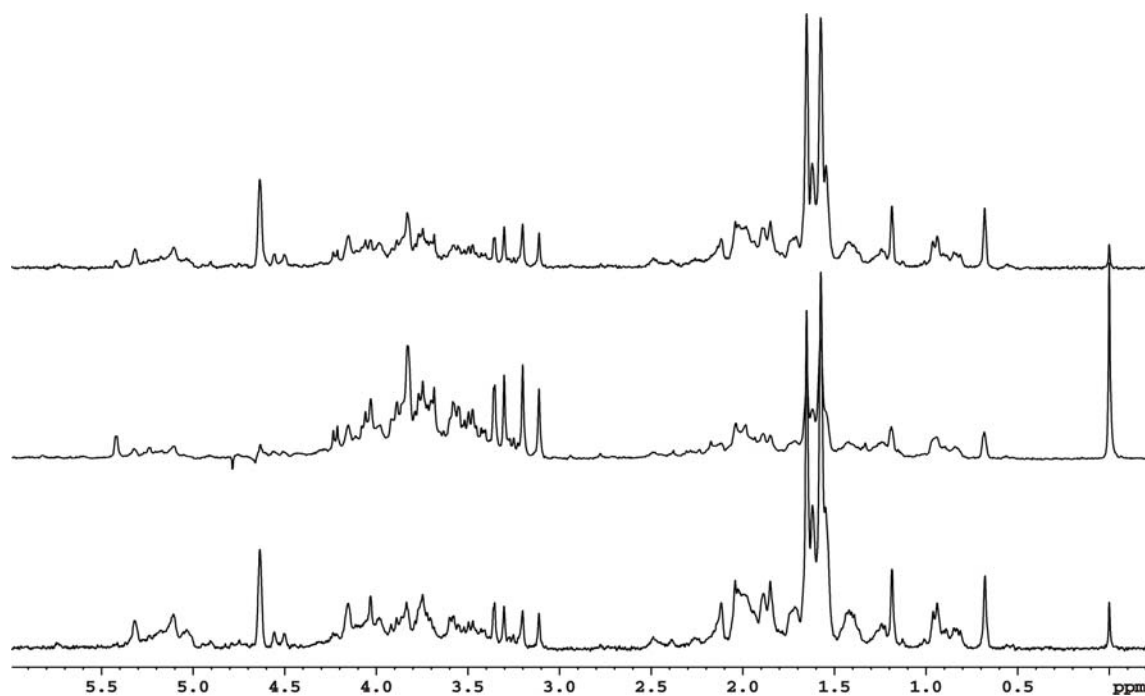
ESPECTROS 22 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01=400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* da variedade Valência Lisa



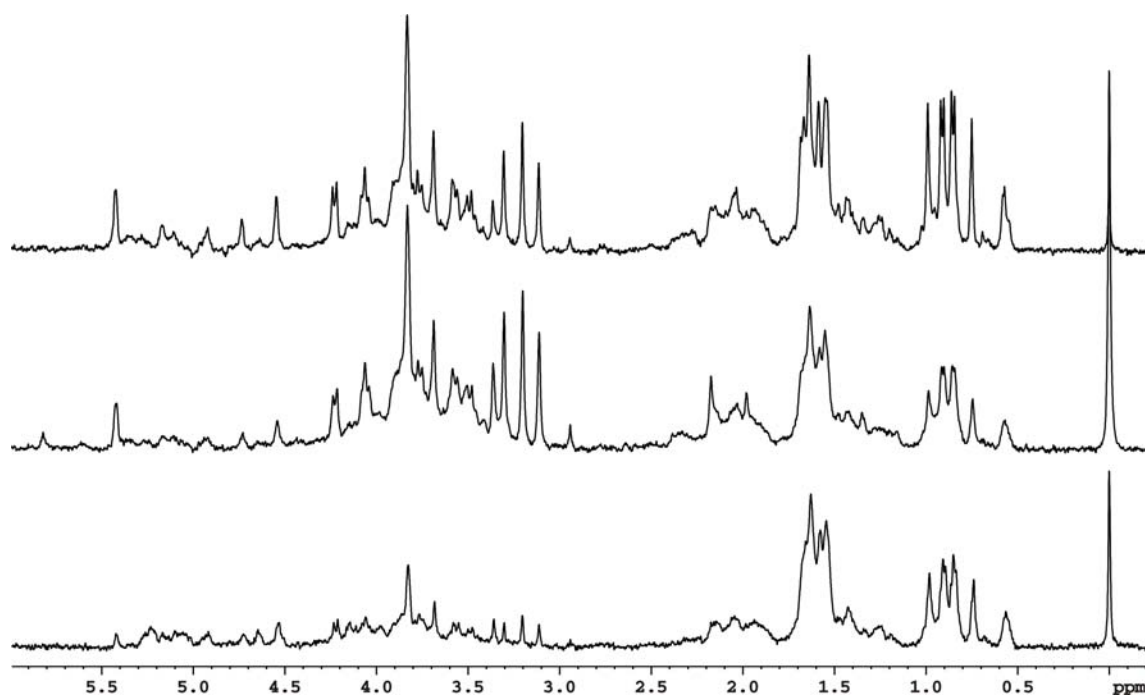
ESPECTROS 23 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis*

Os espectros foram obtidos empregando-se a seqüência de pulso CPMG com pré-saturação do sinal da água (zgpr), com tempo de eco (τ) de 1 ms, 150 ciclos (n), potência do pulso de pré-saturação de 60 dB, largura espectral de 7062,15 Hz, tempo de aquisição de 2,3 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, duração do pulso de rf de 12,25 μs . Foram acumulados 512 FIDs e empregados D_2O como solvente e TSPA- d_4 como referência interna.

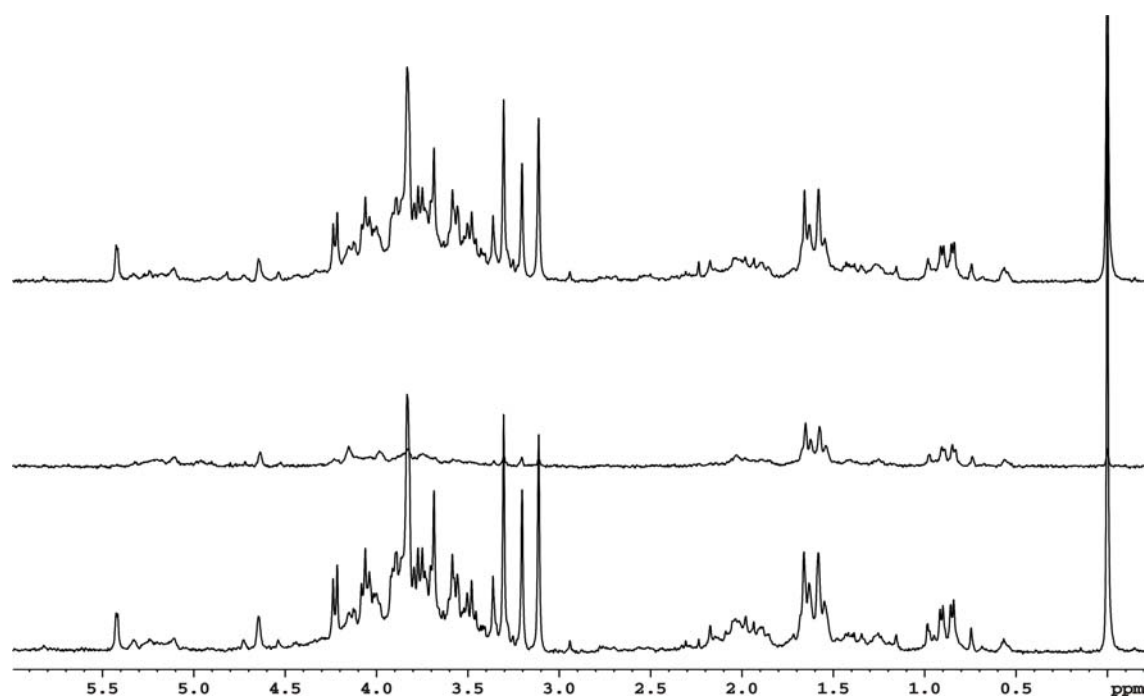
O processamento foi realizado com *zero filling* (SI = 32 K) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (lb) de 1 Hz.



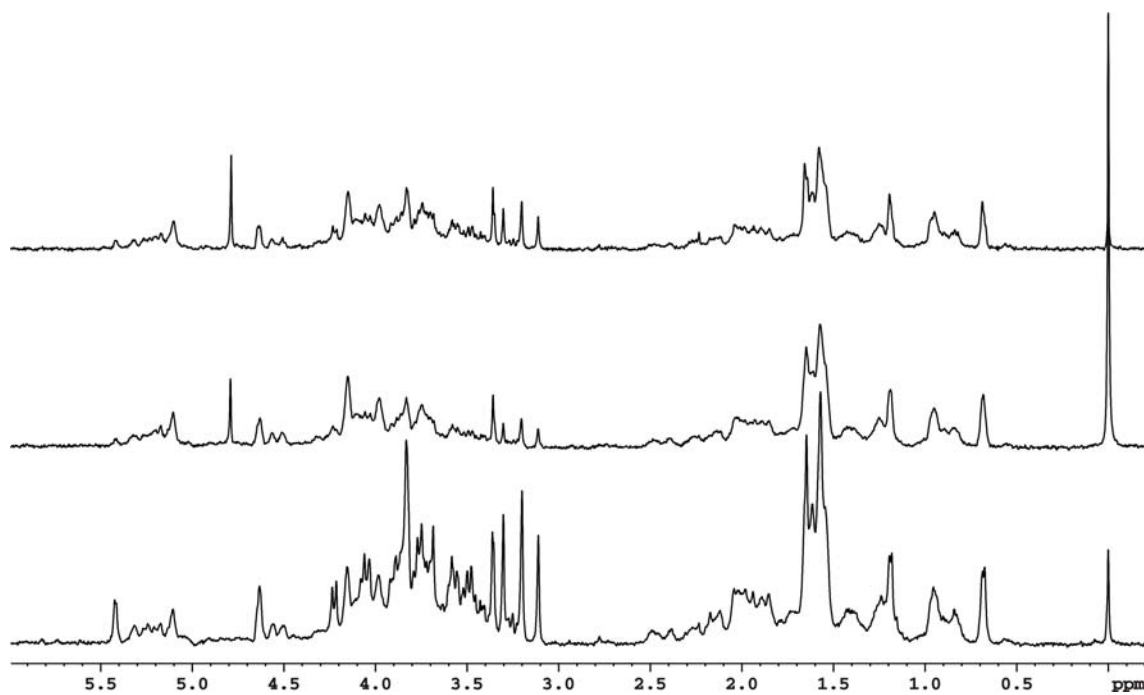
ESPECTROS 24 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus limonea*



