Universidade de São Paulo Instituto de Física

Quantificação de Lipoproteínas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Antônio Neves da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Prof. Dr. Said Rahnamaye Rabbani (IF-USP/Orientador) Prof. Dr. Tito José Bonagamba (IFSC-USP) Prof. Dr. Sadao Isotani (IF-USP)

> São Paulo -2008-

Dedico este trabalho a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Said Rahnamaye Rabbani, meu orientador, pelo apoio, pela orientação e confiança depositada em mim.

Ao Dr. Antônio Carlos Bloise pela colaboração inestimável para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Hernan Joel Cervantes Rodrigues pelas colaborações teóricas e esclarecimento de dúvidas, e à Aurea Beatriz pelas discussões e auxílio na preparação das amostras.

A Prfa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla da Faculdade de Farmácia da USP por ceder as amostras e as instalações de seu laboratório para a preparação das mesmas.

À Prfa. Dra. Marie-Anne Van Sluys do Instituto de Biociências da USP por fornecer as instalações de seu laboratório para concentração das amostras.

Aos colegas do grupo de Ressonância Magnética Mateus e Silvana pelo apoio e ajuda sempre quando precisei.

Ao Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas pelas discussões.

Ao técnico Maurício do laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da USP por realizar a análise lipídica das amostras.

A Tanize Faulin, Débora Pacheco e Andreia Elisa alunas da Faculdade de Farmácia pela grande ajuda na preparação das amostras e pelo esclarecimento de dúvidas.

Ao Laboratório Fleury pelas sugestões e apoio para a preparação das amostras.

Aos funcionários da Oficina Mecânica do IFUSP.

Aos técnicos Marcelino Alves e Rubens D. Forcemo do DFGE-IFUSP.

Aos funcionários do Departamento de Física Geral - IFUSP.

A Viviane Morcelle, Ney Sodré e Leandro Andrade pelas contribuições técnicas.

À minha família.

Ao Conjunto Residêncial da Universidade de São Paulo (CRUSP) pela moradia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Lista de Figuras

2.1	Representação gráfica da quantização da componente z do mo-	
	mento angular de spin nuclear para $I = 1/2$	21
2.2	Diagrama de níveis energéticos para núcleos de spin $I = 1/2$.	
	O nível mais energético corresponde ao spin alinhado antipa-	
	ralelo ao campo B_0 e o nível de menor energia ao spin alinhado	
	paralelo ao campo	22
2.3	Magnetização resultante do excesso de núlceos no estado de	
	spin α $(I = 1/2)$	24
2.4	Representação esquemática de um núcleo com momento magnétic	0
	$\vec{\mu}$ em um campo magnético \vec{B}_0	27
2.5	Representação de \vec{B}_0 e \vec{B}_1 no referencial girante	29
2.6	Movimento da magnetização em torno do campo efetivo	29
2.7	Na ressonância a magnetização gira em torno de B_1	30
2.8	Movimento da magnetização M durante a aplicação de um	
	pulso de RF, em ressonância, no sistema girante. a) Pulso de	
	90° na direção x: O campo B_{1x} é aplicado durante o tempo	
	necessário para que a magnetização inicial M_z gire ao redor	
	do eixo x até a direção y. b) Pulso de 180^0 na direção y: O	
	campo B_{1y} é aplicado durante o tempo necessário para que a	
	magnetização inicial M_z gire ao redor do eixo y até a direção	
	-z passando pela direção -x	31
2.9	Reconstrução da magnetização longitudinal M_z pela ação da	
	relaxação spin-rede. a) O vetor magnetização total M é nulo.	
	Os momentos magnéticos nucleares se encontram no plano xy	
	defasados. b) e c) Cada momento magnético se alinha com	
	o campo B_0 construindo a magnetização M_z . Devido à de-	
	fasagem não existe magnetização M_{xy} . d) A magnetização	
	alcança o estado de equilíbrio no qual $M_z = M_0$	33

2.10	Estado de coerência parcial dos momentos magnéticos dos	
	spins devido a ação de um campo de RF (esquerda), projeção	
	no plano xy (meio) e vetor soma das componentes no plano	
	xy dando origem à magnetização transversal	33
2.11	Extinção da magnetização transversal pela ação da relaxação	
	spin-spin. a) A magnetização se encontra em repouso alinhada	
	com o campo externo. b) Após a aplicação de um pulso de	
	90° a magnetização é colocada no plano transversal. c) Devi-	
	do às interações entre os spins ou inomogeneidade do campo	
	externo as freqüências de precessão de Larmor de cada um dos	
	momentos magnéticos nucleares serão ligeiramente diferentes.	
	d) Com a evolução do processo os efeitos de defasagem se in-	
	tensificam o suficiente para destruir a magnetização transversal.	34
2.12	A precessão da magnetização transversa induz a formação de	
	uma corrente elétrica oscilante na bobina.	36
2.13	Deteccão simultânea de M_r e M_u	37
2.14	Partes real (R) e imaginária (I) do sinal no domínio de freqüência.	38
2.15	Componente de absorção com respectiva largura à meia altura.	39
3.1	Representação de um dos primeiros espectros de ¹ H do etanol	
	obtido experimentalmente mostrando o desdobramento das	
	linhas de ressonância (estrutura fina) devido ao deslocamento	
	químico	41
3.2	Origem do Deslocamento Químico: O movimento dos elétrons	
	gera um campo B' que se opõe ao campo externo B_0	42
3.3	devido à diminuição do campo total sentido pelo núcleo a	
	diferença entre os níveis de energia (aqui em uma escala ampli-	
	ada) para um núcleo de spin $1/2$ também diminui, modificando	
	a freqüência de ressonância.	44
3.4	Espectro mostrando os grupos de ressonância de ¹ H comuns	
	em moléculas biológicas.	45
3.5	Representação esquemática da interação spin-spin através das	
	ligações químicas.	46
3.6	Espectro de ${}^{1}H$ do etanol mostrando o desdobramento das	
	linhas de ressonância devido ao acoplamento escalar	47

3.7	Diagrama de níveis energéticos para um sistema de dois núcleos	
	A e X de spin $1/2$ (escala ampliada). a) Níveis energéticos e	
	transições na ausência de acoplamento escalar b) Modificação	
	nos níveis energéticos sob efeito do acoplamento escalar. W_1	
	indica transições entre os níveis com mudança no estado de	
	somente un spin. Transições com mudanças nos estados de	
	ambos os spins também são possíveis $(W_0 \in W_2)$	48
3.8	Exemplo de troca química na molécula de N,N-dimetilformamida.	53
3.9	Seqüência de pulsos de inversão-recuperação usada para medir	
	o tempo de relaxação T_1	54
3.10	Medidas dos tempos de relaxação longitudinal e transversal da	
	borracha natural.	55
3.11	Formação do spin eco em um experimento de ecos de spin(A),	
	os spins são excitados(B) e depois eles defasam no plano transverso	
	durante a primeira metade do tempo de eco(C). Um pulso de	
	180° rotaciona os vetores magnetização ao longo do eixo v(D)	
	e em seguida os spins se refocalizam na segunda metade do	
	tempo de eco. No tempo de eco os spins estam refocalizados e	
	o eco de spin é formado(E). Obviamente o sinal decaiu devido	
	à relaxaxação por T_2	57
3.12	Rotação de um vetor após um tempo Δt	58
3.13	Rotação da magnetização no plano zv.	60
3.14	Um experimento unidimensional simples consistindo de um	
0.11	pulso de 90^0	60
	Factor and contract the second s	
4.1	Desenvolvimento da placa de aterosclerose	63
4.2	Oclusão na luz do vaso	65
4.3	Estrutura química dos lipídios encontrados nas lipoproteínas.	
	1 - Colesterol, 2 - Colesterol esterificado (CE), 3 - Triglicéride	
	(TG), 4 - Fosfolipídio (PL)	69
4.4	Representação esquemática de uma lipoproteína. O núcleo a-	
	polar possui colesterol esterificado e TG. A superfície é consti-	
	tuída de fosfolipídios com a extremidade polar apontando para	
	a superfície. Junto com eles estão uma ou mais apolipoproteínas	
	e colesterol livre. Magneticamente o núcleo é isotrópico en-	
	quanto a superfície é anisotrópica	70
4.5	Figura mostrando a relação entre o tamanho e a densidade das	
	partículas e a proporção de lipídios nas lipoproteínas	71
4.6	Espectro de RMN do plasma sanguíneo[23]. 1 - prótons dos	
	grupos metil terminais - CH_3 , 2 - prótons dos grupos metilenos	
	$-CH_2.\ldots$	76

4.7 4.8	Modelo esquemático introduzido para uma lipoproteína Freqüências experimentais (círculos) dos grupos $CH_2 \ e \ CH_3$ dos lipídios nas lipoproteínas em função do raio da lipoproteína R_2 . As curvas sólidas representam um ajuste para os pontos	77
4.9	usando a equação 4.1	78
	eletroforese	79
5.1	Figura esquemática de um magneto	81
5.2	Vista do <i>spinner</i> com o tubo porta-amostra dentro do probe	82
5.3	Dependência dos campos de <i>shimming</i> ao longo do eixo z	83
5.4	Forma do FID com (esquerda) e sem um bom <i>shimming</i>	83
5.5	Espectrômetro de RMN usado para fazer as medidas	87
5.6	Sequencia de pulsos usada nas primeiras medidas dos espectros	07
	das classes de lipoproteinas.	87
5.7	Sequencia de pulsos usada na segunda etapa de medidas dos	00
50	espectros das classes de incorrotemas.	88
5.0	espectros des classes de lipoproteínas	80
		05
6.1	Espectros de RMN de 13 C de amostras de tecido arterial(carótida).	90
6.2	a) colesterol livre, b) exemplo de ácido gorduros o ${\rm COOH}[{\rm CH}_2]_{21}{\rm CH}_3$	
	, c) ácido gorduroso poliinsaturado (linoleico), d) ácido gorduroso	
	monoinsaturado (oléico).	91
6.3	Primeiros espectros das lipoproteínas e n-propanol obtidos. 1	
.	$- \operatorname{CH}_3, 2 - \operatorname{CH}_2, \dots, \dots,$	94
6.4	Evolução temporal dos espectros das classes de lipoproteínas.	95
6.5	Espectro do plasma humano	96
6.6	Segundo conjunto de espectros das classes de lipoproteinas	07
0.7	obtido junto com o espectro do n-propanol	97
0.7	Espectros do plasma humano com e sem saturação do sinal da	00
6 9	Agua	98
0.0	Ajuste da curva do plasma simulado atraves das curvas das	00
6.0	Espectros som o pico CH, o sincto de curva do plasma simulado 1	99
0.9 6 10	Primeiras medidas relativas aos diferentes tubos	.00 .01
6 11	Segundas medidas relativas aos diferentes tubos	.01 02
6.12	Medidas relativas ao tubo usado na amostra de LDL	03
6.13	Espectros obtidos sob novas condições experimentais 1	.04
-	1 STATE 1 STATE	-

6.14	Espectro de Carbono do plasma humano. O espectro mostra						
	que as linhas concentram-se em uma faixa estreita de desloca-						
	mento químico (20ppm)						
6.15	Terceiro conjunto de espectros das lipoproteínas obtido 106						
6.16	Espectros após normalização e retirada do pico CH_2 107						
6.17	Segundo ajuste da curva do plasma simulado						
6.18	Evolução temporal do terceiro grupo de espectros obtido 110						
6.19	Espectro do plasma contaminado. 1 - Pico surgido devido à						
	presença de uma colônia de bactérias						

Lista de Tabelas

2.1	Propriedades de alguns núcleos em RMN. Os valores de freqüência são em um campo de 9,4T
4.1	Características das principais classes de lipoproteínas no plasma humano. a Componentes da superfície e b Componentes do
	núcleo
4.2	Função Metabólica das Lipoproteínas (LP) e principais Apolipoproteínas
	(ApoLP) estruturais e de superfície
6.1	Características das amostras
6.2	Razões do grau de saturação e da presença de CE nos grupos
	$1 e 2. \dots $
6.3	Variação nas áreas do TSP
6.4	Análise química das amostras
6.5	Resultados em mmol/L
6.6	Resultados da análise por RMN do plasma simulado. $\ .\ .\ .\ .$ 109

Lista de Abreviações e Acrônimos

ApoLP . . . Apolipoproteína CHD Coronary Heart Disease (Doença Cardiovascular) CT Colesterol Total CE Colesterol Esterificado FEM Força Eletromotriz FID Free Induction Decay (Decaimento Livre da Indução) HDL *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Densidade Alta) IDL Intermediate Density Lipoprotein (Lipoproteína de Densidade Intermediária) LDL Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Densidade Baixa) LPL Lipoproteína Lipase nOe Nuclear Overhauser Effect (Efeito de Overhauser Nuclear) cional de Educação do Colesterol). Produto) PUFA Polyunsaturated Fatty Acid (Ácido Gorduroso Poliinsaturado) PL Phospholipid (Fosfolipídio) RF Radiofreqüência RMN Ressonância Magnética Nuclear RMND Ressonância Magnética Nuclear Dinâmica RT *Room Temperature* (Temperatura Ambiente) TF Transformada de Fourier TG *Triglyceride* (Triglicerídio) TRC Transporte Reverso do Colesterol TSP Ácido Trimetilsililpropiônico UFA Unsaturated Fatty Acid (Ácido Gorduroso Monoinsaturado)

Resumo

A Espectroscopia de RMN é uma técnica poderosa para identificação de compostos químicos e fornece uma maneira não destrutiva para o estudo de placas de aterosclerose permitindo caracterizar os estágios da doença. Ela também oferece uma nova maneira de medir níveis de lipoproteínas no plasma baseando-se nas amplitudes dos sinais espectrais emitidos pelas classes de lipoproteínas de diferentes tamanhos, uma vez que o sinal é proporcional à quantidade de compostos químicos na amostra.

O estudo de placas ateroscleróticas foi feito através da análise dos espectros obtidos das mesmas. Os espectros das amostras mostram a presença de um conjunto de picos intensos na faixa de deslocamentos químicos de 0 a 80ppm (carbonos alifáticos) associados principalmente às moléculas de colesterol. Foi analisado o comportamento das ressonâncias dos ácidos gordurosos monoinsaturados (UFA - Unsaturated Fatty Acid) e poliinsaturados (PUFA -Polyunsaturated Fatty Acid), dos carbonos 19 e 21 do colesterol esterificado (C19,21) e do carbono metileno dos ácidos gordurosos (CH₂)_n.

O estudo da quantificação de lipoproteínas por RMN foi feito objetivandose concretizar a metodologia estabelecida[21] por esta técnica para medir níveis de lipoproteínas no plasma. Foi estabelecido um protocolo de preparação das amostras procurando sempre melhorar a qualidade dos espectros. Com esta mesma finalidade buscou-se a otimização das condições experimentais em todas as análises feitas. O uso do colesterol como alvo para a avaliação do risco de doença cardiovascular possui limitações (a quantidade de colesterol no interior das partículas varia de pessoa para pessoa devido a variações nos níveis de lípídios no interior das partículas e variações no diâmetro das partículas). Medidas de lipídios para substituir lipoproteínas não fornecem resultados precisos pois já se sabe que as lipoproteínas interagem com a parede arterial possuindo importante papel no desenvolvimento da aterosclerose. Uma nova técnica para quantificação de lipoproteínas que explora as diferentes propriedades na Espectroscopia de RMN das lipoproteínas foi proposta. Este método possui ainda as vantagens de ser rápido, barato, eficiente, não requer o uso de reagentes, não requer separação física das partículas e mede tanto as classes quanto as subclasses de lipoproteínas. Neste trabalho foi comprovado a validade da técnica de RMN baseando-se na utilização dos espectros individuais das classes de lipoproteínas (ressonâncias dos grupos metil CH₃) como padrões para ajuste da curva do plasma. No processo de ajuste verificou-se a necessidade da subtração do pico associado aos grupos metilenos (CH_2) . Neste estudo também tentou-se observar alterações nos espectros das lipoproteínas com o passar do tempo devido a efeitos como: oxidação, absorção de água e contaminação das amostras.

Abstract

The Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy is a powerful technique for the identification of chemical compounds and allows a nondestructive way to study atherosclerotic plaques offering a way of characterizing the disease. This is specially important in evaluation of the coronary heart disease. In addition, it offers a new means of measuring lipoprotein levels in plasma, with quantification based on the amplitudes of spectral signals emitted by lipoprotein classes of different size, once the signal is proportional to the amount of chemical compounds in the sample.

The study of atherosclerotic plaques has been done through of spectral analysis of the plaques. The sample spectra show the presence of a set of intense peaks in region of chemical shifts of 0 to 80ppm (aliphatic carbons) associated mainly with the molecules of Cholesterol. It has been analyzed the behavior of the resonances of unsaturated fatty acid (UFA) and polyun-saturated fatty acid, of carbons 19 and 21 of cholesterol ester (C19,21) and of methylene carbon of fatty acids $(CH_2)_n$ as well.

The study of lipoprotein quantification by NMR has been done with the purpose of supporting the established methodology [21] by this technique to measure lipoprotein levels in plasma. A protocol of sample preparation has been established always trying to gain better quality in the spectra. With the same purpose the optimization of the experimental conditions has been made in all analysis. The use of Cholesterol as a target to evaluation of coronary heart disease has limitations (the amount of cholesterol inside particles changes from person to person because the variation in levels of lipids inside particles and variation in diameter of particles). The act of measuring lipids as a way of replacing lipoproteins gives no exact results once we know that lipoproteins interchange with the arterial wall and have important function in atherosclerosis progress. A new technique for the quantification of lipoproteins has been established. This technique works with the different properties in NMR Spectroscopy of the lipoproteins with different sizes. This method has still the advantages of being fast, cheap, efficient, doesn't require no use of reagents, requires no particles physical separation and measures classes and subclasses of lipoproteins as well. It has been demonstrated here that the base of the method of quantification - curve-fitting (spectral deconvolution) of the plasma methyl lipid resonance, the amplitude and shape of which depend directly on the amplitudes of the superimposed methyl resonance of the lipoproteins - is effective. It has been found the necessity of subtracting the peak associated with methylene group (CH_2) . The time evolution of the spectra has been also studied, some effects like sample oxidation, water absorption and sample contamination could affect the resonance lines.

Sumário

1	Intr	odução	16
2	Bas	es Físicas da Espectroscopia de RMN	20
	2.1	Spin e Momento Magnético Nuclear	20
	2.2	Descrição Quântica do Spin em um campo estático	22
	2.3	Equação de Movimento dos valores médios e Tratamento Clássico	25
	2.4	Excitação	27
	2.5	Relaxação	31
		2.5.1 Relaxação Longitudinal	32
		2.5.2 Relaxação Transversal	33
	2.6	Equações de Bloch	35
	2.7	Detecção	35
	2.8	Transformada de Fourier	37
3	\mathbf{Esp}	ectroscopia de RMN	40
	3.1	Características Gerais dos Espectros de RMN	41
	3.2	Deslocamento Químico (<i>Chemical Shift</i>)	42
		3.2.1 Proteção Magnética	43
		3.2.2 Medidas de Deslocamento Químico	44
	3.3	Acoplamento de Spins Nucleares	45
		3.3.1 Acoplamento Escalar (<i>J-Coupling</i>)	45
		3.3.2 Espectros de $1^{\underline{a}}$ e $2^{\underline{a}}$ ordem e equivalência de núcleos .	48
	3.4	Dupla Ressonância	50
		3.4.1 Desacoplamento	50
		3.4.2 Efeito de Overhauser Nuclear - nOe	51
	3.5	Processos de Permuta Química	52
		3.5.1 Troca Química e Forma do Espectro	53
	3.6	RMN Unidimensional	53
		3.6.1 Medidas do tempo de Relaxação Longitudinal T_1	54
		3.6.2 Ecos de Spin - Medidas de T_2	56
	3.7	Formalismo do Operador Produto	56

		3.7.1	Evolução do deslocamento químico
		3.7.2	Evolução do acoplamento escalar
		3.7.3	Pulsos de Radiofreqüência
		3.7.4	Um experimento unidimensional simples 60
1	Tin	onnoto	ínac 62
4	LIP	oprote	mas 02
	4.1	Uma a	A Degree A Ateroscierose
		4.1.1	A Doença \ldots 02
		4.1.2	Formação e Evolução da Aterosclerose
	4.0	4.1.3	Espectroscopia de RMN e Ateroscierose
	4.2	Lipidi	os e Doença Cardiovascular $\dots \dots \dots$
	4.3	Defini	ção, Estrutura e Função
		4.3.1	Definição
		4.3.2	Estrutura
		4.3.3	Nomenclatura e Classificação
		4.3.4	Metabolismo das Lipoproteínas
	4.4	Medin	do as Lipoproteínas
		4.4.1	Lipídios e Lipoproteínas
		4.4.2	Limitação dos métodos existentes para medir
			Lipoproteínas
	4.5	Quant	cificação de Lipoproteínas por Espectroscopia de RMN . 75
		4.5.1	Medidas de classes de Lipoproteínas
		4.5.2	Vantagens da análise de Lipoproteínas por RMN 79
5	Pro	codim	onto Exporimontal 80
0	5 1		ento Experimental 80
	0.1	5 1 1	$\bigcirc \text{magneto} \qquad \qquad$
		519	O Inaglieto
		0.1.2	Cistema de shim
		0.1.0	Sistema de $snim \dots 82$
		5.1.4 F 1 F	Sistema de $lock$
	5 0	0.1.0 D	O sistema de transmissao/recepção
	5.2	Prepa	ração das Amostras \ldots 84
		5.2.1	Ultracentrifugação
		5.2.2	Dialise \ldots 85
		5.2.3	Concentração
		5.2.4	Tubo coaxial selado com marcador interno 85
		5.2.5	n-propanol
		5.2.6	Análise Lipídica
	5.3	Medic	las dos Espectros
		5.3.1	Primeiras Medidas
		5.3.2	Segundas Medidas

		5.3.3	Terceiras Medidas	8
		5.3.4	Exportanto os espectros	;9
6	Res	ultado	s e Discussão 9	0
	6.1	Estude	de Placas Ateroscleróticas	0
	6.2	Quant	ificação de Lipoproteínas por RMN 9	3
		6.2.1	PRIMEIRA ANÁLISE)3
		6.2.2	SEGUNDA ANÁLISE	6
		6.2.3	TERCEIRA ANÁLISE	6
7	Cor	nclusõe	s e Perspectivas 11	2

Capítulo 1 Introdução

Em 1938 Rabi e seus colaboradores realizaram experimentos através dos quais observaram pela primeira vez o fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear em um feixe de moléculas de hidrogênio e em janeiro deste ano publicou o artigo que descreve a verificação do fenômeno[1]. Rabi recebeu o prêmio Nobel de Física de 1944 por este experimento.

Em 1945 se detectou Ressonância Magnética Nuclear em amostras líquidas e sólidas. Bloch e seus colegas da Universidade de Stanford, e Purcell e colaboradores da Universidade de Harvard, ambas dos E.U.A.[2] observaram sinais de absorção da água e da parafina, respectivamente, quando procuravam medir momentos magnéticos nucleares com maior precisão. O comitê do Prêmio Nobel reconheceu as descobertas de Bloch e Purcell como simultâneas e independentes, e agraciou ambos com o prêmio Nobel de Física de 1952. Até este estágio RMN era puramente um experimento para se medir momentos magnéticos nucleares. RMN somente se desenvolveu para uma das mais versáteis formas de espectroscopia depois da descoberta de que núcleos dentro de uma mesma molécula absorvem energias em diferentes freqüências de ressonâncias. Este fenômeno denominado deslocamento químico foi primeiramente observado em 1949 por Proctor e Yu, e independentemente por Dickinson[3].

