UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

*Desenvolvimento da técnica de precessão livre no estado
estacionário para aumento da razão sinal ruído em espectros
de RMN de alta resolução*

Poliana Macedo dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, como um dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências (Química Analítica)

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos
2009

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais José Alfredo e Nilcéa e
à minha irmã Larissa pelo apoio
incondicional durante a realização
deste trabalho.*

*Ao André Alves de Souza, pelo
incentivo, amizade, paciência e valiosa
contribuição no desenvolvimento deste
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago pela orientação sempre muito dedicada.

Ao Prof. Dr. Cláudio José Magon pela colaboração neste trabalho.

À Dra. Lucimara Aparecida Forato por sua prestativa ajuda no laboratório de RMN.

Aos amigos do grupo de RMN da Embrapa, Antonio Neto, Cátia, Fabiana, Fayene, Gabriela, Giovane, Lucinéia, Lúcio, Luiza, Matheus, Paulo, Roberta pela amizade, convivência e ajuda mútua.

Aos meus amigos de Ponta Grossa, em especial a Juli, a Juh, a Lari, o Lucas, o Cris e o Lamers pelo incentivo e amizade.

Aos amigos da Embrapa Instrumentação Agropecuária Juliana, Tassiane, Lillian, Livia, Aline, Fernanda, Úrsula, Edilene, Humberto, Willian, Rafael, Mateus, Kelly, Josiane e Joana pelos momentos de descontração nesses dois anos de trabalho.

Ao Dú pela paciência, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infra-estrutura e por todas as facilidades oferecidas.

Ao Instituto de Química de São Carlos - USP, por todo o suporte acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro, através do processo 07/01560-9.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho realizou-se uma análise detalhada das vantagens e desvantagens da sequência de Precessão Livre no Estado Estacionário (Steady State Free Precession – SSFP) para aquisição rápida de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C . O regime de SSFP é obtido através da aplicação de um trem de pulsos de mesma fase, duração e intensidade, separados por um intervalo de tempo (T_p) menor que os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) da amostra. Nestas condições é possível acumular dezenas de espectros por unidade de T_1 , proporcionando um incremento significativo na razão sinal/ruído (s/r) do espectro. Ao comparar os resultados obtidos com as sequências de SSFP e convencional (pulsos de 90 graus e $T_p \geq 5T_1$), verificou-se que a SSFP apresentou um ganho médio de 30 vezes no tempo de análise para uma mesma s/r. No entanto, os espectros obtidos com a SSFP apresentam anomalias de fase e amplitude do sinal, decorrente da refocalização da magnetização na forma de um eco de spin. Comparou-se também a SSFP com a sequência padrão usada para obtenção de espectros de ^{13}C , que utiliza pulsos de 30 graus e $T_p = 1.38\text{s}$. Neste caso os ganhos da SSFP foram menores (5,5 vezes no tempo de análise para uma mesma s/r) verificando que a sequência padrão utiliza a vantagem da SSFP ($T_p < T_1, T_2$). A formação do eco e, conseqüente das anomalias de fase não são observadas na sequência padrão, pois a aquisição do sinal é truncada em 0,9s, e a ciclagem de fase dos pulsos reduz a formação do eco, por levar á uma perda de coerência do sinal SSFP. Neste trabalho também analisou-se os métodos propostos por Rudakov, Freeman e Hill e Schwenk para supressão destas anomalias nos espectros de RMN ^{13}C quando adquiridos no regime de SSFP. Os resultados demonstraram que a aplicação destas metodologias proporciona uma melhora significativa na qualidade do espectro. No entanto, verificou-se que nenhum método foi capaz de suprimir totalmente as anomalias de fase e amplitude do sinal.

ABSTRACT

It was performed a detailed analysis of the advantages and disadvantages of Steady State Free Precession (SSFP) sequence for a rapid acquisition of ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra. The SSFP regime is obtained by the application of a pulse train with the same phase, duration and intensity, separated by a time interval (T_p) shorter than the transverse (T_2) and longitudinal (T_1) relaxation times. In these conditions it is possible to accumulate tens of spectra per units of T_1 , providing a significant increase in the spectrum signal-to-noise ratio (s/n). By comparing the spectra obtained by SSFP and conventional pulse sequence (90 degree pulse and $T_p \geq 5T_1$) it was noted that SSFP shows an average gain of 30 times in analysis time for the same s/n. However, the SSFP spectra show phase and intensity anomalies due to the refocusing of the magnetization, generating a spin echo. We also compared the SSFP with the standard ^{13}C pulse sequence, that uses a 30 degree pulses and $T_p = 1.38$ s. In this comparison the SSFP gain were small (5,5 times in analysis time for the same s/n), because the standard sequence also uses the advantage of SSFP ($T_p < T_1, T_2$). The echo signal and the phase anomalies are not observed in the standard sequence because the signal acquisition is truncated at 0.9s and the cycling of the pulse phase, that partially destroy the SSFP coherence. We also analyzed the methods proposed by Rudakov, Freeman and Hill and Schwenk to suppress those anomalies in the ^{13}C NMR spectrum when acquired in SSFP regime. The results showed that the application of these methodologies provides a significant improvement in the spectrum quality. However, it was verified that none of the methods were able to completely eliminate the phase and intensity anomalies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do efeito do campo magnético para spins $I = 1/2$.	21
Figura 2. Representação vetorial do movimento de precessão.	23
Figura 3. Representação vetorial da magnetização de um sistema de spins no modelo de coordenadas girantes (a) quando em equilíbrio térmico e (b) após aplicado um pulso de rf.	24
Figura 4. Representação esquemática da intensidade do sinal de RMN depois de aplicado um trem de pulsos de rf igualmente espaçados por $T_p < T_2$.	27
Figura 5. Representação vetorial do eco de Hahn para descrever o eco formado por dois pulsos de 90° .	28
Figura 6. Sinais de RMN ^1H obtidos de um trem de pulsos de 90° igualmente espaçados por um intervalo $T_p < T_2$.	29
Figura 7. Espectro RMN ^1H do ácido fosfórico nos regimes de (A) alternância de amplitude, (B) quase-estacionário e (C) verdadeiramente estacionário.	30
Figura 8. Espectros simulados de RMN ^1H de óleo, com pulsos de 90° , $T_1 = 138$ ms, $T_2 = 53$ ms, $T_2^* = 0,5$ ms e T_p de 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7; 0,9 e 0,3 ms, dos espectros A a H respectivamente.	32
Figura 9. Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco, como uma dependência do ângulo de <i>offset</i> .	33
Figura 10. Estabelecimento do regime estacionário para uma amostra de água com $T_2 = 2,7$ s, $T_p = 300$ μs e $\theta = 90^\circ$ para ψ (a) 4π e (b) 5π .	34
Figura 11. Sinais de RMN ^{13}C obtidos com a sequência de SSFP de iodeto de metila com T_p (A) constante e (B) aleatório.	36
Figura 12. Espectros de RMN ^{13}C no SSFP para iodeto de metila com T_p (a) constante, (b) aleatório após cada pulso e (c) aleatório após aplicação de 64 pulsos.	37
Figura 13. Espectros de RMN ^{31}P de ácido fosfórico obtido com a sequência de SSFP.	38
Figura 14. Espectros de RMN ^{31}P de ácido fosfórico observado quando $T_p < T_1$, T_2 (curva superior), e $T_p > 5T_1$ (curva inferior).	39
Figura 15. Espectros de RMN ^{109}Ag obtidos com a sequência (A) SSFP com QFT e (B) convencional.	39
Figura 16. Sinais de RMN de uma amostra de óleo de 2,2 mg de óleo vegetal obtidos com a sequência (A) convencional e (B) CWFP.	42

Figura 17. Variação da intensidade do sinal CWFP em função da concentração do óleo vegetal em CCl ₄ .	43
Figura 18. (A) Intensidade do sinal de óleo obtido com a sequência de CWFP com 96 fragmentos de noz macadâmia e (B) gráfico da massa de óleo versus intensidade do sinal CWFP das 96 amostras.	43
Figura 19. Variação da amplitude do sinal (A) FID, (B) Eco e (C) CWFP para sementes de milho com diferentes umidades.	44
Figura 20. Estrutura química das moléculas de: (A) acetato de sódio, (B) acetato de etila, (C) octanol e (D) brucina.	47
Figura 21. Representação esquemática e vetorial da sequência de inversão recuperação.	48
Figura 22. Representação esquemática e vetorial da sequência de CPMG.	50
Figura 23. Representação esquemática da sequência convencional para aquisição de espectros de RMN.	51
Figura 24. Representação esquemática da sequência padrão para análise de ¹³ C.	52
Figura 25. Representação esquemática da sequência SSFP-A.	52
Figura 26. Representação esquemática da sequência SSFP-B.	53
Figura 27. Representação esquemática da sequência “SSS”.	54
Figura 28. Modelo vetorial para o comportamento da magnetização durante o processo de relaxação.	54
Figura 29. Modificação na fase dos pulsos na sequência de SSFP para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal.	56
Figura 30. Modificação na configuração do desacoplamento para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal (A) SSFP com efeito NOE e (B) SSFP sem efeito NOE.	56
Figura 31. Gráficos da variação da intensidade do sinal de RMN em função do tempo para a sequência de IR (A) e CPMG (B), que foram utilizadas para a determinação dos valores de T ₁ e T ₂ , respectivamente.	60
Figura 32. Variação da intensidade do sinal em função de θ para obtenção do ângulo ótimo para o núcleo ¹³ C ₂ da amostra de acetato de sódio.	61
Figura 33. Representação esquemática da molécula de acetato de etila.	62
Figura 34. Sinais de RMN no domínio do tempo de ¹³ C de acetato de sódio obtidos com as sequências: (A) convencional e (B) SSFP.	63

Figura 35. Sinal de RMN de ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência de SSFP com um $T_p = 0,3$ s.....	64
Figura 36. Espectros de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com a sequência (A) convencional e (B) SSFP.	65
Figura 37. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtidos com a sequência (A) convencional e (B) SSFP.	66
Figura 38. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência de SSFP.	67
Figura 39. Sinais de RMN no domínio do tempo de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com a sequência de SSFP com aplicação de um t igual a (A) 0,9 e (B) 1,3797 s.	69
Figura 40. Sinais de RMN no domínio do tempo de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com a sequência padrão com aplicação de um t igual a (A) 0,9 e (B) 1,3797 s.	70
Figura 41. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de etila obtidos com a sequência (A) padrão e (B) SSFP.	70
Figura 42. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de etila obtidos com a sequência de SSFP com aplicação de um <i>offset</i> de (A) 100 e (B) 1000 Hz.....	72
Figura 43. Espectros de RMN ^{13}C de octanol obtidos com a sequência (A) padrão e (B) SSFP.....	73
Figura 44. Espectros de RMN ^{13}C de brucina obtidos com a sequência (A) padrão e (B) SSFP.....	73
Figura 45. Sinais de RMN ^{13}C da amostra de acetato de sódio obtidos com a sequência de SSS (A) com T_p igual a 300 ms (curva superior) e 310 ms (curva inferior) e (B) somatório dos sinais mostrados na Figura 42A.....	75
Figura 46. Sinais de RMN ^{13}C da amostra de acetato de sódio obtidos com a sequência de SSS (A) com T_p igual a 300 ms (curva superior) e 305 ms (curva inferior), (B) sobreposição dos sinais mostrados na Figura 46A, (C) somatória dos sinais apresentados na Figura 46A e (C) TF do sinal mostrado na Figura 46C.	76
Figura 47. Sinais de RMN ^{13}C da amostra de acetato de etila obtido com a sequência SSS com aplicação de valores de <i>offset</i> iguais (A) 100, (B) 500, (C) 1000 e (D) 2000 Hz.....	78
Figura 48. Sinais de RMN ^{13}C da amostra brucina obtido com a sequência SSS com aplicação de valores de <i>offset</i> iguais (A) 100, (B) 500, (C) 1000 e (D) 2000 Hz.	79
Figura 49. Sinais de RMN ^{13}C da amostra acetato de sódio obtido com a sequência SSS com variações de T_p igual a (A) 20, (B) 40, (C) 80 e (D) 120.....	80
Figura 50. Sinais de RMN ^{13}C da amostra brucina obtido com a sequência SSS com variações de T_p igual a (A) 20, (B) 40, (C) 80 e (D) 120.	81

Figura 51. Representação da dispersão de 3 blocos distintos de números aleatórios formados por (A) 20 e (B) 120 números ao longo de um tempo T_p .	82
Figura 52. Espectros de ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência <i>SSS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	84
Figura 53. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência <i>SSS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	84
Figura 54. Espectros de ^{13}C de octanol obtido com a sequência <i>SSS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	84
Figura 55. Espectros de ^{13}C de brucina obtido com a sequência <i>SSS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	85
Figura 56. Sinais de RMN de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com as sequências (A) SSFP-B e (B) <i>SSS</i> .	85
Figura 57. Sinais de RMN de ^{13}C acetato de etila obtidos com as sequências (A) SSFP-B e (B) <i>SSS</i> .	86
Figura 58. Sinais de RMN de ^{13}C de octanol obtidos com as sequências (A) SSFP-B e (B) <i>SSS</i> .	86
Figura 59. Sinais de RMN de ^{13}C brucina obtidos com as sequências de (A) SSFP-B e (B) <i>SSS</i> .	86
Figura 60. Espectros de ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência <i>USS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	88
Figura 61. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência <i>USS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	88
Figura 62. Espectros de ^{13}C de octanol obtido com a sequência <i>USS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	89
Figura 63. Espectros de ^{13}C de brucina obtido com a sequência <i>USS</i> com <i>offset</i> = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.	89
Figura 64. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de sódio obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.	90
Figura 65. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de etila obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.	91
Figura 66. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de octanol obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.	91
Figura 67. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de brucina obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.	91

Figura 68. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de sódio obtido com a SSFP sem efeito NOE.....	93
Figura 69. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de etila obtido com a SSFP sem efeito NOE.....	93
Figura 70. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de octanol obtido com a SSFP sem efeito NOE.....	93
Figura 71. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra brucina obtido com a SSFP sem efeito NOE.	94
Figura 72. Espectros de RMN-SSFP de ^{13}C obtidos com a amostra de acetato de sódio com $T_p = 0,5\text{ s}$, $\theta = 90^\circ$ e <i>offset</i> de (-) 500 e (-)497,5 Hz.....	96
Figura 73. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência QFT.	96
Figura 74. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência SSFP.	97
Figura 75. (A) Espectros de RMN-SSFP de ^{13}C obtidos com a amostra de acetato de sódio com $T_p = 0,5\text{ s}$, $\theta = 90^\circ$ e <i>offset</i> de (-) 500 e (-) Hz e (B) após aplicação da sequência QFT.	98
Figura 76. Sinal de RMN-SSFP ^1H no domínio do tempo da mistura de acetona e clorofórmio.	101
Figura 77. Decomposição do sinal de RMN-SSFP no domínio do tempo em suas duas componentes: FID e eco, pela FDM.	102
Figura 78. Sinal de RMN-SSFP ^{13}C no domínio do tempo da amostra de octanol.	102
Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C da amostra de octanol obtidos do sinal mostrado na Figura 78 através do processamento (A) TF e (B) FDM.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação do número quântico de spin com número atômico e massa do átomo.....	20
Tabela 2. Valores da constante giromagnética e da abundância natural para alguns núcleos estudados em RMN.....	20
Tabela 3. Valores de T_1 , T_2 e $\theta_{ótimo}$ para os diferentes núcleos de ^{13}C presentes na molécula de acetato de etila.	61
Tabela 4. Tempo gasto nas análises das amostras de acetato de sódio e etila com as seqüências de SSFP e convencional.	67
Tabela 5. Tempo gasto nas análises das amostras de acetato de etila, octanol e brucina com as seqüências de SSFP e padrão.	73
Tabela 6. Relação entre o tempo de análise obtido com a seqüência SSS.....	83
Tabela 7. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as seqüências SSS e a padrão.	87
Tabela 8. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as seqüências “USS” e a padrão.....	90
Tabela 9. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as seqüências SSFP com ciclagem de fase dos pulsos e padrão.	92
Tabela 10. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as seqüências SSFP com introdução de uma incoerência e padrão.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

rf - radiofrequência

I - Número quântico de spin

μ - momento magnético nuclear

γ - razão magnetogírica

a - momento angular

B_0 - Campo magnético estático

α - nível de energia fundamental

β - nível de energia excitado

ΔE - diferença de energia entre os níveis energéticos

m_l - número quântico direcional

N_α - população de spins no nível de menor energia

N_β - população de spins no nível de maior energia

k - constante de Boltzman

T - temperatura (K)