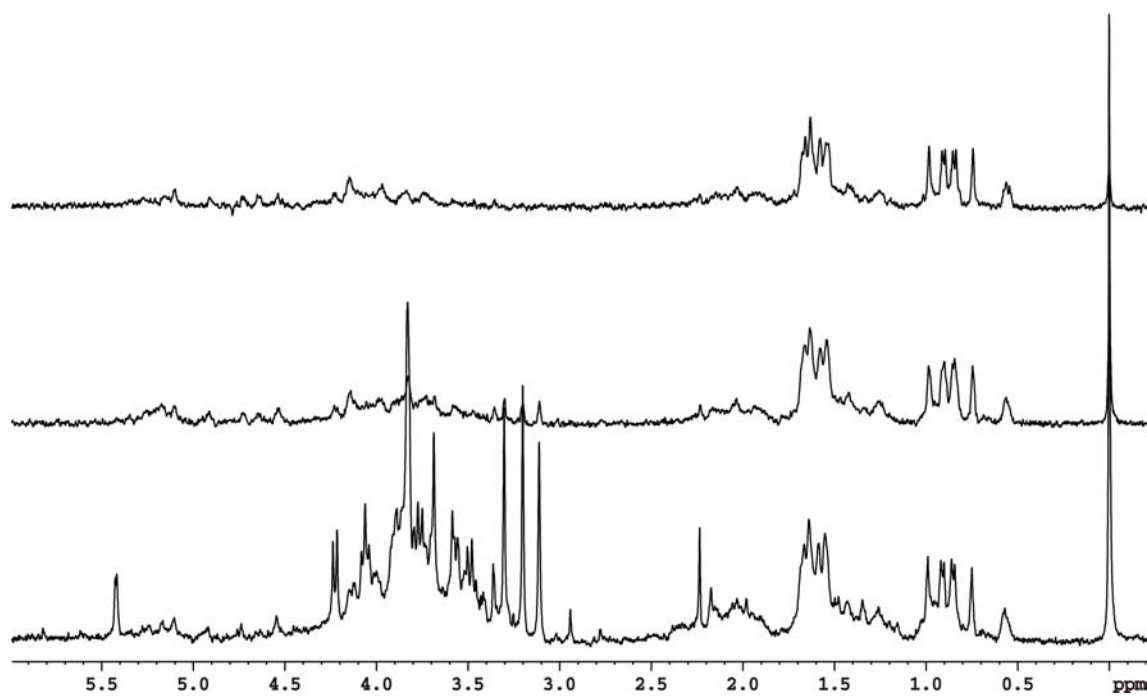
ESPECTROS 25 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de três folhas de *Citrus sinensis* pé franco



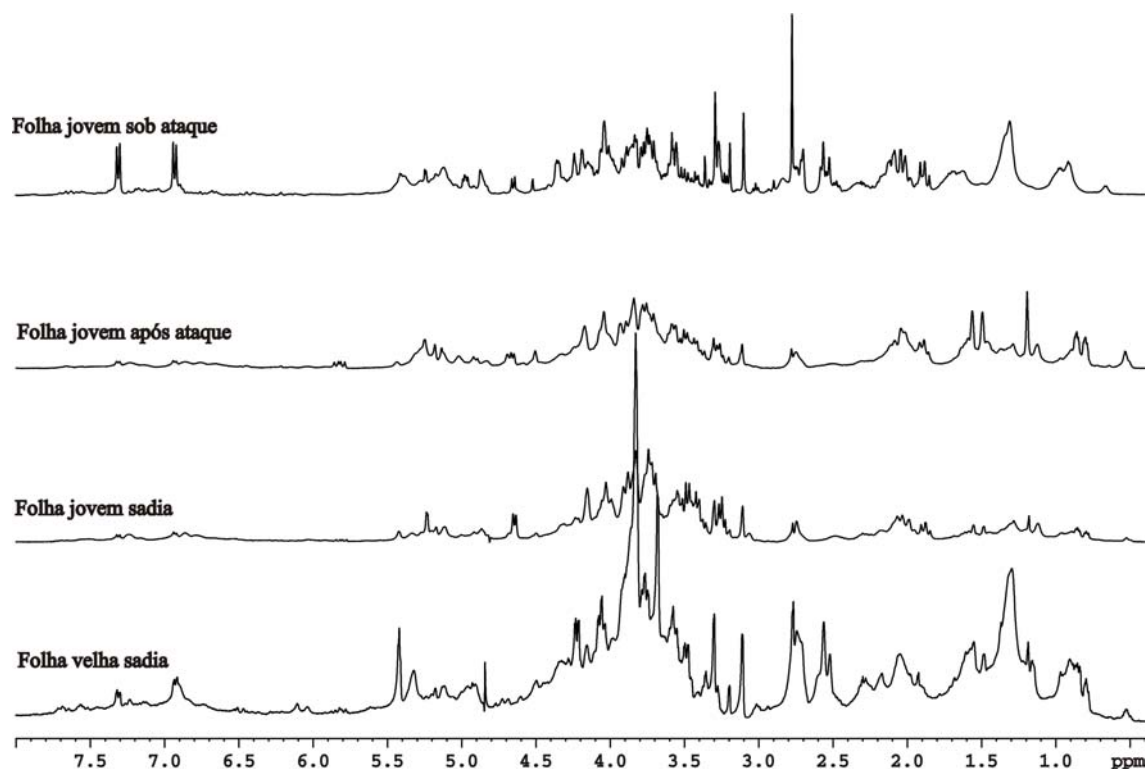
ESPECTROS 26 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de seis folhas de *Citrus sinensis*



ESPECTROS 27 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de seis folhas de *Citrus limonea*



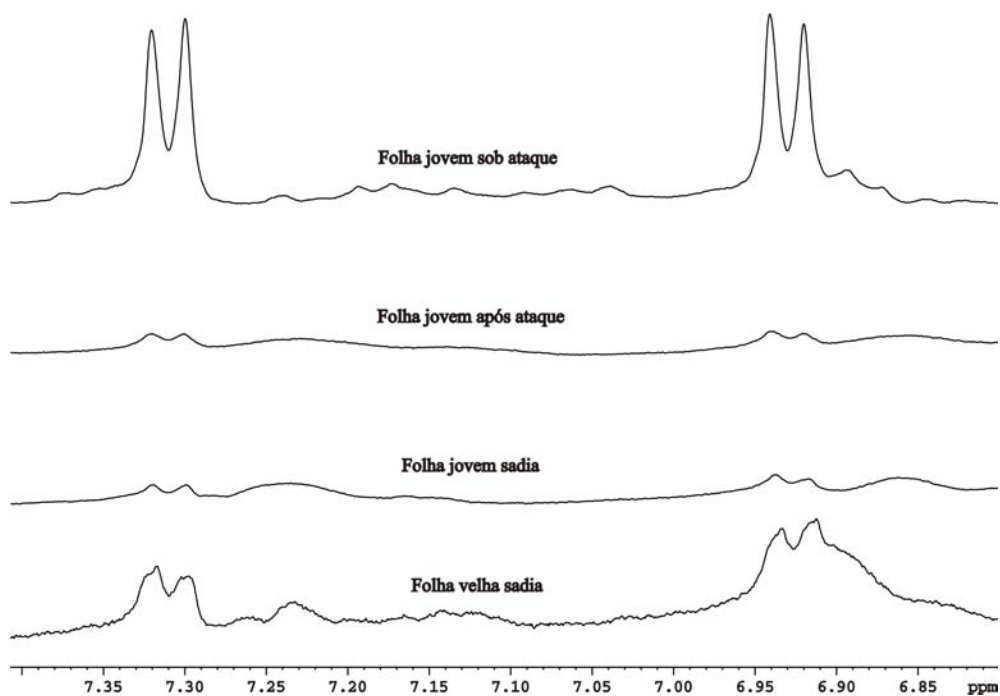
ESPECTROS 28 - Espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de seis folhas de *Citrus sinensis* pé franco



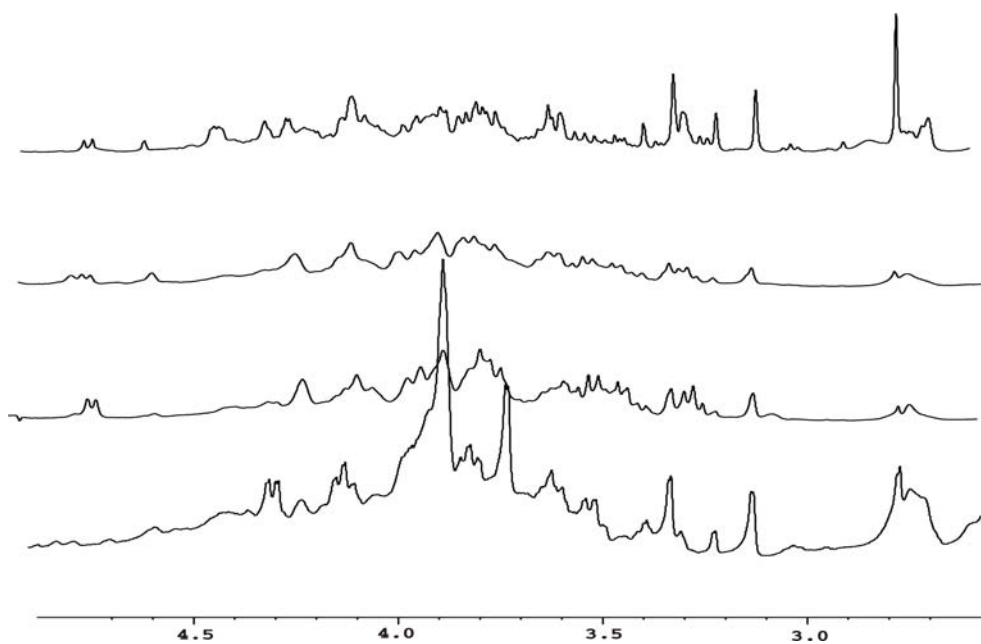
ESPECTROS 29 - Espectro de RMN de ^1H HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus spp* (coletadas em 17/07/02) jovem sob o ataque de pulgões; jovem após o ataque de pulgões e folhas jovem e velha sadias

Os espectros foram obtidos empregando-se a seqüência de pulso zgpr, potência do pulso de pré-saturação de 60 dB, largura espectral de 7062,15 Hz, tempo de aquisição de 4,64 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, duração do pulso de rf de 11,8 μs . Foram acumulados (NS) 256 FIDs e empregado D_2O como solvente.

