UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

TATIANA MONARETTO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES DE SEQUÊNCIAS DE PULSOS
CWFP UNI E BIDIMENSIONAIS PARA RMN NO DOMÍNIO DO TEMPO

São Carlos
2019

TATIANA MONARETTO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES DE SEQUÊNCIAS DE PULSOS
CWFP UNI E BIDIMENSIONAIS PARA RMN NO DOMÍNIO DO TEMPO

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em ciências.

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos
2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aparício e Terezinha, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Adriano, por acreditar em meu potencial e sempre me incentivar a superar os meus limites. Aos meus sobrinhos Ana Clara e Arthur, meus maiores presentes.

Ao Lucas, pelo amor, paciência, companheirismo incondicional e apoio durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago, pela amizade, orientação sempre muito dedicada, confiança e incentivo no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Elton Tadeu Montrazi, pela sua ajuda no processamento dos dados e pelas valiosas discussões que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Me. Rodrigo Henrique dos Santos Garcia, pela sua ajuda na implementação das sequências de pulsos e pelas valiosas discussões que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Victor Bertucci Neto, pelas valiosas discussões sobre os métodos de filtragem.

Ao Dr. André, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Cirlei e à Fernanda, pelo seu incentivo, carinho, amizade e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do grupo de RMN da Embrapa Instrumentação: Fernanda, Flávio, Bruna, Cirlei, Douglas, Isabel, Banny, Gabriela, Tiago, André, Rodrigo, Luiz, Poliana, Guilherme e Carlos pela amizade, convivência e ajuda mútua.

Aos todos os amigos que fiz em São Carlos.

À Embrapa Instrumentação, pela infraestrutura e por todas as suas facilidades oferecidas.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) – USP, por todo o suporte acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro por meio do processo de financiamento 1541262.

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

EPÍLOGO

“A vida começa no final da sua zona de conforto. ”

Neale Donald Walsh

RESUMO

Os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) são largamente utilizados em medidas qualitativas e quantitativas em Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo (RMN-DT). As constantes de tempo T_2 e T_1 são obtidas com as sequências de pulsos Carr-Purcel-Meiboom-Gill (CPMG) e Inversão Recuperação (IR), respectivamente. Além dessas sequências, também têm sido desenvolvidos outros métodos que permitem a determinação de T_1 e T_2 em um único experimento. Dentre esses, destacam-se os provenientes da condição *Continuous Wave Free Precession*: CWFP e CP-CWFP (Carr-Purcel-CWFP) com ou sem alternância de fase entre os pulsos que compõe a sequência de pulsos de 90° desses métodos. Baseando-se no fato de que os métodos provenientes da condição CWFP têm sido promissores para a determinação das constantes de tempo de uma forma rápida, esse trabalho visou aprofundar o estudo das sequências de pulsos oriundas dessa condição a fim de desenvolver um método de determinação rápida da constante de tempo T_1 em um único experimento e também implementar a condição CWFP em sequências de pulsos 2D (2D-CWFP). Utilizando-se de pulsos de baixo ângulo de rotação ($\theta \sim 10$ graus) foi possível determinar a constante de tempo T_1 utilizando a condição CWFP, esse método foi denominado de CWFP- T_1 . Contudo, este apresentou um sinal com baixa razão sinal ruído (S/R) devido aos baixos valores de θ . Para minimizar esse efeito foram estudados cinco métodos de redução de ruído que podem ser aplicados em sinais de RMN-DT após a aquisição, sendo que, dentre os métodos estudados foi comprovado que os filtros *wavelet* (WA) e o Savitzky-Golay (SG) são os mais eficazes para redução do ruído sem distorcer as informações da amostra. Além disso, o sinal obtido pelo método CWFP- T_1 associado ao filtro WA demonstrou ser eficiente para determinação de gordura em carne bovina. Dentre os métodos 2D-CWFP desenvolvidos neste trabalho, o CPMG-CWFP- T_1 apresentou vantagem em tempo de experimento sobre o método IR-CPMG. Além disso, o sinal adquirido pelo método CPMG-CWFP- T_1 quando associado ao filtro SG propiciou a obtenção de mapas com melhor resolução na dimensão de T_1 , que as outras sequências de pulsos abordadas neste estudo e demonstrou ser um método promissor para a análise da carne e gordura bovina. Esta foi a primeira vez em que a constante de tempo T_1 foi utilizada como dimensão de aquisição de uma forma conveniente em experimento 2D de correlação dos tempos de relaxação, visto que aquisições dessa natureza geralmente requerem longos tempos de experimento.

ABSTRACT

The longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times are widely used in the qualitative and quantitative measurements in time domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR). Those relaxation times are generally measured by the Carr-Purcel-Meiboom-Gill (CPMG) and Inversion Recovery (IR) pulse sequences, respectively. In addition to these sequences, other methods have been development, which makes it possible to measure T_1 and T_2 in a single experiment. Among these, a special reference is made those ones coming from the Continuous Wave Free Precession condition: CWFP and CP-CWFP (Carr-Purcel-CWFP) with or without phase alternation between the pulses that make up the pulse train of 90° of these methods. Based on the fact that the methods from the CWFP condition have been promising to determine the time constants fast, the purpose of this work was to deepen the study of the sequences from that condition in order to develop a rapid method to determine the T_1 relaxation time in a single experiment, and also to implement the CWFP condition in 2D sequences (2D-CWFP). Using a small flip angle ($\theta \sim 10$ degrees), it was possible to determine the T_1 relaxation time using the CWFP condition; this method was named CWFP- T_1 . Nevertheless, this sequence has a signal with a low signal-to-noise ratio (SNR) because of the small values of θ . In order to minimize this effect was studied five denoise methods to applied in the post-acquisition TD-NMR signals. Among the denoise methods studied, the wavelet (WA) and the Savitzky-Golay (SG) are the most effective to reduce the noise of the signal without distorting the sample information. In addition, the CWFP- T_1 signal associated to the WA has shown to be effective for determining the fat in beef samples. Among the 2D-CWFP methods developed in this work, the CPMG-CWFP- T_1 had advantage in the experimental time compared with the IR-CPMG method. Furthermore, the signal acquired by CPMG-CWFP- T_1 sequence, when associated with the SG filter, had 2D maps with the best resolution in the T_1 dimension than the other sequences addressed in this work and also proved to be effective to analyze fat beef. This was the first time that T_1 time constant was encoded in the acquisition dimension at a convenient way in the 2D experiments of relaxation times correlation, once such acquisitions generally require extensive experimental time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do diagrama de energia sobre efeito do campo magnético para $spin\ I=1/2$	27
Figura 2 – Representação vetorial do movimento de precessão.....	28
Figura 3 – (a) Esquema da sequência de pulsos para o método IR, onde τ_r representa o tempo de recuperação da magnetização longitudinal. (b) intensidade do sinal de RMN obtido pelo método IR, sendo que cada ponto representa um experimento com valor de τ_r diferente.....	30
Figura 4 – (a) Esquema da sequência de pulsos do método SR, onde τ_r representa o tempo de recuperação da magnetização longitudinal. (b) Intensidade do sinal de RMN obtido pelo método SR, sendo que cada ponto representa um experimento com valor de τ_r diferente.....	31
Figura 5 – Sequência de pulsos do método CPMG, sendo que $\tau/2$ é o tempo entre o pulso de 90° e o de 180° , τ é o tempo ao eco e n é o número de ecos.....	32
Figura 6 – Sinais de RMN simulados numericamente usando $T_1 = 200\ ms$, $T_2 = 150\ ms$ e $T_2^* = 0,5\ ms$ e quatro valores de τ : $\tau = 5T_1$ (a), $\tau = T_2$ (b), $\tau = 2T_2^*$ (c) e $\tau < T_2^*$ (d) e (e). A frequência de <i>offset</i> foi igual a $5\ KHz$ para os sinais de (a) até (d) e $3,33\ KHz$ para o experimento (e). A linha tracejada nesta figura indica a posição onde o pulso de 90° é aplicado.	34
Figura 7 – Esquema das sequências de pulsos para o regime SSFP/CWFP, onde τ é o tempo entre os pulsos, ϕ_1 e ϕ_2 são as fases dos pulsos, θ é o ângulo do pulso, que no caso da CWFP é 90° e n é o número de vezes que os pulsos θ_{ϕ_1} e θ_{ϕ_2} são repetidos. Para as condições SSFP e CWPF $\tau = T_2$ e $T_2 \gg \tau < T_2^*$, respectivamente. Para as sequências de pulsos SSFP e CWFP $\phi_1 = \phi_2$ e para as sequências SSFPx-x e CWFPx-x $\phi_1 = -\phi_2$	35
Figura 8 – Expansão da região do estado estacionário (EE) da componente do sinal real obtido para uma solução contendo íons Mn^{2+} $1\ mM$ por meio das sequências de pulsos (a) SSFP e (b) SSPx-x para um $T_2 > \tau > T_2^*$. As linhas tracejadas referem-se à aplicação de pulsos de rf de 90°	36

Figura 9 – Amplitude do sinal (a) CWFP e (b) CWFPx-x obtidos por simulação utilizando $\tau = 300 \mu\text{s}$ (linha contínua) e $\tau = 200 \mu\text{s}$ (linha tracejada).....37

Figura 10 – Sinal real obtido pela sequência de pulsos CWFP para uma solução contendo íons de Mn^{2+} 1 mM. Neste é mostrado o regime de transição em cinza escuro, o estado quase estacionário (EQE) em cinza claro e o estado estacionário em branco. As abreviações M_0 , T^* e $|M_{EE}|$ referem-se à magnetização inicial, a constante de decaimento do sinal do EQE ao EE e ao módulo da amplitude da magnetização no EE, respectivamente.39

Figura 11 – Esquema das sequências de pulsos para o regime CP-CWFP onde τ é o tempo entre os pulsos ($T_2 \gg \tau < T_2^*$), ϕ , ϕ_1 e ϕ_2 são as fases dos pulsos, $\theta = 90^\circ$ e n é o número de vezes que os pulsos θ_{ϕ_1} e θ_{ϕ_2} são repetidos. Para a sequência de pulsos CP-CWFP $\phi = \phi_1 = \phi_2$ e para a sequência de pulsos CP-CWFPx-x $\phi = \phi_1 = -\phi_2$40

Figura 12 – Sinais obtidos com as sequências de pulsos CWFP (a), CP-CWFP (b) e CP-CWFPx-x (c) para soluções contendo íons de Cu^{2+} 10 mM ($T_1 \sim T_2$) e Mn^{2+} 1 mM ($T_1 \sim 4T_2$).40

Figura 13 – Componente real dos sinais obtido pelas sequências de pulsos CP-CWFP e CP-CWFPx-x para uma solução contendo íons de Cu^{2+} 10 mM. Nestes sinais é mostrado o regime de transição em cinza escuro, o estado quase-estacionário (EQE) em cinza claro e o estado estacionário em branco. As abreviações M_0 , T^* e $|M_{EE}|$ referem-se à magnetização inicial, à constante de crescimento exponencial do sinal do EQE, ao EE e ao módulo da amplitude da magnetização no EE, respectivamente.41

Figura 14 – Esquema da sequência de pulsos 2D IR-CPMG (a) e SR-CPMG (b). Nestas n é o número de vezes que o pulso de 180° é repetido, τ é o tempo entre os ecos do método CPMG e τ_r é o tempo de recuperação na sequência de pulsos IR e SR.43

Figura 15 – Sinais resultantes das sequências de pulsos IR-CPMG (a) e SR-CPMG (b) e seus respectivos mapas 2D em (c) e (d). Tais sinais foram simulados considerando-se um sistema composto por três componentes com $T_1 = T_2$, cujos valores são iguais a 1.200, 600 e 100 ms.

Estes sinais foram simulados sem ruído e os mapas foram obtidos pelo método de processamento FLI utilizando um $\alpha = 0,1$43

Figura 16 – Esquema da compressão linear (LI) e logarítmica (LO) dos dados. Os círculos pretos representam um conjunto de cinco pontos de um dado sinal e o círculo branco representa a média aritmética desses cinco pontos, o qual substituiu os outros cinco pontos na compressão LI e LO.49

Figura 17 – (a) Parâmetros utilizados para caracterizar um filtro. A figura (a) exemplifica um tipo passa baixa onde a linha em azul indica um filtro real e a linha vermelha tracejada mostra o comportamento de um filtro ideal. A figura em (b) mostra a janela espectral característica dos filtros passa baixa (i) passa alta (ii) passa banda (iii) e corta banda (iv). Na figura (b) ω_c corresponde à frequência de corte.50

Figura 18 – (a) Sinal simulado para a sequência de pulsos CPMG para um $T_2 = 200$ ms, $\tau = 1,3$ ms, 1.500 ecos e homogeneidade do campo magnético ajustada para se obter uma $S/R \sim 10$. (b) Aplicação do filtro passa baixa (PB) na Transformada de Fourier (TF) do sinal (a). (c) TF do sinal (a) após a aplicação do filtro PB e (d) sinal no domínio do tempo após a aplicação do filtro PB no sinal (a) com $S/R \sim 100$51

Figura 19 – Ilustração da suavização do ruído pelo método dos mínimos quadrados pelo ajuste polinomial de segunda ordem (linha sólida) para um conjunto de cinco pontos de um determinado sinal (círculo preto sólido). Os círculos transparentes indicam a resultante (a_0) da aplicação dos mínimos quadrados e x corresponde ao peso tabelado das constantes.52

Figura 20 – (a) Separação do conjunto de frequências (representados pelo sinal), pela transformada *wavelet* direta (TWD), em duas bandas de frequências por intermédio de dois filtros: passa alta (PA) e passa baixa (PB), gerando duas componentes denominadas de aproximação (cA) e detalhe (cD), respectivamente; (b) o procedimento citado em (a) pode ser realizado várias vezes para a componente aproximação (cA1). Em (b) S representa o sinal a ser decomposto.55

Figura 21 – Esquema de um sistema composto por três tubos de ensaio de 3 mm de diâmetro acondicionado dentro de um tubo de 11 mm de diâmetro. As diferentes tonalidades de azul indicam que há diferentes soluções nos tubos.59