M_0 - magnetização resultante no equilíbrio térmico

ν_0 - frequência de Larmor

ω_0 - velocidade angular de precessão

B_1 - campo magnético oscilante

θ - ângulo de rotação

τ - duração do pulso

TF - Transformada de Fourier

M_{xy} - componente transversal da magnetização

FID - Free induction decay

T_2 - tempo de relaxação transversal

ΔB_0 - heterogeneidade de B_0

T_2^* - tempo de decaimento aparente

T_1 - tempo de relaxação longitudinal

M_z - componente longitudinal da magnetização

s/r - razão sinal/ruído

T_p - Intervalo de tempo entre os pulsos

SSFP - Steady-State free precession

SS - Steady-State

M^+ - magnetização após aplicação do pulso

M^- - magnetização imediatamente antes da aplicação do pulso

$\Delta\omega\tau$ - ângulo de precessão

T^* - decaimento da magnetização no regime quase-estacionário

M_{+s} - magnetização no estado verdadeiramente estacionário

n - número de pulsos

CWFP - Continuous Wave Free Precession

Offset - frequência de irradiação

ψ - ângulo de defasagem

RMN-SSFP - espectros de RMN no estado estacionário de precessão livre

SSS - Scrambled Steady State

ν_p - frequência irradiada

ν_E - frequência da rf irradiada

ρ - número de experimentos (0, 1, 2 e 3)

z - nova escala das abscissas em Hz

x - escala inicial em Hz

QFT - Quadriga Fourier Transform

NQR - Nuclear Quadrupolar Resonance

$\theta_{\text{ótimo}}$ - ângulo ótimo de rotação

r^2 - coeficiente de correlação linear

D₂O - água deuterada

C₃D₆O - acetona deuterada

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

TMS - tetrametilsilano

DSS - 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio

IR - Inversão-Recuperação

CPMG - Carr-Purcell-Meiboom-Gill

at - tempo de aquisição

T_r - tempo de reciclo

n_t - número de espectros promediados

p1 - pulso aplicado para efetuar a transição dos spins

d2 - intervalo de tempo entre os pulsos em um loop

p2 - pulso aplicado para efetuar a transição dos spins

P - período

F - frequência

USS - Unscrambled Steady State

NOE - Nuclear Overhauser Effect

ν_r - frequência aplicada para a excitação da amostra

ΔT_p - quantidade de números aleatórios aplicados para as variações de T_p

N - concentração de núcleos por unidade de volume

Q - fator de qualidade da bobina de recepção

V_c - volume da amostra

$\Delta\nu$ - tamanho da janela espectral

ξ - fator de preenchimento da bobina de detecção

f - figura de ruído do pré-amplificador

FDM - Filter Diagonalization Method

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Fundamentos da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear[4,8,9]	19
1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Precessão Livre no Estado Estacionário	26
1.2.1. Anomalias de fase e intensidade do sinal em espectros de RMN-SSFP	34
1.2.2. Aplicações da SSFP	40
2. OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Amostras utilizadas	47
3.2. Equipamento utilizado	47
3.3. Sequências de RMN utilizadas	48
3.3.1. Inversão-Recuperação (IR)	48
3.3.2. CPMG	49
3.3.3. Sequência para determinação do Ângulo Ótimo	50
3.3.4. Sequência convencional.....	51
3.3.5. Sequência padrão para análise de ^{13}C	51
3.3.6. SSFP.....	52
3.3.6.1. SSFP-A	52
3.3.6.2. SSFP-B.....	53
3.3.7. Sequências para supressão das anomalias de fase e amplitude do sinal	53
3.3.7.1. Scrambled Steady State (SSS).....	53
3.3.7.2. Unscrambled Steady State (USS).....	55
3.3.7.3. SSFP com ciclagem de fase dos pulsos	55
3.3.7.4. SSFP com alteração no desacoplamento de ^1H	56
3.3.7.5. QFT	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Precessão Livre no Estado Estacionário (SSFP).....	58
4.1.1. Dependência de T_1 e T_2 para aquisição dos sinais no regime de SSFP	60
4.1.2. Comparação entre as sequências SSFP e convencional.....	62
4.1.3. Comparação entre as sequências SSFP e padrão	68
4.2. Estudo das sequências para eliminação das anomalias nos espectros de RMN-SSFP ..	74
4.2.1. Avaliação da proposta de Freeman e Hill	74
4.2.1.1. Dependência do <i>Offset</i>	74
4.2.1.2. Dependência do número de variações para T_p	79
4.2.1.3. Aplicação da sequência de Freeman e Hill	83
4.2.2. Avaliação da sequência <i>Unscrambled Steady State</i>	87
4.2.3. Avaliação da sequência de SSFP com ciclagem de fase dos pulsos.....	90
4.2.4. SSFP com alteração no desacoplamento de ^1H	92
4.2.5. Avaliação da proposta de Schwenk	95

5. CONCLUSÃO	99
6. PROPOSTAS FUTURAS.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

1. INTRODUÇÃO

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das mais importantes técnicas analíticas, com aplicações nas mais diversas áreas da ciência. O desenvolvimento desta técnica teve início nos anos 20 quando Otto Stern e Walther Gerlach^{1,2,3}, ao realizarem um experimento com átomos de prata, verificaram que estes quando sujeitos a um campo magnético não-homogêneo sofriam desvios em relação a sua orientação. Com base neste experimento, Stern e Gerlach concluíram que os elétrons apresentavam um momento angular intrínseco, denominado de spin, e que este momento era uma grandeza quantizada.

No entanto, foi no ano de 1924 que a base do fenômeno da espectroscopia de RMN foi proposta por Wolfgang Pauli^{2,4} ao constatar que certos núcleos atômicos apresentavam propriedades magnéticas, ou seja, comportavam-se como pequenos ímãs e que, conseqüentemente, a exposição destes a um campo magnético deveria levar a um desdobramento de seus níveis de energia.

No ano de 1939, Isidor Rabi^{1,2} e colaboradores, no seguimento das experiências realizadas por Stern e Gerlach, submeterem um feixe de hidrogênio a um campo magnético não homogêneo simultaneamente com a aplicação de uma radiação eletromagnética no domínio da radiofrequência (rf). Nesta experiência, Rabi e colaboradores, verificaram que para um determinado valor de frequência o feixe absorvia energia. Este experimento marca, historicamente, a primeira observação do fenômeno de RMN.

Anos mais tarde, 1945-46, os físicos Felix Bloch e Edward Purcell⁴, procurando aprimorar as medidas para determinação dos momentos magnéticos nucleares, observaram sinais de absorção na região de radiofrequência dos núcleos de ^1H em amostras de água e

parafina. De forma independente, eles desenvolveram dois métodos de análise: um baseado na aplicação da rf contínua e outro na aplicação da rf pulsada. A importância desta descoberta foi tão notória que seus descobridores foram laureados com o Prêmio Nobel de Física.

Contudo, a técnica de RMN teria um grande avanço quando Packard⁴ e outros assistentes de Bloch substituíram a amostra de água por etanol. O resultado obtido foi um espectro que apresentava três sinais e não somente um sinal, como para água. Este experimento veio a indicar um dos aspectos mais importantes da técnica de RMN: núcleos iguais, mas em ambientes químicos diferentes, absorvem energia em rf diferentes. Este efeito foi denominado de deslocamento químico. Pouco tempo após esta descoberta, 1953, já eram produzidos e comercializados os primeiros espectrômetros de RMN, e desde então, a RMN vem se desenvolvendo de forma rápida e contínua, apresentando aplicações nas mais diversas áreas^{5,6,7}.

1.1. Fundamentos da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear[4,8,9]

A RMN, assim como as demais técnicas espectroscópicas, constitui um exemplo de interação da matéria com a radiação eletromagnética. Em particular, a RMN baseia-se nas propriedades magnéticas apresentadas por determinados núcleos atômicos, os quais apresentam um comportamento similar a um pequeno ímã. Estas propriedades apresentadas pelo núcleo atômico são decorrentes do seu respectivo movimento de rotação em torno do seu próprio eixo nuclear, que conseqüentemente gera um momento angular de spin. Este momento angular de spin pode ser expresso em termos de número quântico de spin (representado pela letra I).

Na Tabela 1 tem-se a relação entre o número quântico de spin, os quais podem assumir valores nulo, inteiro ou fracionado, com o número atômico e de massa do átomo. Os núcleos que possuem $I = 0$, não são observáveis pela RMN por apresentarem spin nulo.

Tabela 1. Relação do número quântico de spin com número atômico e massa do átomo.

Número de Massa	Número Atômico	Valor de I
Ímpar	Par ou Ímpar	1/2, 3/2, ...
Par	Par	0
Par	Ímpar	1,2,3, ...

A magnitude desta propriedade gerada pelo núcleo atômico é expressa em termos do momento magnético nuclear, μ , que está orientado na direção do eixo do spin. O valor de μ é diretamente proporcional ao momento angular do núcleo a e sua constante magnetogírica, γ , como mostra a equação 1:

$$\mu = \gamma \cdot a \quad (1)$$

A constante magnetogírica é uma característica de cada núcleo e pode ser utilizada como parâmetro para definir a sensibilidade do núcleo para a RMN por descrever a diferença de energia (ΔE) entre os níveis de energia, para determinados núcleos, quando na presença de campo magnético externo. Como mostrado na equação 1, quanto maior o valor de γ , maior será μ e, desta forma, maior será a interação desse vetor com o campo magnético aplicado. Na tabela 2 têm-se os valores desta constante para alguns núcleos comumente estudados em RMN juntamente com sua abundância natural.

Tabela 2. Valores da constante giromagnética e da abundância natural para alguns núcleos estudados em RMN.

Núcleo	$\gamma \times 10^6$ (rad / s.T)	Abundância Natural
^1H	267,522	99,99 %
^{13}C	67,28	1,1 %
^{31}P	108,394	100 %

Quando uma amostra, contendo um núcleo com spin $I > 0$ é submetida a um campo magnético estático B_0 , ocorre interação entre o μ do núcleo em questão com o campo B_0 . Esta interação separa os spins em $2I+1$ níveis de energia e faz com que os núcleos atômicos se

posicionem a favor ou contra o campo. Este efeito do desdobramento dos níveis de energia é denominado de Efeito Zeeman. Na Figura 1, pode-se verificar a interação do campo magnético, $\mathbf{B}_0$, sobre um núcleo com $I = 1/2$. Nesta figura, observa-se que na ausência de um campo magnético estático, $\mathbf{B}_0 = 0$, os níveis de menor e maior energia, α e β , não se distinguem em energia, isto é, estão degenerados. Porém, na presença de um campo magnético, $\mathbf{B}_0 > 0$, os dois níveis são separados por uma diferença de energia, ΔE .

Figura 1. Representação do efeito do campo magnético para spins $I = 1/2$.

Ainda na Figura 1, observa-se que os spins posicionados a favor do campo magnético, encontram-se em um estado de menor energia (α), enquanto que os spins com orientação contrária ao campo magnético, encontram-se em uma estado de maior energia (β). A energia associada a estes níveis de energéticos é dada por:

$$E = \mu B_0 = \gamma m_l \hbar B_0 \quad (2)$$

onde m_l é a relação entre o spin nuclear e o momento magnético que leva a uma série de estados quânticos magnéticos observáveis, denominados de número quântico direcional, que são dados por $m_l = I, I - 1, I - 2, \dots, -I$.

Desta forma, através da equação 2, tem-se os seguintes auto-estados possíveis para o sistema de $I = 1/2$:

$$E_\alpha = -1/2 \gamma \hbar B_0 \quad (3)$$

$$E_\beta = +1/2 \gamma \hbar B_0 \quad (4)$$

Assim, de acordo com as equações 3 e 4, a diferença de energia (ΔE) entre os estes níveis α e β é:

$$\Delta E = E_{\beta} - E_{\alpha} = \gamma \hbar \mathbf{B}_0 \quad (5)$$

A distribuição da população de spins nucleares entre esses dois níveis de energia pode ser calculada através da equação de distribuição de Boltzmann (equação 6), mostrada logo abaixo.

$$N_{\alpha}/N_{\beta} = \exp(\Delta E/kT) \quad (6)$$

onde N_{α} = população de spins no nível de menor energia

N_{β} = população de spins no nível de maior energia

ΔE = diferença de energia entre os níveis α e β

k = constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

T = temperatura (K).

Por esta equação, verifica-se que apenas dois parâmetros, variáveis, afetam diretamente a diferença de população entre os níveis de energia: T e B_0 . Assim, umas das maneiras de se obter um aumento da sensibilidade na RMN pode ser realizado através do decréscimo da temperatura.

Sabendo-se que o nível α apresenta menor energia por estar orientado a favor do campo magnético, haverá um pequeno excesso de população neste nível de energia quando comparado com o nível β . Desta diferença de população surge um momento magnético total ou uma magnetização resultante, $\mathbf{M}_0$, a qual é normalmente definida como a somatória do excesso dos momentos magnéticos μ , posicionada a favor de $\mathbf{B}_0$, como mostra a equação 7:

$$\mathbf{M}_0 = \sum \mu \quad (7)$$

Como resultado da interação de $\mathbf{M}_0$ e $\mathbf{B}_0$ (eixo z), surge um movimento de rotação do núcleo atômico ao redor de $\mathbf{B}_0$ (eixo z). Este movimento, aliada a rotação exercida pelo núcleo atômico em torno de seu próprio eixo, gera um movimento análogo ao do pião no campo gravitacional da Terra, denominado de movimento de precessão. Este movimento pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2. Representação vetorial do movimento de precessão.

A frequência com que o núcleo exerce este movimento de precessão nuclear também é conhecida como frequência de Larmor, ν_0 (equação 8).

$$\nu_0 = \gamma \cdot \mathbf{B}_0 / 2\pi \text{ ou } \omega_0 = \gamma \cdot \mathbf{B}_0 \quad (8)$$

onde ω_0 é a velocidade angular de precessão

A equação 8 é considerada a equação fundamental da RMN, pois define a frequência de ressonância (ν_0) do núcleo estudado em relação ao campo magnético estático aplicado, $\mathbf{B}_0$.

A condição de ressonância é atingida quando se aplica um campo magnético oscilante linearmente polarizado, $\mathbf{B}_1$, sob a forma de um pulso de rf, com frequência igual à ν_0 , perpendicularmente a $\mathbf{B}_0$. O resultado deste processo é a transição dos spins nucleares entre os níveis de energia. Com o uso de um sistema vetorial denominado de coordenadas girantes é possível uma melhor visualização deste processo de excitação dos spins. Este sistema é representado pelas coordenadas z, x' e y' e considera-se que o plano x'y' gira em

torno do eixo z com velocidade de rotação idêntica ao do pulso de rf aplicado. Na Figura 3, tem-se a representação vetorial da aplicação de um pulso de rf, o qual exerce um torque sobre $\mathbf{M}_0$ deslocando-a θ graus em relação ao eixo z, projetando-se sobre o plano $x'y'$.

Figura 3. Representação vetorial da magnetização de um sistema de spins no modelo de coordenadas girantes (a) quando em equilíbrio térmico e (b) após aplicado um pulso de rf.

O ângulo de rotação θ depende da duração do pulso, τ , e da intensidade de $\mathbf{B}_1$, conforme mostra a equação 9. Para muitos experimentos com transformada de Fourier (TF), escolhe-se uma duração do pulso igual a 90° , como mostrado na figura 3B, obtendo-se assim o máximo da intensidade do sinal.

$$\theta = \gamma \mathbf{B}_1 \tau \quad (9)$$

onde θ é o ângulo de rotação em radianos.

Com o deslocamento da magnetização para o plano $x'y'$, surge uma componente $\mathbf{M}_{xy}$ que é responsável pela geração do sinal de RMN através da indução de uma corrente elétrica em uma bobina receptora. O sinal obtido encontra-se no domínio do tempo, e é denominado de FID, proveniente do termo Free Induction Decay (Decaimento da Indução Livre). Este sinal é usualmente convertido para o domínio da frequência pela transformada de Fourier (TF) gerando os espectros de RMN, com os respectivos deslocamentos químicos para cada núcleo atômico.

Após o pulso de rf, os spins encontram-se em um estado excitado, e para retornar a condição de equilíbrio térmico ocorrem dois processos distintos e simultâneos: um responsável pelo desaparecimento da magnetização no plano $x'y'$ e outro responsável pela recuperação da magnetização ao longo do eixo z . Estes processos são denominados de relaxação transversal e longitudinal, respectivamente.

O processo de relaxação transversal, que é caracterizado por um tempo T_2 , corresponde à perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos individuais na sua precessão e, portanto, resulta em um aumento na entropia do sistema. Esta perda de coerência de fase é atribuída às interações diretas entre os momentos de spins individuais. Assim, este processo também é denominado de relaxação spin-spin e é responsável por um decaimento exponencial da intensidade da magnetização $\mathbf{M}_{xy}$, como mostra a equação 10, quando na presença de um campo magnético estático ideal, $\Delta\mathbf{B}_0 = 0$.

$$\mathbf{M}_{xy}(t) = \mathbf{M}_0 \exp(-t/T_2) \quad (10)$$

onde T_2 é o tempo de relaxação transversal.

Em condições reais, onde $\Delta\mathbf{B}_0 \neq 0$, o decaimento exponencial do sinal de RMN (FID) é regido por um tempo de decaimento aparente, T_2^* , que além do tempo de relaxação intrínseco da amostra, abrange o termo $\Delta\mathbf{B}_0$ da seguinte forma:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma\Delta B_0 \quad (11)$$

onde $\Delta\mathbf{B}_0$ é a heterogeneidade do campo $\mathbf{B}_0$.