Nas duas primeiras décadas os espectros de RMN eram obtidos em um modo de onda contínuo no qual a intensidade do campo magnético ou do campo de radiofreqüência varriam a região espectral de interesse enquanto o outro era mantido fixo. Em 1966, a técnica de RMN foi revolucionada por Ernst e Anderson[3] que introduziram RMN pulsada em combinação com transformada de Fourier.

Este trabalho visa o emprego da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no estudo de placas ateroscleróticas e principalmente no estudo da **Quantificação de Lipoproteínas Plasmáticas**. Estes dois focos têm como pano de fundo para estudos mais avançados a avaliação do risco de doença cardiovascular.

No primeiro caso espectros de algumas amostras de placas (obtidos anteriormente a este trabalho pelo grupo de pesquisa em RMN do IF-USP), classificadas de acordo com a evolução da lesão aterosclerótica, foram obtidos e através deles conseguiu-se estudar modificações nos constituíntes das placas de acordo com o progresso da doença. Sabe-se que com a evolução da doença mais propícia a ruptura a placa de aterosclerose fica e conseqüentemente aumenta-se o risco de um infarto ou outros danos cardiovasculares.

No segundo caso o estudo baseou-se principlamente no emprego da metodologia para quantificação de lipoproteínas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. A quantificação estabelecida pela técnica de RMN tem como ojetivo principal estabelecer um método mais preciso, rápido e eficiente para avaliação do risco de doença cardiovascular. Neste estudo também explorou-se os efeitos nos espectros das lipoproteínas com o passar do tempo devido à oxidação, absorção de água e contaminação das amostras.

A apresentação da base teórica e dos resultados experimentais está organizada em 6 capítulos com os seguintes conteúdos:

O capítulo 2 explora a física por trás do experimento de Ressonância Magnética descrevendo de forma gradativa os fenômenos envolvidos durante um experimento de RMN. São discutidas as propriedades de spin e momento magnético nuclear, as interações Zeeman e de Radiofreqüência, a condição de ressonância, pulsos de Radiofreqüência; além de serem explorados os fenômenos de relaxação (Longitudinal e Transversal), que ocorrem durante o experimento, o processo de detecção do sinal de RMN e a relação da intensidade do sinal com a concentração de núcleos da amostra (conceito importante para o trabalho).

O capítulo 3 apresenta a teoria necessária para o entendimento da técnica de RMN empregada no trabalho: a Espectroscopia. Descreve os dois principais fenômenos observados em RMN de líquidos envolvendo interações entre os spins: deslocamento químico e acoplamento escalar. Discorre também sobre outros fenômenos relacionados à espectroscopia como dupla ressonância e processos de permuta química. Há ainda uma exploração sobre RMN unidimensional e medidas dos tempos de relaxação $T_1 e T_2$. No final do capítulo há uma breve explicação sobre o Formalismo do Operador Produto usado para explicar o comportamento de um sistema de spins sujeito a uma seqüência de pulsos.

O capítulo 4 trata dos alvos de estudo do trabalho: a aterosclerose e principalmente as lipoproteínas. Aborda-se sobre a formação e evolução da aterosclerose e o emprego da Espectroscopia de RMN em estudo de placas ateroscleróticas. Com relação às lipoproteínas discute-se definição, estru-

tura, função e metabolismo. Com grande ênfase aborda-se a quantificação de lipoproteínas por espectroscopia de RMN evidenciando as propriedades espectroscópicas das lipoproteínas que possibilitam a quantificação.

O capítulo 5 trata do procedimento experimental usado para o estudo das lipoproteínas por RMN. Inicialmente discorre sobre o aparelho de RMN usado, o espectrômetro, em seguida descreve gradativamente todo o processo de preparação das amostras de lipoproteínas e por fim explicita os aspectos experimentais envolvidos nas análises feitas para as medidas dos espectros das lipoproteínas.

O capítulo 6 apresenta os resultados do trabalho. São mostrados os resultados para as razões entre os picos de ressonância UFA/PUFA, PUFA/ $(CH_2)_n$, UFA/ $(CH_2)_n$ e C19,21/ $(CH_2)_n$ nos espectros de Carbono das placas de aterosclerose obtidos.

No estudo da quantificação são mostradas todas as análises feitas seguindo um roteiro de preparação de amostras e aquisição de espectros. Em todas as etapas estão apresentados os espectros obtidos evidenciando as dificuldades e os aspectos a serem melhorados. Clinicamente o risco de doença cardiovascular tem sido medido através do colesterol. Freqüentemente nos deparamos com as expressões colesterol "mau" (LDL-C) e colesterol "bom" (HDL), mas temos que entender que são as partículas de LDL e HDL que, na verdade, são funcionalmente más e boas e o colestrol contido nelas serve apenas como uma medida indireta para as concentrações de lipoproteínas. O uso do colesterol para a avaliação do risco de doença cardiovascular possui a limitação de que não é levado em conta o fato de que a quantidade de colesterol por partícula varia de pessoa para pessoa devido a diferenças nas quantidades de colesterol esterificado e triglicérides no interior da partícula bem como também devido a diferenças no diâmetro da partícula. O uso do colesterol como alvo para a avaliação do risco de doença cardiovascular tem sido amparado pelo extensivo conjunto de dados que mostram uma intensa relação entre níveis anormais de lipídios com aterosclerose e eventos cardiovasculares bem como pela dificuldade que se tem de medir lipoproteínas diretamente. No entanto esta dificuldade foi superada com uma nova técnica para quantificar lipoproteínas que usa os sinais de RMN emitidos pelas lipoproteínas de diferentes tamanhos como base para sua quantificação. Neste método não existe a necessidade de separação física das partículas (principal vantagem) e pode-se medir tanto as classes quanto as subclasses de lipoproteínas. Não existe também a necessidade de utilizar qualquer espécie de reagentes e possui vantagens com relação a precisão, custo e tempo quando comparado a outros métodos existentes como Ultracentrifugação, Cromatografia e Eletroforese. Neste trabalho foi estabelecido uma metodologia para quantificação e a validade do método de quantificação por RMN foi confirmada como pode ser

verificado através do ajuste obtido para a curva do plasma simulado através das curvas individuais das classes de lipoproteínas.

No capítulo 7 são apresentadas as considerações finais e perspectivas deste trabalho.

Capítulo 2

Bases Físicas da Espectroscopia de RMN

Atomos e moléculas são extremamente pequenos para serem estudados e observados diretamente. Precisa-se, portanto, de um espião capaz de transmitir informações químicas, estruturais e dinâmicas de átomos e moléculas sem modificar significativamente suas propriedades. Este espião trata-se do núcleo cuja propriedade magnética forma a base para o fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear, um dos fenômenos mais importantes em magnetismo. Este fenômeno é observado em sistemas magnéticos que possuem ambos momento magnético e angular. O termo ressonância implica que existe uma sintonia entre as freqüências naturais do sistema magnético, que neste caso corresponde à freqüência de precessão dos momentos magnéticos em um campo magnético externo estático e a freqüência do campo magnético oscilante. Este fenômeno foi primeiro observado em 1945 e desde então tornouse uma importante ferramenta em Física, Química e outras ciências.

2.1 Spin e Momento Magnético Nuclear

A existência de núcleos atômicos com momento angular foi sugerido pela primeira vez por Pauli, em 1924, para explicar a chamada estrutura hiperfina dos espectros atômicos [2]. Um núcleo consiste de um sistema com muitas partículas acopladas de tal forma que em qualquer estado dado o núcleo possui um momento magnético total $\vec{\mu}$ e um momento angular total \vec{I} . \vec{I} é o momento angular de spin que pode ser tomado como paralelo ao momento magnético, e assim podemos escrever

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \tag{2.1}$$

onde γ é um escalar chamado de "razão giromagnética" constante para cada núcleo, sendo positiva para a maioria dos núcleos com interesse em RMN. Para qualquer dado estado de um núcleo, o conhecimento da função de onda permitiria, em princípio, calcular ambos $\vec{\mu} \in \vec{I}$. Em teoria quântica $\vec{\mu} \in \vec{I}$ são tratados como operadores vetoriais. De acordo com um dos postulados da Mecânica Quântica, o momento angular do núcleo é quantizado e assume somente certos valores discretos. Esta quantização implica na quantização da energia da partícula.

$$|\vec{I}| = [I(I+1)]^{1/2} h/2\pi$$
(2.2)

Nesta expressão, h é a constante de Planck. A unidade de \vec{I} é a de h/2 π : J rad⁻¹s. I é o número quântico de spin nuclear que pode ser inteiro, semiinteiro ou zero. Elétrons, prótons e neutrons também possuem momento angular de spin, caracterizado pelo número quântico I=1/2. Além do módulo a direção do momento angular de spin também é quantizada e é especificada por um segundo número quântico direcional m. Escolhida uma direção z, somente determinadas componentes I_z do momento angular são permitidas:

$$I_z = \left(\frac{h}{2\pi}\right)m\tag{2.3}$$

com m = -I, -I + 1, ..., +I. A cada 2I + 1 valores de m corresponde um estado de spin nuclear descrito por uma função de onda $|\psi\rangle$ denominada autofunção do operador I_z . Para núcleos com I = 1/2 têm-se duas autofunções normalmente designadas $|\alpha\rangle$ (m = 1/2) e $|\beta\rangle$ (m = -1/2). O valor esperado do operador I_z nestes dois estados será:

$$\langle \alpha | I_z | \alpha \rangle = +1/2 \left(\frac{h}{2\pi} \right) \qquad \langle \beta | I_z | \beta \rangle = -1/2 \left(\frac{h}{2\pi} \right) \qquad (2.4)$$



Figura 2.1: Representação gráfica da quantização da componente z do momento angular de spin nuclear para I = 1/2.

2.2 Descrição Quântica do Spin em um campo estático

Na ausência de um campo magnético externo, os dois estados de spin α e β estão degenerados. Na presença de um campo magnético estático, porém, um estado é mais estável do que o outro. Isto resulta da interação entre o campo e o momento magnético associado ao spin nuclear (Interação Zeeman) dada por $-\vec{\mu}.\vec{B}_0$. Temos portanto para o Hamiltoniano:

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu}.\vec{B}_0 \tag{2.5}$$

Tomando o campo \vec{B}_0 ao longo da direção z, ou seja $\vec{B}_0 = B_0 \vec{k}$, temos

$$\mathcal{H} = -\mu_z B_0 \tag{2.6}$$

$$\mathcal{H} = -\gamma B_0 I_z$$

Os autovalores deste Hamiltoniano são simples, sendo somente múltiplos (γB_0) dos autovalores do operador I_z (Equação 2.3). Portanto as energias permitidas são:

$$E = -\gamma \hbar B_0 m \qquad \hbar = \left(\frac{h}{2\pi}\right) \tag{2.7}$$



Figura 2.2: Diagrama de níveis energéticos para núcleos de spin I = 1/2. O nível mais energético corresponde ao spin alinhado antiparalelo ao campo B_0 e o nível de menor energia ao spin alinhado paralelo ao campo.

Para um núcleo de spin I = 1/2 a diferença de energia entre os dois estados possíveis é dada por (Figura 2.2)

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \tag{2.8}$$

O fenômeno de ressonância em RMN é alcançado aplicando um campo magnético oscilante perpendicular a B_0 com uma freqüência ω_0 , tal que a energia do fóton da radiação é igual a energia magnética dada pela equação 2.8. A energia do fóton da onda eletromagnética é dada por $\hbar\omega_0$, assim a condição de ressonância capaz de estimular as transições entre os níveis energéticos para núcleos com relação giromagnética γ é então

$$\omega_0 = \gamma B_0 \tag{2.9}$$

Alguns valores das freqüências de ressonância (em um campo de 9,4T), de alguns núcleos estudados em RMN encontram-se na tabela 1.1. Levando em conta os campos magnéticos utilizados em RMN - 1,5 a 12T - e os valores de γ da ordem de $10^7 - 10^8 \text{radT}^{-1} \text{ s}^{-1}$, os valores de $\nu_0 = \left(\frac{\omega_0}{2\pi}\right)$ caem na gama das dezenas e centenas de megahertz. As transições de spin nuclear exigem, pois, radiações eletromagnéticas na região das radiofreqüências.

Vamos dar um passo adiante e ver o que acontece se nós temos uma amostra macroscópica na qual observamos a ressonância. Esta contém um "ensemble" de muitos núcleos magnéticos idênticos sujeitos a um campo estático e distribuídos pelos estados de spin de acordo com a lei de distribuição de Boltzmann. Para I = 1/2, a razão das populações de equilíbrio para os estados de spin $\alpha \in \beta$ é:

$$\left(\frac{n_{\alpha}}{n_{\beta}}\right) = e^{(\Delta E/KT)} \tag{2.10}$$

Aqui K é a constante de Boltzmann, T a temperatura, n_{α} é o número de spins no estado de mais baixa energia (paralelo ao campo) e n_{β} no estado de mais alta (anti-paralelo ao campo). Como ΔE é muito pequeno em comparação com a energia térmica KT podemos escrever a aproximação

$$\left(\frac{n_{\alpha}}{n_{\beta}}\right) = 1 + \frac{\Delta E}{KT} \tag{2.11}$$

De acordo com a equação acima haverá um ligeiro excesso de núcleos com spin paralelo sobre núcleos de spin antiparalelo. Sabendo-se que $n = n_{\alpha} + n_{\beta}$ podemos encontrar a diferença de população entre os estados:

$$n_{\alpha} - n_{\beta} = \frac{n\Delta E}{2KT} \tag{2.12}$$

A diferença de população entre os níveis determina uma magnetização líquida \vec{M}_0 , ao longo do eixo z, paralela a \vec{B}_0 .

Os momentos magnéticos nucleares não possuem uma direção fixa em relação à direção do campo aplicado \vec{B}_0 , como poderia se pensar pela figura 2.2. Podemos considerar $\vec{\mu}$, e portanto \vec{I} em qualquer orientação segundo uma superfície cônica cujo vértice é a origem do vetor e a base é descrita pela rotação do extremo do vetor em torno de \vec{B}_0 . E realmente $\vec{\mu}$ precessa em torno do campo, como veremos na secção seguinte. Portanto, o porquê da magnetização resultante se alinhar com \vec{B}_0 decorre do fato de a distribuição dos vetores $\vec{\mu}$ no cone de precessão em torno de \vec{B}_0 ser aleatória.



Figura 2.3: Magnetização resultante do excesso de núlceos no estado de spin α (I = 1/2).

A diferença de energia entre dois estados consecutivos na espectroscopia de RMN é muito pequena quando comparada com a diferença encontrada em espectroscopia de infravermelho (estados vibracionais) e do visível e ultravioleta (estados eletrônicos). Isto justifica a pequena sensibilidade da espectroscopia de RMN em relação às espectroscopias vibracionais e eletrônicas de absorção, nas quais a diferença de população entre estados fundamentais e excitados é muito maior.

Atingida a condição de ressonância os núcleos no estado de spin α absorvem energia e tendem a igualar as populações dos estados de spin α e β . Quando, em certas condições experimentais, as populações se igualam, diz-se que houve saturação do estado de maior energia. No entanto o fenômeno de RMN teria pouca aplicação prática se a diferença $n_{\alpha} - n_{\beta}$ ficasse nula após a condição de Bohr ter sido atingida. Existem mecanismos de relaxação através dos quais o sistema troca energia com o ambiente circundante fazendo com que os núcleos voltem do estado de maior energia (β) para o estado de menor energia (α); assim a diferença entre os níveis é mantida. Estes processos de relaxação que serão explicados depois acontecem devido a transições induzidas por campos magnéticos oscilantes com uma determinada freqüência. São, também, os mesmos mecanismos que estabelecem a distribuição de equilíbrio de Boltzmann, logo que o campo B_0 é aplicado.

Núcleo	Spin	$\gamma (10^7 \text{rad}\text{T}^{-1}\text{s}^{-1})$	ν (MHz)	Abundância Natural (%)
$^{1}\mathrm{H}$	1/2	26,75	400	99,985
$^{2}\mathrm{H}$	1	4,11	61,4	0,015
$^{13}\mathrm{C}$	1/2	6,73	$100,\!6$	1,108
$^{14}\mathrm{N}$	1	$1,\!93$	28,9	99,63
$^{15}\mathrm{N}$	1/2	-2,71	40,5	0,37
$^{17}\mathrm{O}$	2	-3,63	54,3	0,037
$^{19}\mathrm{F}$	1/2	$25,\!18$	376,5	100,0
$^{29}\mathrm{Si}$	1/2	-5,32	$79,\! 6$	4,7
$^{31}\mathrm{P}$	1/2	10,84	162,1	100,0

Tabela 2.1: Propriedades de alguns núcleos em RMN. Os valores de freqüência são em um campo de 9,4T.

2.3 Equação de Movimento dos valores médios e Tratamento Clássico

A correspondência entre os tratamentos Mecânico Quântico e Clássico torna-se clara quando examinamos a equação diferencial relacionando a variação temporal dos valores médios $\langle \mu_x \rangle$, $\langle \mu_y \rangle$, e $\langle \mu_z \rangle$. A evolução temporal do valor médio de um operador A é dada pelo Teorema de Ehrenfest [4].

$$\frac{d\langle A\rangle}{dt} = \frac{i}{\hbar} \langle [\mathcal{H}, A] \rangle + \langle \frac{\partial A}{\partial t} \rangle \tag{2.13}$$

Desde que o operador não possua dependência explícita no tempo, temos

$$\frac{d\langle A\rangle}{dt} = \frac{i}{\hbar} \langle [\mathcal{H}, A] \rangle \tag{2.14}$$

 $[\mathcal{H}, A]$ é a relação de comutação entre \mathcal{H} e A. Podemos usar esta relação para calcular a evolução temporal dos valores médios de $\langle \mu_x \rangle$, $\langle \mu_y \rangle$, e $\langle \mu_z \rangle$. Sabendo-se que

$$\mathcal{H} = -\gamma B_0 I_z \tag{2.15}$$

nota-se que é necessário usar as relações de comutação para as componentes do momento de spin, as mesmas podem ser obtidas por uma permutação cíclica da relação seguinte:

$$[I_x, I_y] = iI_z, (2.16)$$

Então:

$$\frac{d\langle I_x \rangle}{dt} = \frac{i}{\hbar} \langle [\mathcal{H}, I_x] \rangle,$$

$$\frac{d\langle I_x \rangle}{dt} = \gamma B_0 i \langle [I_z, I_x] \rangle$$

$$\frac{d\langle I_x \rangle}{dt} = \gamma B_0 \langle I_y \rangle$$

$$\frac{d\langle I_y \rangle}{dt} = -\gamma B_0 \langle I_x \rangle,$$
(2.17)
(2.17)
(2.18)

Analogamente

$$\frac{l\langle I_y \rangle}{dt} = -\gamma B_0 \langle I_x \rangle, \qquad (2.18)$$
$$\frac{d\langle I_z \rangle}{dt} = 0$$

Nota-se facilmente que estas equações são as componentes da equação

$$\frac{d\langle \vec{I} \rangle}{dt} = \langle \vec{I} \rangle \times \gamma \vec{B}_0 \tag{2.19}$$

Nesta equação temos

$$\frac{d\langle I\rangle}{dt} = \vec{i}\frac{d\langle I_x\rangle}{dt} + \vec{j}\frac{d\langle I_y\rangle}{dt} + \vec{k}\frac{d\langle I_z\rangle}{dt}$$
(2.20)

Mas $\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$. Então o valor médio do momento magnético será:

$$\frac{d\langle\vec{\mu}\rangle}{dt} = \langle\vec{\mu}\rangle \times \gamma \vec{B}_0 \tag{2.21}$$

Esta equação é exatamente a equação clássica para o movimento de um momento magnético nuclear localizado em um campo magnético externo \vec{B}_0 . A mesma mostra que $\vec{\mu}$ muda sua orientação em relação ao campo, ou seja $\vec{\mu}$ rotaciona em torno de \vec{B}_0 com a freqüência de precessão de Larmor $\omega_0 = \gamma B_0$ (Figura 2.4), descrevendo um cone de precessão. Esta mesma freqüência

também foi obtida no tratamento quântico, equação 2.9. Se não existe interação entre os spins a equação 2.21 também vale para o valor esperado da magnetização total $\vec{M} = \sum \vec{\mu}$.

$$\frac{d\langle \dot{M}\rangle}{dt} = \langle \vec{M} \rangle \times \gamma \vec{B}_0 \tag{2.22}$$



Figura 2.4: Representação esquemática de um núcleo com momento magnético $\vec{\mu}$ em um campo magnético \vec{B}_0 .

2.4 Excitação

Em equilíbrio térmico os spins não possuem coerência de fase no plano transverso e a única magnetização resultante encontra-se na direção z. No entanto esta magnetização líquida é um vetor estático. De modo a observar esta magnetização, movimento precessional precisa ser detectado. Isto é conseguido pela interação com um segundo campo magnético no plano perpendicular a \vec{B}_0 , oscilando numa variação de radiofreqüência. Nos experimentos modernos de RMN este campo é aplicado como um pulso de Radiofreqüência (RF), aplicado durante um determinado intervalo de tempo.

O campo magnético oscilatório aplicado é da forma $\vec{B}_1 = 2B_1 \cos(\omega t)\vec{i}$ e pode ser decomposto em duas componentes, \vec{B}'_1 e \vec{B}''_1 , girando com as respectivas freqüências $\omega \in -\omega$:

$$\vec{B}_1' = B_1 \left(\vec{i} \cos(\omega t) + \vec{j} sen(\omega t) \right)$$

$$\vec{B}_1'' = B_1 \left(\vec{i} \cos(\omega t) - \vec{j} sen(\omega t) \right)$$
(2.23)

Somando $\vec{B}'_1 \in \vec{B}''_1$ encontramos novamente \vec{B}_1 . Estas componentes possuem uma defasagem em freqüência de 2ω e uma delas rotacionará no mesmo sentido da freqüência de precessão dos momentos magnéticos enquanto a outra no sentido oposto. Vamos considerar o movimento dos spins no sentido horário (- ω). Assim, próximo da ressonância a componente no sentido oposto pode ser desprezada. Assumiremos, assim, sem perda de generalidade, que temos somente o campo \vec{B}_1'' e portanto

$$\vec{B}_1 = B_1 \left(\vec{i} \cos(\omega t) - \vec{j} sen(\omega t) \right)$$
(2.24)

Este campo magnético oscilante ocasiona transições entre os níveis de energia Zeeman de um sistema de spins. O hamiltoniano desta interação em uma amostra com vários núcleos é dado por

$$\mathcal{H} = -\sum_{i} \vec{\mu_i} \cdot \vec{B_1} \tag{2.25}$$

Para um sistema de spins 1/2 esta interação induz transições entre os estados $\alpha \in \beta$ com probabilidades por unidade de tempo dada pela "regra de ouro de Fermi":

$$P_{\alpha \to \beta} = P_{\beta \to \alpha} = \gamma^2 B_1^2 |\langle \alpha | I_x | \beta \rangle|^2 \delta(\omega - \omega_0)$$
(2.26)

A função δ , centrada na freqüência de Larmor, garante que o campo B_1 oscila com uma freqüência igual ao espaçamento, em freqüência, dos níveis de Zeeman, para que ocorra a absorção de energia pelo sistema de spins.