Figura 22 – Variação do T^* obtido com a sequência CP-CWFP_{x-x} em função do ângulo dos pulsos θ para soluções contendo complexos: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM (●), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM (▲) e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM (■). Curvas em linha contínua azul são os valores de T^* calculados utilizando a Equação 13.68

Figura 23 – Sinais obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM usando todos os pulsos das sequências de pulsos com os seguintes ângulos θ igual a 90° (a), 50° (b), 30° (c) e 10° (d).69

Figura 24 – Sinais obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM utilizando ângulo θ de 10° para os pulsos que compõe a sequência de n pulsos do método CP-CWFP_{x-x} e $\tau = 300 \mu\text{s}$. Os três sinais se diferem com relação ao ângulo do primeiro pulso da CP-CWFP_{x-x}, sendo este 10° (a), 90° (b) e 180° (c). 70

Figura 25 – Variação do T^* obtido com a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} em função do ângulo θ dos pulsos para soluções contendo complexos: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM (●), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM (▲) e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM (■). Os experimentos referentes a $\theta = 10^\circ$ foram realizados usando um ângulo de 180° no primeiro pulso e 10° nos n pulsos que compões a sequência CP-CWFP_{x-x}. Curvas em linha contínua azul representam os valores de T^* calculados utilizando a Equação 13.70

Figura 26 – Esquema referente a sequência de pulsos CWFP- T_1 , onde θ representa ângulos pequenos de 10° ou 5°, τ o tempo entre os pulsos θ e n é o número de vezes que o pulso θ e θ - x são repetidos.71

Figura 27 – Sinais obtidos para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM utilizando as sequências de pulsos CWFP- T_1 (a) e CPMG (b) com variação do RD de $0,05T_1$ (35 ms) a $5T_1$ (3,5 s).74

Figura 28 – Em (a) são mostrados os sinais obtidos pelas sequências de pulsos CWFP- T_1 (sinal em preto) e pelo método IR (bolinhas e linha vermelha) e em (b) é apresentado o sinal do FID. Todos esses sinais foram obtidos para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e utilizando 4 *scans*. 75

Figura 29 – (a) Sinal FID (sinal azul) e sinal obtido com o método CPMG (sinal vermelho) utilizando uma solução contendo complexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,02 mM, cujo $T_2^* = 0,5$ ms e $T_2 = 680$ ms. (b) Transformada de Fourier do sinal FID (em azul) e do sinal obtido com o método CPMG (em vermelho), demonstrado na (a), sendo que as respectivas larguras à meia altura da banda espectral da TF desses sinais são de 650 Hz e 0,47 Hz. 76

Figura 30 – Pré-processamento do sinal CWFP- T_1 : (A) componente real do sinal após a correção de fase adequada para obter um decaimento exponencial; e (B) sinal após a correção do *offset*. 77

Figura 31 – (a) - Sinais CWFP- T_1 bruto e filtrados e suas respectivas ILT (b) obtidos para uma amostra composta por três soluções aquosas contendo os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 mM (T_{11}), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM (T_{12}), e 0,125 mM (T_{13}); (a) BR é o sinal CWFP- T_1 adquirido, denominado de sinal bruto; ME é o sinal CWFP- T_1 após realizar a média do conjunto de 64 pontos adquiridos durante cada τ ; PB é o sinal CWFP- T_1 ME filtrado usando o filtro passa banda com uma largura de banda de ± 200 Hz; LI e LO são a compressão do sinal CWFP- T_1 ME em dez vezes utilizando métodos de compressão linear e logarítmico, respectivamente; SG é o sinal CWFP- T_1 ME filtrado utilizando o método Savitzky-Golay de 2ª ordem com um subconjunto de 41 pontos e WA é o sinal CWFP- T_1 ME filtrado utilizando o método *wavelet* com uma onda Symlet do tipo Sym8 e uma decomposição de nível 5 As linhas verticais pontilhadas em vermelho em (b) indicam os valores de T_1 individuais para cada solução. 79

Figura 32 – (a) - Sinais CPMG bruto e filtrados e suas respectivas ILT (b) obtidos para uma amostra composta por três soluções aquosas contendo os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 M (T_{21}), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM (T_{22}), e 0,125 mM (T_{23}); (a) BR é o sinal CPMG adquirido, denominado de sinal bruto; PB é o sinal CPMG BR filtrado usando o filtro passa baixa com uma largura de banda de ± 200 Hz; LI e LO são a compressão do sinal CPMG BR em dez vezes utilizando métodos de compressão linear e logarítmico, respectivamente; SG é o sinal CPMG BR filtrado utilizando o método Savitzky-Golay de 2ª ordem com um subconjunto de 41 pontos e WA é o

sinal CPMG BR filtrado utilizando o método *wavelet* com uma onda Symlet do tipo Sym8 e uma decomposição de nível 5; As linhas verticais pontilhadas em vermelho em (b) indicam os valores de T_1 individuais para cada solução. 80

Figura 33 – Sinal CWFP- T_1 ME após a aplicação do filtro digital passa banda (PB) de resposta de impulso infinito (IIR) usando uma largura de banda de corte de ± 200 Hz sem (a) e utilizando (b) o método de correção de fase *forward-backwards*. A linha vertical tracejada em (a) indica parte do filtro que precisa ser cortada para evitar distorções na ILT. 81

Figura 34 – (a) Sinal CWFP- T_1 ME após a aplicação do filtro PB – IIR, utilizando uma banda de corte 20 Hz, sem (sinal com linha contínua) e com (sinal pontilhado) o método de correção de fase forward-backward, com suas respectivas distribuições de tempo em (b) e (c). A linha vertical pontilhada (a) indica a região em que o sinal CWFP- T_1 filtrado sem o método de correção de fase é deletada a fim de remover as oscilações iniciais e a linha tracejada em (b) indicam os valores de T_1 individuais para cada solução (T_{11} , T_{12} e T_{13}). 83

Figura 35 – Distribuições de T_1 obtidas pela ILT do sinal CWFP- T_1 ME filtrado. LI e LO correspondem à compressão linear e logarítmica em 500 vezes; SG representa a aplicação do filtro Savitzky-Golay de 2ª ordem utilizando um subconjunto de 501 pontos. WA refere-se à aplicação do filtro *wavelet* utilizando a função Sym8 e nível de decomposição igual a nove. As linhas verticais tracejadas indicam os valores de T_1 individuais para cada solução (T_{11} , T_{12} e T_{13}). 85

Figura 36 – Distribuição dos tempos de relaxação T_1 e T_2 obtidos pela ILT dos sinais CWFP- T_1 ME (a) e CPMG RA (b) sem (linha tracejada preta) e com filtro WA (linha contínua azul). Estes sinais foram adquiridos para amostras de carne bovina com diferentes teores de gordura: (i) carne magra (CM), (ii) carne com baixo teor de gordura (CBTG) e (iii) carne com alto teor de gordura (CATG-1:1 – carne: gordura) e (iv) para uma amostra gordura bovina pura (GP). 88

Figura 37 – Esquema da sequência de pulsos 2D CWFP- T_1 -CPMG, onde τ representa o tempo entre os pulsos, $\theta_x/-x$ um ângulo pequeno ($\geq 10^\circ$), n indica quantas vezes os pulsos de θ_x e θ_x são aplicados na sequência de pulsos CWFP- T_1 e m o número de vezes que o pulso 180°_y é aplicado no método CPMG. 91

Figura 38– Esquema da sequência de 2D CPMG-CWFP- T_1 , onde τ é o tempo entre os pulsos, m é o número de pulsos de 180° aplicados na sequência de pulsos CPMG, $\theta_x/-x$ é um ângulo pequeno (5° ou 10°) e n indica o número de vezes que os pulsos de θ_x e θ_x são aplicados na sequência CWFP- T_1 91

Figura 39 – Os sinais em cinza representam os sinais obtidos com o primeiro experimento utilizando a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 antes (sinal cinza que não decai a zero) e após (sinal cinza que decai a zero) a subtração do sinal obtido com o último experimento (sinal em preto que não decai a zero). A linha em preto com amplitude zero ao longo do eixo x é o sinal obtido com o último experimento após a subtração por ele mesmo. 93

Figura 40 – Sinais experimentais obtidos pelas sequências de pulsos IR-CPMG (a), SR-CPMG (b), CWFP- T_1 -CPMG (c) e CPMG-CWFP- T_1 (d), para um sistema composto por três soluções aquosas contendo os seguintes complexos: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM..... 94

Figura 41 – Primeiros 4 s do 1° (amplitude máxima igual a um) e do 32° (amplitude máxima igual a zero) sinal normalizado obtido pela sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 para um sistema composto por três soluções aquosas, a quais continham um dos seguintes complexos: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. O sinal de cor vermelha foi obtido utilizando o valor do $RD = 5T_1$ e sinal de cor preta foi adquirido usando o valor de $RD = 0,01$ s..... 95

Figura 42 – Demonstração do efeito da utilização de um RD de 0,01 nos sinais (a) e no mapa 2D (b) obtido pelo método IR-CPMG: (a) 32 sinais experimentais obtidos pelo método IR-CPMG para o sistema complexo composto por três soluções aquosas soluções aquosas que continham um dos seguintes complexos: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. Mapa 2D obtido para o sinal (a) utilizando o método FLI. A linha tracejada em preto em (b) indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1..... 96

Figura 43 – Projeções 1D da distribuição de tempo de T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidas pelo método FLI para os sinais adquiridos utilizando as sequências de pulsos: IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii), CWFP- T_1 -CPMG (iii), CPMG-CWFP- T_1 (iv) e CPMG-CWFP- T_1 -SG (v) para a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta

por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM (T_2) e 0,02 mM (T_3) e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM (T_1). As linhas tracejadas verticais indicam os valores de T_1 e T_2 resultantes do método IR-CPMG (i). 98

Figura 44 – Mapas 2D obtidos do processamento dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos CWFP- T_1 -CPMG (a), SR-CPMG (b) e CPMG-CWFP- T_1 (c) utilizando o método de processamento FLI. Estes sinais foram obtidos com a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. A linha tracejada em preto indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é il gual a 1..... 99

Figura 45 - (a) Sinais experimentais adquiridos com a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 após a aplicação do filtro SG de 2ª ordem utilizando um subconjunto de 71 pontos (CPMG-CWFP- T_1 -SG). (b) mapa 2D obtido pelo processado do sinal (a) pelo método FLI. Os sinais em (a) foram obtidos para o sistema composto por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. A linha tracejada em preto em (b) indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1..... 101

Figura 46 – Projeções 1D da distribuição de tempo de T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidos pelo processamento dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos: IR-CPMG (linha preta) e CPMG-CWFP- T_1 -SG (linha vermelha) utilizando o método máxima entropia. Os sinais IR-CPMG foram adquiridos utilizando a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM..... 102

Figura 47 – Mapas 2D obtidos do processamento dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos IR-CPMG (a) e CPMG-CWFP- T_1 -SG utilizando o método de processamento máxima entropia. Estes sinais foram obtidos com a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. A linha tracejada em preto indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1..... 103

Figura 48 – Projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método FLI para sinais simulados da sequência de pulsos IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii) e CPMG-CWFP- T_1 utilizando $\alpha = 2,5$. As linhas contínuas vermelha e preta e a linha tracejada azul indicam o número de pontos da dimensão direta iguais a 30.000, 10.000 e 1.000, respectivamente, para ambos os casos a dimensão indireta foi simulada com 32 pontos. Para a simulações desses sinais foram utilizadas as constantes de tempo T_1 de valor igual a 1.760 ms, 640 ms e 100 ms e T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms, esses sinais forma simulados em ruído. 104

Figura 49 – Projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método máxima entropia para sinais simulados da sequência de pulsos IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii) e CPMG-CWFP- T_1 . As linhas contínuas vermelha e preta e a linha tracejada azul indicam o número de pontos da dimensão direta iguais a 30.000, 10.000 e 10.00, respectivamente, para ambos os casos a dimensão indireta foi simulada com 32 pontos. Para a simulações desses sinais foram utilizadas as constantes de tempo T_1 de valor igual a 1.760 ms, 640 ms e 100ms e T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms, esses sinais forma simulados em ruído..... 106

Figura 50 – Projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método FLI para sinais simulados da sequência de pulsos IR-CPMG (sinal preto), SR-CPMG (sinal vermelho) e CPMG-CWFP- T_1 (sinal azul) utilizando 10.000 na dimensão direta e 32 na dimensão indireta. Para a simulações desses sinais foram utilizadas as constantes de tempo T_1 de valor igual a 1.760 ms, 640 ms e 100ms e T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms. 107

Figura 51 – Mapas 2D obtidos dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos: (b) IR-CPMG e (a) CPMG-CWFP- T_1 -SG para uma amostra de carne magra (CM-i), carne com alto teor de gordura (CATG-ii) e gordura pura obtida por secagem a vácuo (GPS-iii). Para a obtenção desses mapas foi utilizado o método de processamento FLI. As linhas tracejadas em preto e vermelho indicam a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1 e 2, respectivamente. 111

Figura 52 – Espectros de ^1H -HR-MAS RMN obtidos em um espectrômetro de 600 MHz para amostras de gordura bovina pura secada a vácuo (GPS-a), gordura bovina pura (GP-b) e carne magra (CM-c). Em (c) o espectro em cinza mostra a região do espectro de ^1H para a CM ampliada 200 vezes..... 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Funções núcleo para experimentos de correlação dos tempos de relaxação T_1 e T_2 .