O processamento foi realizado com *zero filling* (SI = 32 K) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha de 0,3 Hz.

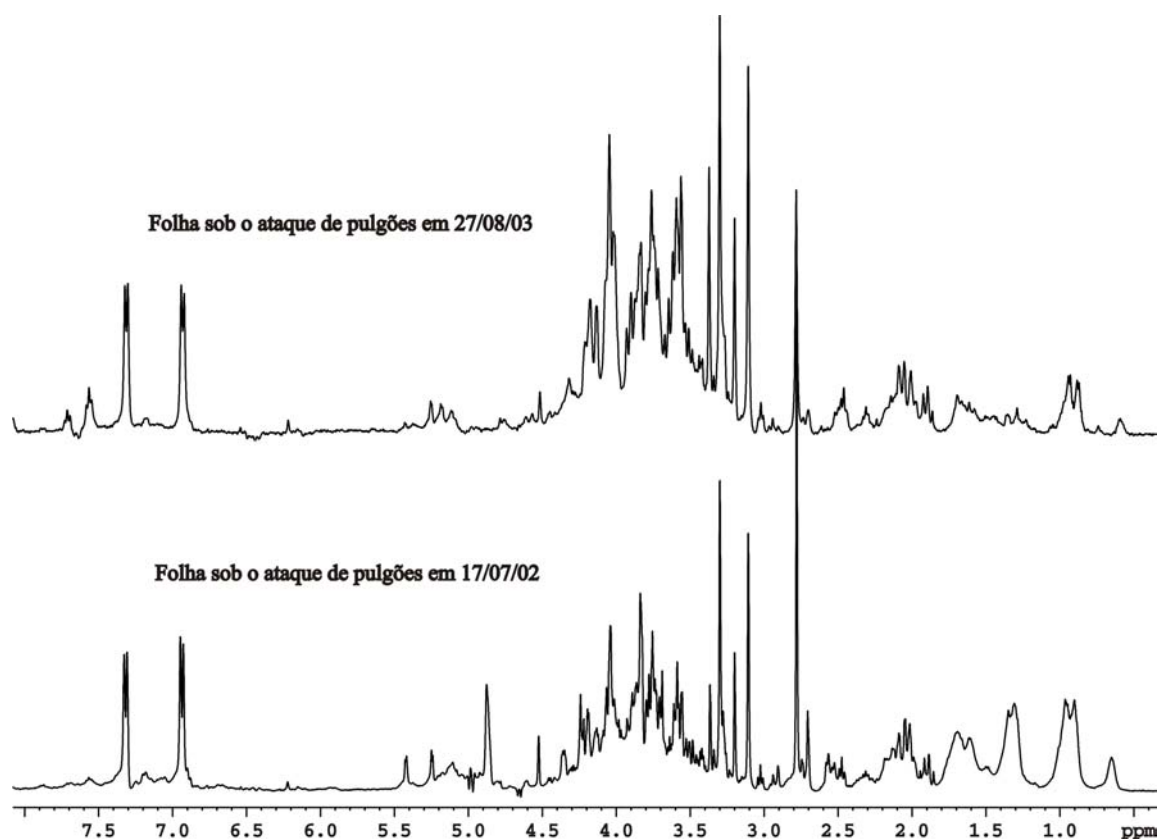


a)



b)

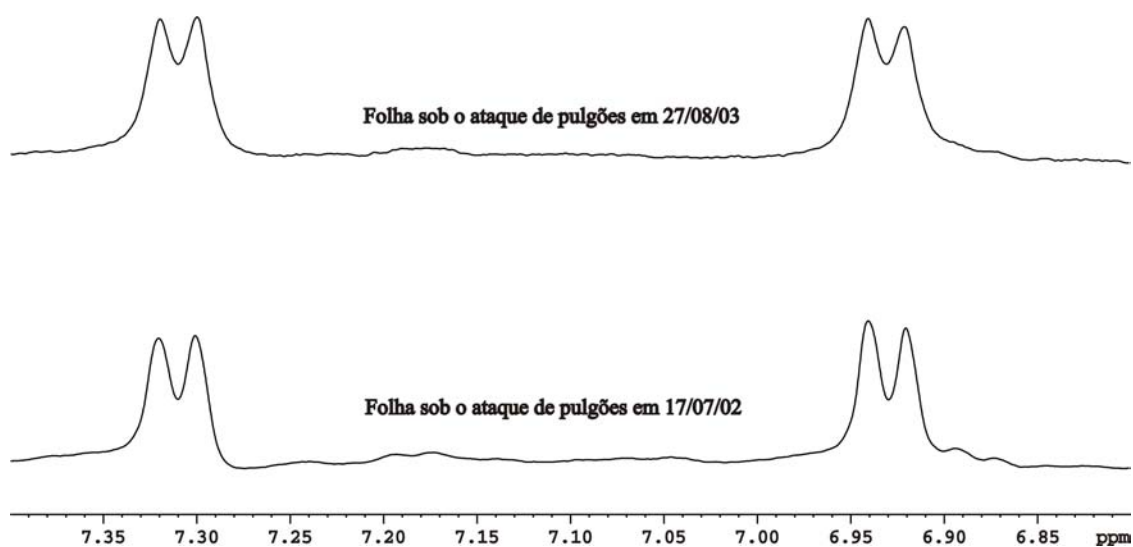
ESPECTROS 30 – Expansão de espectros de RMN de ^1H HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus spp* (coletadas em 17/07/02) jovem sob o ataque de pulgões; jovem após o ataque de pulgões e folhas jovem e velha sadias; a) região de δ 7,4 a 6,8 ppm e b) região de δ 4,5 a 3,0 ppm



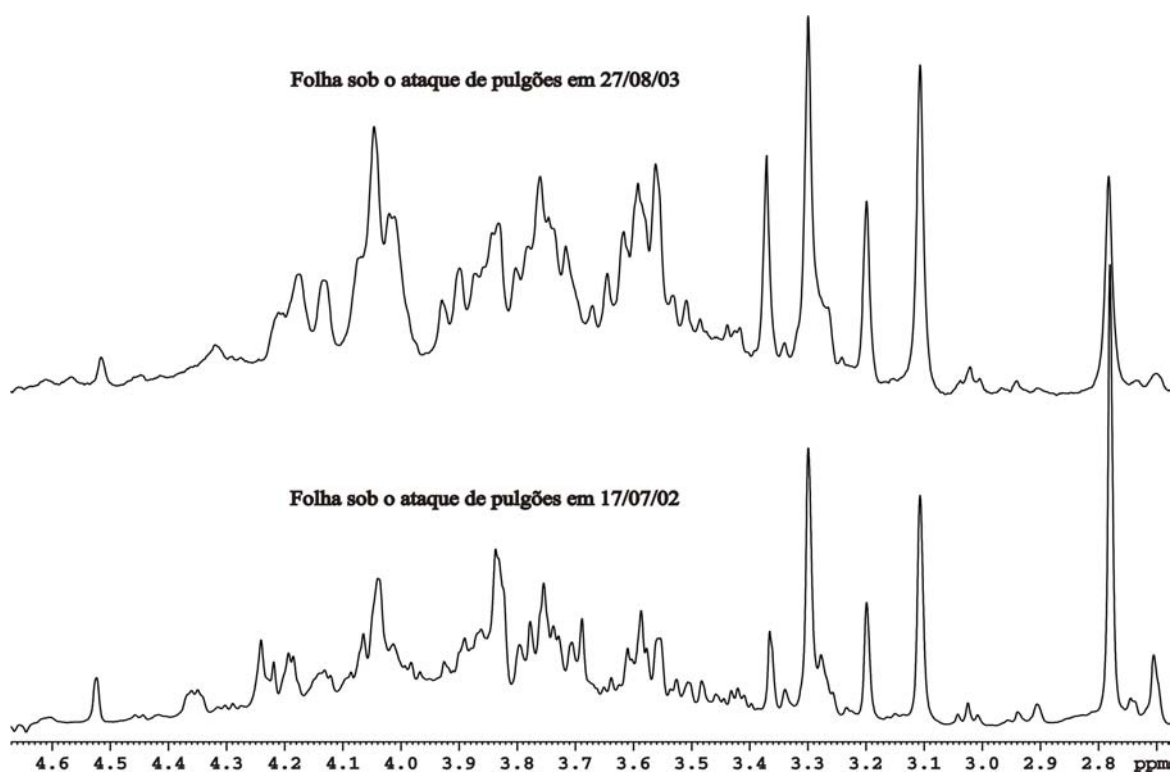
ESPECTROS 31 - Espectros de RMN de ¹H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus spp* jovens sob o ataque de pulgões e coletadas dias 17/07/02 e 27/08/03

Os espectros foram obtidos empregando-se a seqüência de pulso CPMG com pré-saturação do sinal da água (zgpr), com tempo de eco (τ) de 1 ms, 150 ciclos (n), potência do pulso de pré-saturação de 60 dB, largura espectral de 7062,15 Hz, tempo de aquisição de 2,3 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, duração do pulso de rf de 11,80 μ s. Foram acumulados 512 FIDs e empregados D₂O como solvente e TSPA-d₄ como referência interna.

O processamento foi realizado com *zero filling* (SI = 32 K) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (lb) de 1 Hz.

