

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

**Precessão Livre de Onda Contínua (CWFP) como  
ferramenta para supressão do sinal de solvente  
em RMN de alta resolução.**

**CLAUDIMAR JUNKER DUARTE\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio**

**\*bolsista Capes**

**São Carlos-SP  
2011**

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

D812pL

Duarte, Claudimar Junker.

Precessão Livre de Onda Contínua (CWFP) como ferramenta para supressão do sinal de solvente em RMN de alta resolução / Claudimar Junker Duarte. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

84 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

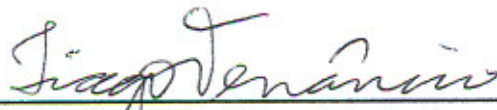
1. Química orgânica. 2. Precessão Livre de Onda Contínua (CWFP). 3. Supressão do sinal do solvente. 4. RMN de  $^1\text{H}$  em alta resolução. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

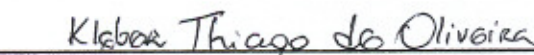
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato **Claudimar Junker Duarte**, realizada em 01 de agosto de 2011:*

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Tiago Venâncio

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luiz Alberto Colnago

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira

## **Das Utopias**

Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!

**Mario Quintana**

Aos meus familiares,  
em especial aos meus adoráveis pais, Satilo  
e Deja, que tanto prezaram pelos educação  
dos filhos...

À minha querida Elis,  
razão de minha vida e inspiradora  
de todos os meus sonhos...

Dedico.

## Agradecimentos

Sempre acreditei ser insuficiente o espaço para agradecer todos àqueles dignos de minha gratidão nesta jornada. Mesmo assim, o meu eterno obrigado:

- ✓ À Deus, por segurar em minhas mãos em todos os instantes de minha vida.
- ✓ A toda família Junker & Duarte, pelos ensinamentos, oportunidade e reconhecimento. Um agradecimento em especial aos meus Irmãos Claudio, Cleonice, Gilberto (*in memory*) e Gilmar. Vocês são muito especiais para mim.
- ✓ Ao meu orientador professor Dr. Tiago Venâncio, pela ampla colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pelo grande espírito científico.
- ✓ Ao professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pelo exemplo profissional e, juntamente com o professor Tiago, pela oportunidade em realizar este trabalho.
- ✓ A todos os amigos do grupo de RMN da UFSCar: Clayton, Daniele, Darlene, Eduardo, Elenilson, Francisco, Sérgio (Tião), Katuxa, Lorena, Luiz, Lyege, Nazish e Sheraz (alunos) e Luciana e Paulo (técnicos).
- ✓ Aos membros da banca, professor Dr. Kleber Thiago de Oliveira e Dr. Luiz Alberto Colnago, por aceitarem o convite.
- ✓ A toda a comunidade da UFSCar, em especial do departamento de Química, pela recepção calorosa e o companheirismo.
- ✓ À Arlete, Julieta e Zenaide pelas oportunidades e incentivo à minha formação.
- ✓ Aos amigos de república Marco, Cyber e Eduardo pela amizade e bom convívio.
- ✓ À Capes, pela bolsa de estudos concedida e as outras instituições: Fapesp, CNPq e INCT pelo suporte financeiro ao laboratório.

## Lista de abreviaturas e símbolos

$B_0$  - Campo magnético externo

$B_1$  - Campo magnético oscilante

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CWFP - AF Precessão Livre de Onda Contínua com alternância de fase

$G_z$  - Gradiente de campo magnético aplicado no eixo z.

$M^-$  - Magnetização imediatamente antes da aplicação do pulso

$M^+$  - Magnetização após aplicação do pulso

$M_{+s}$  - Magnetização no estado verdadeiramente estacionário

$M_0$  - Magnetização no equilíbrio térmico

$M_{xy}$  - Magnetização projetada no plano xy do sistema de coordenadas girantes

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SSFP - Steady-State Free Precession

$T^*$  - Constante de tempo de decaimento do sinal SSFP/CWFP

$T_1$  - Constante de tempo de relaxação longitudinal

$T_2$  - Constante de tempo de relaxação transversal

$T_2^*$  - Constante de tempo de relaxação sob efeito heterogeneidade do campo

TMS - Tetrametilsilano

TMSP - Trimetilsilil-2, 2, 3, 3-d4-propionato de sódio

$T_p$  - Intervalo de tempo entre os pulsos

$\psi$  - Ângulo de defasagem ou precessão

$\alpha$  - Ângulo de rotação

$\omega$  - Frequência de uma dada isocromata

$\omega_0$  - Frequência do referencial rotativo

$\gamma$  - Razão magnetogírica

$\delta$  - Deslocamento químico

## **Lista de Tabelas**

TABELA 3. 1- Sequência de pulsos CWFP convencional na forma escrita.....	34
TABELA 3. 2- Sequência de pulsos CWFP-AF na forma escrita.....	35
TABELA 4. 1- Valores para a concentração de sacarose nas quatro amostras diferentes de uva utilizando-se do método CWFP-AF e °Brix .....	68
TABELA 4. 2- Valores reajustados para a concentração de sacarose nas quatro amostras diferentes de uva utilizando-se do método CWFP-AF e °Brix.....	70



## Lista de Figuras

- FIGURA 1. 1- Representação esquemática da pré-saturação do sinal do solvente.  
..... 6
- FIGURA 1. 2- Representação esquemática da sequência *Jump-and-Return*. ..... 7
- FIGURA 1. 3- Representação do efeito de um gradiente (aplicado no eixo z) na velocidade de precessão dos spins ao longo do tubo. Círculos abertos e fechados representam os vetores entrando e saindo no plano da página, respectivamente. 9
- FIGURA 1. 4- Representação dos spins de uma amostra sujeita a um gradiente  $G_z$ , vistos da parte superior do tubo..... 10
- FIGURA 1. 5- Representação esquemática da ação de dois gradientes de magnitude e duração iguais e fases diferentes sobre um conjunto de spins de uma amostra. .... 11
- FIGURA 1. 6- Representação da Sequência de pulsos Watergate. .... 12
- FIGURA 1. 7- Representação esquemática da intensidade do sinal de RMN depois de aplicado um trem de pulsos de pulsos igualmente espaçados por  $T_p < T_2$ . .... 14
- FIGURA 1. 8- Representação do modelo vetorial proposto por Hahn para descrição do eco formado por dois pulsos de  $90^\circ$ .<sup>32</sup> ..... 15
- FIGURA 1. 9- Sinais de RMN  $^1\text{H}$  obtidos de um trem de pulsos de  $90^\circ$  igualmente espaçados por um intervalo de  $T_p < T_2$ .<sup>31</sup> ..... 17
- FIGURA 1.10- Simulação do espectro de RMN no estado estacionário para diversas condições de homogeneidade do campo.<sup>31</sup> ..... 18
- FIGURA 1. 11- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de óleo, com pulsos de  $90^\circ$ ,  $T_1 = 138$  ms,  $T_2 = 53$  ms,  $T_2^* = 0.5$  ms e  $T_p$  de 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7; 0,9 e 0,3 ms, para os espectros a-h respectivamente<sup>25</sup> ..... 19
- FIGURA 1. 12- Sinal resultante da combinação das componentes FID e eco, como uma dependência do ângulo de defasagem  $\Psi$ .  $\Psi = 5\pi$ , Interferência construtiva (parte superior) e  $\Psi = 4\pi$  interferência destrutiva ( parte inferior).<sup>31</sup> 20

- FIGURA 1. 13- Estabelecimento do estado estacionário para uma amostra de água com  $T_2= 2.7$  s,  $T_p$  de 300  $\mu$ s. (a)  $\Psi= 4\pi$  e (b)  $\Psi= 5\pi$ .<sup>25</sup> ..... 21
- FIGURA 1. 14- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido fosfórico nos regimes de (a) alternância de amplitude, (b) quase-estacionário e verdadeiramente estacionário (c).<sup>34</sup> ..... 22
- FIGURA 1. 15- Representação vetorial para a magnetização (a) durante o equilíbrio térmico, (b) durante o pulso e (c) após o pulso. .... 24
- FIGURA 1. 16- Sinal de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostras de 2.2 mg de óleo de girassol. a) Experimento FID adquirido com  $T_p= 5T_1= 690$  ms, pulso de excitação  $\theta=\pi/2$  e b) sinal CWFP adquirido com um  $T_p= 0,3$  ms e  $\theta=\pi/2$ .<sup>25</sup> .... 28
- FIGURA 1. 17- Amplitude do sinal CWFP para amostras de sementes de ervilha.<sup>25</sup> ..... 28
- FIGURA 1. 18- Ecos no estado estacionário no FID do iodeto de metila enriquecido com  $^{13}\text{C}$ . a) Utilizando um tempo de repetição constante entre os pulsos; b) Utilizando um tempo de repetição com um retardo aleatório entre os pulsos.<sup>31</sup> ..... 30
- FIGURA 1. 19- Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de iodeto de metila observados no estado estacionário utilizando  $T_p$  (a) constante, (b) aleatório após cada pulso e (c) após aplicação de 64 pulsos<sup>31</sup>. ..... 31
- FIGURA 3. 1- Representação esquemática para as análises envolvendo Glicina. .... 38
- FIGURA 4. 1- Representação esquemática da sequência CWFP convencional 42
- FIGURA 4. 2- Perfis de excitação da sequência CWFP convencional para as larguras de pulsos de 15, 45, 90 e 150° no modo fase (a, c, e, g) e no modo magnitude (b, d, f, h) respectivamente.  $T_p=500$   $\mu$ s e  $n=1024$  pulsos..... 45
- FIGURA 4. 3- Perfis de excitação para a sequência CWFP convencional nos modos fase (em vermelho) e absoluto (em preto)..... 46

FIGURA 4. 4- Perfis de excitação (modo absoluto) a partir de várias larguras de pulsos diferentes: a) 200, b) 250, c) 300, d) 400, e) 500 e f) 550 $\mu$ s. $P_1= 90^\circ$ e $n= 1024$ pulsos.....	47
FIGURA 4. 5- Representação esquemática da alternância de fases. ....	49
FIGURA 4. 6- Representação esquemática da sequência CWFP-AF .....	49
FIGURA 4. 7- Perfil de excitação (modo fase) para a sequência CWFP-AF. $P_1= 90^\circ$ , $T_p= 500 \mu$ s, $n= 1024$ pulsos. ....	50
FIGURA 4. 8- Representação esquemática das sequências de pulsos : a) Pré-saturação com incremento NOE e b) Pré-saturação com pulso composto. $T_{mix}$ representa o tempo de mistura.....	52
FIGURA 4. 9- Espectro parcial de RMN de $^1H$ de uma amostra de sacarose 20 mM: a) sem supressão do sinal da água, b) utilizando-se da sequência CWFP convencional e c) CWFP-AF. ....	53
FIGURA 4. 10- Espectro de RMN $^1H$ no domínio do tempo para amostra de sacarose 20 mM: a) CWFP convencional e b) CWFP-AF. Espectros adquiridos com 256 scans. ....	54
FIGURA 4. 11- Espectro parcial de RMN de $^1H$ para a sacarose 20 mM: a) sem supressão, b) utilizando-se da pré-saturação com incremento NOE, c) pré-saturação com pulso composto e d) CWFP-AF.....	55
FIGURA 4. 12: Espectro de RMN de $^1H$ (sem supressão) da amostra de RITMONEURAM® dissolvido em metanol- $d_4$ .....	56
FIGURA 4. 13- Espectro de $^1H$ de RMN da amostra RITMONEURAM®. a) Pré-saturação com pulso composto b) pré-saturação com incremento NOE e c) CWFP-AF.....	57
FIGURA 4. 14: Estrutura da Glicina em $pH \cong 7.0$ . ....	59
FIGURA 4. 15- Espectros de RMN de $^1H$ para a glicina. a) Sem supressão, b) utilizando a sequência com pré-saturação com pulso composto e c) CWFP-AF. ....	60

- FIGURA 4. 16- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da sacarose 20 mM dissolvida em  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$  (sem supressão de sinais de solventes). ..... 62
- FIGURA 4. 17- Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da sacarose 20 mM com supressão do sinal da água e da acetonitrila: a) utilizando CWFP convencional com a frequência de defasagem fixa no sinal da água, b) CWFP-AF com a frequência de defasagem fixa no sinal da água e c) no sinal da acetonitrila. .... 63
- FIGURA 4. 18- Estrutura da sacarose..... 65
- FIGURA 4. 19- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a uva Itália sem supressão do sinal da água..... 66
- FIGURA 4. 20- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com supressão do sinal da água utilizando-se da sequência CWFP-AF para as quatro amostras analisadas de uva. a) Itália, b) Niagara, c) Rubi e d) Red Globe. .... 67
- FIGURA 4. 21- Curvas de calibração para cinco amostras de sacarose: a) utilizando o método CWFP-AF e b)  $^\circ\text{Brix}$ ..... 68
- FIGURA 4. 22- Correlação entre os valores de concentração obtidos através dos métodos CWFP-AP e  $^\circ\text{Brix}$ ..... 69
- FIGURA 4. 23- Representação esquemática das sequências COSY a) com pré-saturação e com b) CWFP-AF. .... 72
- FIGURA 4. 24- Mapa de correlação COSY da amostra de sacarose 20 mM: a) Utilizando-se do trem de pulsos CWFP-AF e da b) pré-saturação. O tempo total do experimento foi de 2h..... 73
- FIGURA 4. 25- Sequência de pulsos para o experimento de HMBC a) utilizando-se da pré-saturação e do b) trem de pulsos CWFP-AF. “X” representa o canal do carbono ou nitrogênio.  $\Delta$  representa um tempo de espera entre os pulsos. Barras finas e largas representam pulsos de  $90^\circ$  e  $180^\circ$ , respectivamente. .... 75
- FIGURA 4. 26- Mapa de correlação HMBC para amostras de sacarose 20 mM: a) Utilizando-se da pré-saturação e b) do trem de pulsos CWFP-AF O tempo total de ambos os experimentos foi de 5h. .... 76

FIGURA 4. 27- Estrutura da sacarose mostrando algumas das correlações a longa distância entre  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , obtidas através do HMBC..... 77

## Resumo

### PRECESSÃO LIVRE DE ONDA CONTÍNUA (CWFP) COMO FERRAMENTA PARA SUPRESSÃO DO SINAL DE SOLVENTE EM RMN DE ALTA RESOLUÇÃO.

A aplicação do método de Precissão Livre de onda Contínua (CWFP) para supressão de sinal(s) de solvente(s) em RMN de alta resolução 1D e 2D é reportada. A metodologia aplicada baseou-se no uso da sequência convencional, que se utiliza de um trem de pulsos de mesma fase, intensidade e duração, separados por um intervalo de tempo  $T_p$  menor que os tempos de relação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) da amostra. Em seguida, foram realizadas modificações que correspondem à alternância nas fases dos pulsos. Estas modificações permitiram minimizar anomalias de fase que resultam da refocalização da magnetização e que ocorrem nos espectros de  $^1\text{H}$  quando se utiliza da sequência convencional. Através da nova sequência, denominada CWFP-AF, foi possível a supressão de sinal(s) de solventes em várias amostras com características distintas e determinação do teor de sacarose em quatro tipos diferentes de uva (*Vitis vinifera*) disponíveis no comércio local. Além disso, o trem de pulsos com alternância de fases foi inserido em dois experimentos de RMN 2D de rotina: COSY (*Correlation Spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy*). Os resultados foram comparados com sequências tradicionais para supressão de sinal de solvente e demonstram o potencial da Precissão Livre de Onda Contínua para experimentos desta natureza.

## Abstract

### CONTINUOUS WAVE FREE PRECESSION (CWFP) AS TOOL FOR SOLVENTE SUPPRESSION IN HIGH RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY

The application of Continuous Wave Free Precession (CWFP) method for solvent suppression in high resolution NMR spectroscopy is reported. The applied methodology was based in the use of conventional pulse sequence that use a train of pulses with same phase, intensity and duration, separated by a time interval ( $T_p$ ) shorter than the longitudinal ( $T_1$ ) and transverse ( $T_2$ ) relaxation times of the sample. After that, it was performed modifications that correspond to the phase alternation of pulses. These modifications allowed to minimize phase anomalies, which result from the refocusing of the magnetization and occur in the  $^1\text{H}$  spectrum when using the conventional pulse sequence. Through the new sequence, named PA-CWFP, it was possible to suppress solvent signals in several samples with different characteristics and the determination of sucrose content in four different types of grapes (*Vitis vinifera*), available in the local trade. In addition, the train of pulses with phase alternation was added in two routines 2D experiments: COSY (Correlation Spectroscopy) and HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy). The results were compared with traditional sequences for solvent suppression and demonstrate the potential of Continuous Wave Free Precession method for experiment of this type.

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1	SUPRESSÃO DO SINAL DO SOLVENTE	2
1.1.1	Sequências de pulsos	5
1.1.1.1	Saturação do sinal do solvente	5
1.1.1.2	Excitação nula	7
1.1.1.3	Destruição da magnetização do solvente	8
1.2	ESTADO ESTACIONÁRIO	13
1.2.1	Teoria da precessão livre de onda contínua (CWFP)	22
1.2.2	Aplicações do Estado Estacionário	26
1.2.3	Anomalias de fase e de intensidade no estado estacionário	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
3.1	PROGRAMAÇÃO DA SEQUÊNCIA CWFP	34
3.1.1	Aplicação do método CWFP em experimentos 2D	35
3.2	CONSTRUÇÃO DOS PERFIS DE EXCITAÇÃO	36
3.3	TESTES DE SUPRESSÃO 1D	37
3.3.1	Amostra de sacarose	37
3.3.2	Aplicação em amostra de rotina	37
3.3.3	Amostra de Glicina	38
3.3.4	Testes de dupla supressão	39
3.3.5	Amostras in vivo	39
3.4	TESTE DE SUPRESSÃO 2D	40
3.5	MEDIDAS DE BRIX	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
4.1	EXCITAÇÃO DA MAGNETIZAÇÃO ATRAVÉS DO ESTADO ESTACIONÁRIO	42
4.1.1	Variação da largura de pulso	43
4.1.2	Variação do intervalo de tempo entre os pulsos	46



4.2	MODIFICAÇÕES NA SEQUÊNCIA CWFP .....	48
4.3	TESTES DE SUPRESSÃO 1D .....	51
4.3.1	Supressão em <i>amostra</i> de rotina .....	55
4.3.2	Teste com prótons Trocáveis .....	58
4.4	TESTE DE DUPLA SUPRESSÃO .....	60
4.5	EXPERIMENTOS IN VIVO .....	64
4.6	CWFP APLICADA EM EXPERIMENTOS 2D .....	70
4.6.1	COSY com supressão do sinal do solvente .....	71
4.6.2	HMBC com supressão do sinal do solvente .....	74
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica relacionada às propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. Quando expostos a um campo magnético, determinados núcleos ressonam em frequências características na região das radiofrequências do espectro eletromagnético. Estas variações nas frequências de ressonância proporcionam informações detalhadas sobre a estrutura molecular em que os átomos se encontram<sup>1</sup>.

Desde a primeira observação do fenômeno RMN em água<sup>2</sup> e em parafina<sup>3</sup> esta técnica tem se consagrado como uma das mais poderosas ferramentas analíticas. Por se tratar de um método não destrutivo, o que permite estudos *in vivo*, encontra aplicações nas mais diversas áreas da Química, Biologia, Bioquímica, Ciência dos Materiais, Medicina e outros.

Basicamente, pode-se dividir a espectroscopia por RMN em duas áreas: A de baixa resolução, cujos campos operam com intensidade inferior a 2 tesla (cerca de 85 MHz para  $^1\text{H}$ ) e a de alta resolução, em que são utilizados campos magnéticos que variam deste 2.1 a valores maiores que 20 tesla. No primeiro caso, em função da homogeneidade reduzida do campo e pouca sensibilidade, torna-se aplicável somente a amostras cujos núcleos de interesse apresentem elevada abundância natural e alta razão magnetogírica como  $^1\text{H}$  e  $^{19}\text{F}$  e é muito empregada na determinação de tempos de relaxação e em medidas quantitativas de amostras heterogêneas<sup>4</sup>. Por outro lado, RMN de alta resolução, proporciona um maior número de informações a respeito da estrutura investigada devido à capacidade de discriminar melhor absorções de radiofrequências individuais<sup>5</sup>.

Através do uso da transformada de Fourier aplica a RMN, as técnicas pulsadas, magnetos supercondutores e sondas cada vez mais sensíveis, capaz de detectar um número maior de núcleos, a RMN de alta resolução tem

sido muito aplicada, por exemplo, na elucidação estrutural, análise conformacional, determinação estereoquímica, investigação de perfis metabólicos, estudo das interações proteína-ligante e outros<sup>6</sup>.

## 1.1 Supressão do sinal do solvente

O  $^1\text{H}$  é o núcleo mais sensível para RMN em função de sua alta razão magnetogírica e elevada abundância natural ( $> 99,9\%$ ). Como praticamente todos os compostos orgânicos contêm prótons, esta técnica é uma ferramenta poderosa para observar, identificar e quantificar um grande número de metabólitos importantes em tecidos intactos<sup>7</sup>. Em experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  em alta resolução envolvendo biomoléculas ou estudos *in vivo*, o solvente, quando utilizado, é geralmente composto por núcleos do mesmo tipo da amostra em interesse. Como a concentração do solvente é muito maior que a do soluto, o espectro é praticamente dominado pelo sinal do primeiro. Dessa forma, os sinais correspondentes ao soluto que ressonam muito próximo ou abaixo do intenso e largo sinal do solvente, tornam-se difíceis de serem analisados.

Para amostras muito diluídas, muitas vezes é necessário aumentar ganho do receptor (*receiver gain*, RG) para que os sinais do soluto possam ser observados. Por outro lado, o RG deve ser ajustado de forma que o FID (*Free Induction Decay*), que neste caso é praticamente dominado pelo solvente, não sature o digitalizador<sup>1</sup>. Este, por sua vez, é limitado pela faixa dinâmica do receptor a qual representa a razão entre a amplitude do maior e do menor sinal. Se um sinal for tão intenso, de forma que não possa ser registrado pelo Conversor Analógico-Digital (ADC), sua intensidade não será medida de forma adequada, o que resultará num espectro com linha de base distorcida.

Outro problema associado à concentração elevada do solvente é a dissipação da radiação (*radiation damping*). Esse efeito, que surge do acoplamento não linear entre a bobina de detecção e a magnetização transversa,

induz uma corrente oscilante na bobina que, em contrapartida, gera um campo magnético também oscilante que acelera o retorno dos spins ao estado de equilíbrio. Dessa forma, a decaimento da magnetização ocorre de uma forma mais acelerada fazendo com que os spins apresentem um tempo de relaxação longitudinal aparente ( $T_{RD}$ ) menor que o normal<sup>8</sup> e um alargamento de linha indesejável, correspondente ao sinal do solvente, podendo assim mascarar sinais do soluto.

Uma alternativa para minimizar os problemas relacionados à intensidade do solvente é utilizar-se de solventes deuterados ao invés daqueles que contém prótons. No entanto, esse método nem sempre é aplicável como, por exemplo, no estudo de proteínas e experimentos *in vivo*. Isso porque informações importantes podem ser perdidas em função processo de troca que ocorre entre átomos de deutério, do solvente, e grupos NH das ligações peptídicas das biomoléculas. A substituição do solvente pode ainda reduzir a solubilidade de determinadas proteínas, o que promove a precipitação deste material<sup>9</sup>. Outra limitação está relacionada ao advento das técnicas hífenadas, como por exemplo, CLAE-RMN (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada á RMN), em que o uso de solvente deuterados torna-se praticamente inviável, por razões de economia. Além disso, os estudos de amostras *in vivo* ou *in natura*, cuja manipulação não requer extração, dispensam o uso de solventes deste tipo por proporcionarem condições incompatíveis com a realidade.

Várias técnicas para supressão de sinais de solventes têm sido desenvolvidas e revisadas<sup>10</sup>. Um método ideal deveria suprimir apenas o sinal do solvente sem qualquer outro efeito sobre o espectro, o que representa uma prática muito difícil senão impossível.

Basicamente, os métodos para supressão de sinais de solventes são divididos em métodos de pós-processamento e métodos envolvendo sequências de pulso. No primeiro caso, a atenuação do sinal indesejado ocorre após o espectro obtido e consiste num tratamento matemático dos sinais. Geralmente, o

tratamento dos dados é realizado no domínio do tempo, uma vez que o processo de subtração do sinal do solvente, antes da transformada de Fourier, pode evitar distorções da linha de base e de fase. Além disso, filtros de frequências são utilizados para distinguir o sinal a ser suprimido dos outros sinais. Nesse caso, a componente de baixa frequência é isolada e subtraída do sinal original<sup>11</sup>.

A maior dificuldade nos métodos de pós-processamento é descrever o sinal do solvente como uma função analítica principalmente porque sua forma reflete o método a ser adotado para a supressão. Assim, problemas como mudança da área do sinal e de fase podem surgir<sup>12</sup>. Outra limitação está relacionada à necessidade de um conhecimento prévio das variáveis, nem sempre fáceis de serem tratadas, o que exige perícia do operador. Além disso, o uso desse esquema para supressão de sinais é praticável em espectrômetros com uma eletrônica mais sofisticada, incluindo ADCs com maior resolução e computadores com maior capacidade de processamento de dados, nem sempre disponíveis em todos os laboratórios de rotina de RMN.

Já o uso sequências de pulsos representa uma forma de supressão experimental muito difundida em experimento de RMN de  $^1\text{H}$ . Entende-se por sequências de pulsos como uma série de pulsos e gradientes de radiofrequência capazes de “manipular” os spins da amostra e assim proporcionar a informação desejada. No tocante a supressão, o objetivo geral é reduzir a magnitude do sinal do solvente antes de alcançar o receptor. Uma supressão eficiente significa um sinal FID menos intenso no receptor, conseqüentemente, uma maior amplificação do sinal é possível antes que alcance o digitalizador.

Em uma sequência de pulsos ideal, todos os spins do solvente deveriam experimentar exatamente a mesma radiação. Na prática isso raramente ocorre, em função da homogeneidade nem sempre estável dos campos magnéticos, o que pode resultar numa supressão insuficiente.

Existem vários mecanismos para discriminação entre os spins do solvente e do soluto como, por exemplo, através da diferença de deslocamento

químico (ou frequências), dos tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) ou movimentos de difusão das moléculas. Embora a diferença de deslocamento químico possa comprometer o sucesso da supressão quando sinais do soluto ressonam muito próximos ou abaixo do sinal solvente ou quando um *shimming* mais apreciável não é possível, este mecanismo não depende de um conhecimento prévio de parâmetros da amostra como em outras técnicas (isto é,  $T_1$ ,  $T_2$  e coeficiente de difusão) e, portanto, tem sido o mais difundido<sup>12</sup>.

De um modo geral, a supressão envolvendo sequências de pulsos é classificada em:

- Métodos baseados na saturação do sinal do solvente.
- Métodos que evitam a saturação do sinal do solvente (excitação nula)
- Métodos baseados na destruição da magnetização do solvente.

## **1.1.1 Sequências de pulsos**

### **1.1.1.1 Saturação do sinal do solvente**

A técnica mais simples e robusta de saturação do sinal do solvente é a pré-saturação. Este método envolve a aplicação de um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente seguido de outro  $\theta$  mais curto e de maior intensidade (figura 1. 1). O primeiro pulso promove a transição dos spins do estado fundamental para o estado excitado sobre uma banda de aproximadamente 1 Hz. Se a velocidade de excitação exceder o tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ), os níveis populacionais tornam-se iguais e o sinal do solvente não é observado.<sup>13</sup>

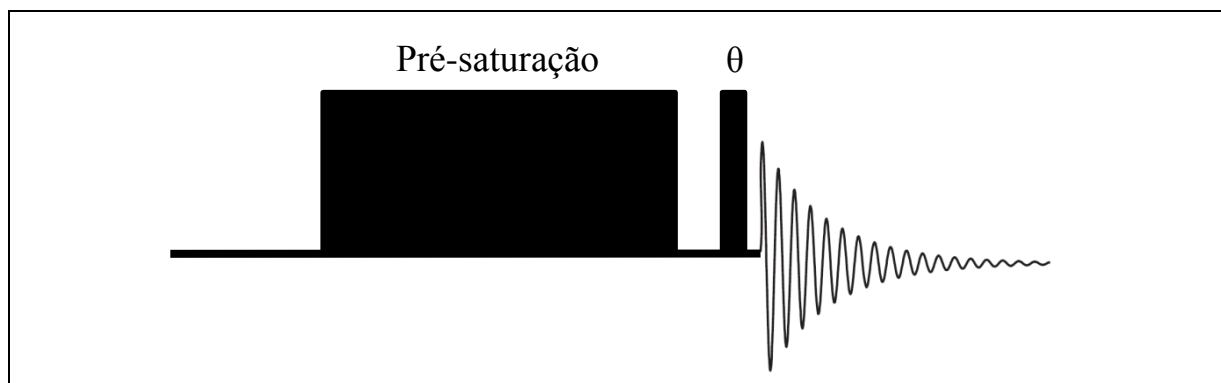


FIGURA 1. 1- Representação esquemática da pré-saturação do sinal do solvente.