.....45

Tabela 2 – Valores da constante de tempo T_1 mensuradas pelas sequências de pulsos IR, CWFP- T_1 com θ da sequência de n pulsos igual a 10° e 5° para água deionizada e soluções aquosas contendo os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM, $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM e $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ 3,3 mM.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN – Ressonância Magnética Nuclear
AR – alta resolução
BR – baixa resolução
BC – baixo campo
DT – domínio do tempo
rf – rádio frequência
CPMG – Carr-Purcell-Maiboom-Gill
IR – Inversão Recuperação
SR – Saturação Recuperação
RD – recycle delay
SSFP – Steady State Free Precession
CWFP – Continuous Wave Free Precession
CP-CWFP – Carr-Purcell- Continuous Wave Free Precession
CP-CWFP_{x-x} – CP-CWFP com alternância de fase
SSFP – Single-Scan Fourier Transform
EE – estado estacionário
EQE – estado quase estacionário
FID – *Free Induction Decady*
TF – Transformada de Fourier
LT – *Laplace Transform*
ILT – *Inverse Laplace Transform*
FI – Fredholm *Integral*
IFI – *Inverse Fredholm Integral*
FLI – *Fast Laplace Inversion*
S/R – razão sinal ruído
PB – passa baixa
PA – passa alta
IIR - *Infinity Impulse Response*
FIR - *Finity Impulse Response*
TWC – transformada *wavelet* contínua
TWD – transformada *wavelet* discreta
LO – logarítmico

LI – linear

GCV – *Generalised Cross-Validation*

BRD – (Buter, Reeds e Dawson)

TSVD – *Truncated Singular Values Decomposition*

SG – Savitzky-Golay

WA – *wavelet*

TH – *threshold*

1D – unidimensional

2D – bidimensional

CM – carne magra

CBTG – carne com baixo teor de gordura

CATG – carne com alto teor de gordura

GP – gordura pura

GPS – gordura pura secada a vácuo

HR-MAS – *high-resolution magic-angle-spinning*

LISTA DE SIMBOLOS

$\vec{B}_0$ – campo magnético

$\vec{B}_1$ – campo magnético oscilante

h – constante de Planck

$\hbar = h/2\pi$

I – *spin* nuclear resultante

$\vec{I}$ – momento angular do *spin* nuclear

$\vec{\mu}_n$ – momento magnético nuclear

γ – razão magnetogírica

k_B – constante de Boltzman

M_0 – amplitude da magnetização no equilíbrio térmico

$\vec{M}$ – magnetização resultante

t_p – tempo de duração da aplicação do pulso

τ – tempo entre os pulsos

τ_r – tempo de recuperação da magnetização longitudinal

T_1 – tempo de relaxação longitudinal

T_2 – tempo de relaxação transversal

T_2^* – T_2 considerando a não homogeneidade de B_0

T^* – constante de decaimento do EQE ao EE

ν_0 – frequência de *Larmor*

ω_0 – frequência angular de *Larmor*

ω_1 – frequência angular de B_1

ω_c – frequência de corte

ψ – ângulo de precessão

ν – frequência de *offset* em Hz

Ω – frequência angular de *offset* em radianos

D – coeficiente de difusão

δ – deslocamento químico

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
EPÍLOGO.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	18
LISTA DE SIMBOLOS	20
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 Fundamentos básicos da RMN	26
2.1.1 Efeito do pulso de radiofrequência (rf)	28
2.1.2 Relaxação longitudinal (T_1)	29
2.1.3 Relaxação transversal (T_2).....	31
2.2 Regimes provenientes da condição SSFP e CWFP.....	33
2.2.1 Determinação das constantes de tempo T_1 e T_2 utilizando técnicas do EE	37
2.3 Experimentos bidimensionais em RMN-DT.....	41
2.4 – Transformada inversa dos dados experimentais	44
2.41 – Inversão de dados unidimensionais.....	44
2.42 – Inversão de dados bidimensionais.....	46
2.5 Métodos de atenuação de ruído para sinais adquiridos por RMN-DT.....	48
2.5.1 Compressão de dados linear e logarítmica.....	48
2.5.2 Filtro digital: filtro passa baixa	49
2.5.3 Filtro Savitzky – Golay.....	52
2.5.4 Wavelet (WA).....	53
3 OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo geral.....	57
3.2 Objetivos parciais.....	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 Amostras.....	58
4.2 Espectrômetros de RMN.....	59
4.3 Sequências de pulsos e parâmetros experimentais de aquisição dos sinais	60
4.3.1 Sequência de pulsos unidimensional CWFP- T_1	61
4.3.2 Aplicação de filtros nos sinais CWFP- T_1 e CPMG.....	62
4.3.3 Sequências de pulsos 2D-CWFP	62

4.3.4 <i>Análise de gordura e carne bovina por HR-MAS RMN</i>	63
4.4- Métodos de atenuação de ruído aplicados aos sinais adquiridos por RMN-DT	63
4.5 Processamentos dos dados unidimensionais	64
4.6 Processamento de dados bidimensionais	64
4.7 Parâmetros usados na simulação dos sinais 2D	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 <i>Sequência de pulsos unidimensional CWFP-T₁</i>	67
5.2 <i>Aplicação de métodos para redução do ruído em sinais adquiridos pelos métodos CWFP-T₁ e CPMG</i>	75
5.2.1 – <i>Pré-processamento do sinal adquirido pelo método CWFP-T₁</i>	77
5.2.2 – <i>Análise de um sistema composto por três soluções aquosas</i>	78
5.2.3 <i>Análise da gordura em carne bovina utilizando os sinais filtrados CWFP-T₁ e CPMG</i>	86
5.3 Sequências de pulsos 2D-CWFP	90
5.3.1 <i>Sequência de pulsos bidimensional CWFP-T₁-CPMG</i>	90
5.3.2 – <i>Sequência de pulsos bidimensional CPMG-CWFP-T₁</i>	91
5.3.2.1 – <i>Pré-processamento do sinal CPMG-CWFP-T₁</i>	92
5.3.3 <i>Resultados experimentais das sequências de pulsos 2D-CWFP</i>	93
5.3.3.1 – <i>Comparação entre os sinais obtidos pelas sequências de pulsos 2D-CWFP com os obtidos pelas técnicas IR-CPMG e SR-CPMG</i>	94
5.3.3.2 – <i>Análise do tempo experimental das sequências de pulsos 2D - CWFP</i>	95
5.3.3.3 – <i>Comparação entre os mapas obtidos pelas sequências de pulsos 2D-CWFP com os obtidos pelas técnicas IR-CPMG e SR-CPMG</i>	97
5.3.4 <i>Análise da resolução em mapas 2D utilizando sinais simulados</i>	103
5.3.4.1 <i>Estudo da influência do número de pontos total da matriz de dados 2D na resolução dos mapas 2D</i>	104
5.3.4.2 <i>Estudo da influência do número de pontos da dimensão de aquisição 2D na resolução dos mapas 2D e da equação núcleo</i>	106
5.3.5 – <i>Análise de gordura em carne bovina utilizando as sequências de pulsos CPMG-CWFP-T₁ e IR-CPMG</i>	108
5.4 – Análise de gordura e carne bovina por HR-MAS RMN	112
6 CONCLUSÃO	114
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	116
REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que pode ser aplicada em diversas áreas tais como química, engenharia, medicina, bioquímica, alimentos, petróleo, farmacêutica entre outras áreas. Na química, a RMN é uma das principais ferramentas utilizadas na determinação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, bem como em estudos de interação intermolecular, controle de qualidade, estudo da estrutura e dinâmica de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, dentre outras aplicações.^{1; 2; 3} A ampla aplicabilidade da RMN se deve às inúmeras vantagens que esta possui como, por exemplo, possibilitar a análise de amostras em diferentes estados físicos (sólido, líquido e gasoso), requer pouco ou nenhum procedimento para preparação da amostra e ser um método não destrutivo. Contudo, a maioria das aplicações da RMN em química se dá pela utilização da espectroscopia de RMN de alta resolução (RMN-AR). Para isso, são utilizados ímãs supercondutores de alta intensidade ($\vec{B}_0 > 4,7 \text{ T}$) e alta homogeneidade ($\Delta\vec{B}_0 < 0,01 \text{ ppm}$ para uma amostra de aproximadamente 200 μL). No entanto, esses instrumentos possuem como principal limitação o alto custo com líquidos criogênicos para sua manutenção, além do alto valor agregado para a sua aquisição.³

Nas últimas décadas, a RMN de baixo campo (RMN-BC) – ou de baixa resolução (RMN-BR) – que usa ímãs permanentes $\vec{B}_0 < 0,7 \text{ T}$ e de baixa homogeneidade ($\Delta\vec{B}_0 > 100 \text{ ppm}$), tem apresentado grandes avanços com relação às suas aplicações científicas e tecnológicas. Esses equipamentos com ímã permanente, além de serem mais compactos, não requerem líquidos criogênicos e possuem um custo de aquisição inferior quando comparado aos espectrômetros de RMN-AR. Por outro lado, a RMN-AR permite obter informações mais detalhadas sobre os componentes da amostra, visto que nesta área da RMN, geralmente, a interpretação dos resultados se dá pelo deslocamento químico, acoplamento *spin-spin*, dentre outros parâmetros acessíveis em espectros no domínio da frequência, os quais são obtidos pela transformada de Fourier (TF) do sinal *Free Induction Decay* (FID). Informações dessa natureza não são obtidas por equipamentos de RMN-BC, pois, eles não possuem resolução suficiente para analisar informações no domínio da frequência, sendo assim, suas medições geralmente são baseadas no domínio do tempo, por isso, esses tipos de equipamentos podem ser denominados também de RMN no domínio do tempo (RMN-DT). Neste trabalho foi adotada a denominação de RMN-DT para se referir a esse tipo de equipamento, visto que o foco deste estudo foi em medições realizadas no domínio do tempo.

Na RMN-DT, a maioria dos estudos é realizada com base na intensidade do sinal do FID ou eco de *spin*, no coeficiente de difusão (D) e nos tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Usualmente, as mensurações destes tempos de relaxação são realizadas por técnicas unidimensionais (1D). A relaxação longitudinal é normalmente determinada pelo método Inversão Recuperação (IR)⁴ ou Saturação Recuperação (SR)⁵, enquanto que a mensuração da relaxação transversal é feita por meio do método Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)⁶. Estudos quantitativos e qualitativos relacionados à constante de tempo T_2 são muito comuns devido à técnica CPMG ser uma medida rápida. Por outro lado, a mensuração da constante de tempo T_1 não é usual devido ao longo tempo de análise requerido pelo método. Entretanto, a constante de tempo T_1 é interessante para o estudo de sistemas com componentes que apresentam T_2 iguais ou semelhantes e T_1 distintos. Além disso, a constante de tempo T_1 tem demonstrado potencial para a análise do grau de reticulação polimérica em função da temperatura.⁷ Esse e outros motivos têm impulsionado o desenvolvimento de técnicas alternativas, aos métodos IR e CPMG, que visam à determinação rápida de T_1 ou a determinação de ambas as constantes de tempo de relaxação em um único experimento.^{8; 9; 10;}

11

Os métodos provenientes da condição CWFP (*Continuous Wave Free Precession*): CWFP e CP-CWFP (Carr-Purcell-CWFP), com e sem alternância de fase, são métodos alternativos as técnicas CPMG e IR que possibilitam obter ambas as constantes de tempo de relaxação em um único experimento.^{12; 13} Todavia, a exatidão dos valores das constantes de tempo de relaxação, mensurados por essas sequências de pulsos, está vinculada ao tempo morto de cada equipamento. Assim, espectrômetros com tempo morto curto geram resultados mais confiáveis que os com tempo morto longo. Além disso, após a aquisição do sinal é necessário utilizar expressões matemáticas para determinação das constantes de tempo T_1 e T_2 .

Sequências de pulsos bidimensionais (2D) também são de grande interesse na área de RMN-DT, visto que elas correlacionam às informações de T_1 e T_2 ou T_2 e D ou ainda T_1 e D permitindo obter maiores informações sobre o sistema em estudo do que os métodos 1D. A utilização de métodos 2D na RMN-DT tem se tornado mais acessível nas últimas décadas devido ao estabelecimento de bases teóricas que simplificaram o tratamento das matrizes de dados resultantes desses tipos de sequências de pulsos.¹⁴ Entretanto, apesar deste progresso, a dimensão de aquisição das sequências de pulsos de correlação T_1 - T_2 ainda é comumente realizada pela técnica CPMG, visto que, aquisições pela dimensão de T_1 utilizando os métodos IR ou SR, geralmente, requerem longo tempo de experimento. A fim de melhorar a eficiência das sequências multidimensionais na RMN-DT muitas pesquisas têm sido desenvolvidas e

alguns métodos bidimensionais (2D) ou *pseudo* 2D rápidos têm sido propostos.^{11; 15; 16} Apesar destas sequências de pulsos terem proporcionado uma redução considerável nos tempos de experimentos, a maioria dessas técnicas geralmente são compostas por sequências de pulsos de difícil implementação e/ou necessitam de complexos tratamentos matemáticos para processar os dados.

A baixa razão sinal-ruído (S/R) também é um desafio em análises de RMN-DT tanto em análises uni quanto multidimensionais principalmente em dados que são analisados pelo método de inversão pela transformada de Laplace (ILT- *Inverse Laplace Transform*). Song e colaboradores (2002) demonstraram correlação direta entre a S/R e a resolução espectral do espectro obtido por ILT. Os autores mostraram com dados teóricos que a separação da distribuição dos tempos de relaxação de amostras com multicomponentes é dependente da S/R.¹⁷ Na literatura também é sugerido que sinais 2D com baixa S/R passem por pré-processamentos para aumentar a S/R antes de inverter os dados.¹⁸ Apesar de ser bastante comum a utilização de filtros para melhorar a S/R ou resolução em RMN-AR estes procedimentos não são muito usados em RMN-DT. Normalmente é utilizado apenas o aumento do número de *scans* dos experimentos para o aumento da S/R. Contudo, esse recurso aumenta o tempo experimental, pois, é necessária uma grande quantidade de *scans* para melhorar a S/R, já que $S/R \propto (n^\circ \text{ de scans})^{1/2}$.