Esta heterogeneidade do campo $\mathbf{B}_0$ faz com que a magnetização transversal disperse mais rapidamente no plano $x'y'$, alargando o sinal de RMN no domínio da frequência.

Já o processo de relaxação longitudinal, ao contrário da relaxação transversal, ocorre devido à transferência do excesso de energia potencial magnética do estado excitado para a vizinhança ou para a rede. Este processo de transferência também é denominado de relaxação spin-rede ou simplesmente de T_1 que é o tempo que governa a recuperação da magnetização ao longo do eixo z como mostra a equação 12:

$$\mathbf{M}_z = \mathbf{M}_0 [1 - \exp(-t/T_1)] \quad (12)$$

onde T_1 é o tempo de relaxação spin-rede.

A RMN é uma técnica que apresenta baixa sensibilidade quando comparada com às demais técnicas espectroscópicas e, conseqüentemente, para se obter uma boa razão sinal/ruído (s/r) é necessário acumular um grande número de espectros. Neste contexto, o processo de relaxação longitudinal tem um efeito prático nas medidas de RMN, pois caso seja muito longo, o tempo total de uma análise pode levar dias para ser finalizada, já que antes da aplicação de cada pulso deve-se esperar um tempo da ordem de $5T_1$ (tempo necessário para que 99,3% da magnetização resultante retorne a condição de equilíbrio térmico). Dessa maneira, novas metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de obter uma redução no valor do intervalo de tempo entre os pulsos, T_p .

1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Precessão Livre no Estado Estacionário

Com o objetivo de tornar as análises de RMN mais rápidas, Carr¹⁰ propôs no ano de 1958 uma seqüência na qual o T_p era independente dos tempos de relaxação T_1 e T_2 . Desta forma, tornou-se possível a adição de vários espectros por segundo e conseqüentemente obter um ganho significativo na razão s/r para o mesmo tempo de análise quando comparada com as seqüências normalmente utilizadas para aquisição de espectros de RMN. A seqüência, desenvolvida por Carr, foi denominada de Precessão Livre no Estado Estacionário (Steady

State Free Precession – SSFP) e é estabelecida através da aplicação de um trem de pulsos de mesma fase, duração e intensidade, e igualmente espaçados por um tempo menor que os tempos de relaxação T_1 e T_2 . A resposta de um sistema de spins quando submetido a esta seqüência, pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática da intensidade do sinal de RMN depois de aplicado um trem de pulsos de rf igualmente espaçados por $T_p < T_2$.

Por esta figura, observa-se que após aplicação de um determinado número de pulsos a intensidade do sinal não varia mais. Neste momento diz-se que a magnetização atingiu o regime de estado estacionário (Steady State – SS). No entanto, com a utilização de um $T_p < T_2$, T_1 a magnetização transversal não decai a zero, e o sistema de spins atinge não somente o regime de SS, como restabelece a intensidade da magnetização transversal antes de cada pulso sob a forma de eco. Nesta condição, diz-se que o sistema atingiu o regime de SSFP. Desta forma, pode-se concluir que na seqüência de SSFP cada pulso aplicado é responsável por dois processos simultâneos: a excitação da magnetização longitudinal, gerando um FID logo após o pulso, M^+ , e a refocalização da magnetização transversal residual sob a forma de um eco, M^- , antes do próximo pulso da seqüência.

Freemann e Hill¹¹, no ano de 1971, relacionaram a seqüência de SSFP com a seqüência desenvolvida por Hahn no ano de 1950, a qual foi denominada de eco de Hahn¹². Nesta seqüência, após a aplicação de dois pulsos de 90° , igualmente espaçados, têm-se a formação de um eco cuja intensidade é independente da não-homogeneidade do campo. Uma descrição vetorial deste processo pode ser visualizada na Figura 5.

Na Figura 5A, observa-se que a magnetização resultante encontra-se no equilíbrio térmico. Após a aplicação do primeiro pulso a magnetização desloca-se para o plano $x'y'$ com um ângulo de 90° (5B). Durante o intervalo de tempo T_p , a magnetização se defasa com um ângulo $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$ devido à não-homogeneidade do campo magnético e ao processo de relaxação transversal do núcleo, conforme ilustrado na figura 5C. Ao final do intervalo de tempo T_p um segundo pulso de 90° é aplicado deslocando os momentos magnéticos do plano $x'y'$ para o plano $x'z$ (5D). Ao longo do novo intervalo T_p , os momentos magnéticos precessionam ao redor de z , refocalizando-se em $2T_p$ conforme ilustrado na Figura 5E. Considerando-se a posição de cada momento magnético na esfera no instante $2T_p$, o desenho resultante, como se pode observar na Figura 5E, e é semelhante ao do número oito projetado na casca esférica de raio igual ao módulo do vetor momento magnético. Por este motivo, este modelo ficou conhecido como “8 Ball”.

Figura 5. Representação vetorial do eco de Hahn para descrever o eco formado por dois pulsos de 90° ¹².

Freemann e Hill¹¹ realizaram uma série de experimentos nos quais foram introduzidos outros pulsos de 90° , igualmente espaçados, até atingir o regime de SSFP. Na Figura 6A observa-se que após a aplicação de dois pulsos de 90° ocorre a formação de um eco negativo em $2T_p$. Ao aplicar um terceiro pulso (Figura 6B), observa-se que este pulso coincide exatamente sobre o pico do eco, fazendo com que o sinal decaia ocasionando a formação de dois ecos: um intenso em $3T_p$ e um de menor intensidade em $4T_p$. Nas Figuras 6C e 6D, pode-se verificar que ao aplicar uma seqüência de quatro ou mais pulsos, também igualmente espaçados, o sinal passa a ser composto por duas componentes: FID e eco. A formação da componente eco é resultante da utilização de um T_p menor que T_2 .

Figura 6. Sinais de RMN ^1H obtidos de um trem de pulsos de 90° igualmente espaçados por um intervalo $T_p < T_2$ ¹¹.

Recentemente, Venâncio e colaboradores^{13,14}, verificaram que o sinal característico para o estabelecimento do regime de estado estacionário é composto de três estágios distintos, como mostra a Figura 7. O primeiro corresponde ao período em que o sinal apresenta uma alternância em sua amplitude (Figura 7A). Após este período de oscilação da intensidade do sinal, a magnetização entra em um segundo estágio, chamado estado quase-estacionário (Figura 7B). E por último, a magnetização entra no estado denominado de verdadeiramente estacionário, onde não se observa variações em sua intensidade. (Figura 7C).

Figura 7. Espectro RMN ^1H do ácido fosfórico nos regimes de (A) alternância de amplitude, (B) quase-estacionário e (C) verdadeiramente estacionário ¹³.

De acordo com a resolução das equações diferenciais apresentadas por Kronenbitter e Scwenk¹⁵, a constante que governa o decaimento da magnetização durante o regime quase-estacionário, T^* , é dada por:

$$T^* = \frac{2T_1T_2}{[T_1(1 - \cos \theta) + T_2(1 + \cos \theta)]} \quad (13)$$

Considerando um ângulo de rotação da magnetização para o plano $x'y'$, já definido na equação 9, igual a 90° , a equação 13 torna-se:

$$T^*(\theta = \pi/2) = \frac{2T_1T_2}{[T_1 + T_2]} \quad (14)$$

A intensidade do sinal no estado verdadeiramente estacionário, M_{+s} , está diretamente relacionada com o decaimento da magnetização, desde a condição de equilíbrio térmico, M_0 , através de T_1 e T_2 , até o estado estacionário ser completamente atingido, como mostra a equação 15:

$$|M_{+s}| = M_0 \frac{T_2}{[T_1 + T_2]} \quad (15)$$

Neste mesmo trabalho¹³, estes autores verificaram que o número de pulsos, n , necessários para atingir a condição de SSFP está diretamente relacionado com o valor de T_p e de T_2^* , como mostra a equação 16:

$$n = \frac{5T_2^*}{T_p} \quad (16)$$

Azeredo e colaboradores^{16,17} estudaram a influência do valor de T_p para obtenção de sinais de RMN no SSFP. Neste trabalho, os autores fixaram uma determinada homogeneidade de campo ($T_2^* = 0,5$ ms) e variaram os valores de T_p entre $3T_2 > T_p \ll T_2^*$. Os sinais de RMN de 1H , obtidos com uma amostra de óleo que apresenta um $T_1 = 138$ ms e um $T_2 = 53$ ms, podem ser visualizados na Figura 8.

Na Figura 8A, com a utilização de um $T_p = 500$ ms, que equivale aproximadamente $3T_1$, observa-se que o sinal de RMN é composto somente pela componente M^+ que apresenta uma pequena saturação. Na Figura 8B, observa-se uma saturação considerável do sinal de M^+ decorrente do decréscimo do valor de T_p para 108,3 ms ($T_2 > T_p < T_1$). Ao reduzir ainda mais o valor de T_p para um valor aproximadamente igual a T_2 ($T_p = 56,1$ ms), observa-se que além da saturação do sinal da componente M^+ , ocorre à formação de um sinal antes da aplicação do próximo pulso, denominado de M^- . Este resultado pode ser observado nas Figuras 8C, 8D, 8E e 8F, em que utilizou-se valores de T_p iguais a 56,1, 29,1, 15,1 e 2,7 ms, respectivamente. Nestes resultados, verifica-se que a utilização de um $T_p < T_2$, como mencionado anteriormente, é o requisito necessário para o estabelecimento do regime de SSFP, no qual o sinal é formado por um componente M^+ , logo após o pulso e por M^- , antes da aplicação do próximo pulso. Já nas Figuras 8G e 8H, ao utilizar um $T_p < T_2^*$, não é possível separar as componentes M^+ e M^- . Neste momento diz-se que a magnetização atingiu a condição de Precessão Livre em Onda Contínua (Continuous Wave Free Precession - CWFP), que é uma

variante peculiar da SSFP. No CWFP, o sinal apresenta uma amplitude constante com uma alta sobreposição das componentes M^+ e M^- .

Figura 8. Espectros simulados de RMN ^1H de óleo, com pulsos de 90° , $T_1 = 138$ ms, $T_2 = 53$ ms, $T_2^* = 0,5$ ms e T_p de 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7; 0,9 e 0,3 ms, dos espectros A a H respectivamente ¹⁶.

Em outro trabalho também publicado por Azeredo e colaboradores^{17,18}, foi estudado o comportamento do sinal no regime de CWFP. Estes autores verificaram que a intensidade do sinal no regime de CWFP depende de como as componentes M^+ e M^- interagem entre si. Neste trabalho, verificou-se que uma interferência construtiva das componentes M^+ e M^- leva ao máximo de sinal, e é obtido quando se aplica uma frequência de irradiação (*offset*) que corresponde a um múltiplo ímpar de π , $\psi = (2n+1)\pi$. Estas componentes também podem interagir de forma destrutiva, e o sinal obtido nesta condição é nulo. Esta forma de interferência é resultado da aplicação de um *offset* múltiplo par de π , $\psi = 2n\pi$. Os resultados obtidos nestas duas condições podem ser visualizados na Figura 9.

Na Figura 9, parte superior, observa-se que o *offset* aplicado apresenta um ângulo de defasagem de 5π , e, conseqüentemente, o sinal resultante da soma das componentes M^+ e M^- é máximo. Isto ocorre devido a uma interação construtiva destas duas componentes que encontram-se em coerência de fase. Já na parte inferior da Figura 9, tem-se o resultado obtido

com aplicação de *offset* com ângulo de defasagem 4π . Neste resultado, verifica-se uma interação destrutiva das componentes M^+ e M^- devido estarem defasadas 180° uma da outra e, desta forma, o sinal obtido é nulo.

Figura 9. Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco, como uma dependência do ângulo de *offset*¹⁴.

Neste mesmo trabalho, Azeredo e colaboradores¹⁸ estudaram o tempo necessário para que um sistema de spins alcançasse o regime de SSFP. Resultados obtidos com amostra de água, $T_2 = 2,7$ s, demonstraram que o regime de SSFP é estabelecido após aproximadamente 10 ms. Isso significa que se deve aplicar mais de 30 pulsos separados por um $T_p = 300$ μ s. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 10, onde se observa que até um tempo de 10 ms o sinal apresenta variações em suas intensidades, e após este período, o sistema atinge o regime de SSFP, no qual a intensidade do sinal não varia mais. Verifica-se ainda nestes resultados que o valor de *offset* utilizado no sinal mostrado na Figura 10A é diferente do utilizado para aquisição do sinal mostrado na Figura 10B. De acordo com a teoria

apresentada anteriormente, conclui-se que o valor de *offset* aplicado nestes experimentos foi ímpar e par, respectivamente.

Figura 10. Estabelecimento do regime estacionário para uma amostra de água com $T_2 = 2,7\text{s}$, $T_p = 300\text{ }\mu\text{s}$ e $\theta = 90^\circ$ para ψ (a) 4π e (b) 5π ¹⁸.

Apesar da sequência de SSFP possibilitar uma aquisição rápida de espectros de RMN de alta resolução, ela nunca foi utilizada para análises de rotinas de ^{13}C . Isso pode ser justificado pelo fato de que os espectros de RMN obtidos com esta sequência apresentam anomalias de fase e amplitude do sinal, as quais são consequência direta da formação da componente M_z no sinal no domínio do tempo, devido à utilização de um $T_p < T_2$. Estas anomalias de fase e amplitude do sinal serão discutidas no item abaixo.

1.2.1. Anomalias de fase e intensidade do sinal em espectros de RMN-SSFP

Ernst e Anderson¹⁹, no ano de 1966, foram os primeiros a observar a presença de anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros de RMN quando obtidos no regime de SSFP (RMN-SSFP). Ao introduzirem a técnica de pulso e TF, estes autores avaliaram quais seriam as melhores condições para se obter o máximo da razão s/r nos espectros de RMN de alta resolução. Os resultados obtidos demonstraram que o aumento da razão s/r era diretamente proporcional ao decréscimo de T_p . No entanto, eles observaram que ao utilizar um T_p inferior a T_2 o espectro apresentava problemas de anomalia de fase e amplitude de

sinal. Deste modo, eles sugeriram que, para a solução deste problema, o tempo mínimo utilizado para T_p deveria ser de pelo menos três vezes o valor de T_2 , pois nesta condição ($T_p = 3T_2$) 95% da magnetização já havia perdido a coerência de fase.

Freemann e Hill¹¹, dando continuidade aos estudos realizados por Ernst e Anderson, avaliaram mais detalhadamente o emprego da SSFP como alternativa para melhorar a razão s/r nos espectros de RMN de alta resolução, para isso, eles desenvolveram novas seqüências com o objetivo de eliminar as anomalias de fase e amplitude dos sinais. Como mostrado na Figura 4, o sinal característico do regime de SSFP é composto por uma componente M^+ (FID) e M^- (eco) e, este eco seria o fator responsável pelo aparecimento destas anomalias nos espectros de RMN-SSFP. Desta forma, todas as metodologias estudadas por estes pesquisadores baseavam-se na eliminação da componente M^- no sinal de RMN.

Dentre as maneiras de eliminar a componente M^- , Freeman e Hill propuseram a introdução de uma incoerência entre os spins, sendo esta na forma de um gradiente de pulso, no acoplamento heteronuclear ou até mesmo em um lock instável. No entanto, todas estas metodologias promovem um decaimento acelerado da magnetização transversal, causando um alargamento na linha do espectro. Assim, estes pesquisadores desenvolveram novas seqüências para eliminação destas anomalias sem que ocorresse o alargamento do sinal. No total foram desenvolvidas duas metodologias, as quais foram denominadas de “*random pulse delay*” e “*scrambled steady state*”, sendo todas estas baseadas na utilização de variações aleatórias para T_p .

A primeira, denominada de “*random pulse delay*”, era realizada com variações de T_p com passos da ordem milissegundos, após a aplicação de cada pulso. No entanto, foi com a metodologia denominada de “*scrambled steady state - SSS*” que Freeman e Hill obtiveram os melhores resultados. Nesta seqüência as variações de T_p eram realizadas após aplicação de 64

pulsos. Os resultados obtidos com estas seqüências podem ser visualizados nas Figuras 11 e 12.

Na Figura 11a, pode-se visualizar o sinal de RMN de ^{13}C da amostra de iodeto de metila, enriquecido com ^{13}C , obtido com a seqüência de SSFP. Para aquisição deste sinal, utilizou-se um $T_p = 0,4\text{ s}$ ($T_p < T_1, T_2$). Neste resultado, observa-se que o sinal é composto pela componente M^+ e M^- . Na Figura 11b, tem-se o mesmo sinal de RMN, porém obtido com variações aleatórias de T_p após a aplicação de cada pulso. Neste resultado, observa-se que a componente M^- foi totalmente eliminada.

Figura 11. Sinais de RMN ^{13}C obtidos com a seqüência de SSFP de iodeto de metila com T_p (A) constante e (B) aleatório ¹¹.