Incluíndo os efeitos de $\vec{B}_1(t)$ e \vec{B}_0 e substituindo $\langle \vec{M} \rangle$ pela respectiva magnetização macroscópica na equação 2.22 temos

$$\frac{d\dot{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma \left[\vec{B}_0 + \vec{B}_1\right] \tag{2.27}$$

Podemos analisar este movimento de uma maneira mais simples eliminando a dependência temporal de $\vec{B}_1(t)$. Para isto usamos um sistema de coordenadas que rotaciona em torno do eixo z com freqüência $-\omega$. Tomamos o eixo x deste sistema ao longo de \vec{B}_1 e o eixo z ao longo de \vec{B}_0 . Logo, \vec{B}_0 e \vec{B}_1 serão estáticos neste sistema e além disso \vec{B}_0 será reduzido.

Para analizarmos o movimento da magnetização neste novo sistema usamos uma equação que relaciona as derivadas nos dois referenciais [5].

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \frac{d^*\vec{M}}{dt} - \vec{\omega} \times \vec{M}$$
(2.28)

onde $\frac{d\vec{M}}{dt}$ é a derivada em relação ao sistema estático e $\frac{d^*\vec{M}}{dt}$ em relação ao sistema girante. Aplicando 2.28 em 2.27, temos

$$\frac{d^*\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma \left[\left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \vec{k} + B_1 \vec{i} \right]$$
(2.29)



Figura 2.5: Representação de \vec{B}_0 e \vec{B}_1 no referencial girante.

$$\frac{d^*\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma \vec{B}_{ef}$$

Esta equação mostra que, no referencial girante, a magnetização se comporta como se nela atuasse um campo magnético efetivo estático B_{ef} . Portanto a magnetização rotaciona em um cone de ângulo fixo em torno da direção deste campo com freqüência de precessão de γB_{ef} , comforme vemos na figura abaixo:



Figura 2.6: Movimento da magnetização em torno do campo efetivo.

A grandeza

$$\Omega = \gamma (B_0 - \frac{\omega}{\gamma}) = (\omega_0 - \omega)$$
(2.30)

é designada *offset* e é a diferença entre a freqüência de Larmor e a freqüência de excitação dos spins.

Se $\omega = \gamma B_0$, a condição de ressonância é satisfeita e o campo efetivo é formado somente por $B_1 \vec{i}$. A magnetização, que inicialmente está paralela ao campo B_0 , precessa no plano yz permanecendo sempre perpendicular a B_1 . Se B_1 é aplicado por um período limitado de tempo t_p (tipicamente da ordem de microsegundos), \vec{M} precessará formando um ângulo $\alpha = \gamma B_1 t_p$. Este ângulo é normalmente chamado de ângulo de *flip* e o pulso que o gerou é nomeado pelo valor do ângulo α que produz.



Figura 2.7: Na ressonância a magnetização gira em torno de B_1 .

Se t_p tem uma duração tal que $\alpha = \pi$ (pulso de 180⁰), o pulso inverte a magnetização. Se $\alpha = \pi/2$ (pulso de 90⁰) a magnetização é colocada no plano transversal. Na grande maioria dos experimentos de RMN os pulsos são quase exclusivamente pulsos de 90⁰ e 180⁰ (Figura 2.8).

Os pulsos de radiofreqüência são usados nos espectrômetros modernos (espectrômetros de onda pulsada) nos quais a radiação possui grande intensidade (B_1 da ordem de 10-500 Gauss) e é aplicada durante um curto intervalo de tempo (1 a 100μ s).

De acordo com o Princípio de Incerteza, um pulso de RF monocromático ν_0 de curta duração t_p , ou seja pequena incerteza temporal, corresponde a uma gama de freqüências em ν_0 , ou seja grande incerteza na energia. Quanto menor for o pulso mais vasta será a gama de freqüências. É comprovado que para uma gama de valores ν ocorrem valores de B_1 de acordo com:

$$B_1(\nu) = \frac{sen[\pi(\nu - \nu_0)t_p]}{\pi(\nu - \nu_0)t_p}$$
(2.31)

Esta função possui valor nulo para $|\nu - \nu_0| = 1/t_p$. Um pulso com $t_p = 10\mu s$ é equivalente à irradiação de uma amostra com uma gama de freqüência

da ordem de $1/10^{-5}s = 10^5 Hz$. Isto faz com que a condição de ressonância seja atingida, simultaneamente, para uma grande quantidade de núcleos da amostra.

Portanto um pulso curto f(t), no domínio temporal, é equivalente a uma distribuição $F(\nu)$, no domínio das freqüências. As duas funções estão relacionadas por uma transformada de Fourier:

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)exp(-2i\pi\nu t)dt \qquad (2.32)$$
$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(\nu)exp(2i\pi\nu t)d\nu$$



Figura 2.8: Movimento da magnetização M durante a aplicação de um pulso de RF, em ressonância, no sistema girante. a) Pulso de 90° na direção x: O campo B_{1x} é aplicado durante o tempo necessário para que a magnetização inicial M_z gire ao redor do eixo x até a direção y. b) Pulso de 180° na direção y: O campo B_{1y} é aplicado durante o tempo necessário para que a magnetização inicial M_z gire ao redor do eixo y até a direção -z passando pela direção -x.

2.5 Relaxação

Cessada a ação do pulso a magnetização, deslocada da sua posição de equilíbrio, precessionará livremente voltando para sua posição de equilíbrio. Chamamos este processo de relaxação da magnetixação. Duas magnetizações macroscópicas são distinguidas em um experimento de RMN, a magnetização longitudinal ao longo do eixo z e a magnetização transversal no plano xy. Ambas estão sujeitas aos fenômenos de relaxação, ou seja, suas magnitudes variam com o tempo. A relaxação longitudinal corresponde à recuperação da magnetização longitudinal ao seu valor de equilíbrio M_0 ao longo do eixo z, e a relaxação transversal corresponde ao decaimento da magnetização no plano xy para o valor nulo. Estes dois processos ocorrem simultaneamente. No estudos destes processos de relaxação é conveniente distinguir entre alterações na energia e alterações na entropia no retorno do sitema ao equilíbrio.

2.5.1 Relaxação Longitudinal

Imediatamente após a exposição de um sistema de spins a um campo magnético externo B_0 , todos os níveis de Zeeman estão igualmente povoados, o sistema ainda não está em equilíbrio e $M_z=0$. O sistema, então, transfere o excesso de energia ganho pela interação com B_0 para o meio ambiente, denominado de um modo geral de rede, para atingir o equilíbrio correspondente à distribuição de Boltzmann dos núcleos pelos níveis energéticos com $M_z = M_0$. Devido a esta interação entre o sistema de spins e a rede, esta experimenta um aumento de temperatura causado pela transformação de energia potencial magnética em energia cinética molecular. A energia potencial do sistema devido a interação com o campo é dada por:

$$U = \vec{M} \cdot \vec{B}_0 = M_z B_0 \tag{2.33}$$

Quando M_z muda de $M_z = 0$ para $M_z = M_0$ implica que haverá uma troca de energia do sistema de spins com a rede. Este processo é designado de *relaxação longitudinal*. Também ocorre após a aplicação de um pulso de radiofreqüência num sistema de spins localizados em um campo estático quando a magnetização, inicialmente deslocada da posição de equilíbrio, retorna para a mesma. Se aplicamos um pulso de $\pi/2$ sobre um sistema de spins 1/2 a magnetização z se anula, o que equivale a igualar a população dos dois níveis de energia Zeeman. Após esta excitação começa o processo de relaxação longitudinal que recupera a diferença de população entre os níveis. Neste processo a evolução temporal da magnetização M_z até atingir o estado de equilibrio é dada por:

$$\frac{dM_z}{dt} = \left(\frac{M_0 - M_z}{T_1}\right) \tag{2.34}$$

Este processo de relaxação é de origem energética e é denominado também de relaxação spin rede. A constante T_1 chama-se tempo de relaxação longitudinal. Deve-se observar, no entanto, que este não é o tempo requerido para a magnetização retornar ao seu valor inicial. O tempo necessário para que a magnetização retorne 99% do seu valor inicial é da ordem de $5T_1$. Quando $t = T_1$ a magnetiação atingiu apenas 63% do seu valor de equilíbrio.



Figura 2.9: Reconstrução da magnetização longitudinal M_z pela ação da relaxação spin-rede. a) O vetor magnetização total M é nulo. Os momentos magnéticos nucleares se encontram no plano xy defasados. b) e c) Cada momento magnético se alinha com o campo B_0 construindo a magnetização M_z . Devido à defasagem não existe magnetização M_{xy} . d) A magnetização alcança o estado de equilíbrio no qual $M_z = M_0$.

2.5.2 Relaxação Transversal

A ação do campo de radiofreqüência acarreta coerência de fase na precessão dos momentos magnéticos individuais em volta da direção z (Figura 2.10). Isto causa uma diminuição da entropia devido ao aumento da ordem. Logo passa-se a ter $M_z < M_0, M_x \neq 0$ e $M_y \neq 0$.



Figura 2.10: Estado de coerência parcial dos momentos magnéticos dos spins devido a ação de um campo de RF (esquerda), projeção no plano xy (meio) e vetor soma das componentes no plano xy dando origem à magnetização transversal.

Cessada a ação de B_1 o sistema retorna para a condição de equilíbrio dada por $M_z = M_0$, $M_x = 0$ e $M_y = 0$, pois é sabido que a magnetização de equilíbrio não possui componente transversal. O retorno de M_x e M_y para os valores de equilíbrio nulos caracaterizam a *relaxação transversal* ou *relaxação spin-spin* e obedecem as equações:

$$\frac{dM_x}{dt} = \left(\frac{-M_x}{T_2}\right)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \left(\frac{-M_y}{T_2}\right)$$
(2.35)

 T_2 é o tempo de relaxação transversal. Este processo corresponde a uma perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos individuais no seu movimento de precessão e, assim, também a um aumento de entropia. Quando o pulso de radiofreqüência termina, cada momento magnético experimenta, além do campo externo estático, os campos locais vizinhos, associados com a distribuição dos núcleos vizinhos e ao fato de B_0 não ser perfeitamente homogêneo. Por isso os momentos magnéticos terão pequenas diferenças nas freqüências de precessão, provocando a perda de coerência (Figura 2.11).



Figura 2.11: Extinção da magnetização transversal pela ação da relaxação spin-spin. a) A magnetização se encontra em repouso alinhada com o campo externo. b) Após a aplicação de um pulso de 90^o a magnetização é colocada no plano transversal. c) Devido às interações entre os spins ou inomogeneidade do campo externo as freqüências de precessão de Larmor de cada um dos momentos magnéticos nucleares serão ligeiramente diferentes. d) Com a evolução do processo os efeitos de defasagem se intensificam o suficiente para destruir a magnetização transversal.

A inomogeneidade em B_0 faz com que surja uma distribuição de campos magnéticos B_0 localmente diferentes ao longo do sistema de spins. Quando consideramos o efeito macroscópico esta distribuição conduz a uma perda mais rápida da magnetização transversal do que a causada pela relaxação pura com T_2 . Define-se um tempo de relaxação efetivo T_2^* dado por

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0 \tag{2.36}$$

onde $\gamma \Delta B_0$ representa as inomogeneidades em B_0 .

Em sólidos os campos locais são significativos e contribuem para uma rápida perda de coerência dos momentos magnéticos caracterizando valores de T_2 curtos enquanto em líquidos estes campos flutuam rapidamente de tal maneira que, em média, são reduzidos, caracterizando tempos T_2 longos.

Boa parte dos estudos de mobilidade iônica ou molecular usando RMN são realizados através das medidas dos tempos de relaxação $T_1 e T_2$. Estes tempos são sensíveis a processos dinâmicos que ocorrem em diferentes feqüências [6].

2.6 Equações de Bloch

Combinando as equações diferenciais para a precessão da magnetização causada por B_0 e B_1 (Equação 2.27) com as relações de relaxação apresentadas no ítem anterior, obtemos um conjunto de equações acopladas formuladas por Bloch em 1946 que descrevem a dinâmica dos spins na presença de campos magnéticos externos. Eatas equações foram inicialmente propostas para descrever classicamente a evolução temporal das variáveis macroscópicas como a magnetização mas são aplicáveis aos valores médios de grandezas quânticas, como o spin nuclear.

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma \left(M_y B_0 - M_z B_1 sen\omega t \right) - \frac{M_x}{T_2}$$
(2.37)

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma \left(M_z B_1 cos\omega t - M_x B_0 \right) - \frac{M_y}{T_2}$$
(2.38)

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma \left(M_x B_1 sen\omega t - M_y B_1 cos\omega t \right) - \frac{M_z - M_0}{T_1}$$
(2.39)

Resolvendo as equações de Bloch para valores baixos de B_1 encontramos soluções de forma lorentziana para o decaimento da magnetização transversal [8].

2.7 Detecção

A interação com um campo de radiofreqüência (pulso de $\pi/2$) tem dois efeitos no sistema de spins. Primeiro os dois estados de spin se tornam igualmente populados e, segundo, os spins tendem a um estado de coerência de fase, o campo magnético externo força a aquisição de coerência de fase pelos spins e, com isso, gera-se magnetização transversal. Cessada a aplicação do pulso, a magnetização experimenta somente o campo principal B_0 e precessará ao redor dele com a freqüência de Larmor. O movimento da magnetização transversal induz, pela lei de Faraday, uma força eletromotriz (fem) em uma bobina de detecção com eixo perpendicular ao campo estático. A fem induzida forma, depois de amplificada, o sinal de RMN.



O sinal detectado chama-se Free Induction Decay (FID).

Figura 2.12: A precessão da magnetização transversa induz a formação de uma corrente elétrica oscilante na bobina.

A magnetização transversal, responsável pelo sinal detectado, decai, devido aos efeitos de relaxação, exponencialmente para zero com um tempo de relaxação efetivo T_2^* determinado por T_2 e pela não-homogeneidade do campo magnético. A dependência temporal da força eletromotriz (ou intensidade do sinal) é chamada de Decaimento Livre da Indução do inglês *Free Induction Decay (FID)*.

A intensidade do FID é proporcional à magnetização líquida M_0 e portanto também à diferença de população entre os níveis (ver equação 2.12). Por conseguinte também será proporcional ao número total de núcleos n, o que é extremamente importante em estudos de análise quantitativa por RMN pois a integral (àrea) do sinal obtido é proporcional ao número de núcleos da amostra.

A projeção da magnetização transversal nos planos x e y é dada por

$$M_x(t) = M_0 sen[(\omega_0 - \omega)t] e^{\frac{-t}{T_2^*}}$$
(2.40)
$$M_y(t) = M_0 \cos[(\omega_0 - \omega)t] e^{\frac{-t}{T_2^*}}$$
(2.41)

O sinal obtido é um sinal complexo e se detecta as magnetizações M_x e M_y simultaneamente. M_x e M_y estão relacionadas com as partes real e imaginária respectivamente do FID complexo.

$$S(t) = S_x(t) + iS_y(t)$$
 (2.42)



Figura 2.13: Detecção simultânea de M_x e M_y .

2.8 Transformada de Fourier

Embora o sinal FID carregue todas as informações relevantes sobre os spins nucleares, como suas freqüências de ressonância e abundância relativa, eles não são avaliados diretamente. Normalmente os dados no domínio temporal (FID) são convertidos para dados no domíneo de freqüências, ou seja um espectro, por uma transformada de Fourier (TF). Ernst e Anderson [2] demonstraram em 1966 que a aplicação de uma transformada de Fourier permite converter um sinal f(t) em um sinal $F(\omega)$:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t}dt \qquad (2.43)$$

Ambas as componentes do FID complexo $(M_x \in M_y)$ são medidas usando a denominada detecção em quadratura (Figura 2.14) e suas transformadas de Fourier fornecem independentemente as partes real e imaginária do sinal no domíneo de freqüências:

$$S(\omega) = R(\omega) + iI(\omega) \tag{2.44}$$

$$R(\omega) = \frac{M_0 T_2^*}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^{*2}}$$
(2.45)

$$I(\omega) = \frac{M_0 T_2^{*2}(\omega_0 - \omega)}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^{*2}}$$
(2.46)

 $R(\omega)$ e $I(\omega)$ são as componentes de absorção e dispersão, respectivamente, de uma curva Lorentziana.



Figura 2.14: Partes real (R) e imaginária (I) do sinal no domínio de freqüência.

A componente dispersiva é mais larga com integral total nula. Assim, a componente absortiva é a única conservada para análise. Esta componente possui largura à meia altura, $\Delta v_{1/2}$, igual a $(\pi T_2^*)^{-1}$.



Figura 2.15: Componente de absorção com respectiva largura à meia altura.

Na prática o espectro raramente surge com a linha de absorção na parte real e a de dispersão na parte imaginária. O aparato experimental sempre insere um curto intervalo de tempo entre o fim do pulso e o início de aquisição dos dados e durante este tempo os momentos magnéticos desenvolvem fases devido às diferentes freqüências de precessão. Assim logo após a TF a componente absortiva tem fase arbitrária. De modo a se obter um formato de linha puramente absortivo na parte real deve-se "fasear o espectro" o que envolve tomar combinações lineares das partes real e imaginária até se conseguir o resultado desejado.

A transformada de Fourier é feita de forma numérica num computador. O sinal FID é primeiro digitalizado utilizando um conversor analógico-digital. O computador procede, depois, a TF e o espectro pode então ser visualizado na tela do computador.

Capítulo 3

Espectroscopia de RMN

O campo da espectroscopia trata da interação entre matéria e radiação eletromagnética. A interação entre átomos e radiação eletromagnética é caracterizada pela absorção e emissão de fótons pelos átomos, de tal forma que os quanta dos fótons sejam iguais a diferença de energia dos níveis energéticos atômicos. Sabendo-se que a energia de um fóton é proporcional à freqüência, as diferentes formas de espectroscopia são distingüidas com base nas freqüências envolvidas. A espectroscopia por RMN usa radiofreqüências que estão na variação de 10-900 MHz. Em RMN a absorção e emissão da radiação eletromagnétcia pode ser observada quando o núcleo é submetido a um intenso campo magnético uniforme.

Inicialmente os espectros de RMN eram obtidos em um modo de onda contínuo no qual a radiofreqüência ou a intensidade do campo magnético variava através da área espectral de interesse enquanto se mantinha o outro fixo. Ernst e Anderson[3] introduziram em 1966 a RMN pulsada em combinação com transformada de Fourier (Cap. 2 - seção 2.8). Esta técnica revolucionou o campo da espectroscopia por RMN pois se reduz consideravelmente o tempo de experimento desde que não há necessidade da variação através da área espectral checando ponto por ponto se ocorre absorção.

3.1 Características Gerais dos Espectros de RMN

Núcelos magnéticos de diferentes espécies possuem diferentes freqüências de ressonância. Sabendo-se que a razão giromagnética γ é uma característica de cada núcleo, a condição de ressonância (Equação 2.9) implica em diferentes freqüências para um mesmo campo.

RMN, inicialmente, tinha por objetivo determinar momentos magnéticos nucleares e somente se desenvolveu para uma das mais versáteis formas de espectroscopia depois da descoberta que núcleos na mesma molécula absorvem energia em diferentes freqüências de ressonância. A freqüência de ressonância depende do ambiente químico do núcleo na molécula. A este fenômeno designou-se Deslocamento Químico, do inglês *Chemical Shift*.

Proctor e Yu (Havard), em 1950, observaram este efeito pela primeira vez ao estudarem RMN de ¹⁴N em vários compostos [7], mas o exemplo de maior impacto é o espectro de ressonância de ¹H no etanol, CH₃-CH₂-OH, obtido por Packard e seus colaboradores (USA) em 1951. O espectro do etanol apresenta três bandas de absorção de intensidades relativas 1:2:3 correspondendo aos três grupos de átomos de H quimicamente diferentes -OH, CH₂ e CH₃ - como mostra a figura 3.1.

Com o avanço dos estudos e dos aparelhos de medida observou-se nos espectros, além desta *estrutura fina* devida ao deslocamento químico, uma *estrutura hiperfina* causada pelas interações entre spins nucleares de uma mesma molécula. Este efeito é denominado Acoplamento de Spins Nucleares.

Estes são os dois principais fenômenos observados em RMN envolvendo interações de spins que ocorem em amostras líquidas para núcleos de spin 1/2. Através deles pode-se distinguir átomos de um mesmo elemento em uma molécula e obter informações que permitem localizá-los espacialmente.



Figura 3.1: Representação de um dos primeiros espectros de ¹H do etanol obtido experimentalmente mostrando o desdobramento das linhas de ressonância (estrutura fina) devido ao deslocamento químico.

3.2 Deslocamento Químico (*Chemical Shift*)

O deslocamento químico surge porque o campo realmente experimentado por um núcleo (\vec{B}) em um átomo ou molécula difere ligeiramente (0,01G a 0,1G) do campo magnético externo \vec{B}_0 , o campo que seria sentido pelo núcleo sem a presença de seus elétrons. Os elétrons nos átomos são os responsáveis pela ocorrência de desvios químicos em RMN. Por causa da presença de elétrons rodeando os núcleos uma amostra colocada em um campo magnético fica magnetizada e, portanto, modificará o campo. Esta magnetização resulta da polarização dos momentos magnéticos dos elétrons quando a molécula possui elétrons com spins desemparelhados (substância paramagnética). No caso de substância paramagnética o campo no interior da amostra é maior do que o aplicado. Se não há spins desemparelhados na molécula (substância diamagnética) a amostra fica magnetizada por causa das correntes de elétrons induzidas nas moléculas da amostra pelo campo externo aplicado. Neste outro caso o campo no interior da amostra é menor do que o campo externo.

Assumindo que estamos trabalhando com uma amostra diamagnética, os elétrons nos núcleos da amostra rotacionarão em torno de \vec{B}_0 em sentido oposto à precessão do spin nuclear. Uma vez que esta precessão envolve movimento de carga, existirá um momento magnético $\vec{\mu}_e$ e um campo \vec{B}' associado que se opõem ao campo magnético externo \vec{B}_0 .



Figura 3.2: Origem do Deslocamento Químico: O movimento dos elétrons gera um campo $\vec{B'}$ que se opõe ao campo externo $\vec{B_0}$.

3.2.1 Proteção Magnética

Com isso, na posição do núcleo o campo magnético total é inferior ao aplicado, os elétrons exercem uma proteção magnética ou blindagem magnética no núcleo. O campo local induzido $\vec{B'}$ que se opõe ao aplicado é proporcional a $\vec{B_0}$:

$$\vec{B}' = -\sigma \vec{B}_0 \tag{3.1}$$

Designa-se σ como a constante de proteção magnética do núcleo. Esta constante é independente do campo, adimensional e variável de elemento para elemento. Em um átomo isolado $\vec{B'}$ é constante e paralelo a $\vec{B_0}$ (Figura 3.2).

Em se tratando de moléculas, a existência de várias ligações faz com que a direção de \vec{B}' seja diferente da direção de \vec{B}_0 . Neste caso σ é uma grandeza tensorial. Contudo, em amostras líquidas e gasosas, nas quais temos rápidos movimentos moleculares, o efeito resultante no sinal de RMN é determinado pelo valor médio de \vec{B}' em relação à direção de B_0 , obtemos um valor médio do tensor $\tilde{\sigma}$.