Considerando o exposto, esse trabalho buscou aprofundar os estudos provenientes da condição CWFP, a fim de, desenvolver sequências de pulsos rápidas para mensurar a constante de tempo T_1 e a correlação entre ambos os tempos de relaxação com tempo de experimento inferior aos dos métodos IR e IR-CPMG, respectivamente. Além disso, um dos propósitos deste trabalho foi utilizar a sequência de pulso CWFP como dimensão direta e indireta em sequências de pulsos 2D. Ainda, a fim de contornar as adversidades da RMN-DT em relação ao ruído, alguns métodos que visam reduzir o ruído, sem aumentar o tempo de aquisição, foram implementados e seus limites e efeitos ILT foram demonstrados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fundamentos básicos da RMN

O fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), assim como outras técnicas espectroscópicas, ocorre pela interação da matéria com a radiação eletromagnética. Em especial, na RMN, essa interação somente ocorre quando núcleos atômicos que apresentam *spin* nuclear resultante (I) diferente de zero são submetidos a um campo magnético. Estes núcleos podem ser comparados classicamente a uma esfera carregada positivamente que gira em torno do seu próprio eixo, conseqüentemente, devido a esse giro surgem nestes núcleos momento angular ($\vec{I}$) e momento magnético nuclear ($\vec{\mu}_n$). Conforme é mostrado na Equação 1, a razão entre o $\vec{\mu}_n$ e o $\vec{I}$ é uma constante que é denotada de constante/razão magnetogírica (γ), sendo está uma propriedade intrínseca de cada isótopo.^{19; 20; 21; 22}

$$\vec{\mu}_n = \gamma \vec{I} \quad \text{Equação 1}$$

Assim, o $\vec{\mu}_n$ confere ao núcleo propriedades magnéticas e conseqüentemente é a responsável pelas interações do núcleo com o campo magnético estático ($\vec{B}_0$). Esta interação provoca a divisão dos níveis energéticos degenerados em $2I+1$ níveis de energias, sendo este desdobramento energético denominado de Efeito Zeeman. A energia que de cada nível energético é quantizada e está relacionada com a interação do $\vec{\mu}_n$ com $\vec{B}_0$, conforme descrito na Equação 2.

$$E = -\vec{\mu}_n \cdot \vec{B}_0 = -\gamma m \hbar B_0 \quad \text{Equação 2}$$

Onde m é a relação entre o *spin* nuclear e o momento magnético a qual gera uma série de estados quânticos observáveis regidos por $m = -I, -I+1, \dots, I-1, I$. Por exemplo, para $I = 1/2$ haverá dois níveis energéticos: $m = -1/2$ e $1/2$. A Figura 1 mostra o desdobramento energético para o núcleo de ^1H , cujo *spin* nuclear é $1/2$. Nesta figura é possível observar que na ausência do $\vec{B}_0$ ($\vec{B}_0=0$) todos os estados energéticos dos *spins* nucleares são iguais. Já na presença do $\vec{B}_0$ ($\vec{B}_0>0$) surgem dois estados energéticos: α – estado de menor energia – e β – estado de maior energia.

Figura 1 – Representação do diagrama de energia sobre efeito do campo magnético para $spin\ I=1/2$.

Fonte: figura adaptada da referência¹⁹.

Após a separação dos níveis energéticos a redistribuição dos *spins* entre o nível de menor (N_α) e maior energia (N_β) é regido pela equação de distribuição de Boltzmann (Equação 3), onde k_B é denominada de constante de Boltzman e equivale a $1,3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$. Por meio desta equação é possível constatar que dois fatores afetam diretamente a distribuição de população entre os níveis energéticos: a temperatura (T) e a diferença de energia entre os níveis energéticos (ΔE). Assim, a sensibilidade da RMN pode ser aumentada pela redução da temperatura e/ou pelo aumento da intensidade de $\vec{B}_0$.^{19; 20; 21}

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)} \quad \text{Equação 3}$$

Esse pequeno excesso populacional no nível de menor energia é o que permite realizar experimentos via RMN. Classicamente, esse pequeno excesso populacional no nível de menor energia é descrito pelo excesso de momentos magnéticos nucleares alinhados a favor de $\vec{B}_0$ (eixo z). A somatória destes gera uma magnetização resultante ($\vec{M}$) conforme mostrado na Equação 4. $\vec{M}$ também pode ser denominada de magnetização no equilíbrio térmico.^{19; 21}

$$\vec{M} = \sum \vec{\mu}_n \quad \text{Equação 4}$$

A interação dos $\vec{\mu}_n$ com $\vec{B}_0$, faz com que $\vec{M}$ sofra um torque e comece a executar um movimento de precessão em torno da direção de $\vec{B}_0$. A Figura 2 demonstra o esquema deste movimento. A frequência com que o movimento de precessão é realizado é denominado de frequência de Larmor (ν_0) e é dado pela Equação 5. Nesta, ω_0 é a frequência angular de precessão.^{19; 20; 21}

$$\nu_0 = \frac{\gamma \vec{B}_0}{2\pi} \quad \text{ou} \quad \omega_0 = \gamma \vec{B}_0 \quad \text{Equação 5}$$

Figura 2 – Representação vetorial do movimento de precessão

Fonte: figura adaptada da referência²¹.

2.1.1 Efeito do pulso de radiofrequência (rf)

Para que seja possível a realização de experimentos via RMN, assim como em outras espectroscopias, é necessário que haja um mecanismo de interação entre a radiação eletromagnética e o sistema em estudo. Para isso, na RMN é aplicado um campo magnético oscilante ($\vec{B}_1$), perpendicular a $\vec{B}_0$, o qual varia periodicamente com uma frequência angular ω_1 , e para que haja uma interação coerente e eficaz entre $\vec{B}_1$ e $\vec{M}$ é necessário que ω_1 seja igual a ω_0 . Ou seja, a frequência de $\vec{B}_1$ precisa estar em ressonância com o sistema em estudo. O campo magnético oscilante gera um torque em $\vec{M}$, o que gera uma rotação desta magnetização do eixo z para o plano xy. O ângulo de rotação de $\vec{M}$ (θ) depende do tempo de duração da aplicação do B_1 (t_p) e da intensidade do $\vec{B}_1$, conforme a Equação 6. Experimentalmente, a aplicação do $\vec{B}_1$ é comumente descrita como a aplicação de um pulso de radiofrequência (rf) de θ graus.^{19; 21}

$$\theta = \omega_1 t_p = \gamma \vec{B}_1 t_p \quad \text{Equação 6}$$

Uma vez cessada a irradiação de $\vec{B}_1$ ocorre o retorno dos *spins* nucleares ao estado inicial de equilíbrio térmico. O processo que proporciona este retorno é denominado de relaxação magnética nuclear. Este processo ocorre por dois mecanismos distintos,

independentes e simultâneos, sendo estes denominados de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Os fundamentos destes mecanismos são abordados nas seções 2.1.2 e 2.1.3.

O retorno da magnetização ao seu estado inicial de equilíbrio gera uma corrente elétrica que é induzida em uma bobina de detecção, dentro da qual a amostra se encontra, sendo esta corrente correspondente ao sinal obtido via RMN denominado de FID (*Free Induction Decay*).

2.1.2 Relaxação longitudinal (T_1)

A relaxação longitudinal, denominado de T_1 , é um processo que envolve a troca de energia dos *spins* com a rede, por isso também é denominado de relaxação *spin*-rede. Assim, este processo de relaxação ocorre por transferência de energia dos *spins* para os campos locais gerados pela rede. Desta maneira, para que este processo seja eficiente, é necessário que as flutuações dos campos locais sejam na ordem da frequência de *Larmor*. Caso essas flutuações sejam superiores ou inferiores, a esta frequência, a transferência de energia para a vizinhança será mais lenta e o tempo de relaxação T_1 será maior.

A relaxação longitudinal descreve a evolução temporal da magnetização na direção do campo magnético externo (eixo z), até a recuperação da condição inicial em equilíbrio: $\vec{M} = M_0 \hat{z}$, ou seja, a magnetização no eixo z (M_z) é igual a M_0 . Desta forma, se a constante de tempo T_1 for longa, o tempo de experimento por RMN também será longo, já que é necessário esperar o retorno da magnetização ao estado de equilíbrio antes de realizar novos experimentos ou até mesmo entre *scans*. Este tempo de espera, para que 99,9% da magnetização retorne ao equilíbrio, é da ordem de aproximadamente $5T_1$.^{19; 21} Geralmente nos espectrômetros este tempo de espera, entre *scans* e/ou experimentos, é denominado *recycle delay* (*RD*), por isso, neste trabalho, utilizaremos a sigla *RD* para se referir a este tempo de espera.

Existem inúmeras sequências de pulsos para mensurar o valor de T_1 , entretanto a mais utilizada, e que é considerada referência para medir esta constante de tempo, é a Inversão Recuperação (IR).⁴ O esquema da sequência de pulsos deste método é apresentado na Figura 3 (a). Nesta figura é possível observar que o método IR é composto por um pulso de rf de 180° que gira a magnetização que estava no equilíbrio térmico (M_0) em 180° , deslocando M_0 para $-M_0$. Após este pulso, espera-se um tempo, denominado de tempo de recuperação (τ_r). Neste intervalo, a magnetização tende a retornar gradualmente ao estado de equilíbrio no sentido do eixo z . A magnetização resultante deste processo, ou seja, a diferença entre a magnetização que retornou ao estado inicial e a magnetização que ainda se encontra orientada em $-z$, é

determinada pela intensidade do sinal FID gerado após a aplicação de um pulso de 90° . Este experimento é repetido várias vezes variando o valor do τ_r logaritmicamente. A evolução temporal de M_z se caracteriza por um crescimento exponencial descrito pela Equação 7 e demonstrado na Figura 3 (b). Nesta figura pode-se observar que para a obtenção de cada ponto é necessária a realização de um experimento. Contudo, antes da realização de cada experimento é necessário utilizar um RD de aproximadamente $5T_1$. Como, geralmente, quando são realizados experimentos de IR não se conhece o valor de T_1 da amostra, visto que esta sequência é utilizada justamente para determinar T_1 , superestima-se o valor do RD , a fim de garantir que a maior parte da magnetização esteja no equilíbrio antes da realização do próximo experimento.

$$M_z(t = \tau_r) = M_0 \left(1 - 2e^{\left(-\frac{\tau_r}{T_1}\right)} \right) \quad \text{Equação 7}$$

Figura 3 – (a) Esquema da sequência de pulsos para o método IR, onde τ_r representa o tempo de recuperação da magnetização longitudinal. (b) intensidade do sinal de RMN obtido pelo método IR, sendo que cada ponto representa um experimento com valor de τ_r diferente.

Fonte: figura elaborada pela autora.

Outro método menos utilizado que o IR, mas também conhecido na literatura para medir T_1 é o método saturação recuperação (SR). Nesta sequência de pulsos o pulso inicial de 180° do IR é substituído por vários pulsos de 90° com fases distintas com a finalidade de saturar a magnetização longitudinal conforme é mostrado na Figura 4 (a). Com o sistema saturado, assim como o método IR, espera-se um tempo de recuperação τ_r e em seguida aplica-se um pulso de 90° e lê-se a intensidade do sinal por meio do FID. Vários experimentos são realizados para diferentes valores de τ_r . A evolução de M_z segue um crescimento exponencial conforme descrito na Equação 8 e demonstrado na Figura 4 (b). Porém, pelo método SR o sinal tem a metade da

intensidade em relação ao método IR, já que este mede a evolução temporal de M_z ser medida a partir da intensidade zero.

$$M_z(t = \tau_r) = M_0 \left(1 - e^{\left(-\frac{\tau_r}{T_1}\right)} \right) \quad \text{Equação 8}$$

No método SR não é necessário um RD de $5T_1$, pois a condição inicial da magnetização nessa sequência de pulsos é nula devido à aplicação de um conjunto de pulsos de 90° que saturam a magnetização no plano xy . Isto faz com que a técnica SR requiera menor tempo experimental que o método IR.

Figura 4 – (a) Esquema da sequência de pulsos do método SR, onde τ_r representa o tempo de recuperação da magnetização longitudinal. (b) Intensidade do sinal de RMN obtido pelo método SR, sendo que cada ponto representa um experimento com valor de τ_r diferente.

Fonte: figura elaborada pela autora.

2.1.3 Relaxação transversal (T_2)

O mecanismo que está envolvido no processo de relaxação transversal (T_2) é a perda de coerência entre os *spins*, por isso este processo de relaxação também é denominado de relaxação *spin-spin*. Neste processo ocorre a variação das componentes M_x e M_y , sendo que quando o sistema já retornou ao equilíbrio ($M_z = M_0$) estas são iguais a zero, $M_x = M_y = 0$. Esse processo ocorre via decaimento exponencial da magnetização transversal.

Entretanto, devido principalmente a não homogeneidade do campo $\vec{B}_0$, os *spins* executam o movimento de precessão com frequências ligeiramente diferentes, isto faz com que a magnetização perca coerência mais rapidamente do que se o campo fosse homogêneo. Desta forma, quando um pulso de rf de 90° é aplicado e deixa-se a magnetização retornar livremente

ao equilíbrio ocorre a formação de um decaimento de indução livre denominado de FID. Este decaimento exponencial é descrito por uma constante denominada de T_2^* . Esta é menor que T_2 e descreve o decaimento da magnetização transversal considerando a não homogeneidade do campo magnético ($\Delta \vec{B}_0$) conforme é mostrado na Equação 9.^{19; 21}

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta \vec{B}_0 \quad \text{Equação 9}$$

Desta forma, para a obtenção de valores de T_2 , é necessário a utilização de sequências de pulsos que minimizam o efeito da não homogeneidade de $\vec{B}_0$. Atualmente a sequência de pulsos CPMG é considerada como referência para medição da constante de tempo T_2 . Esta sequência de pulsos é proveniente da técnica CP, que leva o nome dos autores desta: Carr e Purcell.²³ Estes pesquisadores desenvolveram a sequência de pulsos CP aprimorando um método denominado de eco de *spin*, proposto por Erwin Hahn.²⁴ Posteriormente, o método CP foi aperfeiçoado por Meiboom e Gill, dessa forma foi estabelecida a denominação CPMG, em referência ao nome dos quatro autores Carr-Purcell-Meiboom-Gill.⁶ A Figura 5 mostra a sequência de pulsos para a técnica CPMG, em que os *spins* que se encontram inicialmente em equilíbrio térmico são alinhados ao eixo y com a aplicação de um pulso de rf de 90° . Os *spins* começam a se defasar no plano xy ao longo de um tempo $\tau/2$, gerando assim um FID. Após esse tempo $\tau/2$, uma sequência de pulso de rf de 180° são aplicados, causando a refocalização dos *spins* em $\tau, 2\tau \dots n\tau$, a partir do pulso de 90° . A intensidade do sinal do eco decai exponencialmente conforme aumenta o número de pulsos de 180° , como apresentado na Figura 5. Este decaimento é descrito pela Equação 10.^{19; 21} No decorrer do trabalho, em alguns momentos a expressão sinal CPMG foi utilizada, nesse casos, faz-se referência ao sinal/decaimento obtido com o sinal CPMG.