Ao efetuar a transformada de Fourier destes sinais (Figura 11a e 11b), verificou-se que o espectro de RMN obtido com a SSFP desenvolvida por Carr (T_p constante) apresentava anomalias de fase e amplitude do sinal (Figura 12a). Na figura 12b, com a introdução de tempos aleatórios entre cada pulso, observa-se uma minimização das anomalias de fase porém, verifica-se um aumento significativo nas anomalias de intensidade do sinal, verificada pelo decréscimo nas intensidades dos sinais. Na Figura 12c, com a introdução de valores aleatórios para T_p após a aplicação de 64 pulsos, verificou-se que a qualidade espectral

apresentou uma melhora significativa, em que as intensidades dos sinais foram parcialmente recuperadas.

Figura 12. Espectros de RMN ^{13}C no SSFP para iodeto de metila com T_p (a) constante, (b) aleatório após cada pulso e (c) aleatório após aplicação de 64 pulsos ¹¹.

Ainda no ano de 1971, Schwenk²⁰ publicou um trabalho no qual apresentava uma outra metodologia para minimizar estas anomalias de fase e amplitude do sinal presentes nos espectros de RMN no SSFP. A alternativa proposta por Schwenk baseava-se na obtenção de quatro espectros com diferentes valores de frequências de irradiação (ν_p). Os valores de ν_p utilizados nesta sequência, eram obtidos de acordo com a equação 18.

$$\nu_p = \nu_E - \rho/(4T_p) \quad (18)$$

onde ν_E = frequência da rf irradiada

ρ = número de experimentos (0, 1, 2 e 3)

Devido à utilização de diferentes valores de frequência de irradiação, os quatro sinais adquiridos, não apresentam a mesma coordenada das abscissas. Assim, antes de somá-los coerentemente é necessário ajustar suas respectivas escalas. Este procedimento é realizado através da criação de uma nova coordenada (z) de acordo com a equação 19.

$$z = x - \rho/4 \quad (19)$$

onde x é a escala inicial em Hz.

Com esta metodologia, Schwenk conseguiu eliminar as anomalias de fase e amplitude dos espectros de RMN ao executar a somatória de somente quatro sinais. Esta seqüência foi denominada de *Quadriga Fourier Transform (QFT)* e seus resultados podem ser visualizados nas Figuras 13 e 14.

Na Figura 13, tem-se o espectro de RMN de ^{31}P da amostra de ácido fosfórico obtido com a seqüência de SSFP. Neste resultado, verifica-se que o sinal apresenta batimentos laterais decorrente da presença da componente M^- no sinal no domínio do tempo.

Figura 13. Espectros de RMN ^{31}P de ácido fosfórico obtido com a seqüência de SSFP ²⁰.

O mesmo espectro foi obtido com a seqüência QFT e pode ser visualizado na Figura 14 - curva superior. Nesta figura observa-se que a aplicação da QFT resultou na eliminação dos batimentos laterais, presentes nos espectros de RMN obtidos com a seqüência SSFP, resultante do truncamento do FID. Ao comparar o resultado obtido com esta seqüência com o espectro obtido com a seqüência convencional, na qual o T_p é da ordem de $5T_1$, (Figura 15 - curva inferior), verifica-se que estes espectros apresentam perfil similar.

Figura 14. Espectros de RMN ^{31}P de ácido fosfórico observado quando $T_p < T_1, T_2$ (curva superior), e $T_p > 5T_1$ (curva inferior) ²⁰.

Em outro trabalho também publicado por Schwenk²¹, este autor explorou o uso da sequência QFT como alternativa para aquisição rápida de espectros de RMN de prata (^{109}Ag), uma vez que esta apresenta um $T_1 = 86,5$ s e um $T_2 = 19,6$ s. Nos resultados obtidos, verificou-se que o tempo total de análise obtido com a sequência convencional ($T_p > 5 T_1$) foi de 17,2 horas enquanto que com a sequência QFT o tempo total de análise foi de 34 min. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 15, em que se observa que o espectro obtido na condição de SSFP - porém aplicando a sequência QFT (Figura 15A) - apresenta perfil similar ao obtido com a técnica convencional (Figura 15B).

Figura 15. Espectros de RMN ^{109}Ag obtidos com a sequência (A) SSFP com QFT e (B) convencional ²¹.

Métodos mais recentes, desenvolvidos por Rudakov e colaboradores^{23,24,25}, têm sido utilizados para eliminação destas anomalias presentes nos espectros adquiridos com a SSFP. Estes métodos baseiam-se na ciclagem de fases dos pulsos e também na introdução de pulsos adicionais na forma de blocos. Estas seqüências foram aplicadas na Ressonância Quadrupolar (*Nuclear Quadrupole Resonance - NQR*), e permitiram uma supressão eficaz do efeito destas anomalias quando utilizadas para detecção de nitrogênio (¹⁴N) em entorpecentes e explosivos.

1.2.2. Aplicações da SSFP

Apesar da presença de anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros adquiridos com a seqüência de SSFP, trabalhos recentes têm mostrado seu uso para medidas simultâneas dos tempos de relaxação T_1 e T_2 ^{13,14,15}, estudos em processos dinâmicos¹⁴, análises quantitativas¹⁶, medidas em fluxo²⁶, quantificação de um determinado analito dentro de um sistema multicomponente¹⁸, entre outras aplicações²⁷⁻³⁰.

Uma das primeiras aplicações da seqüência de SSFP, encontrada na literatura, foi publicada por Kronenbitter e Schwenk¹⁵ no ano de 1976. Estes autores propuseram o uso da SSFP para determinação rápida dos valores de T_1 e T_2 para amostras que apresentam um T_1 longo. A medida baseava-se na realização de dois experimentos: no primeiro obtém-se o valor da razão de T_1/T_2 e no segundo determina-se o valor de $T_1 + T_2$. Para a determinação de T_1/T_2 , vários experimentos eram realizados em que observava-se a variação da intensidade de M_{+s} em função do ângulo utilizado. Ao determinar o θ que apresentasse o máximo da intensidade para M_{+s} , $\theta_{ótimo}$, o valor de T_1/T_2 é obtido através da equação 20.

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{(1 + \cos(\theta_{ótimo}))}{(1 - \cos(\theta_{ótimo}))} \quad (20)$$

A partir de $\theta_{\text{ótimo}}$, e conseqüentemente da razão de T_1/T_2 , um novo experimento era realizado para determinar o valor de $T_1 + T_2$. Para isso, adquiria-se um sinal de RMN com a seqüência de SSFP, aplicando-se o valor de $\theta_{\text{ótimo}}$, determinado no experimento passado. Nesta condição, o decaimento deste sinal está relacionado com a somatória dos valores de $T_1 + T_2$ de acordo com a equação 21.

$$T_{\theta_{\text{ótimo}}} = \frac{(T_1 + T_2)}{2} \quad (21)$$

Recentemente, Venâncio e colaboradores^{13, 14}, desenvolveram um novo método para determinação rápida dos tempos de relaxação T_1 e T_2 através da realização de um único experimento. Para isto, estes autores utilizaram a seqüência de CWFP, a qual é composta por pulsos de 90° , de mesma fase, separados por um $T_p = 0,3$ ms. No regime de CWFP, o sinal gerado é dividido em três estágios: regime de alternância de intensidade, estado quase estacionário e estado verdadeiramente estacionário (Figura 7). Utilizando as resoluções das equações de Bloch, apresentadas nas equações 13, 14 e 15, os valores de T_1 e T_2 , foram determinados através das equações 22 e 23, respectivamente.

$$T_1 = \frac{(T^*/2)}{M_{+s}/M_0} \quad (22)$$

$$T_2 = \frac{(T^*/2)}{1 - M_{+s}/M_0} \quad (23)$$

Estes autores exploraram ainda o uso desta seqüência para monitoramento de processos dinâmicos como, por exemplo, uma reação de polimerização. Para isso, os autores monitoraram a cura de uma resina epóxi comercial, tanto pelo decaimento do sinal de CWFP, quanto pela variação dos tempos de relaxação que ocorre durante o processo de síntese. Ao

comparar os resultados obtidos com esta seqüência com os métodos convencionais utilizados para o estudo deste processo dinâmico, eles verificaram que a CWFP apresentou a vantagem de monitorar a cinética e também a variação da mobilidade, através das medidas de T_1 e T_2 realizadas em um único experimento.

Azeredo e colaboradores¹⁶ exploraram o uso da seqüência de CWFP como ferramenta analítica para medidas de RMN de baixo campo. Na Figura 16, têm-se os resultados de RMN de ^1H obtidos de óleo de girassol com a seqüência convencional e a CWFP. Para aquisição dos sinais com a seqüência convencional, foram efetuadas apenas duas aquisições, utilizando-se um $T_p = 5T_1 = 690$ ms, obtendo-se um tempo total de análise de 1,38 s. Este resultado pode ser visualizado na Figura 16A onde observa-se que o sinal apresenta uma baixa intensidade e praticamente não é possível distingui-lo do ruído. Já na 16B, tem-se o mesmo sinal de RMN de ^1H , porém obtido com a seqüência de CWFP. Com esta seqüência, foi possível acumular 657 sinais e, conseqüentemente, obter um ganho significativo na razão s/r (aproximadamente 40 vezes) para o mesmo tempo de análise gasto com a seqüência convencional (1,38 s).

Figura 16. Sinais de RMN de uma amostra de óleo de 2,2 mg de óleo vegetal obtidos com a seqüência (A) convencional e (B) CWFP¹⁶.

Neste mesmo trabalho, Azeredo e colaboradores¹⁶ demonstraram que o sinal obtido com a CWFP depende linearmente da concentração do analito em solução e, assim, esta

seqüência pode ser utilizada para análises quantitativas em RMN de baixo campo. Este resultado pode ser visualizado na Figura 17, onde se observa uma variação linear da intensidade do sinal em função da massa de óleo contida em sementes de ervilha.

Figura 17. Variação da intensidade do sinal CWFP em função da concentração do óleo vegetal em CCl_4 ¹⁶.

Colnago e colaboradores²⁶ demonstraram o potencial da CWFP para medidas ultrarápidas de sementes intactas em fluxo. Na Figura 18A têm-se os resultados obtidos de 96 fragmentos de sementes de noz macadâmia. O tempo total gasto para esta análise foi de 14 s, resultando em uma metodologia com o potencial de analisar mais de 20 mil amostras por hora. Ao correlacionar a intensidade destes sinais obtidos com sua respectiva massa de óleo, obteve-se uma reta com um coeficiente de correlação linear, r^2 , igual a 0,95 (Figura 18B).

Figura 18. (A) Intensidade do sinal de óleo obtido com a seqüência de CWFP com 96 fragmentos de noz macadâmia e (B) gráfico da massa de óleo versus intensidade do sinal CWFP das 96 amostras ²⁶.

A sequência SSFP oferece ainda uma grande vantagem em termos de razão s/r para análises de RMN de baixo campo como a possibilidade de quantificar um determinado analito dentro de um sistema multicomponente¹⁸. Na figura 19 têm-se a relação das intensidades do sinal de RMN do FID (A), eco (B) e CWFP (C) em função da umidade em sementes de milho para determinação do teor de óleo. Nestes resultados, verifica-se que o sinal do FID (19A) observado abaixo de 5% está relacionado somente com a porcentagem de óleo presente na amostra, e o sinal acima de 5% apresenta uma resposta linear com a quantidade de umidade presente na semente. No caso da sequência eco (19B) só foi possível observar a influência do sinal da água para medidas de óleo a partir de 10% de umidade. Isso praticamente inviabiliza o uso desta sequência para medidas de umidade em grãos, mas indica a potencialidade desta sequência para medidas do teor de óleo em sementes, pois até 10% de umidade não se observa a interferência deste parâmetro nas análises. As medidas realizadas com a sequência de CWFP (19C) apresentaram resultados muito similares ao obtidos através do sinal do FID, sendo sensível à umidade a partir de 5%.

Figura 19. Variação da amplitude do sinal (A) FID, (B) Eco e (C) CWFP para sementes de milho com diferentes umidades¹⁸.

Este mesmo comportamento foi observado para outras sementes como trigo, sorgo e ervilha, demonstrando que existe uma boa correlação entre o sinal CWFP e a umidade dos grãos acima de 5%.

A SSFP apresenta ainda grandes aplicações na área da RMN de imagem, onde esta sequência é utilizada para obtenção rápidas de imagens^{31,32}.

Apesar de todas estas aplicações, verificou-se que a SSFP nunca foi utilizada, rotineiramente, para obtenção de espectros em RMN de alta resolução.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste projeto de mestrado foram:

- Realizar uma análise detalhada das vantagens e desvantagens da sequência de SSFP para aquisição rápida de espectros de RMN de ^{13}C ;
- Estudar as metodologias existentes para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros de RMN-SSFP;
- Desenvolver novos métodos para suprimir estas anomalias de fase e amplitude do sinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras utilizadas

As amostras utilizadas foram: acetato de sódio (Figura 20A) enriquecido com 99% de $^{13}\text{C}_2$, acetato de etila (Figura 20B), octanol (Figura 20C) e brucina (Figura 20D).

Figura 20. Estrutura química das moléculas de: (A) acetato de sódio, (B) acetato de etila, (C) octanol e (D) brucina.

Essas amostras foram dissolvidas nos respectivos solventes deuterados: água (D_2O), clorofórmio (CDCl_3) e acetona ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$). Para as amostras dissolvidas em CDCl_3 e $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ utilizou-se como padrão interno tetrametilsilano (TMS), e na amostra dissolvida em D_2O utilizou-se o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico (DSS).

3.2. Equipamento utilizado

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos em espectrômetro Varian modelo Inova 400, com ímã de 9,4 Tesla, equivalente às frequências de 400 MHz para ^1H e 100,5 MHz para ^{13}C .

3.3. Seqüências de RMN utilizadas

3.3.1. Inversão-Recuperação (IR)

Dentre as seqüências utilizadas para a determinação do tempo T_1 , a mais utilizada é a inversão-recuperação (IR)⁴, a qual consiste em inverter a população de spins através da aplicação de um pulso de 180° , esperar um tempo para que o sistema de spins relaxe, e com a aplicação de um pulso de 90° efetuar a leitura. A representação esquemática desta seqüência seguida da sua descrição vetorial pode ser visualizada na Figura 21, mostrada abaixo.

Figura 21. Representação esquemática e vetorial da seqüência de inversão recuperação.

Na Figura 21A, tem-se o sistema em equilíbrio térmico. Com a aplicação do pulso de 180° , verifica-se que ocorre a rotação da magnetização para o plano $-z$ (21B) e, durante o intervalo de tempo entre os pulsos esta magnetização evolui segundo o processo de relaxação longitudinal (21C). Como este processo ocorre no eixo perpendicular ao eixo da bobina, aplica-se um pulso de 90° para direcionar a magnetização para o plano transversal (21D). Imediatamente, após aplicação deste pulso, surge um FID cuja amplitude é diretamente

proporcional ao valor da magnetização ao longo do eixo z. Deste modo, ao aplicar esta seqüência, variando-se o valor de T_p , pode-se obter a evolução temporal da magnetização longitudinal e, conseqüentemente, obter o valor de T_1 de acordo com a equação 24:

$$M_z(T_p) - M_0 = - 2 M_0 \exp(-T_p/T_1) \quad (24)$$

3.3.2. CPMG

O método mais utilizado para determinação do valor do tempo de relaxação T_2 foi desenvolvido por Carr, Purcell, Meiboom e Gill³³, e conseqüentemente, o nome do método leva as iniciais destes quatro pesquisadores (CPMG). Este método baseia-se em um experimento de eco de spin, mas algumas correções foram efetuadas para eliminar erros de calibração de pulsos e também para minimizar o efeito da difusão. Na Figura 22, tem-se a representação esquemática desta seqüência, a qual consiste na aplicação de um pulso de 90° no eixo x' seguido da aplicação de um trem de pulso de 180° no eixo y' . Nesta seqüência n_t representa o número de espectros promediados.

Ainda na Figura 22, pode-se visualizar a representação vetorial para esta seqüência, em que partiu-se inicialmente de um sistema em equilíbrio térmico (Figura 22A). Após a aplicação de um pulso de 90° a magnetização desloca-se para o plano $x'y'$ (22B). Durante o intervalo de tempo T_p , a magnetização se defasa $\Delta\phi\tau$ no plano $x'y'$ devido à não-homogeneidade do campo magnético e ao processo de relaxação transversal da amostra, conforme ilustrado na Figura 22C. Ao final deste intervalo de tempo T_p , aplica-se um pulso de 180° (22D). Ao longo do novo intervalo T_p , os momentos magnéticos precessionam ao redor de z, refocalizando-se em $2T_p$, sob a forma de um eco, conforme ilustrado na Figura 22E. Como a intensidade de cada eco gerado está diretamente relacionada com o valor de T_2 natural da amostra, pode-se medir seu valor a partir de um ajuste da curva exponencial obtida com a intensidade do eco para os diferentes valores de T_p .

Figura 22. Representação esquemática e vetorial da sequência de CPMG.

3.3.3. Sequência para determinação do Ângulo Ótimo

A determinação do $\theta_{\text{ótimo}}$ foi realizada através da variação da intensidade de M_{+s} em função de θ , onde o ângulo ótimo é definido como aquele em que se obtém uma intensidade máxima para M_{+s} .