Assim, o campo magnético efetivo em um determinado núcleo será:

$$\vec{B} = \vec{B}_0 + \vec{B}' \tag{3.2}$$

Considerando uma amostra líquida, temos

$$\vec{B} = (1 - \sigma)\vec{B}_0 \tag{3.3}$$

Onde σ é o valor médio de $\widetilde{\sigma}.$ Com isto a nova condição de ressonância será

$$\omega = \gamma B = \gamma B_0 (1 - \sigma) \tag{3.4}$$

$$\omega = \omega_0 (1 - \sigma) \tag{3.5}$$

Concluímos então que valores de σ maiores correspondem a menores valores de freqüência. Logo no espectro enquanto $\nu = \omega/2\pi$ aumenta para a esquerda, σ aumenta para a direita. Um sinal mais à direita, com baixas freqüências, surge no espectro devido a um núcleo com maior *proteção magnética*, altos valores de σ . Por razões históricas se usam as expressões "região de campo alto" e "região de campo baixo" para menores e maiores valores de ν respectivamente, ou seja, sinais mais à direita e à esquerda do espectro.

O efeito de proteção nulear pode ser descrito pelo Hamiltoniano:

$$\mathcal{H} = -\sum_{i} \vec{\mu}_{i} \cdot (\tilde{\sigma}_{i} \cdot \vec{B}_{0}) = -\gamma \hbar \sum_{i} \vec{I}_{i} \cdot \tilde{\sigma}_{i} \cdot \vec{B}_{0}$$
(3.6)

Para amostras líquidas $\tilde{\sigma}_i = \sigma$, e assim:

$$\mathcal{H} = -\gamma \hbar \sigma \sum_{i} \vec{I}_{i} \cdot \vec{B}_{0} \tag{3.7}$$



Figura 3.3: devido à diminuição do campo total sentido pelo núcleo a diferença entre os níveis de energia (aqui em uma escala ampliada) para um núcleo de spin 1/2 também diminui, modificando a freqüência de ressonância.

3.2.2 Medidas de Deslocamento Químico

Da equação 3.4 percebe-se que os deslocamentos químicos dependem da intensidade de B_0 . Para uma melhor análise retira-se a dependência em B_0 definindo os deslocamentos químicos de acordo com um parâmetro adimensional δ , expresso em partes por milhão (ppm):

$$\delta = 10^6 \frac{(v - v_{ref})}{v_{ref}} \tag{3.8}$$

Nesta expressão $v \in v_{ref}$ são as freqüências do composto sobre investigação e um composto de referência, respectivamente.

O sinal de referência é obtido adicionando uma pequena quantidade do composto de referência à amostra. Um bom composto como padrão de referência deve ser quimicamente inerte, não reagir e não se associar com as moléculas da substância analisada; solúvel em um elevado número de amostras e originar um único sinal, estreito, intenso e afastado da região de freqüências em que as amostras apresentam picos. Um composto de referência amplamente utilizado para RMN de ¹H e ¹³C é o tetrametilsilano $S_i(CH_3)_4$ (TMS). Por definição o deslocamento δ do TMS é zero.



Figura 3.4: Espectro mostrando os grupos de ressonância de ¹H comuns em moléculas biológicas.

3.3 Acoplamento de Spins Nucleares

Além do deslocamento químico há outra fonte de informação fornecida pelos espectros de RMN devido às interações magnéticas entre os núcleos. Estas interações provocam o desdobramento das linhas de ressonância em diversas linhas menores. Este fenômeno se origina do fato de que um núcleo com momento magnético interage com outro através do espaço ou através das ligações químicas. Ao primeiro denomina-se *acoplamento dipolar* e ao segundo *acoplamento escalar*.

Moléculas em líquidos rotacionam rapidamente com freqüentes mudanças nos eixos e velocidades de rotação como um resultado das colisões com outras moléculas. Conseqüentemente as interações dipolares diretas (através do espaço) possuem uma média total nula e não há acoplamento dipolar líquido [9]. Apesar de não produzir desdobramentos nos espectros de RMN de líquidos, o acoplamento dipolar é de vital importância para o entendimento de RMN do estado sólido e possui um papel crucial nos processos de relaxação.

3.3.1 Acoplamento Escalar (*J*-Coupling)

As interações através das ligações químicas não possuem uma média total nula em amostras líquidas e devido a elas surgem os desdobramentos nas linhas espectrais. Estas interações ocorrem entre os momentos magnéticos nucleares e os momentos magnéticos dos elétrons (de valores muito maiores) nas ligações [16]. Levando em consideração somente o deslocamento químico o espectro do etanol consta de três ressonâncias, mas por causa do acoplamento escalar o espectro de ¹H do etanol constará de oito ressonâncias quando obtido com altos campos magnéticos.

Consideremos o acoplamento escalar entre dois núcleos de spin 1/2 numa molécula AX, tal como o fluoreto de hidrogênio HF (a distância na ordem alfabética corresponde a distância nas freqüências de ressonância). O momento magnético do núcleo A causa uma fraca polarização magnética dos seus elétrons orbitais que estão envolvidos nas ligações. Esta polarização é transmitida para o núcleo X acoplado devido a superposição dos orbitais (Figura 3.5). O núcleo X sente a polarização de seus elétrons provocada pela polarização dos elétrons do núcleo A. Por conseqüência dependendo do estado de spin de A (alinhado ou desalinhado com o campo), o campo realmente sentido por X pode aumentar ou diminuir, assumindo dois valores e fazendo com que o sinal de RMN de X seja dividido em um dubleto. O mesmo ocorre para o núcleo A. Como os dois estados de spin de X são quase igualmente prováveis, as linhas do dupleto possuem a mesma intensidade.



Figura 3.5: Representação esquemática da interação spin-spin através das ligações químicas.

O hamiltoniano da interação spin-spin entre dois núcleos A e X é expresso como

$$\mathcal{H} = 2\pi J_{AX} \vec{I}_A \cdot \vec{I}_X \tag{3.9}$$

onde $\vec{I}_A \in \vec{I}_X$ são os operadores vetoriais de spin nucleares dos respectivos núcleos e J_{AX} é conhecida como constante de acoplamento escalar entre os núcleos.

Um fato importante resultante desta equação é que a energia de interação devida ao acoplamento e a constante de acoplamento são independentes do campo magnético externo aplicado. A constante de acoplamento é expressa em unidades de freqüência (Hz). Valores típicos das constantes de acoplamento J são, ¹H-¹H (1-15Hz), ¹H-¹³C (100-200Hz), ¹H-³¹P (10-20Hz) e ¹³C-¹³C (30-80Hz).



Figura 3.6: Espectro de ${}^{1}H$ do etanol mostrando o desdobramento das linhas de ressonância devido ao acoplamento escalar.

O acoplamento escalar pode também ser descrito em termos do diagrama de níveis energéticos. Temos quatro diferentes estados energéticos para dois núcleos A e X de spin 1/2 em um campo magnético externo B_0 $(\alpha_A \alpha_X, \alpha_A \beta_X, \beta_A \alpha_X, \beta_A \beta_X)$. Os momentos nucleares podem estar ambos paralelos ou antiparalelos ao campo ou um paralelo e outro antiparalelo e vice versa. Na ausência de acoplamento (J = 0) as transições que envolvem a mudança de estado de um único spin (representadas por W_1 na figura 3.7) têm a mesma diferença de energia entre os níveis, e conseqüentemente somente uma linha de ressonância é observada. Na presença de acoplamento escalar (J > 0), os níveis energéticos alteram-se dando origem ao desdobramento das linhas (Figura 3.7).

O fato do acoplamento escalar ser transmitido através de ligações químicas faz da constante de acoplamento J um parâmetro sensível aos tipos de ligações envolvidas e à orientação espacial da molécula.



Figura 3.7: Diagrama de níveis energéticos para um sistema de dois núcleos A e X de spin 1/2 (escala ampliada). a) Níveis energéticos e transições na ausência de acoplamento escalar b) Modificação nos níveis energéticos sob efeito do acoplamento escalar. W_1 indica transições entre os níveis com mudança no estado de somente um spin. Transições com mudanças nos estados de ambos os spins também são possíveis ($W_0 \in W_2$).

3.3.2 Espectros de $1^{\underline{a}}$ e $2^{\underline{a}}$ ordem e equivalência de núcleos

Os espectros são designados de primeira ordem quando a diferença entre as freqüências de ressonância dos núcleos acoplados é muito maior do que a constante de acoplamento J, quando isto não acontece os espectros são ditos ser de segunda ordem.

O entendimento da diferença entre núcleos equivalentes, magneticamente equivalentes e quimicamente equivalentes é essencial para se entender o padrão de desdobramento encontrado nos espectros de ressonância magnética nuclear devido ao acoplamento escalar. Núcleos equivalentes possuem todas as propriedades físicas e químicas iguais. Para núcleos quimicamente e magneticamente equivalentes a diferença é mais sutil. Consideremos dois núcleos (mesmo deslocamento químico) acoplados com um terceiro núcleo (com um diferente deslocamento químico). Caso a constante de acoplamento destes dois núcleos seja diferente em relação à do terceiro, estes núcleos são ditos quimicamente equivalentes (pois o deslocamento químico e portanto o ambiente químico são idênticos) mas não magneticamente equivalentes. Para serem magneticamente equivalentes a constante de acoplamento com um terceiro núcleo deve ser igual. Núcleos quimicamente equivalentes não são necessariamente magneticamente equivalentes mas núcleos magneticamente equivalentes são necessariamente quimicamente equivalentes.

A forma dos espectros de primeira ordem pode ser prevista através de algumas regras:

- O acoplamento escalar entre núcleos magneticamente equivalentes não produz desdobramento em multipletos no espectro. Por exemplo não há desdobramento devido aos prótons dentro de um grupo metil isolado (CH₃).
- O sinal de RMN de um núcleo S acoplado a outro de spin I e não quimicamente equivalente a este é um multipleto de 2I + 1 componentes de igual intensidade com a separação dada pela constante de acoplamento J. Caso o núcleo S esteja acoplado a um grupo de n núcleos equivalentes de spin I, o sinal resultante terá 2nI + 1 picos. O número de componentes do multipleto deve ser igual ao número de combinações diferentes dos spins dos n núcleos. Como a cada combinação diferente dos spins dos n núcleos pode corresponder a vários estados, as intensidades relativas dos multipletos são variáveis.
- Quando há mais do que dois núcleos magnéticos numa molécula, o acoplamento pode ocorrer entre cada par de núcleos, resultando em um padrão de desdobramento mais complexo. O padrão para um determinado núcleo na molécula pode ser explicado pelo método de desdobramento sucessivo. Como exemplo considere três spins A, M e X, que não são magneticamente equivalentes, acoplados. Considerado um sistema de spins AMX. A grande diferença na ordem alfabética corresponde a uma grande diferença nas freqüências de ressonância. Este sistema possui somente acoplamento escalar entre A e M (J_{AM}) e entre M e X (J_{MX}) , com $J_{AM} > J_{MX}$. O spin A somente possui acoplamento com o spin M. A linha de ressonância de A vai portanto ser dividida em duas linhas separadas pela constante de acoplamento J_{AM} . O mesmo acontece para o spin X. O desdobramento para o spin M é mais complicado. O acoplamento com o spin A resulta em duas linhas (dupleto) e o acoplamento com o spin X resulta numa divisão de cada uma destas linhas em mais duas linhas resultando em quatro linhas de igual intensidade (um dupleto de dupletos).

Estas regras podem ser usadas para predizer a aparência dos espectros de primeira ordem. Efeitos de segunda ordem são explicados com base em argumentos mecânico quânticos [2]. O padrão de desdobramento provocado pelo acoplamento escalar fornece uma maneira de elucidar as estruturas dos compostos sobre investigação[10].

3.4 Dupla Ressonância

Designa-se dupla ressonância à perturbação de um sistema de spins devida à aplicação de um segundo campo oscilante \vec{B}_2 , seus efeitos nos espectros e as aplicações associadas a estes efeitos. A ressonância dupla homonuclear ocorre quando a diferença entre as freqüências de ressonância de $\vec{B}_2 \ e \ \vec{B}_1$ estão na variação de hertz a kHz (audiofreqüências) e assim os núcleos excitados por \vec{B}_2 são os mesmos excitados por \vec{B}_1 . Quando a diferença entre as freqüências está na variação das radiofreqüências ocorre a ressonância dupla heteronuclear e os núcleos perturbados por \vec{B}_2 são de espécies diferentes daqueles cuja ressonância se pretende investigar com \vec{B}_1 .

3.4.1 Desacoplamento

Embora o acoplamento escalar forneça informações sobre o ambiente químico, nem sempre é desejado pois a divisão das linhas diminui o sinal obtido. Isto acontece muito nos espectros de RMN de ¹³C, nos quais o núcleo de ¹³C normalmente se encontra acoplado com um a três prótons. Muitas vezes os espectros ficam de difícil interpretação devido às excessivas divisões das linhas. Através do procedimento de desacoplamento dos spins é possível anular o efeito de desdobramento das linhas quando este é indesejável. As técnicas usadas são as dos *experimentos de dupla ressonância*.

Durante o desacoplamento do núcleo de ¹³C, um segundo campo magnético oscilante \vec{B}_2 é aplicado na freqüência de ressonância dos prótons durante a aquisição do FID. Isto causa uma rápida mudança dos estados de spin dos prótons de α para β e β para α (saturação) tal que o acoplamento escalar efetivo com o núcleo de carbono se reduz a zero. Tudo se passa como se o núcleo de carbono experimentasse o efeito médio dos estados de spin dos prótons. Se quizermos que todos os ¹³C estejam desacoplados é necessário irradiar toda a variação de deslocamentos químicos do ¹H. O desacoplamento de banda larga[10] consegue fazer isto irradiando uma grande variação das freqüências de ¹H simultaneamente. O desacoplamento pode ser tanto heteronuclear, ¹³C com ¹H, como homonuclear, entre dois prótons por exemplo, os quais são realizados pelos experimentos de ressonância dupla homo e heteronuclear.

A intensidade do sinal de um núcleo de ¹³C desacoplado é maior do que a soma de suas respectivas linhas desdobradas individuais provocadas pelo

acoplamento. Este fenômeno é causado pelo *Efeito de Overhauser Nuclear* do ingles "Nuclear Overhauser Effect (nOe)".

3.4.2 Efeito de Overhauser Nuclear - nOe

O efeito de Overhauser nuclear é resultado da dupla irradiação aliada a mecanismos de relaxação envolvendo o núcleo observado e o núcleo perturbado, acarretando em alterações na intensidade do sinal observado. O núcleo perturbado é o núcleo saturado pelo campo B_2 . Sobre condições normais a população relativa dos estados de spin de um núcleo (conseqüentemente a magnetização de equilíbrio) é dada pela distribuição de Boltzmann. Quando esta distribuição é alterada para um determinado núcleo as populações dos estados de spin de um núcleo dipolarmente acoplado mudará. A saturação de um próton durante um desacoplamento com carbono, representada como ¹³C-{¹H}, causa uma mudança na magnetização de equilíbrio do ¹³C. Este efeito é o efeito de Overhauser nuclear.

O nOe é oriundo do acoplamento dipolar (que possui efeito médio total nulo nos espectros obtidos em solução - secção 3.3) entre os spins e ocorre através do espaço quando a distância entre os núcleos é pequena o suficiente para os mesmos interagirem magneticamente. Devido à interação dipolar entre dois spins I e S, a relaxação das componentes longitudinais da magnetização destes spins passa a ser acoplada e regida pela equação de Solomon [11]:

$$\frac{d}{dt}(\langle I_z \rangle - I_0) = -\rho_I(\langle I_z \rangle - I_0) - \sigma(\langle S_z \rangle - S_0)$$
(3.10)

onde I_0 e S_0 são os valores de equilíbrio de $\langle I_z \rangle$ e $\langle S_z \rangle$ e $\rho_I = 1/T_1$, T_1 é o tempo de relaxação longitudinal do spin I.

Suponha que o spin S esteja saturado, quando medimos a ressonância do spin I, nota-se uma alteração na sua intensidade dada por [9]

$$\eta = \frac{I - I_0}{I_0} = \frac{\sigma}{\rho_I} \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \tag{3.11}$$

em que I e I₀ são as intensidades observadas da ressonância do spin I com e sem irradiação de S e σ é denominada taxa de relaxação cruzada.

As transições entre os níveis energéticos que envolvem mudanças nos estados dos dois spins simultaneamente $W_0 \in W_2$ (relaxação cruzada) são as causadoras de nOe como vemos na figura 3.7. Se a transição $W_2(\alpha \alpha \leftrightarrow \beta \beta)$ ocorre após S está saturado, provoca uma alteração positiva na intensidade de I. Se $W_0(\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha)$ ocorre, uma alteração negativa na intensidade da magnetização de I ocorre. Embora freqüentemente presente o acoplamento escalar não é requerido para o nOe pois este se dá pelas interações dipolares através do espaço em vez de interações escalares através das ligações. Alguns núcleos com razão giromagnética negativa podem ter suas ressonâncias diminuídas, anuladas e até mesmo invertidas por causa do nOe. A combinação do desacoplamento de hidrogênio e o nOe fornece um grande aumento na sensibilidade do espectro de carbono.

A grandeza σ depende altamente da distância entre os núcleos, $\sigma \propto 1/r^6$, e com isto é de grande importância em RMN estrutural.

3.5 Processos de Permuta Química

Nos processos de permuta química, os núcleos magnéticos experimentam alterações de ambiente químico, e portanto, magnético. Estes processos geram efeitos nos espectros de RMN que podem ser estudados para obter informações detalhadas sobre eles. Este domínio é normalmente designado por ressonância magnética nuclear dinâmica (RMND). A RMND fornece informação sobre as constantes de velocidade k do processo de permuta química. A espectroscopia de RMN em problemas de dinâmica química permite acompanhar reações suficientemente lentas (k da ordem de 10^{-1} a 10^{-4} s⁻¹) pois em reações lentas se pode obter espectros da mistura reativa em diferentes fases do processo. A identificação e integração dos sinais registrados em função do tempo permite determinar a velocidade de reação.

Nos processos de permuta química é conveniente fazer a distinção entre Permuta Intermolecular e Permuta Intramolecular:

- 1. Permuta Intermolecular Há ruptura na molécula e formação de novas ligações.
- Permuta Intramolecular → Não há ruptura de ligações (como por exemplo um processo de rotação interna ou qualquer outro de reorientação interna em uma molécula)

Nos processos de permuta intramolecular ou intermolecular em equilíbrio termodinâmico, a constante k cai na variação de 10^{-1} a 10^{6} s⁻¹. Nesta variação os sinais são alargados devido à troca e k não pode ser obtido pela análise da evolução temporal dos espectros nas diferentes fases do processo. A constante k é obtida por análise do perfil dos sinais obtidos. A troca química ocorre entre locais magneticamente não equivalentes com diferentes deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, ou ainda os dois.

Um exemplo de troca química é fornecido pela N,N-dimetilformamida (DMF) na qual os dois isômeros, obtidos por rotação dos grupos metil em torno da ligação C-N são quimicamente idênticos.



Figura 3.8: Exemplo de troca química na molécula de N,N-dimetilformamida.

3.5.1 Troca Química e Forma do Espectro

O espectro de RMN de ¹H da N,N-dimetilformamida contém dois picos de intensidade relativa três na temperatura ambiente. Cada pico corresponde a um grupo metil nas posições A e B. Quando se aumenta a temperatura observa-se somente um pico de intensidade relativa 6 numa posição intermediária. Isto acontece porque com o aumento da temperatura a velocidade de rotação interna em torno de C-N aumenta e os prótons de cada grupo N-CH₃ rapidamente alternam entre dois ambientes químicos diferentes A, correspondendo a uma freqüência ν_A e B, correspondendo a uma freqüência ν_B (Figura 3.8). Esta rápida alternância origina um sinal estreito na freqüência $(\nu_A + \nu_B)/2$ contanto que a freqüência de transição entre aqueles dois locais seja bem maior em comparação com a diferença entre as respectivas freqüências de ressonância $|\nu_A - \nu_B|$.

O denominado regime de troca rápida é caracterizado pela obtenção de sinais médios estreitos com a largura determinada pela não homogeneidade do campo e pelo tempo de relaxação T_2 . Já o regime de troca lenta é caracterizado por sinais distintos para cada forma envolvida na troca, também igualmente estreitos. A condição intermediária entre a troca lenta e a troca rápida é considerado o regime *intermediário de troca*.

3.6 RMN Unidimensional

A aplicação de um pulso de RF a um sistema de spins causa uma deflexão do vetor \vec{M} a partir do eixo z e induz magnetização no plano xy (seção 2.4 - Cap.2). Após a ação do pulso se inicia a precessão de Larmor em torno do eixo z. O movimento da magnetização transversal gera uma voltagem alternada que decai a zero com constante de tempo T₂^{*}. O sinal gerado (FID) é transformado em um sinal no domínio das freqüências pela TF. Em geral é assim que acontece um experimento de RMN.

Um exemplo simples de um experimento de Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional consiste na excitação da amostra com um pulso de 90⁰ e, após este ter sido aplicado, a captação do sinal durante a evolução temporal do sistema. Em um espectro Unidimensional todas as informações estão contidas nas duas dimensões do espectro: freqüência e intensidade.

Como visto no capítulo anterior um ângulo de excitação $\alpha = 90^{0}$ coloca a magnetização total no plano xy e um ângulo com $\alpha = 180^{0}$ inverte a magnetização total para o eixo z negativo. Os campos de radiofreqüência que fornecem estes ângulos são chamados de pulsos de $90^{0}(\pi/2)$ e $180^{0}(\pi)$ respectivamente. Estes dois pulsos formam a base para a formação de uma vasta gama de seqüências de pulsos aplicadas em RMN unidimensional, cada uma com um diferente objetivo. A grande utilidade dos pulsos de $\pi/2$ e π pode ser demonstrada através dos experimentos aplicados para medir os tempos de relaxação T_1 e T_2 .

3.6.1 Medidas do tempo de Relaxação Longitudinal T_1

Existem vários métodos para medir o tempo de relaxação longitudinal T_1 entre eles a *inversão-recuperação*, a saturação-recuperação e a saturação progressiva. O método mais utilizado é o de *inversão-recuperação*, no qual inverte-se a magnetização, através de um pulso de 180^0 , e em seguida deixase recuperar durante um período de tempo τ . Depois aplica-se um pulso de 90^0 para leitura do sinal (Figura 3.9). Logo após a plicação do pulso de 90^0 surge um sinal FID cuja amplitude é diretamente proporcional ao valor da magnetização z no instante τ . Portanto variando os valores de τ pode-se obter a evolução temporal da magnetização longitudinal e por conseqüência o valor do tempo de relaxação longitudinal T_1 .

A melhoria da relação sinal-ruído impõe a utilização de vários pulsos e por isso repete-se o processo n vezes com um intervalo de tempo de espera antes do pulso de 180° que seja superior a cinco vezes T_1 para que a magnetização retorne completamente à posição inicial.



Figura 3.9: Seqüência de pulsos de inversão-recuperação usada para medir o tempo de relaxação T_1 .