Figura 5 – Sequência de pulsos do método CPMG, sendo que $\tau/2$ é o tempo entre o pulso de 90° e o de 180° , τ é o tempo ao eco e n é o número de ecos.

Fonte: figura elaborada pela autora.

$$M_{xy}(t = 2n\tau) = M_0 e^{(-2n\tau/T_2)} \quad \text{Equação 10}$$

2.2 Regimes provenientes da condição SSFP e CWFP

Além dos métodos IR, SR e CPMG, outras técnicas, que visam a obtenção de informações das constantes de tempo de relaxação, têm sido desenvolvidas ao longo dos anos. Dentre elas se encontram as técnicas que são provenientes do estado estacionário (EE). A primeira constatação da condição do EE foi realizada por Bradford, em 1951, em um experimento composto por vários pulsos consecutivos, com espaçamentos entre eles na ordem do valor de T_2 .²⁵ Posteriormente, em 1958, Carr propôs uma técnica denominada de SSFP (*Steady State Free Precession*) que atingia o EE, e era composta por uma sequência de pulsos de mesma fase, duração e intensidade e separados por um tempo entre os pulsos menor do que T_2 ($\tau < T_2$).²⁶

Na condição de EE, devido ao $\tau < T_2$ ocorre a formação de duas componentes simultâneas entre dois pulsos: um FID e um eco, defasados 180° . O FID, que é gerado logo após um pulso, é oriundo da excitação da magnetização longitudinal. Já o eco, que é formado antes do próximo pulso da sequência de pulsos, é oriundo da refocalização da magnetização transversal residual. Em um estudo realizado por Freeman e Hill, em 1971, foi demonstrado por meio de uma série de experimentos a formação das duas componentes FID e eco na condição EE.²⁷ Os autores começaram os experimentos utilizando uma sequência de pulsos simples composta por dois pulsos de 90° espaçados por τ ($90^\circ - \tau - 90^\circ$ e $\tau < T_2$) e foram adicionando mais pulsos de 90° . Após a aplicação de quatro pulsos de 90° os autores comprovaram que o EE era estabelecido e neste estado começavam a ser formadas as duas componentes FID e um eco defasados 180° .

Azeredo e colaboradores mostraram, em 2000, a transição entre as sequências de pulso que utiliza $\tau \sim 5T_1$ e a sequência de pulsos SSFP, cujo $\tau \leq T_2$.²⁸ A Figura 6 demonstra esta transição utilizando pulsos de 90° espaçados por quatro valores diferentes τ , sendo que a linha tracejada indica a posição onde o pulso de 90° é aplicado. Os sinais mostrados nesta figura foram obtidos por simulação utilizando tempos de relaxação $T_1 = 200$ ms, $T_2 = 150$ ms e $T_2^* = 0,5$ ms e 5 valores de τ : $\tau = 5T_1$ (a), $\tau = T_2$ (b), $\tau = 2T_2^*$ (c) e $\tau < T_2^*$ (d) e (e). A frequência de *offset* foi igual a 5 KHz para os sinais de (a) até (d) e 3,33 KHz para o experimento (e).

Figura 6 – Sinais de RMN simulados numericamente usando $T_1 = 200$ ms, $T_2 = 150$ ms e $T_2^* = 0,5$ ms e quatro valores de τ : $\tau = 5T_1$ (a), $\tau = T_2$ (b), $\tau = 2T_2^*$ (c) e $\tau < T_2^*$ (d) e (e). A frequência de *offset* foi igual a 5 KHz para os sinais de (a) até (d) e 3,33 KHz para o experimento (e). A linha tracejada nesta figura indica a posição onde o pulso de 90° é aplicado.

Fonte: figura adaptada da referência ²⁹.

Na Figura 6 (a) é possível observar que para o valor de $\tau = 5T_1$ praticamente toda a magnetização já retornou ao estado de equilíbrio e, por isso, não é possível observar a formação de eco antes do pulso, sendo observada somente a formação do FID com amplitude máxima após o pulso. Em (b) é observado um típico regime SSFP após a aplicação de vários pulsos, onde, devido ao $T_2^* < \tau = T_2$, a intensidade do FID diminui, entretanto surge um eco de baixa intensidade, neste caso, FID e eco ainda não se sobrepõem. Por outro lado, em (c), como $T_2^* < \tau < T_2$, ocorre uma sobreposição parcial entre FID e eco. Devido à defasagem de 180° entre essas componentes no centro do FID/eco, a interferência entre estes é destrutiva. Já na Figura 6 (d), devido ao tempo entre os pulsos ser tão pequeno ($T_2 \gg \tau < T_2^*$ (0,3 ms)) ocorre a sobreposição total do FID e do eco. Esta é uma condição especial da SSFP, visto que o sinal não decai, mas sim atinge uma condição de onda contínua e por isso, esta condição foi denominada de CWFP (*Continuous Wave Free Precession*).^{29; 30; 31; 32}

Entretanto, por haver sobreposição total do FID e do eco na condição CWFP, dependendo do ângulo de precessão (ψ) a interação entre estes pode ser construtiva ou destrutiva. Uma vez que na condição de ressonância ($\psi = 0$) o FID e o eco estão defasados 180° , a interação destes nesta circunstância, ou para qualquer ângulo de precessão múltiplo par ($\psi = 2n\pi$), será destrutiva. Isto pode ser observado no caso do sinal da Figura 6 (e), onde a interação

destrutiva entre o FID e o eco devido ao deslocamento da frequência de *offset* (ν) em 3,33KHz levar à formação $\psi = 2\pi$ (em conformidade Equação 11 e utilizando nesta $\tau = 300 \mu\text{s}$). Dessa forma, é preciso combinar a ν a ser deslocada a um determinado valor de τ , de forma a se obter um ψ múltiplo ímpar de π , ou seja, a condição $\psi = (2n + 1)\pi$ deve ser satisfeita. Na Figura 6 (d) a ν é deslocada 5 KHz levando a um $\psi = 3\pi$ (em conformidade a Equação 11 utilizando $\tau = 300 \mu\text{s}$), o que gera uma interação construtiva entre FID e eco.

$$\psi = 2\pi\nu\tau = \Omega\tau \quad \text{Equação 11}$$

Buscando tornar a condição CWFP independente do deslocamento da frequência de *offset* e, conseqüentemente, independentemente do tempo entre os pulsos (τ) Monaretto et al. propuseram alternar a fase da sequência de pulsos CWFP.¹³ A Figura 7 mostra um esquema típico de uma sequência de pulsos SSSFP/CWFP, onde o $\tau = T_2$ para a condição SSFP e $T_2 \gg \tau < T_2^*$ para o regime CWFP. Nesta figura, a fase dos pulsos está representada pela letra grega ϕ , sendo que para a sequência de pulsos SSFP/CWFP tradicional, sem alternância de fase (AF), as fases dos pulsos são iguais, ou seja, $\phi_1 = \phi_2$. Por outro lado, nas sequências de pulsos com AF as fases dos pulsos estão defasadas 180° ($\phi_1 = -\phi_2$) e por esse motivo essas sequências de pulsos passaram a ser denominadas de SSFPx-x/CWFPx-x.

Figura 7 – Esquema das sequências de pulsos para o regime SSFP/CWFP, onde τ é o tempo entre os pulsos, ϕ_1 e ϕ_2 são as fases dos pulsos, θ é o ângulo do pulso, que no caso da CWFP é 90° e n é o número de vezes que os pulsos θ_{ϕ_1} e θ_{ϕ_2} são repetidos. Para as condições SSFP e CWFP $\tau = T_2$ e $T_2 \gg \tau < T_2^*$, respectivamente. Para as sequências de pulsos SSFP e CWFP $\phi_1 = \phi_2$ e para as sequências SSFPx-x e CWFPx-x $\phi_1 = -\phi_2$.

Fonte: figura elaborada pela autora.

A AF de 180° faz com que FID e eco sejam formados em fase entre dois pulsos, conforme pode ser observado na Figura 8 (b), a qual ilustra a formação do FID e do eco entre dois pulsos de 90° obtida no EE para condição SSFP sem (a) e com (b) AF utilizando $T_2 > \tau > T_2^*$. Analisando esta figura é possível afirmar que o fato de a AF gerar FID e o eco com mesma

fase na condição SSFP (Figura 8 (b)) contribui para uma interação construtiva quando ambas as componentes se sobrepõem na condição CWFP, enquanto que o oposto é observado para a sequência SSFP sem AF (Figura 8 (a)). Consequentemente, pode-se dizer que AF de 180° entre os pulsos tornou desnecessário o deslocamento da frequência de *offset* para se obter um sinal com amplitude máxima, na condição CWFP. Um estudo mais detalhado da dependência da amplitude do sinal adquirido pelo método CWFP com e sem AF em função da frequência de *offset* é apresentado na Figura 9. Para fim de simplificação, em muitos casos, no decorrer do trabalho é utilizada a expressão sinal CWFP ao invés de sinais adquiridos utilizando o método CWFP.

Figura 8 – Expansão da região do estado estacionário (EE) da componente do sinal real obtido para uma solução contendo íons Mn^{2+} 1 mM por meio das sequências de pulsos (a) SSFP e (b) SSPx-x para um $T_2 > \tau > T_2^*$. As linhas tracejadas referem-se à aplicação de pulsos de rf de 90° .

Fonte: figura adaptada da referência ¹³. Com permissão da Elsevier.

A Figura 9 mostra a dependência da amplitude do sinal CWFP (a) e CWFPx-x (b) em relação a frequência de *offset* para $\tau = 300 \mu s$ (linha contínua) e $\tau = 200 \mu s$ (linha tracejada). Nesta figura é possível confirmar que a principal diferença entre as sequências de pulsos CWFP com e sem AF é a intensidade do sinal na condição de ressonância (frequência de *offset* = 0), demonstrando que a sequência de pulsos CWFPx-x não necessita o deslocamento da frequência de *offset* para se obter um sinal com amplitude máxima. ^{13; 32} Além disso, é possível notar que a distância entre dois pontos de amplitude mínima é proporcional ao inverso do τ ($\Delta\nu = 1/\tau$). Isto comprova que o τ afeta na obtenção da amplitude máxima do sinal na condição CWFP conforme já foi apresentado na Equação 10. Assim, é possível afirmar que as sequências de pulsos com AF, por não necessitarem do deslocamento da frequência de *offset* e são independentes do τ na condição de ressonância.

Figura 9 – Amplitude do sinal (a) CWFP e (b) CWFPx-x obtidos por simulação utilizando $\tau = 300 \mu\text{s}$ (linha contínua) e $\tau = 200 \mu\text{s}$ (linha tracejada).

Fonte: figura adaptada da referência¹³. Com permissão da Elsevier.

2.2.1 Determinação das constantes de tempo T_1 e T_2 utilizando técnicas do EE

Em 1977, Kronenbitter e Schwenk propuseram a utilização da técnica SSFP para determinação das constantes de tempo de relaxação T_1 e T_2 . Para confirmar tal proposição foram realizados vários experimentos com a sequência de pulsos SSFP variando a largura dos pulsos a fim de encontrar um ângulo que possibilitasse obter o maior valor da razão $|M_{EE}|/M_0$ (onde $|M_{EE}|$ é o módulo da amplitude da magnetização no EE e M_0 é a amplitude da magnetização inicial). O ângulo que satisfaz essa condição foi denominado pelos autores de ângulo ótimo ($\theta_{\text{ótimo}}$). Com estes dois parâmetros, $|M_{EE}|/M_0$ e $\theta_{\text{ótimo}}$, e utilizando a Equação 12 a razão entre T_1 e T_2 (T_1/T_2) foi determinada. Utilizando o $\theta_{\text{ótimo}}$ encontrado, outro experimento foi realizado a fim de determinar a constante de tempo T^* (Equação 13), a qual descreve o decaimento do sinal SSFP até o EE. Por meio desta constante foi mensurada a relação T_1+T_2 . As duas relações: T_1+T_2 e T_1/T_2 foram combinadas de forma a se obter os valores das constantes de tempo de relaxação T_1 e T_2 .

$$\frac{|M_{EE}|}{M_0} = \frac{|\sin\theta|\sqrt{2-2\cos\psi}}{(1+\cos\theta)(1-\cos\psi)+(1-\cos\theta)2T_1/T_2} \quad \text{Equação 12}$$

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

Em 2005, Venâncio e colaboradores também propuseram a determinação das constantes de tempo T_1 e T_2 utilizando o regime de EE, mas utilizando a sequência de pulsos proveniente da condição CWFP e utilizando um único experimento.¹² Estes autores também utilizaram as Equações 12 e 13 propostas por Kronenbitter e Schwenk, entretanto, o θ destas equações foi substituído por 90° , valor corresponde à largura dos pulsos da sequência de pulsos CWFP. Após esta substituição, as Equações 12 e 13 se simplificam gerando as Equações 14 e 15, respectivamente. Estas duas últimas equações foram rearranjadas a fim de se obter equações que fornecessem diretamente os valores de T_1 e T_2 conforme expressos nas Equações 16 e 17.

$$|M_{EE}| = \frac{M_0 T_2}{T_1 + T_2} \quad \text{Equação 14}$$

$$T^* = \frac{2T_1 T_2}{T_1 + T_2} \quad \text{Equação 15}$$

$$T_1 = \frac{T^* (\pi/2)/2}{(|M_{EE}|/M_0)} \quad \text{Equação 16}$$

$$T_2 = \frac{T^* (\pi/2)/2}{1 - (|M_{EE}|/M_0)} \quad \text{Equação 17}$$

As Equações 16 e 17 são dependentes dos parâmetros M_0 , $|M_{EE}|$ e T^* , os quais são obtidos pelo sinal CWFP conforme pode ser comprovado na Figura 10. Nesta figura, é possível notar que o M_0 , o qual representa a intensidade da magnetização no equilíbrio térmico, está no início do sinal CWFP, visto que ele é o primeiro ponto do sinal CWFP e por isso ele é obtido no primeiro regime do sinal CWFP. Este parâmetro é o responsável pelas ocasionais inexatidões dos valores das constantes T_1 e T_2 já que seu valor é afetado pelo tempo morto dos espectrômetros: quanto maior o tempo morto do equipamento menor será o valor de M_0 e maiores serão as inexatidões dos valores das constantes de relaxação. Na Figura 10 também é mostrado que o sinal CWFP é dividido em três regimes distintos, sendo que cada regime é representado por uma cor diferente. O primeiro regime é simbolizado pela cor cinza escuro e representa um estado onde ocorre oscilação do sinal devido à alternância na amplitude do sinal entre os pulsos pares e ímpares. O segundo estágio do sinal CWFP é caracterizado por um estado quase estacionário (EQE – representado pela cor cinza claro na Figura 10), o qual progride até que a magnetização atinja o estado estacionário (EE), sendo este o terceiro e último estágio do sinal CWFP representado pela cor branca na Figura 10. O parâmetro $|M_{EE}|$ representa

o módulo da amplitude da magnetização neste último estágio, enquanto a constante de tempo T^* descreve o decaimento do EQE ao EE.