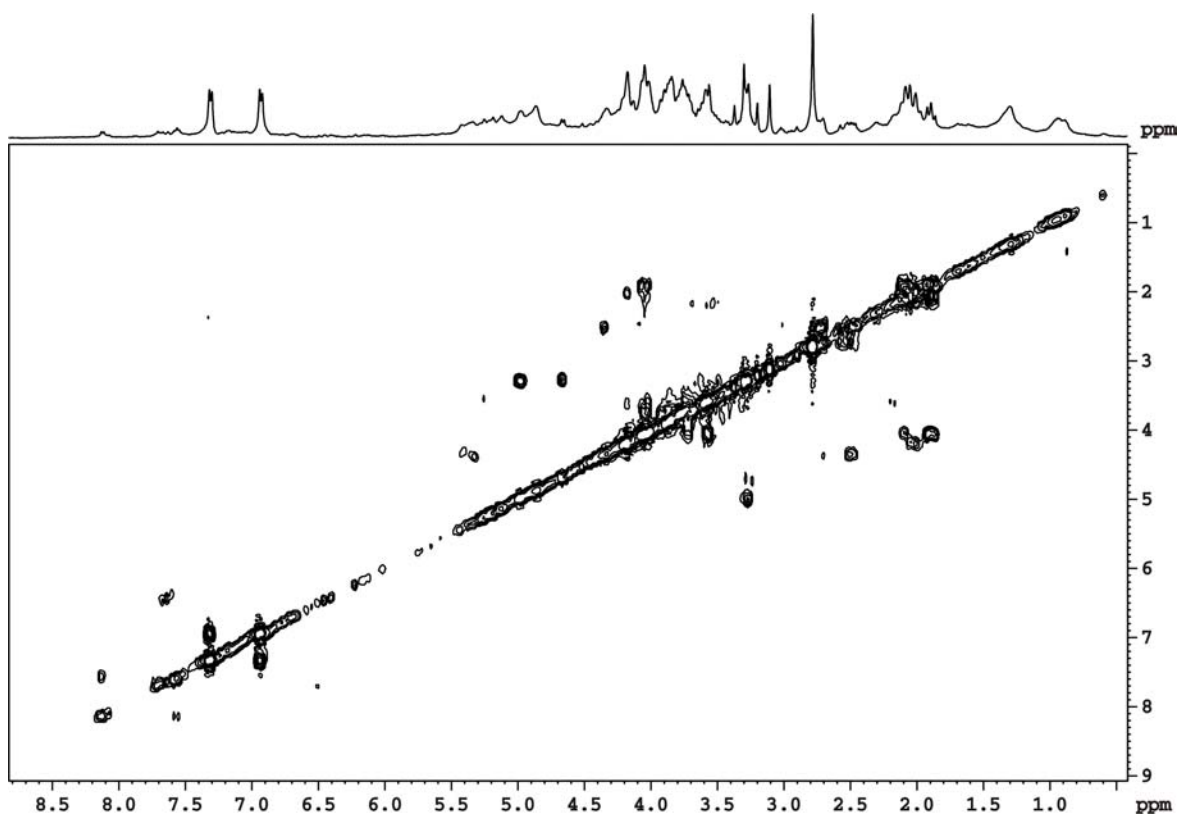


a)



b)

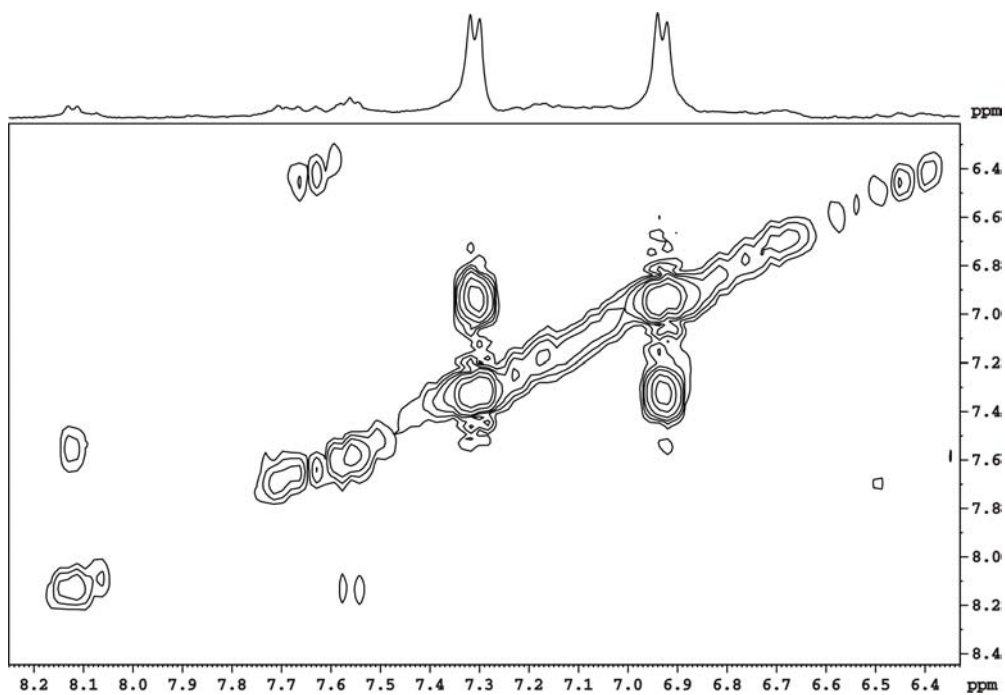
ESPECTROS 32 - Expansão dos espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS (SF01= 400,13 MHz) de folhas de *Citrus spp* jovens sob o ataque de pulgões e coletadas dias 17/07/02 e 27/08/03; a) região de δ 7,40 a 6,80 ppm e b) região de δ 4,7 a 2,7 ppm



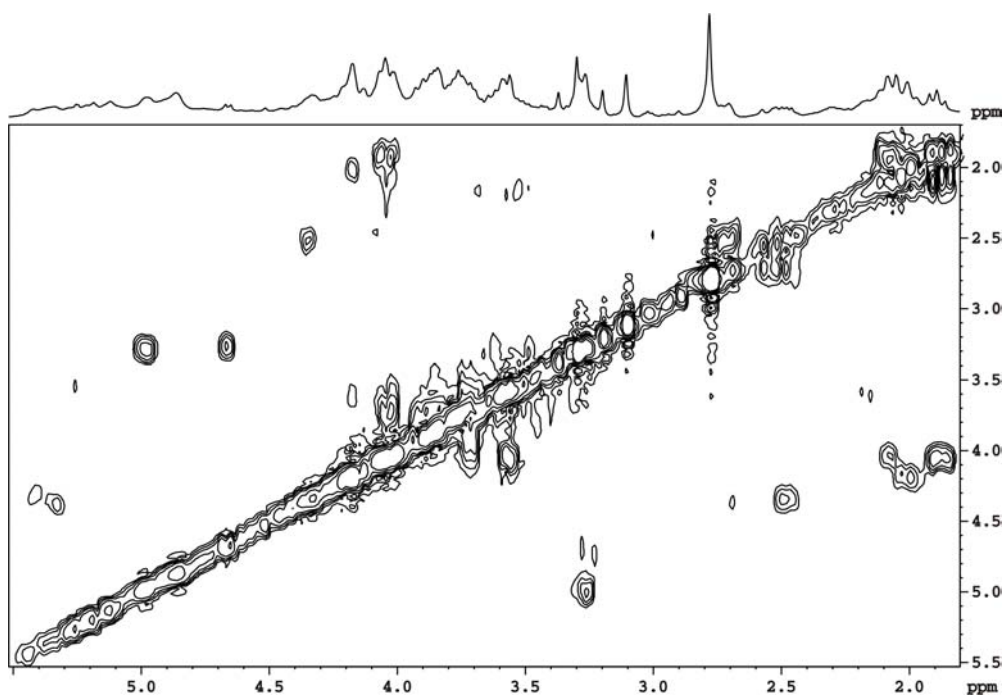
ESPECTRO 33 - Espectro de RMN de COSY HR-MAS (^1H , SFO1 = 400,13 MHz) de folha de *Citrus spp* jovem sob ataque de pulgões

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso COSYGPPR, com 2 K pontos digitalizados em F_2 , largura espectral em F_2 e F_1 de 7062,13 Hz, tempo de aquisição de 0,14 s, tempo de reciclagem de 1,8 s, potência do pulso de pré-saturação (PL9) de 60 dB, duração do pulso de rf (90°) de 11,80 μs e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 8 FIDs e realizados 64 experimentos no eixo F_1 , sendo empregados D_2O como solvente e TSPA- d_4 como referência interna.

No processamento foram utilizados 2 K pontos em F_2 e F_1 e empregada a função de apodização seno-sino, com lb de 1 para o eixo F_2 e lb de 0,3 e gb de 0,1 para o eixo F_1 .

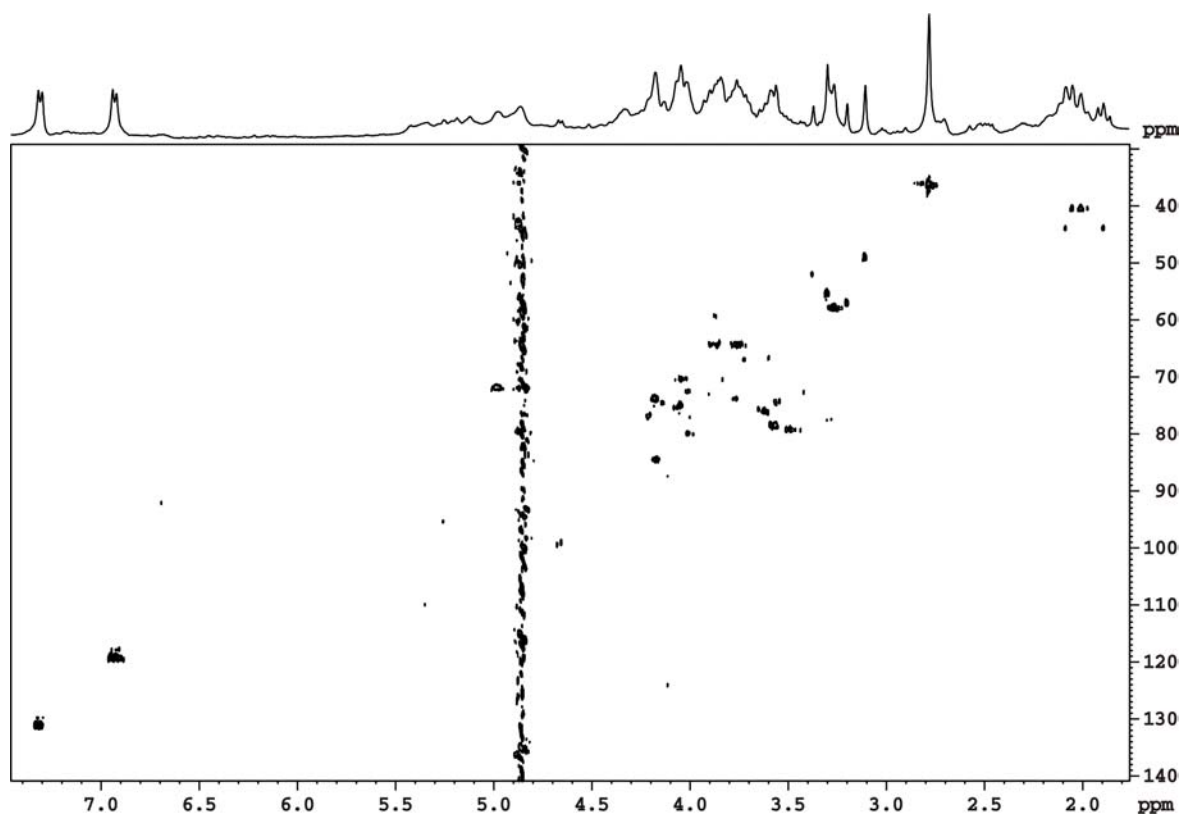


a)



b)