A partir desta sequência de pulsos obtemos uma curva que pode ser ajustada com a seguinte equação [2]:

$$M_z = M_0 [1 - 2exp(-t/T_1)]$$
(3.12)

Como a intensidade do sinal I(t) é proporcional a $M_z(t)$ e $I(t = \infty)$ é proporcional à M_0 podemos derivar da equação acima uma nova equação:

$$I(t) = I(\infty)[1 - 2exp(-t/T_1)]$$
(3.13)

Com isso podemos obter o tempo de relaxação T_1 facilmente através de um ajuste exponencial dos dados experimentais I(t) para diferentes valores de t.

Um outro método convencional para se medir T_1 é o método de saturaçãorecuperação no qual inicialmente aplica-se um pulso de 90[°] transferindo a magnetização M_z para o plano xy ($M_z = 0$), criando assim uma efetiva saturação da magnetização e em seguida se aplica outro pulso de 90[°] para a aquisição. A curva obtida é ajustada com a equação:

$$M_z = M_0[1 - exp(-t/T_1)] \tag{3.14}$$



Figura 3.10: Medidas dos tempos de relaxação longitudinal e transversal da borracha natural.

3.6.2 Ecos de Spin - Medidas de T_2

A medida do tempo de relaxação T_2 está sujeita a dificuldades experimentais superiores às de T_1 . A observação do sinal de RMN depende da geração de coerência de fase. Após um pulso de 90⁰ é gerado coerência de fase que depois desaparece exponencialmente com uma constante de tempo T_2^* , omitindo qualquer informação sobre T_2 . Surge assim a necessidade de separar as contribuições da não homogeneidade do campo B_0 e de T_2 para o decaimento do FID ou para a largura a meia altura no espectro. Isto é feito pela aplicação dos denomidados ecos de spin. O experimento mais simples para gerar um eco de spin (fornecendo informação sobre T_2) é a seqüência de pulsos de Hahn [14].

Esta seqüência consiste de um pulso de 90^{0} aplicado ao longo do eixo x do referencial girante que gera magnetização transversal ao longo do eixo y. Espera-se o sistema evoluir durante um determinado intervalo de tempo τ . A magnetização começa a perder coerência por causa da relaxação longitudinal e da variação do campo devido às inomogeneidades em B_0 e assim precessam com uma variedade de freqüências. Em seguida um pulso de 180^{0} é aplicado e os spins rotacionam por um ângulo de 180^{0} em torno do eixo y. Novamente o sistema evolui e os spins, agora invertidos, serão alinhados para formar o eco de spin após um intervalo de tempo total de 2τ . Este intervalo de tempo total é referido como tempo de eco (TE).

Ao se formar um eco de spin os efeitos de inomogeneidade do campo B_0 são refocalizados e o decrescimento do sinal será causado exclusivamente pela relaxação transversal T_2 . A seqüência de eco de spin é uma das mais importantes seqüências para espectroscopia de RMN *in vivo*. Esta seqüência é usada para medir o tempo de relaxação T_2 através de diversos experimentos nos quais se varia o tempo de eco. As intensidades dos espectros obtidos de cada eco podem ser ajustadas a uma curva exponencial dada por

$$M_{xy}(\tau) = M_{xy}(0)exp(-\tau/T_2)$$
(3.15)

para se obter o tempo de relaxação T_2 . Outro método para se medir T_2 é o método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill[3].

3.7 Formalismo do Operador Produto

O formalismo do operador produto, do inglês *Product Operator Formalism* (*POF*), foi introduzido por Ernst e outros [15]. É fundamentado na teoria da matriz densidade [17] e utilizado para explicar a física dos spins sujeitos a seqüências de pulsos e interações magnéticas. É baseado nos operadores de



Figura 3.11: Formação do spin eco em um experimento de ecos de spin(A), os spins são excitados(B) e depois eles defasam no plano transverso durante a primeira metade do tempo de eco(C). Um pulso de 180° rotaciona os vetores magnetização ao longo do eixo y(D) e em seguida os spins se refocalizam na segunda metade do tempo de eco. No tempo de eco os spins estam refocalizados e o eco de spin é formado(E). Obviamente o sinal decaiu devido à relaxaxação por T₂.

spin nuclear cartesianos \hat{I}_x , $\hat{I}_y \in \hat{I}_z$ bem como no produto destas quantidades. O uso do POF é limitado a sistemas de spins fracamente acoplados (espectros de primeira ordem), ou seja não há efeitos de segunda ordem.

No POF as mudanças nos operadores de spin devido à evolução temporal do deslocamento químico e do acoplamento escalar são descritas como rotações no espaço cartesiano tridimensional.

Uma rotação contínua pode ser descrita como uma oscilação harmônica e apresenta uma superposição de funções seno e cosseno. Na figura 3.12 temos que um vetor \vec{A} alinhado ao longo do eixo x rotaciona sobre o eixo z em direção ao eixo y com uma freqüência ω .



Figura 3.12: Rotação de um vetor após um tempo Δt .

No POF representa-se como:

$$A_x \xrightarrow{\omega t A_z} A_x cos(\omega t) + A_y sen(\omega t) \tag{3.16}$$

O símbolo sobre a seta indica o ângulo e o eixo de rotação. As secções seguintes mostram como os operadores de spin evoluem no caso de precessão livre (deslocamento químico e acoplamento escalar) e aplicação de pulsos de RF.

3.7.1 Evolução do deslocamento químico

O Hamiltoniano descrevendo o deslocamento químico de um spin I pode ser expresso da seguinte forma $H = \Omega I_z$ onde $\Omega = \gamma B_0(1-\sigma) - \omega$ é o of f set (freqüência de precessão de Larmor) deste spin. A rotação dos operadores de spin cartesianos, no POF, após um intervalo de tempo t será dada por:

$$\hat{I}_{z} \xrightarrow{\Omega t \hat{I}_{z}} \hat{I}_{z}$$

$$\hat{I}_{x} \xrightarrow{\Omega t \hat{I}_{z}} \hat{I}_{x} cos(\Omega t) + \hat{I}_{y} sen(\Omega t)$$

$$\hat{I}_{y} \xrightarrow{\Omega t \hat{I}_{z}} \hat{I}_{y} cos(\Omega t) - \hat{I}_{x} sen(\Omega t)$$
(3.17)

A evolução temporal dos operadores de spin cartesianos \hat{I}_x, \hat{I}_y e \hat{I}_z é semelhante à evolução temporal das magnetizações macroscópicas M_x, M_y e M_z .

3.7.2 Evolução do acoplamento escalar

Considerando um sistema com dois spins I e S o hamiltoniano para a evolução de I sobre a ação do acoplamento escalar com o spin S pode ser escrito como $H = 2\pi J_{IS}I_zS_z$. J_{IS} é a constante de acoplamento escalar entre os dois spins. Com isso temos para a rotação dos operadores de spin após um intervalo de tempo t.

$$\hat{I}_{z} \xrightarrow{\pi J_{IS}t2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z}} \hat{I}_{z}$$

$$\hat{I}_{x} \xrightarrow{\pi J_{IS}t2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z}} \hat{I}_{x}cos(\pi J_{IS}t) + 2\hat{I}_{y}\hat{S}_{z}sen(\pi J_{IS}t)$$

$$\hat{I}_{y} \xrightarrow{\pi J_{IS}t2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z}} \hat{I}_{y}cos(\pi J_{IS}t) + 2\hat{I}_{x}\hat{S}_{z}sen(\pi J_{IS}t)$$

$$(3.18)$$

As coerências do tipo $2\hat{I}_i\hat{S}_z$ (i=x,y,z) evoluirão da seguinte forma:

$$2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z} \xrightarrow{\pi J_{IS}t2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z}} 2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z} \qquad (3.19)$$

$$2\hat{I}_{y}\hat{S}_{z} \xrightarrow{\pi J_{IS}t2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z}} 2\hat{I}_{y}\hat{S}_{z}cos(\pi J_{IS}t) - \hat{I}_{x}sen(\pi J_{IS}t)$$

$$2\hat{I}_{x}\hat{S}_{z} \xrightarrow{\pi J_{IS}t2\hat{I}_{z}\hat{S}_{z}} 2\hat{I}_{x}\hat{S}_{z}cos(\pi J_{IS}t) - \hat{I}_{y}sen(\pi J_{IS}t)$$

A evolução de todos os operadores de spin do tipo $2\hat{I}_i\hat{S}_j$ (i,j=x,y,z) pode ser obtida através das fórmulas acima simplesmente trocando os índices.

3.7.3 Pulsos de Radiofreqüência

A aplicação de um pulso de RF ao longo do eixo x vai rotacionar a magnetização, inicialmente no eixo z, em torno do plano zy.



Figura 3.13: Rotação da magnetização no plano zy.

Para um pulso no eixo x positivo que implique em uma rotação de β^{o} teremos para a evolução dos operadores de spin:

$$\hat{I}_{z} \xrightarrow{\beta I_{x}} \hat{I}_{z} cos(\beta) - \hat{I}_{y} sen(\beta)$$

$$\hat{I}_{y} \xrightarrow{\beta \hat{I}_{x}} \hat{I}_{y} cos(\beta) + \hat{I}_{z} sen(\beta)$$

$$\hat{I}_{x} \xrightarrow{\beta \hat{I}_{x}} \hat{I}_{x}$$
(3.20)

Quando os operadores comutam pode-se aplicar as ações do deslocamento químico, acoplamento escalar e pulsos de RF um após o outro sendo que o resultado final não sofrerá interferência.

3.7.4 Um experimento unidimensional simples

Um experimento unidimensional convencional para gravar um espectro de próton é representado como o seguinte:



Figura 3.14: Um experimento unidimensional simples consistindo de um pulso de 90° .

Pulsos de 90° são descritos como retângulos estreitos e de 180° como retângulos mais largos. Neste experimento um pulso de 90° aplicado ao longo do eixo x é seguido pela aquisição do sinal FID. Usando o POF podemos sintetizar os eventos para um sistema de dois spins. Inicialmente começamos com a magnetização de equilíbrio na direção z. Os eventos subseqüêntes são:

1. Pulso de 90° na direção x

$$\hat{I}_z \stackrel{90(\hat{I}_x)}{\longrightarrow} -\hat{I}_y \tag{3.21}$$

2. Evolução do deslocamento químico

$$-\hat{I}_y \xrightarrow{\Omega t \hat{I}_z} -\hat{I}_y cos(\Omega t) + \hat{I}_x sen(\Omega t)$$
(3.22)

3. Evolução do acoplamento escalar

$$-\hat{I}_{y}cos(\Omega t) + \hat{I}_{x}sen(\Omega t) \xrightarrow{\pi J_{IS}t(2I_{z}S_{z})} - \hat{I}_{y}cos(\Omega t)cos(\pi J t) + 2\hat{I}_{x}\hat{S}_{z}cos(\Omega t)sen(\pi J t)$$

$$+\hat{I}_{x}sen(\Omega t)cos(\pi J t) + 2\hat{I}_{y}\hat{S}_{z}sen(\Omega t)sen(\pi J t)$$

$$(3.23)$$

Os efeitos do deslocamento químico e acoplamento escalar podem ser calculados em ordem arbitrária.

Durante uma seqüência de pulsos mais longa do que simplesmente um pulso de 90° todas as possíveis interações precisam ser calculadas o que pode conduzir a um extenso número de termos. No entanto ao final da seqüência somente um número limitado de termos conduz a uma magnetização detectável e estes são os únicos termos de interesse pois são aqueles que contribuem para o sinal (denominados termos de "single-quantum" cujos valores esperados são diferentes de zero).

Capítulo 4

Lipoproteínas

4.1 Uma abordagem sobre a Aterosclerose

Aterosclerose é uma terminologia empregada para descrever o espessamento e endurecimento das lesões nas artérias de grande e médio calibre (como as carótidas, artérias dos membros inferiores, coronárias, e vasos do polígono de willis), e nas artérias elásticas tais como aorta e ilíacas. Esta terminologia é usada em contraposição com o termo "arteriosclerose" que é um termo genérico para descrever o espessamento e endurecimento de todos os tipos de vasos sanguíneos.

A aterosclerose (um tipo de arteriosclerose) é responsável pela maioria dos casos de infarto cerebrais e de miocárdio representando a principal causa de morte nos Estados Unidos e no mundo ocidental [35], [36]. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, ela é a principal causa de doenças e óbitos na população de mais de 50 anos.

4.1.1 A Doença

A Aterosclerose é uma doença crônica-degenerativa que leva à obstrução das artérias pelo acúmulo de lipídios (principalmente colesterol) em suas paredes. A Aterosclerose pode causar danos a órgãos importantes ou até mesmo levar à morte. Tem início nos primeiros anos de vida, mas sua manifestação clínica geralmente ocorre no adulto. É causada pelo acúmulo de lipídeos (gorduras) nas artérias, que podem ser fabricados pelo próprio organismo ou adquiridos através dos alimentos. Ela começa quando monócitos (um tipo de leucócito mononuclear - célula de defesa) migram da corrente sangüínea e depositam-se nas paredes arteriais e passam a acumular gorduras, principalmente colesterol, formando as placas ateroscleróticas ou ateromas. As artérias afetadas pela aterosclerose perdem elasticidade e, à medida que essas placas de gordura crescem, a luz das artérias se estreitam, interferindo no fluxo sanguíneo.

Eventualmente essas placas podem se romper, destacando-se da parede. Quando isto acontece os seguintes fenômenos podem acontecer: coagulação local e a conseqüente formação de um trombo; ou o desprendimento e deslocamento pela luz do vaso, com a formação de um êmbolo.

Os sintomas dependem do órgão afetado pela obstrução da artéria. Assim, se as artérias acometidas são as que levam sangue para o cérebro, a pessoa poderá sofrer um acidente vascular cerebral AVC (derrame); ou se são aquelas que levam sangue para as pernas, ela sentirá dor ao caminhar (claudicacão intermitente); no caso de obstrução nas artérias coronárias (vasos que levam sangue ao coração), o sintoma será dor no peito, o que caracteriza a "angina".



Esta doença pode afetar as artérias de órgãos vitais como o cérebro, coração e rins.

Figura 4.1: Desenvolvimento da placa de aterosclerose

Estudos mostraram que a aterosclerose incide com maior frequência e intensidade em indivíduos que têm algumas características, que foram denominadas "fatores de risco" [41], [43] tais como: idade (após cerca de 50 anos), sexo masculino, hiperlipidemia(aumento da gordura circulante no sangue), tabagismo, hipertensão, sedentarismo.

O diagnóstico da aterosclerose é dado pela história clínica do paciente, pelo exame físico com a palpação dos pulsos arteriais e por exames laboratoriais, eletrocardiograma, ultra-sonografia, exame Doppler e arteriografia. O angiologista e/ou cirurgião vascular é o médico indicado para este tipo de avaliação. Para cada fase evolutiva da aterosclerose e para cada órgão acometido pela doença há uma forma diferente de terapia, mas todas passam por um tratamento básico de controle da hiperlipidemia, do tabagismo, da hipertensão, do diabetes e da obesidade.

4.1.2 Formação e Evolução da Aterosclerose

De todas as formas de esclerose (endurecimento) arterial, a aterosclerose é a mais importante posto que as placas fibro-ateromatosas que a caracterizam levam à oclusão do vaso e à instalação de várias síndromes isquêmicas graves (infarto do miocárdio, ictus cerebral, gangrena de membros, etc).

A Aterosclerose agride essencialmente a camada íntima da artéria. A lesão típica das formas avançadas da doença é a "placa fibrosa", formação esbranquiçada que profunde na luz do vaso, (ver figura 4.2).

A placa é coberta por uma capa fibrosa que consiste em várias camadas de células achatadas envoltas numa matriz extracelular de tecido conjuntivo denso, ao lado de lamínulas de material amorfo, proteoglicanos, fibras colágenas e células musculares lisas. No interior da "placa", abaixo da capa fibrosa, há um acúmulo de "células espumosas", íntegras ou rotas, e de tecido conjuntivo. As "células espumosas" são derivadas dos macrófagos (macrócitos e linfócitos sanguíneos, e células musculares lisas da parede arterial) que contém gotículas de gordura, principalmente sob a forma de colesterol livre e esterificado. Este colesterol é derivado do sangue e não produzido no local. No centro da placa fibrosa há uma área de tecido necrótico, debris, cristais de colesterol extracelular e de cálcio.

Com a evolução do processo ateromatoso ocorrem diversos eventos:

1) Vindos da camada adventícia nascem vasos que fazem intensa vascularização da média e da íntima;

2) Aumenta a deposição de cálcio e de células necróticas;

3) Surgem rupturas, fissuras e hemorragias da placa;

4) A placa pode ulcerar e/ou se desprender;

5) A exposição da subíntima ulcerada gera a deposição de plaquetas, coagulação sanguínea, trombose e eventual oclusão do vaso, etc.

Acredita-se que a primeira lesão estrutural na aterogênese é a "estria gordurosa" [44] [48], que consiste no acúmulo, sob o endotélio, de células de esteres de colesterol ("células espumosas"), cercadas por depósitos de lipídeos. As estrias gordurosas aparecem como áreas amareladas no endotélio vasal e já estão presentes em crianças de tenra idade. Elas não perturbam

CAPÍTULO 4. LIPOPROTEÍNAS

a circulação do sangue, mas se localizam nos mesmos sítios onde mais tarde se localizarão as placas fibrosas - daí a idéia de serem elas as precursoras da placa. Aparentemente estas estrias gordurosas são formadas por monócitos (e linfócitos e células musculares lisas) preenchidos de gordura por um processo de fagocitose.

Desenvolvimento da placa de aterosclerose



Figura 4.2: Oclusão na luz do vaso

4.1.3 Espectroscopia de RMN e Aterosclerose

Estudos demonstraram que os vários estágios da doença estão diretamente relacionados com a composição das placas ateroscleróticas (ateromas). Vimos na secção anterior que a primeira lesão é a estria gordurosa (células preenchidas com esteres de colesterol sob o endotélio) formada por monócitos, linfócitos e células musculares lisas. Nos estados mais avançados, as lesões possuem uma capa fibrótica e abaixo desta as "células espumosas" derivadas dos macrófagos que contém gordura principalmente sob a forma de colesterol. Com o agravamento do processo as lesões podem apresentar um conteúdo ainda maior destes compostos deixando-as facilmente fraturáveis.

O estado em que se encontram as ateromas é dependente da constituição das mesmas. A Espectroscopia de RMN *in vitro* é uma técnica poderosa para identificação de componentes químicos e do estado físico dos constituintes das placas e sua utilização pode permitir determinar o grau de evolução das placas e conseqüentemente da doença.

Exceto por extração química, nenhuma técnica é efetiva na caracterização dos componentes lipídicos de uma placa de ateromas. Ultra Som intravascular ou angioscopia *in vivo* e avaliação histopatológica *in vitro* geram informação estrutural de alta resolução mas pecam com respeito a composição química.

Espectroscopia de RMN do núcleo de ¹³C permite a caracterização não destrutiva da composição química lipídica permitindo detectar e caracterizar

todos os estágios ateromáticos . A ruptura das placas é o fator mais importante para o infarto do miocárdio e foi demonstrado que a vulnerabilidade das placas é dependente das características bioquímicas de sua concentração lipídica.

4.2 Lipídios e Doença Cardiovascular

Doença Cardiovascular - *Coronary Heart Disease* (CHD) - constitui a principal causa de morte em países desenvolvidos. O colesterol, um constituinte essencial das membranas celulares e o precusor de ácidos biliares, vitamina D e hormôneos esteróides, tem sido há muito tempo relacionado com o desenvolvimento da aterosclerose.

Lipídios como triglicérides e colesterol esterificado advindos da dieta ou produzidos endogeneamente são armazenados em partícluas denominadas lipoproteínas (no intestino e no fígado) e transportados no plasma sanguíneo para os tecidos periféricos. Níveis de colesterol elevados no plasma sanguíneo há muito tempo é tomado como um fator de aumento de incidência de doença cardiovascular e infarto do miocárdio.

As lipoproteínas são classificadas em três grandes classes, baseado nas suas densidades: Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa Very Low Density Lipoproteins (VLDL), Lipoproteínas de Densidade Baixa Low Density Lipoproteins (LDL) e Lipoproteínas de Densidade Alta High Density Lipoproteins (HDL). Semelhantemente ao colesterol, o LDL-colesterol (LDL-C) colesterol transportado pelas partícluas LDL - em altos níveis também aumenta o risco de CHD. No entanto, o HDL colesterol (HDL-C) - colesterol transportado pelas partículas HDL - possui uma associação negativa com o risco de CHD, o que significa que altos níveis de HDL-C conferem um risco reduzido [18]. Devido às suas respectivas associações com o risco de doença cardiovascular, o LDL-C é normalmente designado de "mau"colesterol, e o HDL-C como "bom" colesterol.

A prevenção de doenças cardiovasculares é um importante fator de saúde pública e se baseia na identificação precisa de indivíduos em risco elevado. Isto é feito pela análise das concentrações de colesterol total, LDL-C e HDL-C no sangue de acordo com os níveis recomendados pelo National Cholesterol Education Program (NCEP)[19]. Inicialmente a classificação é feita em três categorias baseadas na concentração de colesterol total: "desejável" (< 2.00g/L, < 5.17mmol/L), "intermediário" (2.00 - 2.39g/L, 5.17 - 6.18mmol/L), e "alto" ($\geq 2.40g/L$, > 6.21mmol/L). Indivíduos nas categorias "intermediária" e "alta" requerem uma outra análise para o colesterol de LDL (LDL-C) e de HDL (HDL-C) para guiar decisões com relação a mudanças na dieta ou tratamento com medicamentos. Um problema relacionado a esta avaliação do colesterol é que um número significante de indivíduos que possuem valores de colesterol total desejáveis, mas que estão em condições de risco por causa de baixas concentrações de HDL-C, não será identificado pelas normas do NCEP.

Em prática clínica LDL-C não é medido diretamente. O procedimento clínico amplamente usado para medir as concentrações de LDL-C é o proposto por Friedewald[21] no qual são feitas primeiramente medidas do colesterol total (CT), triglicérides (TG) e HDL-C. Depois o LDL-C é estimado usando a fórmula de Friedewald, LDL-C = CT - HDL-C -TG/5. Portanto o erro estimado na medida do LDL-C conterá a imprecisão de todas as três grandezas contidas na fórmula.

Outros fatores são levados em conta na avaliação do risco de Doença Cardiovascular tais como o histórico de ataque cardíaco e infarto do miocárdio na família, o diabetes, mas os principais fatores são cigarro, hipertensão, baixo HDL-C, histórico na família de prematura CHD e idade.

Como mencionado, a avaliação do risco de doença cardiovascular tem sido tradicionalmente focalizada no colesterol. As pessoas sabem que exitem o colesterol "mal" (LDL-C) e o colesterol "bom" (HDL-C), mas é necessário entender que, na verdade, são as partículas de LDL e HDL que funcionalmente são "más" e "boas", com o colesterol contido nas mesmas servindo como um substituto para medidas das concentrações das lipoproteínas. Fredrickson, Levy e Lees[26] notaram que as anormalidades nas concentrações de lipídios plasmáticos (dislipidemia) podem ser direcionadas para dislipoproteinemia e que focalizar nas lipoproteínas oferece vantagens no reconhecimento e controle destas disordens. Uma das limitações evidenciadas quando se usa o colesterol para avaliação do risco de CHD é que não é levado em consideração que a quantidade de colesterol por partícula varia de pessoa para pessoa devido a diferenças nas quantidades relativas do colesterol esterificado e triglicérides no interior da partícula e também por causa das diferenças no diâmetro da partícula[26].