Embora simples, a pré-saturação apresenta vários problemas como a necessidade de aplicação de altos níveis de potência para equalizar os estados fundamental e excitado sobre uma ampla faixa de frequências e saturação de spins de interesse que sofrem troca química com o solvente como grupos NH, OH e COOH. Isso porque a pré-saturação do solvente requer aproximadamente 1-2s. Conseqüentemente, qualquer próton com uma velocidade de troca próxima deste valor também será saturado. Este processo de troca é bastante comum em estudos sobre proteínas, conforme discutido anteriormente. Além disso, a aplicação da pré-saturação na ressonância do solvente também pode promover a saturação de sinais próximos.

Algumas modificações têm sido propostas para essa sequência como a adição de um pulso adiabático de inversão<sup>14</sup> que elimina sinais residuais das moléculas de água mais distantes da bobina de detecção (*Faraway water*). Neste trabalho<sup>14</sup>, a supressão do sinal da água em uma amostra de urina humana foi mais eficiente que o método tradicional. No entanto, os sinais de prótons trocáveis da uréia, próximos de 5.8 ppm, são significativamente atenuados devido a longa duração da pré-saturação. Em outro trabalho<sup>15</sup>, a pré-saturação utilizando gradientes de relação e ecos (PURGE) promove uma supressão altamente seletiva sem distorções da linha de base.

### 1.1.1.2 Excitação nula

Os métodos que evitam a saturação do solvente são aqueles que previnem sua excitação, ou seja, a magnetização do solvente é mantida ao longo do eixo “Z” e, ao mesmo tempo, a sequência de pulsos desloca toda a magnetização restante para o plano transversal antes da aquisição<sup>16</sup>.

O exemplo mais clássico que evita a saturação do solvente é a sequência *Jump-and-return* (FIGURA 1. 2) introduzida por Guéron e Plateau<sup>17</sup>, para estudos de ácidos nucleicos em D<sub>2</sub>O.

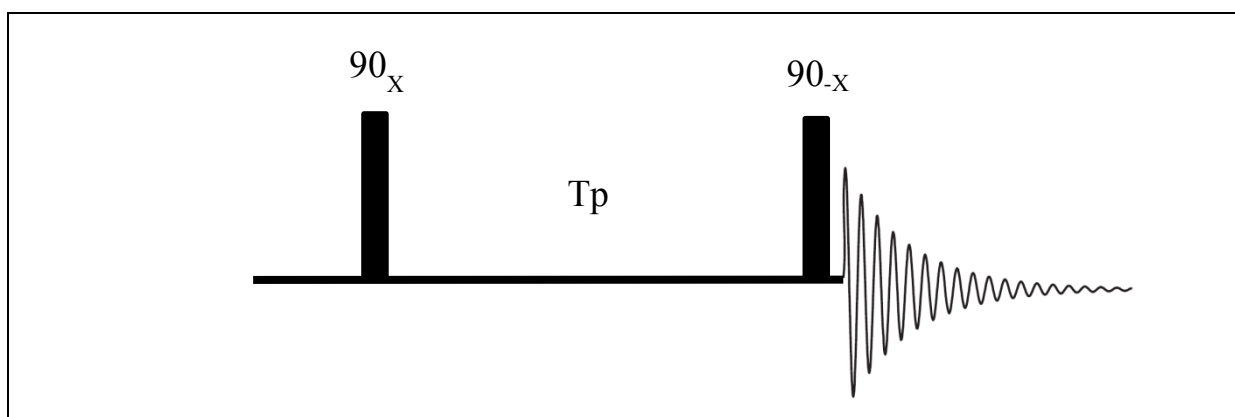


FIGURA 1. 2- Representação esquemática da sequência *Jump-and-Return*.

Conforme a figura 1. 2, esta sequência é composta por dois pulsos de 90° separados por um intervalo de tempo  $T_p$ . A frequência do transmissor é ajustada para a frequência do solvente. O primeiro pulso desloca todos os spins para o plano transversal. Durante o tempo  $T_p$  todos os spins se defasam de acordo com suas frequências de defasagem, exceto aqueles do solvente, que estão em ressonância e, portanto, apresenta frequência nula no referencial rotativo. O segundo pulso conduz os spins do solvente para o eixo “+Z” enquanto que a magnetização remanescente é deslocada do plano “XY” para “XZ”.

Por se tratar de uma sequência simples, tem sido incorporada em vários outros experimentos como NOE e RMN bidimensional. Por outro lado, o uso desta sequência introduz deslocamento de fase e problemas relacionados à



amplitude dos sinais no espectro, além de parte do sinal do solvente ser mantida mesmo após a supressão.

Várias modificações para a sequência *Jump and Return* têm sido propostas, como a adição de gradientes<sup>18</sup> e pulsos compósitos<sup>19</sup>. Além disso, um trabalho recente<sup>20</sup> demonstrou o uso do amortecimento da radiação aplicada à *Jump and Return* para melhorar a atenuação do sinal do solvente. Através da aceleração efetiva da relaxação longitudinal do solvente, é possível reduzir o tempo de espera entre os transientes e melhorar a supressão do sinal da água.

Embora apresentem algumas vantagens sobre a sequência convencional, estas alterações elevam a complexidade na implementação do experimento, além de tornar a sequência dependente de um número relativamente maior de pulsos.

### 1.1.1.3 Destruição da magnetização do solvente

Os gradientes de campo, que inicialmente foram desenvolvidos e aplicados à Ressonância Magnética de Imagem (MRI), têm sido utilizados com bastante sucesso em espectroscopia por RMN. Trata-se de períodos curtos durante os quais o campo magnético  $B_0$  torna-se não homogêneo<sup>21</sup>. É curioso imaginar que tal tecnologia seja aplicada desta maneira, uma vez que há uma busca contínua por campos magnéticos cada vez mais estáveis e elevados. Mas a verdade é que a destruição da homogeneidade do campo ocorre de uma maneira linear e previsível. A intensidade do campo magnético, após a aplicação de um gradiente, passa a ser função da posição da molécula (no caso de gradientes aplicados no eixo z) segundo a equação (1):

$$B_g(z) = B_0 + G_z \times Z \quad (1)$$

onde  $B_g$  é a intensidade do campo magnético com o gradiente de intensidade  $G_z$  ligado e  $Z$  é a posição da molécula ao longo do eixo  $z$ . Dessa forma, cada parte do tubo está sujeita a um campo magnético diferente e o resultado é que os spins dos núcleos que compõem a amostra passam a precessar em velocidades diferentes em função de ocuparem regiões distintas. A figura 1. 3 ilustra este processo:

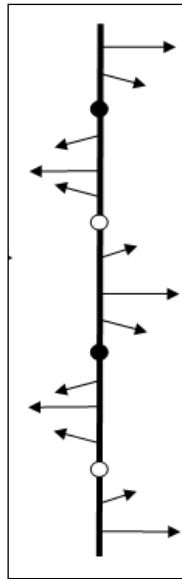


FIGURA 1. 3- Representação do efeito de um gradiente (aplicado no eixo  $z$ ) na velocidade de precessão dos spins ao longo do tubo. Círculos abertos e fechados representam os vetores entrando e saindo no plano da página, respectivamente.

Se escolhermos como zero o centro do tubo, as moléculas acima do centro experimentarão um campo magnético que cresce à medida que avançamos para a parte superior enquanto que as moléculas na parte inferior ao centro estarão sujeitas a um campo que diminui quando avançamos nesta direção. Assim, os spins na parte de cima e de baixo do tubo precessam com velocidade maior e menor, respectivamente, do que normal (ou seja, numa situação em que o gradiente não fosse utilizado).

Um espectro adquirido neste momento não exibiria sinal algum porque os spins estão totalmente defasados e a soma dos vetores que os representam é nula (figura 1. 4).

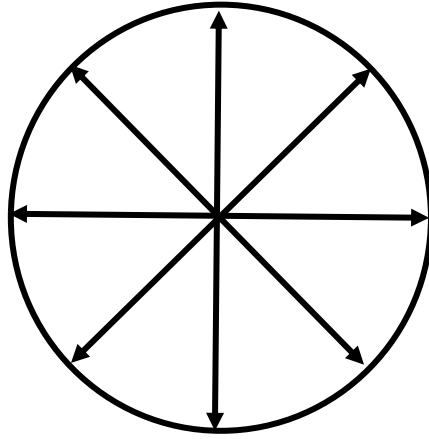


FIGURA 1. 4- Representação dos spins de uma amostra sujeita a um gradiente  $G_z$ , vistos da parte superior do tubo.

Porém, se um gradiente de mesma magnitude e duração que  $G_z$ , mas de fase oposta, for aplicado, os spins na parte superior precessarão mais lentamente e em um sentido oposto (horário ou anti-horário). O inverso é válido para os spins na parte inferior. Isto porque o gradiente  $-G_z$  diminuirá a intensidade do campo na parte de cima enquanto o aumentará na parte de baixo do tubo. Dessa forma, ao final do segundo gradiente, os spins serão novamente alinhados como se não tivessem sido defasados (figura 1. 5). Neste caso  $-G_z$  atua promovendo a recuperação da homogeneidade do campo.

Na prática, o que se utiliza são dois gradientes de mesma magnitude, duração e fase, separados por um pulso de  $180^\circ$  que inverte a posição dos spins no plano  $x'y'$ . Este arranjo entre dois gradientes e um pulso de  $180^\circ$  é conhecido como *Pulse Field Gradient Spin Echo* (PFGSE).

Porém, se este pulso de  $180^\circ$  for um pulso seletivo (*Shaped Pulse*), somente coerências selecionadas pelo mesmo serão reorientadas enquanto que as outras, não sendo alteradas por este pulso, serão destruídas<sup>1</sup>. Esta estratégia foi desenvolvida por Shaka<sup>22</sup> que a chamou de “*excitation sculpting*” devido ao fato de que a excitação de todos os spins ocorre de modo igual no início do processo e, posteriormente, tem-se o “corte” da magnetização indesejada, como um escultor revela a forma lapidando o mármore a partir de um bloco sem forma<sup>1</sup>.

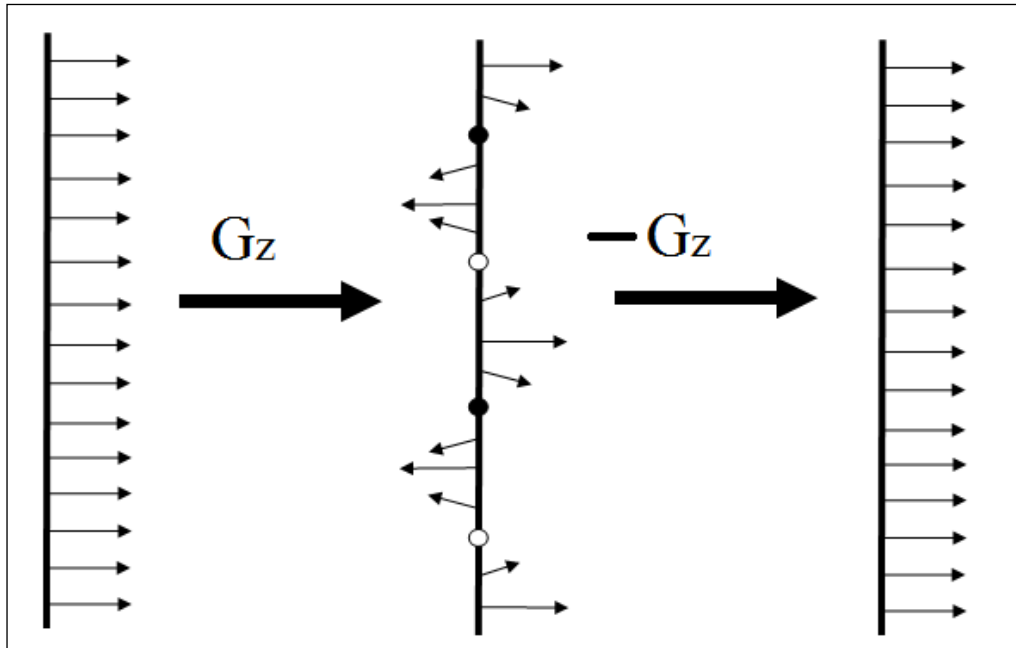


FIGURA 1. 5- Representação esquemática da ação de dois gradientes de magnitude e duração iguais e fases diferentes sobre um conjunto de spins de uma amostra.

O PFGSE pode ser utilizado como uma alternativa para remoção de sinal de solvente, quando o pulso seletivo proporciona rotação de  $180^\circ$  em todas as partes da janela espectral, exceto onde o sinal da água está posicionado. Dessa forma, todos os sinais do espectro resistem ao PFGSE, exceto o sinal do solvente, uma vez que é destruído pelos gradientes em função de não ter seus spins invertidos.

O único problema é encontrar um pulso seletivo que promova uma rotação em várias partes diferentes da janela espectral. Uma alternativa é utilizar uma série de seis pulsos duros separados igualmente pelo mesmo intervalo de tempo. Esta é a composição da sequência *Watergate* (*Water suppression by gradient-tailored excitation*) conforme figura 1. 6. As barras sobre os valores dos três últimos pulsos ( $\overline{19,9}$  e  $\overline{3}$ ) indicam inversão de fase em relação aos primeiros (3, 9 e 19).

Nesta sequência, a magnetização do solvente é destruída em função da defasagem cumulativa provocada pelos dois gradientes enquanto que todas as outras coerências são recuperadas. A intensidade da magnetização para este

experimento é muito uniforme sobre uma ampla faixa de frequências, sem distorção da linha de base e problemas com inversão de fase de sinais<sup>16</sup>. Além disso, a grande vantagem dos métodos envolvendo gradiente é que a seleção de coerências pode ser feita com um único scan, diferente de outras formas de seleção como a ciclagem de fases, onde um número muito maior de transientes é necessário.

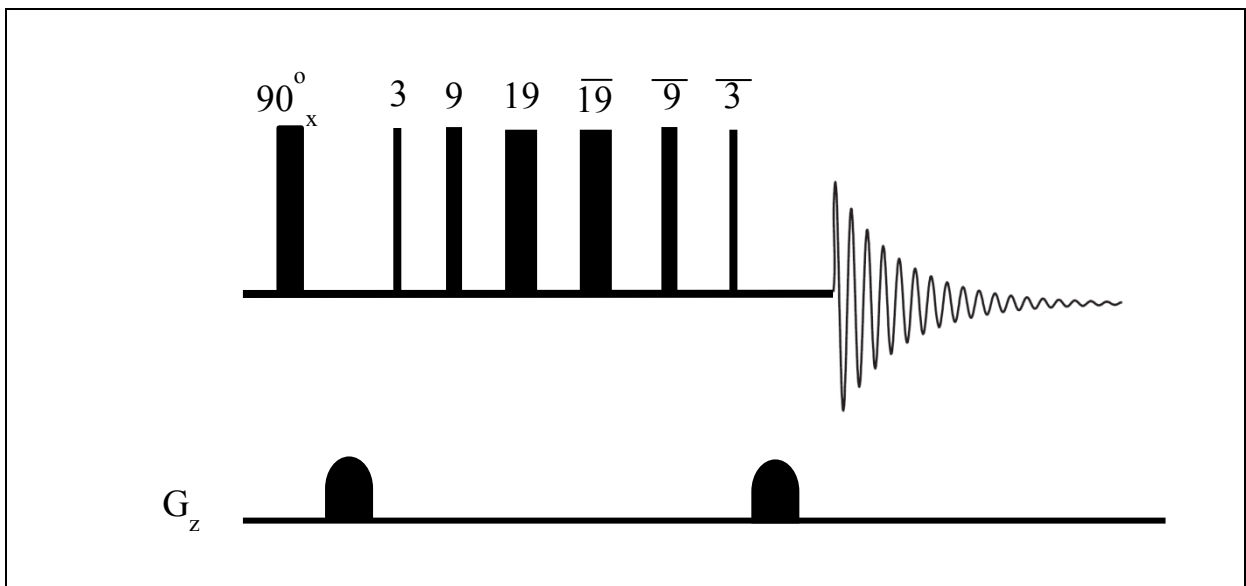


FIGURA 1. 6- Representação da Sequência de pulsos Watergate.

Embora o emprego de gradientes forneça as bases mais eficientes para a construção das sequências aplicadas a supressão de sinais, alguns problemas persistem como, por exemplo, os acessórios de gradientes (amplificadores e sondas) nem sempre disponíveis em todos os espectrômetros, os movimentos de difusão das moléculas que podem ocorrer no interior dos tubos reduzindo os sinais do soluto no espectro, perdas de sensibilidade devido à relaxação transversal ( $T_2$ ), além de reduzida seletividade. Neste último caso, o uso de gradientes promove a seleção de apenas uma coerência no tempo de cada gradiente, o que representa uma limitação frente a outras formas de seleção.

De um modo geral, a escolha de um experimento para supressão dependerá das características da amostra (presença de prótons trocáveis, o tamanho das moléculas, etc.), do solvente e do espectrômetro bem como as

informações desejadas dentro de um intervalo de tempo disponível<sup>12</sup>. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas para supressão de sinais de solventes é uma das áreas de pesquisas mais ativa em RMN principalmente em função da necessidade de novas técnicas capazes de suprimir mais de um sinal (como em Cromatografia Líquida acoplada á Ressonância Magnética Nuclear, CLAE-RMN)<sup>23, 24</sup> ou estudos *in vivo* ou *in natura* onde um pré-tratamento da amostra não é possível.

Recentemente, uma variante da Precessão Livre no Estado Estacionário (Steady State Free Precession, SSFP), chamada Precessão Livre de Onda Contínua (Continuous Wave Free Precession, CWFP), que tem sido utilizada com muito sucesso em análises de RMN de baixo campo<sup>4, 25</sup> e em medidas de fluxo<sup>26, 27</sup>, foi introduzida como um novo método de supressão de sinal de solvente<sup>28</sup>. O uso desta técnica apresenta algumas vantagens, como fácil implementação, requer baixa potência e conseqüente economia de amplificadores e não necessita de acessórios adicionais como fontes de gradiente. Foi demonstrado que ela funciona, mas ainda é necessário resolver alguns problemas que tratam principalmente das anomalias de intensidade e de fase do sinal. Além disso, uma série de aplicações desta sequência pode ser desenvolvida nos mais variados tipos de sistemas.

## 1.2 Estado Estacionário

Quando um sistema de spins é submetido a um trem de pulsos com um tempo de repetição menor que  $5T_1$ , ocorre uma saturação progressiva do sistema de spins e, conseqüentemente, uma redução da amplitude do FID.

Porém, se o mesmo sistema de spins, em equilíbrio térmico, é submetido a um trem de pulsos de mesma fase, duração e intensidade, espaçados pelo mesmo intervalo de tempo, é atingido um estado estacionário<sup>29</sup> (Steady

State, SS), onde a intensidade da magnetização se mantém constante com o tempo.

A utilização de um intervalo de tempo  $T_p < T_1, T_2$ , implica que a magnetização transversal não decai a zero, e o sistema de spins atinge não somente o regime de SS, como restabelece a intensidade da magnetização transversal que antecede cada pulso, sob a forma de eco. Esta condição é conhecida como precessão livre no estado estacionário (SSFP), conforme ilustrado na figura 1. 7.

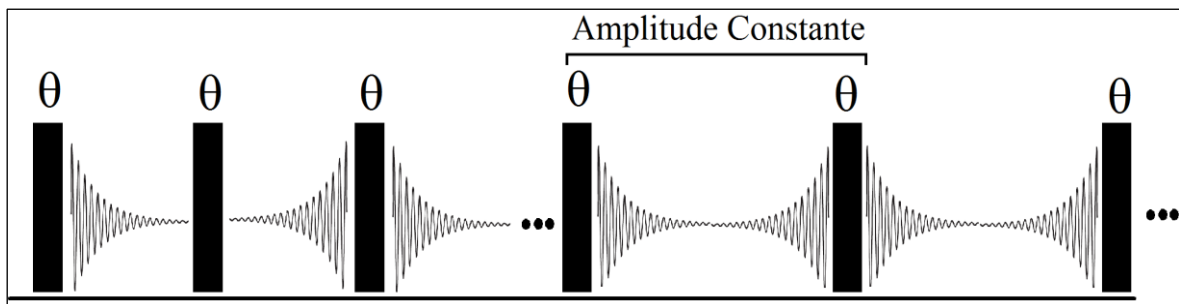


FIGURA 1. 7- Representação esquemática da intensidade do sinal de RMN depois de aplicado um trem de pulsos de pulsos igualmente espaçados por  $T_p < T_2$ .

A figura 1. 7 mostra dois processos simultâneos que caracterizam o regime de SSFP: a excitação da magnetização longitudinal, gerando um FID logo após o pulso,  $M^+$ , e a refocalização da magnetização transversal residual sob a forma de um eco,  $M^-$ , no instante que antecede o próximo pulso da sequência.

O regime de SSFP foi primeiro descrito por Carr<sup>30</sup>. Uma vez que a intensidade da magnetização independe dos tempos de relação  $T_1$  e  $T_2$ , Carr<sup>30</sup> demonstrou que é possível a adição de vários espectros num intervalo de tempo bastante curto e conseqüentemente um aumento na razão sinal/ruído (S/N) para o mesmo tempo de análise quando comparada a sequência SSFP com outras utilizadas.

Freeman e Hill<sup>31</sup>, dando continuidade ao trabalho de Carr, relacionaram a sequência SSFP, com outra desenvolvida por Hahn<sup>32</sup>. Nesta

última, após a aplicação de dois pulsos de  $90^\circ$  separados por um dado intervalo de tempo  $T_p$ , ocorre a formação de um eco que independe da não homogeneidade do campo. A figura 1. 8 mostra a descrição vetorial deste processo.

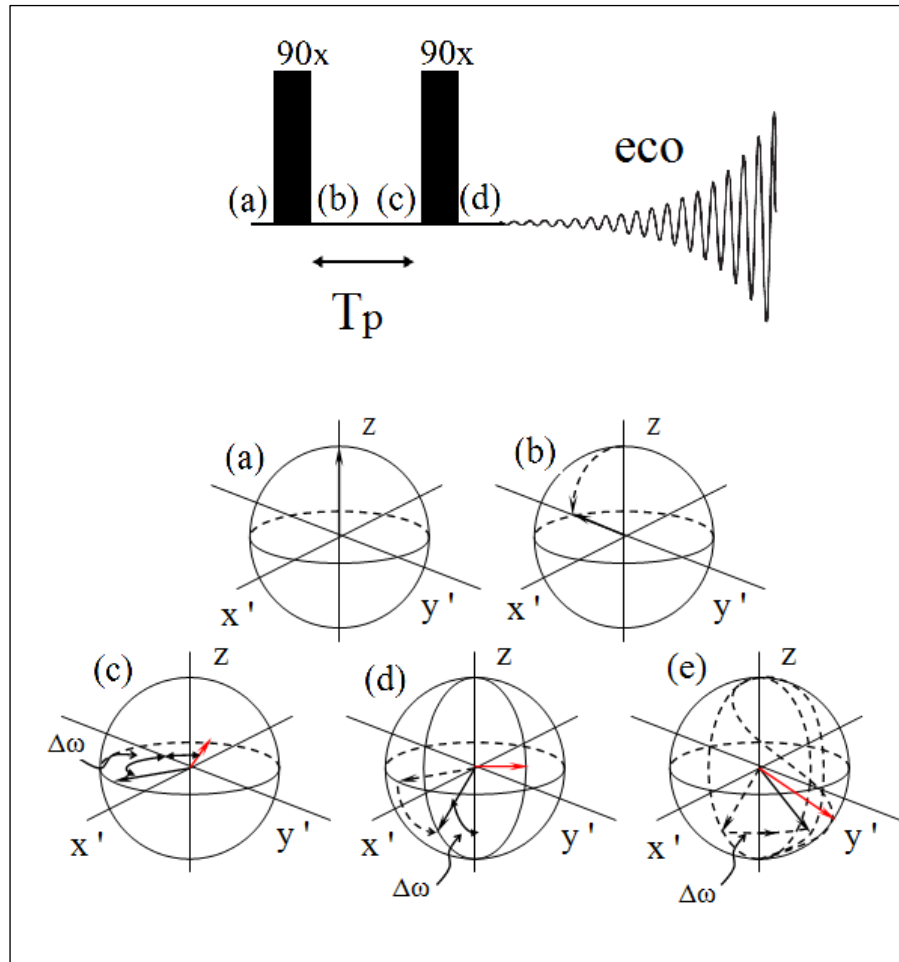


FIGURA 1. 8- Representação do modelo vetorial proposto por Hahn para descrição do eco formado por dois pulsos de  $90^\circ$ .<sup>32</sup>

Nesta sequência, o primeiro pulso desloca a magnetização para o plano  $x'y'$  com um ângulo de  $90^\circ$ , gerando um sinal de amplitude máxima (etapa a e b). Durante o intervalo de tempo  $T_p$ , a magnetização se defasa  $\Delta\omega t$  devido a não homogeneidade do campo magnético. Em função de  $T_p \ll T_1$ , antes que o segundo pulso seja aplicado, parte da magnetização ainda se encontra no plano  $x'y'$  (etapa c). Quando o segundo pulso é aplicado, a magnetização se desloca



do plano  $x'y'$  para o plano  $x'z'$  (etapa d). Ao longo do novo intervalo de tempo, os spins precessam ao redor de  $z$  sofrendo refocalização em  $2T_p$ . (etapa e). Como a trajetória das isocromatas de spins descreve a forma do número 8, projetado na casca esférica de raio igual ao módulo do vetor momento magnético, este modelo ficou conhecido como “*eight Ball echo*.”

Os experimentos de Freeman e Hill<sup>31</sup> consistiram em introduzir outros pulsos de  $90^\circ$ , igualmente espaçados, na sequência proposta por Hahn até atingir o estado estacionário. Na figura 1. 9a observa-se que, para dois pulsos de  $90^\circ$  ocorre a formação de um eco negativo em  $2T_p$ . Quando foram utilizados três pulsos (figura 1. 9b), sendo o terceiro aplicado exatamente sobre o pico do eco, ocorre o decaimento do sinal e formação de um eco em  $3T_p$ , de maior intensidade seguido de outro em  $4T_p$ . Quando se aplica uma sequência com quatro ou mais pulsos, igualmente espaçados (figura 1. 9c e figura 1. 9d), a magnetização atinge o estado estacionário de modo que cada pulso é precedido de uma metade de um eco negativo e sucedido de um FID positivo. Este processo de refocalização da magnetização é uma consequência direta do estabelecimento do estado estacionário em que são utilizados intervalos entre os pulsos comparáveis com  $T_2$ .

Através deste comportamento, foi possível simular espectros de RMN no estado estacionário para diferentes condições de homogeneidade do campo  $T_2^*$ , levando em conta a defasagem da magnetização causada pela não homogeneidade do campo magnético, conforme a figura 1.10.