Experimentalmente, para determinação do $\theta_{\text{ótimo}}$, observou-se a variação da intensidade M_{+s} em função da aplicação de θ iguais a: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90° .

O valor de $\theta_{\text{ótimo}}$ ainda foi determinado através da equação 20, mostrada na parte introdutória, em que inicialmente, determinaram-se os valores de T_1 e T_2 para o núcleo de interesse.

3.3.4. Seqüência convencional

Na Figura 23 tem-se a representação esquemática da seqüência convencional utilizada para análises quantitativas com a técnica de RMN. Nesta seqüência, aplica-se um pulso de 90° , e em seguida espera-se um tempo, T_p , equivalente a $5T_1$ para que, aproximadamente, 99,3% da magnetização retorne a condição de equilíbrio térmico. Este T_p é definido como a somatória de at (tempo e aquisição) e T_r (tempo de reciclo), como mostrado na Figura 23.

Figura 23. Representação esquemática da seqüência convencional para aquisição de espectros de RMN.

Neste trabalho, esta seqüência foi utilizada para a análise de acetato de sódio (Figura 20A) e acetato de etila (Figura 20B). Para a amostra de acetato de sódio utilizou-se um $T_p = 53$ s ($at = 3$ s e $T_r = 50$ s), enquanto que para a amostra de acetato de etila o T_p utilizado foi igual a 153 s ($at = 3$ s e $T_r = 150$ s).

3.3.5. Seqüência padrão para análise de ^{13}C

Todas as amostras, citadas no item 3.1, foram analisadas pela seqüência padrão³⁴ de RMN ^{13}C . Esta seqüência é composta por um pulso de 30° , $at = 900$ ms e um $T_r = 480$ ms, obtendo-se um $T_p = 1,38$ s, como mostra a Figura 24.

Figura 24. Representação esquemática da sequência padrão para análise de ^{13}C .

3.3.6. SSFP

O regime de SSFP é atingido através da aplicação de um trem de pulso de mesma duração, intensidade e fase, quando separado por um T_p menor que os tempos de relaxação T_1 e T_2 . Neste trabalho utilizaram-se duas seqüências de SSFP, as quais foram denominadas de SSFP-A e SSFP-B. Estas seqüências podem ser visualizadas nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

3.3.6.1. SSFP-A

A seqüência SSFP-A é composta por um trem de n pulsos, $p1$, separados por um tempo, $d_2 < T_1, T_2$. Após a magnetização entrar no regime de SSFP, aplica-se um outro pulso ($p2$) e efetua-se a aquisição. Para realizar a promediação dos espectros, deve-se esperar um tempo, T_r , da ordem de $5T_1$ para que a magnetização retorne a condição de equilíbrio térmico.

Figura 25. Representação esquemática da seqüência SSFP-A.

Experimentalmente, aplicou-se esta seqüência para análise da amostra de acetato de sódio (Figura 20A), utilizando-se um $T_r = 50$ s, $d_2 = 1$ s, $at = 3$ s, $p_1 = p_2 = 53^\circ$ e um $n = 64$.

3.3.6.2. SSFP-B

Na seqüência de SSFP-B, o regime de SSFP é atingido através da aplicação de pulsos de 60° , $at = 299,7$ ms e $T_r = 300$ μ s, obtendo-se um $T_p = 300$ ms, como mostra a sua representação esquemática na Figura 26. Esta seqüência foi utilizada para efetuar a análise de todas as amostras apresentadas no item 3.1.

Figura 26. Representação esquemática da seqüência SSFP-B.

3.3.7. Seqüências para supressão das anomalias de fase e amplitude do sinal

3.3.7.1. Scrambled Steady State (SSS)

A seqüência SSS apresenta perfil similar da seqüência SSFP mostrada na Figura 26. No entanto, para a eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal, os valores de T_p foram variados, de forma aleatória, após a aplicação de 64 pulsos. A representação esquemática desta seqüência pode ser visualizada na Figura 27, onde se verifica que as alterações de T_p foram realizadas através das variações de T_r , como indicado pelas setas vermelhas.

Figura 27. Representação esquemática da sequência “SSS”.

Estas variações de T_r foram efetuadas em um intervalo de zero à π radianos que equivale aos extremos da precessão dos spins. Na Figura 28 tem-se a representação vetorial deste movimento que ocorre após a aplicação de um pulso.

Figura 28. Modelo vetorial para o comportamento da magnetização durante o processo de relaxação.

O período, P , que é definido como o tempo necessário para que a magnetização efetue esta volta completa, é inversamente proporcional a frequência (F) utilizada, como mostra a equação 25.

$$P = \frac{1}{F} \quad (25)$$

Desta forma, para um valor de *offset* = 100 Hz o tempo necessário para que a magnetização efetue este movimento é igual a 0,01 s, enquanto que para um *offset* = 500 Hz

este tempo decai para 0,002 s. Como estes valores equivalem ao movimento de 2π , os valores utilizados para as variações de T_r , de 0 a π , foram: 0,005 s e 0,001 s, respectivamente.

Para análise desta sequência, estudou-se tanto a influência do *offset* como da quantidade de variações para T_r para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal. Os valores de *offset* estudados foram: 100, 500, 1000 e 2000 Hz, e a quantidade de números utilizados para as variações de T_r foram variadas de 20 até 100. Estes testes foram realizados com as amostras de acetato de sódio, acetato de etila, brucina e octanol, com aplicação de pulsos de 60° e um $\Delta t = 299,7$ e $499,7$ ms.

3.3.7.2. Unscrambled Steady State (USS)

Baseada na metodologia desenvolvida por Freeman e Hill, neste trabalho desenvolveu-se uma nova sequência a qual foi denominada de Unscrambled Steady State (USS). A única diferença entre esta sequência e a SSS, é que na USS as variações de T_p são realizadas em passos constantes, e não aleatórios como no método de Freeman e Hill, o que permite uma distribuição mais uniforme dos valores de T_p em uma faixa de tempo estabelecida.

3.3.7.3. SSFP com ciclagem de fase dos pulsos

A alteração de fase dos pulsos para a sequência de SSFP foi realizada de acordo com a proposta sugerida por Rudakov e colaboradores²²⁻²⁵. Na Figura 29, tem-se a representação esquemática da sequência utilizada, na qual a fase do pulso é variada em 180° após aplicação de dois pulsos de 60° .

Figura 29. Modificação na fase dos pulsos na sequência de SSFP para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal.

Todas as amostras citadas no item 3.1 foram analisadas com esta sequência, em que aplicaram-se pulsos de 60° , $T_r = 300 \mu s$ e $t = 299,7 ms$ ($T_p = 300 ms$).

3.3.7.4. SSFP com alteração no desacoplamento de 1H

Uma outra forma de eliminar as anomalias de fase e amplitude do sinal, também sugerida por Freeman e Hill, baseava-se em uma alteração simples no modo de realizar o desacoplamento dos sinais de 1H quando adquirindo espectros de RMN de ^{13}C . Esta alteração pode ser visualizada na Figura 30, e consiste em permitir que a magnetização evolua durante o processo de relaxação sem o efeito Overhauser (Nuclear Overhauser Effect – NOE) (Figura 30B). Como resultado desta alteração, tem-se a introdução de uma incoerência entre os spins que ocasiona a eliminação da componente M' no sinal de RMN no domínio do tempo.

Figura 30. Modificação na configuração do desacoplamento para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal (A) SSFP com efeito NOE e (B) SSFP sem efeito NOE.

Para aquisição dos espectros com esta seqüência, os valores de t_r , T_r e θ foram, respectivamente: 299,7ms, 300 μ s e 60° .

3.3.7.5. QFT

O estudo da seqüência QFT foi realizado através da aplicação da seqüência SSFP-B, ilustrada na Figura 26. Os espectros de RMN-SSFP foram adquiridos com aplicação de pulsos de 90° , $t_r = 399,7$ ms e $T_r = 300$ μ s, obtendo-se um $T_p = 400$ ms. No total foram obtidos quatro espectros, variando-se os valores de *offset* de acordo com a equação 16, mostrada na parte introdutória.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais relativos ao estudo das vantagens e desvantagens apresentadas pela sequência de SSFP para aquisição rápida de espectros de RMN de ^{13}C . Serão mostrados ainda os resultados obtidos com as sequências propostas por Freeman e Hill, Rudakov e Schwenk para eliminação das anomalias de fase e amplitude dos sinais presente nos espectros obtidos com esta sequência e, os resultados obtidos com uma metodologia desenvolvida para eliminação destas anomalias.

4.1. Precessão Livre no Estado Estacionário (SSFP)

Como mencionado anteriormente, uma das maiores limitações apresentada pela técnica de RMN está diretamente relacionada com a sua baixa sensibilidade. Assim, há uma busca constante de novas metodologias com o objetivo de promover um aumento na razão s/r nos espectros de RMN. Entre os métodos existentes, o mais utilizado é realizado através da promedição ou somatórios dos espectros, onde o ganho na razão s/r é dado pela raiz quadrada do número dos espectros acumulados, $s/r = n_t^{1/2}$. No entanto, para obter o máximo da intensidade do sinal é necessário esperar um T_p da ordem de $5T_1$, do núcleo com maior T_1 presente na molécula, para que 99,3% da magnetização retorne a condição de equilíbrio térmico. Nesta condição a RMN pode ser utilizada em análises quantitativas. Esta sequência pulsada, em que se aplica um $T_p = 5T_1$, será denominada neste trabalho de sequência convencional. No caso do núcleo de ^{13}C , que além de apresentar uma baixa abundância natural e γ , apresenta um T_1 da ordem de até dezenas de segundos, essa sequência não é largamente usada na prática, em decorrência do tempo gasto para realização da análise.

Ernest e Anderson, com o objetivo de obter um aumento na razão s/r propuseram o uso de um pulso de excitação com ângulo abaixo de 90^0 . Nesta condição, $\theta < 90^0$, apesar de termos uma redução na intensidade do sinal gerado por pulso, tem-se uma recuperação mais rápida da magnetização ao longo do eixo z possibilitando efetuar a promediação de mais espectros em um intervalo de tempo. Nesta condição, o ângulo de excitação é determinado através dos valores de T_p e T_1 , como mostra a equação 26.

$$\cos \theta = e^{-T_p/T_1} \quad (26)$$

A seqüência rotineiramente aplicada para a aquisição de espectro de RMN de ^{13}C baseia-se nesta teoria através da utilização de pulsos de 30^0 e T_p de 1,4s. Neste trabalho, esta seqüência será denominada de seqüência padrão³⁴.

Para melhorar ainda mais a razão s/r por tempo de análise, Ernest e Anderson propuseram a utilização de um $T_p < T_2, T_1$. A aplicação de um $T_p < T_2, T_1$ faz com que a magnetização entre no regime SSFP, no qual é possível promediar dezenas de espectros por unidades de T_1 e, conseqüentemente, obtém-se um aumento significativo na razão s/r, para um mesmo tempo de medida. Assim, a seqüência de SSFP apresenta uma maior eficiência quando utilizada para determinação de isótopos que possuem um T_1 longo, da ordem de dezenas de segundos, como no caso dos espectros de ^{13}C .

Na condição de SSFP o $\theta_{ótimo}$, não depende apenas de T_p e T_1 , como para seqüência padrão, mas também do valor de T_2 (equação 20). Desta forma, inicialmente, realizou-se a determinação do $\theta_{ótimo}$ para as amostras de acetato de sódio e acetato de etila e, em seguida, comparou-se o valor da razão s/r obtido com a seqüência SSFP, convencional e padrão.

4.1.1. Dependência de T_1 e T_2 para aquisição dos sinais no regime de SSFP

Kronenbitter e Schwenk¹⁵, no ano de 1976, verificaram quais os fatores que poderiam influenciar para aquisição de um sinal, com intensidade máxima, no regime de SSFP. Neste estudo, eles constataram que, no regime de SSFP, o $\theta_{\text{ótimo}}$ está diretamente relacionado com os valores de T_1 e T_2 , apresentados pelo núcleo de interesse, como mostrado na equação 20. Por esta equação, verifica-se que a aplicação de um $\theta = 90^\circ$ resultará em uma intensidade máxima somente quando a razão T_1/T_2 for igual a 1.

Desta forma, inicialmente, determinou-se os valores de T_1 e T_2 para o núcleo $^{13}\text{C}_2$, enriquecido, presente na amostra de acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) através das seqüências de IR e CPMG, respectivamente. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 31.

Na Figura 31A, tem-se a curva de recuperação da magnetização longitudinal em função do tempo, obtida com a seqüência IR, e na Figura 31B tem-se o decaimento da intensidade do sinal no plano $x'y'$ também em função do tempo, obtido com a seqüência CPMG. Com estas curvas, calculou-se que este carbono apresenta um $T_1 = 12$ s e um $T_2 = 3$ s.

Figura 31. Gráficos da variação da intensidade do sinal de RMN em função do tempo para a seqüência de IR (A) e CPMG (B), que foram utilizadas para a determinação dos valores de T_1 e T_2 , respectivamente.

Com os valores de T_1 e T_2 calculados acima, e através da equação 20, obteve-se um valor de $\theta_{\text{ótimo}}$ igual a 53° .

Para confirmar este resultado, foram adquiridos vários espectros de RMN-SSFP com diferentes valores de θ . A curva obtida (Figura 32) confirma que o máximo da intensidade do sinal de SSFP para o núcleo $^{13}\text{C}_2$ é atingido quando se aplica um ângulo com valor próximo a 50° , sendo este valor de $\theta_{\text{ótimo}}$ similar ao obtido com equação 20.

Figura 32. Variação da intensidade do sinal em função de θ para obtenção do ângulo ótimo para o núcleo $^{13}\text{C}_2$ da amostra de acetato de sódio.

O mesmo estudo foi realizado com a amostra de acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), em que, primeiramente, determinaram-se os valores de T_1 e T_2 para os diferentes núcleos de ^{13}C presente nesta amostra. Os valores obtidos, através das seqüências de IR e CPMG, podem ser visualizados na Tabela 3, seguido dos valores da razão de T_1/T_2 e dos respectivos $\theta_{\text{ótimo}}$. A notação utilizada para facilitar a atribuição dos valores de T_1 e T_2 dos ^{13}C pode ser visualizada na Figura 33.

Tabela 3. Valores de T_1 , T_2 e $\theta_{\text{ótimo}}$ para os diferentes núcleos de ^{13}C presentes na molécula de acetato de etila.

Núcleos ^{13}C	T_1 (s)	T_2 (s)	T_1/T_2	$\theta_{\text{ótimo}}$
C_1	30	6	5	49,5
C_2	13	5	2,6	62,3
C_3	12	4	3	50,2
C_4	8	3	2,6	64,7

Figura 33. Representação esquemática da molécula de acetato de etila.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, verifica-se que cada carbono desta amostra apresenta um valor distinto de $\theta_{\text{ótimo}}$, devido aos diferentes valores da razão T_1/T_2 . Mas, observa-se que estes valores encontram-se na faixa de 50° a 60° . Em amostras reais, que apresentam um maior número de carbonos e diferenças relativas na razão T_1/T_2 , não existe um ângulo que possibilite adquirir todos os sinais com intensidade máxima.

4.1.2. Comparação entre as seqüências SSFP e convencional

Determinados os valores de $\theta_{\text{ótimo}}$, T_1 e T_2 para as amostras de acetato de sódio e acetato de etila, iniciaram-se os estudos com a seqüência de SSFP. Primeiramente, compararam-se os resultados obtidos com esta seqüência e com a seqüência convencional.

Na Figura 34, têm-se os sinais de RMN no domínio do tempo, da amostra de acetato de sódio, obtido com a seqüência convencional ($T_p \geq 5T_1$) (Figura 34A) e com a seqüência SSFP-A (Figura 34B). Para a seqüência convencional, utilizou-se um $\theta = 90^\circ$, $T_r = 50$ s e um $\text{at} = 3$ s, e, para a seqüência SSFP-A, aplicou-se 64 pulsos de 53° , separados por um $d_2 = 1$ s. Nesta condição, o valor de d_2 é inferior aos tempos de relaxação T_1 e T_2 e, desta forma, após a aplicação do último pulso, o sinal de RMN deve apresentar um sinal típico da condição SSFP. Para observar a formação do eco como um todo e não apenas a parte crescente, fez-se a aquisição deste sinal durante 3 s. Antes de realizar a promediação destes sinais, esperou-se um T_r igual a 50 s para que a magnetização retornasse a condição de equilíbrio térmico.

Figura 34. Sinais de RMN no domínio do tempo de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com as seqüências: (A) convencional e (B) SSFP.