Clinicamente o nível de triglicérides tem sido usado como um substituto para os níveis da lipoproteína VLDL e os valores de LDL-C e HDL-C são indicadores das concentrações das partículas de LDL e HDL respetivamente. Isto acontece por causa do extensivo conjunto de dados mostrando uma intensa relação entre níveis anormais de lipídios com aterosclerose e eventos cardiovasculares[26], e ainda a dificuldade que se tem de medir lipoproteínas diretamente. No entanto esta dificuldade foi superada com uma nova técnica para quantificar lipoproteínas que usa os sinais de RMN emitidos pelas lipoproteínas de diferentes tamanhos como base para sua quantificação[21]. Este método oferece significantes vantagens sobre os métodos de quantificação existentes e é uma grande ferramenta para a avaliação do risco de CHD.

4.3 Definição, Estrutura e Função

Após um processo de ultracentrifugação o plasma pode ser extraído do sangue humano. O plasma humano consiste de muitos metabólitos, lipoproteínas e proteínas plasmáticas tais como albumina, globulina e fibrinogênio.

4.3.1 Definição

Lipoproteínas são partículas globulares que consistem de um interior apolar de triglicérides e colesterol esterificado circundado por uma capa anfifílica (capa que possui ao mesmo tempo uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica) de proteína, fosfolipídios e colesterol.

Os lipídios, tais como os fosfolipídios, triglicérides e colesterol possuem natureza hidrofóbica que proíbe o transporte direto no plasma. O empacotamento dos lipídios *in vivo* em partículas denominadas lipoproteínas facilita seu transporte pelos órgãos e tecidos. Os lipídios da dieta e sintetizados no corpo são armazenados dentro das lipoproteínas e transportados no plasma sanguíneo para os tecidos periféricos. Os lipídios advindos da dieta contém ácidos gordurosos que foram esterificados com colesterol, denominado colesterol esterificado, ou com glicerol, denominado triglicérides. Estes ácidos grodurosos são cadeias de hidrocarbonetos longas que possuem um grupo metil (CH_3) de um lado e um ácido carboxílico (COOH) no outro.

As lipoproteínas contém tanto lipídios quanto proteínas. As proteínas contidas nas lipoproteínas são chamadas apolipoproteínas e são importantes para o metabolismo das lipoproteínas.



Figura 4.3: Estrutura química dos lipídios encontrados nas lipoproteínas. 1 - Colesterol, 2 - Colesterol esterificado (CE), 3 - Triglicéride (TG), 4 - Fosfolipídio (PL).

4.3.2 Estrutura

As lipoproteínas são partículas menores que as hemáceas, visíveis apenas à microscopia eletrônica. São formadas por um "core"hidrofóbico (núcleo central) contendo ésteres de colesterol e de glicerol. Envolvendo este núcleo há uma camada hidrofílica fina de proteínas e lipídios (formando uma monocamada lipídica) composta de colesterol livre e fosfolipídios, principalmente fosfatidilcolina. Esta camada possui uma espessura de aproximadamente 2nm e nela estão mergulhadas as apoproteínas que flutuam como troncos de madeira na água.

CAPÍTULO 4. LIPOPROTEÍNAS

Ao se passar das partículas de maior tamanho para as de menor, a densidade protéica no envoltório externo aumenta e o teor de lipídios no núcleo central diminui. HDL, lipoproteína de menor tamanho, possui metade do seu peso formado por apoproteína, enquanto que LDL possui quase 50% do seu peso representado pelo colesterol (existe somente uma ApoB-100 por molécula de LDL). Já a lipoproteína VLDL tem apenas 10% de proteína e 90% de lipídios e os quilomícrons tem 98% de lipídios.

As densidades das lipoproteínas são inversamente proporcionais à quantidade de lipídios, ou seja quanto maior a quantidade de lipídio carregada pelas lipoproteínas menor a densidade.



Figura 4.4: Representação esquemática de uma lipoproteína. O núcleo apolar possui colesterol esterificado e TG. A superfície é constituída de fosfolipídios com a extremidade polar apontando para a superfície. Junto com eles estão uma ou mais apolipoproteínas e colesterol livre. Magneticamente o núcleo é isotrópico enquanto a superfície é anisotrópica.

4.3.3 Nomenclatura e Classificação

As lipoproteínas são partículas que passam continuamente por processos metabólicos e por isso elas possuem propriedades e composição variáveis (ver tabela 4.1). Estas partículas são classificadas em diferentes formas baseado nas suas propriedades físicas. A classificação mais conhecida é baseada na densidade e divide as lipoproteínas em três grandes grupos de Densidade Muito Baixa Very Low Density Lipoproteins (VLDL), de Densidade Baixa Low Density Lipoproteins (LDL) e de Densidade Alta High Density Lipoproteins (HDL). Outros dois grupos também são relacionados: os Quilomícrons, que são menos densos do que VLDL e as lipoproteínas de densidade intermediária Intermediate Density Lipoproteins (IDL) que possui densidade variando entre as densidades de VLDL e LDL. As densidades das partículas aumentam dos quilomícrons para HDL enquanto que o tamanho das partículas diminuem dos quilomícrons para HDL. Além da densidade a porcentagem de proteína também aumenta dos quilomícrons para HDL.



Figura 4.5: Figura mostrando a relação entre o tamanho e a densidade das partículas e a proporção de lipídios nas lipoproteínas.

	Quilomícrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidade	< 0.95	< 1.006	1.006 -	1.019 -	1.063 -
$(g.cm^{-3})$			1.019	1.063	1.210
Diâmetro (Å)	750 - 12000	300 - 800	250 - 350	180 - 250	50 - 120
% de proteína ^a	1.5 - 2.5	5 - 10	15 - 20	20 - 25	40 - 55
% de fosfolipídeos ^a	7 - 9	15 - 20	22	15 - 20	20 - 35
% de colesterol	1 - 3	5 - 10	8	7 - 10	3 - 4
$livre^a$					
% de triglicérides ^b	84 - 89	50 - 65	22	7 - 10	3 - 5
% de colesterol	3 - 5	10 - 15	30	35 - 40	12
$esterificado^b$					
Principais	A-I, A-II, B-48,	B-100, C-I,	B-100, C-	B-100	A-I, A-II,
apolipoproteínas	C-I, C-II, C-III,	C-II, C-III,	III, E		C-I, C-II,
	E	Е			C-III, D, E

Tabela 4.1: Características das principais classes de lipoproteínas no plasma humano. a Componentes da superfície e b Componentes do núcleo.

4.3.4 Metabolismo das Lipoproteínas

As gorduras absorvidas no intestino são armazenadas em partículas grandes e ricas em triglicérides, os quilomícrons. Estes, então, passam por lipólise (os triglicerídios são hidrolisados em monoglicerídio e ácido graxos pela ação da enzima lipoproteína lipase (LPL)) para formar os remanescentes dos quilomícrons que são captados pelo fígado através de um receptor da apolipoproteína E. Os remanesecentes de quilomícrons também podem ser convertidos em LDL. A LDL formada é captada pelo fígado e outros tecidos através dos receptores de LDL dos mesmos que reconhecem tanto a apo B-100 como a apo E. Se a LDL estiver modificada ela é detectada pelos receptores scavenger (proteína responsável pelo reconhecimento da LDL modificada) nos macrófagos. As LDL são as principais lipoproteínas transportadoras de colesterol no homem, responsáveis por cerca de 60 a 70% do transporte de colesterol total plasmático. As LDLs são partículas pequenas, com cerca de 180 a 250Å de diâmetro, constituídas por uma molécula de apoB-100, contendo principalmente colesterol esterificado no núcleo. As LDL são removidas da circulação mais lentamente que as outras lipoproteínas, sendo preferencialmente captadas por receptor LDL de células em processo ativo de divisão ou por tecidos que utilizam colesterol na síntese de hormôneos esteróides ou sais biliares. Estas partículas, devido ao seu pequeno tamanho, atravessam o endotélio e atingem a parede vascular.

A LDL é a mais aterogênica das lipoproteínas. Outros componentes
aterogênicos são partículas pequenas de LDL, baixas concentrações de HDL-Colesterol no soro, e altas concentrações de triglicerídeos. A LDL modificada por agressão, acetilação ou oxidação resulta na formação de células espumosas derivadas de macrófagos e de células musculares lisas. A oxidação da LDL vem recebendo muita atenção baseada em evidências que indicam sua presença *in vivo*, em lesões ateroscleróticas.

A HDL pode ser sintetisada tanto pelo fígado quanto pelo intestino. A mesma coleta lipídios dos quilomícrons e VLDL enquanto estes estão passando pelo processo de lipólise (hidrolisação dos triglicerídios em monoglicerídio e ácido graxo pela ação da enzima lipoproteína lipase). Elas são as principais responsáveis pela remoção do excesso de colesterol. Estas partículas são sintetizadas tanto no fígado quanto no intestino. A HDL atua no chamado transporte reverso do colesterol (TRC). O transporte reverso do colesterol é um processo pelo qual o excesso de colesterol é transportado das células periféricas para o fígado, sendo então excretado pela bile ou incorporado em VLDL. O TRC é o único meio pelo qual ocorre a eliminação do colesterol dos tecidos, evitando seu acúmulo. Se ocorrer alguma alteração nas etapas do TRC, a conseqüência será um alto risco de doença cardiovascular. Existe uma correlação inversa entre a concentração plasmática de HDL e o risco de infarto do miocárdio, conferindo proteção contra a aterosclerose.

LP	Função	ApoLP Es-	ApoLP de Su-
		trutural	perfície
QM	Transporte de Triglicerídios do	B-48	A-I, A-IV,C's
	intestino ao tecido adiposo, mus-		
	cular e hepático		
VLDL	Transporte de colesterol e	B-100	C's e E's
	triglicerídios do fígado para		
	outros tecidos		
LDL	Transporte de colesterol para o	B-100	-
	fígado e tecidos		
HDL-2	Transporte de colesterol para o	A-I/A-II	C's e E's
	fígado pela "via direta ou indi-		
	reta"		
HDL-3	Remoção do colesterol dos tecidos	A-I/A-II	C's e E's

Tabela 4.2: Função Metabólica das Lipoproteínas (LP) e principais Apolipoproteínas (ApoLP) estruturais e de superfície.

4.4 Medindo as Lipoproteínas

4.4.1 Lipídios e Lipoproteínas

Métodos enzimáticos são usados para medir colesterol total (TC), triglicérides (TG) e HDL-C. A medida do colesterol de HDL envolve precipitação para remover LDL e VLDL. Como já foi dito LDL-C é estimado através da fórmula TC - (HDL-C) - (TG/5), expresso em mg/dL. Quando usado TG/2,2 em vez de TG/5 o resultado é expresso em mmol/L.

Existe uma relação de substituição dos lipídios para as lipoproteínas que foi descrita por Fredrickson, Levy e Lees[20]. Eles notaram que as anormalidades nas concentrações de lipídios no plasma (dislipidemia) podem ser direcionadas à dislipoproteinemia e isto fornece vantagens no reconhecimento e avaliação destas disordens. No entanto medidas de lipídios como substituto para medidas de lipoproteínas não fornece resultados verdadeiros. Já é sabido que as lipoproteínas interagem com a parede arterial possuindo assim importante papel no desenvolvimento da ateroscleorse.

Pelo fato de que as medidas de lipoproteínas são relativamente complexas, então triglicérides continua como um substituto para VLDL e LDL-C e HDL-C como indicadores das concentrações de partículas de LDL e HDL.

Algumas apolipoproteínas possuem relação direta com os níveis de lipoproteínas e por isso medidas de apolipoproteínas têm sido usadas como informação extra na avaliação do risco de doença cardiovascular.

4.4.2 Limitação dos métodos existentes para medir Lipoproteínas

As classes e subclasses de lipoproteínas podem ser quantificadas por uma variedade de técnicas analíticas. A mais comum e antiga é a ultracentrifugação: ajustando apropriadamente a densidade do plasma a ultracentrifugação pode ser usada para isolar as classes bem como as subclasses dentro destas. No entanto este processo envolve várias etapas e toma vários dias. Cromatografia é outra técnica através da qual usa-se um gel para isolar as partículas pelo tamanho. A Eletroforese é um método amplamente usado para medidas de subclasses de LDL e HDL. Esta técnica possui problemas devido a necessidade de se fazer um gel de gradiente uniforme. Por ser uma técnica refinada está confinada a poucos laboratórios especializados. Devido ao tempo e trabalho envolvido as técnicas citadas não são ideais para rotina clínica.

Há alguns anos atrás Otvos e seus colaboradores[21] propuseram um novo método para a quantificação de lipoproteínas. Este novo método utiliza a espectroscopia de RMN como uma ferramenta analítica-quantitativa a fim de caracterizar as lipoproteínas de diferentes tamanhos. Neste método não existe a necessidade de separação física das partículas e mede tanto as classes quanto as subclasses de liporpoteínas. Não há também a necessidade de qualquer espécie de reagentes e possui vantagens com relação a custo e tempo quando comparado com outros métodos existentes.

4.5 Quantificação de Lipoproteínas por Espectroscopia de RMN

Em vez de basear a quantificação de lipoproteínas em medidas de lipídios ou apolipoproteínas a técnica por RMN usa os sinais característicos emitidos pelas lipoproteínas de diferentes tamanhos como base para sua quantificação.

A RMN de próton tem sido extensivamente usada para identificar metabólicos no plasma e em outros fluidos biológicos. A grande utilização da RMN de próton em fluídos biológicos começou com o advento de excelentes técnicas de supressão do sinal da água.

O sinal emitido pelas lipoproteínas vem dos grupos metil terminais dos lipídios contidos dentro das partículas. O colesterol esterificado e triglicérides no núcleo da partícula contribuem com 3 grupos metil cada e os fosfolipídios junto com o colesterol livre na camada superficial contribuem com 2 grupos metil cada. O número total de grupos metil contidos dentro de uma classe de partículas é, em aproximação, dependente somente do diâmetro da partícula e não é afetado pelas diferenças na composição lipídica que surgem devido à variabilidade nas quantidades relativas de colesterol esterificado e triglicérides no interior da partícula, nos graus de insaturação nas cadeias de ácidos gordurosos dos lipídios e na composição de fosfolipídios. Por isso, o sinal dos grupos metil emitido por cada classe (ou subclasse) de lipoproteína serve como uma medida direta da concentração desta classe (ou subclasse).

4.5.1 Medidas de classes de Lipoproteínas

A figura seguinte mostra um espectro de RMN de próton de uma amostra de plasma adquirido em um espectrômetro de 400MHz.



Figura 4.6: Espectro de RMN do plasma sanguíneo [23]. 1 - prótons dos grupos metil terminais -CH₃, 2 - prótons dos grupos metil enos -CH₂.

O pico de deslocamento químico dos lipídios mais intenso surge dos átomos de hidrogênio das unidades repetitivas de CH_2 (grupos metileno). O sinal que surge dos grupos metil na faixa de 0,7-0,9ppm são mais simples espectroscopicamente se avaliarmos o seu ambiente químico pois se localizam nas pontas terminais dos lipídios. Por isto as medidas de lipoproteínas são feitas com base no sinal dos grupos metil do plasma. Este sinal tem origem nos prótons dos grupos metil dos fosfolipídios, colesterol livre, colesterol esterificado e triglicérides que são espectroscopicamente indistinguíveis como visto na secção anterior. O sinal metil detectado é portanto proporcional ao conjunto de lipídios carregados pelas lipoproteínas.

Os sinais de RMN de ¹H dos grupos metil (CH_3) e metileno (CH_2) dos lipídios das lipoproteínas se deslocam para freqüências mais baixas com a

diminuição do tamanho da partícula. A existência deste comportamento aponta para algum mecanismo físico por trás dele. Inicialmente foi sugerido que os lipídios no interior da partícula e na superfície possuem diferentes susceptibilidades magnéticas e os efeitos de deslocamento de freqüências com o tamanho surgiriam porque a razão de lipídios da superfície para o interior da partícula varia continuamente com o diâmetro da partícula caracterizando um ambiente químico diferente para cada partícula[28].

J. Lounila, M. Ala-Korpela e J. Jokisaari introduziram um modelo simples para as lipoproteínas envolvendo a anisotropia da susceptibilidade magnética que conduz de uma maneira natural à freqüência dependente do tamanho da partícula com forma funcional, magnitude e sinal corretos para todos os sinais de RMN dos lipídios das lipoproteínas[28]. Neste modelo a lipoproteína é simulada por uma micela esfericamente simétrica de raio R_2 consistindo de um núcleo de raio R_1 e uma casca superficial esférica de espessura $\Delta = R_2$ - R_1 (Figura abaixo).



Figura 4.7: Modelo esquemático introduzido para uma lipoproteína

O núcleo hidrofóbico (região 1) e o meio circundante à micela (região 3) estam em um estado líquido isotrópico, enquanto que as moléculas na superfície (região 2) estam radialmente orientadas. Isto significa que a susceptibilidade magnética da casca superficial é anisotrópica: $\Delta \chi_2 = \chi_{2||} - \chi_{2\perp}$, onde $\chi_{2||}$ e $\chi_{2\perp}$ são as susceptibilidades volumétricas paralela e perpendicular ao raio vetor \vec{r} da micela, respectivamente. Este efeito faz com que no resultado para o cálculo da i-ésima linha de ressonância na região nuclear da micela surja uma dependência explícita com R₂.

$$\upsilon_i(R_2) = \upsilon_i^0 + \frac{2}{3}\upsilon_0 \Delta \chi_2 ln \frac{R_2}{R_2 - \Delta}$$
(4.1)

Onde v_i^0 é a freqüência da linha na ausência da contribuição devido a $\Delta \chi_2$,

e v_0 é a freqüência do espectrômetro. Como vemos o modelo conduz de uma maneira natural a dependência da freqüência com o tamanho da micela. Esta dependência é ausente se $\Delta \chi_2 = 0$, ou seja se não existe ordem orientacional na micela. Portanto pode-se concluir que existe um mecanismo pelo qual a ordem orientacional interna das lipoproteínas pode afetar a posição das linhas de ressonância dos lipídios. Esta ordem é medida pela anisotropia da susceptibilidade magnética $\Delta \chi_2$ [28] pois a anisotropia surje devido a mesma.

Este modelo foi comprovado experimentalmente através de estudos de espectros de lipoproteínas isoladas nos quais obteve-se a variação experimental das ressonâncias dos grupos $CH_2 \ e \ CH_3$ com o tamanho da partícula. A equação mostrada acima se encaixa perfeitamente com os dados experimentais.



Figura 4.8: Freqüências experimentais (círculos) dos grupos $CH_2 e CH_3$ dos lipídios nas lipoproteínas em função do raio da lipoproteína R_2 . As curvas sólidas representam um ajuste para os pontos usando a equação 4.1.

Além das principais classes (VLDL, LDL, HDL), um total de 15 diferentes subclasses de lipoproteínas consistindo de 6 VLDL, 4 LDL e 5 HDL podem ser quantificadas por RMN. A variação no diâmetro das subclasses quantificadas por RMN estão mostradas na figura 4.9.

A principal informação obtida pelo método de Ressonância Magnética é a concentração de partículas uma vez que a intensidade do sinal de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos de hidrogênio dos prótons nos grupos metil.



Figura 4.9: Classes e subclasses quantificadas por RMN. Denominação das subclasses e variação no diâmetro para as 15 subclasses de lipoproteínas. O tamanho das subclasses foi determinado por eletroforese.

4.5.2 Vantagens da análise de Lipoproteínas por RMN

A técnica de RMN para análise de lipoproteínas é mais rápida do que as outras técnicas usadas mas a principal vantagem da técnica é a não necessidade de separação física das classes e subclasses de lipoproteínas. A precisão da técnica de RMN também é superior à dos métodos tradicionais. A eficiência com que os dados das classes de lipoproteínas podem ser gerados abre novos rumos na avaliação e controle do risco de doença cardiovascular na população.

Capítulo 5

Procedimento Experimental

5.1 O espectrômetro

Como em outras técnicas de espectroscopia, um espectrômetro de RMN constitui de uma fonte de radiação eletromagnética que atua sobre a amostra a ser estudada. Além disso, também é necessário um magneto para criar uma indução magnética, B_0 , estável e homogênea em toda a amostra. Um espectrômetro consiste, principlamente, das seguintes partes: magneto, *probe*, fontes de radiofreqüência, amplificadores, conversores analógico-digital, sistema de *lock*, sistema de *shimming* e um computador.

5.1.1 O magneto

Nos dias de hoje o campo magnético estático é fornecido por um magneto supercondutor. O solenóide que produz o campo é localizado em um banho de hélio líquido para que a resistência elétrica do mesmo seja zero. O ambiente de hélio é circundado por um ambiente de nitrogênio para diminuir as perdas por evaporação de hélio. Bobinas adicionais são localizadas no ambiente de hélio líquido a fim de corrigir distorções na homogeneidade do campo (*shim* supercondutor). O *room-temperature* (*R. T.*) shim tube interssessa o magneto verticalmente e possui as bobinas do shim RT na sua superfície. Estas são aquelas em que o usuário aplica correntes na tentativa de produzir campos magnéticos adicionais que corrigem pequenas distorções do campo principal (B₀). A amostra, comumente diluída em um solvente deuterado dentro de um tubo de vidro com 5mm de diâmetro, é colocada dentro de um *spinner* e baixada através do *upper barrel* para que entre no *probe* pelo topo.



Figura 5.1: Figura esquemática de um magneto.

5.1.2 Probe

O probe contém a bobina de transmissão e recepção (atualmente usa-se uma única bobina para ambas funções). No entanto muitos probes possuem duas bobinas. A bobina de recepção se encontra no centro do campo magnético. Uma vez abaixado o *spinner*, o tubo de ressonância é posicionado de tal forma que o líquido dentro (amostra) seja coberto pela bobina de recepção completamente. A bobina de transmissão/recepção não deve ser confundida com as bobinas para homogeneização do campo magnético. O *probe* é conectado ao preamplificador que está normalmente localizado próximo ao magneto, e que faz a primeira amplificação do sinal.

As fontes de radiofreqüência são componentes eletrônicos que produzem ondas senoidais/cossenoidais em freqüências apropriadas. Estas fontes nos dias de hoje são completamente digitais.

Os amplificadores aumentam os sinais advindos das fontes de radiofreqüência. Eles estam em uma variação de 50-100 Watts para prótons e 250-500 Watts para heteronúcleos, tratando-se de Espectrômetros para RMN de sólidos. Para líquidos eles estam em aproximadamente 10 Watts para ambos prótons e heteronúcleos.

Os conversores analógico-digital são necessários porque o sinal é gerado em uma forma analógica mas deve estar em uma forma digital para que o computador possa fazer a transformada de Fourier.





5.1.3 Sistema de shim

Sabendo-se que as freqüências de precessão são proporcionais à intensidade do campo magnético, então este deve ser altamente homogêneo ao longo do volume da amostra de modo a se poder observar pequenas diferenças em freqüência. Se o campo magnético não for altamente homogêneo, a intensidade do campo efetivo em diferentes volumes dentro da amostra será diferente e, assim, os spins precessarão em diferentes taxas. Isto levará a um considerável alargamento de linha. O sistema de *shim* é um dispositivo que corrige campos magnéticos locais ligeiramente diferentes.