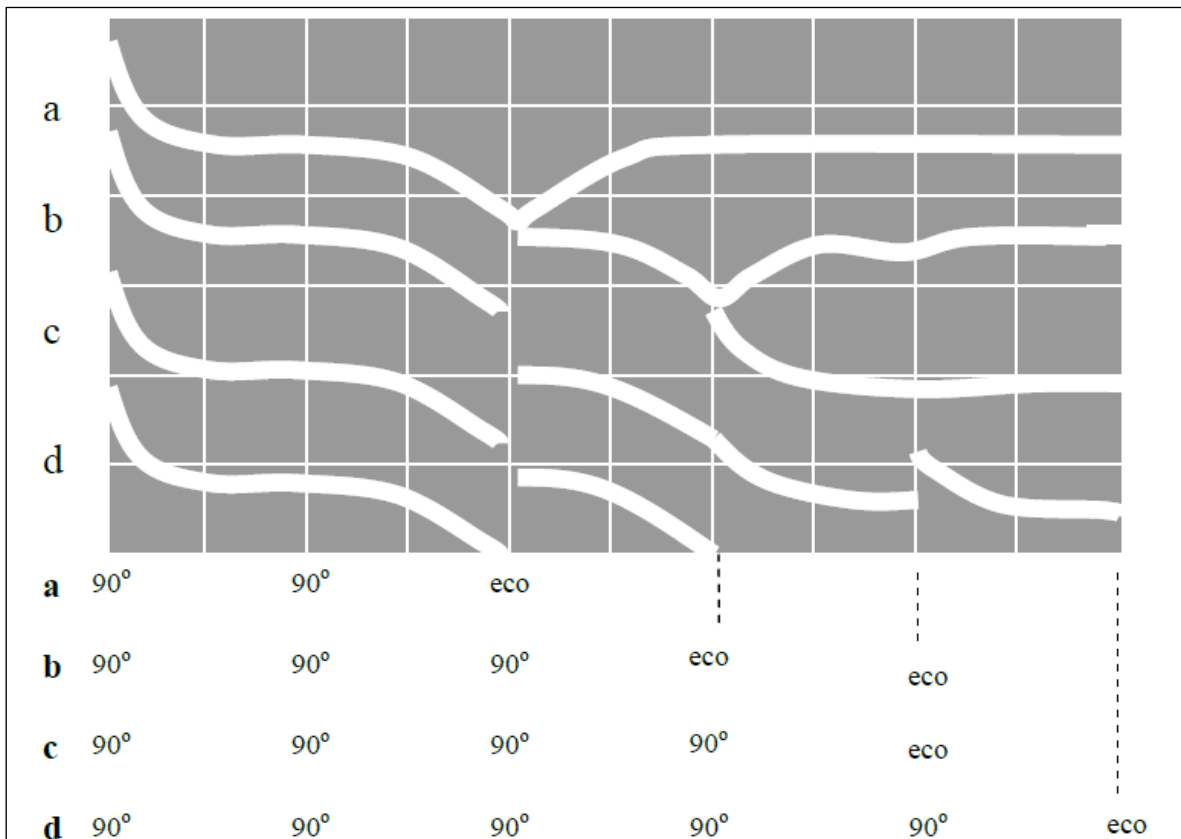


FIGURA 1. 9- Sinais de RMN  $^1\text{H}$  obtidos de um trem de pulsos de  $90^\circ$  igualmente espaçados por um intervalo de  $T_p < T_2$ .<sup>31</sup>

Na figura 1.10 é possível observar o efeito da refocalização das componentes transversais da magnetização. Na condição em que o campo magnético é tal que  $T_2^*/T_p=2$  a amplitude do sinal entre um pulso e outro permanece constante.

Este mesmo efeito foi estudado por Azeredo e colaboradores<sup>25</sup> através experimentos e simulações teóricas. Utilizando-se de um  $T_p < T_2^*$  e conseqüentemente  $T_p \ll T_2, T_1$ , o sistema de spins atinge o regime especial de SSFP, em que o sinal preserva um elevado grau de coerência entre os spins e uma grande sobreposição das componentes FID e eco. Estas duas propriedades conferem ao sinal um comportamento particular que levou a classificá-lo como um novo tipo de estado estacionário denominado Precessão Livre de Onda Contínua (Continuous Wave Free Precession – CWFP).

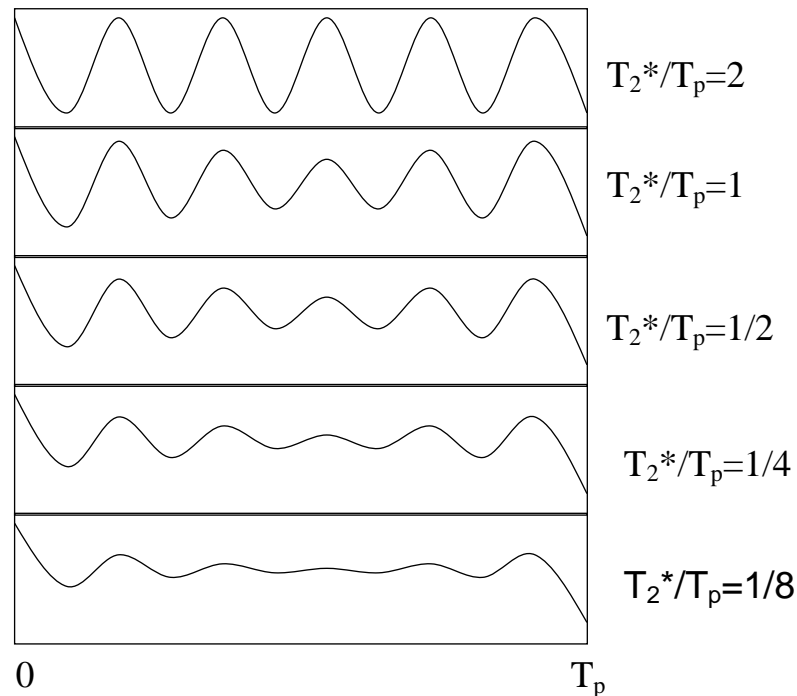


FIGURA 1.10- Simulação do espectro de RMN no estado estacionário para diversas condições de homogeneidade do campo.<sup>31</sup>

A figura 1. 11 mostra os sinais simulados de RMN  $^1\text{H}$  no domínio do tempo obtidos para uma amostra de óleo com  $T_1= 138$  ms e  $T_2= 53$  ms para uma homogeneidade de campo  $T_2= 0.5$  ms. O tempo zero representa o momento em que um pulso é aplicado. O período que antecede o pulso e representado pela componente eco ( $M^-$ ) enquanto que o período posterior corresponde FID ( $M^+$ ). Para as situações em que  $T_p$  é maior, ou da mesma ordem dos tempos de relaxação (a e b),  $M^+$  predomina. À medida que  $T_p$  diminui (c, d e f), a componente  $M^-$  apresenta maior contribuição para a formação do sinal até que as duas componentes se sobrepõem numa onda contínua (g e h).

Através desta característica do sinal, é possível adquirir vários espectros em intervalos de tempo bastante curtos, com um ganho substancial da razão sinal /ruído.

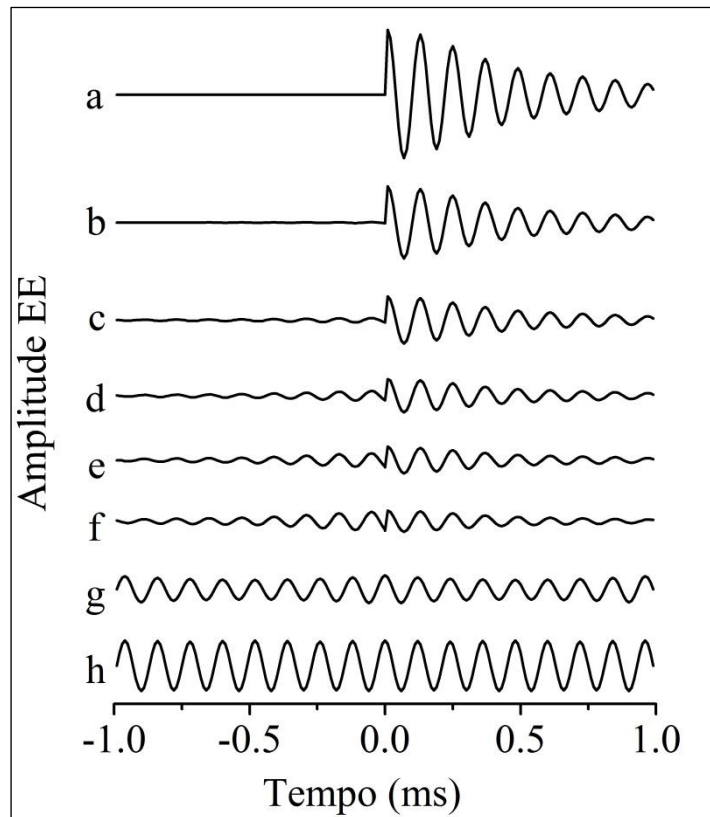


FIGURA 1. 11- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de óleo, com pulsos de  $90^\circ$ ,  $T_1= 138$  ms,  $T_2= 53$  ms,  $T_2^*=0.5$  ms e  $T_p$  de 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7; 0,9 e 0,3 ms, para os espectros a-h respectivamente <sup>25</sup>.

Ainda nos trabalhos de Azeredo e colaboradores<sup>4, 33</sup>, foi realizado um estudo sobre como a interação das componentes FID ( $M^+$ ) e eco ( $M^-$ ) influencia na formação do sinal CWFP. Foi demonstrado que uma interferência construtiva destas componentes leva ao máximo de sinal, obtido quando uma frequência de irradiação (*offset*)  $\Psi= (2n + 1)\pi$ , que corresponde a um múltiplo ímpar de  $\pi$ , é utilizado. Neste caso, ambas as componentes estão em fase. Por outro lado, quando são utilizados ângulos de defasagem pares de  $\pi$ , ou seja,  $\Psi= 2n\pi$ , ocorre uma interferência destrutiva e o sinal praticamente se anula, em função de  $M^+$  e  $M^-$  apresentarem fases opostas, conforme a figura 1. 12.

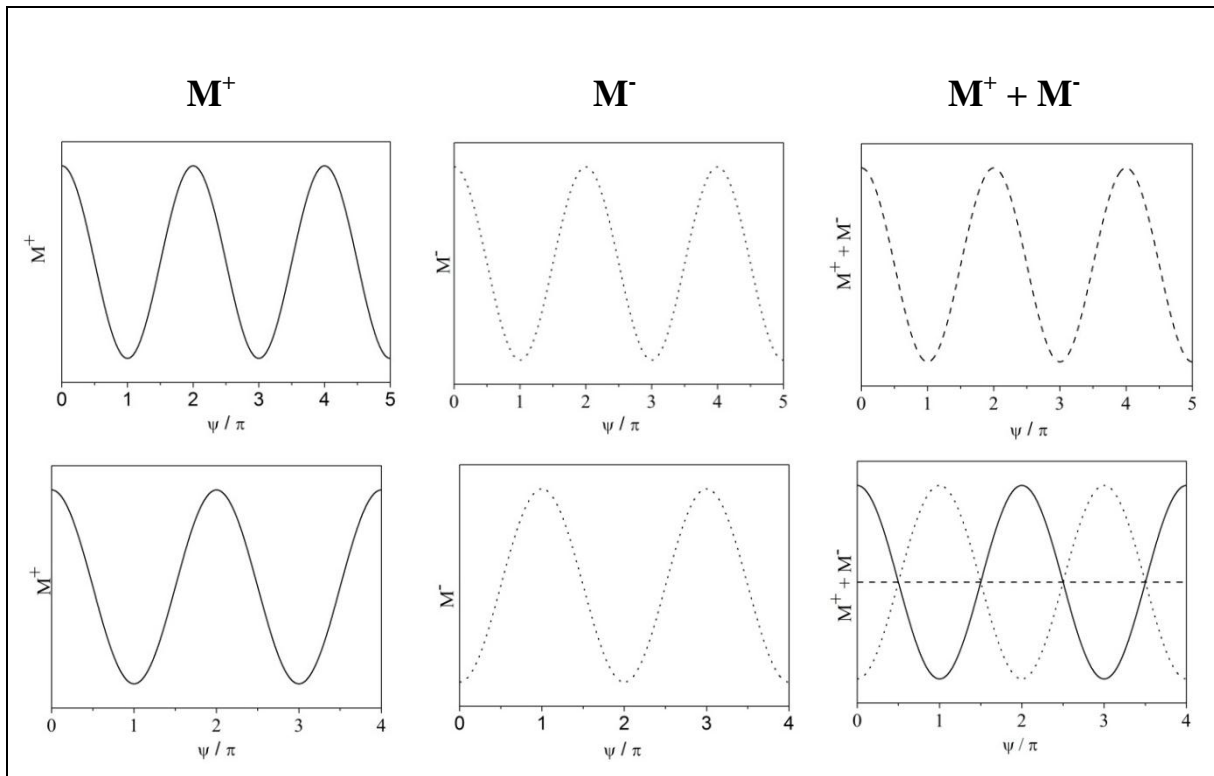


FIGURA 1. 12- Sinal resultante da combinação das componentes FID e eco, como uma dependência do ângulo de defasagem  $\Psi$ .  $\Psi = 5\pi$ , Interferência construtiva (parte superior) e  $\Psi = 4\pi$  interferência destrutiva (parte inferior).<sup>31</sup>

A figura 1. 12 mostra a representação de como ocorre a interferência entre as componentes  $M^+$  e  $M^-$ . Para um ângulo de defasagem igual a  $\Psi = 5\pi$ , o sinal apresenta intensidade máxima enquanto para um valor correspondente a  $\Psi = 4\pi$ , o sinal formado entre as componentes de mesma amplitude e de fase oposta é mínimo. Assim, a frequência de defasagem é um parâmetro a ser considerado no estabelecimento do regime CWFPP e sua importância será discutida posteriormente.

Utilizando dos mesmos valores de  $\Psi$ , foi estudado<sup>25</sup> o tempo necessário para que os spins alcançassem o regime de estado estacionário. Analisando a figura 1. 13, é possível observar que, para ambos os valores de  $\Psi$  ( $4\pi$  e  $5\pi$ ), ocorre uma alternância da amplitude do sinal que é interrompida em cerca de 10 ms, o que significa a aplicação de mais de 30 pulsos separados por um intervalo de tempo  $T_p = 300 \mu s$ .

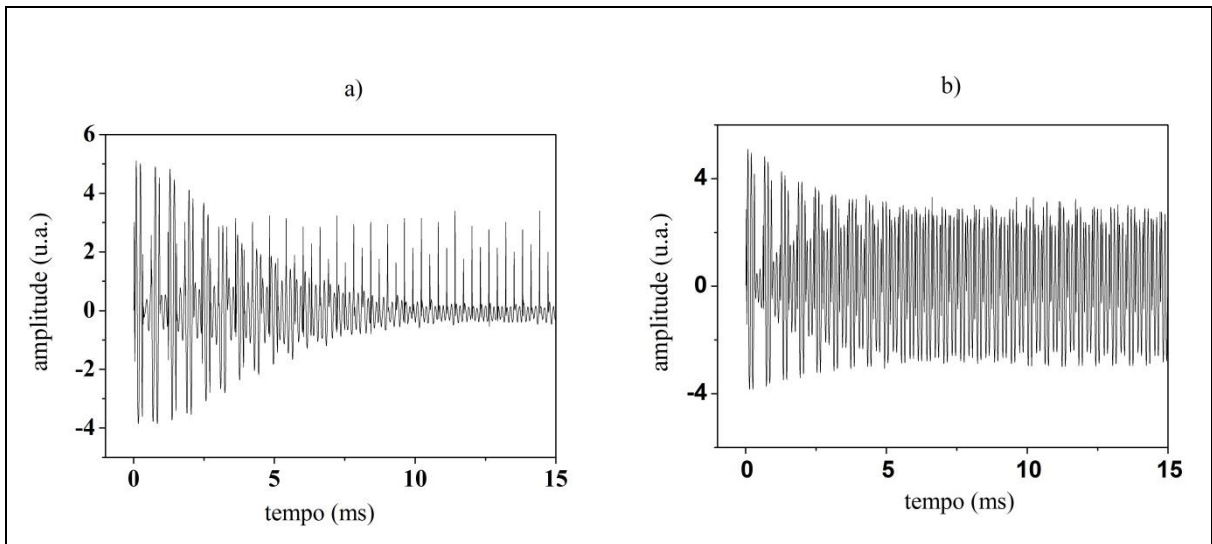


FIGURA 1. 13- Estabelecimento do estado estacionário para uma amostra de água com  $T_2=2.7$  s,  $T_p$  de  $300\mu\text{s}$ . (a)  $\Psi=4\pi$  e (b)  $\Psi=5\pi$ .<sup>25</sup>

Recentemente, Venâncio e colaboradores<sup>34</sup> demonstraram que o sinal no regime de estado estacionário é, na verdade, composto por três estágios distintos. O primeiro é referente ao período em que o sinal apresenta alternância em sua amplitude (figura 1. 14a) e ocorre em função da homogeneidade do campo, sendo tão mais longo quanto maior a homogeneidade. Após este período, a amplitude do sinal não se alterna entre si, mas continua a decair com o tempo, sendo este período denominado quase-estacionário (figura 1. 14b). Finalmente a magnetização entra no estado chamado verdadeiramente estacionário, em que a intensidade do sinal não mais se modifica (figura 1. 14c).

Este estudo<sup>34</sup> é de grande importância para o estabelecimento das condições necessárias para que o regime de CWFP seja atingido mais rapidamente, o que representa maior agilidade na execução de medidas, principalmente em fluxo<sup>26, 27</sup> e difusividade térmica de elastômeros.<sup>35</sup>

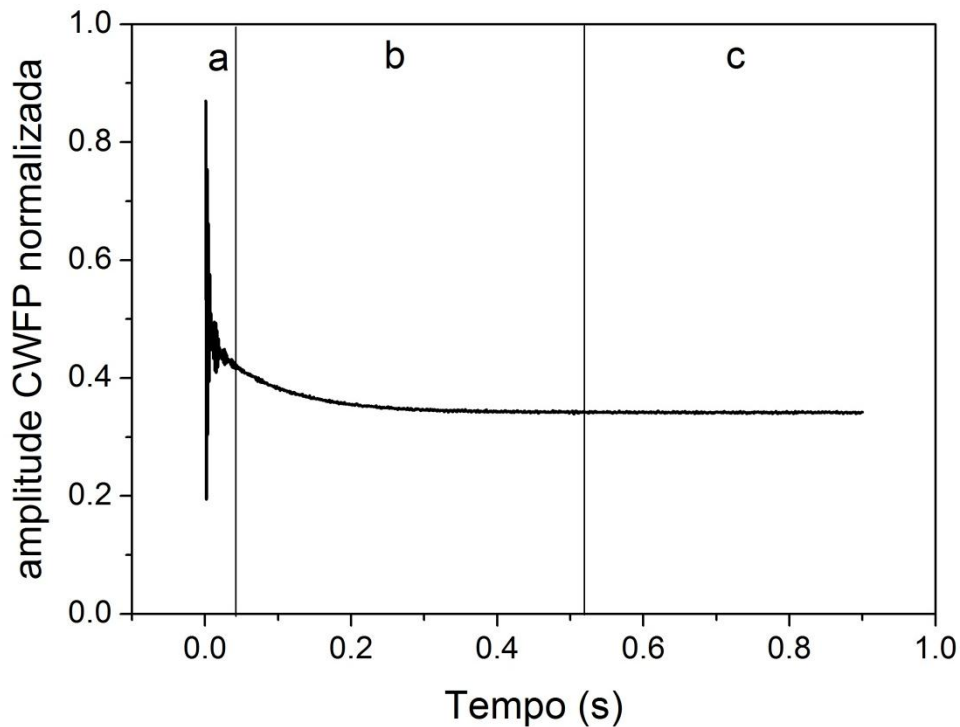


FIGURA 1. 14- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido fosfórico nos regimes de (a) alternância de amplitude, (b) quase-estacionário e verdadeiramente estacionário (c).<sup>34</sup>

### 1.2.1 Teoria da precessão livre de onda contínua (CWFP)

A descrição de como o regime CWFP é alcançado, bem como SSFP convencional, é baseada nas equações de Bloch<sup>30, 36</sup>. A princípio, quando um sistema de spins em equilíbrio térmico é submetido a um pulso de radiofrequência (rf)  $B_1$ , a magnetização resultante desloca-se  $\theta$  graus do eixo  $z$ , girando ao redor do eixo  $x'$  (sistema de coordenadas girantes), segundo a equação:

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

onde  $\gamma$  é a razão magnetogírica e  $\tau$  é o tempo de duração do pulso.

Devido a curta duração do pulso  $\tau$  em relação aos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ , considera-se que não ocorre qualquer tipo de relaxação durante a aplicação do mesmo.

A magnetização  $M^+$ , imediatamente após o pulso, provocada pelo movimento de rotação da magnetização inicial  $M_0$  (equilíbrio térmico) ao redor do eixo  $x'$ , é descrita pelo operador  $R_x$ :

$$M^+ = R_x(\theta)M_0 \quad (3)$$

$$\text{Onde } R(\theta)_x = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\theta & \text{sen}\theta \\ 0 & -\text{sen}\theta & \cos\theta \end{bmatrix}$$

Durante o intervalo de tempo  $T_p$ , o sistema de spins relaxa, promovendo o decaimento exponencial da intensidade da magnetização transversal de  $M^+$ , através de uma constante de tempo  $T_2$  e um aumento na intensidade da componente longitudinal, com uma constante de tempo  $T_1$ . Este processo pode ser representado pelo operador  $S(T_p, T_1, T_2)$ :

$$S(T_p, T_1, T_2) = \begin{bmatrix} E_2(T_p) & 0 & 0 \\ 0 & E_2(T_p) & 0 \\ 0 & 0 & E_1(T_p) \end{bmatrix} \quad (4)$$

Onde  $E_2 = e^{-T_p/T_2}$  e  $E_1 = e^{-T_p/T_1}$  são parâmetros de relaxação.

Além da relaxação durante o intervalo de tempo  $T_p$ , a magnetização  $M^+$  precessiona livremente ao redor do eixo  $z$ , defasando  $\Psi$  graus em relação o eixo  $y'$ . Este ângulo de defasagem é dado por:

$$\Psi = (\omega - \omega_0)T_p \quad (5)$$

Onde  $\omega$  é a frequência de defasagem e  $\omega_0$  é a frequência no referencial rotativo. Este processo pode ser visualizado na figura 1. 15.



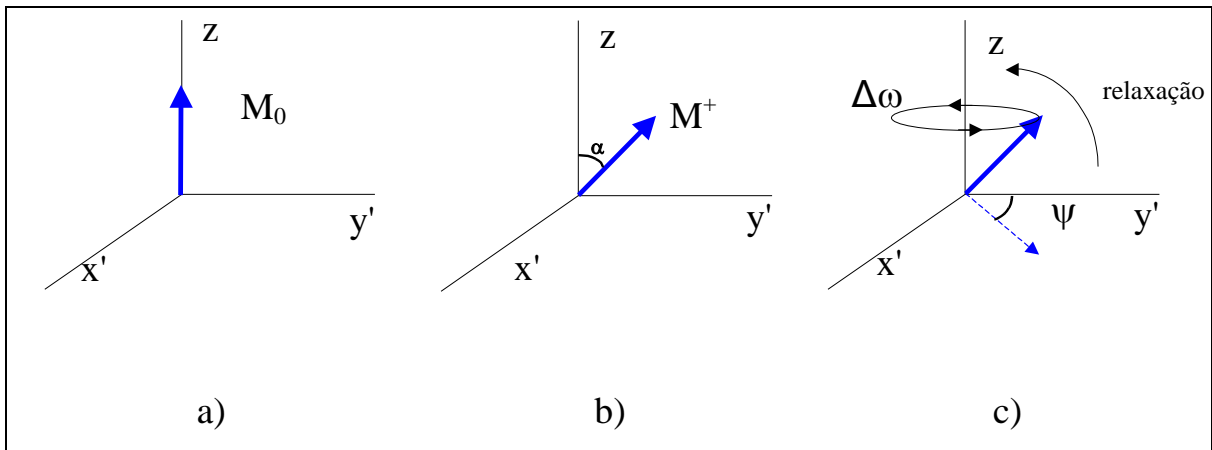


FIGURA 1. 15- Representação vetorial para a magnetização (a) durante o equilíbrio térmico, (b) durante o pulso e (c) após o pulso.

Para um determinado tempo  $t$ , entre o intervalo de tempo  $T_p$ , a magnetização resultante pode ser obtida através da seguinte equação:

$$M(t) = M_0(1 - E_1(t)) + M^+ R_z(\Psi) S(T_p, T_1, T_2) \quad (6)$$

$$\text{em que } R_z(\Psi) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\theta & \text{sen}\theta \\ 0 & -\text{sen}\theta & \cos\theta \end{bmatrix}$$

é um operador que descreve a rotação em torno do eixo  $z$ .

Para satisfazer a condição de estado estacionário, é necessário que a magnetização antes do pulso  $M^+$  seja igual a  $M(t)$  no tempo  $t$ . Através desta condição, é possível determinar a intensidade da magnetização em qualquer intervalo de tempo:

$$M_{x'}^- = \frac{M_0(1 - E_1)[E_2 \sin \alpha \sin \Psi]}{D} \quad (7)$$

$$M_{y'}^- = \frac{M_0(1 - E_1)[E_2 \sin \alpha \cos \Psi]}{D} \quad (8)$$

$$M_z^- = \frac{M_0(1 - E_1)[1 - E_2 \cos \Psi - E_2 \cos \alpha (\cos \Psi - E_2)]}{D} \quad (9)$$

$$M_{x'}^+ = M_{x'}^- \quad (10)$$

$$M_{y'}^+ = \frac{M_0(1 - E_1)[(1 - E_2 \cos \Psi) \sin \alpha]}{D} \quad (11)$$

$$M_z^+ = \frac{M_0(1 - E_1)[E_2(E_2 - \cos \Psi) + (1 - E_2 \cos \Psi) \cos \alpha]}{D} \quad (12)$$

onde  $D = [(1 - E_1 \cos \alpha)(1 - E_2 \cos \Psi)] - [(E_1 - \cos \alpha)(E_2 - \cos \Psi)E_2]$

Considerando um ângulo  $\theta = \pi/2$  e intervalo de tempo  $T_p \ll T_1, T_2$ , para um ângulo de defasagem múltiplo ímpar de  $\Psi$ , a componente eco ( $M^-$ ) da magnetização que precede cada pulso se iguala a componente FID ( $M^+$ ) é o resultado é um sinal de amplitude máxima, segundo a equação:

$$\left[ (M_{x'}^\pm)^2 + (M_{y'}^\pm)^2 \right]^{1/2} = \frac{M_0 T_2}{(T_1 + T_2)} \quad (13)$$

A partir destas equações é possível simular a amplitude do sinal CWFP em função da variação do ângulo de defasagem ( $4\pi < \Psi < 6\pi$ ) para várias larguras de pulsos em sistemas de diferentes parâmetros (como  $T_1$  e  $T_2$ ) e assim corroborar com medidas experimentais<sup>4</sup>. A estimativa da amplitude do sinal CWFP é de grande importância para avaliar sua sensibilidade frente a imperfeições no ajuste do ângulo de excitação ou alterações na potência dos pulsos de rf.

## 1.2.2 Aplicações do Estado Estacionário

Em função da elevada razão sinal ruído S/R, proporcionada pela independência dos tempos de relaxação do sistema em estudo, a SSFP e sua variante CWFP tem sido muito aplicadas em medidas de RMN em baixo campo e de imagens.

Kronenbitter e Schwenk<sup>37</sup> propuseram um método rápido para determinação de  $T_1$  e  $T_2$  em líquidos através da SSFP. Os experimentos consistem em determinar a razão  $T_1/T_2$ , através da equação:

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{(1 + \cos(\theta_{\text{ótimo}}))}{(1 - \cos \theta_{\text{ótimo}})} \quad (14)$$

e em seguida a soma entre  $T_1$  e  $T_2$  através da equação:

$$M_x^- = \frac{(T_1 - E_1)}{D} \quad (15)$$

em que  $\theta_{\text{ótimo}}$  é a máxima intensidade para o decaimento da magnetização  $M^+$ . Embora muito geral, este método<sup>37</sup> é bastante prático no estudo de núcleos cujo  $T_1$  seja longo, como por exemplo,  $\text{Xe}^{129}$ .

Venâncio e colaboradores<sup>34</sup>, utilizando da sequência CWFP, desenvolveram outra forma determinar de  $T_1$  e  $T_2$  através de um único experimento segundo as equações:

$$T_1 = \frac{T^*/2}{M_{+s}/M_0} \quad (16)$$

$$\text{e } T_2 = \frac{T^*/2}{1 - M_{+s}/M_0} \quad (17)$$

em que  $T^*$  representa o decaimento da magnetização no regime quase-estacionário e  $M_{+s}$  a magnetização no estado verdadeiramente estacionário, conforme discutido anteriormente. A partir desta nova metodologia, o método CWFP foi aplicado ao estudo de processos dinâmicos, como por exemplo, reações de polimerização.<sup>34</sup>

O estado estacionário em RMI tem sido utilizado apenas recentemente. Uma das razões pode ser atribuída a limitações de *Hardware*, como por exemplo os gradientes de campo, que apenas recentemente tornaram-se disponíveis<sup>38</sup>. Através desta e outras tecnologias, o estado estacionário aplicado à RMI proporciona informações como mapeamento *in vivo* da temperatura, saturação do oxigênio no sangue e informações de natureza anatômica e fisiológica em tempo real.

Recentemente, Azeredo e colaboradores<sup>25</sup> demonstraram várias aplicações para a CWFP através de medidas quantitativas como determinação de um componente em uma amostra heterogênea, determinação do teor de óleo e umidade em sementes, quantidade de hidrogênio em vários solventes, etc.

A figura 1. 16 mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  no domínio do tempo para uma amostra de óleo de girassol adquirido através das sequências convencional FID (a) e CWFP (b). Ambos os espectros foram adquiridos com um tempo total de análise de 1,38 ms. Na sequência convencional, a intensidade do sinal é tão reduzida que é praticamente impossível distingui-lo do ruído. Por outro lado, quando utilizada a sequência CWFP, foi possível acumular 657 vezes a mesma janela espectral e um ganho na razão sinal ruído de cerca de 40 vezes.