Na Figura 34A, observa-se que o sinal adquirido com a seqüência convencional é composto somente por um FID, denominado de M^+ , enquanto que o sinal obtido na condição de SSFP (Figura 34B) é composto por um FID, seguido da formação de um eco, M^- , em torno de 1 s. Nesta Figura, também se observa a formação de um eco, com menor intensidade, em torno de 2s. A origem destes ecos é decorrente da presença da magnetização transversal no plano $x'y'$, antes da aplicação do último pulso da seqüência, devido à utilização de um $T_p < T_2, T_1$. Este efeito não é observado com a seqüência convencional, pois ao aplicar um $T_p \sim 5T_1$ 99,3% da magnetização encontra-se na condição de equilíbrio térmico antes da aplicação do próximo pulso. Ainda comparando estes resultados, verifica-se que a componente M^+ apresenta uma constante de decaimento menor no sinal adquirido com a seqüência de SSFP do que o sinal adquirido com a seqüência convencional. Este efeito é decorrente da interferência destrutiva entre a componente M^- e M^+ , no sinal apresentado. No entanto, esta constante de tempo pode ser maior, que a do sinal obtido com a seqüência convencional, ao aplicar um valor de *offset* que resulte em uma interferência construtiva entre as componentes M^+ e M^- .

Como discutido na seção introdutória, o aumento da razão s/r esta diretamente relacionada com o decréscimo do valor de T_p . Assim, com o objetivo de obter um aumento na razão s/r , reduziu-se o valor de T_p para 0,3 s, como pode ser visualizado na Figura 35. Para aquisição deste sinal aplicou-se a seqüência SSFP-B, a qual consiste em um trem de pulsos de 53° , separados por um $T_p = 300$ ms.

Figura 35. Sinal de RMN de ^{13}C de acetato de sódio obtido com a seqüência de SSFP com um $T_p = 0,3$ s.

O decréscimo de T_p resulta na aquisição de espectros com uma baixa resolução espectral em decorrência da digitalização do sinal ocorrer com um número reduzido de pontos. Esta diminuição no valor de T_p também pode fazer com que a magnetização entre em um regime particular do SSFP, o CWFP. Como mostrado na seção introdutória, no regime de CWFP, tem-se uma maior sobreposição de M^+ e M^- e, dependendo da forma com que estas componentes interagem entre si pode haver uma supressão do sinal. No entanto, verificou-se que com a redução de T_p para 300 ms, o sinal não apresentou problemas referentes à resolução espectral, e também confirmou-se que a magnetização encontrava-se no regime de SSFP (sinal formado pelas componentes M^+ e M^-).

O efeito da presença da componente M^- nos sinais de RMN é o responsável pelo aparecimento de batimentos laterais, anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros de RMN. Na Figura 36, pode-se comparar os espectros de RMN de ^{13}C da amostra de acetato de

sódio obtidos com a sequência convencional e com a SSFP. Por estes resultados, observa-se que o espectro adquirido com a sequência convencional (Figura 36A) não apresenta nenhuma distorção em sua linha de base, em decorrência do sinal no domínio do tempo ter um decaimento com tendência a zero, como mostrado na Figura 34A. Já na Figura 36B, verifica-se que o espectro apresenta batimentos no sinal. Estes batimentos são decorrentes da presença da componente M^- no sinal do domínio do tempo (Figura 35) que resulta na aquisição de um sinal de RMN truncado. As anomalias de fase e amplitude não podem ser visualizadas neste espectro devido à amostra apresentar apenas um único pico.

Figura 36. Espectros de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com a sequência (A) convencional e (B) SSFP.

Contudo, apesar da presença destes batimentos laterais, ao comparar o tempo de análise necessário para obtenção de uma razão $s/r \cong 3000$ com estas duas sequências, verificou-se que com a sequência de SSFP o tempo necessário foi de 5 min enquanto que para a sequência convencional foi de 124 min. Isso significa um ganho de 24,8 vezes no tempo de análise com a SSFP sobre a sequência convencional.

Este mesmo estudo foi realizado com a amostra de acetato de etila. Como mostrado na Tabela 3, para esta amostra, não existe um $\theta_{\text{ótimo}}$ que possibilite a aquisição de todos os sinais com a intensidade máxima. Assim, para a sequência de SSFP aplicaram-se pulsos de

60° separados por um $T_p = 300$ ms, enquanto que para a sequência convencional os pulsos foram de 90° separados por um $T_p = 5T_1 = 153$ s.

O espectro obtido com a amostra de acetato de etila com a sequência convencional, sem o efeito Overhauser nuclear (NOE), (resultados não mostrados), apresentou todos os sinais de ^{13}C com mesma área. No entanto, como citado anteriormente, os espectros de RMN de ^{13}C são normalmente adquiridos com o efeito NOE que proporciona um aumento na área do sinal (intensidade) de até duas vezes. Na Figura 37A pode-se visualizar o espectro de RMN ^{13}C da amostra de acetato de etila obtido com a sequência convencional, e na Figura 37B tem-se o mesmo espectro, porém obtido com a sequência SSFP. Estes espectros foram adquiridos com a aplicação do efeito NOE. A necessidade de se utilizar o desacoplador ligado durante a aplicação da sequência SSFP será discutido com detalhes adiante no item 4.2.4.

Figura 37. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtidos com a sequência (A) convencional e (B) SSFP.

Nestes resultados, observa-se que tanto o espectro obtido com a sequência convencional quanto com a sequência de SSFP apresentam anomalias de intensidade (sinais relativos a mesmo número de carbono com diferentes áreas) decorrente da utilização do efeito NOE. As anomalias de fases e a presença de batimentos laterais só foram observadas no espectro obtido com a sequência de SSFP. Para melhor visualização destas anomalias e dos

batimentos laterais, expandiram-se algumas regiões do espectro mostrado na Figura 37B. O resultado obtido pode ser visualizado na Figura 38.

Figura 38. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência de SSFP.

A partir destes resultados, verificou-se que para aquisição de um espectro com uma razão $s/r \cong 370$ com a sequência SSFP o tempo necessário é de 5 minutos, enquanto que com a sequência convencional este tempo é de 180 minutos. Isto resulta em um ganho de 36 vezes no tempo de análise para esta amostra, com a sequência de SSFP.

Com base nestes resultados, conclui-se que os espectros obtidos com a sequência de SSFP apresentam um ganho significativo, no tempo de análise, quando comparada com a sequência convencional. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Tempo gasto nas análises das amostras de acetato de sódio e etila com as sequências de SSFP e convencional.

Amostra	Tempo de Análise		Ganho no tempo de análise
	SSFP	Padrão	
Acetato de Sódio	5 min	124 min	24,8
Acetato de Etila	5 min	180 min	36

No entanto, como descrito anteriormente, os espectros de RMN de ^{13}C são freqüentemente obtidos através da sequência padrão, pois com esta sequência é possível

promediar um maior número de espectros por minuto, resultando em um aumento na razão s/r, para um mesmo tempo de análise, quando comparado com a sequência convencional. Assim, a seguir será apresentado um estudo comparativo entre a sequência padrão e SSFP.

4.1.3. Comparação entre as sequências SSFP e padrão

Devido aos altos valores de T_1 normalmente apresentados pelos núcleos de ^{13}C , os seus espectros são freqüentemente adquiridos através da aplicação de uma sequência denominada de padrão³⁴, que é composta por um $\theta = 30^\circ$, $t_a = 900$ ms e um $T_r = 480$ ms, como mostrado na Figura 24.

De acordo com os valores mostrados, anteriormente, dos valores de T_1 e T_2 dos ^{13}C presentes nas amostras de acetato de sódio e acetato de etila, observa-se que o T_p utilizado nesta sequência ($T_p = t_a + T_r = 1,38$ s) é menor que o valor de T_2 destes núcleos. Ao obter um espectro com um $T_p = 1,38$ s e pulsos de $\theta = 30^\circ$ (todos de mesma fase), a magnetização atingirá o regime SSFP ($T_p < T_1, T_2$). O sinal de ^{13}C da amostra de acetato de sódio, obtido nesta condição, pode ser visualizado na Figura 39A. Neste resultado, observa-se o início da formação do eco ao final do tempo de aquisição do sinal de RMN. Para uma visualização do eco como um todo, aplicou-se um t_a da ordem de T_p , ou seja, $t_a = 1,38$ s. Este resultado pode ser visualizado na Figura 39B. Para que o computador possa transferir os dados da aquisição entre os pulsos, é necessário um tempo, T_r , da ordem de micro segundos entre o final da aquisição e o próximo pulso. Nestes experimentos o valor de T_r foi de 0,3ms.

Figura 39. Sinais de RMN no domínio do tempo de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com a sequência de SSFP com aplicação de um at igual a (A) 0,9 e (B) 1,3797 s.

Ao adquirir o mesmo sinal de RMN ^{13}C mostrado na Figura 39A com a sequência padrão (Figura 40A), verifica-se que este não apresenta o sinal do eco. Este efeito pode ser justificado pelos seguintes motivos:

1. Na sequência padrão ao efetuar a ciclagem de fase dos pulsos (x, y, -x, -y) para a eliminação dos sinais de *offset* e de artefatos tem-se, conseqüentemente, uma minimização da formação do eco. O efeito da ciclagem de fase para eliminação da componente eco dos sinais de RMN obtidos com a sequência de SSFP será discutido no item 4.3;
2. Como demonstrado na Figura 39A, ao realizar a aquisição do sinal até 0,9s não é possível observar o sinal do eco, porém ao efetuar a aquisição até 1,3797 s este sinal é bem visível como mostra a Figura 39B;
3. A baixa razão s/r nos espectros de ^{13}C normalmente impede a observação da componente eco;
4. A aplicação de uma função de apodização (exponencial, Gaussiana, etc), normalmente utilizada para melhoria da razão s/r, leva o sinal no final do FID a zero e conseqüentemente elimina o sinal do eco.

Figura 40. Sinais de RMN no domínio do tempo de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com a sequência padrão com aplicação de um t_r igual a (A) 0,9 e (B) 1,3797 s.

Após verificar que a sequência padrão utiliza a vantagem da sequência de SSFP com aplicação de um $T_p < T_1$, T_2 , comparou-se o perfil dos espectros obtidos com estas duas sequências. Como proposto no item 4.1.2, os espectros de RMN-SSFP foram adquiridos através da aplicação de um trem de pulso de 60° , $T_r = 300 \mu\text{s}$ e um $t_r = 299,7 \text{ ms}$, enquanto que para a sequência padrão, o valor de θ foi de 30° e o T_p de 1,380 s. Os resultados obtidos, com estas duas sequências, com a amostra de acetato de etila, podem ser visualizados na Figura 41.

Figura 41. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de etila obtidos com a sequência (A) padrão e (B) SSFP.

Nestes resultados, verifica-se que apesar da sequência padrão utilizar um $T_p < T_2$, T_1 o espectro não apresenta anomalia de fase devido à supressão da componente eco do sinal de RMN (Figura 41A). Estas anomalias são evidentes no espectro adquirido com a sequência de SSFP-B, como mostra a Figura 41B.

Ainda comparando estes resultados, observa-se uma diferença nas intensidades relativas entre os sinais nos espectros obtidos com estas duas sequências. Isso ocorre porque no regime de SSFP a intensidade do sinal depende da razão T_1/T_2 (equação 15), enquanto que para a sequência padrão, a intensidade do sinal depende do tempo relaxação T_1 , do intervalo de tempo T_p e do ângulo θ . Assim, para sequência padrão, o sinal que deve apresentar uma maior intensidade é aquele com um menor valor de T_1 e o sinal com menor intensidade é aquele que apresenta um T_1 mais longo. Este comportamento pode ser confirmado na Figura 41A, onde o sinal mais intenso corresponde ao carbono que apresenta um $T_1 = 8$ s e o sinal com menor intensidade corresponde ao carbono que apresenta um $T_1 = 30$ s.

Este mesmo raciocínio não pode ser aplicado para a sequência de SSFP, pois para esta sequência a intensidade do sinal esta diretamente relacionada com a razão de T_1/T_2 , e quanto menor o valor desta razão maior a intensidade do sinal. De acordo com os valores de T_1 e T_2 apresentados na Tabela 3, conclui-se que os carbonos C2 e C4 deveriam apresentar intensidades máximas e similares, enquanto que o carbono C1 deveria apresentar uma intensidade mínima. Este resultado não é confirmado no espectro apresentado na Figura 41B, em que se observa que o sinal que apresenta uma intensidade máxima é o carbono C3 e, além disso, as intensidades apresentadas pelos carbonos C2 e C4 não são equivalentes. Um dos fatores que contribui para este efeito é o valor de *offset* utilizado durante a aquisição dos espectros. Como discutido na parte introdutória, dependendo do valor de *offset* utilizado, pode ocorrer uma interferência construtiva ou destrutiva das componentes M^+ e M^- . A interferência construtiva leva ao máximo do sinal, enquanto a interferência destrutiva resulta em um sinal

nulo. A influência deste parâmetro nas intensidades dos sinais obtidos com a SSFP pode ser visualizada nas Figuras 42, onde se têm os espectros de RMN de ^{13}C obtidos com a amostra de acetato de etila com aplicação de um *offset* de 100 (Figura 42A) e 1000 Hz (Figura 42B). Os valores de *offset* foram determinados em relação ao sinal do TMS.

Figura 42. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de etila obtidos com a sequência de SSFP com aplicação de um *offset* de (A) 100 e (B) 1000 Hz.

Com base nestes resultados, confirma-se que o valor do *offset* influencia de forma direta nas intensidades dos sinais dos espectros obtidos com a sequência de SSFP. Outro fator que auxilia neste processo de distorções nas intensidades dos sinais é o efeito NOE. O efeito NOE está presente tanto nos espectros de RMN de ^{13}C obtidos com a sequência padrão quanto nos espectros obtidos com a sequência de SSFP.

Em seguida comparou-se o perfil dos espectros de RMN adquirido com as sequências padrão e com a SSFP para as amostras de octanol e brucina. Os resultados podem ser visualizados na Figura 43 e 44, respectivamente. Nestes resultados, confirma-se a presença de batimento laterais, anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros obtidos com a sequência de SSFP.

Figura 43. Espectros de RMN ^{13}C de octanol obtidos com a sequência (A) padrão e (B) SSFP.

Figura 44. Espectros de RMN ^{13}C de brucina obtidos com a sequência (A) padrão e (B) SSFP.

Ao comparar o tempo necessário para obtenção de um espectro com uma razão s/r similar com estas duas sequências, verificou-se que para todas as amostras, o tempo de análise foi menor ao aplicar a sequência de SSFP. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5. Tempo gasto nas análises das amostras de acetato de etila, octanol e brucina com as sequências de SSFP e padrão.

Amostra	Tempo de Análise		Ganho no tempo de análise
	SSFP	Padrão	
Acetato de Etila	16 min	96 min	6
Octanol	13 min	96 min	7
Brucina	26 min	96 min	3,7

Como os espectros obtidos no regime de SSFP apresentam batimentos laterais, anomalia de fase e amplitude do sinal (Figuras 41B, 43B e 44B), esta seqüência não é utilizada em análises de rotina. Assim, verificou-se o potencial das seqüências propostas para a eliminação destas anomalias nos espectros de RMN ^{13}C . Iniciou-se este estudo com a metodologia desenvolvida por Freeman e Hill.

4.2. Estudo das seqüências para eliminação das anomalias nos espectros de RMN-SSFP

4.2.1. Avaliação da proposta de Freeman e Hill

Freeman e Hill, como discutido na parte introdutória, propuseram algumas metodologias para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal presentes nos espectros de RMN-SSFP. As metodologias desenvolvidas por estes autores baseavam-se na aquisição de vários sinais de RMN com diferentes valores de T_p . A seguir, serão analisadas quais as condições experimentais ideais que devem ser utilizadas nestas seqüências e suas vantagens e desvantagens para supressão das anomalias de fase e amplitude do sinal.

4.2.1.1. Dependência do *Offset*

Uma das principais exigências para obtenção de um resultado satisfatório com as seqüências propostas por Freeman e Hill é que a frequência aplicada para a excitação da amostra (ν_r) seja maior ou menor que a frequência de ressonância (ν_0) dos sinais a serem analisados, ou seja, a frequência de *offset* deve ser diferente de zero. Este efeito pode ser visualizado na Figura 45 através dos sinais de RMN ^{13}C obtidos com a seqüência de SSFP da amostra de acetato de sódio. Para aquisição destes sinais utilizou-se um *offset* igual a 0, com uma variação de T_p de 10 ms. Na Figura 45A, curva superior, tem-se o sinal obtido com aplicação de um $T_p = 300$ ms e na Figura 45A, curva inferior, o valor de T_p utilizado foi de

310 ms. Ao efetuar a somatória destes sinais (Figura 45B), verifica-se que o sinal obtido é praticamente idêntico aos mostrados na Figura 45A, e assim, conclui-se que o eco não foi suprimido.

Figura 45. Sinais de RMN ^{13}C da amostra de acetato de sódio obtidos com a sequência de SSS (A) com T_p igual a 300 ms (curva superior) e 310 ms (curva inferior) e (B) somatório dos sinais mostrados na Figura 42A.

Outros testes foram realizados (resultados não apresentados) com aplicação de diferentes variações para T_p , e os resultados obtidos foram similares ao mostrado na Figura 45. Desta forma, conclui-se que quando o sinal encontra-se em ressonância não é possível efetuar a eliminação do sinal do eco, independente do valor aplicado para variação de T_p . Este efeito pode ser justificado através do modelo vetorial apresentado na Figura 5, no qual se observa que o FID e o eco encontram-se defasados por um ângulo de 180° e como, neste caso, não há alternância de fase não há como suprimir a componente eco.