O sistema de *shim* consiste de duas partes: (A) O *cryo-shimsystem* e o (B) *room-temperature shims*. O princípio básico por trás deles é o mesmo: pequenas bobinas nas quais passam correntes ajustáveis. Estas correntes produzem pequenos campos magnéticos adicionais que são usados para corrigir as inomogeneidades do campo magnético principal. Existem bobinas de várias geometrias, produzindo correções no campo em diferentes orientações. No sistema A as bobinas se encontram no ambiente de Hélio, elas são ajustadas somente por profissionais especializados durante a montagem inicial do instrumento. O sistema B é regulado pelo usuário toda vez que uma nova amostra é colocada no magneto. Este sistema é agrupado em dois conjuntos de *shim*:

- 1 Os on-axis shims $(z, z^2, z^3, z^4, ...)$
- 2 Os off-axis shims (x, y, xy, ...)

O primeiro somente corrige inomogeneidades ao longo do eixo z e pelo menos as ordens mais baixas $(z,z^2 e z^3)$ devem ser ajustadas. As denominações z,z^2 , z^3 , etc, estão relacionadas com a ordem do polinômio do campo que precisa ser usado para corrigir as inomogeneidades do campo principal. O segundo conjunto corrige inomogeneidades ao longo dos eixos transversais.



Figura 5.3: Dependência dos campos de *shimming* ao longo do eixo z.

O *shimming* pode ser feito observando-se a intensidade do sinal do lock ou monitorando o formato do FID. Observar a forma do FID constitui outra maneira de controlar a homogeneidade do campo magnético. Quando o campo está altamente homogêneo o FID deve cair suavemente seguindo uma exponencial.



Figura 5.4: Forma do FID com (esquerda) e sem um bom *shimming*.

5.1.4 Sistema de lock

A estabilidade do campo magnético é alcançada pelo sistema de *lock* de deutério. Este mede a freqüência da linha de deutério do solvente. O sistema possui um *feedback loop* que gera correções para a intensidade do campo magnético B_0 de tal forma que a freqüência de ressonância do deutério presente no solvente permanece constante. Isto é feito fornecendo-se uma corrente adequada à bobina do canal z_0 do shim R.T..

O sistema de *lock* tem que ser ativado quando a amostra é colocada no magneto, quando isto não acontece naturalmente ocorre variações no campo

magnético que conduzem a variações nas freqüências de ressonância com o tempo e conseqüentemente ao alargamento nas linhas. A estabilidade do *lock* é influenciada por muitos fatores dos quais a instabilidade na temperatura tem a maior influência. Sistemas digitais de *lock* modernos permitem ajustar os parâmetros de regulação do canal de *lock*.

5.1.5 O sistema de transmissão/recepção

Como vimos no capítulo 2, a transmissão e recepção do sinal são feitas na mesma bobina. Nos espectrômetros modernos a detecção é feita em *quadratura* na qual dois detectores com uma diferença de fase de 90^0 são empregados. Este arranjo permite distinguir freqüências positivas de freqüências negativas.

5.2 Preparação das Amostras

5.2.1 Ultracentrifugação

O plasma humano fornecido pelo Hospital Universitário da USP passou por um processo de Ultracentrifugação seqüencial [25] para a separação das classes de Lipoproteínas, VLDL (<1,006kg/L), LDL (1,006-1,063kg/L) e HDL (1,063-1,21kg/L). A ultracentrifugação foi feita a 4°C em uma velocidade de 56.000rpm. Seguindo um protocolo estabelecido pelo Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da USP a cada 8hs foi adicionado uma quantidade de solução salina de Brometo de Potássio (KBr) com densidade ligeiramente maior do que a densidade da lipoproteína que está sendo isolada para que no processo de ultracentrifugação a classe de lipoproteína se ressuspenda e se separe do restante da amostra. A quantidade desta solução salina usada é calculada através da fórmula:

$$m_{KBr} = \frac{Vf(Df - Di)}{1 - 0,312Df}$$
(5.1)

Onde Di e Df são as densidades iniciais e finais do plasma respectivamente e Vf é o volume final da amostra usada para centrigugação. As medidas de densidade são feitas usando um densímetro.

As densidades das soluções salinas usadas foram: 1,019g/L para VLDL, 1,063g/L para LDL e 1,210g/L para HDL. As amostras isoladas (cerca de 50mL de cada classe de lipoproteína) foram usadas para a geração dos espectros de referência de cada classe de lipoproteína, estes usados para o ajuste da curva do plasma (deconvolução espectral), e para a preparação de uma amostra de plasma simulado.

5.2.2 Diálise

Para assegurar uma composição iônica uniforme, necessária para uma correta localização dos deslocamentos químicos, é feito uma diálise de cada estoque de lipoproteína. Para a diálise foi preparado três litros de uma solução tampão contendo 120mmol/L de KCl, 5mmol/L de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 1mmol de CaCl₂, 1g de NaN₃ e pH 7,4. O ajuste de pH é feito usando um pHmetro. As amostras ficaram submersas nesta solução durante 24 horas a 4°C, sendo que a cada 8 horas foi feito uma troca da solução. Após a diálise a solução salina é trocada pela solução tampão.

Todo o processo de Ultracentrifugação e Diálise, com preparação da solução salina, da solução tampão, medidas de densidade e ajuste de pH foi feito no departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da USP.

5.2.3 Concentração

As medidas diretas dos espectros constataram a necessidade de concentrar as amostras, devido à grande quantidade de água presente (o sinal da água se sobrepunha aos sinais das lipoproteínas nos espectros das amostras). A concentração das amostras foi feita usando-se um "speed vac" no laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Instituto de Biociências da USP. Foram preparadas três remessas de amostras. Na primeira remessa elas foram concentradas 30 vezes o seu volume inicial, na segunda 10 vezes e na última foram concentradas ao máximo com o objetivo de retirar toda água contida. No último caso as amostras foram ressuspendidas em uma solução de água deuterada (D₂O) com TSP (ácido Trimetilsililpropiônico 48,76mmol/L).

O plasma simulado foi preparado combinando 0,2mL de cada amostra de lipoproteína concentrada. Em seguida as amostras foram armazenadas a $4^{o}C$ até as medidas de RMN.

5.2.4 Tubo coaxial selado com marcador interno

Nas duas primeiras remessas de amostras as medidas foram feitas inserindose um tubo coaxial selado (2mm de diâmetro) contendo uma solução de água deuterada com TSP (8mmol/L) e $MnSO_4$ (0,6mmol/L) dentro dos tubos de RMN contendo as amostras. O TSP é usado para normalizar as amplitudes dos picos de ressonância dos espectros e ajustar o eixo de deslocamento químico ($\delta_{TSP} = 0$). O MnSO₄ foi adicionado porque o íon Mn²⁺ faz com que a ressonância do TSP fique menos sensível a mudanças na homogeneidade do campo magnético, e para diminuir o tempo de relaxação spin-rede T₁ para um valor comparável com o da ressonância dos lipídios (~ 200-500ms).

5.2.5 n-propanol

O Alcool Normal Propílico (n-propanol $CH_3CH_2CH_2OH$) é usado como um padrão de referência secundário para medida das concentrações de lipoproteínas. Inicialmente foi preparado uma amostra contendo 6,67mmol/L de n-propanol, 120mmol/L de KCl e 1,2mmol/L de MnSO₄, pH 7,4. No entanto, devido ao excesso de água, ao se realizar a medida não foi possível observar o sinal de ressonância do n-propanol. Então foi usado uma amostra de n-propanol puro com concentração de: 13,31mol/L. Assim a amplitude de ressonância dos grupos metil do n-propanol é dada por aquela produzida por 13,31mol/L.

5.2.6 Análise Lipídica

Foi feita a análise química para o terceiro conjunto de amostras preparado com o intuito de determinar quantitativamente o colesterol total, triglicérides, HDL-C e LDL-C presentes. A análise química foi feita por procedimentos automáticos *in vitro* no Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

As concentrações de colesterol total (TC), triglicérides e HDL-C são medidas enzimaticamente. Através de uma reação enzimática a amostra muda sua coloração e a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração do lipídio (TC, TG e HDL-C). Assim a concentração pode ser determinada fotometricamente através de um dispositivo denominado analisador.

As concentrações de LDL-C foram determinadas pelo método de Friedwald[29].

5.3 Medidas dos Espectros

Podemos classificar as medidas dos espectros em três análises sendo que em cada uma delas foi repetido todo o processo de preparação das amostras de lipoproteínas (ultracentrifugação, diálise,etc.). Para cada análise os espectros foram obtidos sobre as mesmas condições experimentais em um espectrômetro VARIAN de 200MHz (freqüência do ¹H) para amostras líquidas. Este espectrômetro pertence ao laboratório de RMN do Instituto de Física da USP.





Figura 5.5: Espectrômetro de RMN usado para fazer as medidas.

Antes de introduzir os tubos (com 5mm de diâmetro) contendo as amostras no espectrômetro, eles foram deixados entre 15 e 30 min a temperatura ambiente a fim de que as amostras atingissem esta temperatura. Antes de efetuar as medidas foi feito o *shimming* afim de assegurar uma boa homogeneidade do campo magnético. Isto pode ser conferido pela largura de linha à meia altura do sinal da água após o *shimming*.

5.3.1 Primeiras Medidas

Os espectros foram adquiridos com a amostra sem girar. Um tubo capilar (2mm de diâmetro) selado (com D_2O e TSP) foi introduzido no tubo portaamostra (5mm de diâmetro) como mencionado na seção 5.2.4.

A seguinte seqüência de pulsos foi usada:



Figura 5.6: Seqüência de pulsos usada nas primeiras medidas dos espectros das classes de lipoproteínas.

 T_x se refere ao núcleo que está sendo medido (¹H). O parâmetro d1 é o tempo de espera (em segundos), p1 e pw são as larguras dos pulsos de

RF (em microsegundos) e d2 é o tempo de separação entre os pulsos. Outros parâmetros de aquisição usados foram at (tempo de aquisição)=2s, np (número de pontos no FID)=8192, sw (janela de aquisição espectral - espaço de freqüências)=2kHz e nt (número total de médias)=256.

5.3.2 Segundas Medidas

A segunda etapa de medidas dos espectros das lipoproteínas foi feita com a amostra girando em uma rotação de cerca de 30Hz. Novamente foi introduzido um tubo capilar selado no interior dos tubos de RMN contendo as amostras.

Estas medidas foram feitas usando ainda uma seqüência de pulsos com saturação do sinal da água.



Figura 5.7: Seqüência de pulsos usada na segunda etapa de medidas dos espectros das classes de lipoproteínas.

Temos ainda que at=2s, np=8192, sw=2kHz e nt=750. A largura do pulso de saturação do sinal da água é dada por d2=3s e sua potência da ordem de 2 watts.

5.3.3 Terceiras Medidas

Na terceira etapa foi feito uma otimização das condições experimentais e melhoramento do shimming. Os parâmetros para a janela espectral (sw), o número de pontos (np) e o número total de médias (nt) foram melhorados.

As amostras foram concentradas de modo a retirar o máximo da água contida e em seguida foram ressuspendidas em uma solução (1,2mL) contendo água deuterada com TSP.

Estas medidas foram feitas sem seqüência de saturação do sinal da água.



Figura 5.8: Seqüência de pulsos usada na terceira etapa de medidas dos espectros das classes de lipoproteínas.

Aqui, temos ainda para os outros parâmetros de aquisição: at=3,2s, np=8192, sw=1282Hz e nt=1500.

5.3.4 Exportanto os espectros

Após ajustar a fase dos espectros e referenciar o pico do TSP para zero na escala, os mesmos foram, então, exportados para posterior análise. O parâmetro lb foi usado. Este parâmetro serve para criar uma função exponencial que multiplicada pelo FID suprime a parte final deste que não é significativa por apresentar muito ruído. O valor usado foi lb=0,5Hz.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

6.1 Estudo de Placas Ateroscleróticas

O início do trabalho se deu com o emprego da Espectroscopia de RMN em estado sólido no estudo da Aterosclerose. Como vimos estudos demonstraram que os vários estágios da doença estão diretamente relacionados com a composição das placas ateroscleróticas (ateromas).

Medidas de RMN de ¹³C, usando amostras de tecido humano, foram realizadas usando o espectrômetro de RMN de 400MHz do Instituto de Física de São Carlos.



Figura 6.1: Espectros de RMN de ¹³C de amostras de tecido arterial(carótida).

As características das amostras estam mostradas na tabela 6.1. As amostras estão organizadas de acordo com a evolução do processo de deterioração dos tecidos. Os picos de ressonância magnética nos espectros fornecem informações sobre os constituíntes químicos das amostras e sua intensidade é proporcional à concentração do respectivo constituínte. Foi analisado as ressonâncias dos ácidos gordurosos monoinsaturados (*Unsaturadet Fatty Acids* - UFA) e poliinsaturados (*Polyunsaturadet Fatty Acids* - PUFA), dos carbonos 19 e 21 (C19,21) do colesterol esterificado (CE) e a ressonância do carbono metileno dos ácidos gordurosos (CH₂)_n.

Nos ácidos gordurosos monoinsaturados foram avaliados os picos dos carbonos exteriores à dupla ligação $(CH_2-\underline{C}H=\underline{C}H-CH_2)$ dos ácidos monoinsaturados no CE, fosfolipídios (PL) e triglicérides (TG). Nos ácidos gordurosos poliinsaturados foram avaliados os carbonos interiores à uma das duplas ligações (CH=<u>C</u>H-CH₂-CH=CH) dos ácidos poliinsaturados do CE, PL e TG.



Figura 6.2: a) colesterol livre, b) exemplo de ácido gorduroso $COOH[CH_2]_{21}CH_3$, c) ácido gorduroso poliinsaturado (linoleico), d) ácido gorduroso monoinsaturado (oléico).

As razões entre as intensidades dos picos de UFA/PUFA, UFA/ $(CH_2)_n$ e PUFA/ $(CH_2)_n$ são considerados marcadores do grau de saturação dos lipídios. C19,21/ $(CH_2)_n$ é indicador da presença de CE.

indivíduo	idade	sexo	raça	classificação da lesão
				aterosclerótica
А	33	Masculino	Caucasiano	I-II
В	70	Masculino	Caucasiano	V
C	47	Masculino	Caucasiano	V
D	90	Feminino	Caucasiano	V
E	75	Masculino	Caucasiano	VII

Com o objetivo de avaliar como o avanço da doença provoca modificações químicas nos constituíntes das placas que podem torná-las mais instáveis (propenção ao rompimento), cada um dos espectros foi ajustado através de curvas Lorentzianas nas posições de deslocamento químico referentes a UFA, PUFA, $(CH_2)_n$ e C19,21. Então a partir dos valores das áreas obtidos de cada curva foi construída a tabela 6.2 que mostra a proporção relativa entre os lipídios nos dois grupos seguintes: a) grupo **1** ou de controle, no qual as razões são obtidas de uma única amostra e b) grupo **2** ou doente no qual as razões são obtidas de cada uma das quatro amostras para em seguida ser calculado um valor médio.

grupo	Classificação	UFA/PUFA	$PUFA/(CH_2)_n$	$\mathrm{UFA}/(\mathrm{CH}_2)_n$	$C19,21/(CH_2)_n$
	da lesão				
1	I e II	0,76	0,19	0,14	0,23
2	V e VII	1,55	0,17	0,24	$0,\!66$

Tabela 6.2: Razões do grau de saturação e da presença de CE nos grupos 1 e 2.

Os resultados mostram que a razão UFA/PUFA do grupo 2 é bem maior do que a do grupo 1. A razão PUFA/ $(CH_2)_n$ é mais baixa no grupo 2 e a razão UFA/ $(CH_2)_n$ é mais alta. A razão C19,21/ $(CH_2)_n$ é mais alta no grupo 2.

Jean-François Toussaint, James F. Southern et al.[49], também encontraram um aumento na razão UFA/PUFA bem como uma diminuição na razão PUFA/(CH₂)_n com o aumento da lesão. Porém observaram uma diminuição não muito significante na razão UFA/(CH₂)_n e uma diminuição significante na razão C19,21/(CH₂)_n. O ligeiro decréscimo na razão PUFA/ $(CH_2)_n$ do grupo **2** sugere uma diminuição na quantidade de PUFA por quebra nas duplas ligações devido a processos oxidativos que ocorrem nos componentes das placas [49]. Esta diminuição da razão PUFA/ $(CH_2)_n$ pôde ser estabelecida uma vez que os carbonos metileno do grupo $(CH_2)_n$ estão presentes em todas as cadeias longas de ácidos gordurosos, sendo por este motivo considerado como uma "piscina de lipídios" [49].

Jean-François Toussaint, James F. Southern et al.[49] sugeriram que o aumento na razão UFA/PUFA também evidencia quebras nas duplas ligações dos ácidos poliinsaturados (PUFA) que ocorre com o aumento da lesão aterosclerótica. Isto aconteceria porque o aumento da razão UFA/PUFA seria somente devido à diminuição dos ácidos poliinsaturados (PUFA) já que a variação na razão UFA/(CH₂)_n não foi significante para os autores citados. No entanto no nosso estudo não encontramos uma variação insignificante na razão UFA/(CH₂)_n.

Um outro fato interessante mostrado pela razão $C19,21/(CH_2)_n$ é de que o valor obtido é maior para o gupo **2**, sugerindo um aumento na quantidade de colesterol esterificado com o avanço da doença. Alguns autores [27] sugerem que a abundância química de CE bem como seu estado físico podem ser importantes fatores de estabilidade das placas.

6.2 Quantificação de Lipoproteínas por RMN

6.2.1 PRIMEIRA ANÁLISE

Os primeiros espectros das lipoproteínas obtidos estão mostrados na figura 6.3.

Devido ao fato de as amostras terem sido bastante concentradas (30 vezes o volume inicial) as mesmas tinham uma consistência muito viscosa, o que provocou o alargamento das linhas de ressonância. Como as medidas foram feitas sem girar (ver procedimento experimental), resultando em uma menor homogeneidade do campo magnético sentido pelos núcleos da amostra, a resolução dos espectros está baixa e praticamente não se distingue o deslocamento químico entre as classes de lipoproteínas. Vale lembrar ainda que a diferença entre os deslocamentos químicos das lipoproteínas são um tanto pequenos (Figura 6.2). O grande alargamento nas linhas, inclusive na linha de ressonância da água (não mostrada), sugere que não é possível concentrar bastante as amostras porque isto provoca aumento na sua viscosidade.

As ressonâncias dos grupos metil e metileno foram destacadas por razões que veremos mais na frente.



Figura 6.3: Primeiros espectros das lipoproteínas e n-propanol obtidos. 1 - CH₃, 2 - CH₂.

É sabido que a oxidação causa fragmentação da apolipoproteína na LDL[30] modificando sua estrutura. Como os deslocamentos químicos e a forma de linha de uma classe de liporpoteína estão diretamente relacionados com esta classe, é suposto que as alterações citadas poderiam ser observadas pelos espectros de RMN.

Com o passar do tempo as amostras ficam mais suscetíveis a efeitos de deterioração (como oxidação). A fim de verificar tais modificações foram medidos espectros das lipoproteínas em intervalos de tempo de mais ou menos 24 horas.



Figura 6.4: Evolução temporal dos espectros das classes de lipoproteínas.

Novamente devido à uma não muito boa resolução dos espectros não se pode verificar se houve mudanças nos deslocamentos químicos (somente se tivesse havido alterações substanciais). Algumas mudanças observadas possuem um caráter diferente das que poderiam ocorrer devido à oxidação. Provavelmente se devem a outros fatores como contaminação. No dia vinte e sete já não era mais possível observar o sinal emitido pela amostra de HDL. Nos dias seguintes não foi possível obter sinal de nenhuma das classes.

Nesta primeira análise também foi feito a primeira medida do plasma humano.

O resultado evidenciou a necessidade de concentrar a amostra de plasma, pois na mesma há uma porcentagem muito alta de água cujo sinal sobrepõe, e muito, os sinais das lipoproteínas. No espectro mostrado, o sinal relativo à água está omitido, os sinais relativos aos grupos metil e metileno possuem amplitudes muito baixas e por isso a escala do espectro teve que ser bastante ampliada.



Figura 6.5: Espectro do plasma humano.

Esta primeira análise possibilitou uma avaliação de como se estabelecer a metodologia de preparação de amostras e aquisição dos espectros.

6.2.2 SEGUNDA ANÁLISE

Nesta segunda etapa de medidas dos espectros, estes foram obtidos com a amostra girando com uma velocidade de rotação de cerca de 30Hz.

Na figura 6.6 vemos os espectros obtidos para as classes de lipoproteínas mostrando somente os picos relativos aos grupos CH_2 (pico mais intenso) e CH₃ (pico menos intenso). Em primeira observação se poderia esperar que ambas ressonâncias (metil e metileno) fossem igualmente recomendáveis para a análise do ajuste de curva. No entanto, Otvos e seus colaboradores [21] encontraram que não é este o caso. Resultados mais precisos são obtidos omitindo inteiramente a ressonância do metileno e usando somente a região do espectro contendo a ressonância do grupo metil. Basicamente o que se argumenta é que a forma de linha da ressonância do grupo metil exibe menos variabilidade de pessoa para pessoa do que a ressonância do grupo metileno. Esta observação é consistente com o ambiente uniforme dos prótons dos grupos metil dos lipídios nas lipoproteínas, dada sua localização na parte final das cadeias de ácidos gordurosos. Não se escolhendo a ressonância dos grupos metileno também se evita problemas causados nesta região espectral pela presença de ressonâncias interferentes de metabólitos como o lactato, como foi observado em medidas realizadas no laboratório.



Figura 6.6: Segundo conjunto de espectros das classes de lipoproteínas obtido junto com o espectro do n-propanol.

Estas medidas foram feitas usando uma seqüência de pulsos com saturação do sinal da água a fim de melhorar a intensidade dos sinais das lipoproteínas ao reduzir o sinal da água.

Com o objetivo de verificar a eficiência da saturação foram feitas medidas de uma amostra de plasma humano com e sem saturação do sinal da água (Figura 6.7).

Os espectros mostram claramente que a saturação diminui drasticamente a intensidade do sinal da água. Este decréscimo faz com que os sinais relacionados às lipoproteínas fiquem mais evidentes.

Foi obtido também o espectro do plasma simulado, preparado com quantidades iguais das três amostras de VLDL, LDL e HDL (Figura 6.8).



Figura 6.7: Espectros do plasma humano com e sem saturação do sinal da água.

Como um passo para a confirmação do método de quantificação buscouse fazer o ajuste da curva do plasma simulado fazendo uma deconvolução através das curvas das classes de lipoproteínas.

A fim de obtermos um ajuste da curva do plasma simulado através das curvas relativas às lipoproteínas isoladas, os picos relativos aos grupos metil foram ajustados por curvas lorentzianas com forma definida. Os resultados estão mostrados na figura 6.8.

Os coeficientes mostrados no segundo gráfico indicam a porcentagem necessária de cada curva para o ajuste da curva do plasma simulado. No entanto esta análise é um tanto imprecisa pois desconsidera a forma real das curvas individuais além de ter sido obtida simplesmente dividindo as curvas de cada classe por valores aleatórios até se obter o melhor ajuste.



Figura 6.8: Ajuste da curva do plasma simulado através das curvas das lipoproteínas (ajustadas por curvas lorentzianas).