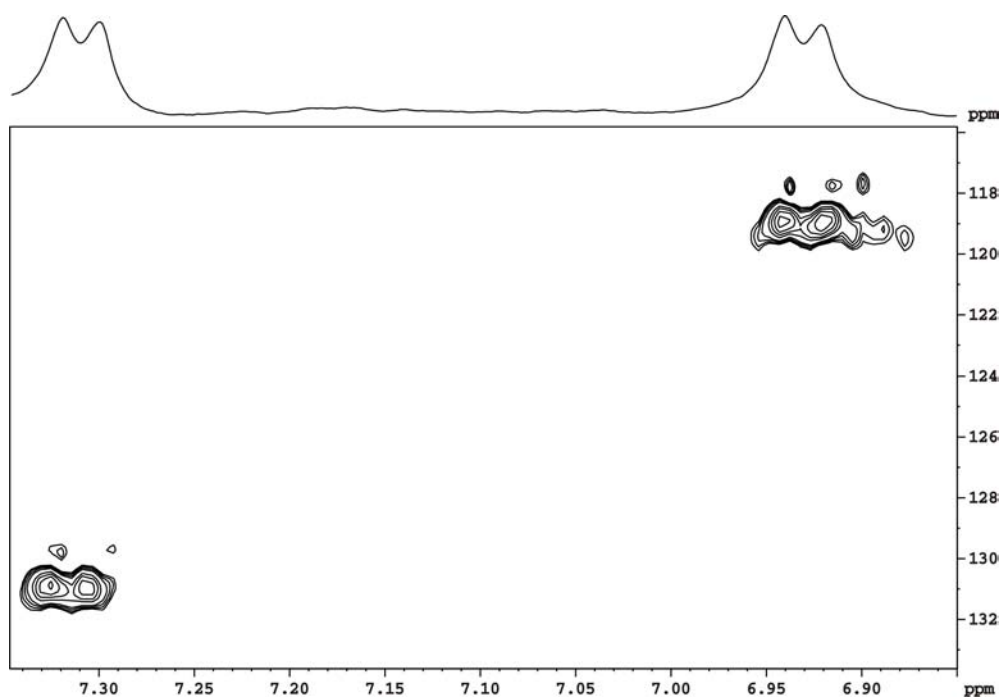
ESPECTRO 34 – Expansões de espectro de RMN de COSY HR-MAS (¹H, SFO1 = 400,13 MHz) de folha de *Citrus spp* jovem sob ataque de pulgões: a) região de δ 8,2 a 6,4 ppm; b) região de δ 5,5 a 1,8 ppm



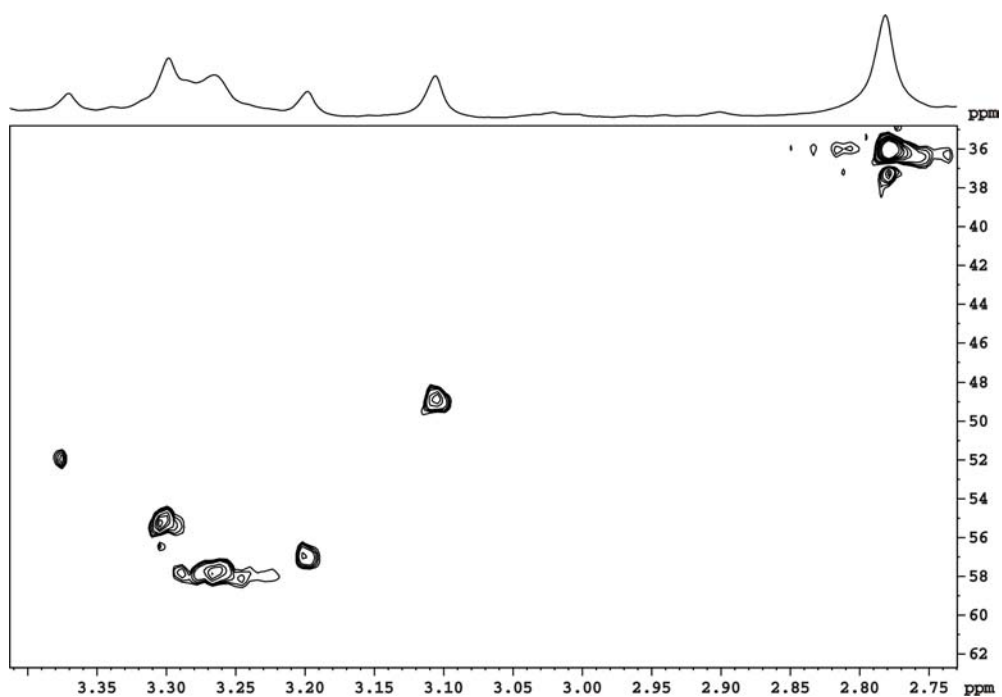
ESPECTRO 35 - Espectro de RMN de HSQC HR-MAS (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de *Citrus spp* jovem sob ataque de pulgões

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso INVETGSSI, com 2 K pontos digitalizados em F_2 , larguras espectrais de 4401,41 Hz em F_2 e de 18112,17 Hz em F_1 , tempo de aquisição de 0,15 s, tempo de reciclagem de 1,0 s, tempo de saturação do sinal dos hidrogênios ligados ao ^{12}C de 80 μs , duração dos pulsos de rf (90°) de 11,80 μs e de gradiente de 1 ms. Foram acumulados 32 FIDs e realizados 300 e experimentos no eixo F_1 , sendo empregados D₂O como solvente e TSPA-d₄ como referência interna.

No processamento foram utilizados 2 K pontos em F_2 e F_1 e empregada a função de apodização seno-seno elevado ao quadrado, com fator de deslocamento de 3 para ambos os eixos.

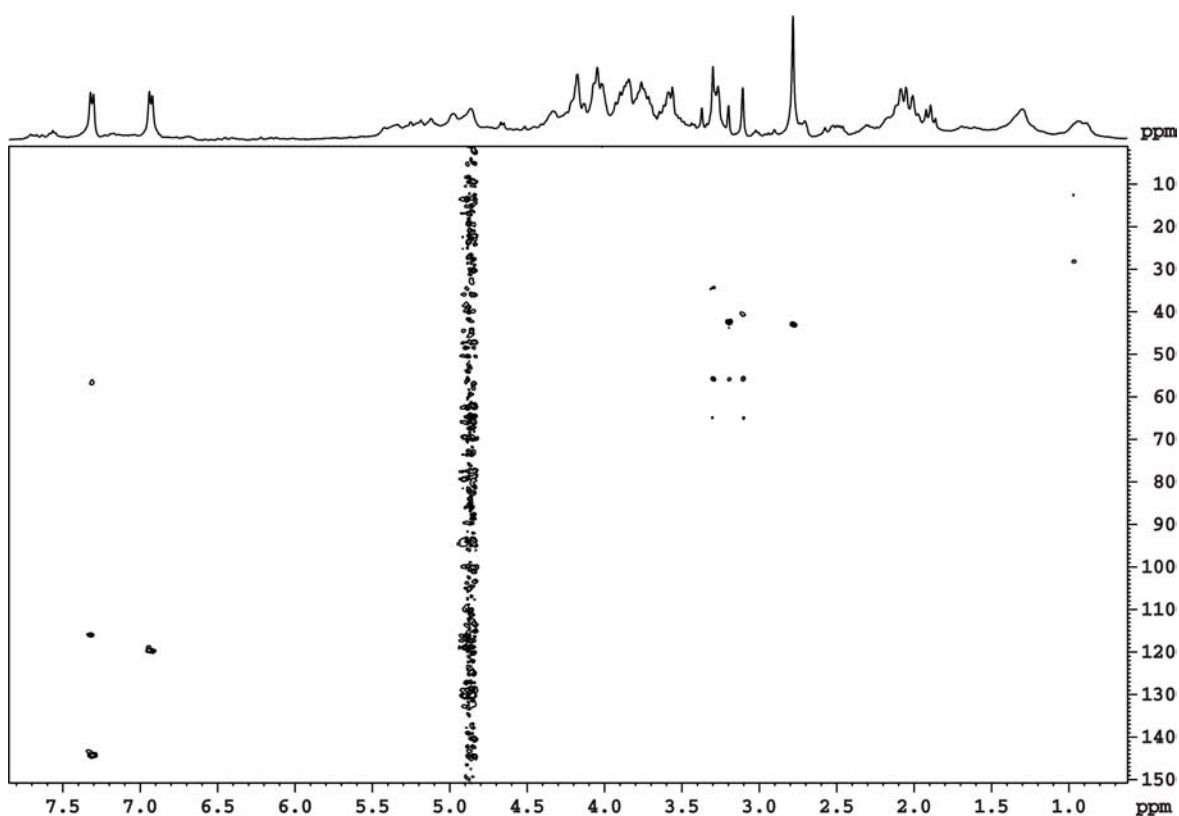


a)



b)