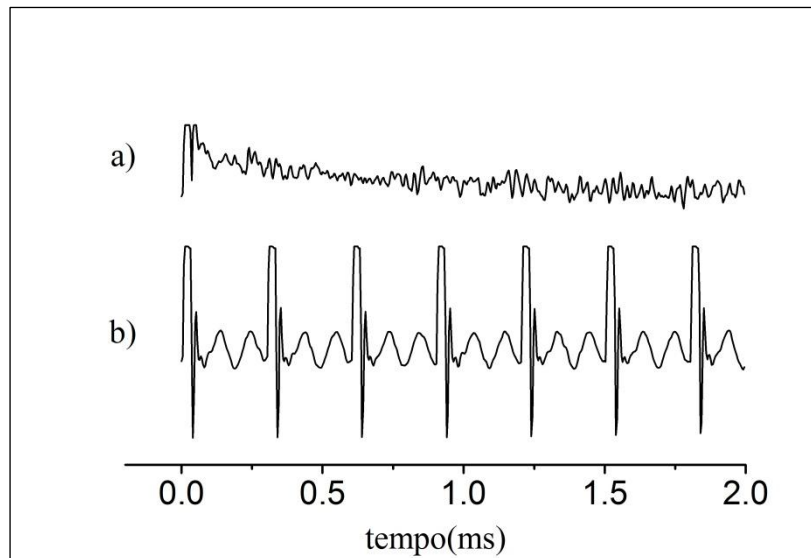


FIGURA 1. 16- Sinal de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostras de 2.2 mg de óleo de girassol. a) Experimento FID adquirido com  $T_p = 5T_1 = 690$  ms, pulso de excitação  $\theta = \pi/2$  e b) sinal CWFP adquirido com um  $T_p = 0,3$  ms e  $\theta = \pi/2$ .<sup>25</sup>

Neste mesmo trabalho<sup>25</sup> foi demonstrado que o sinal CWFP depende linearmente da concentração da amostra. A figura 1. 17 mostra a amplitude do sinal CWFP *versus* a massa de óleo em sementes de ervilha desidratadas. Este comportamento linear é uma característica importante deste sinal para medidas quantitativas.

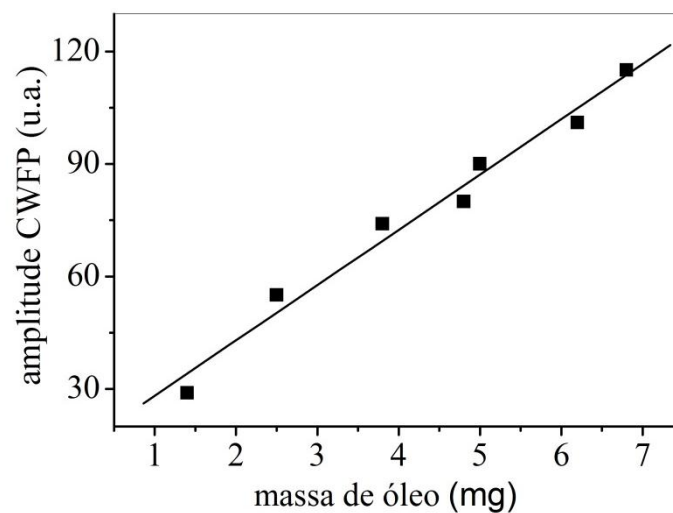


FIGURA 1. 17- Amplitude do sinal CWFP para amostras de sementes de ervilha.<sup>25</sup>

### 1.2.3 Anomalias de fase e de intensidade no estado estacionário

Embora apresente muitas aplicações, existem poucos trabalhos envolvendo o estado estacionário em RMN de alta resolução. Esta aparente contradição ocorre em função de anomalias de fase e de intensidade que surgem no espectro transformado.

Ernst e Anderson<sup>36</sup> foram os primeiros a observar este processo. Empregando as técnicas pulsadas e a transformada de Fourier, estes autores avaliaram quais as condições para se obter a máxima razão S/R. Foi observado que o aumento na intensidade era inversamente proporcional ao intervalo de tempo  $T_p$  entre os pulsos. No entanto, para um  $T_p$  menor que  $T_2$ , condição necessária para formação do eco no estado estacionário, os sinais no espectro apresentavam anomalias de fase e de intensidade. Foi proposto como solução do problema um intervalo mínimo de  $T_p$  correspondente ao  $3T_2$ . Nesta situação grande parte da magnetização (95%) já teria perdido a coerência de fase.

Freeman e Hill<sup>31</sup> também propuseram algumas modificações, sem deixar de se beneficiar das propriedades do estado estacionário. Foi demonstrado que a refocalização do sinal sob a forma de eco, para 2 pulsos de  $90^\circ$  separados por um intervalo de tempo  $T_p$ , era responsável pelas anomalias de fase e de intensidade no espectro transformado.

Neste trabalho<sup>31</sup> foram apresentadas várias propostas para eliminação da componente eco ( $M^-$ ) do sinal. Porém, estas medidas causavam um decaimento acelerado da magnetização transversal promovendo assim um alargamento indesejável na linha do espectro. Contudo, a introdução de um retardo aleatório entre os pulsos (denominado *Scrambled Steady State*, SSS) apresentou os melhores resultados. A figura 1. 18a mostra a formação do eco no sinal RMN e a figura 1. 18b quando foi inserido um tempo de retardo aleatório entre os pulsos, demonstrando a eliminação da componente eco.

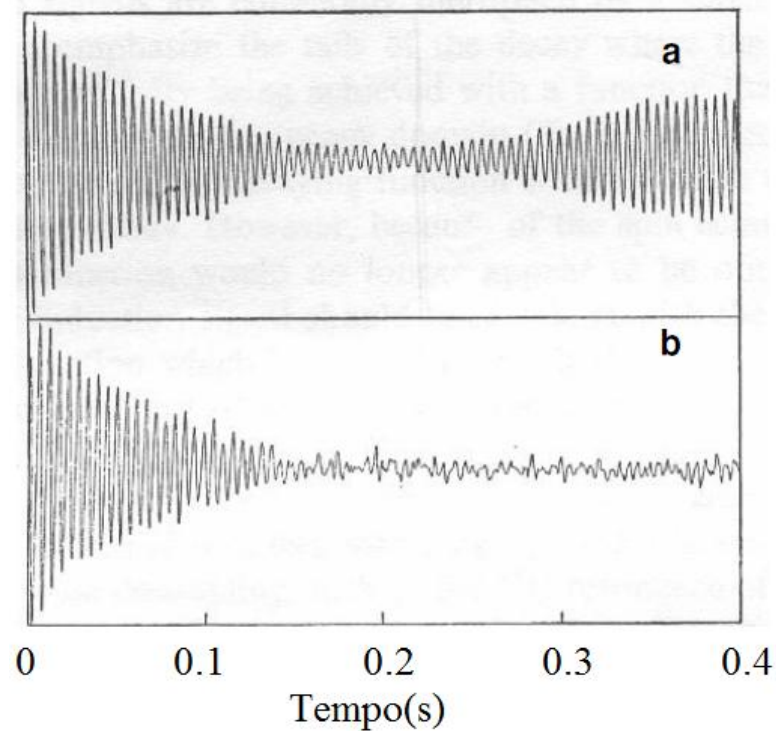


FIGURA 1. 18- Ecos no estado estacionário no FID do iodeto de metila enriquecido com  $^{13}\text{C}$ . a) Utilizando um tempo de repetição constante entre os pulsos; b) Utilizando um tempo de repetição com um retardo aleatório entre os pulsos.<sup>31</sup>

A figura 1. 19 mostra os espectros de RMN para a mesma amostra de iodeto de metila após a transformada de Fourier, com um intervalo de tempo  $T_p$  constante (figura 1. 19a), aleatório após cada pulso (figura 1. 19b) e após a aplicação de 64 pulsos (figura 1. 19c). No primeiro caso, em função da presença da componente eco, o espectro apresenta distorções na linha de base e uma irregularidade na proporção entre as intensidades dos sinais. Ao utilizar um valor aleatório de  $T_p$ , a proporção entre as intensidades dos sinais (1: 3: 3: 1) é parcialmente recuperada sem distorções na linha de base. Finalmente, quando utilizado valores aleatórios de  $T_p$  após a aplicação de 64 pulsos, as anomalias de fase e de intensidade foram praticamente eliminadas.

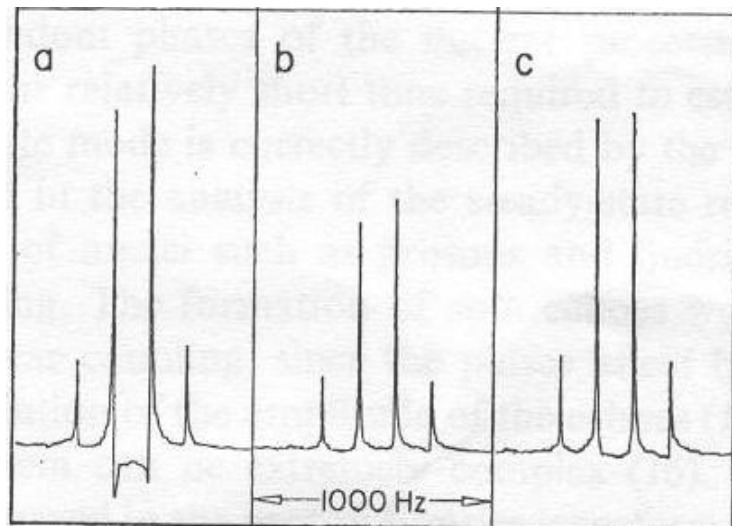


FIGURA 1. 19- Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de iodeto de metila observados no estado estacionário utilizando  $T_p$  (a) constante, (b) aleatório após cada pulso e (c) após aplicação de 64 pulsos<sup>31</sup>.

Alguns trabalhos se seguiram como a publicação de Schwenk<sup>39</sup> em que as distorções no espectro são eliminadas através de 4 experimentos com diferentes frequências de irradiação (processo denominado *Quadrige Fourier Transform*, QFT) segundo a equação:

$$\nu_\rho = \nu_E - \frac{1}{T_p} (\rho = 0, 1, 2 \text{ e } 3) \quad 18$$

Em que  $\nu_E$  é a frequência do pulso aplicado e  $\rho$  é número de experimentos. Devido o uso de valores diferentes de frequência de irradiação, uma nova escala foi aplicada de modo ajustá-las a uma mesma frequência de ressonância  $Z$  segundo a equação:

$$Z = 1 - \frac{\rho}{4} \quad 19$$

E assim os quatro espectros podem ser somados. Este método<sup>39</sup> foi aplicado em espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  para uma amostra de ácido fosfórico para remoção de batimentos laterais. Outros estudos<sup>40</sup> similares também publicados por Schwenk



foram estendidos a núcleos de  $^{109}\text{Ag}$ . Recentemente<sup>41</sup>, estas metodologias foram testadas e comparadas para remoção de batimentos laterais e anomalias de fase em espectros de  $^{13}\text{C}$ .

Rudakov e colaboradores<sup>42-47</sup> publicaram vários trabalhos propondo modificações na sequência SSFP para eliminação de anomalias de intensidade. Estas modificações correspondem á alternância de fases entre os pulsos e tem sido aplicada com muito sucesso na detecção de explosivos e entorpecentes através de NQR (*Nuclear Quadrupolar Resonance*). Através da combinação entre as componentes FID e eco, foi demonstrado um aumento substancial na razão S/R. Neste trabalho será demonstrado que estas modificações podem também ser aplicadas na correção de efeitos indesejados que surgem no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

## 2 OBJETIVOS

Considerando o potencial do método Precessão Livre de Onda Contínua (CWFP) e a atual necessidade de supressão de sinal(s) de solvente em espectros de RMN de alta resolução, o objetivo deste trabalho é:

1) Desenvolver e aplicar o método (CWFP) na supressão de sinal de solvente(s) em RMN  $^1\text{H}$  de alta resolução tendo foco a correção das anomalias de fase.

2) Aplicar o método CWFP em experimentos 2D que envolvem supressão para amostras rotineiras e experimentos *in natura*. Neste último caso, medidas quantitativas serão realizadas para determinação de açúcar (sacarose) e os resultados serão comparados com o método Brix.

3) Avaliar o uso do método CWFP para supressão de múltiplos sinais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Programação da sequência CWFP

De início, no *software* Topspin<sup>®</sup>, instalado no equipamento Bruker DRX 400 (400,13 MHz para a frequência do Hidrogênio), a sequência CWFP foi escrita sob a forma de texto, em linguagem C. A tabela 3. 1 abaixo lista as linhas escritas segundo a notação Bruker.

TABELA 3. 1- Sequência de pulsos CWFP convencional na forma escrita.

1 ze
2 d1
p1 ph1
3 T <sub>p</sub>
p1 ph2
T <sub>p</sub>
lo to 3 times n
go=2 ph31
wr #0
lo to 1 times td
exit
ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph2=0 0 2 2 1 1 3 3
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

Caso não ocorra nenhum erro, o próprio *software* converte a sequência da forma escrita para a forma gráfica.

Em seguida, a sequência foi modificada através da alternância de fases. A nova sequência, denominada CWFP-AF (onde “AF” representa “fase alternada”), os pulsos avançam com passos de 90°, conforme a tabela 3. 2.

TABELA 3. 2- Sequência de pulsos CWFP-AF na forma escrita.

1 ze
2 d1
3 p1 ph1
$T_p$
p1 ph2
$T_p$
p1 ph3
$T_p$
p1 ph4
$T_p$
lo to 3 times n
p1 ph4
go=2 ph31
wr #0
lo to 1 times td
exit
ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph2=1 1 3 3 2 2 0 0
ph3=2 2 0 0 3 3 1 1
ph4=3 3 1 1 0 0 2 2
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

### 3.1.1 Aplicação do método CWFP em experimentos 2D

Após a programação da sequência no modo unidimensional, o método CWFP foi inserido em 2 experimentos bidimensionais de rotina: COSY

(*Correlation Spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy*) ambos com pré-saturação do sinal do solvente. Como ponto de partida, foram utilizadas duas sequências já existentes e disponíveis no laboratório de RMN do departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-SP. As modificações, para ambas as sequências, ocorreram através da substituição do pulso longo e de baixa potência, correspondente a pré-saturação, pelo trem de pulsos CWFP.

### 3.2 Construção dos perfis de excitação

Após a implementação das sequências, foram construídos os perfis de excitação. Para tanto, foi preparada uma solução de 2 mM de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (agente relaxante) em uma mistura de  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (fornecedor: Aldrich Chemical Company) na proporção 9:1 e inserida num tubo de RMN de 5mm. Os experimentos foram realizados num equipamento Bruker DRX400, 9,4 tesla (400,13 MHz para a frequência do Hidrogênio), utilizando-se de uma sonda de detecção inversa equipada com gradiente de campo no eixo Z, a uma temperatura de 298K. Para obtenção dos perfis, foram obtidos espectros em várias frequências de defasagem diferentes, utilizando-se de uma janela de 6000 Hz, 65536 pontos na aquisição do espectro (*Time Domain*), ganho do receptor de 1, tempo de espera de 1s e tempo de aquisição de 2s. Os experimentos ocorreram no modo unidimensional com um deslocamento de frequência de 50 Hz para cada scan. Os parâmetros avaliados inicialmente foram a largura de pulso ( $P_1$ ) e o intervalo de tempo entre os pulsos ( $T_p$ ). A princípio, foram calculados os perfis com a sequência CWFP convencional, com vários  $P_1$  diferentes: 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 135°, utilizando-se de um intervalo de tempo fixo entre os pulsos de 500  $\mu\text{s}$ . Em relação  $T_p$ , os valores utilizados são equivalentes a: 200, 250, 300, 400, 500 e 550 $\mu\text{s}$ , para uma largura de pulso fixa de 90°. Neste último caso, estes números já incluem o tempo necessário para que

a eletrônica “ligue” e “desligue” o pulso (cerca de 60  $\mu$ s). Após o ajuste de  $P_1$  e  $T_p$ , foi calculado um perfil de excitação para a sequência CWFP-AF, com os parâmetros largura de pulsos e intervalo de tempo entre os pulsos ajustados.

### **3.3 Testes de supressão 1D**

#### **3.3.1 Amostra de sacarose**

Foi preparada uma amostra de sacarose (fornecedor: Aldrich Chemical Company) 20 mM em uma mistura  $H_2O/D_2O$  na proporção (9:1) e inserida em um tubo de 5mm. Esta proporção entre os solventes, assim como em outras amostras, foi mantida para a trava de campo (sistema *Lock*). O TMSP (Trimetilsilil-2, 2, 3, 3-d4-propionato de sódio) 0,16% foi utilizado como referência interna. Para esta amostra foram adquiridos espectros de RMN de  $^1H$  utilizando-se das sequências CWFP convencional e CWFP-AF. Além disso, duas sequências muito difundidas para experimentos de supressão, baseadas na pré-saturação do sinal do solvente (uma com adição de pulso composto e outra com incremento por NOE) foram utilizados, para fins de comparação. Os parâmetros utilizados foram: janela espectral de 4800 Hz, 16 aquisições, 65536 pontos(*Time Domain*), tempo de aquisição de 5s, tempo de espera de 7s, ganho do receptor de 64, largura de pulso de 8,5  $\mu$ s,  $T_p$  de 500  $\mu$ s (CWFP<sup>s</sup>) e uma atenuação do pulso de pré-saturação de 60db (para as sequências baseadas na pré-saturação). Antes de cada experimento para remoção do(s) solvente, foi adquirido um espectro de RMN de  $^1H$  sem supressão e utilizando-se dos mesmos parâmetros acima, exceto o ganho do receptor que foi 1.

#### **3.3.2 Aplicação em amostra de rotina**

Com a finalidade aplicar as modificações na sequência CWFP em uma amostra “real”, foi utilizada para teste de supressão uma amostra de um

fármaco denominado RITMONEURAN<sup>®</sup> (Passiflora Incarnata 182,93 mg). Neste trabalho, uma cápsula desta amostra foi dissolvida em 0,6 mL de metanol deuterado (contendo 0,16% de tetrametilsilano, TMS) e inserida num tubo de 5 mm. Os parâmetros utilizados foram iguais a aqueles adotados para a sacarose (item 3.31) exceto o ganho do receptor, que neste caso corresponde a 362.

### 3.3.3 Amostra de Glicina

Foi preparada uma amostra de Glicina 20 mM dissolvida em H<sub>2</sub>O (pH $\cong$ 7) e inserida num tubo de 5mm. Como esta amostra foi utilizada para os estudos envolvendo supressão de prótons trocáveis, um capilar interno contendo TMSP em D<sub>2</sub>O (0,16%) foi inserido no tubo (figura 3. 1) com o objetivo de evitar possíveis processos de troca que poderiam ocorrer entre átomos de deutério do solvente e prótons do aminoácido, caso fossem misturados.

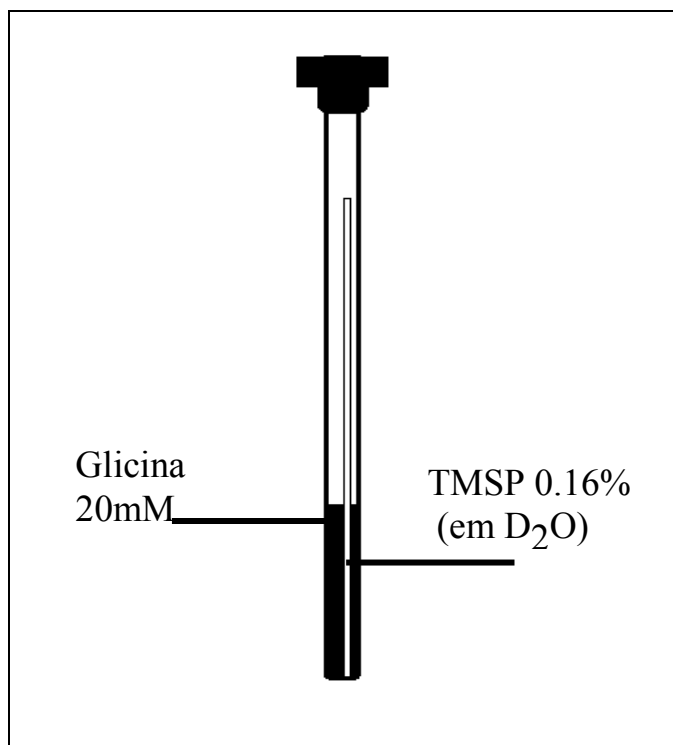


FIGURA 3. 1- Representação esquemática para as análises envolvendo Glicina.

Os parâmetros utilizados foram: Janela espectral de 4800 Hz, tempo de espera de 8 s, 16 aquisições, tempo de aquisição de 3 s, de 65536 pontos na aquisição do espectro, largura de pulso de 8.5 $\mu$ s e ganho do receptor de 204.

### 3.3.4 Testes de dupla supressão

Considerando o comportamento da sequência CWFP através dos perfis de excitação, foram realizados testes com o objetivo de suprimir dois sinais num mesmo espectro. Para tanto, foi utilizada uma amostra de 20 mM sacarose dissolvida em uma mistura de CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O na proporção 3:2:1. Os experimentos foram realizados com a frequência de defasagem (*offset*) fixa ora no sinal da acetonitrila (2.2 ppm) ora fixa no sinal da água. Para ambos os experimentos foram utilizados trens de 1024 pulsos, um intervalo de tempo entre os pulsos fixo de 1090  $\mu$ s e ganho do receptor de 10. Os outros parâmetros foram iguais a aqueles utilizados para a sacarose (item 3.3.1).

### 3.3.5 Amostras in natura

Para os testes de supressão *in natura*, foram utilizadas 4 amostras de uvas (*Vitis vinifera*) dos tipos Itália, Niágara, Rubi e Red Globe, disponíveis no comércio local, São Carlos-SP. Para estas análises, em particular, foram utilizados tubos de 10 mm que a princípio permitiriam o uso de uma quantidade maior de amostra, inclusive o uso de uma uva inteira e intacta, o que dispensaria processos de extração. Além disso, duas curvas de calibração (concentração *versus* intensidade do sinal CWFP e concentração *versus* °Brix) foi traçada a partir de cinco amostras diferentes (100, 200, 300, 400 e 500 mg.mL<sup>-1</sup>) de sacarose dissolvida em água com o objetivo de determinar, através de ambos os métodos, a quantidade deste açúcar na fruta. Neste caso, o triplo com



deslocamento químico próximo de 3.2 ppm foi utilizado como referência para os valores de intensidade do sinal CWFP.

Novamente, foi utilizado um arranjo semelhante ao da figura 3. 1, no entanto envolvendo um tubo de 5 mm como capilar (contendo TMSP-d4 0.16% em D<sub>2</sub>O) inserido num tubo de 10 mm. Em relação às amostras de uva e as de sacarose (curva padrão), os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H foram realizados em triplicada e sob temperatura controlada (298 K). Foi utilizada uma largura de pulsos de 7,5 μs, janela espectral de 6.000 Hz, 65536 pontos na aquisição do espectro, tempo de aquisição de 2s, tempo de espera de 10s, ganho do receptor de 18s e 16 aquisições. Neste caso, diferente de todos os outros experimentos de RMN listados neste trabalho, os teste de supressão *in natura* bem como a curva de calibração para a sacarose, foram adquiridos no equipamento Bruker-Avance III, equipado com um magneto Oxford de 9,4 tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio) com uma sonda de detecção direta com gradiente BBO 10 mm.

### **3.4 Teste de supressão 2D**

Para testar a eficiência do trem de pulsos CWFP em experimentos 2D, a mesma amostra de sacarose 20 mM (item 3.3.1) foi utilizada. Um trem de 1024 pulsos de 90° espaçados por um intervalo de tempo de 500 μs para o experimentos de COSY e HMBC foram utilizados. Os resultados obtidos com as sequências modificadas foram comparados com aqueles obtidos com as sequências 2D sem alterações porém utilizando-se dos mesmos parâmetros e os resultados foram comparados entre si.

### **3.5 Medidas de Brix**

Entende-se por valor Brix a porcentagem de sólidos solúveis em uma determinada amostra<sup>48</sup>. As medidas são realizadas por meio de

refratometria em que o índice de refração é medido através do ângulo crítico de um feixe de luz que atinge a amostra. Neste ângulo crítico não ocorre mais o fenômeno de refração, de modo que todo o feixe de luz é refletido. Este processo é medido por um sensor ótico que converte a reflexão total para o valor brix.

Neste trabalho, as quatro amostras de uvas e das soluções de sacarose utilizadas para construção da curva calibração (item 3.3.5) foram utilizadas logo após os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  através da adição de 3 gotas das respectivas amostras sobre a superfície do refratômetro (marca Soloeste, modelo TR-30-ATC). As análises ocorreram em triplicatas e sob temperatura de 298 K. Os resultados das medidas °Brix e CWFPP para as amostras de uvas foram confrontados entre si.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Excitação da Magnetização através do Estado Estacionário

Conforme discutido na parte introdutória deste trabalho, o estado estacionário é estabelecido através da aplicação de um trem de pulsos de mesma fase, intensidade e duração, separados por um intervalo de tempo  $T_p$ . A figura 4. 1 mostra a representação gráfica da sequência CWFP convencional programada no Laboratório RMN da UFSCar (equipamentos DRX 400 e Avance III, Bruker).

Na figura 4. 1, “n” representa um trem de n pulsos  $P_1$  separados por um intervalo de tempo  $T_p$  enquanto que  $P_w$  representa um pulso de leitura que antecede a aquisição e D o tempo de espera para que os spins atinjam o equilíbrio térmico.

O efeito de uma sequência de pulsos pode ser estudado a partir de um perfil de excitação que demonstra a ação dos pulsos sobre a magnetização da amostra em vários *offsets* diferentes. O resultado é um gráfico que reflete a fase e a intensidade da magnetização. Uma sequência de pulso ideal, para supressão do sinal do solvente, deve proporcionar um perfil de excitação uniforme sem qualquer perda de intensidade e distorção de fase, dentro de uma determinada faixa de frequência.

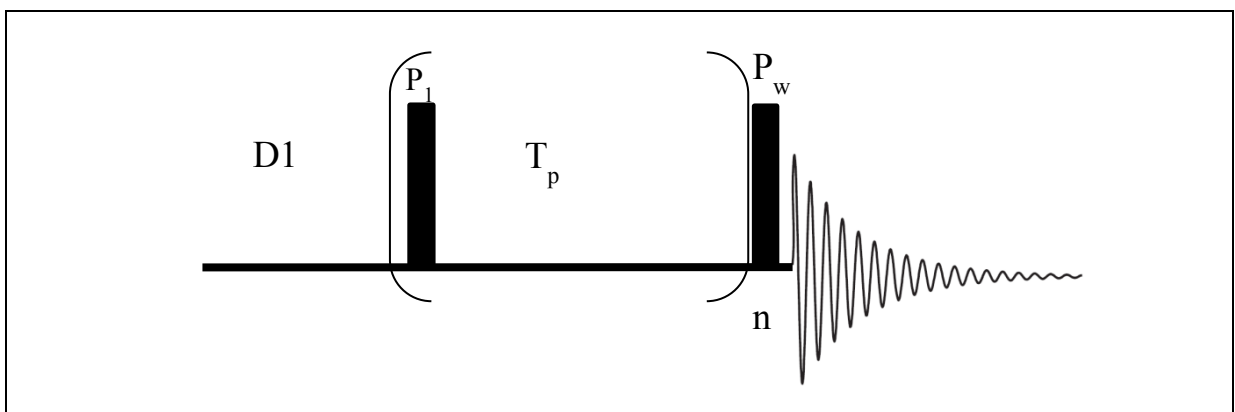


FIGURA 4. 1- Representação esquemática da sequência CWFP convencional

A partir da sequência CWFP convencional, foram traçados os perfis de excitação através da variação da largura dos pulsos ( $P_1$ ) e do intervalo de tempo ( $T_p$ ) entre os pulsos. Para tanto, foi utilizada uma amostra de água (contendo o agente relaxante  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a qual o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  exibe um único sinal.

#### 4.1.1 Variação da largura de pulso

Num estudo sobre precessão livre aplicada à RMN de imagens, BANGERTER e colaboradores<sup>49</sup> verificaram que este sinal é sensível a variações de largura de pulso e apresenta uma dependência entre os tempos de relaxação longitudinal e transversal.

O sinal CWFP apresenta uma grande sobreposição das componentes FID ( $M^+$ ) e eco ( $M^-$ ). Para ângulos de defasagem pares de  $\pi$ ,  $\psi = 2n\pi$ , a intensidade do sinal praticamente se anula em função destas componentes estarem defasadas em  $180^\circ$  (interferência destrutiva). Por outro lado, para múltiplos ímpares do ângulo de defasagem,  $\psi = (2n+1)\pi$  o sinal tem intensidade máxima em função de  $M^+$  e  $M^-$  estarem em fase (interferência construtiva). Dessa forma, o modo de interação entre as componentes pode ser utilizado para remoção de sinais indesejados do espectro na região onde o sinal se anula enquanto a intensidade da magnetização é preservada onde a interação é máxima.