Em seguida, realizou-se o mesmo teste aplicando-se um *offset* igual a 100 Hz, onde primeiramente adquiriu-se um sinal de RMN ^{13}C utilizando-se um $T_p = 300 \text{ ms}$ (Figura 46A - curva superior) e logo após com um $T_p = 305 \text{ ms}$ (Figura 46A - curva inferior). Ao sobrepor estes sinais (Figura 46B), observa-se que as componentes M^+ estão em coerência de fase, resultando em uma interação construtiva, enquanto que as componentes M^- estão defasadas por um ângulo de 180° , levando a uma interação destrutiva. Em decorrência desta interferência destrutiva, ao efetuar o somatório destes sinais tem-se a supressão da

componente M^- como mostrado na Figura 46C. Na Figura 46D pode-se observar o espectro obtido a partir do FID apresentado na Figura 46C. Ao comparar este espectro com o obtido com a sequência de SSFP (Figura 36B), verifica-se que a metodologia desenvolvida por Freeman e Hill possibilita uma redução significativa dos batimentos laterais, decorrentes da eliminação da componente eco no sinal no domínio do tempo.

Figura 46. Sinais de RMN ^{13}C da amostra de acetato de sódio obtidos com a sequência de SSS (A) com T_p igual a 300 ms (curva superior) e 305 ms (curva inferior), (B) sobreposição dos sinais mostrados na Figura 46A, (C) somatória dos sinais apresentados na Figura 46A e (C) TF do sinal mostrado na Figura 46C.

A supressão do eco, mostrado na Figura 46C é resultado da aplicação de diferentes valores de T_p durante a aquisição dos sinais de RMN no domínio do tempo. Esta variação de T_p é responsável pelo deslocamento do sinal máximo do eco na escala do tempo e, como estes sinais são adquiridos sempre com o mesmo valor de t_r (300ms), tem-se uma alteração na fase

no final do sinal do eco. Esta alternância na fase no final do sinal do eco está diretamente relacionada com o valor aplicado para T_p e *offset*.

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 46, realizou-se o mesmo teste aplicando-se diferentes valores de *offset* mínimo, ou seja, valor de *offset* em relação à linha mais próxima. Os valores de *offset* estudados foram 100, 500, 1000 e 2000 Hz. Estes testes foram realizados tanto com uma amostra simples, como o acetato de sódio, como também com uma amostra mais complexa, como a brucina.

Iniciou-se este estudo com a amostra de acetato de sódio. Para aquisição destes sinais aplicou-se um $\theta = 53^\circ$ e um $t_r = 500$ ms. As variações de T_r foram realizadas de acordo com o valor aplicado para o *offset*, sendo estes iguais a 100, 500, 1000 e 2000 Hz, o que equivale em uma variação de T_p de 0,005, 0,001, 0,0005 e 0,00025 s, respectivamente. Para esta amostra, o valor de *offset* mínimo foi determinado em relação ao sinal do $^{13}\text{C}_2$. O número de incrementos de T_p , ΔT_p , foi igual a 40 que permite uma boa variação de T_p , sem comprometer o tempo total de análise (a escolha desse número será melhor discutida no item 4.2.1.2). Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 47, nos quais observa-se uma melhor supressão do sinal do eco ao aplicar um *offset* igual a 1000 Hz (Figura 44C).

Figura 47. Sinais de RMN ^{13}C da amostra de acetato de etila obtido com a sequência SSS com aplicação de valores de *offset* iguais (A) 100, (B) 500, (C) 1000 e (D) 2000 Hz.

Com o objetivo de verificar a influência deste parâmetro para a supressão do sinal do eco em uma amostra mais complexa, realizou-se este mesmo teste com uma amostra que apresentasse um maior número de linhas como a brucina. Esta molécula contém 23 sinais de RMN de ^{13}C . Para aquisição destes sinais utilizou-se um $\Delta T_p = 40$, um $\theta = 60^\circ$ e um $t_a = 300$ ms. As variações de T_p e os valores de *offset* foram iguais aos aplicados para a amostra de acetato de sódio. O valor de *offset* mínimo foi determinado em relação ao sinal do TMS. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 48, observando-se que o valor de *offset* não interfere de maneira significativa no processo de eliminação do sinal do eco em amostras com múltiplos sinais.

Figura 48. Sinais de RMN ^{13}C da amostra brucina obtido com a sequência SSS com aplicação de valores de *offset* iguais (A) 100, (B) 500, (C) 1000 e (D) 2000 Hz.

Na equação 27, têm-se os fatores que influenciam no valor da razão s/r obtida em um espectro de RMN.

$$\frac{S}{R} = N \gamma I(I + 1) \left(\frac{B_0}{T} \right)^{3/2} \left(\frac{QV_c}{\Delta v} \right)^{1/2} \frac{\xi}{f} \quad (27)$$

onde N é a concentração de núcleos por unidade de volume, T é a temperatura, Q é o fator de qualidade da bobina de recepção, V_c o volume de amostra, Δv o tamanho da janela espectral, ξ o fator de preenchimento da bobina de detecção e f a figura de ruído do pré-amplificador.

Por esta equação, verifica-se que o aumento de Δv contribui para o decréscimo da razão s/r e, sabendo-se que quanto maior o valor de *offset* maior será o Δv , determinou-se como condição ideal para aplicação do método desenvolvido por Freeman e Hill um *offset* de 500 Hz.

4.2.1.2. Dependência do número de variações para T_p

Outro parâmetro que também pode influenciar na supressão das anomalias de fase nos espectros obtidos com a sequência de Freeman e Hill é a quantidade de números

aleatórios, ΔT_p , aplicado para a realização das variações de T_p . Desta forma, submeteu-se, primeiramente, a amostra de acetato de sódio a uma série de seqüências em que se alterou o valor de ΔT_p . Para aquisição destes sinais utilizou-se um $\theta = 53^\circ$, $t_r = 500$ ms e um $offset = 500$ Hz. Os valores estudados para ΔT_p foram: 20, 40, 80 e 120, e os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 49 (A), (B), (C) e (D), respectivamente.

Figura 49. Sinais de RMN ^{13}C da amostra acetato de sódio obtido com a seqüência *SSS* com variações de T_p igual a (A) 20, (B) 40, (C) 80 e (D) 120.

Nestes resultados, verifica-se que os sinais de RMN têm um perfil similar, apresentando uma pequena melhora na supressão no sinal do eco ao aplicar um ΔT_p igual a 40 (Figura 49B) e 120 (Figura 49D).

Para confirmar estes resultados, realizou-se o mesmo estudo com a amostra a brucina. Estes sinais foram adquiridos através da aplicação de um $\theta = 53^\circ$, um $t_r = 300$ ms e um $offset = 500$ Hz e, os valores de ΔT_p foram iguais aos aplicados para a amostra de acetato de sódio (20, 40, 80, 120). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 50.

Figura 50. Sinais de RMN ^{13}C da amostra brucina obtido com a sequência SSS com variações de T_p igual a (A) 20, (B) 40, (C) 80 e (D) 120.

Por estes resultados, observa-se que os sinais apresentam um perfil similar indicando que o valor de ΔT_p não influencia de forma significativa no processo de eliminação do sinal do eco em amostras que apresentam um grande número de linhas.

Ao realizar este mesmo teste com diferentes números aleatórios, os resultados obtidos não foram similares (resultados não mostrados). Isto indica que a utilização de variações aleatórias para T_p resulta na obtenção de resultados não reprodutíveis. Este efeito pode ser melhor compreendido pelas Figuras 51, onde se tem a dispersão de 3 blocos distintos de números aleatórios ao longo de um tempo T_p . Na Figura 51A, os blocos gerados são compostos por 20 números aleatórios, enquanto que na Figura 51B cada bloco é composto por um total de 120 números aleatórios.

Pela Figura 51A, observa-se que os números aleatórios além de não apresentarem uma distribuição uniforme ao longo da faixa de tempo estabelecida, 0 a 1 s, ao comparar cada bloco, verifica-se que eles apresentam perfis bem diferentes. Nesta figura, nota-se que o bloco 2 apresenta uma baixa concentração de números aleatórios compreendidos entre 0 a 0,04 s, enquanto que para o bloco 3, o comportamento é inverso, onde tem-se mais da metade dos números aleatórios na faixa de 0,6 a 1 s. A distribuição não uniforme deste números afeta diretamente no resultado obtido para supressão do sinal do eco.

Figura 51. Representação da dispersão de 3 blocos distintos de números aleatórios formados por (A) 20 e (B) 120 números ao longo de um tempo T_p .

Este efeito pode ser minimizado através do aumento da quantidade de números aleatórios utilizados para as variações de T_p . De acordo com os dados apresentados na Figura 51B, verifica-se que os três blocos compostos por 120 números aleatórios apresentam uma

distribuição, praticamente uniforme ao longo do tempo T_p , e também se observa que estes não apresentam diferenças significativas entre si. No entanto, o aumento de ΔT_p resulta em um aumento no tempo total de análise, fazendo com que esta sequência não apresente vantagem sobre a sequência padrão. A relação entre ΔT_p e o tempo total de experimento pode ser visualizado na Tabela 6.

Tabela 6. Relação entre o tempo de análise obtido com a sequência SSS.

	$\Delta T_p = 20$	$\Delta T_p = 40$	$\Delta T_p = 80$	$\Delta T_p = 120$
Tempo de Análise	19 minutos	30 minutos	48 minutos	70 minutos

Assim, determinou-se como condição ideal para aplicação do método desenvolvido por Freeman e Hill a aplicação de um ΔT_p igual a 40, pois nesta condição tem-se uma supressão significativa nas anomalias de fase e o tempo total de análise não é afetado.

4.2.1.3. Aplicação da sequência de Freeman e Hill

Após determinada às condições ideais para aplicação da metodologia desenvolvida por Freeman e Hill ($offset = 500$ Hz e $\Delta T_p = 40$), verificou-se a sua eficiência para supressão das anomalias de fase nos espectros de RMN ^{13}C obtidos no regime de SSFP.

Dentre as sequências propostas por estes autores, a que apresentou maior eficiência consiste em efetuar a variação de T_p após a aplicação de 64 pulsos. Esta sequência foi denominada de “*scrambled steady state – SSS*” e seus resultados podem ser visualizados nas Figuras 52, 53, 54 e 55 para as amostras de acetato de sódio, acetato de etila, octanol e brucina, respectivamente. Para aquisição do espectro com a amostra de acetato de sódio utilizou-se um $\theta = 53^\circ$ e um $at = 500$ ms, enquanto que para as amostras de acetato de etila, octanol e brucina os valores de θ e at foram de 60° e 300 ms, respectivamente.

Figura 52. Espectros de ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência *SSS* com *offset* = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.

Figura 53. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência *SSS* com *offset* = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.

Figura 54. Espectros de ^{13}C de octanol obtido com a sequência *SSS* com *offset* = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.

Figura 55. Espectros de ^{13}C de brucina obtido com a sequência SSS com $\text{offset} = 500$ Hz e $\Delta T_p = 40$.

Nestes resultados, observa-se que com a aplicação desta sequência tem-se uma supressão significativa nas anomalias de fase e amplitude do sinal quando comparado com os espectros obtidos com a sequência de SSFP (Figuras 36B, 37B, 43B e 44B). No entanto, observa-se que estas anomalias não foram totalmente eliminadas.

Esta melhora, como citada anteriormente, é decorrente da eliminação da componente eco no sinal de RMN no domínio do tempo. Nas Figuras 56, 57, 58 e 59, têm-se os sinais de RMN ^{13}C obtidos com a sequência de SSFP-B e SSS, das amostras de: acetato de sódio, acetato de etila, octanol e brucina.

Figura 56. Sinais de RMN de ^{13}C de acetato de sódio obtidos com as sequências (A) SSFP-B e (B) SSS.

Figura 57. Sinais de RMN de ^{13}C acetato de etila obtidos com as seqüências (A) SSFP-B e (B) SSS.

Figura 58. Sinais de RMN de ^{13}C de octanol obtidos com as seqüências (A) SSFP-B e (B) SSS.

Figura 59. Sinais de RMN de ^{13}C brucina obtidos com as seqüências de (A) SSFP-B e (B) SSS.

Ao comparar a razão s/r, para o mesmo tempo de análise, para os espectros de RMN ^{13}C obtidos com a sequência SSS e com a sequência padrão, observou-se que para as amostras de acetato de etila e octanol obteve-se um ganho de aproximadamente 1,9 com a sequência “SSS”. Já para a amostra brucina, a razão s/r obtida com as duas sequências foi similar, enquanto com a amostra de acetato de sódio a razão s/r foi maior com a sequência padrão. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as sequências SSS e a padrão.

Amostra	Razão s/r	
	Sequência SSS	Sequência Padrão
Acetato de Sódio	2800	6469
Acetato de Etila	1452	751
Octanol	873	437
Brucina	104	100

Como citado anteriormente, uma das limitações apresentada por esta sequência está diretamente relacionada com a utilização de números aleatórios para efetuar as variações de T_p . Desta forma, desenvolveu-se uma nova sequência para a supressão do sinal do eco, na qual as variações de T_p eram realizadas através da aplicação de números calculados. Esta metodologia foi denominada de “*unscrambled steady state*” e será discutida no item a seguir.

4.2.2. Avaliação da sequência *Unscrambled Steady State*

A sequência “*Unscrambled Steady State - USS*” também se baseia na obtenção de espectros com diferentes valores de T_p , cujos limites de escolha, tal como na metodologia de Freeman e Hill, deveriam ser calculados em função do ângulo de precessão que os spins perfazem durante o período de precessão livre (T_p), e que, portanto, dependem da frequência de *offset* aplicada. A diferença, aqui, é que os passos são constantes, e não aleatórios como no método de Freeman e Hill, o que permite uma escolha mais uniforme dos valores de T_p . Os

resultados obtidos com esta sequência podem ser visualizados nas Figuras 60, 61, 62 e 63 para as amostras de acetato de sódio, acetato de etila, octanol e brucina, respectivamente. Estes espectros foram obtidos nas mesmas condições experimentais utilizadas para a metodologia “SSS” ($\Delta T_p = 40$ e $offset = 500$ Hz), aplicando-se um $\theta = 53^\circ$ e um $at = 500$ ms para aquisição do espectro da amostra de acetato de sódio, e, $\theta = 60^\circ$ e $at = 300$ ms para as amostras de acetato de etila, octanol e brucina.

Figura 60. Espectros de ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência *USS* com $offset = 500$ Hz e $\Delta T_p = 40$.

Figura 61. Espectros de ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência *USS* com $offset = 500$ Hz e $\Delta T_p = 40$.

Figura 62. Espectros de ^{13}C de octanol obtido com a sequência *USS* com *offset* = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.

Figura 63. Espectros de ^{13}C de brucina obtido com a sequência *USS* com *offset* = 500 Hz e $\Delta T_p = 40$.

Ao comparar estes resultados com os espectros obtidos com a sequência proposta por Freeman e Hill (Figuras 52, 53, 54 e 55), pode-se verificar que a utilização de variações calculadas para T_p não proporcionou em uma supressão mais eficiente das anomalias de fase, no entanto, possibilitou uma recuperação significativa nas intensidades dos sinais. Em relação à razão *s/r*, obteve-se um aumento para as amostras de acetato de etila, octanol e brucina, enquanto que para a amostra de acetato de sódio a razão *s/r* foi maior no espectro obtido com a sequência padrão. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as seqüências “USS” e a padrão.

Amostra	Razão s/r	
	Seqüência USS	Seqüência Padrão
Acetato de Sódio	5414	6469
Acetato de Etila	1444	751
Octanol	937	304
Brucina	125	100

4.2.3. Avaliação da seqüência de SSFP com ciclagem de fase dos pulsos

Um método mais recente, baseado na ciclagem de fase dos pulsos, foi proposto por Rudakov e colaboradores^{23,24,25} como uma alternativa para eliminar as anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros de RMN-SSFP. Como mostrado no item 3.3.7.3, nesta seqüência, a fase do pulso é variada em 180^0 após a aplicação de dois pulsos de 90^0 .

Os espectros de RMN ^{13}C e os respectivos sinais do domínio do tempo, obtidos com esta seqüência, podem ser visualizados nas Figuras 64, 65, 66 e 67 para as respectivas amostras: acetato de sódio, acetato de etila, octanol e brucina.

Figura 64. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de sódio obtido com a seqüência com ciclagem de fase dos pulsos.

Figura 65. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de etila obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.

Figura 66. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de octanol obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.

Figura 67. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de brucina obtido com a sequência com ciclagem de fase dos pulsos.

Ao comparar estes resultados com os espectros obtidos com a sequência SSFP (Figuras 34B, 36B, 39B e 40B), observa-se que esta sequência também possibilita uma minimização significativa nas anomalias de fase e amplitude do sinal nos espectros de RMN, apresentando um resultado similar ao obtido com a sequência *USS*.

Os valores da razão s/r obtido com esta sequência podem ser visualizados na Tabela 9, e comparando-se estes valores com os obtidos com a sequência padrão, verifica-se que esta apresentou aumento na razão s/r para as amostras de acetato de etila, octanol e brucina.

Tabela 9. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as sequências SSFP com ciclagem de fase dos pulsos e padrão.