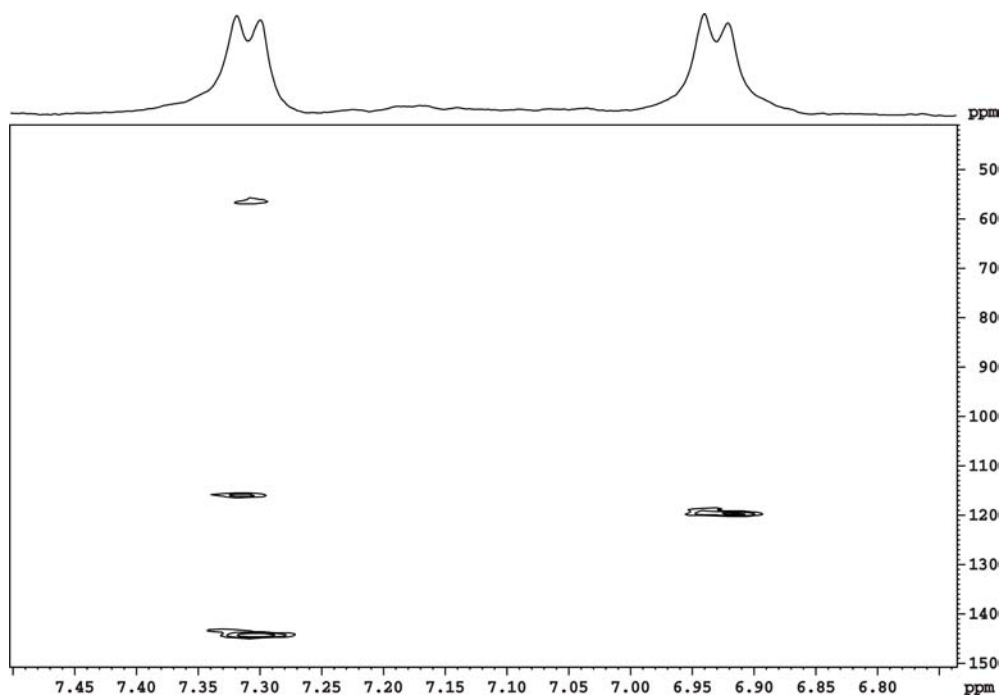
ESPECTRO 36 – Expansões de espectro de RMN de HSQC HR-MAS (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de *Citrus spp* jovem sob ataque de pulgões: a) região de δ 7,35 a 6,85 ppm; b) região de δ 3,40 a 2,68 ppm



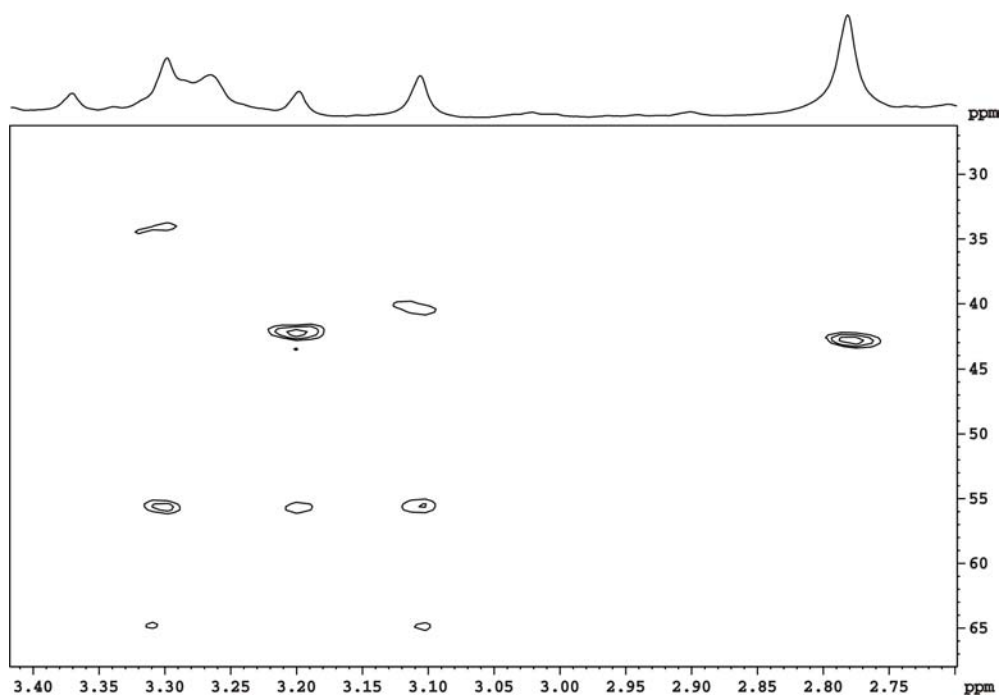
ESPECTRO 37 - Espectro de RMN de HMBC HR-MAS (¹H SFO1 = 400,13 e ¹³C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de *Citrus spp* jovem sob ataque de pulgões

O espectro foi obtido empregando-se o programa de pulso INVI4GPLPLRND, com 2 K pontos digitalizados em F_2 , larguras espectrais de 4401,41 Hz em F_2 e de 18112,17 Hz em F_1 , tempo de aquisição de 0,15 s, tempo para evolução do acoplamento em longa distância de 62,5 ms, tempo de reciclagem de 1,1 s, duração dos pulsos de rf (90°) de 11,80 μ s e de gradiente de 1,0 ms. Foram acumulados 96 FIDs e realizados 300 e experimentos no eixo F_1 , sendo empregados D₂O como solvente e TSPA-d₄ como referência interna.

No processamento foram utilizados 2 K pontos em F_2 e F_1 e empregada a função de apodização seno-seno elevado ao quadrado, com fator de deslocamento de 3 para ambos os eixos.



a)



b)

ESPECTRO 38 – Expansões do espectro de RMN de HMBC de HR-MAS (^1H SFO1 = 400,13 e ^{13}C SFO2 = 100,52 MHz) de folha de *Citrus spp* jovem sob ataque de pulgões: a) região de δ 7,50 a 6,75 ppm; b) região de δ 3,40 a 2,65 ppm

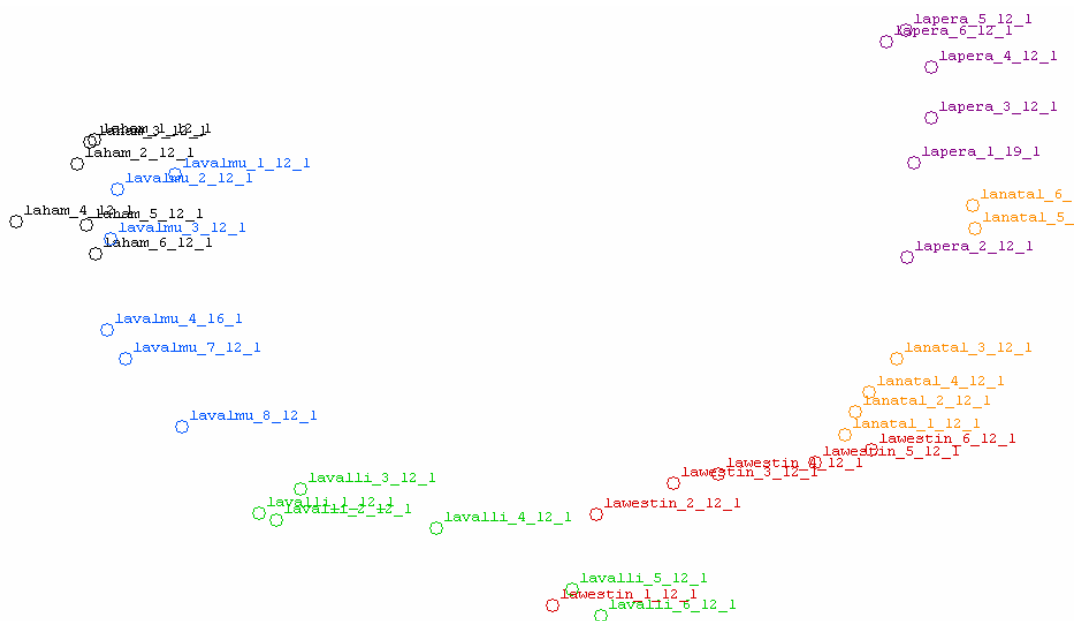


Gráfico 1 – Gráfico de escores de PC1 x PC2 das seis variedades de *Citrus*, região de δ 3,0 a 5,6 ppm

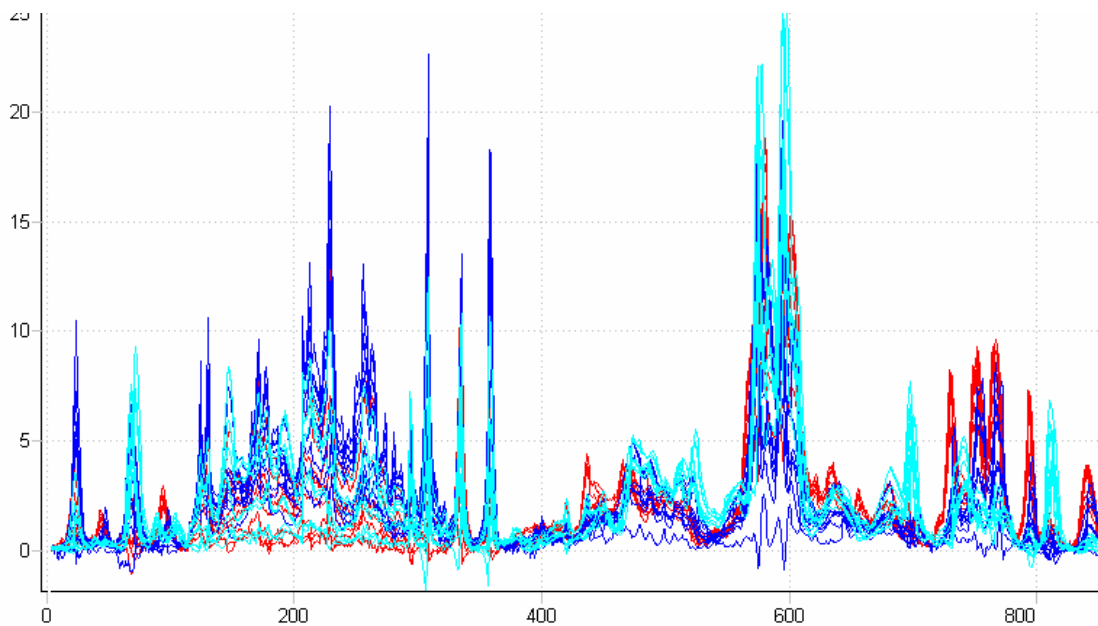


Gráfico 2 - Gráfico de variáveis versus matriz X reconstruída após a normalização dos dados