A figura 4. 2 mostra os perfis de excitação para a sequência CWFP convencional utilizando várias larguras de pulsos diferentes. Os espectros foram adquiridos no modo fase e convertidos para o modo absoluto. Pode-se observar que a intensidade da magnetização é praticamente nula na região onde foi fixada a frequência de defasagem, neste caso escolhida como frequência do solvente, e nas regiões que coincidem com o inverso do intervalo de tempo entre os pulsos. Por outro lado, a região compreendida entre a frequência zero e o inverso de  $T_p$

demonstra a recuperação da magnetização. Além disso, os perfis de excitação (no modo fase) mostram uma inversão das fases entre os sinais principalmente nas regiões mais próximas da frequência de defasagem. Esta anomalia de fase é uma consequência direta da refocalização da magnetização (componente eco).

Para os ângulos de  $15^\circ$  e  $45^\circ$  (figura 4, 2b e d, respectivamente), observar-se que, grande parte dos sinais de maior intensidade ocorre em frequências próximas do zero. Este comportamento pode ser muito interessante para observação de núcleos cujos sinais ocorrem em frequências muito próximas do solvente, uma vez que suas intensidades são rapidamente recuperadas em frequências próximas do zero (frequência de defasagem), o que pode representar uma vantagem sobre métodos de supressão de solvente que se utilizam, por exemplo, da pré-saturação. Nesse caso, sinais próximos ao sinal suprimido experimentam alguma perda de intensidade.

Contudo, quando se utiliza de pulsos de largura  $135^\circ$  (figura 4. 2d), pode se observar grandes perdas de intensidade dos sinais tanto próximo do zero quanto nas extremidades do perfil de excitação.

Já o perfil de excitação para uma largura de pulso igual a  $90^\circ$ , representa o resultado mais promissor, uma vez que a intensidade dos sinais é mantida quase que uniforme. Esta característica é muito importante quando se trata de medidas quantitativas.

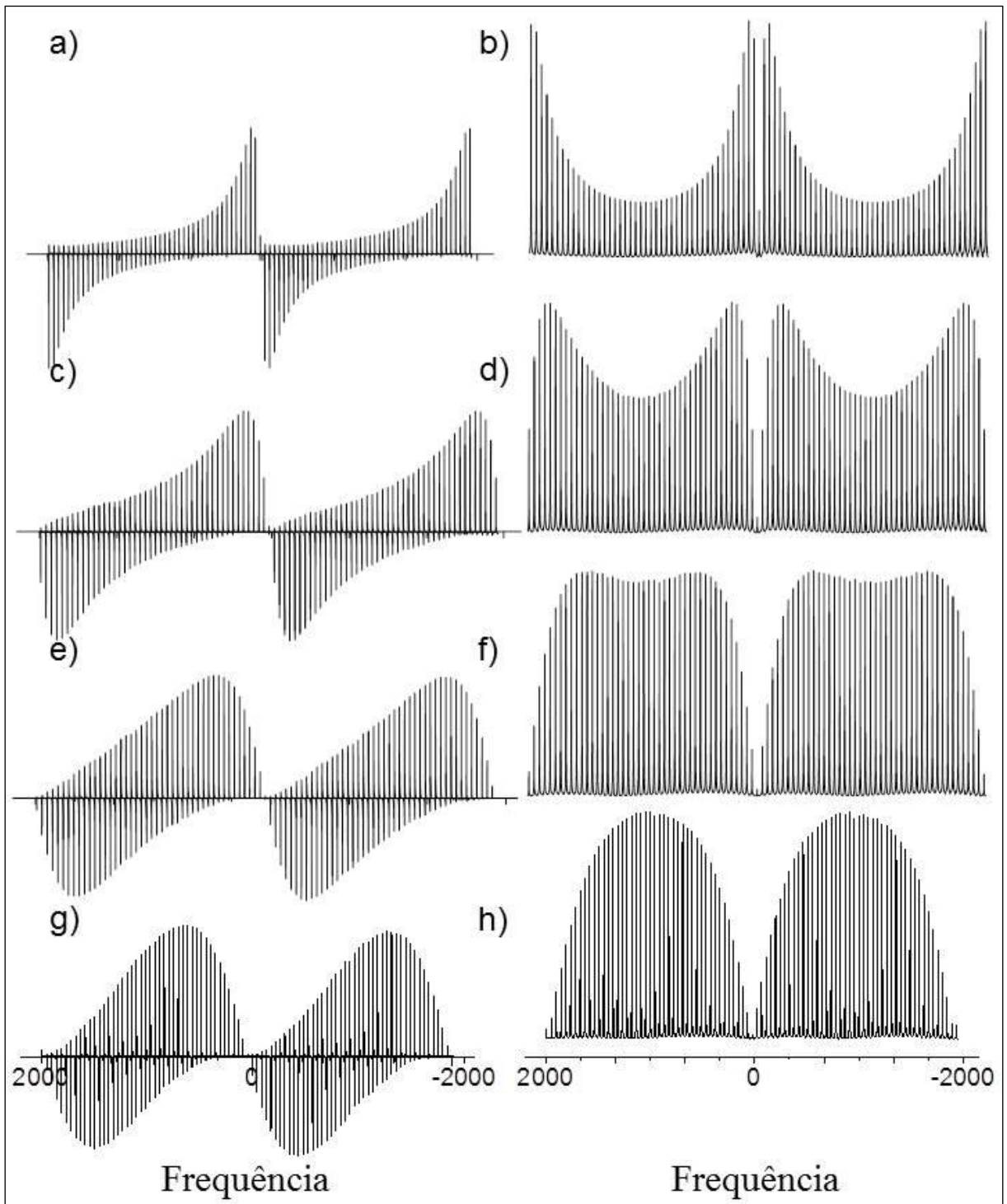


FIGURA 4. 2- Perfis de excitação da sequência CWFP convencional para as larguras de pulsos de 15, 45, 90 e 150° no modo fase (a, c, e, g) e no modo magnitude (b, d, f, h) respectivamente.  $T_p = 500 \mu s$  e  $n = 1024$  pulsos.

Os perfis mostrados na figura 4. 2 foram apresentados tanto no modo fase como no modo absoluto. Este processo ocorre através da substituição cada ponto “i” por um valor absoluto de acordo com a equação:

$$\text{ABS}(i) = \sqrt{(\text{R}(i)^2 + \text{I}(i)^2)} \quad 20$$

Onde R e I representam a parte real e imaginária do espectro, respectivamente<sup>50</sup>. Esta medida foi tomada apenas como uma forma mais prática de visualizar o efeito da sequência CFWP sobre a magnetização.

Contudo, é adequado que a aquisição dos espectros ocorra sempre no modo fase, uma vez que o processo de conversão entre estes modos promove o alargamento indesejável da linha de base dos sinais no espectro. Este efeito pode ser observado na figura 4.3 em que foram sobrepostos o modo fase e absoluto de um mesmo perfil de excitação.

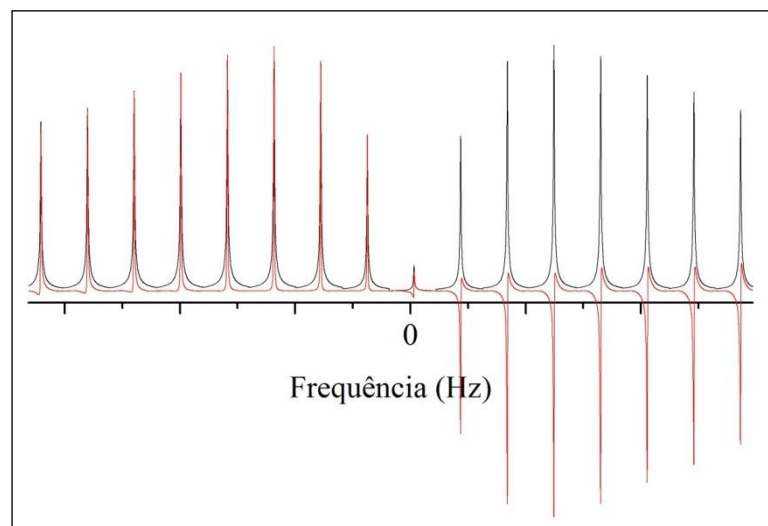


FIGURA 4. 3- Perfis de excitação para a sequência CFWP convencional nos modos fase (em vermelho) e absoluto (em preto).

#### 4.1.2 Variação do intervalo de tempo entre os pulsos

Outro parâmetro importante a ser avaliado é o intervalo de tempo entre os pulsos. Uma vez que o inverso de  $T_p$  equivale à diferença de frequência entre dois sinais, é possível selecionar uma faixa de frequências adequada para detecção somente de núcleos de interesse.

A figura 4. 4 mostra a dependência da região de supressão com o intervalo de tempo entre os pulsos.

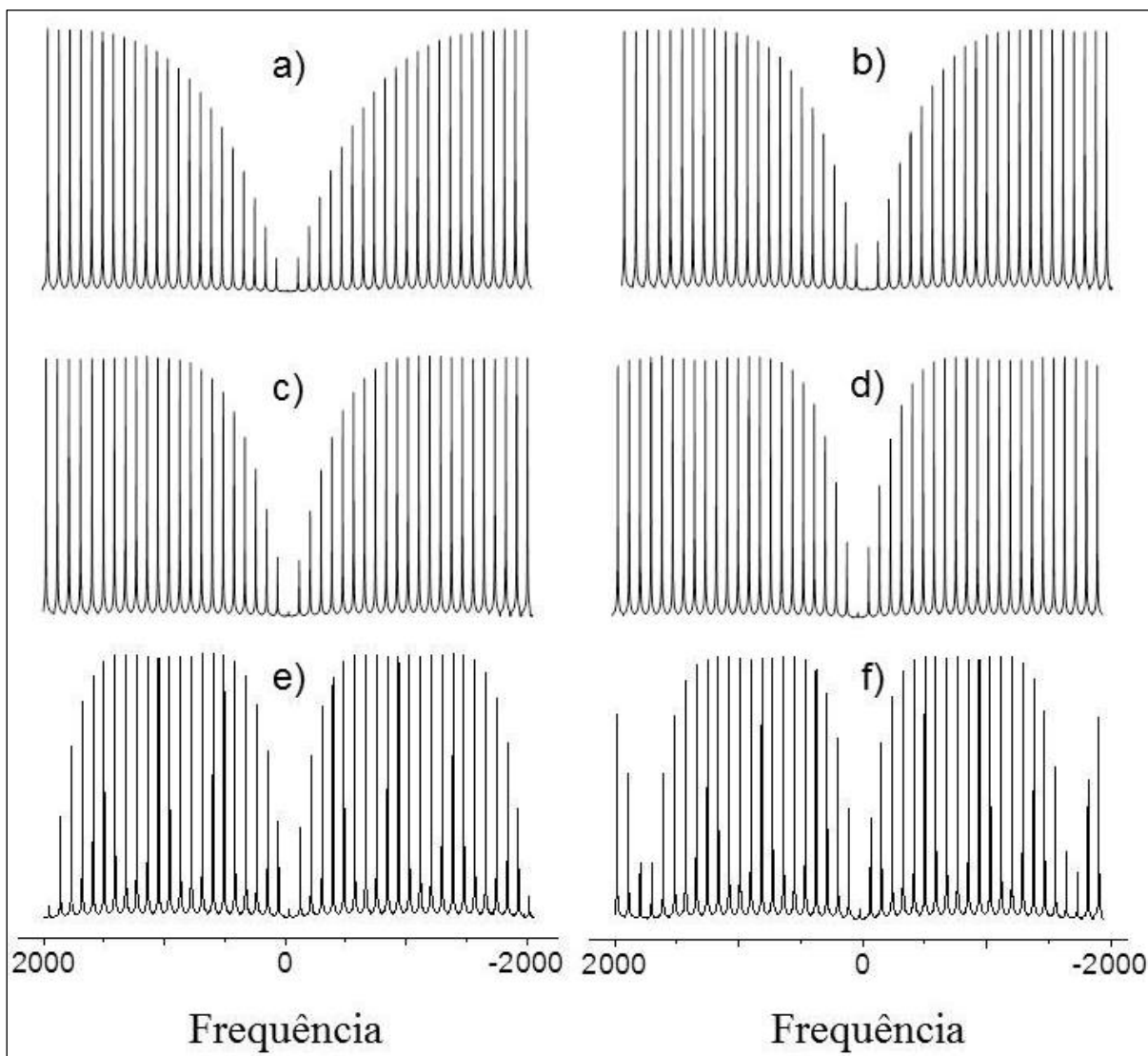


FIGURA 4. 4- Perfis de excitação (modo absoluto) a partir de várias larguras de pulsos diferentes: a) 200, b) 250, c) 300, d) 400, e) 500 e f) 550  $\mu$ s.  $P_1 = 90^\circ$  e  $n = 1024$  pulsos.

É possível observar que para larguras de pulsos maiores, a sequência CWFPT torna-se mais seletiva (Figura 4. 4c, d, e) se comparada a intervalos de pulsos menores (figura 4. 4a e b). Quanto mais estreita for a região suprimida nas proximidades do sinal do solvente, mais eficiente se torna a sequência, uma vez que frequências que aparecem próximas deste sinal apresentam menores (ou nenhuma) perda de intensidade. Além disso, é possível



promover a supressão de mais de um sinal num mesmo espectro, desde que o inverso da largura de pulso coincida com a frequência do sinal que se deseja suprimir, tomando como frequência de defasagem o valor do solvente. Este comportamento pode ser visualizado na figura 4. 4f. Para uma largura de pulso de 550  $\mu$ s, ocorre supressão de 3 sinais, embora uma intensidade relevante seja mantida para os sinais suprimidos das extremidades. Este comportamento foi estudado mais profundamente e será reportado neste trabalho.

## 4.2 Modificações na sequência CWFP

A partir da sequência CWFP convencional, foram feitas as modificações conforme proposto na literatura<sup>39-44</sup>. Estas modificações consistem na adição de uma alternância nas fases dos pulsos que representa uma forma de seleção de coerências em que vários *scans* são necessários para remoção de sinais, conforme a figura 4. 5. Neste processo, as fases dos pulsos e do receptor são alteradas de um modo estratégico para que coerências desejadas sejam somadas enquanto que outras (como do solvente, por exemplo) se cancelam.

Este método é semelhante à ciclagem de fases, que representa outra forma de seleção de coerências. A diferença principal é que no primeiro caso, a mudança nas fases dos pulsos ocorre num mesmo *scan* enquanto que no segundo caso estas alterações ocorrem a cada novo *scan*.

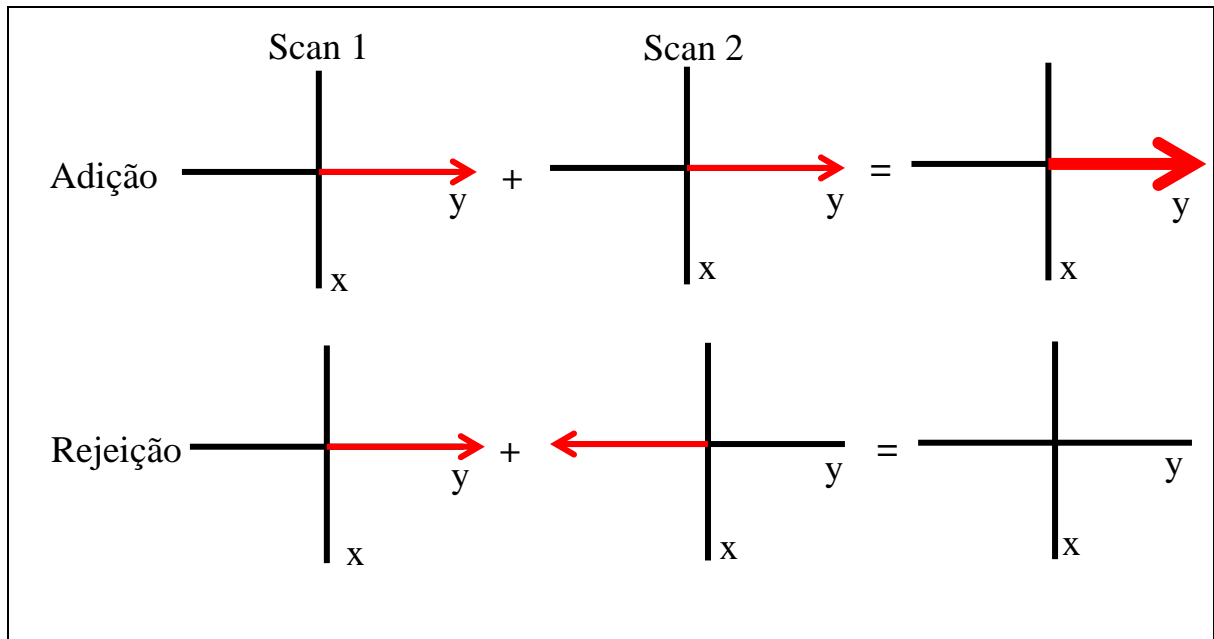


FIGURA 4. 5- Representação esquemática da alternância de fases.

A figura 4. 6 mostra a sequência CWFP-AF com os pulsos avançando de  $90^\circ$  com a aquisição sendo realizada em fase com o último pulso do trem.

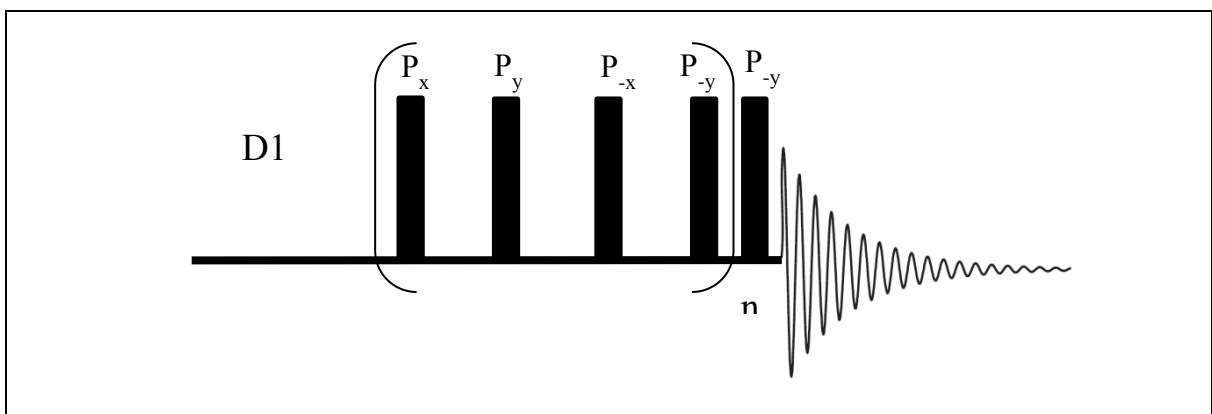


FIGURA 4. 6- Representação esquemática da sequência CWFP-AF

A partir desta nova sequência, foi construído um perfil de excitação com os parâmetros largura e intervalo de tempo entre os pulsos otimizados a partir da sequência CWFP convencional, utilizando-se da mesma amostra de água contendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e uma variação de frequência a cada experimento de 250 Hz. O resultado é mostrado na figura 4. 7. É possível observar que todos

os sinais no perfil de excitação apresentam mesma fase, o que aponta uma possível resolução deste tipo de anomalia que ocorre no espectro transformado quando se utilizou da sequência convencional.

Por outro lado, o sinal com frequência zero, ou seja, onde foi fixa a frequência de defasagem, não foi totalmente atenuado de modo que o sinal com intensidade nula ocorre em frequências menores. Este comportamento demonstra que um deslocamento significativo da frequência de defasagem poder estar ocorrendo para a sequência CWFP-AF de modo a excitar diferentemente sinais que ressonam no limite inferior e superior próximos ao sinal suprimido. Assim, ajustes adicionais na frequência de defasagem para uma supressão mais efetiva são necessários. Estas modificações são referentes a uma adição à frequência de defasagem de cerca de  $\frac{1}{4}$  do inverso do intervalo de tempo entre os pulsos.

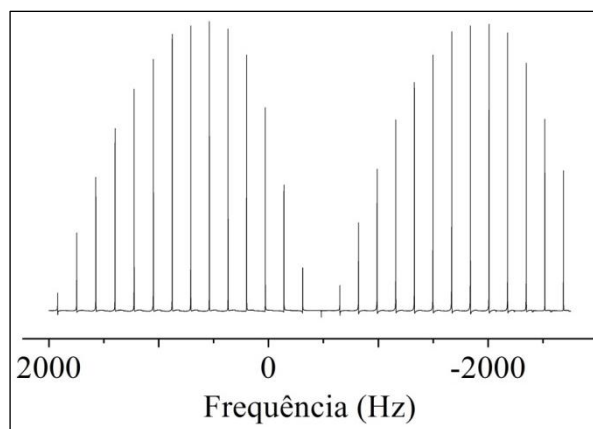


FIGURA 4. 7- Perfil de excitação (modo fase) para a sequência CWFP-AF.  $P_1 = 90^\circ$ ,  $T_p = 500 \mu s$ ,  $n = 1024$  pulsos.

Este efeito de deslocamento da frequência de defasagem foi relatado por Rudakov e colaboradores<sup>44</sup> quando estudaram a adição de um pulso preparatório na sequência SSFP com o objetivo de aumentar a intensidade dos sinais em um trabalho aplicado a NQR. Foi demonstrado que através desta modificação sinais de amplitude máxima e mínima ocorriam em períodos diferentes. Porém nenhum estudo mais refinado foi realizado a respeito deste

deslocamento de frequência. Segundo Venâncio<sup>51</sup>, este efeito pode decorrer pelo fato de que como a fase dos pulsos avançam de  $90^\circ$  a partir de x, e a aquisição é feita em fase com o último pulso do trem, neste caso  $-y$ , então a defasagem para que o sinal fosse suprimido teria um ângulo de  $3\pi/2$ . Como esta variação ocorre de modo periódico em relação a  $T_p$  o outro ponto de nulo correspondente deveria ser  $-\pi/2$ .

### 4.3 Testes de supressão 1D

Com o objetivo de confirmar, compreender e justificar modificações na sequência de pulsos foram realizados alguns testes de supressão utilizando-se das sequências CWFP convencional e modificada. Para tanto, foi utilizada uma amostra de sacarose 20 mM. Duas sequências muito difundidas baseadas na pré-saturação foram utilizadas neste experimento: uma com adição de pulso composto e outra com incremento por NOE. A representação gráfica destas sequências é mostrada na figura 4. 8.

A execução de ambos os experimentos é muito semelhante à pré-saturação comum, exceto algumas peculiaridades. A sequência que se utiliza de um pulso composto é, na verdade, um conjunto de pulsos com duração e fases variadas que são aplicados para compensar inhomogeneidades do campo<sup>52</sup>. Já a sequência com incremento por NOE é composta pelo primeiro incremento de um NOESY 2D através da adição de um tempo de mistura. Dessa forma, além de promover a saturação do sinal do solvente, aumenta a intensidade dos outros sinais do espectro através da transferência de magnetização<sup>16</sup>.

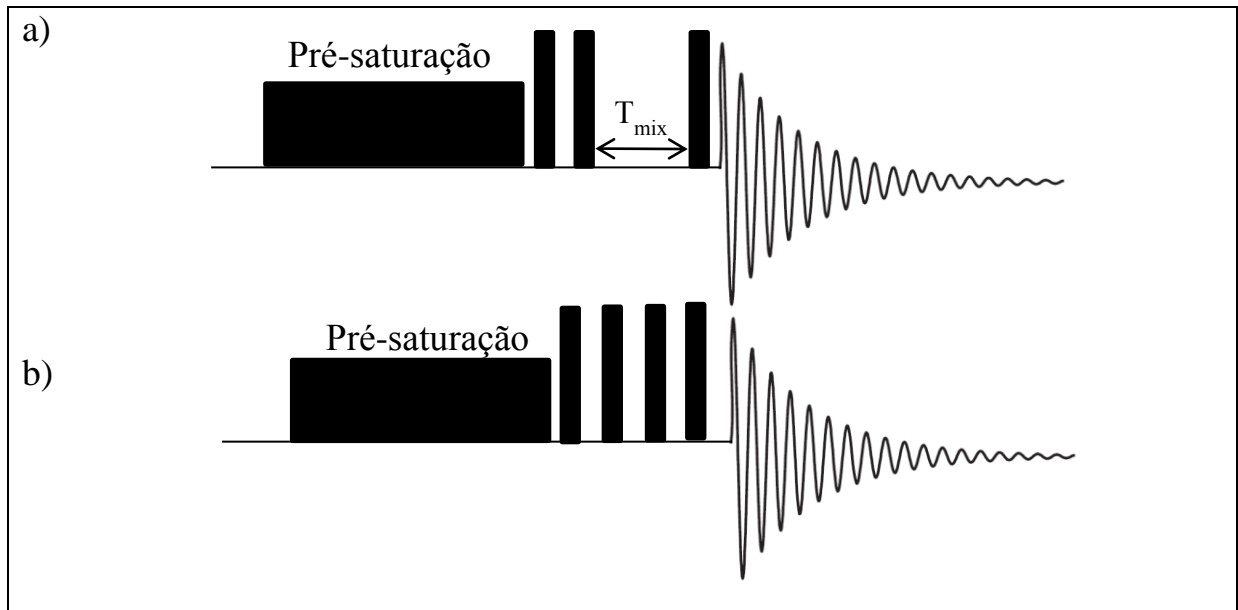


FIGURA 4. 8- Representação esquemática das sequências de pulsos : a) Pré-saturação com incremento NOE e b) Pré-saturação com pulso composto.  $T_{mix}$  representa o tempo de mistura.

A figura 4. 9 mostra o espectro de sacarose 20 mM sem supressão e utilizando-se das sequências CWFP convencional e CWFP-AF. Sem a supressão, o espectro é praticamente dominado pelo sinal da água (4.8 ppm). O efeito da dissipação da radiação, que promove o alargamento do sinal em 4.8 ppm, é bastante pronunciado. Quando utilizada a sequência CWFP sem a alternância nas fases dos pulsos, ocorre um ganho substancial da razão S/R dos sinais de açúcar em função da atenuação do sinal do solvente. No entanto, o duplete próximo de 5.4 ppm, que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico, apresenta fase invertida em relação aos demais sinais. Este comportamento já era esperado conforme demonstrado pelos perfis de excitação. Os sinais que ressonam acima da frequência de defasagem, apresentavam uma inversão de fases e este efeito, conforme discutido anteriormente, é resultante da refocalização da magnetização. Ao aplicar a sequência CWFP-AF todos os sinais no espectro exibem mesma fase.

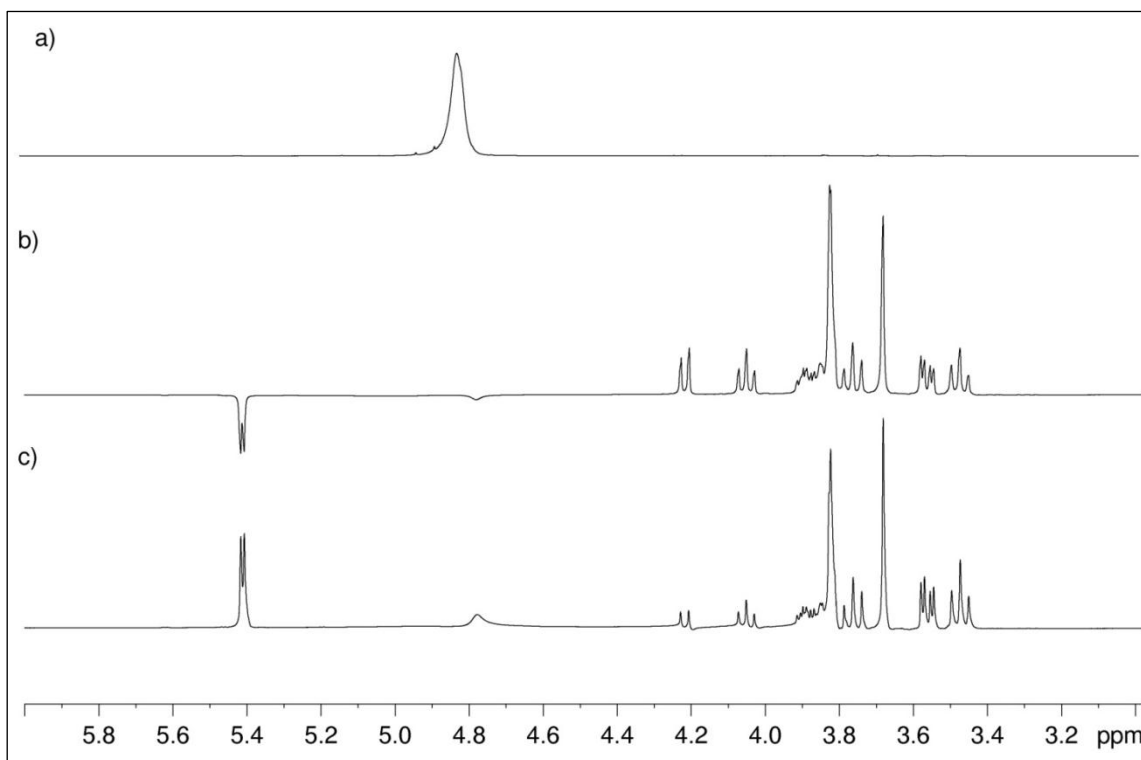


FIGURA 4. 9- Espectro parcial de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de sacarose 20 mM: a) sem supressão do sinal da água, b) utilizando-se da sequência CWFP convencional e c) CWFP-AF.