De modo a considerar a forma de linha original das curvas uma nova análise foi feita retirando-se o pico referente ao grupo CH_2 [21] (Figura 6.9). Agora o ajuste da curva do plasma simulado foi feito usando-se o programa Origin. A retirada do pico referente ao grupo CH_2 foi feita usando-se os programas Peak Fit e Origin.

A curva em vermelho (figura 6.9) é dada pela soma de porcentagens diferentes das três curvas individuais mostradas (VLDL, LDL e HDL). O coeficiente **a** se refere ao peso da curva de VLDL, **b** de LDL e **c** de HDL. Podemos tentar encontrar valores para estes coeficientes calculando a porcentagem de cada curva baseando-se na área experimental desta: simplesmente dividindo-se a área de cada curva pela área total (soma) das curvas individuais. O resultado fornece o respectivo peso de cada curva. Fazendo isto encontramos **a**'=0,19, **b**'=0,51 e **c**'=0,30. Comparando com o resultado anterior (mostrado no gráfico) vemos que é como se os coeficientes **b** e **c** estivessem com os valores trocados. O fato de os resultados não concordarem plenamente sugeriu uma avaliação mais minuciosa de como os espectros foram obtidos.



Figura 6.9: Espectros sem o pico CH_2 e ajuste da curva do plasma simulado

Observando-se as amplitudes e formas de linha relativas aos picos do TSP, verificou-se que havia uma grande variação (de até $\sim 50\%$) entre as áreas dos picos em cada espectro (ver tabela 6.3).

Devido a tais alterações, a normalização dos espectros dividindo pela área relativa ao TSP estaria ocasionando erros. Para verificar a origem destas alterações várias medidas dos tubos coaxiais usados, introduzidos dentro do tubo com as amostras e contendo o TSP, foram feitas.

Amostra	Área do TSP (u.a.)
VLDL	0,46
LDL	0,38
HDL	0,40
SIMULADO (SIM)	0,24

Tabela 6.3: Variação nas áreas do TSP.

Os dois primeiros gráficos seguintes mostram espectros relacionados aos diferentes tubos coaxiais usados. As medidas foram repetidas uma vez. Observando os valores para as áreas dos picos vemos que existe sim uma variação (19%) entre elas, no entanto esta variação se encontra dentro de um limite experimental esperado, levando em consideração as restrições do equipamento.



Figura 6.10: Primeiras medidas relativas aos diferentes tubos.

A repetição das medidas confirmaria as variações nas áreas relativas ao pico do TSP. Se houvesse uma grande variação, provavelmente este seria o fator de erro no ajuste do espectro do plasma simulado. No entanto a variação possui a mesma extensão do caso anterior.



Figura 6.11: Segundas medidas relativas aos diferentes tubos.

O gráfico da figura 6.12 mostra vários espectros de um mesmo tubo medidos com o objetivo de verificar se haveria alguma mudança nos picos de ressonância devido a falhas no espectrômetro. O último espectro mostrado foi obtido retirando a amostra e a reinserindo. Como no caso anterior nenhuma mudança substancial foi observada.



Figura 6.12: Medidas relativas ao tubo usado na amostra de LDL.

Estas conclusões mostraram que as alterações nas áreas não tinham origem na amostra com TSP e água deuterada contida nos tubos coaxiais bem como devido à introdução do próprio tubo. Com isso partiu-se para um novo planejamento de medidas otimizando as condições experimentais e melhorando o shimming.

Os parâmetros para a janela espectral, o número de pontos e o número total de médias foram otimizados (as alterações nos valores podem ser conferidas no procedimento experimental). Os seguintes novos espectros foram obtidos para as amostras de HDL e plasma simulado.



Figura 6.13: Espectros obtidos sob novas condições experimentais.

Os novos espectros obtidos mostram claramente uma melhora na razão sinal-ruído e mostram também uma excelente definição na forma de linha dos espectros. As mudanças nas áreas dos picos relacionadas ao TSP poderiam ser devido a uma baixa razão sinal-ruído. Então partiu-se para uma nova análise fazendo medidas com os novos parâmetros experimentais.

Nesta segunda etapa ainda foi medido o espectro de Carbono do plasma humano a fim de reconhecer a distribuição de linhas isotrópicas do ¹³C, o qual apresenta uma região de deslocamentos químicos maior (~ 20 vezes) que a de ¹H. No entanto, devido às dificuldades de se observar núcleos de carbono (tais como baixa razão giromagnética e abundância natural (1%) o que confere uma baixa magnetização líquida, e altos valores para o tempo de relaxação longitudinal (T₁) o que torna os experimentos bastante longos), este tipo de experimento é inviável para um grande número de amostras.



Figura 6.14: Espectro de Carbono do plasma humano. O espectro mostra que as linhas concentram-se em uma faixa estreita de deslocamento químico (20ppm).

6.2.3 TERCEIRA ANÁLISE

Em seguida podemos ver os espectros obtidos nesta terceira etapa.



Figura 6.15: Terceiro conjunto de espectros das lipoproteínas obtido.

Os espectros apresentam uma qualidade superior aos anteriores. As áreas dos picos relacionados ao TSP não apresentam valores que variam significantemente.

Em seguida o pico referente ao grupo CH_2 foi subtraído por razões discutidas anteriormente. A fim de realizar um melhor ajuste do plasma simulado o pico relativo ao TSP também foi subtraído e os espectros normalizados pela área do TSP.



Figura 6.16: Espectros após normalização e retirada do pico CH₂.

Com estes resultados foi feito um novo ajuste para a curva do plasma simulado.



Figura 6.17: Segundo ajuste da curva do plasma simulado.

O cálculo dos coeficientes **a**', **b**' e **c**' através da porcentagem de cada curva experimental baseando-se em sua área fornece: **a**'=0,31, **b**'=0,19 e **c**'=0,50. Comparando com os valores obtidos pelo ajuste do plasma simulado usando o Origin (**a**=0,21, **b**=0,13 e **c**=0,67) vemos que estes resultados são aceitáveis dentro de um limite de erro experimental esperado (~ 28%). Com isto concluímos que os espectros individuais das classes de lipoproteínas podem ser usados no ajuste da curva do plasma simulado e conseqüêntemente do plasma sanguíneo. A deconvolução do plasma sanguíneo através das curvas das classes de lipoproteínas é base para a quantificação das mesmas.

A análise química das amostras, feita no laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Farmácia da USP, forneceu as concentrações de colesterol total, Triglicérides, LDL-C e HDL-C presentes (ver tabela 6.4).

Os resultados em branco não foram calculados devido à grande imprecisão na fórmula de Friedewald (ver capítulo 3) ocasionado pelo grande número de triglicérides nas amostras.
Amostra	Colesterol	HDL-C	LDL-C	TG
	Total	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
	(mg/dL)			
VLDL	480	54	-	580
LDL	237	-	-	285
HDL	166	94	34	190
SIM	321	108	133	354

Tabela 6.4: Análise química das amostras.

Convertendo os valores de HDL-C, LDL-C e TG para mmol/L (para isto basta tomar os valores de HDL-C, LDL-C em g/L e multiplicar por **2,586** e os valores de TG por **1,129** [24]) encontramos:

Amostra	HDL-C	LDL-C	TG
	$(\rm mmol/L)$	$(\rm mmol/L)$	$(\rm mmol/L)$
VLDL	1,40	-	6,55
LDL	-	-	3,22
HDL	2,43	0,88	2,15
SIM	2,80	3,44	3,40

Tabela 6.5: Resultados em mmol/L

Usando o pico do espectro do n-propanol como padrão de referência de medida, foi calculado as concentrações de partícula das lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) na amostra do plasma simulado através da deconvolução de sua curva. O objetivo era comparar os resultados de análise química com os resultados de Ressonância Magnética Nuclear. Foi encontrado:

Amostra	HDL	LDL	VLDL
	$(\rm mmol/L)$	$(\rm mmol/L)$	$(\rm mmol/L)$
SIM	105,93	9,19	13,53

Tabela 6.6: Resultados da análise por RMN do plasma simulado.

Os resultados apresentaram discrepâncias, isto pode ser comprovado pela diferença entre os resultados de RMN (medida direta) e análise química (medida indireta), como para a amostra de HDL.

Uma explicação seria o fato de que foi usado o pico de ressonância CH_3 do n-propanol como padrão de referência. Assim estamos obtendo a concentração dos grupos CH_3 nas lipoproteínas. Outros fatores poderiam estar

contribuíndo para esta discrepância: Fatores externos (contaminação por umidade ambiente ou bactérias, efeitos oxidativos, manuseio da amostra em ambiente não controlado, efeito da temperatura) ou que ocorreram durante a fase de aquisição dos espectros (saturação por T_1 , calibração incorreta de pulsos de RF, instabilidade de rotação e temperatura).

Novamente objetivando-se verificar alteração nas amostras com o passar do tempo, foram medidos espectros das lipoproteínas, agora em um intervalo de tempo de quinze dias.



Figura 6.18: Evolução temporal do terceiro grupo de espectros obtido.

Os espectros mostram uma região de deslocamentos químicos que vai além da região dos grupos metil e metileno. Além do desaparecimento do pico relacionado ao grupo CH_2 no espectro de HDL nenhuma alteração substancial foi encontrada.

Obtido o ajuste do plasma simulado, um passo seguinte seria fazer o mesmo para uma amostra de plasma autêntico. No entanto o espectro obtido da amostra apresentou sinais fantasmas e deformações não esperadas nas formas de linha, além de apresentar os deslocamentos químicos em regiões incorretas nos espectros.



Figura 6.19: Espectro do plasma contaminado. 1 - Pico surgido devido à presença de uma colônia de bactérias.

Analisando a amostra ao microscópio verificou-se a presença de uma colônia de bactérias. Um pico não esperado (2,24ppm) apareceu tanto no espectro do plasma quanto no espectro do solvente (água deuterada) com TSP, usado para preparar a amostra. Isto sugere, então, que a contaminação partiu da amostra de solvente com TSP.

Capítulo 7

Conclusões e Perspectivas

A Espectroscopia de Ressonância Magnética permite indentificar os constituíntes químicos nas placas de aterosclerose de uma forma não destrutiva, bem como obter informações sobre a evolução da doença dada pela variação destes constituíntes, uma vez que o estado das placas é dependente de sua constituição química.

No nosso estudo de placas ateroscleróticas através da Espectroscopia de RMN encontramos que os picos de ressonância dos ácidos gordurosos poliinsaturados diminui com a evolução da doença, o que sugere perdas de duplas ligações. Encontramos também que os picos de ressonância do colesterol esterificado aumentam com o progresso da aterosclerose, sugerindo um aumento gradativo na quantidade de colesterol esterificado.

Como perspectiva para o avanço do estudo cidado acima temos a utilização de uma técnica de Ressonância Magnética do estado sólido que permite obter o sinal dos carbonos rígidos nas moléculas uma vez que a técnica usada não permitiu. Com isto consegue-se distinguir a fase de agregação das moléculas (líquida, líquida-cristalina e cristalina). Este é um fato crucial, pois sabemos da literatura[50] que estas fases possuem diferentes propriedades físicas, como por exemplo taxa de fusão, as quais estão diretamente relacionadas com as trocas lipídicas que ocorrem entre as placas e o meio externo, que por sua vez define a estabilidade dos ateromas quanto à ruptura.

No estudo da quantificação de lipoproteínas por espectroscopia de RMN, a técnica de RMN usada para quantificar lipoproteínas foi validada dentro das limitações experimentais (através da comprovação do ajuste da curva do plasma simulado pelas curvas referentes às lipoproteínas individuais - VLDL, LDL e HDL).

Na primeira análise feita para a obtenção dos espectros de lipoproteínas, encontramos que o processo de concentração das amostras deve ser feito de tal forma que as mesmas não aumentem sua viscosidade substancialmente, pois se isto acontece há um alargamento nos picos de ressonância. Para se obter uma melhor qualidade nos espectros é recomendável que as medidas sejam feitas com as amostras girando porque com isso temos uma maior homogeneidade do campo magnético e conseqüêntemente melhor resolução nos espectros.

Devido à grande porcentagem de água no plasma humano é necessário que a amostra de plasma seja concentrada ou ainda que a medida seja obtida usando uma técnica eficiente de saturação do sinal da água.

As amostras de lipoproteínas precisam ser armazenadas em baixas temperaturas (4^{o}) a fim de evitar a deterioração das mesmas. Caso isto não aconteça ocorrerá uma diminuição da vida útil das amostras, acarretando na obtenção de sinais distorcidos ou até mesmo impossibilitando a obtenção do sinal das lipoproteínas.

Na segunda análise confirmamos que na técnica de RMN usada para quantificar lipoproteínas é de grande eficiência a utilização de uma seqüência de pulsos com saturação do sinal da água. Mesmo com a concentração das amostras o percentual de água nas mesmas é bastante alto e o sinal da água sobrepõe o sinal dos lipídios nas lipoproteínas. Quanto menos intenso for o sinal da água mais acentudados serão os sinais relacionados às lipoproteínas.

No processo de ajuste da curva do plasma simulado percebemos que a validade do método de ressonância magnética para quantificação se justifica somente se forem usadas as formas de linha originais das curvas de ressonância das lipoproteínas. Isto ocorre porque assim haverá uma maior precisão nos resultados. Verificou-se também a necessidade de subtração do pico referente aos grupos CH_2 nos espectros das classes de lipoproteínas.

Ao se trabalhar com a forma original das curvas de lipoproteínas é essencial o controle dos parâmetros experimentais objetivando sempre a melhora na qualidade dos espectros. A forma de linha dos espectros precisa apresentar uma excelente definição, conseguida também com uma melhora na razão sinal-ruído.

A validade do uso dos espectros individuais das classes de lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) como padrões para o ajuste da curva do plasma, para com isso se obter a concentração de cada classe em uma amostra de plasma, foi comprovado na terceira etapa.

Os valores de concentrações de lipídios nas amostras de lipoproteínas dados pela análise química servem como referência para comparação com os valores de concentração de lipoproteína obtidos pela técnica de ressonância, uma vez que espera-se que estes resultados não sejam significantemente distintos.

Nesta terceira análise verificou-se que os espectros das classes de lipoproteínas não apresentaram grandes mudanças em um intervalo de tempo considerável. Isto sugere que as amostras ainda permaneciam em um bom estado de conservação.

A ocorrência de sinais fantasmas, deformações na forma de linha e mudanças nos deslocamentos químicos podem ser indicativos de contaminação da amostra, como verificado no espectro de plasma humano obtido nesta terceira etapa.

Como continuação para este trabalho temos que pode ser feito a obtenção das concentrações de lipoproteínas, considerando que os grupos CH_3 nas lipoproteínas são proporcionais ao volume da partícula. Com isto a partir das concentrações encontradas, usando o n-propanol como referência, pode se chegar às concentrações de lipoproteínas.

Afim de se aumentar a exatidão deste cálculo, pode-se ainda estimar a quantidade de grupos CH_3 em cada classe de lipoproteína através da porcentagem de lipídios (tabelada) nas mesmas, uma vez que é sabido a contribuição de grupos CH_3 de cada grupo lipídico.

Outro passo a ser dado é a aquisição de um espectro de plasma autêntico e seu ajuste através das curvas de lipoproteínas individuais. O mesmo procedimento feito para a curva do plasma simulado pode ser feito para verificar a validade em uma amostra de plasma autêntico. A partir disso se poderia obter concentrações de lipoproteínas em uma amostra de plasma humano.

Há ainda a possibilidade de extensão nos estudos relacionados à oxidação das amostras, através de uma análise mais minuciosa das alterações nos especros e aquisição de novos.

Referências Bibliográficas

- I.I. Rabi, S. Millman, P. Kusch e J. R. Zacharias, *Phys. Rev.*, 55, 526, (1939); J. M. B. Lellogg, I. I. Rabi, N. F. Ramsey e J. R. Zacharias, *ibid.*, 56, 728, (1939).
- [2] Gil, V. M. S.; Geraldes, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações, Fundação Calouste Gulbenkian, Portugal, 1987.
- [3] A. De Graaf, Robin. In vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques, Wiley, 1998.
- [4] Das, Ashok; Melissinos, Adrian C. Quantum Mechanics: A Modern Introduction, University of Rochester, New York, 1953.
- [5] Symon, Keith R. *Mecânica*, Campus, 2 ed, 685p.
- Bloembergen, N., Purcell, E. R., Pound, R. V., Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption, Physical Review, 1948. 73(7): p. 679-712.
- [7] Proctor, W. G., Yu, F. C., Phys. Rev., 77, 717, 1950.
- [8] Slichter, C.P. Principles of Magnétic Resonance, Springer-Verlag, New York, 3rd Ed., 1990.
- [9] Hore, P.J. (1995) Nuclear Magnétic Resonance (Oxford Publications).
- [10] Günther, Harald. NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry, Wiley, University of Siegen, Siegen, Germany, 2nd Ed., 1994.
- [11] Fadel, Valmir. Estrutura tridimensional da cromatina extraída do veneno da cascavel utilizando Ressonância Magnética Nuclear Homonuclear. Tese de doutorado, Istituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, São José do Rio Preto, 2003.

- [12] Santos, Marcelo Alves dos. Estudos dos Efeitos da Ordem Local sobre a Difusão Iônica utilizando RMN com Gradiente de Campo Magnético Pulsado. Dissertação de mestrado, Instituto de Física DFG-USP, São Paulo, 2002.
- [13] Contreras, Lionel Fernel Gamarra. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear Localizada: Projeto e Implementação Dissertação de Mestrado, Instituto de Física DFG-USP, São Paulo, 2001.
- [14] Hahn, E. L. Spin Echoes, Physical Review, University of Illinois, Urbana, Vol. 80, p. 580-594, 1950.
- [15] Ernst, R. R., Sorensen, O. W., Eich, G. W., Levitt, M. H., Bodenhausen G. Product Operator Formalism for the Description of NMR Pulse Experiments, Progress in NMR Spectroscopy, Vol.16, p. 163-192, 1983.
- [16] Ramsey, N. F., Purcell, E. M., Interations between Nuclear Spins in Molecules, Physical Review, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, p 143-144, 1951.
- [17] Van de Ven, Frank J. M., Multidimensional NMR in liquids: basic principles and experimental methods, Wiley-VCH, New York, 1995.
- [18] Jeyarajah, Elias Joseph. Development and Validation of a ¹H NMR Method for Lipoprotein Quantification and Coronary Heart Disease Risk Assessment. *Raleigh*; 2004; 144.
- [19] Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, National Education Cholesterol Education Program, National Heart, Lung, and Blood Institute. Arch Intern Med 1988; 145: 36-39.
- [20] Fredrickson D. S., Levy R. I., Lees R. S., Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967;276:148-156.
- [21] Otvos J.D., E.J. Jeyarajah, and D.W. Bennett. Quantification of Plama Lipoproteins by Proton Nuclear Nagnetic Resonance Spectroscopy. *Clin. Chem.* 37/3;377-386 (1991).
- [22] Otvos James D., Jeyarajah Elias J., Bennett Dennis W., and Krauss Ronald M. Development of a Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Method for Determining Plasma Lipoprotein Concentrations and Subspecies Distributions from a Single, Rapid Measurement. *Clin. Chem.* 38/9;1632-1638 (1992).

- [23] Otvos James D. Measurement of Lipoprotein Subclass Profiles by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Handbook of Lipoprotein Test*ing Washington, DC: AACC Press 2000:609-623.
- [24] Otvos J.D, Jeyarajah E.J, Hayes L.W, Freedman D.S, Janjan N.A, Anderson T. Relationships between the Proton Nuclear Magnetic Resonance Properties of Plasma Lipoproteins and Cancer. *Clin. Chem.* 1991; 37: 369-76.
- [25] Schumaker V.N., Puppione D.L. Sequential Floration Ultracentrifugation. *Methods Enzymol* 1986; 128; 155-170.
- [26] Otvos James D., Jeyarajah Elias J., Cromwell William C. Measurement Issues Related to Lipoprotein Heterogeneity. Am J Cardiol 2002;90(suppl): 22i-29i.
- [27] Shaoqing Peng, Wen Guo, Joel D. Morrisett, Michael T. Johnstone e James A. Hamilton. Quantification of Cholesteryl Esters in Human and Rabbit Atherosclerotic Plaques by Magic-Angle Spinning ¹³C-NMR. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000;20;2682-2688.
- [28] Lounila J, Ala-Korpela M., and Jokisaari J. Effe cts of Orientational Order and Particle Size on the NMR Line Positions of Lipoproteins. *Physical Rewiew Letters* 72/25; 4049-4052; 1994.
- [29] Friedwald W.T, Levy R.I, Fredrickson D.S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, without use of the preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18:499-502.
- [30] Olofsson S. O., Boren J., Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis, *Journal of Internal Medicine*, 2005; 258; p. 395-410.
- [31] Otvos J., Jeyarajah E., Bennett D., A Spectroscopic Aproach to Lipoprotein Subclass Analysis. *Clin. Lig. Assay* 1996; 19:184-9.
- [32] Otvos J. Meajurement of Triglyceride-rich Lipoproteins by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Clin. Cardiol* 1999; 29(Suppl II):21-7.
- [33] Voet Donald, Voet Judith G. Biochemistry John Wiley & Sons, Inc. Second Edition. 1994; 1361p.

- [34] Kuller Lewis, Arnold Alice, Tracy Russell, Otvos James, Burke Greg, Psaty Bruce, Siscocick David, Freedman David S., Kronmal Richard. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Lipoproteins and Risk of Coronary Heart Disease in the Cardiovascular Health study. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002;22;1175-1180
- [35] C.J.Murray and A.D.Lopez; *Lancet*, 389, 1436-42(1997).
- [36] M. Ezzati, A.D. Lopez, A.Rodgers, S.Vander Hoom and C.J.Murray; Lancet, 360,1347-60(2002).
- [37] P.Libby; Circulation, 104, 365-372(2001).
- [38] E.Falk, P.K. Shah and V. Fuster; *Circulation*, 92,657-671(1995).
- [39] M.J.Davies; J Cardio.,88(suppl 4),2F-9F(2001).
- [40] R.Ross; N Engl J Med., 336, 1276-1282(1997).
- [41] P. Libby, *Nature*, 420, 868-874(2002).
- [42] P. Puddu, E. Cravero, G.M. Puddu and A. Muscari; Int.J.Pract;59,462-472(2005).
- [43] G.K.Hansson, N Engl J Med, 352, 1685-1895 (2005).
- [44] W. Insull Jr. and G.E. Bartsch, J. Clin. Invest., 58, 200-211 (1976).
- [45] S.S.Katz, G.G.Shipley and D.M.Small; J.Clin.Invest., 58, 200-211(1976).
- [46] S.Fowlwe; Act Med Scand. Suppl., 642, 151-158(1980).
- [47] B. Lundberg, Atherosclerosis, 56, 93-110 (1985)
- [48] M.E. Rosenfeld, J.C.Khoo, E.Miller, S.Parthasarathy, W.Palinski and J.L. Witztum, J. Clin.Invest., 87, 90-90 (1991).
- [49] Toussaint J.F., Souther J.F., V Fuster, Kantor H.L. 13C-NMR spectroscopy of human atherosclerotic lesions. Relation between fatty acid saturation, cholesteryl ester content, and luminal obstruction. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1994;14;1951-1957
- [50] Wen Guo, Joel D. Morrisett, Michael E. D. Bakcy, Gerald M. Lawrie, James A. Hamilton, Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio. 2000;20;1630-1636.