Figura 10 – Sinal real obtido pela sequência de pulsos CWFP para uma solução contendo íons de Mn^{2+} 1 mM. Neste é mostrado o regime de transição em cinza escuro, o estado quase estacionário (EQE) em cinza claro e o estado estacionário em branco. As abreviações M_0 , T^* e $|M_{EE}|$ referem-se à magnetização inicial, a constante de decaimento do sinal do EQE ao EE e ao módulo da amplitude da magnetização no EE, respectivamente.

Fonte: figura elaborada pela autora.

Um dos pontos negativos da técnica CWFP é quando esta é empregada para análise de amostras cujo $T_1 \sim T_2$. Caso em que, o sinal obtido por esta sequência de pulsos apresenta uma baixa faixa dinâmica do EQE ao EE, dificultando o ajuste do decaimento, já que este fica susceptível à razão sinal ruído (S/R), conforme pode ser observado na Figura 12 (a) – sinal com $T_1 \sim T_2$. A fim de solucionar este problema foi desenvolvida a sequência de pulsos CP-CWFP (Carr-Purcell - Continuous Wave Free Precession) que também atinge a condição CWFP. O esquema desta sequência de pulsos está apresentado na Figura 11, sendo que para este caso todas as a fase dos pulsos são em x, ou seja, ϕ , ϕ_1 e ϕ_2 são iguais a x e $\theta = 90^\circ$.

A vantagem da técnica CP-CWFP em relação à sequência CWFP, é que ela apresenta uma faixa dinâmica maior entre EQE e o EE do que a CWFP na condição $T_1 \sim T_2$, conforme pode ser comprovado pela Figura 12 (b) – sinal com $T_1 \sim T_2$.³³ Porém, quando $T_1 \gg T_2$, a sequência de pulsos CWFP é a mais indicada, já que nessa condição, a CP-CWFP é que apresenta uma baixa faixa dinâmica do EQE ao EE, conforme pode ser comprovado analisando o sinal com $T_1 \gg T_2$ na Figura 12 (a) e (b).

Figura 11 – Esquema das sequências de pulsos para o regime CP-CWFP onde τ é o tempo entre os pulsos ($T_2 \gg \tau < T_2^*$), ϕ , ϕ_1 e ϕ_2 são as fases dos pulsos, $\theta = 90^\circ$ e n é o número de vezes que os pulsos θ_{ϕ_1} e θ_{ϕ_2} são repetidos. Para a sequência de pulsos CP-CWFP $\phi = \phi_1 = \phi_2$ e para a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} $\phi = \phi_1 = -\phi_2$.

Fonte: figura elaborada pela autora.

Figura 12 – Sinais obtidos com as sequências de pulsos CWFP (a), CP-CWFP (b) e CP-CWFP_{x-x} (c) para soluções contendo íons de Cu^{2+} 10 mM ($T_1 \sim T_2$) e Mn^{2+} 1 mM ($T_1 \sim 4T_2$).

Fonte: figura adaptada da referência ²⁹.

Contudo, no trabalho de Monaretto et al., foi demonstrado que a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} além de não ser dependente do deslocamento da frequência de *offset* e do τ , conforme já mostrado anteriormente, também apresenta uma ampla faixa dinâmica do EQE ao EE em ambas as condições: $T_1 \sim T_2$ e $T_1 \gg T_2$, conforme mostrado na Figura 12 – (c). Assim a CP-CWFP_{x-x} passou a substituir as outras duas sequências: CWFP e CP-CWFP.¹³ O esquema da sequência de pulso CP-CWFP_{x-x} é o mesmo mostrado para a sequência CP-CWFP, na Figura

11. Entretanto, no caso da CP-CWFP_{x-x} as fases são alternadas em 180°, ou seja, $\phi = \phi_1 = -\phi_2$. Além disso, a Figura 13 mostra que não só o sinal CP-CWFP_{x-x} (sinal CP-CWFP_{x-x} refere-se ao sinal adquirido pelo método CP-CWFP_{x-x} – sinal preto) como também o CP-CWFP (sinal CP-CWFP refere-se ao sinal adquirido pelo método CP-CWFP – sinal azul), são constituídos pelos três regimes, como é o sinal CWFP e, desta forma, estes também originam os três parâmetros requeridos para calcular T_1 e T_2 : T^* , M_0 e $|M_{EE}|$. Porém, nas sequências CP-CWFP e CP-CWFP_{x-x} o T^* descreve o crescimento exponencial do sinal do EQE ao EE ao invés do decaimento descrito na CWFP

Figura 13 – Componente real dos sinais obtido pelas sequências de pulsos CP-CWFP e CP-CWFP_{x-x} para uma solução contendo íons de Cu^{2+} 10 mM. Nestes sinais é mostrado o regime de transição em cinza escuro, o estado quase-estacionário (EQE) em cinza claro e o estado estacionário em branco. As abreviações M_0 , T^* e $|M_{EE}|$ referem-se à magnetização inicial, à constante de crescimento exponencial do sinal do EQE, ao EE e ao módulo da amplitude da magnetização no EE, respectivamente.

Fonte: figura elaborada pela autora.

2.3 Experimentos bidimensionais em RMN-DT

Outra forma de mensurar as constantes de tempo de relaxação é por meio de experimentos bidimensionais (2D), os quais têm se tornado cada vez mais populares na área de RMN-DT, pois, eles possibilitam obter mais informações sobre o sistema que experimentos unidimensionais (1D). Nestas sequências de pulsos 2D os dados são adquiridos em uma série de experimentos 1D, sendo que a sequência pela qual a aquisição do sinal é realizada é considerada a dimensão direta. Geralmente, nesta dimensão são utilizadas sequências de pulsos de experimento único, como, por exemplo, a CPMG. Já a dimensão indireta é resultante da acumulação de informações dos múltiplos experimentos, nos quais ocorre a variação de um determinado parâmetro relacionado à sequência de pulsos indireta.¹⁸

Em experimentos 2D em RMN-DT comumente ocorre a correlação entre as constantes de tempo de relaxação ou entre uma das constantes de relaxação com a difusão (D). Alguns exemplos de experimentos de correlação 2D incluem: T_1 - T_2 ³⁴, T_2 - T_2 ^{35; 36} e D - T_2 ³⁷. Neste trabalho é dada uma ênfase maior para as sequências de pulsos que determinam a correlação T_1 - T_2 , já que sequências desta natureza foram um dos objetos de estudo deste trabalho.

Experimentos 2D de correlação T_1 - T_2 têm sido amplamente aplicados para o estudo de produtos lácteos^{38; 39}, rochas reservatório^{37; 40}, sistemas catalíticos⁴¹, interação poro-água em cimento⁴² entre outras aplicações. As correlações T_1 - T_2 , nesses estudos, serviram para discriminar diferentes espécies químicas presentes em um sistema, nos quais os dados dos tempos de relaxação T_1 e T_2 sozinhos não conseguiriam proporcionar adequada distinção. Ainda, no estudo de rochas a correlação T_1 - T_2 possibilita caracterizar a geometria dos poros das rochas.³⁷ Além disso, experimentos de correlação T_1 - T_2 também permitem determinar a T_1/T_2 , o qual pode ser empregada para estudar forças de interação de superfície entre líquidos confinados em poros de matrizes sólidas e também como indicador de molhabilidade.^{11; 40; 41}

As sequências de pulsos mais comuns que têm sido usadas para a determinação da correlação entre as constantes de tempo T_1 - T_2 são IR-CPMG³⁴ e SR-CPMG.^{43; 44} Os esquemas destas sequências de pulsos são mostrados na Figura 14 (a) e (b), respectivamente, onde é possível notar a primeira sequência que compõe esses métodos 2D é a IR em (a) ou SR em (b), sendo esta a dimensão indireta destes métodos. Já a dimensão direta de ambos os métodos é gerada pela sequência de pulsos CPMG, ou seja, os sinais são adquiridos pela sequência de pulsos CPMG.

A Figura 15 (a) e (b) ilustra os sinais obtidos pelas sequências de pulsos IR-CPMG e SR-CPMG, respectivamente. Nesta figura é possível observar que o sinal de ambos os métodos 2D são compostos por vários sinais CPMG, os quais são ilustrados por cores diferentes. Cada sinal CPMG representado na Figura 15 (a) e (b) foi obtido em experimentos distintos utilizando diferentes de tempo de recuperação (τ_r), na sequência de pulsos IR (a) ou SR (b), sendo que a variação dos valores de τ_r é logarítmica e compreende uma faixa de valores satisfatória para determinação do tempo de relaxação T_1 . Dessa forma, a informação de T_1 , gerada pelo método IR ou SR, é obtida indiretamente pela modulação da intensidade do sinal do eco adquirido na sequência de pulsos CPMG, conforme demonstra a Figura 15 pelas diferentes intensidades do sinal CPMG, tanto no método IR-CPMG (a) quanto no SR-CPMG (b). Os mapas 2D obtidos com os sinais adquiridos pelos métodos IR-CPMG e SR-CPMG são mostrados na Figura 15 (c) e (d), respectivamente.

Figura 14 – Esquema da sequência de pulsos 2D IR-CPMG (a) e SR-CPMG (b). Nestas n é o número de vezes que o pulso de 180° é repetido, τ é o tempo entre os ecos do método CPMG e τ_r é o tempo de recuperação na sequência de pulsos IR e SR.

Fonte: figura elaborada pela autora.

Figura 15 – Sinais resultantes das sequências de pulsos IR-CPMG (a) e SR-CPMG (b) e seus respectivos mapas 2D em (c) e (d). Tais sinais foram simulados considerando-se um sistema composto por três componentes com $T_1 = T_2$, cujos valores são iguais a 1.200, 600 e 100 ms. Estes sinais foram simulados sem ruído e os mapas foram obtidos pelo método de processamento FLI utilizando um $\alpha = 0,1$.

Fonte: figura elaborada pela autora.

2.4 – Transformada inversa dos dados experimentais

2.4.1 – Inversão de dados unidimensionais

Quando um sistema com mais de uma componente é analisado por experimentos de relaxação obtém-se um decaimento ou crescimento exponencial resultante, o qual descreve a combinação de funções exponencial que contêm os tempos de relaxação das componentes que compõem o sistema. A Equação 18 demonstra as componentes dos tempos de relaxação T_2 associadas a um sistema com j componentes. Na referida equação, $m(t_i)$ representa o valor de magnetização medido em cada instante de tempo t_i (onde i representa cada adquirido experimentalmente), $f(T_2^j)$ representa a amplitude para cada componente T_2 e ϵ_i é o ruído associado a cada ponto experimental.⁴⁵

$$m(t_i) = \sum_{j=0}^n f(T_2^j) e^{-t_i/T_2^j} + \epsilon_i \quad \text{Equação 18}$$

A Equação 18 na forma contínua assemelha-se à transformada de Laplace (*Laplace transform – LT*):

$$m(t) = \int_{T_{2\min.}}^{T_{2\max.}} f(T_2) e^{-t/T_2} dT_2 + \epsilon_i \quad \text{Equação 19}$$

Como consequência desses fatos, é comum encontrar na literatura que o procedimento matemático para se obter a distribuição dos tempos de relaxação, $f(T_2)$, é chamado de transformada inversa de Laplace (*Inverse Laplace Transform – ILT*).¹⁷ Contudo, a equação 19 pertence ao grupo das integrais de Fredholm (*Fredholm Integral – FI*) de primeiro tipo:

$$m(t) = \int k(t, x) f(x) dx + \epsilon_i \quad \text{Equação 20}$$

Por esse motivo, também é comum encontrarmos na literatura que a distribuição dos tempos de relaxação T_1 e T_2 pode ser obtida pela inversão das FI (*Inverse of Fredholm Integral – IFI*). Na FI, Equação 20, $k(t, x)$ é chamada de função núcleo. Para o experimento CPMG, x corresponde a T_2 e k a e^{-t/T_2} . A FI descreve também os sinais obtidos pelos experimentos IR e SR utilizando a função núcleo adequada conforme mostra a Tabela 1. Assim, A IFI também é comumente utilizada para determinação da distribuição dos tempos de relaxação T_1 .^{18; 46}

Tabela 1 - Funções núcleo para experimentos de correlação dos tempos de relaxação T_1 e T_2 .