A figura 4. 10 abaixo mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  no domínio do tempo da amostra de sacarose 20 mM. A sequência CWFP convencional apresenta um sinal com batimentos compatíveis com a presença da componente eco, também observada por Freeman e Hill<sup>31</sup> (figura 1. 18). A introdução de um trem de pulsos aplicados com alternância de fases elimina esses batimentos e um sinal de decaimento mais suave pode ser obtido, como mostra a figura 4. 10b.

Na intenção de avaliar a influência da supressão sobre sinais do soluto, os resultados envolvendo as sequências baseadas na pré-saturação foram comparados a CWFP-AF, conforme a figura 4. 11. Os espectros foram normalizados e plotados com base na intensidade do TMSP ( $\delta = 0.0$  ppm). O espectro sem supressão foi ampliado 64x.

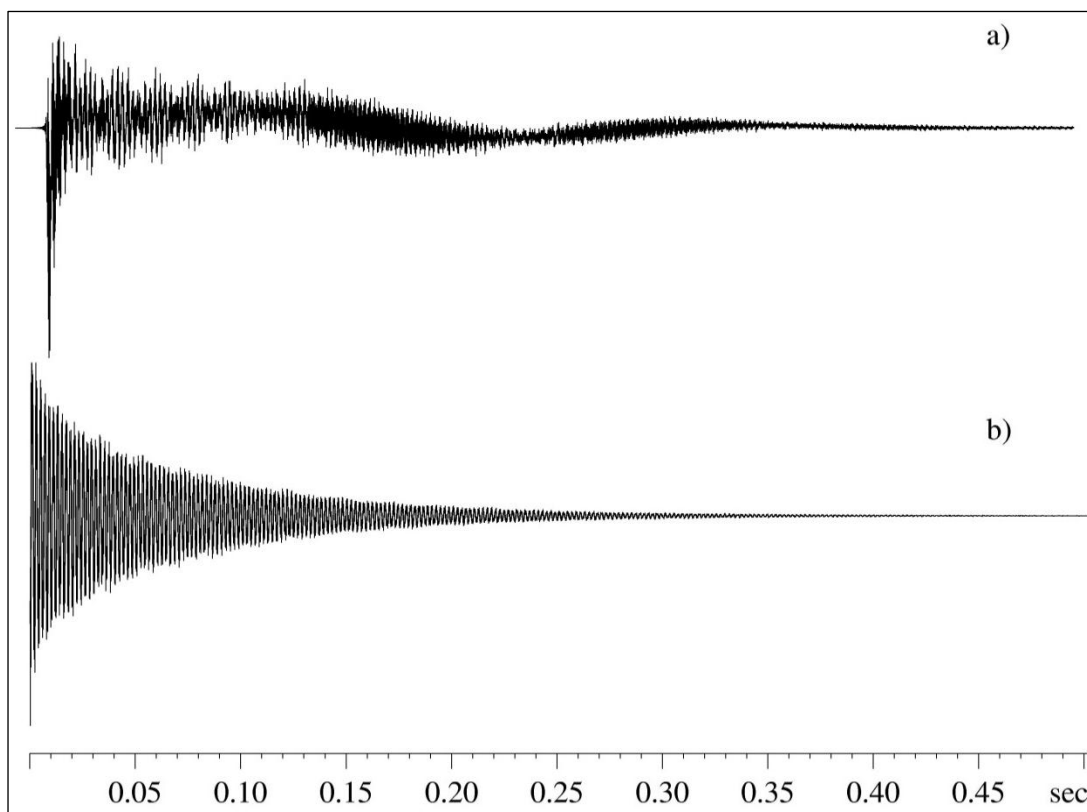


FIGURA 4. 10- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  no domínio do tempo para amostra de sacarose 20 mM: a) CWFP convencional e b) CWFP-AF. Espectros adquiridos com 256 scans.

Considerando os resultados na figura 4. 11 pode-se observar que a intensidade do sinal da água, em todos os três experimentos que envolvem supressão, é intensamente reduzida. Comparando as sequências com pré-saturação, os resultados são bastante equivalentes. Por outro lado pode-se observar no espectro da sequência CWFP-AF duas características bastante distintas dos demais espectros. O sinal que corresponde ao hidrogênio anomérico com deslocamento  $\delta = 5.4$  ppm apresenta-se com uma intensidade relativamente maior frente aos demais experimentos. Por outro lado, o tripleto e o duplete com sinais próximos de 4.0 e 4.2 ppm, respectivamente, tem suas intensidades reduzidas se comparadas com os demais espectros. Uma vez que a distância entre os sinais da água e o hidrogênio anomérico (0.6 ppm) é muito próxima daquela entre o mesmo sinal da água e o duplete e o tripleto ( $\cong 0.7$  ppm), era de se esperar que o efeito da sequência CWFP-AF fosse igual sobre ambos os sinais de lados opostos do espectro. Contudo, o que foi

observado é que o sinal acima do simpleto da água apresenta intensidade maior enquanto perdas consideráveis ocorrem nos sinais próximos e de deslocamento químico menor que o do solvente. Este efeito provavelmente resulta do deslocamento da frequência de defasagem e, deste modo, os sinais nas proximidades são excitados de modo diferente, conforme observado através do perfil de excitação (figura 4. 7).

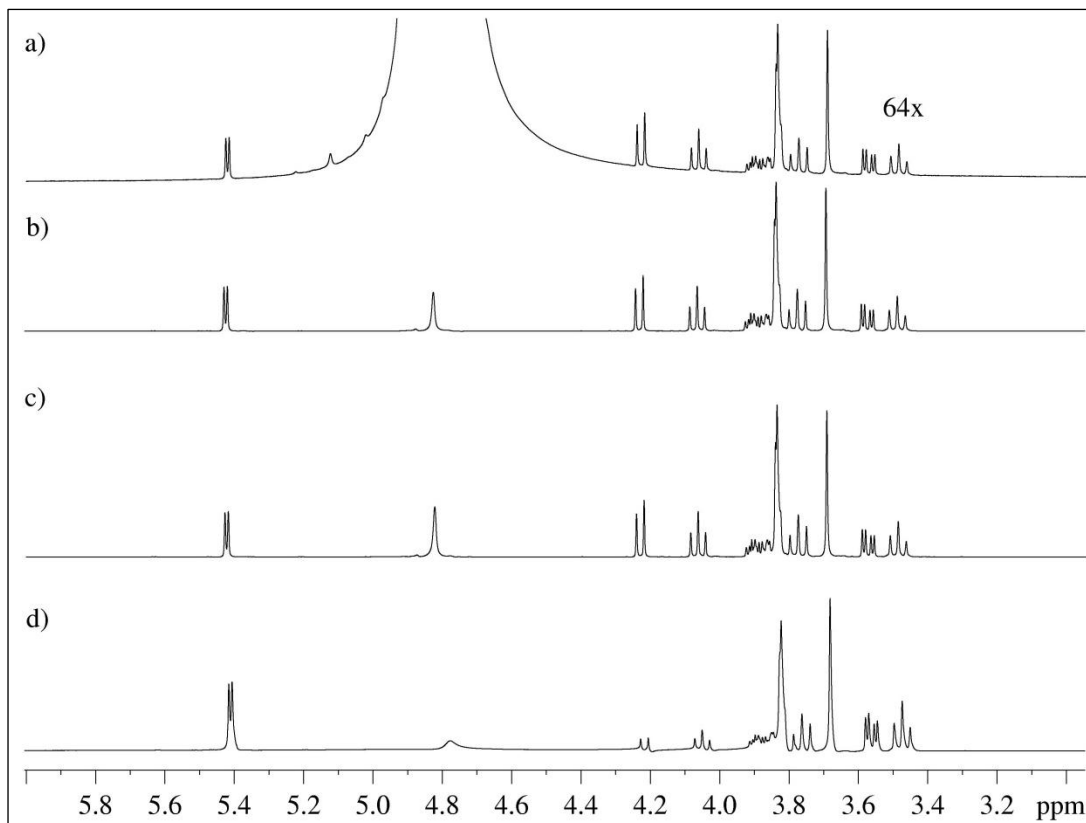


FIGURA 4. 11- Espectro parcial de RMN de  $^1\text{H}$  para a sacarose 20 mM: a) sem supressão, b) utilizando-se da pré-saturação com incremento NOE, c) pré-saturação com pulso composto e d) CWFP-AF.

### 4.3.1 Supressão em amostra de rotina

Para testar o potencial da sequência CWFP-AF, foi utilizada uma amostra de um fármaco denominado RITMONEURAN<sup>®</sup>, um medicamento fitoterápico utilizado no combate a ansiedade, irritabilidade, agitação nervosa e insônia, conforme especificado pelo fabricante (Hertz<sup>®</sup>). Esta amostra exibe uma



grande mistura de compostos e representa um bom modelo para testes de supressão, uma vez que alguns de seus sinais ressonam muito próximo do sinal do solvente.

A figura 4. 12 abaixo mostra o espectro sem supressão desta amostra dissolvida em metanol deuterado (metanol-d<sub>4</sub>). O intenso sinal da água, dissolvida no metanol, domina todo o espectro. Sem supressão, os sinais abaixo próximo à ressonância da água tornam se difíceis de serem analisados. Assim, uma supressão eficiente deveria remover o sinal do solvente sem comprometer os sinais do soluto.

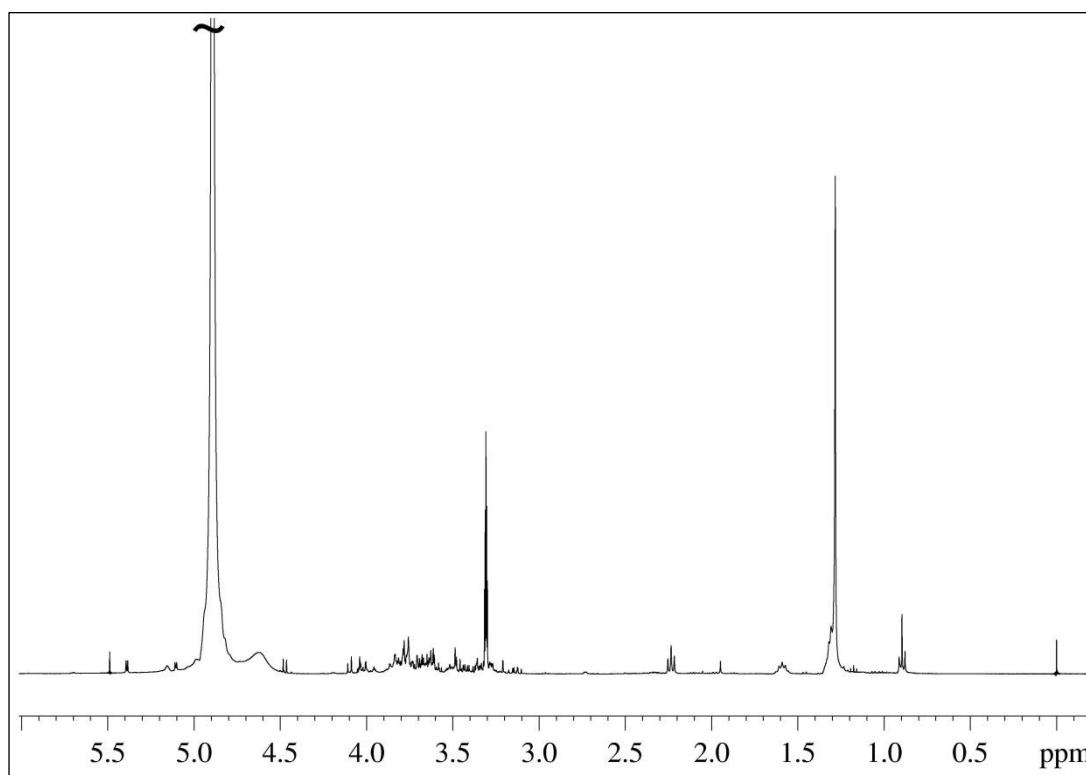


FIGURA 4. 12: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (sem supressão) da amostra de RITMONEURAM<sup>®</sup> dissolvido em metanol-d<sub>4</sub>.

A FIGURA 4. 13 mostra os espectros com supressão do sinal da água para amostra RITMONEURAM<sup>®</sup> utilizando as sequências baseadas na pré-saturação e CWFP-AF. Os espectros foram normalizados com base na intensidade do sinal TMS ( $\delta = 0,0$  ppm) e expandidos na região entre 7.0 e 3.1

ppm. O sinal (parcialmente cortado) em 3.3 ppm corresponde ao solvente metanol.

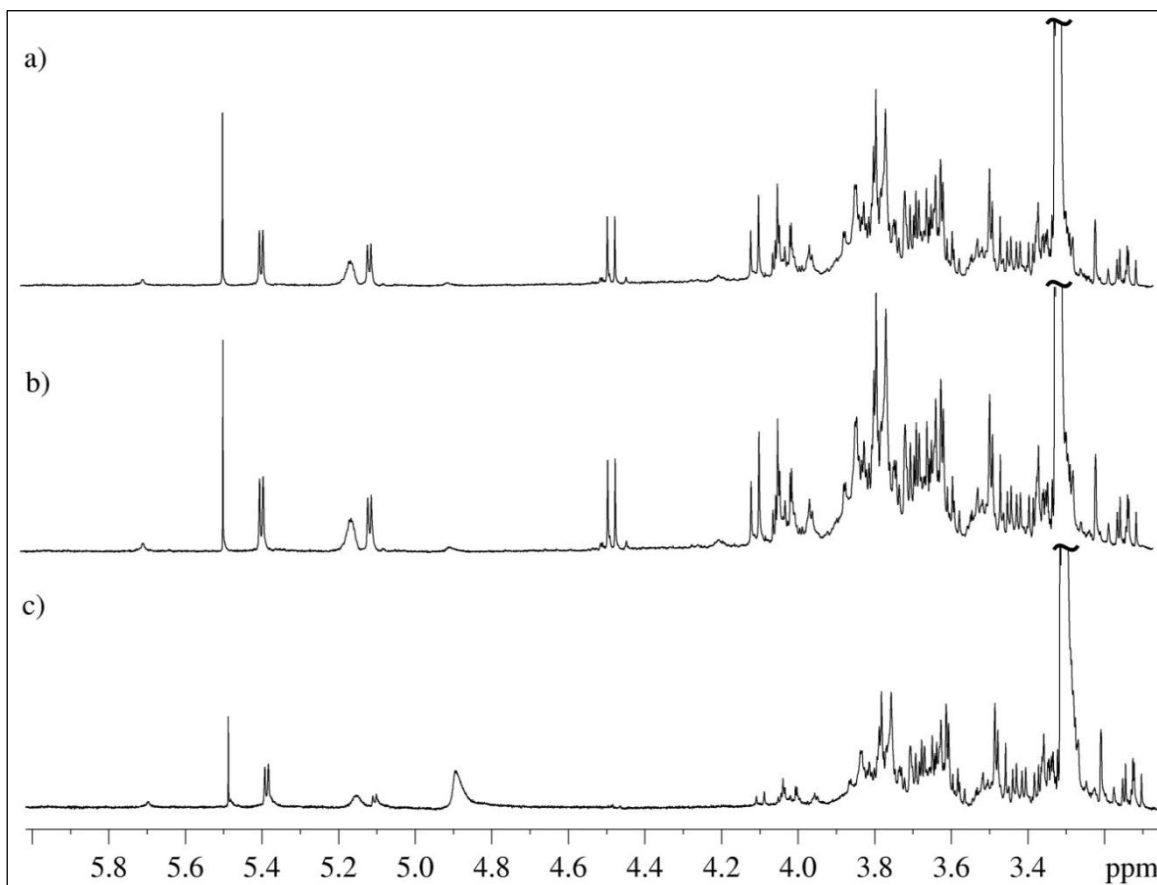


FIGURA 4. 13- Espectro de  $^1\text{H}$  de RMN da amostra RITMONEURAM<sup>®</sup>. a) Pré-saturação com pulso composto b) pré-saturação com incremento NOE e c) CWFP-AF.

Através da comparação entre os espectros com e sem supressão, pode-se observar que a ressonância do sinal da água é intensamente atenuada. Para as sequências envolvendo pré-saturação, a eliminação do sinal deste solvente é quase que completa enquanto que na sequência CWFP-AF parte do sinal da água ainda persiste no espectro. Além disso, o duplete com  $\delta = 4.5$  ppm é totalmente atenuado. Outros sinais com deslocamentos químicos próximos de 4.0, 5.5 e 5.6 ppm apresentam comportamento semelhante. A atenuação completa ou mesmo que parcial de sinais próximos ao do solvente pode representar uma limitação desta técnica uma vez que informações importantes podem ser perdidas como, por exemplo, em estudos de elucidação estrutural em

que a observação de todos os sinais no espectro é necessária, ou ainda medidas quantitativas baseadas em sinais próximos do solvente. Neste sentido, as sequências baseadas na pré-saturação aqui utilizadas, foram mais eficientes para conservação de sinais que ressonam próximo ao do solvente se comparadas à CWFP-AF.

### 4.3.2 Teste com prótons Trocáveis

Uma das limitações das sequências baseadas na pré-saturação e que já foi discutida na parte introdutória deste trabalho, está relacionada à supressão de prótons trocáveis. Neste sentido, prótons em amidas, aminas e outros grupos que compõem os peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos podem ter seus sinais diminuídos ou mesmo suprimidos quando se utiliza a pré-saturação para remover a ressonância do solvente.

Com o objetivo de testar se tal processo de troca poderia estar ocorrendo quando se utiliza do método CWFP-AF, uma amostra de glicina 20 mM dissolvida em água foi utilizada como referência. Esta amostra contém grupos OH e NH<sub>2</sub> e representa um bom modelo para este estudo. O resultado foi comparado com as sequências baseadas na pré-saturação.

Uma vez que a adição de D<sub>2</sub>O para a trava de campo poderia contribuir para o processo de troca entre os núcleos de deutério e prótons da amida, tomou-se o cuidado para que a mistura entre o aminoácido e água deuterada não ocorresse (conforme figura 3. 1) de modo que a possível redução de sinais de prótons trocáveis fosse decorrente apenas das sequências de pulsos testadas. Além disso, foi medido o pH da solução ( $\cong 7.0$ ), pois este é um parâmetro importante a ser considerado para estimar o ponto de equivalência entre cargas desta molécula, também denominado ponto isoelétrico (PI). O PI é uma faixa de pH segundo o qual uma molécula encontra-se com a mesma quantidade de cargas positiva e negativas. Para a glicina, este valor corresponde

$a \cong 6.02$ . Portanto, em pH próximo de 7.0 os grupos carboxílico e amino encontram-se deprotonado e protonado, respectivamente, conforme figura 4. 14.

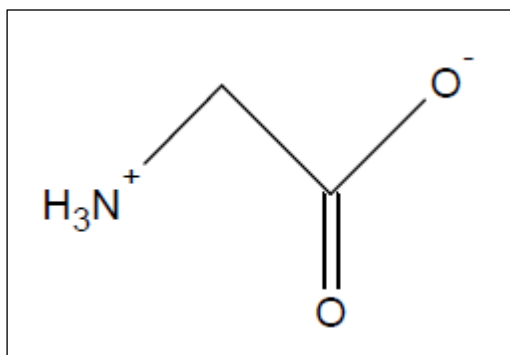


FIGURA 4. 14: Estrutura da Glicina em  $\text{pH} \cong 7.0$ .

Para esta estrutura, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  deve apresentar 2 sinais: um correspondente a metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) e outro a ao grupo amina protonado ( $\text{NH}_3^+$ ). Foram adquiridos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para a amostra de glicina sem a supressão do sinal da água e utilizando-se das sequências com pré-saturação e CWFP-AF. Para medir a intensidade dos sinais após a supressão da ressonância do solvente, foi realizada a integração dos sinais metileno e do grupo amina e calculada a razão entre as áreas  $\text{NH}_2/\text{CH}_2$ . Os espectros foram normalizados com base no sinal do TMSP conforme a figura 4. 15. É possível observar que, embora a atenuação do sinal da água ocorra de forma mais significativa para a sequência com pré-saturação que se utiliza de um pulso composto, a conservação do sinal do grupo amina ( $\delta = 2.2$  ppm) é maior para a sequência CWFP-AF. Este sinal ressona em uma região relativamente distante da frequência de defasagem do solvente. A recuperação da magnetização nesta região é maior, conforme visto a partir dos perfis de excitação (deste de que esta região não coincida com o inverso de  $T_p$ ).

Assim, para supressão de prótons trocáveis, pode-se afirmar que o método de Precessão Livre de onda Contínua é mais eficiente para estudos envolvendo prótons trocáveis que ressonam mais distante da frequência de defasagem do solvente quando comparada à pré-saturação.

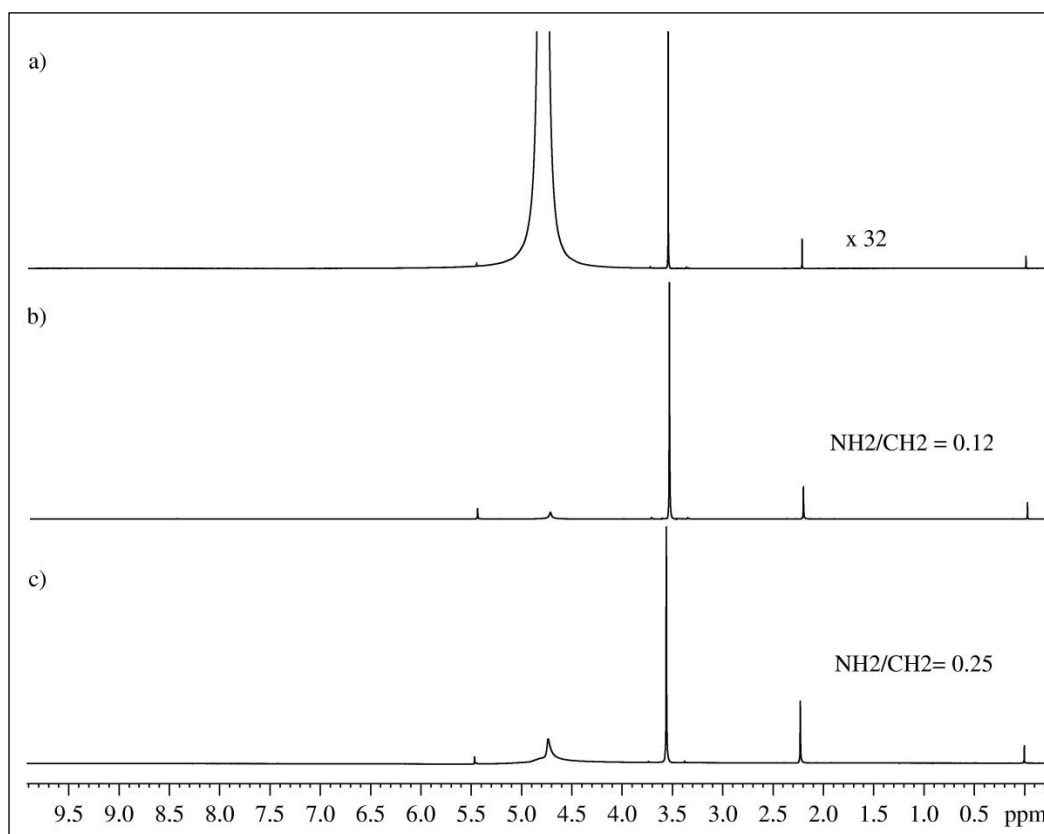


FIGURA 4. 15- Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para a glicina. a) Sem supressão, b) utilizando a sequência com pré-saturação com pulso composto e c) CWFP-AF.

#### 4.4 Teste de dupla supressão

A análise de compostos dissolvidos em misturas de solvente não-deuterados, como por exemplo, dimetilsulfóxido e água ou acetonitrila e água, torna-se bastante limitada em função de múltiplos sinais de solventes que dificultam ou mesmo impedem a observação de sinais menos intensos do soluto. Esta é uma situação comum em CLAE-RMN em que vários solventes em concentrações distintas são utilizados.

Vários métodos têm sido propostos para supressão múltipla de sinais como, por exemplo, empregando a pré-saturação em várias frequências ou através da combinação entre uma excitação seletiva múltipla e gradientes de

campo. Em geral, todas elas apresentam algumas limitações comuns quando utilizadas para atenuação de um único sinal.

Considerando que no método CWFP o inverso do intervalo de tempo entre os pulsos corresponde a um ângulo de precessão par ( $\psi = 2n\pi$ ), é possível que mais de uma ressonância possa ser suprimida. Este comportamento já foi discutido através dos perfis de excitação para larguras de pulsos diferentes. Para testar essa possibilidade, foi utilizada uma amostra de 20 mM de sacarose diluída em uma mistura de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$  (3: 2: 1) em um volume de 0.6 mL. Os testes foram realizados tanto para a sequência convencional como CWFP-AF. Para esta última, os testes ocorreram em duas condições distintas: a frequência de defasagem fixa no sinal da água e em outro momento fixa no sinal da acetonitrila. O valor do intervalo de tempo entre os pulso foi calculado com base na diferença de frequência entre os sinais destes dois solventes. Os resultados foram comparados entre si. A figura 4. 16 mostra o espectro da sacarose 20 mM sem supressão dos sinais de acetonitrila e água (não deuterada).

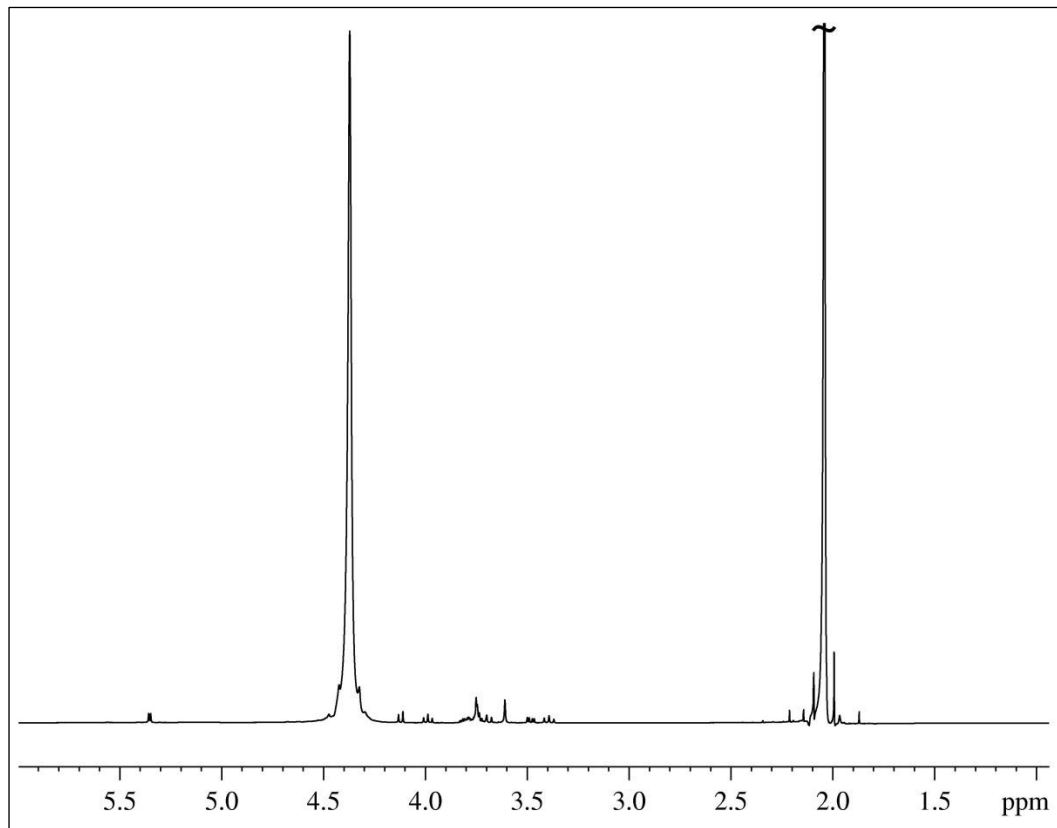


FIGURA 4. 16- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da sacarose 20 mM dissolvida em  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$  (sem supressão de sinais de solventes).