Amostra	Razão s/r	
	SSFP com ciclagem de fase dos pulsos	Sequência Padrão
Acetato de Sódio	1855	6469
Acetato de Etila	889	751
Octanol	986	437
Brucina	192	100

4.2.4. SSFP com alteração no desacoplamento de ^1H

Outra metodologia, também citada por Freeman e Hill¹¹, como alternativa para eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal, é realizada através da introdução de uma forma de incoerência entre os spins. Dentre as formas de adicionar esta incoerência, neste trabalho, utilizou-se o acoplamento heteronuclear. Para isso, os espectros foram adquiridos efetuando o desacoplamento somente no momento da aquisição, ou seja, sem efeito NOE.

Os resultados obtidos com esta sequência (espectros de RMN ^{13}C e os respectivos sinais de RMN no domínio do tempo) podem ser visualizados nas Figuras 68, 69, 70 e 71 para as amostras: acetato de sódio, acetato de etila, octanol e brucina, respectivamente.

Figura 68. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de sódio obtido com a SSFP sem efeito NOE.

Figura 69. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de acetato de etila obtido com a SSFP sem efeito NOE.

Figura 70. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra de octanol obtido com a SSFP sem efeito NOE.

Figura 71. (A) Espectro de RMN ^{13}C e (B) sinal de RMN no domínio do tempo para a amostra brucina obtido com a SSFP sem efeito NOE.

Através dos sinais dos FID's (Figura 68B, 69B, 70B e 71B), verifica-se que a componente eco não foi totalmente eliminada, exceto para a amostra de octanol (Figura 70B), e, conseqüentemente, as anomalias de fase e amplitude do sinal não foram suprimidas de forma significativa como mostram os espectros de RMN ^{13}C nas Figuras 68A, 69A, 70A e 71A. Apesar deste resultado, os espectros obtidos com esta seqüência ainda foram melhores aos obtidos com a seqüência de SSFP (Figuras 34B, 36B, 39B e 40B). Ao comparar estes resultados com os espectros obtidos com as demais seqüências utilizadas para eliminação das anomalias de fase baseada na eliminação do eco, conclui-se que esta seqüência não é a mais indicada para efetuar a eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal.

Os valores da razão s/r dos espectros obtidos com esta seqüência podem ser visualizados na Tabela 10. Ao comparar estes valores com os obtidos nos espectros de RMN ^{13}C com a seqüência padrão, observa-se que esta seqüência apresentou uma razão s/r maior para as amostras de acetato de etila, octanol e brucina.

Tabela 10. Relação entre a razão s/r dos espectros obtidos com as seqüências SSFP com introdução de uma incoerência e padrão.

Amostra	Razão s/r	
	SSFP sem efeito NOE	Seqüência Padrão
Acetato de Sódio	4933	6469
Acetato de Etila	1051	751
Octanol	1228	437
Brucina	190	100

4.2.5. Avaliação da proposta de Schwenk

Ao contrário das metodologias apresentadas até o momento, a seqüência desenvolvida por Schwenk, baseia-se no cancelamento dos batimentos laterais no sinal de RMN no domínio da freqüência. Esta seqüência consiste na aquisição de quatro espectros de RMN-SSFP com diferentes freqüências de irradiação. A utilização de diferentes valores de freqüências de irradiação provoca um deslocamento do sinal no espectro no eixo das abscissas, e assim, ao efetuar o somatório destes sinais, tem-se a eliminação dos batimentos laterais em decorrência de estes não estarem em coerência de fase.

Para verificar a eficácia desta seqüência, espectros de RMN-SSFP de ^{13}C foram obtidos com a amostra de acetato de sódio. Estes espectros foram adquiridos através da aplicação de pulsos de 90° separados por um $T_p = 0,5$ s. Os valores de *offset* utilizados foram: 500, 499,2, 498,3 e 497,5 Hz, e os resultados obtidos pode ser visualizados na Figura 72. Para melhor visualização deste resultado, na Figura 72, têm-se somente os resultados obtidos com os *offset* 500 e 497,5 Hz. Ao sobrepor estes espectros, observa-se que os batimentos laterais não encontram-se em fase e, conseqüentemente, ao efetuar o somatório destes sinais, tem-se o cancelamento dos batimentos laterais, como mostra a Figura 73.

Figura 72. Espectros de RMN-SSFP de ^{13}C obtidos com a amostra de acetato de sódio com $T_p = 0,5$ s, $\theta = 90^\circ$ e *offset* de (-) 500 e (-) 497,5 Hz.

Figura 73. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência QFT.

Na Figura 74, tem-se o espectro de RMN ^{13}C obtido com a sequência de SSFP. Comparando-se este espectro com o obtido com a sequência QFT (Figura 73), verifica-se uma melhora significativa nos batimentos laterais ao aplicar a sequência desenvolvida por Schwenk.

Figura 74. Espectros de RMN ^{13}C de acetato de sódio obtido com a sequência SSFP.

No entanto, ao aplicar esta sequência em amostras com um maior número de linhas, como: acetato de etila, brucina e octanol, os resultados foram similares aos obtidos com a sequência de SSFP. Assim, conclui-se que a sequência QFT não pode ser aplicada em amostras com múltiplos sinais, pois nestes espectros além da presença dos batimentos laterais têm-se também as anomalias de fase, e como estas apresentam um comportamento aleatório não é possível efetuar a sua supressão por estarem, na maioria das vezes, em coerência de fase.

Na Figura 75A têm-se os espectros obtidos com a QFT da amostras de acetato de etila. Para aquisição destes sinais, aplicaram-se pulsos de 90° separados por um $T_p = 0,5$ s. Os valores de *offset* utilizados foram: 500, 499,2, 498,3 e 497,5 Hz. Para melhor visualização deste resultado, na Figura 75A, têm-se somente os resultados obtidos com os *offset* 500 e 497,5 Hz. Por estes resultados, observa-se que os batimentos laterais encontram-se em coerência de fase e, conseqüentemente, ao efetuar o somatório destes sinais verifica-se estes não são eliminados, como mostra a Figura 75B.

Figura 75. (A) Espectros de RMN-SSFP de ^{13}C obtidos com a amostra de acetato de sódio com $T_p = 0,5$ s, $\theta = 90^\circ$ e *offset* de (-) 500 e (-) Hz e (B) após aplicação da sequência QFT.

A partir destes confirma-se que o método desenvolvido por Schwenk não pode ser aplicado em amostras que apresentam múltiplos sinais.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, verificou-se que a sequência de SSFP possibilita a aquisição rápida de espectros de RMN ^{13}C , com uma redução de pelo menos 30 vezes no tempo de análise quando comparado com a sequência convencional, e de 5,5 quando comparada com a sequência padrão. No entanto, devido à aplicação de um $T_p < T_1, T_2$, os espectros obtidos no regime de SSFP apresentam anomalias de fase e amplitude do sinal que inviabiliza o emprego desta sequência em análises de rotina.

Através dos estudos realizados com as sequências de SSFP e padrão, verificou-se que a sequência padrão também utiliza a vantagem da sequência de SSFP através da aplicação de $T_p < T_1, T_2$. No entanto, nesta sequência, as anomalias de fase são suprimidas devido à utilização da ciclagem de fase dos pulsos e um Δt de 0,9s.

Pelos resultados obtidos com as metodologias propostas para a eliminação das anomalias de fase e amplitude do sinal presentes nos espectros RMN-SSFP, verificou-se que estas proporcionam uma melhora significativa na qualidade do espectro, porém nenhuma é capaz de suprimi-las totalmente. Ao comparar os valores da razão s/r obtidos com estas sequências, com os valores obtidos com a sequência padrão, observou-se um acréscimo nos espectros das amostras de acetato de etila, brucina e octanol quando adquiridos com as sequências desenvolvidas para supressão das anomalias de fase e amplitude do sinal.

Entre as sequências estudadas, verificou-se que com a sequência desenvolvida por Freeman e Hill (SSS) só é possível a eliminação das anomalias quando os sinais não estão em ressonância. Ainda em relação a esta sequência, observou-se que a aplicação de valores aleatórios para efetuar as variações de T_p resulta em uma dispersão não uniforme destes valores na faixa de tempo pré-estabelecida, e, como, a supressão das anomalias de fase e

amplitude do sinal depende da forma com que estes valores estão distribuídos, verificou-se que ao aplicar diferentes blocos de números aleatórios para as variações de T_p os resultados obtidos não reproduzíveis. Deste modo, desenvolveu-se uma nova sequência em que as variações de T_p passaram a ser realizada com valores calculados. A aplicação destes valores permitiu uma dispersão mais uniforme destes valores em uma faixa de tempo pré-estabelecida e, conseqüentemente, os resultados obtidos apresentaram uma maior reprodutibilidade.

Finalmente, ao estudar a sequência desenvolvida por Schwenk verificou-se que esta possibilita uma supressão significativa dos batimentos laterais em amostras que apresentam um único sinal. No entanto, ao aplicá-la em amostras com um maior número de linhas, verificou-se que as anomalias de fase e os batimentos laterais não eram eliminados em decorrência de seu comportamento aleatório.

6. PROPOSTAS FUTURAS

Uma perspectiva viável para a aplicação da sequência de SSFP para aquisição rápida de espectros de RMN ^{13}C é o uso do método da diagonalização filtrada (*Filter Diagonalization Method* - FDM). A FDM é um procedimento de ajuste dos sinais (*fitting procedures*) e não em uma transformação como no caso da TF. Assim, com a FDM é possível obter espectros de RMN-SSFP sem as distorções causadas pela TF.

Na Figura 76 tem-se o sinal de RMN ^1H , no domínio do tempo, obtido com a sequência de SSFP de uma mistura de acetona e clorofórmio. Este sinal foi adquirido através da aplicação de pulsos de 90° , $T_r = 300\mu\text{s}$ e $t_a = 299,7\text{ ms}$.

Figura 76. Sinal de RMN-SSFP ^1H no domínio do tempo da mistura de acetona e clorofórmio.

Com método FDM é possível decompor o sinal de RMN-SSFP no domínio do tempo em duas componentes: o FID (Figura 77 - sinal em azul) e o eco (Figura 77 - sinal em vermelho). Com a separação das componentes FID e eco é possível efetuar a TF do FID e obter espectros sem distorção da fase ou amplitude (resultado não mostrado).

Figura 77. Decomposição do sinal de RMN-SSFP no domínio do tempo em suas duas componentes: FID e eco, pela FDM.

A FDM ainda pode ser utilizada para obtenção de espectros provenientes de sinais truncados. Na Figura 78, tem-se o sinal de RMN ^{13}C , no domínio do tempo, obtido da amostra de octanol com a seqüência de SSFP. Para aquisição deste sinal, aplicaram-se pulsos de 90° , $T_r = 300\mu\text{s}$ e $t_a = 0,035$ s. Ao comparar este sinal com o mostrado na Figura 76, verifica-se uma redução de aproximadamente 10 vezes no tempo de aquisição, o que proporciona um ganho significativo na razão s/r.

Figura 78. Sinal de RMN-SSFP ^{13}C no domínio do tempo da amostra de octanol.

Na Figura 79A, tem-se o espectro obtido do sinal mostrado na Figura 78 através da aplicação da TF. Neste resultado não é possível identificar todos os sinais de ^{13}C da amostra de octanol devido à presença das anomalias de fase e a baixa resolução espectral. Já no espectro obtido com o método FDM (Figura 79B) verifica-se que este apresenta perfil similar ao sinal obtido com a sequência padrão (Figura 43A), em que as anomalias de fase e a baixa resolução espectral foram eliminadas.

Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C da amostra de octanol obtidos do sinal mostrado na Figura 78 através do processamento (A) TF e (B) FDM.

Por estes resultados preliminares, conclui-se que a FDM pode ser utilizada para obtenção de espectros no regime de SSFP sem as anomalias de fase e amplitude do sinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BONAGAMBA, T. J.; CAPELLE, K. W.; AZEVEDO, E. R. A RMN e suas aplicações atuais. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 40-48, 2005.
2. TIPLER, P. A. **Física moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981. 422p.
3. EISBERG, R. M. **Física quântica**: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. Rio de Janeiro: Campus, 1979. 928p.
4. GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. **Ressonância magnética nuclear**: fundamentos, métodos e aplicações. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987. 1012p.
5. SCHMIDT-ROHR, K. **Multidimensional solid-state NMR and polymers**. London: Academic Press, 1994. 478p.
6. DICKINSON, E.M. Structural comparison of petroleum fractions using proton and ^{13}C NMR. Spectroscopy. **FUEL**, v. 59, p. 290-294, 1980.
7. TALEBPOUR, Z.; HAGHGOO, S.; SHAMSIPUR, M. ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methyl dopa in human serum and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 506, p. 97-104, 2004.
8. CLARIDGE, T.D.W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Amsterdam: Pergamon, 1999. 382p.
9. SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. **Modern NMR spectroscopy**: a guide for chemists. New York: Oxford University Press, 1987. 314p.
10. CARR, H.Y. Steady-State free precession in nuclear magnetic resonance. **Physical Review**, v. 112, p. 1693-1701, 1958.
11. FREEMAN, R.; HILL, H.D.W. Phase and intensity anomalies in fourier transform NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 4, p. 66-383, 1971.

12. HAHN, E.L. Spin echoes. **Physical Review**, v. 80, p. 580-594, 1950.
13. VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R.B.V.; ALEM, N.E.R.; COLNAGO, L.A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34-39, 2005.
14. VENÂNCIO, T., **Novas aplicações da precessão livre em onda contínua em Ressonância Magnética Nuclear de baixa e alta resolução**. 2006. 152f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
15. KRONENBITTER, J.; SCHWENK, A. New technique for measuring relaxation-times T_1 and T_2 and equilibrium magnetization M_0 of slowly relaxing systems with weak NMR signals. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 25, p. 147-165, 1977.
16. AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2401-2405, 2000.
17. AZEREDO, R.B.V. **Espectroscopia de RMN CWFP**. 2004. 85f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
18. AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A.; SOUZA A.A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession a practical analytical tool for low resolution NMR measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 313-320, 2003.
19. ERNST, R.R.; ANDERSON, W.A. Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. **The Review of Scientific Instrument**, v. 37, p. 93-102, 1966.
20. SCHWENK, A. NMR pulse technique with high sensitivity for slowly relaxing systems. **Progress in NMR Spectroscopy**, v. 5, p. 376-389, 1971.
21. SCHWENK, A. Steady-State techniques for low sensitivity and slowly relaxing nuclei. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 17, p. 69-140, 1985.
22. RUDAKOV, T.N.; BELIAKOV, A.V. Modifications of the steady-state free-precession, sequence for the detection of pure nuclear quadrupole resonance. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 31, p. 1251-1256, 1998.

23. RUDAKOV, T.N.; MIKHALTSEVICH, V.T. Steady-state free-precession in nitrogen-14 quadrupolar spin-system with axially symmetric electric field gradient tensor. **Chemical Physics Letters**, v. 324, p. 69-74, 2000.
24. RUDAKOV, T.N. Modification of SSFP technique for the effective detection of NQR signals. **Physics Letters A**, v. 58, p. 322-326, 2003.
25. RUDAKOV, T.N., MIKHALTSEVICH, V.T., SELCHIKHIN, O.P. The use of multi-pulse nuclear quadrupole resonance techniques for the detection of explosives containing RDX. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 30, p. 1377-1382, 1997.
26. COLNAGO, L.A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A.A.; BARBOSA, L.L. High-throughput, non-destructive, determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1271-1274, 2007.
27. VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A. Thermal diffusivity and nuclear spin relaxation: a continuous wave free precession NMR study. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 181, p. 29-34, 2006.
28. VENANCIO, T.; AZEREDO, R. B. V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Water suppression in high resolution ^1H NMR spectroscopy using continuous wave free precession sequence. **Annals of Magnetic Resonance**, v. 2, p. 122-124, 2003.
29. CORRÊA, C. C. **Análise da qualidade de carne bovina por ressonância magnética nuclear em baixa resolução**. 2007. 119f. Dissertação (Mestrado em Química-Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
30. AZEREDO, R.B.V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L.A. Flow sensitivity and coherence in steady-state free spin precession. **Physical Review E**, v. 64, p. 6309-6313, 2001.
31. MALAYERI, A. A.; JOHNSON, W. C.; MACEDO, R.; BATHON, J.; LIMA, J.A.C.; BLUEMKE, D.A. Cardiac cine MRI: quantification of the relationship between fast gradient echo and steady-state free precession for determination of myocardial mass and volumes. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 28, p. 60-66, 2008.
32. KLARHOFER, M.; MADORIN, P.; BILECEN, D.; SCHEFFLER, K. Assessment of muscle oxygenation with balanced SSFP: a quantitative signal analysis. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 27, p. 1169-1174, 2008.

-
33. MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **The Review of Scientific Instruments**, v. 29, p. 688-691, 1958.
34. BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.O.; BERGER, S. **150 and more basic NMR experiments**. Weinheim: VCH, 1998. 610p.
35. MANDELSHTAM, V. A. FDM: the filter diagonalization method for data processing in NMR experiments. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 38, p.159–196, 2001.