<i>Experimento (sequência de pulsos)</i>	<i>Função núcleo ($k(t, t_1$ ou $t_2)$)</i>
<i>CPMG</i>	$\exp\left\{-\frac{t}{T_2}\right\}$
<i>IR</i>	$1 - 2\exp\left\{-\frac{t}{T_1}\right\}$
<i>SR</i>	$1 - \exp\left\{-\frac{t}{T_1}\right\}$

A FI pode ser escrita de forma matricial, conforme mostra a Equação 21. Nesta, os vetores $\vec{m}$, $\vec{f}$ e $\vec{\epsilon}$ representam $f(x)$ e ϵ_i e a matriz $\overline{K_0}$ representa a função núcleo $k(t, x)$.

$$\vec{m} = \overline{K_0} \cdot \vec{f} + \vec{\epsilon} \quad \text{Equação 21}$$

Apesar de ser chamado de ILT ou IFI, a determinação das distribuições dos tempos de relaxação, T_1 ou T_2 é realizada pelo procedimento matemático de minimização do erro quadrático (χ^2) descrito na equação 22.^{18; 45} Dessa forma, a determinação de $\vec{f}$ é realizada por um método de ajuste e não realmente pelo método de ILT ou IFI.

$$\chi^2 = \|\vec{m} - \vec{f}\overline{K_0}\|^2 \quad \text{Equação 22}$$

Contudo, o ajuste multiexponencial é um problema mal posto, pois qualquer pequena alteração nos dados adquiridos pode ocasionar grandes alterações nos resultados de $\vec{f}$.⁴⁵ Diante de tal situação, podem ser empregados métodos de regularização (ou penalidade), a fim de tornar a solução mais estável. Em RMN, normalmente são aplicadas regularizações para obter $\vec{f}$ positivo e com um formato suave.

Um método de regularização usualmente empregado para tratar dados de RMN é o proposto por Tikhonov. Este método é dependente de um parâmetro de regularização (α), o qual precisa ser ajustado a valores ótimos ($\alpha_{\text{ótimo}}$), de forma a equilibrar o erro dos mínimos quadrados e permitir obter um resultado que seja ao mesmo tempo suavizado e preciso.^{18; 45} A otimização deste parâmetro pode ser feita arbitrariamente pelo usuário, quando o sistema em estudo é conhecido, ou por meio de recursos matemáticos. No caso de determinação do α por recursos matemáticos, há inúmeros métodos, entre os quais os mais utilizados são: curva-L,

GCV (*Generalised Cross-Validation*) e BRD (Buter, Reeds e Dawson).^{18; 47} Há outros métodos de regularização também utilizados na RMN, os quais, diferentemente do método Tikhonov, não possuem o parâmetro de regularização α , como por exemplo o método de máxima entropia.^{18; 48}

2.42 – Inversão de dados bidimensionais

O conjunto de dados obtidos com os experimentos 2D T_1 - T_2 , T_2 - T_2 ou D- T_2 são descritos pela integral de Fredholm bidimensional de primeiro tipo, conforme demonstra a Equação 23. Nesta equação, $M(t_1, t_2)$ representa os dados 2D adquiridos, $f(x, y)$ representa a distribuição bidimensional dos tempos de relaxação ou coeficiente de difusão a serem determinados, $\epsilon(t_1, t_2)$ descreve o ruído experimental e $k_1(t_1, x)$ e $k_2(t_2, y)$ são as equações núcleo que descrevem o comportamento do sinal na dimensão direta e indireta, respectivamente.^{14; 18; 34} Para o caso dos experimentos IR-CPMG e SR-CPMG os parâmetros x e y representam as constantes de tempo T_2 e T_1 , e $k_1(t_1, x)$ e $k_2(t_2, y)$ são substituídos pelas equações apresentadas na Tabela 1 para a sequência de pulsos CPMG e IR/SR, respectivamente.^{18; 45}

$$M(t_1, t_2) = \iint k_1(t_1, x) f(x, y) K_2(t_2, y) dx dy + \epsilon(t_1, t_2) \quad \text{Equação 23}$$

A Equação 23 na forma discreta pode ser descrita como multiplicações de matrizes, conforme é mostra a Equação 24. Onde $\bar{M}$ e $\bar{E}$ são as matrizes referentes à $M(t_1, t_2)$ e $\epsilon(t_1, t_2)$, respectivamente, e as matrizes $\bar{F}$, $\bar{K}_1$ e $\bar{K}_2$ são as versões discretas de $k_1(t_1, x)$, $k_2(t_2, x)$ e $f(x, y)$, respectivamente. As Equações 25 a 29 mostram as estruturações genéricas para as matrizes $\bar{M}$, $\bar{E}$, $\bar{F}$, $\bar{K}_1$ e $\bar{K}_2$. As matrizes dos dados experimentais ($\bar{M}$ – Equação 25) e do ruído ($\bar{E}$ – Equação 26) apresentam dimensão de $n \times m$, sendo que as linhas representam a dimensão direta (n) e as colunas (m) a dimensão indireta. $\bar{F}$ (Equação 27) é geralmente escolhida como uma matriz quadrada que geralmente apresenta uma dimensão 100×100 ($i \times j$). As matrizes núcleo $\bar{K}_1$ (Equação 28), $\bar{K}_2$ e transposta ($\bar{K}_2^T$) (Equação 29) são estruturadas de acordo com as dimensões direta e indireta, respectivamente e com a matriz $\bar{F}$. Assim, a matriz $\bar{K}_1$ e $\bar{K}_2^T$ têm dimensões iguais a $n \times j$ e $m \times i$, respectivamente.¹⁸

$$\bar{M} = \bar{K}_1 \cdot \bar{F} \cdot \bar{K}_2^T + \bar{E} \quad \text{Equação 24}$$

$$\bar{M} = \begin{bmatrix} m_{11} & \cdots & m_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ m_{n1} & \cdots & m_{nm} \end{bmatrix} \quad \text{Equação 25}$$

$$\bar{E} = \begin{bmatrix} \epsilon_{11} & \cdots & \epsilon_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \epsilon_{n1} & \cdots & \epsilon_{nm} \end{bmatrix} \quad \text{Equação 26}$$

$$\bar{F} = \begin{bmatrix} f(y_1, x_1) & \cdots & f(y_1, x_j) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f(y_i, x_1) & \cdots & f(y_i, x_j) \end{bmatrix} \quad \text{Equação 27}$$

$$\bar{K}_1 = \begin{bmatrix} k(t_{11}, x_1) & \cdots & k(t_{11}, x_j) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ k(t_{1n}, x_1) & \cdots & k(t_{1n}, x_j) \end{bmatrix} \quad \text{Equação 28}$$

$$\bar{K}_2^T = \begin{bmatrix} k(t_{21}, y_1) & \cdots & k(t_{21}, y_i) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ k(t_{2m}, y_1) & \cdots & k(t_{2m}, y_i) \end{bmatrix} \quad \text{Equação 29}$$

Para simplificar o processamento, o problema 2D é configurado para 1D, conforme é representado na Equação 30, onde $\vec{m}$ é um vetor obtido pelo empilhamento das colunas individuais da matriz $\bar{M}$. Ou seja, por exemplo, se tivermos um experimento 2D com aquisição de 32 pontos na dimensão direta e 32 pontos na dimensão indireta a matriz 2D 32×32 é transformada em um vetor 1024×1 . Os vetores $\vec{e}$ e $\vec{f}$, da Equação 30, são obtidos por meio das matrizes $\bar{E}$ e $\bar{F}$, da mesma forma que o vetor $\vec{m}$ é obtido da matriz $\bar{M}$ e, por fim, $\bar{K}_0$ é a matriz núcleo obtida pelo produto tensorial das matrizes $\bar{K}_1$ e K_2 : $\bar{K}_0 = K_2 \otimes K_1$.¹⁸ Desta forma, os dados de RMN 2D podem ser invertidos utilizando o mesmo método 1D de minimização do erro quadrático médio (Equação 22).

$$\vec{m} = \vec{f} \cdot \bar{K}_0 + \vec{e} \quad \text{Equação 30}$$

Contudo, experimentos 2D desta magnitude geram uma quantidade de dados muito grande, visto que, as matrizes de dados experimentais 2D (matriz $\bar{M}$) são da ordem de $10^4 \times 32$ e geralmente a matriz $\bar{F}$ é de dimensão 100×100 . Assim, a combinação dessas duas matrizes acaba gerando uma matriz núcleo $\bar{K}_0$ com mais de 10^9 elementos. Dessa forma, computadores

comuns não conseguem processar matrizes de dados dessa magnitude e por esse motivo experimentos 2D T_1 - T_2 , T_2 - T_2 e T_2 -D não eram comumente utilizados.¹⁸

Em 2002, Venkataramanan e colaboradores propuseram um algoritmo rápido para o processamento de dados 2D T_1 - T_2 , T_2 - T_2 e T_2 -D, denominado algoritmo de *Fast Laplace Inversion* (FLI).¹⁴ A principal etapa deste algoritmo é a decomposição em valores singulares truncados das matrizes $\overline{K_1}$ e $\overline{K_2}$ (TSVD – *Truncated Singular Values Decomposition*), obtendo uma matriz núcleo $\overline{K_0}$ comprimida, e, desta forma, tornando possível o tratamento dos dados em computadores convencionais.^{14; 18; 34}

2.5 Métodos de atenuação de ruído para sinais adquiridos por RMN-DT

Como já é conhecido na literatura, existem muitos métodos que podem ser aplicados para redução de ruído em sinal de RMN adquiridos, a fim de melhorar a aparência e/ou possibilitar a obtenção de informações mais precisas sobre o sistema em análise.⁴⁹ Entretanto, a maioria desses pré-processamentos geralmente são aplicados apenas na RMN-AR, não sendo muito comum a aplicação desses tipos de processamento na RMN-DT. Contudo, métodos de atenuação de ruído são uma ferramenta importante em experimentos de RMN-DT, porque sinais ruidosos são corriqueiros nesta área da RMN.⁴⁶

Estudos recentes têm demonstrado que altas S/R são um pré-requisito na RMN-DT, principalmente para dados que são processados pela ILT. Neste caso, a baixa S/R pode acarretar distorções das informações do sistema em estudo.^{17; 18} Neste trabalho são abordados alguns métodos de redução de ruído, os quais são brevemente descritos abaixo. Vale ressaltar que os métodos citados a seguir vêm sendo discutidos na literatura com aplicabilidade em várias áreas, contudo, estes serão abordados neste trabalho como recursos para melhorar a S/R em sinais obtidos por RMN-DT.

2.5.1 Compressão de dados linear e logarítmica

A melhora da S/R pelo processo de compressão não é um método complexo, visto que este consiste na realização de uma média aritmética simples de um determinado conjunto de pontos. O valor obtido por esse processo matemático substituiu o conjunto de pontos em análise, conforme pode ser observado na Figura 16, na qual um conjunto de cinco pontos (círculos pretos) é substituído pela média simples destes pontos (ponto branco). No caso da compressão linear (LI), o tamanho do conjunto de pontos utilizado para fazer a média é constante ao longo

da compressão de um determinado sinal. Já na compressão logarítmica (LO) o tamanho do conjunto de pontos utilizado para fazer a média vai aumentando logaritmicamente ao longo da compressão de um determinado sinal.⁴⁶

Figura 16 – Esquema da compressão linear (LI) e logarítmica (LO) dos dados. Os círculos pretos representam um conjunto de cinco pontos de um dado sinal e o círculo branco representa a média aritmética desses cinco pontos, o qual substituiu os outros cinco pontos na compressão LI e LO.

Fonte: figura elaborada pela autora.

2.5.2 Filtro digital: filtro passa baixa

Os filtros digitais são classificados em duas classes: filtros de resposta infinita ao impulso (IIR - *Infinity Impulse Response*) e de resposta finita ao impulso (FIR - *Finity Impulse Response*). A principal diferença matemática entre esses dois filtros é que o IIR é um filtro recursivo. Ambas as classes de filtros têm suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, os filtros da classe FIR são métodos de simples implementação e projetados para não terem distorções de fases, entretanto, este método demanda tempo computacional. Já os IIR requerem baixo tempo computacional, são métodos rápidos, porém são geralmente instáveis e causam distorções na fase do sinal.⁴⁹ Além disso, ambas as classes podem causar um pequeno deslocamento ou atraso do sinal no tempo, ou seja, o sinal filtrado quando comparado ao sinal original pode apresentar um pequeno atraso temporal, sendo que, a incorporação deste atraso é mais comum no filtro FIR.⁵⁰ Este atraso causado por ambos os filtros e as distorções de fase ocasionadas pelo filtro IIR podem ser removidos utilizando uma filtragem denominada de “zero-fase” por meio do método *forward-backward*.⁵¹

Independente da classe, a qualidade dos filtros digitais é afetada por alguns parâmetros conforme ilustrado na Figura 17 (a), na qual a linha vermelha tracejada representa um filtro ideal, enquanto que, linha azul contínua descreve um filtro real. Nesta figura, a região de passagem da banda (0 a 150 Hz) determina a banda de frequências que irá passar pelo filtro, enquanto que, a região de rejeição de bandas indica a gama de frequências que é suprimida pelo filtro (acima de 230 Hz). A banda de transição (região entre 150 a 230 Hz) descreve a maneira

como o filtro muda de banda de passagem para banda de rejeição. A não idealidade dos filtros leva ao surgimento de ondulações tanto na banda de passagem quanto na banda de rejeição, sendo que a largura dessa ondulação é mensurada em dB (decibéis). Ainda, a não idealidade do filtro também gera uma banda de transição com largura diferente de zero.^{49; 52}

Figura 17 – (a) Parâmetros utilizados para caracterizar um filtro. A figura (a) exemplifica um tipo passa baixa onde a linha em azul indica um filtro real e a linha vermelha tracejada mostra o comportamento de um filtro ideal. A figura em (b) mostra a janela espectral característica dos filtros passa baixa (i) passa alta (ii) passa banda (iii) e corta banda (iv). Na figura (b) ω_c corresponde à frequência de corte.

Fonte: figura adaptada das referências^{49; 52}.