Sem a supressão de ambos os sinais dos solventes, torna-se difícil a observação dos sinais do açúcar. Os satélites de  $^{13}\text{C}$  da acetonitrila ( $\delta = 2.0$ ) são tão intensos que excedem em intensidade os sinais do soluto.

A figura 4. 17 mostra o resultado da supressão dos sinais da acetonitrila e da água para a sequência (a) convencional e CWFP-AF (b e c). As escalas verticais foram padronizadas com base no sinal do tripleto com deslocamento químico próximo de 3.4 ppm. As regiões que apresentam o símbolo (~) representam cortes parciais dos respectivos sinais.

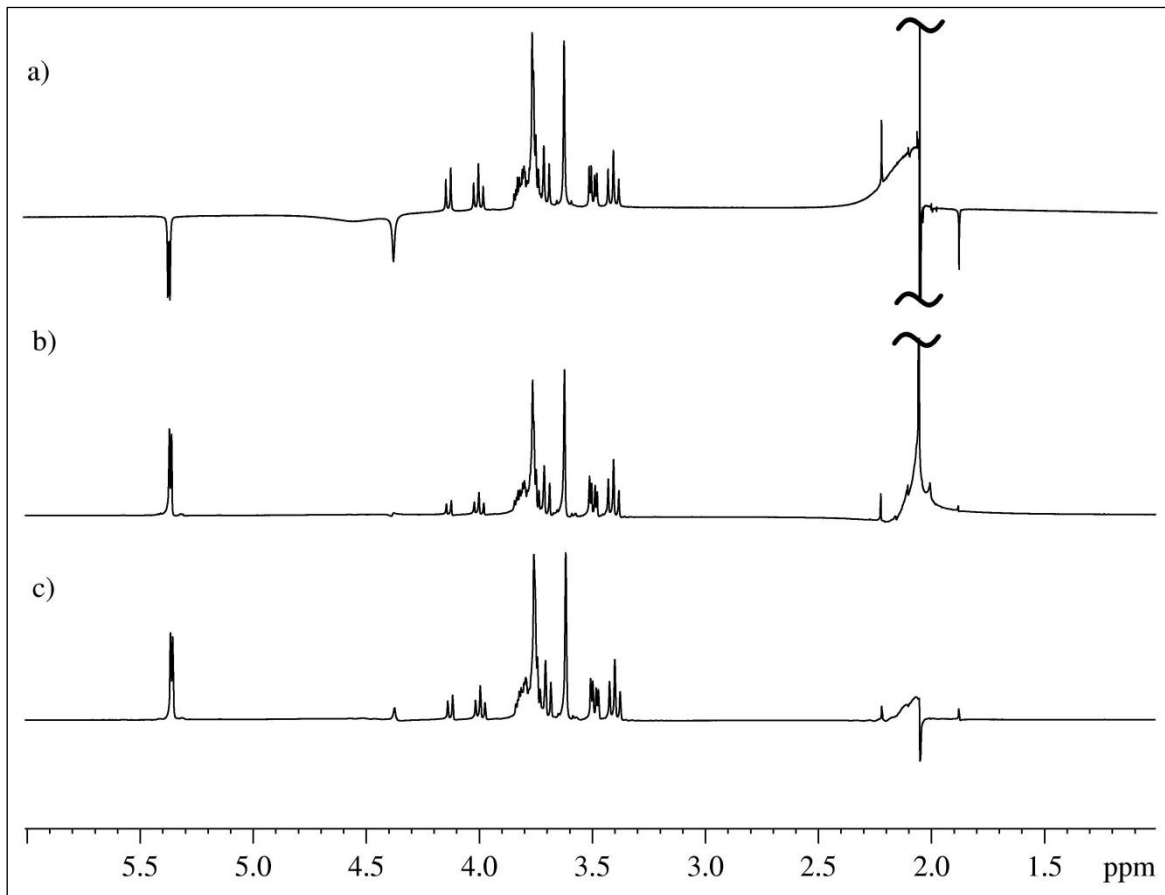


FIGURA 4. 17- Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da sacarose 20 mM com supressão do sinal da água e da acetonitrila: a) utilizando CWFP convencional com a frequência de defasagem fixa no sinal da água, b) CWFP-AF com a frequência de defasagem fixa no sinal da água e c) no sinal da acetonitrila.

Como pode ser observado na figura 4. 17, dois comportamentos diferentes se configuram. No caso em que a frequência de defasagem foi fixada no sinal da água (figura 4. 17 a e b), a atenuação do sinal deste solvente foi quase que completa além de promover mínimas distorções na linha de base. Porém, o sinal da acetonitrila é pouco suprimido o que impede a promoção do aumento dos sinais do soluto. Por outro lado, para a frequência de defasagem fixa no sinal da acetonitrila (figura 4. 17c), a supressão de ambos os sinais dos solventes é bastante efetiva e o resultado é um aumento substancial nos sinais do soluto. Este comportamento pode ser explicado com base no perfil de excitação para um intervalo de tempo entre os pulsos de  $550 \mu\text{s}$  (figura 4. 4f). Embora a atenuação ocorra em mais de uma região da janela espectral, a supressão mais



efetiva ocorre na região em que foi fixada a frequência de defasagem, uma vez que nas outras regiões correspondentes ao inverso do intervalo de tempo entre os pulsos, a intensidade da magnetização é parcialmente recuperada. Dessa forma, uma supressão mais eficiente para ambos os sinais, deve ocorrer quando a frequência de defasagem estiver fixa no sinal mais intenso do espectro, que neste caso corresponde a acetona nitrila.

Através da figura 4. 17a é possível observar também que, para sequência CWFP convencional há inversão nas fases dos sinais em regiões onde ocorrem as supressões ( $\delta = 2.0$  e  $4.2$  ppm) em decorrência da componente eco. Quando se utilizou da sequência CWFP-AF que através da alternância de fases elimina esta componente, todos os sinais no espectro passam a apresentar a mesma fase (figura 4. 17 b e c).

Uma das limitações da supressão de mais de uma ressonância utilizando-se do método de Precessão Livre no Estado Estacionário é a ocorrência de sinais de interesse que surgem em regiões equivalentes ao inverso do intervalo de tempo entre os pulsos, o que provocaria a atenuação de suas ressonâncias. Assim, por exemplo, um sinal com deslocamento químico  $\delta \cong 6.8$  ppm (com a frequência de defasagem fixa no sinal da água) seria suprimido.

Dessa forma, a supressão de sinais utilizando-se da sequência CWFP-AF representa uma alternativa bastante robusta para remoção de sinais indesejáveis no espectro com reduzidas perturbações na linha de base e fases dos sinais.

## 4.5 Experimentos com amostras *in natura*

Na maior parte dos experimentos realizados com amostras *in vivo* e *in natura* o sinal da água é apreciavelmente maior que sinais do soluto. Embora alguns trabalhos publicados tenham demonstrado RMN aplicada em amostras desta natureza sem a remoção do sinal da água<sup>53, 54</sup>, as técnicas que se dedicam à

supressão do sinal do solvente tem sido as mais difundidas principalmente em medidas quantitativas.

Para quantificação de um determinado sinal, o espectro deve ser adquirido e processado sob condições apropriadas<sup>55</sup>: A janela espectral deve ser excitada uniformemente pelos pulsos de rf; O tempo de reciclagem (*Recycle Time*) deve ser suficiente para que todos os spins da amostra relaxem; A digitalização dos dados deve ocorrer de modo que as linhas dos sinais sejam bem definidas; Uma correção precisa da linha de base e fase dos sinais também é necessária para a máxima razão S/N. Além disso, o sinal que será utilizado deve estar livre de sobreposição de outros sinais para que uma integração mais efetiva seja realizada.

Foi demonstrado que sinal CWFP é diretamente proporcional a concentração da amostra<sup>25</sup>. Dessa forma, a sequência CWFP-AF foi utilizada neste trabalho para determinar a concentração da sacarose em quatro tipos diferentes de uva. Para tanto, foi construída uma curva analítica (concentração *versus* intensidade) para cinco concentrações diferentes deste açúcar. As medidas de intensidade do sinal CWFP foram baseadas no tripleto ( $\delta = 3.2$  ppm) que apresenta-se livre da sobreposição de outros sinais, obtido após a supressão do sinal da água. Além disso, para os espectros de uva *in natura*, este sinal foi de melhor resolução. A figura 4. 18 mostra a estrutura da sacarose com destaque do hidrogênio (em vermelho) cujo sinal foi escolhido como referência.

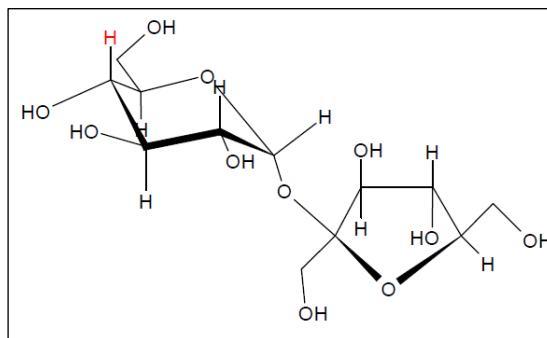


FIGURA 4. 18- Estrutura da sacarose.

As medidas foram feitas em triplicata utilizando-se de cinco concentrações diferentes (25, 50, 100, 200 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>) de sacarose. Em seguida, foi removida uma alíquota de cada amostra analisada e submetida às medidas de °Brix. Este mesmo procedimento foi utilizado para as quatro amostras de uvas.

A figura 4. 19 mostra o espectro de RMN de <sup>1</sup>H para uma amostra de uva do tipo Itália. É possível observar que sem a supressão do sinal da água é quase impossível a observação de outros sinais no espectro, principalmente aqueles que correspondem à sacarose, o açúcar dominante na uva.

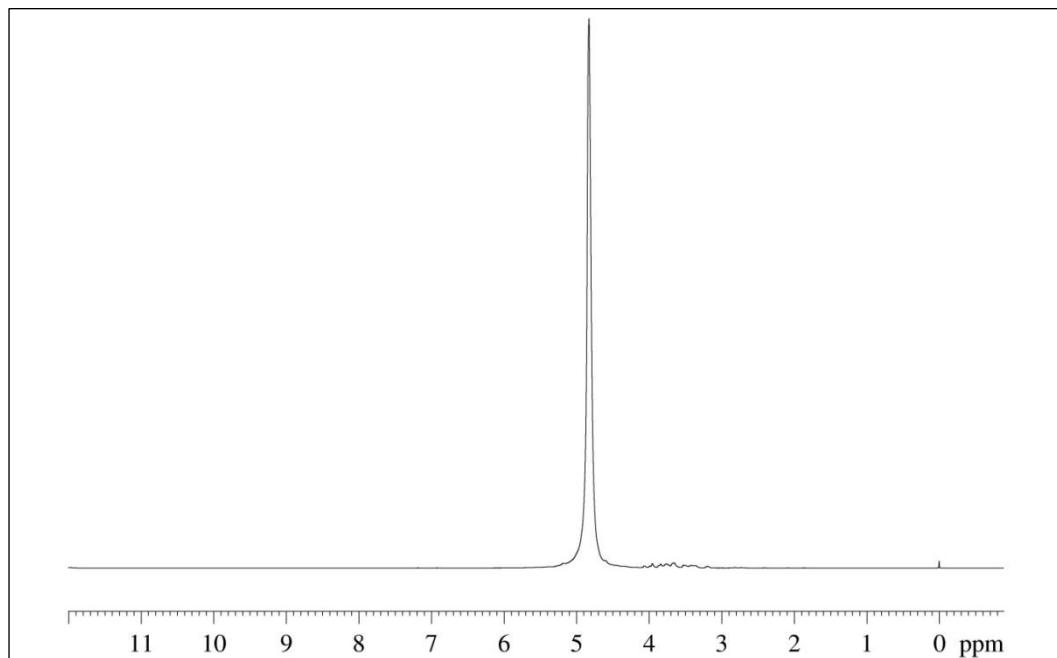


FIGURA 4. 19- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para a uva Itália sem supressão do sinal da água.

A figura 4.20 mostra o espectro de RMN de <sup>1</sup>H para as quatro amostras de uvas analisadas. Mesmo após a supressão, um sinal residual intenso da água persiste no espectro além de uma distorção considerável na linha de base para todas as amostras. Porém, o sinal utilizado como referência ( $\delta=3.2\text{ppm}$ ) para a quantificação está localizado numa região distante daquela da supressão e praticamente não sofre modificação na linha de base. Como as amostras de uvas analisadas não sofreram nenhum processo mais rigoroso de

extração, o espectro apresenta baixa resolução de modo que os desdobramentos dos sinais não estão bem definidos. Alguns sinais além daqueles que correspondem à sacarose, como por exemplo, o tripleto relacionado ao etanol que se forma durante o processo de fermentação, pode surgir em função dos diferentes estágios de amadurecimento dos frutos analisados.

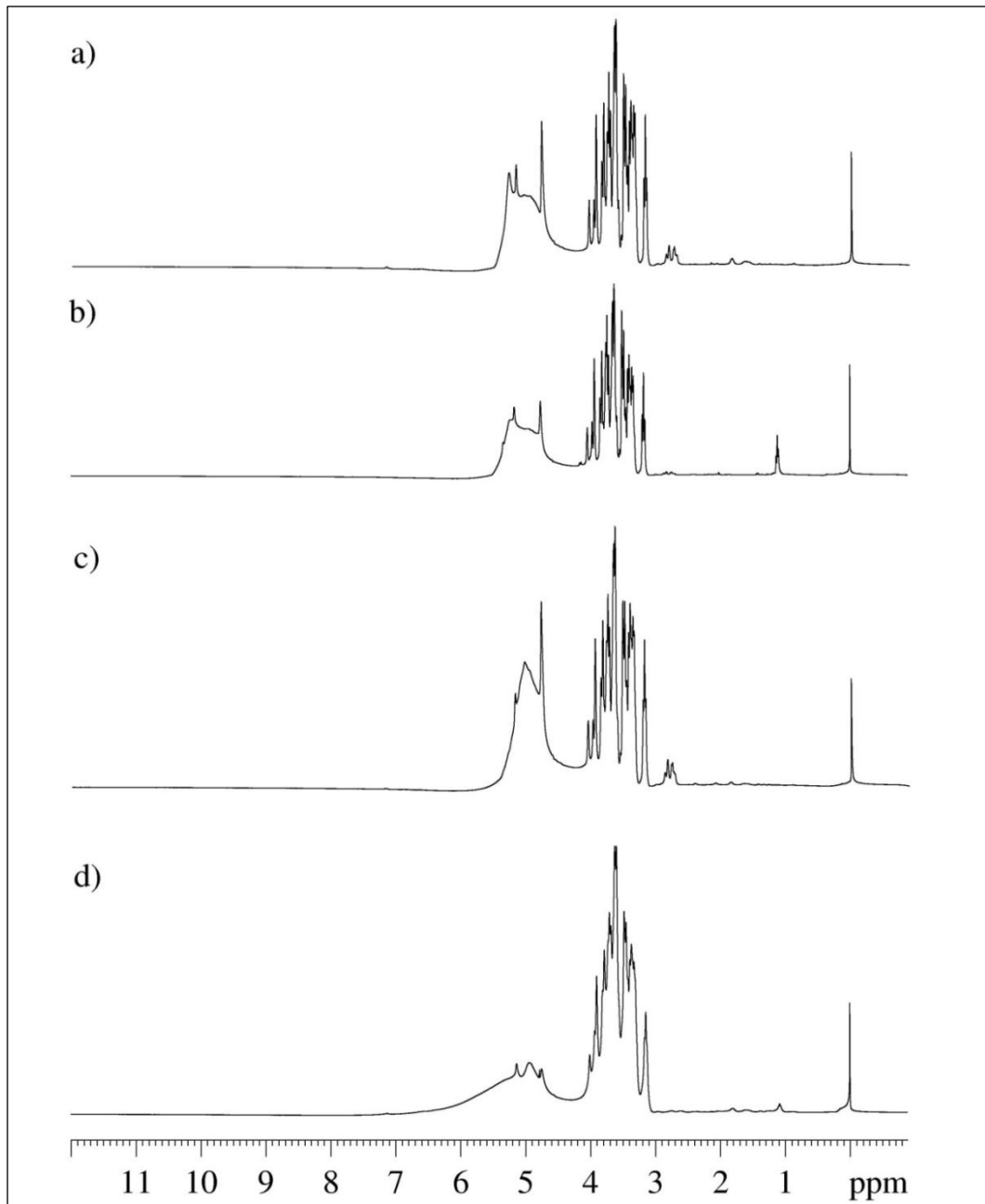


FIGURA 4. 20- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com supressão do sinal da água utilizando-se da sequência CWFP-AF para as quatro amostras analisadas de uva. a) Itália, b) Niagara, c) Rubi e d) Red Globe.

A figura 4. 21 mostra as curvas de calibração para a sequência CWFP-AF e °Brix.

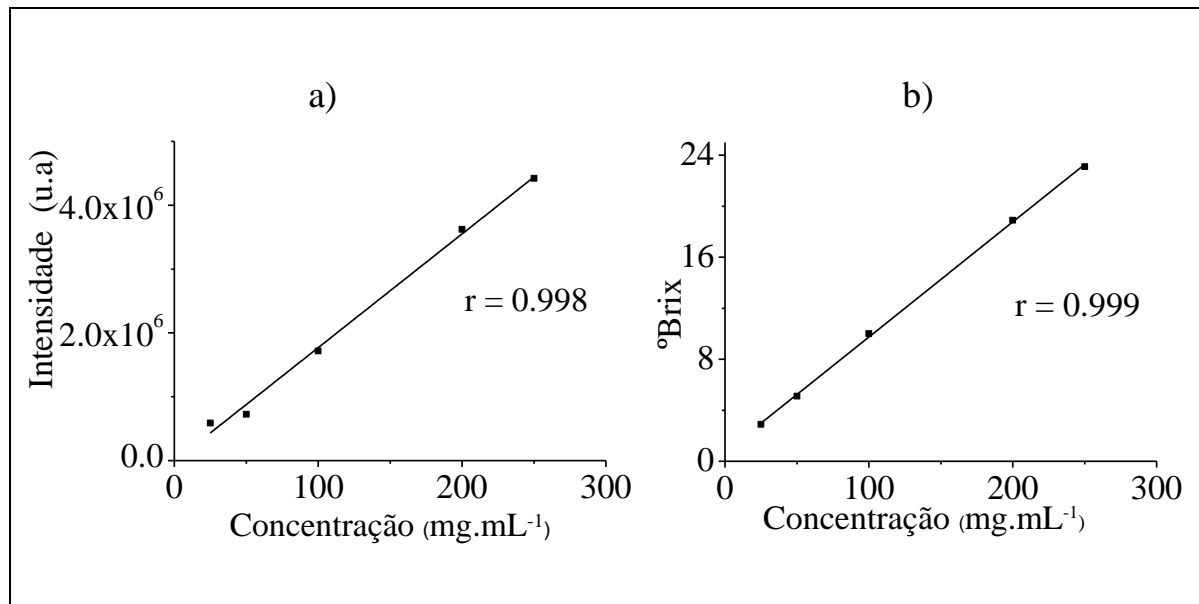


FIGURA 4. 21- Curvas de calibração para cinco amostras de sacarose: a) utilizando o método CWFP-AF e b) ° Brix

Através das curvas de calibração, é possível observar uma excelente correlação tanto para o método CWFP-AF quanto para o °Brix para as cinco concentrações diferentes de açúcar.

A tabela 4. 1 mostra o valor das concentrações de açúcar nas quatro variedades de uvas avaliadas tanto pelo método CWFP-AF quanto °Brix.

TABELA 4. 1- Valores para a concentração de sacarose nas quatro amostras diferentes de uva utilizando-se do método CWFP-AF e °Brix

Uva	Concentração (g.mL <sup>-1</sup> )	
	CWFP-AF	°Brix
Itália	142.00	160.07
Niagara	129.80	156.72
Rubi	112.73	134.38
Red Globe	178.74	224.85

A figura 4. 22 relaciona os valores de concentração (em  $\text{g.mL}^{-1}$ ) entre os métodos  $^{\circ}\text{Brix}$  e CWFP-AF. Assim, os valores mostrados na tabela 4. 1 foram reajustados (conforme a tabela 4. 3) levando em consideração a constante de proporcionalidade entre ambas grandezas segundo a equação 20:

$$\text{Brix} = 1,36 * \text{CWFP} - 23,66 \quad 20$$

Os valores apresentados por ambos os métodos são de mesma ordem. No entanto, para o  $^{\circ}\text{Brix}$  todos os valores encontrados para concentração de açúcar foram superiores quando comparadas às respectivas variedades de uvas analisadas por CWFP-AF. Como as medidas realizadas por meio do método de refratometria indicam a quantidade total de sólidos solúveis, é possível que os valores excedentes estejam relacionados a outros açúcares também dissolvidos e em quantidades menores na fruta, como frutose e glicose. Neste sentido, a determinação de açúcares através de RMN pode ser mais vantajosa uma vez que possibilita quantificar um componente específico enquanto que utilizando-se do  $^{\circ}\text{Brix}$  não seria possível.

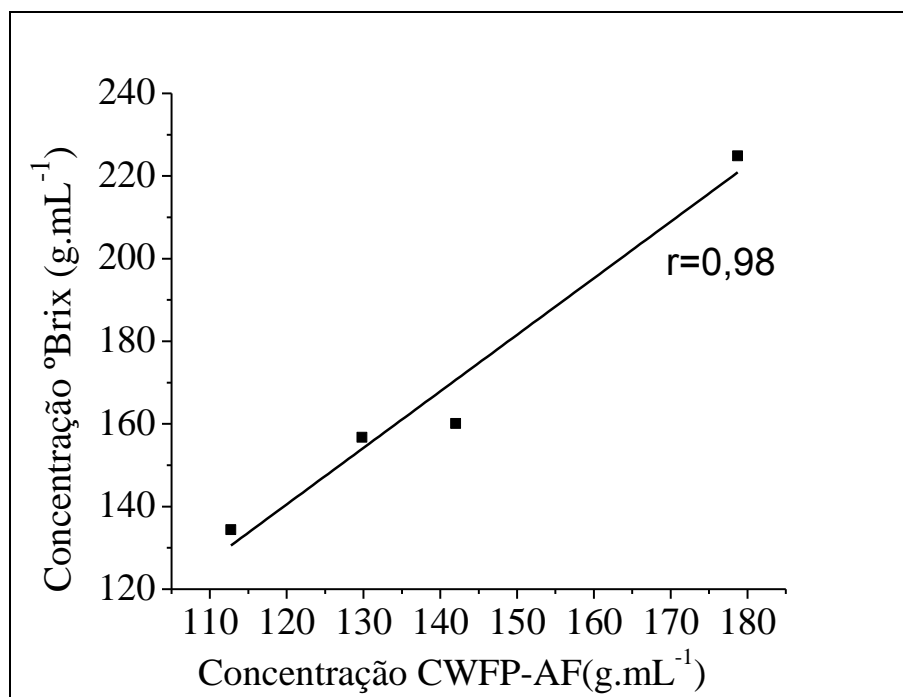


FIGURA 4. 22- Correlação entre os valores de concentração obtidos através dos métodos CWFP-AP e  $^{\circ}\text{Brix}$ .

TABELA 4. 2- Valores reajustados para a concentração de sacarose nas quatro amostras diferentes de uva utilizando-se do método CWFP-AF e °Brix.

Uva	Concentração (g.mL <sup>-1</sup> )	
	CWFP-AF	°Brix
Itália	169,46	160.07
Niagara	152,86	156.72
Rubi	129,65	134.38
Red Globe	219,42	224.85

#### 4.6 CWFP aplicada em experimentos 2D

Em RMN multidimensional, a supressão completa do sinal do solvente nem sempre é tão indispensável como em RMN de <sup>1</sup>H devido à maioria das vezes os sinais de correlação estarem distantes do sinal do solvente. No entanto, o sinal residual do solvente pode promover distorções na linha de base e impedir a observação de sinais próximos, como por exemplo, em estudos envolvendo proteínas<sup>10</sup>.

Basicamente, os experimentos bidimensionais são iniciados através de um período de preparação que é seguido de um período de evolução  $t_1$  e um período de mistura acompanhado da detecção. O período de detecção é fixo e normalmente empregado para permitir que os spins retornem ao equilíbrio termodinâmico. Este período tipicamente se encerra com um pulso de excitação. O período de evolução é aplicado para codificar o deslocamento químico sendo iniciado em zero e incrementado por um valor constante ( $\Delta t_1$ ). Já o período de mistura está relacionado à transferência de magnetização de um determinado spin para outro. E por último a detecção, que ocorre de modo semelhante aos experimentos 1D. Geralmente são utilizados gradientes de campo ( $G_z$ ) para o processo de seleção de coerências. Outros parâmetros podem surgir na sequência de acordo com a complexidade do experimento.

Considerando a eficácia do método CWFP para supressão de sinais de solventes, um trem de pulsos com alternância de fases da sequência foi adicionado em dois experimentos cujas sequências já estão disponíveis no laboratório: COSY (Correlation Spectroscopy) e HMBC (Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation), ambas baseadas na pré-saturação para remoção do sinal do solvente. As modificações ocorreram através da substituição do pulso longo e de baixa potência, correspondente a pré-saturação, pelo trem de pulsos CWFP-AF.

#### **4.6.1 COSY com supressão do sinal do solvente**

O experimento COSY é o mais simples dos experimentos multidimensionais que permite estabelecer correlações entre núcleos de um mesmo tipo através das ligações.

A figura 4. 23 mostra as sequências para experimento de COSY com um pulso de pré-saturação e o trem de pulsos CWFP com alternância de fases.



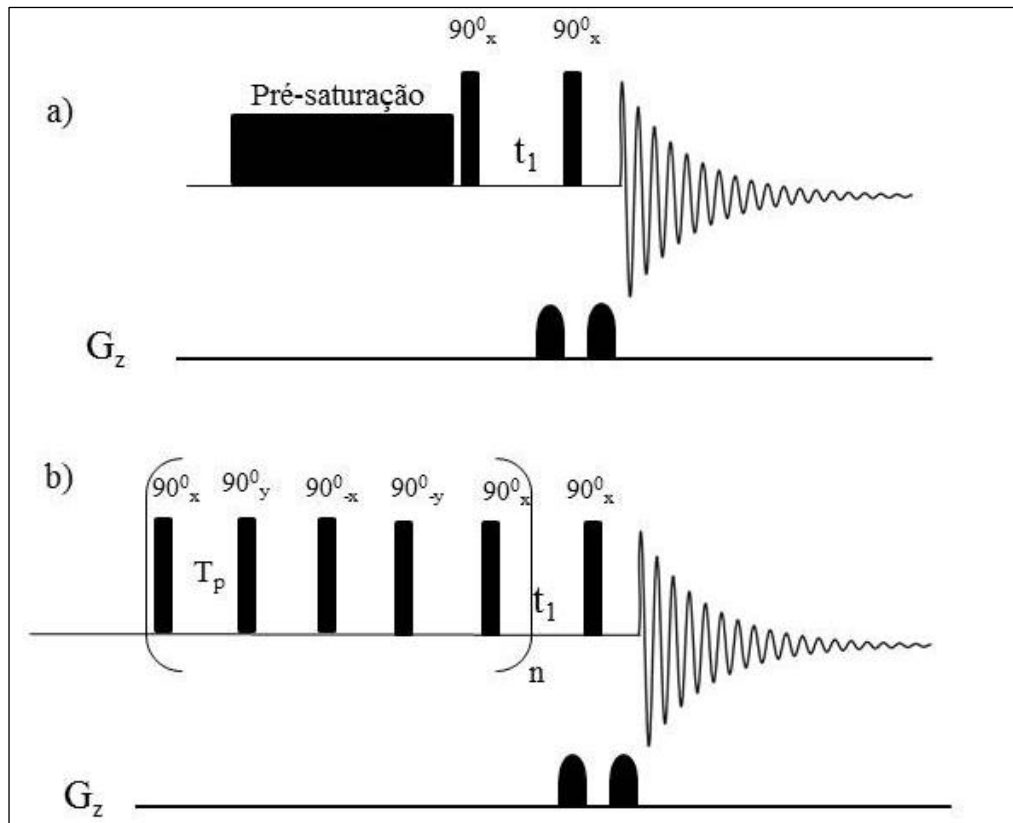


FIGURA 4. 23- Representação esquemática das seqüências COSY a) com pré-saturação e com b) CWFP-AF.