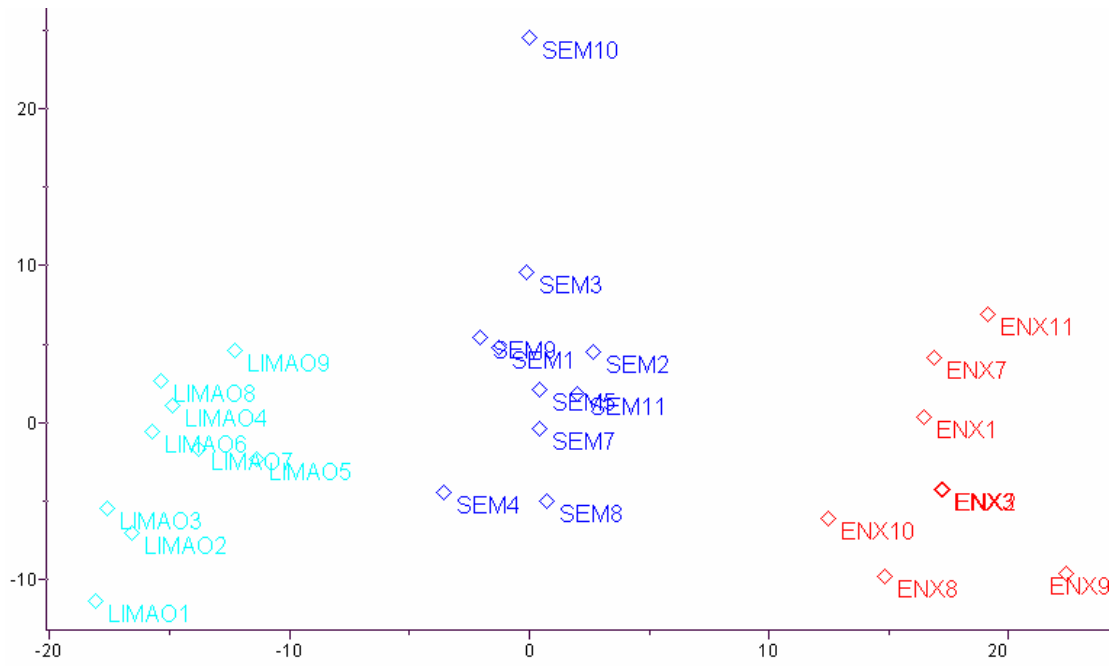


Gráfico 3 - Gráfico de escores de PC1 (36,4%) versus PC4 (6,3%, variância cumulativa de 75,2%) obtido sem seleção de variáveis.

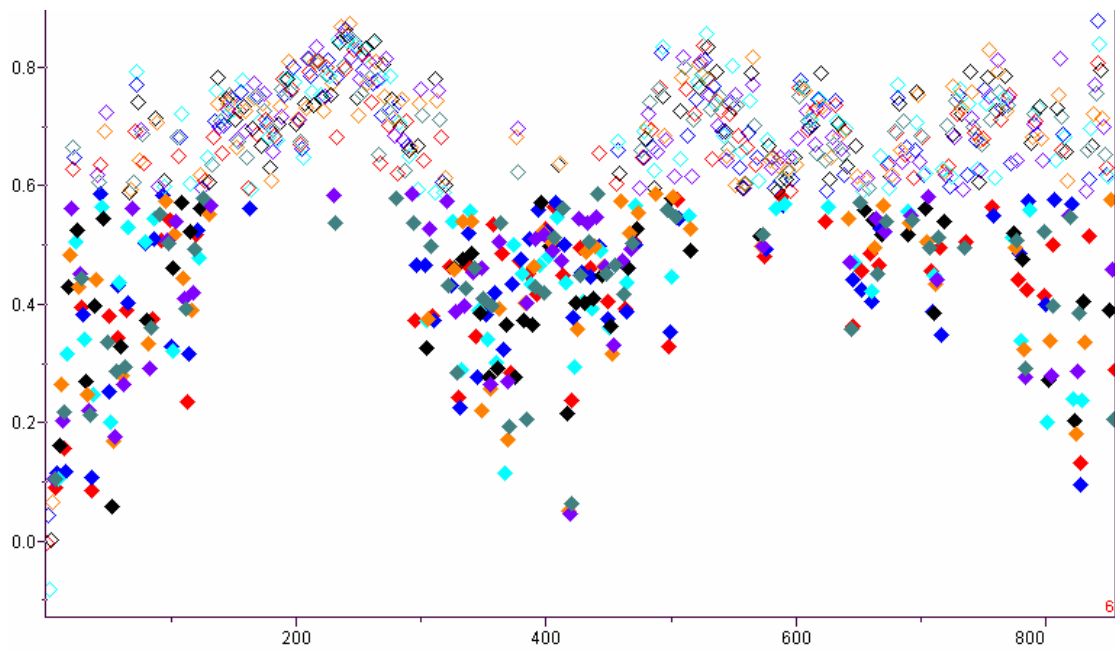


Gráfico 4 - Gráfico do índice de variáveis versus poder de modelagem com variáveis selecionadas de 0 a 0,5

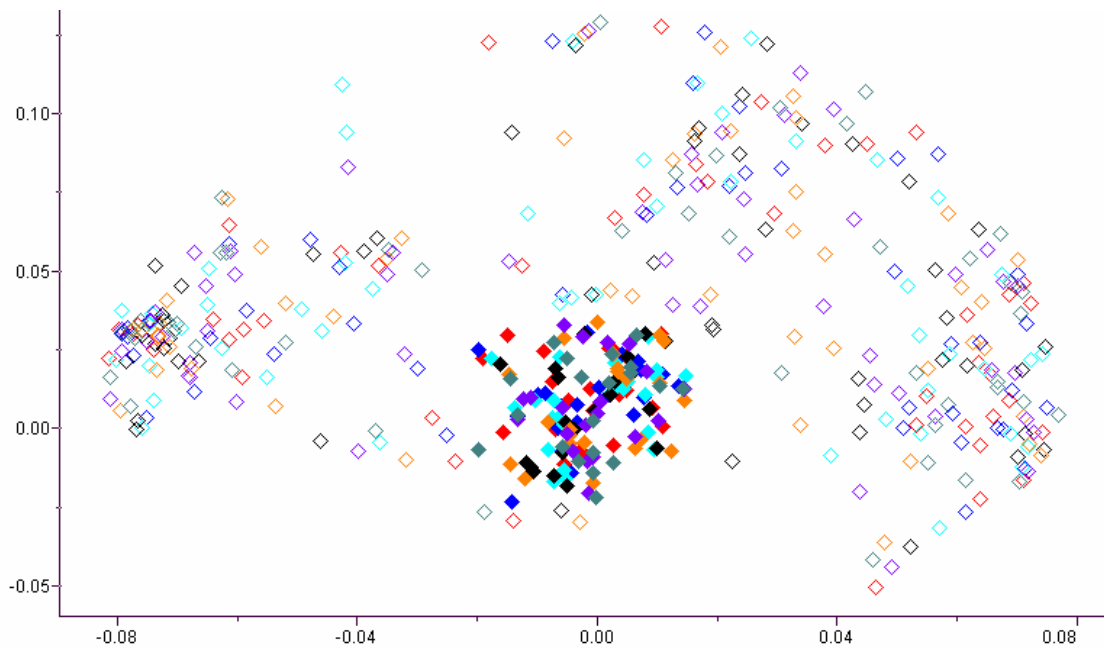


Gráfico 5 - Gráfico de pesos de PC2 versus PC3, com seleção das variáveis com pesos próximos a zero

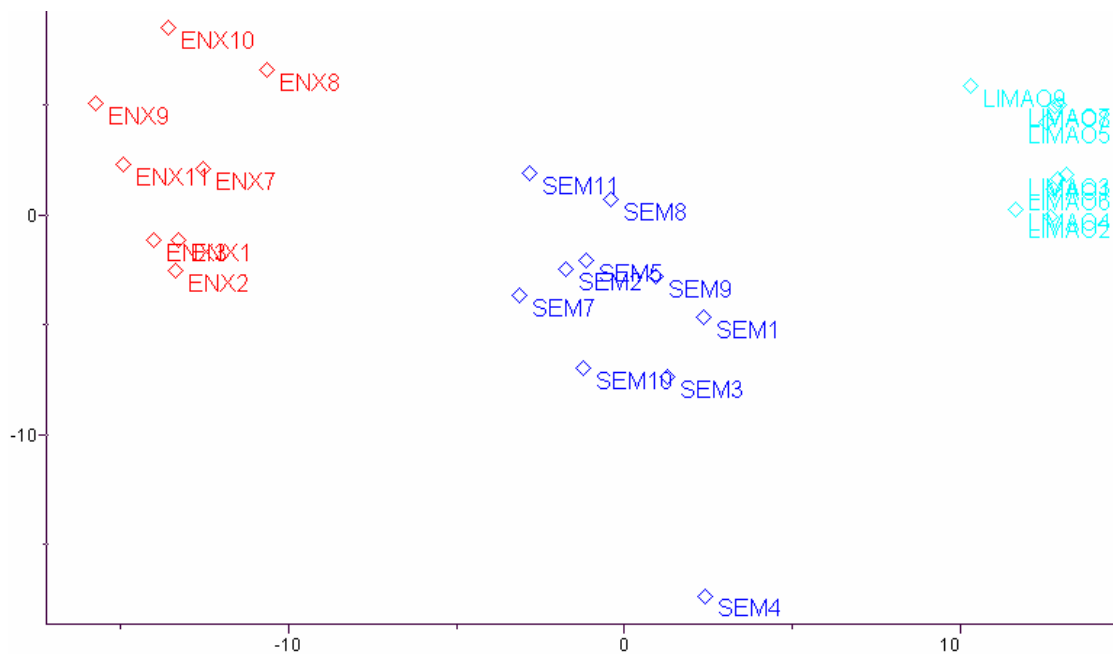


Gráfico 6 - Gráfico de escores de PC1 (47,0%) versus PC3 (12,8%, variância cumulativa de 72,5%) obtido após seleção de variáveis