Para testar e comparar o potencial da nova seqüência (figura 4. 23a) foi utilizada uma amostra de glicose 20 mM. Os resultados foram comparados com um experimento de COSY utilizando-se da pré-saturação (figura 4. 23 b). Comparando os mapas de correlação para ambos os experimentos, é possível observar que a supressão envolvendo o trem de pulsos CWFP-AF é bastante eficiente para remoção do sinal da água com resultados compatíveis com aqueles apresentados pela seqüência com pré-saturação, de modo que as mesmas correlações podem ser observadas em ambos os espectros.

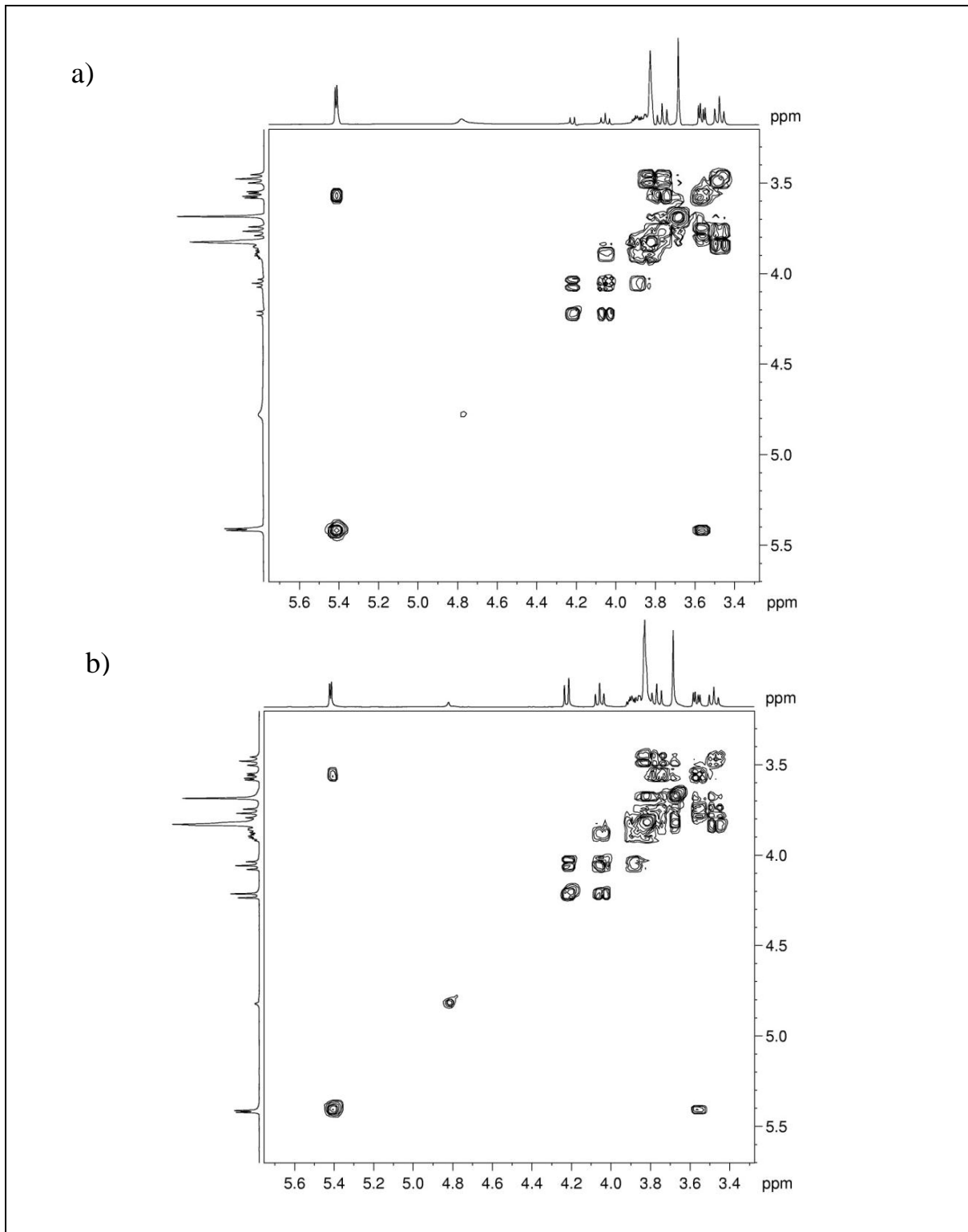


FIGURA 4. 24- Mapa de correlação COSY da amostra de sacarose 20 mM: a) Utilizando-se do trem de pulsos CWFP-AF e da b) pré-saturação. O tempo total do experimento foi de 2h.

#### 4.6.2 HMBC com supressão do sinal do solvente

O HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) é um experimento 2D que permite estabelecer correlações entre prótons e carbonos (ou entre prótons e nitrogênio) que estão separados a duas, três e até quatro ligações (no caso de sistemas conjugados) enquanto correlações a uma ligação são suprimidas.

A figura 4. 25 mostra as sequências de pulsos para o experimento de HSQC com a pré-saturação e utilizando-se do trem de pulsos CWFP-AF. Neste experimento, após a supressão, o primeiro pulso e o tempo de espera  $\Delta$  geram a magnetização no próton que está em anti-fase em relação ao acoplamento com  $^{13}\text{C}$ . O pulso de  $90^\circ$  no canal do carbono rotaciona a magnetização numa coerência *multiple quantum*. Este processo representa uma forma de discriminar entre prótons ligados e não ligados ao  $^{13}\text{C}$ . O segundo pulso, ainda no canal do carbono, retorna a magnetização a coerência *multiple quantum* para observar a magnetização em anti-fase no próton. E finalmente, no segundo tempo de espera  $\Delta$  ocorre à mudança do estado anti-fase para o estado fase. O pulso de  $180^\circ$  colocado ao centro da sequência de pulsos refocaliza a evolução do próton para  $\Delta$  e  $t_1$ .

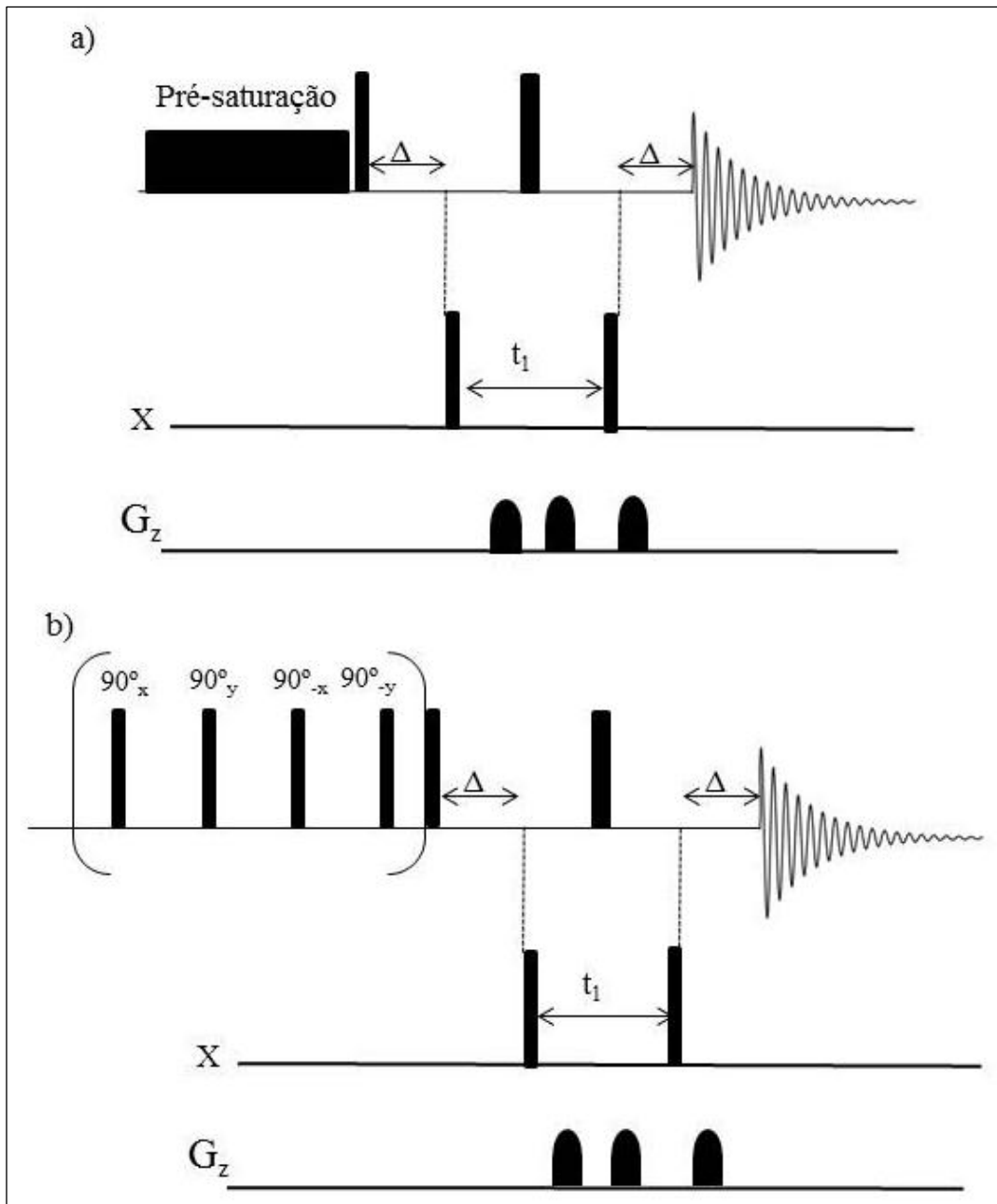


FIGURA 4. 25- Sequência de pulsos para o experimento de HMBC a) utilizando-se da pré-saturação e do b) trem de pulsos CWFP-AF. “X” representa o canal do carbono ou nitrogênio.  $\Delta$  representa um tempo de espera entre os pulsos. Barras finas e largas representam pulsos de 90° e 180°, respectivamente.

Novamente a amostra de sacarose 20 mM foi utilizada para os testes de supressão. Os resultados são mostrados na figura 4. 26.

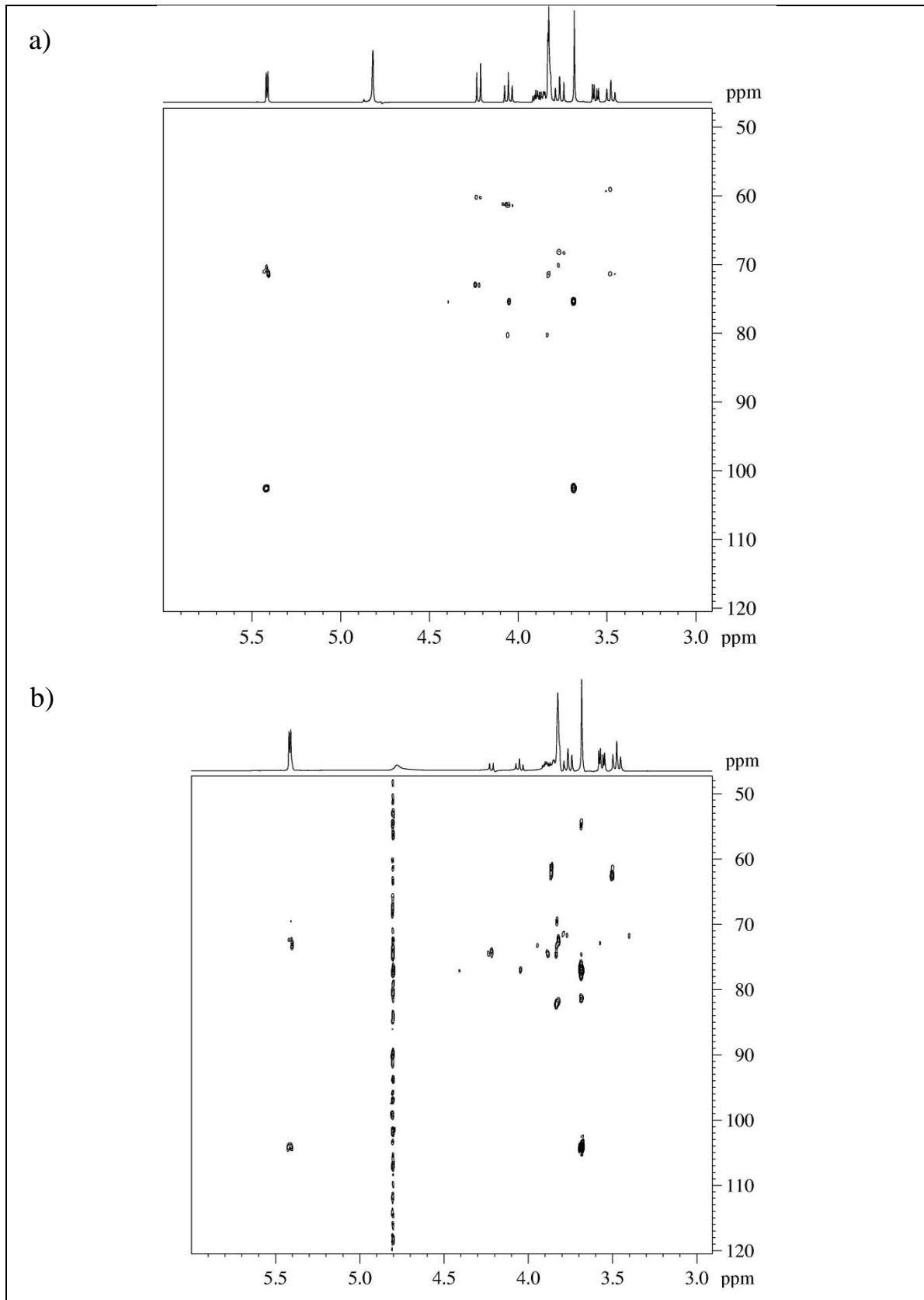


FIGURA 4. 26- Mapa de correlação HMBC para amostras de sacarose 20 mM: a) Utilizando-se da pré-saturação e b) do trem de pulsos CWFP-AF O tempo total de ambos os experimentos foi de 5h.

Embora um sinal residual da água persista no espectro quando se utiliza do trem de pulsos CWFP-AF, o sinal do solvente é bastante atenuado. Além disso, praticamente todas as correlações visíveis no espectro quando se utiliza a pré-saturação também são mostradas quando se utiliza do método CWFP-AF. Assim, por exemplo, as correlações entre os carbonos C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> ou C<sub>2</sub>' e H<sub>1</sub> ( $\delta = 5.4\text{ppm}$ ) são facilmente identificadas. A figura 4. 27 ilustra algumas destas correlações.

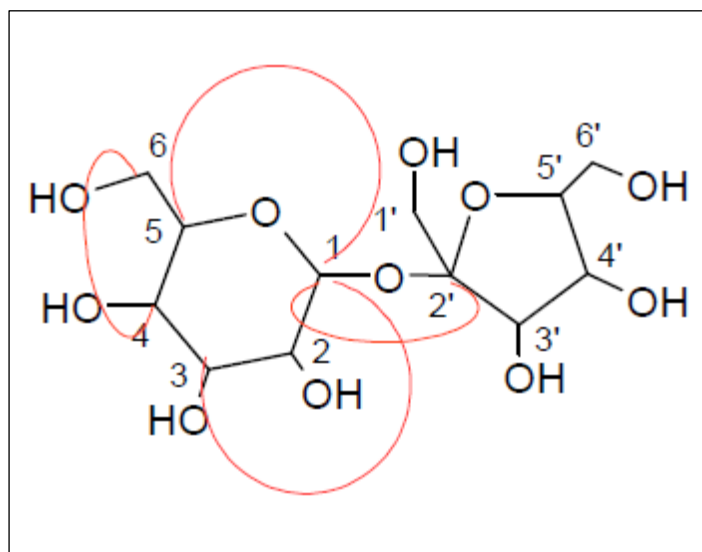


FIGURA 4. 27- Estrutura da sacarose mostrando algumas das correlações a longa distância entre  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , obtidas através do HMBC.

Considerando o potencial do método CWFP para supressão em experimentos bidimensionais, o trem de pulsos CWFP-AF pode ser aplicado a outros experimentos 2D em que a supressão de sinais também é necessária.

Uma desvantagem em aplicar o trem de pulsos CWFP em experimentos deste tipo é a necessidade de um número maior de aquisições para que se complete a alternância de fases entre os pulsos e deste modo o sinal indesejado possa ser removido. Assim, por exemplo, quando se utiliza de gradientes para remoção do sinal do solvente, um número superior de aquisições é possível e conseqüentemente, uma relação S/N maior pode ser obtida.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Através deste trabalho, foi demonstrada a eficiência do método de Precessão Livre de Onda Contínua (CWFP) para supressão de sinal (s) de solvente(s). Os resultados mostraram que a largura e o intervalo de tempo entre os pulsos são parâmetros importantes para uma supressão efetiva. Além disso, a adição da alternância de fases entre os pulsos permitiu corrigir as anomalias de fases que ocorrem no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  quando se utiliza da sequência convencional. Mesmo assim, perdas consideráveis ocorrem para aqueles sinais que ressonam muito próximo do sinal suprimido.

No tocante aos testes de prótons trocáveis, o método CWFP-AF mostrou-se mais eficaz frente à sequência que se utiliza da pré-saturação por conservar melhor a intensidade dos sinais que sofrem processo de troca com o solvente. Para os testes de supressão de mais de um sinal, foi demonstrado que a remoção de duas ressonâncias no espectro é possível e melhores resultados podem ser obtidos quando a frequência de defasagem é mantida fixa no sinal de maior intensidade, pois nesta situação a supressão de ambos os sinais possibilitou um maior aumento no ganho dos sinais do soluto.

Em relação aos estudos *in natura*, a correlação linear entre o sinal CWFP e a concentração da sacarose, permitiu estimar o teor deste açúcar em várias amostras diferentes de uvas e os resultados são condizentes com aqueles determinados através do método Brix. Além disso, a inserção do trem de pulsos CWFP-AF em experimentos 2D demonstrou o potencial da Precessão Livre de Onda Contínua para supressão em estudos desta natureza. Os resultados obtidos são equivalentes àqueles adquiridos quando se utiliza da pré-saturação para remover o sinal do solvente.

Desta forma, uma nova metodologia para supressão de sinais de solvente e de fácil implementação foi introduzida no laboratório de RMN do

departamento de Química da UFSCar, o que representa mais uma alternativa para estudos em que a remoção de sinais se torna necessária.

Considerando os resultados obtidos, em especial a supressão em RMN 2D, a perspectiva é estender a aplicação do método CWFP-AF a outros experimentos bidimensionais que necessitam da supressão de sinais de solvente como NOESY, TOCSY e HSQC.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JACOBSEN, N. E. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. New Jersey, Wiley, 2007. p. 1
2. BLOCH, F.; HANSEN, W. & PACKARD, M. "The nuclear induction experiment" *Phys. Rev.*, **70**: 474, 1946.
3. PURCELL, E.; TORREY, H. & POUND, R. "Resonance absorption by nuclear magnetic moment in a solid". *Phys. Rev.*, **69**: 37, 1946
4. AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUZA, A. A. & ENGELSBERG, M. "Continuous wave free precession practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements". *Anal. Chim. Acta*, **478**: 313, 2003.
5. SILVERTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. & KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro, LTC, 2007. p.133.
6. RITOTA, M.; MARINI, F.; SEQUI, P. & VALENTINI, M. "Metabolomics characterization of italian sweet pepper (*Capsicum annum L.*) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis". *J. Agric. F. Chem.*, **58**: 9675, 2010.
7. SHULMAN, R. G. & ROTMAN, D. L. *Metabolism by in vivo NMR*, Chichester, Wiley, 2005. p. 225
8. ABRAGAM, A. *Principles of nuclear magnetism*. Oxford, Oxford University Press, 1983, p. 75
9. FURIHATA, K.; SHIMOTAKAHARA, S.; SHIBUSAWA, Y & TASHIRO, M. "Application of WET sequence for the detection of ligand signals resonating close to water". *Mag. Reson. Chem.*, **47**: 971, 2009.
10. ZHENG, G. & PRICE, W. S. "Solvent signal suppression in NMR". *Prog. Nucl Magn. Reson. Spectrosc.*, **56**: 267, 2010.
11. CORON, A.; VANHAMME, L.; ANTONIE, J.P.; HECKE P. V. & HUFFEL, S. V. "The filtering approach to solvent peak suppression in MRS: a critical review". *J. Magn. Reson.*, **152**: 26, 2001.
12. PRICE, W. "Water suppression in nmr spectroscopy". *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **38**, 290, 1999.

13. RULE, G. S. & HITCHENS, T. K. *Fundamentals of protein NMR spectroscopy*. Dordrecht, Springer, 2005. p. 317
14. MO, H. & RAFTERY, D. "Pre-SAT180, a simple and effective method for residual water suppression". *J. Magn. Reson.*, **175**: 1, 2005.
15. SIMPSON, A. J. & BROWN, S. "Purge NMR: effective and easy solvent suppression". *J. Magn. Reson.*, **175**: 340, 2005.
16. CLARIDGE, T. D. W. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Oxford, Pergamon, 2009, p. 356
17. PLATEAU, P. & GUERON, M. "Exchangeable proton NMR without baseline distortion, using new strong-pulses sequences". *J. Am. Chem. Soc.*, **104**: 7310, 1982.
18. STONEHOUSE, J.; SHAW, G. L. & KEELER, J. "Improving solvent suppression in jump-return noesy experiments". *J. biom. NMR*, **4**: 799, 1994.
19. LEVITT, M. H. & ROBERTS, M. F. "Solvent signal suppression without phase distortion in High-Resolution NMR". *J. Magn. Reson.*, **71**, 576, 1987.
20. LOUIS-JOSEP, A.; ABERGEL, D; LEBARS, I. & LALLEMAND, J. Y. "Enhancement of water suppression by radiation damping-based manipulation of residual water in jump and return nmr experiments". *Chem. Phys. Lett.*, **337**: 92, 2001.
21. KEELER, J. *Understanding NMR spectroscopy*. Cambridge, Wiley, 2003. p. 145
22. BAUER, C.; FREEMAN, R.; FRENKIEL, T. & SHAKA, A. J. "Gaussian Pulses". *J. Magn. Reson.*, **58**: 442, 1984.
23. SMALLCOMBE, S. H.; PATT, S. L. & KEIFER, P. A. "Wet Solvent Suppression and its applications to LC NMR and High-Resolution NMR Spectroscopy". *J. Magn. Reson.*, **117**(a): 295, 1995.
24. DALVIT, C. & BÖHLEN, J. M. "Multiple-solvent suppression in Double-quantum NMR experiments with magic angle pulse field gradients". *Magn. Reson. Chem.*, **34**: 829, 1996.
25. AZEREDO, RBV.; COLNAGO, L. A. & ENGELBERG, M. "Quantitative analysis using Steady-State Free Precession nuclear magnetic resonance". *Anal Chem.*, **72**(11), 2401, 2000.

26. AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A. & ENGELSBERG, M. "Flow sensitivity and coherence in Steady State Free Spin Precession". *Phys. Rev.*, **6401**(1), 6309, 2001.
27. COLNAGO, L.A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A.A. & BARBOSA, L.L. "High throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR". *Anal. Chem.*, **79**(3), 1271, 2007.
28. VENÂNCIO, T.; AZEREDO, R. B. V.; ENGELSBERG, M. & COLNAGO, L.A. "Water suppression in high resolution  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy Using Continuous Wave Free Precession Sequence". *An. Magn. Reson.*, **2**(3), 122, 2003.
29. SCHEFFLER, K. "A pictorial description of steady-state in rapid magnetic resonance imaging". *Conc. Magn. Reson.*, **11**: 291, 1999.
30. CARR, H. Y. "Steady state free precession in nuclear magnetic resonance". *Phys. Rev.*, **112** (5): 1693, 1958.
31. FREEMAN, R. & HILL, H. D. W. "Phase and intensity anomalies in Fourier transform NMR". *J. Magn. Reson.*, **4**: 366, 1971.
32. HAHN, E. L.; "Spin echoes". *Phys. Rev.*, **80** (5): 580, 1950.
33. AZEREDO, R. B. V. *Espectroscopia de RMN CWFP*. São Carlos, Programa de pós-Graduação em Físico-Química - USP, 2004. Tese de Doutorado, 85p.
34. VENÂNCIO, T.; ENGELBERG, M; AZEREDO, R. B. V.; ALEM, N. E. R. & COLNAGO, L. A. "Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free experiment". *J. Magn. Reson.*, **173**: 34, 2005.
35. VENÂNCIO, T.; ENGELBERG, M; AZEREDO, R. B. V. & COLNAGO, L. A. "Thermal diffusivity and nuclear spin relaxation. A continuous wave free precession NMR study". *J. Magn. Reson.*, **181**: 29, 2006.
36. ERNEST, R. R. & ANDERSON, W. A. "Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance". *Rev. Scient. Instrum.*, **37**(1): 93, 1966.
37. KRONENBITTER, J. & SCHWENK, A. "New technique for measuring relaxation-times  $T_1$  and  $T_2$  and equilibrium magnetization  $M_0$  of slowly relaxing systems with weak NMR signals". *J. Magn. Reson.*, **25**: 147, 1977.

38. DHARMAKUMAR, R. & WRIGHT, G. A. "Understanding steady state free precession: a geometric perspective". *Conc. Magn. Reson. Part A*, **26a** (1): 1, 2005.
39. SCHWENK, A. "NMR pulse technique high sensitivity for slowly relaxing systems". *J. Magn. Reson.* **5**:376, 1971.
40. SCHWENK, A. "Steady-state techniques for low sensitivity and slowly relaxing nuclei". *J. Magn. Reson.* **17**: 69, 1985.
41. SANTOS, P. M.; SOUZA, A. A. & COLNAGO, L. A. "Supressão das anomalias de fase e batimentos laterais em espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos com a sequência de Precessão Livre no Estado Estacionário". *Quím. Nova*, **33**(4): 954, 2010.
42. RUDAKOV, T. N.; MIKHALTSEVICH, V. T. & SELCHIKHIN, O. P. "The use of multi-pulse Nuclear Quadrupole Resonance Techniques for The detection of explosives containing RDX". *J. Phys. D: Appl. Phys.* **30**(9): 1377, 1997.
43. RUDAKOV, T. N. & BELIAKOV, A. V. "Modifications of the Steady-State free-Precession, sequence for detection of pure nuclear quadrupole resonance". *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **31**(9): 1251, 1998.
44. RUDAKOV, T. N. & MIKHALTSEVICH, V. T. "Steady-State Free Precession in nitrogen-14 Quadrupolar spin-system with axially symmetric electric field gradient tensor". *Chem. Phys. Lett.*, **324**: 69, 2000.
45. RUDAKOV, T. N. & MIKHALTSEVICH, V. T. "Multiple NQR Spin Echoes in phase cycled pulse experiments". *Phys. Lett. A*, **309**: 465, 2003.
46. RUDAKOV, T. N.; MIKHALTSEVICH, V. T. & FLEXMAN, J. H. "Modified Steady-State Free Precession Pulse Sequences for the detection of pure nuclear quadrupole resonance". *Solid State Nuc. Magn. Reson.*, **25**: 94, 2004.
47. RUDAKOV, T. N.; MIKHALTSEVICH, V. T.; FLEXMAN, J. H.; HAYES, P. A. & CHISHOLM, W. P. "Modified Multipulse Tehnique for the effective detection of Pure Nuclear Quadrupole Resonance". *Appl. Magn. Reson.*, **25**: 467, 2004.
48. MARIGHETO, N.; WRIGHT, K. & HILLS, B. P. "NMR protocol On-line Brix Determination". *Appl. Magn. Reson.*, **30**: 13, 2006.

49. BANGERTER, N.K.; HARGREAVES, B.A.; VASANAWALA, S.S.; PAULY, J.P.; GOLD, G.E. & NISHIMURA, D.G. "Analysis of Multiple-Acquisition SSFP". *Magn. Reson. Med.*, **51**: 1038, 2004.
50. <c:/Bruker/TOPSPIN/prog/.../mc.html> acessado em 25/06/2011.
51. VENÂNCIO, T. *Novas aplicações da precessão livre em onda contínua em Ressonância Magnética Nuclear*. São Carlos, Programa de pós-Graduação em Físico-Química - USP, 2006. Tese de Doutorado, 152p.
52. BAX, A. D. "A spacial selective composite 90° radiofrequency pulse". *J. Magn. Reson.*, **65**: 142, 1985.
53. HURD, R. E.; GURR, D. & SAILASUTA, N. "Proton spectroscopy without water suppression: the oversampled J-resolved experiment". *Magn. Reson. Med.*, **40**: 343, 1998.
54. VILLEGAS, D. L.; KIMURA, H.; TUNLAYADECHANONT, S. & LENKINSKI, R. E. "High spatial resolution MRI and proton MRS of human frontal cortex". *NMR Biomed.*, **9**: 297, 1996.
55. MARTINO, M. M & HOLZGRABE, U. "NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis". *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **55**: 1, 2005.