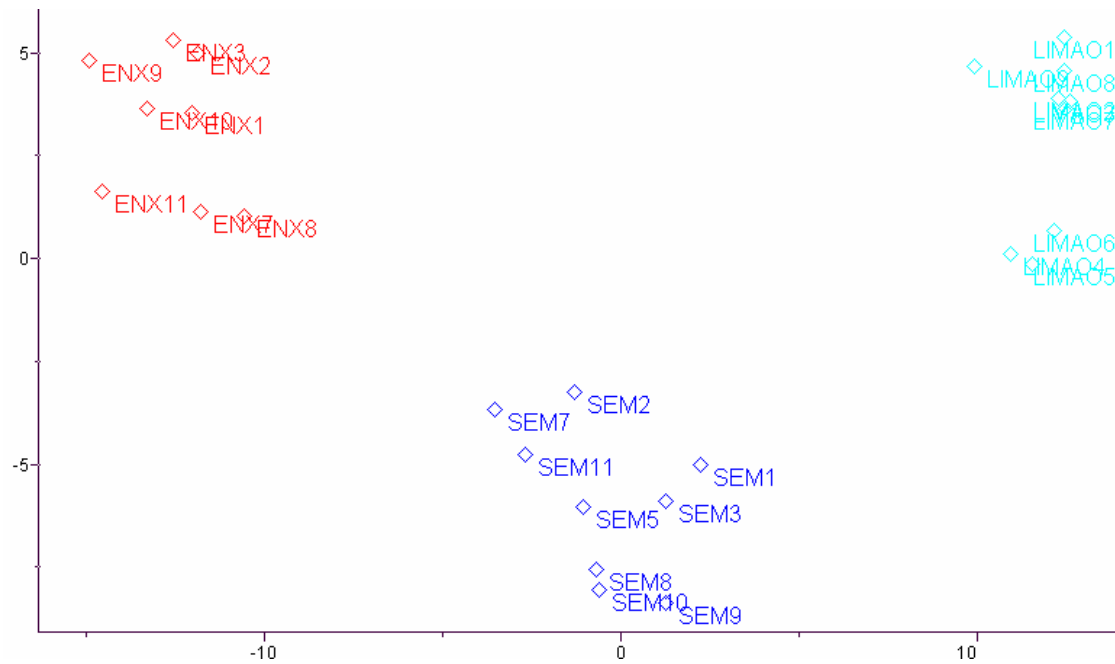


Gráfico 7 - Gráfico de escores de PC1 (48,5%) versus PC3 (10,4%, variância cumulativa de 74,7%) obtido sem outlier

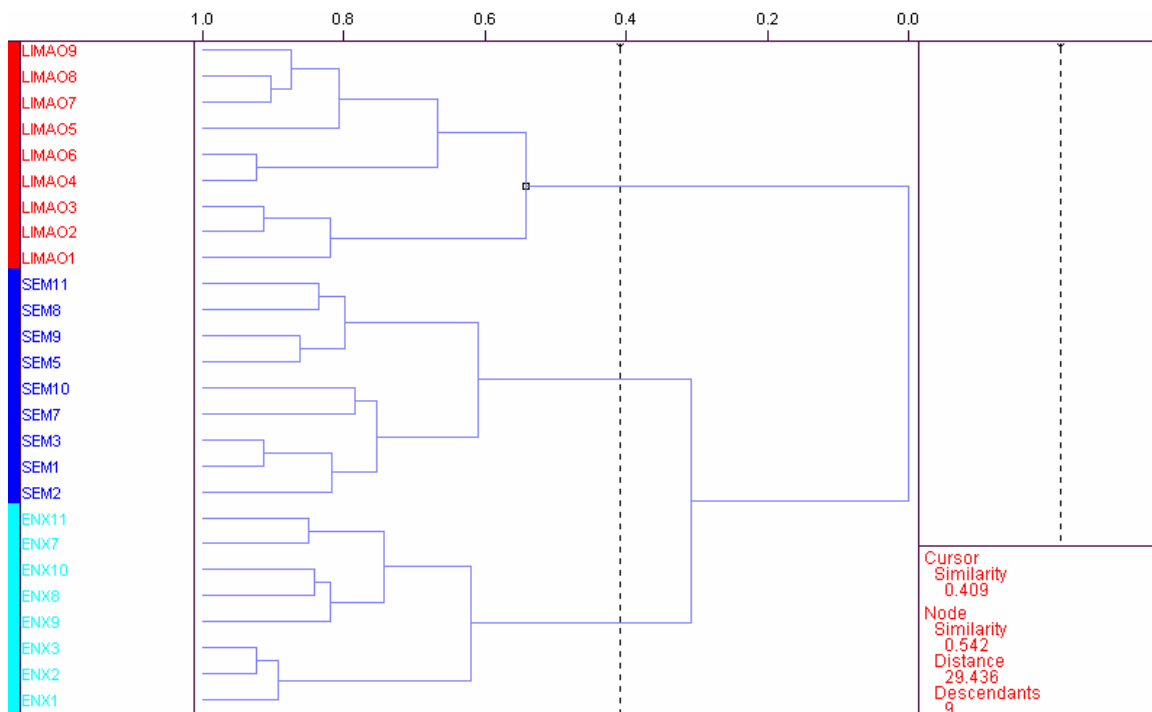


Gráfico 8 - Gráfico de HCA

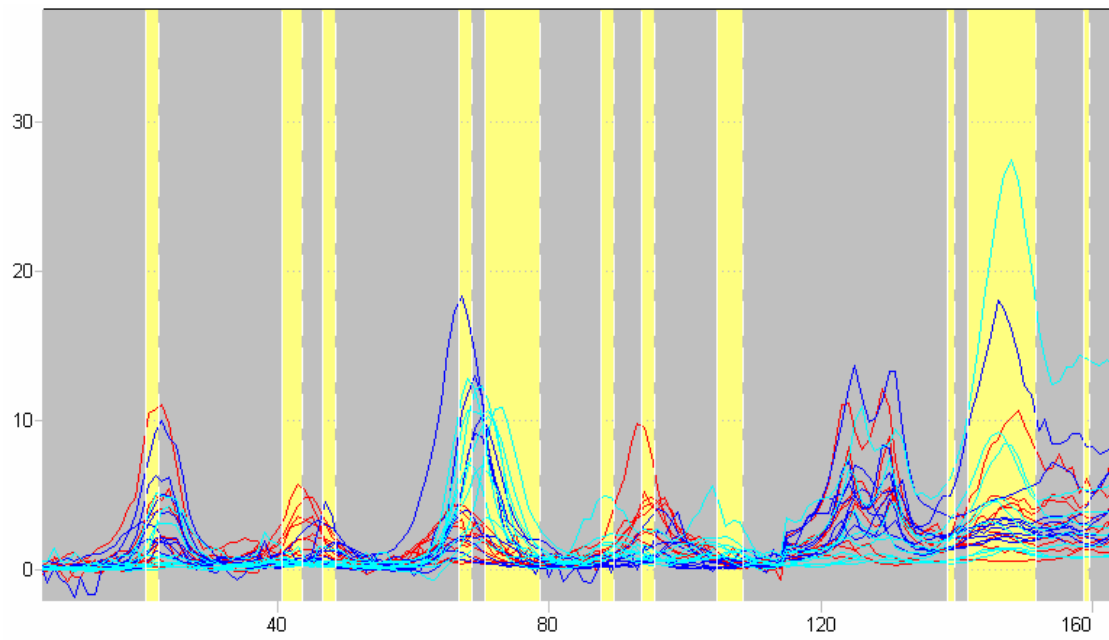


Gráfico 9 - Gráfico do índice de variáveis versus resposta - expansão da região da 1^ª a 165^ª variável.

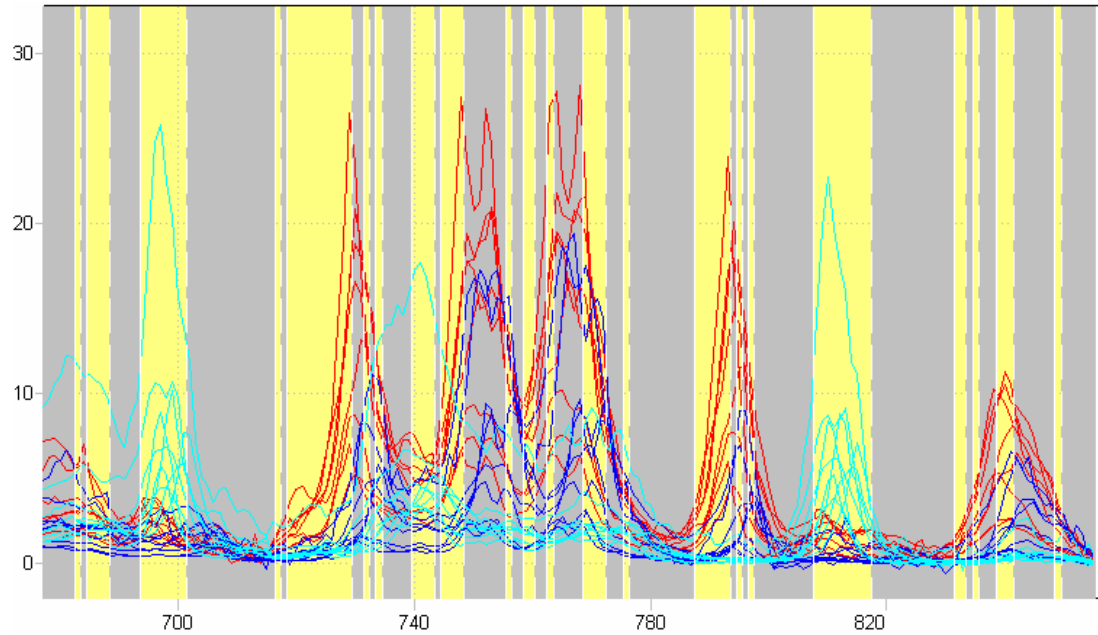


Gráfico 10 - Gráfico do índice de variáveis versus resposta - expansão da região da 680^ª a 860^ª variável