Dependendo do propósito da aplicação do filtro digital, algumas implementações podem ser feitas em sua estrutura a fim de torná-lo mais efetivo para o propósito requerido. Como por exemplo, a ordem do filtro pode ser aumentada, visto que quanto maior for a ordem do filtro, menor será a largura da banda de transição e mais eficaz o filtro para o requisito requerido. Entretanto, quanto maior a sua ordem maior também será o tempo computacional e o atraso do sinal no tempo. Contudo, devido à recursividade do filtro IIR, para uma mesma ordem, o atraso do sinal no tempo e largura de banda de transição deste filtro sempre será menor que para o filtro FIR. Outro fator que pode ser otimizado na estruturação da filtragem digital é o método de projeção do filtro, visto que, cada método apresenta uma disposição diferente na janela espectral: diferentes ondulações nas bandas de passagem e de rejeição e na largura da banda de transição. Consequentemente, cada método terá uma atuação diferente sobre o sinal. Para a estruturação do filtro IIR podem ser utilizados os métodos *Butterworth*, *Inverse Chebyshev*, *Chebyshev*, *Cauer* e *Bessel*. Já os métodos disponíveis para a projeção do filtro FIR são *Chebyshev*, *Hamming*, *Kaiser*, *Hanning* e *Retangular*.^{50; 53}

O filtro digital pode ser classificado em quatro tipos de acordo com a sua atribuição: passa baixa, passa alta, passa banda e corta banda, conforme mostrado na Figura 17 (b). O filtro

passa baixa (PB) suprime todas as frequências acima de uma determinada frequência de corte (ω_c) e deixa passar a gama de frequência que se encontra abaixo da ω_c (Figura 17 (b-i)). Já o filtro passa alta (PA) suprime as frequências abaixo da ω_c e deixa passar a gama de frequências acima da ω_c (Figura 17 (b-ii)). A combinação desses dois filtros pode gerar outros dois tipos de filtro: passa banda e corta banda. O passa banda permite a passagem de frequência que se encontra entre duas frequências de corte conforme é mostrado na Figura 17 (b-iii), enquanto que o corta banda corta as frequências que estão dentro de duas ω_c (Figura 17 (b-iv)).⁵²

Na RMN-DT, geralmente, são empregados filtros PB, conforme mostra a Figura 18. Nesta figura está ilustrada a aplicação no sinal de RMN-DT de um filtro PB ideal, ou seja, um filtro sem ondulações nas bandas de passagem, rejeição e transição.⁴⁶ Como os filtros digitais geralmente são aplicados no domínio da frequência, o sinal de RMN-DT é transformado do domínio do tempo para o domínio da frequência pela transformada de Fourier (TF), conforme ilustrado na Figura 18 em (a) e (b), respectivamente. Ainda na letra (b) a linha vermelha demonstra a aplicação do filtro PB com banda de passagem de sinal de aproximadamente 70 Hz. Em (c) e (d) são mostrados os sinais no domínio da frequência e no domínio do tempo após aplicação do filtro passa banda, sendo que o sinal em (d) foi obtido pela TF inversa do sinal (c). Neste caso, o filtro digital proporcionou um aumento da S/R do sinal (a) para o sinal (d) é de aproximadamente 10 vezes.

Figura 18 – (a) Sinal simulado para a sequência de pulsos CPMG para um $T_2 = 200$ ms, $\tau = 1,3$ ms, 1.500 ecos e homogeneidade do campo magnético ajustada para se obter uma S/R ~ 10 . (b) Aplicação do filtro passa baixa (PB) na Transformada de Fourier (TF) do sinal (a). (c) TF do sinal (a) após a aplicação do filtro PB e (d) sinal no domínio do tempo após a aplicação do filtro PB no sinal (a) com S/R ~ 100 .

Fonte: figura elaborada pela autora.

2.5.3 Filtro Savitzky – Golay

Savitzky e Golay (SG) propuseram um método de suavização do ruído do sinal utilizando o ajuste polinomial de um subconjunto de $2M+1$ pontos utilizando o método dos mínimos quadrados. Os autores demonstraram que o coeficiente a_0 resultante do ajuste polinomial pelo método dos mínimos quadrados proporciona uma excelente suavização do dado original sem perdas de informações. A Figura 19 mostra a principal ideia do filtro SG para um determinado sinal onde os círculos sólidos representam cada ponto do sinal, além de exemplificar o ajuste de um polinômio de 2ª ordem a um subconjunto de 5 pontos, sendo que o ponto do meio do subconjunto de dados é o dado a ser suavizado. Os pontos sólidos em $n=0$ e $n=10$ exemplificam os dados a serem suavizados pela substituição destes pelos valores de a_0 encontrados pelo ajuste polinomial (círculos vazios em $n=0$ e 10 – Figura 19). Neste método, a suavização é feita ponto por ponto, ou seja, após analisar um conjunto de dados desloca-se um ponto para direita e realiza um novo ajuste polinomial, desta forma, por esse método não há redução do número de pontos.⁵⁴

Figura 19 – Ilustração da suavização do ruído pelo método dos mínimos quadrados pelo ajuste polinomial de segunda ordem (linha sólida) para um conjunto de cinco pontos de um determinado sinal (círculo preto sólido). Os círculos transparentes indicam a resultante (a_0) da aplicação dos mínimos quadrados e x corresponde ao peso tabelado das constantes.

Fonte: figura adaptada da referência⁵⁴. Com permissão da IEEE.

A fim de simplificar e acelerar o processamento dos dados, os autores demonstraram que suavizações equivalentes às obtidas pelo ajuste polinomial podem ser alcançadas pelo método de convolução. Neste caso, usa-se o princípio similar ao da média móvel: para um dado conjunto de pontos multiplica-se cada ponto por um constante e depois soma-se a resultante

destas multiplicações, conforme Equação 31, onde p_i são os pontos de um dado sinal e C_i a constante. No caso da média móvel o coeficiente C_i tem o mesmo valor para todos os pontos (1/número de pontos de um dado conjunto em análise).^{54; 55}

$$y_j = \sum_{i=-n}^{i=n} C_i p_{i+j} \quad \text{Equação 31}$$

A convolução pelo método SG somente se difere da média móvel devido aos coeficientes (C_i) terem pesos diferentes. Pelo método SG os coeficientes são determinados pela derivada da equação dos mínimos quadrados para determinadas combinações de polinômio de ordem n e um conjunto de $2M+1$ pontos. A Figura 19 mostra esses coeficientes, indicados pelo sinal “x”, calculados para um conjunto de dados de 5 pontos e para um polinômio de 2ª ordem. Este conjunto de constantes sempre será o mesmo para um dado conjunto pontos e polinômio de ordem fixa. Assim, por exemplo, para qualquer sinal que for suavizado, utilizando um conjunto de cinco pontos e um polinômio de 2ª ordem, utilizar-se-á os mesmos coeficientes ilustrados na Figura 19 pela sinal x. Nesta figura é possível comprovar que esses coeficientes se repetem tanto para a suavização do ponto $n = 0$ quanto para a do ponto $n = 5$. Tabelas destas constantes para específicas combinações de conjunto de dados e grau polinomial foram primeiramente mostradas por Savitzky e Golay, em 1964.⁵⁵ Alguns erros desses coeficientes foram corrigidos posteriormente.⁵⁶

2.5.4 Wavelet (WA)

Wavelet é um método de análise de sinais/imagens por intermédio de ondas que apresentam curta duração e valor médio nulo, sendo estas ondas denominadas de *wavelet* mães. Esse método é muito versátil tendo aplicações em diversas áreas, todavia, de acordo com a finalidade da sua aplicação há um pacote de processamento específico. No presente trabalho é enfatizado o pacote *wavelet* utilizado para realizar a supressão do ruído, denominado de pacote *wavelet* com limiar de corte do ruído, também conhecido como *threshold*. Para o entendimento deste algoritmo é importante a abordagem de três principais processos que ocorrem no método *wavelet*: a decomposição e reconstrução do sinal e a aplicação do limiar de corte do ruído.

A seleção da função *wavelet* adequada para o tratamento do sinal é muito importante, pois a decomposição do sinal é coordenada pela *wavelet* escolhida. A melhor função *wavelet* a ser utilizada para tratar os dados varia para cada caso, sendo que a *wavelet* mais adequada é a que mais se assemelha ao sinal a ser analisado. Existem inúmeras famílias de *wavelets*, sendo

que as mais conhecidas são: *haar*, *daubechies*, *biortogonal*, *coifles*, *symlets*, *morlet*, *mexican hat*, *meyer*.⁵⁷ A decomposição dos dados por meio da *wavelet* é similar ao método de Fourier: ambos fragmentam o sinal, entretanto, enquanto que, na TF o sinal é decomposto em senoides de várias frequências, na transformada *wavelet* contínua (TWC) o sinal é fragmentado em várias *wavelets* filhas com diferentes escalas e posições em relação a *wavelet* mãe. Assim, após a TWC o sinal é decomposto em *wavelets* filhas com diferentes frequências, sendo que, as componentes com alta frequência têm escala pequena e as com baixas frequências possuem escalas grandes. Além disso, para uma dada escala a forma das *wavelets* filhas é fixa só muda sua localização no tempo – posição em referência a *wavelet* mãe.^{58; 59}

Matematicamente a TWC de um determinado sinal ($f(t)$) com relação à *wavelet* mãe ($\psi_{1,0}(t)$) é dada pela Equação 32, onde os fatores a e b são os parâmetros de escala e posição e $\psi_{a,b}^*(t)$ descreve as funções das *wavelet* filhas. Desta forma, ambas, *wavelet* mãe e filhas, têm a mesma função geral, sendo que estas se diferem somente em relação aos parâmetros a e b .

$$TWC(a, b) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \psi_{(a,b)}^*(t) dt \quad \text{Equação 32}$$

Para cada parâmetro de escala e posição é gerada uma *wavelet* filha, no entanto, calcular todas as combinações dos parâmetros escala e posição, além de ser trabalhoso, gera uma enorme quantidade de dados, que geralmente acabam sendo redundantes.⁵⁹ Portanto, ao invés de se proceder desta maneira é possível restringir os parâmetros escala e posição a valores decorrentes de potência 2, esta restrição é denominada de escalas e posições diádicas. Utilizando este processo, a análise é muito mais eficiente, pois gera uma quantidade de dados inferior a TWC e ao mesmo tempo ainda continua sendo uma análise precisa. Esse gênero de processamento é aplicado por intermédio da transformada *wavelet* discreta (TWD), a qual é implementada pela aplicação um algoritmo piramidal proposto por Mallat (1988).^{60; 61} Neste método, o conjunto de frequências, decomposto pela TWD, é separado de acordo com suas bandas de frequências por meio de filtros PB e PA, gerando assim duas componentes denominadas de aproximação e detalhe, respectivamente, conforme é mostrado na Figura 20 (a). Nesta figura é possível ver que a componente aproximação (cA) conserva a característica original do sinal, enquanto, na componente detalhe (cD) são retidas as componentes de alta frequência. Como o ruído é um fenômeno que afeta todas as frequências ele está tanto no detalhe quando na aproximação.^{61; 62}

O processo de decomposição utilizando os filtros passa baixa e passa alta pode ser repetido várias vezes para a componente aproximação, obtendo-se uma melhora na S/R para esta componente à medida que o nível de decomposição aumenta, conforme pode ser observado na Figura 20 (b). Entretanto, à medida que o nível de decomposição se eleva, pode ocorrer perda de algumas informações referente ao sinal. Por outro lado, se o nível de decomposição for muito pequeno a melhora na S/R pode não ser tão significativa. Sendo assim, a escolha do nível de decomposição é um passo fundamental na aplicação do filtro *wavelet*.⁶²

Figura 20 – (a) Separação do conjunto de frequências (representados pelo sinal), pela transformada *wavelet* direta (TWD), em duas bandas de frequências por intermédio de dois filtros: passa alta (PA) e passa baixa (PB), gerando duas componentes denominadas de aproximação (cA) e detalhe (cD), respectivamente; (b) o procedimento citado em (a) pode ser realizado várias vezes para a componente aproximação (cA1). Em (b) S representa o sinal a ser decomposto.

Fonte: figura adaptada da referência⁶².

Após o processo de decomposição, a reconstrução do sinal ocorre a partir dos coeficientes *wavelet* por meio do recurso matemático da inversa da TWD (ITWD).⁶¹ Nesta etapa as componentes de aproximação e detalhe passam novamente por filtros PB e PA a fim de serem reconstruídos. Todavia, se o sinal fosse somente decomposto e depois construído não teríamos grandes melhoras na S/R. Assim, antes da etapa de reconstrução os coeficientes das *wavelets* podem ser modificados de acordo com a aplicação requerida. No caso da redução do ruído do sinal, uma das alternativas é a remoção da componente detalhe antes de realizar a reconstrução do sinal, uma vez que o ruído se concentra geralmente em altas frequências, então, ao remover esta componente se obtém um sinal com menos ruído. Porém, com a remoção desta componente também pode ocorrer perdas de informações do sinal.

Outro método também efetivo para a redução do ruído e utilizado na RMN é o método de aplicação de limiares de corte (a palavra limiar vem da tradução do inglês de *threshold* (TH)).⁶² A ideia deste recurso é definir que todos os coeficientes, que são menores que um limiar particular, sejam iguais a zero. Este processo é geralmente empregado na componente detalhe, reduzindo assim a quantidade de ruído significativamente. Contudo, o mesmo cuidado que é preciso ter na escolha do nível de decomposição também é preciso ter com a largura do limiar, pois para limiares muito estreito e o sinal ainda será muito ruidoso. Já o oposto, ou seja, em limiares muito largos pode haver perda de informações importantes do sinal.⁶³

Existem vários tipos de limiares sendo que o mais conhecido é o limiar universal proposto por Donoho e Johnstone (1994) cuja equação é apresentada a seguir, onde σ é o desvio padrão do ruído e N é o número de pontos.⁶⁴

$$TH = \sigma\sqrt{2\log N}$$
Equação 33

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Aprofundar o estudo das sequências de pulsos provenientes da condição CWFP a fim de desenvolver métodos de determinação rápida da constante de tempo T_1 e da correlação T_1 - T_2 em RMN-DT.

3.2 *Objetivos parciais*

- Estudar a dependência da constante de tempo T^* em relação à largura de pulsos com o intuito de desenvolver uma sequência de pulsos rápida 1D proveniente da condição CWFP para determinação da constante de tempo T_1 em espectrômetros de baixa resolução.
- Aplicar e avaliar métodos de redução de ruído em sinais RMN-DT, em especial nos sinais desenvolvidos neste trabalho.
- Desenvolver sequências de pulsos 2D rápidas provenientes da condição CWFP (2D-CWFP) empregando a sequência de pulsos CWFP como dimensão direta e indireta.
- Avaliar as vantagens e desvantagens das sequências 2D-CWFP em relação aos métodos usualmente utilizados na literatura para determinar a correlação T_1 - T_2 : IR-CPMG e SR-CPMG.
- Demonstrar o potencial das sequências de pulsos propostas neste trabalho para analisar carne e gordura bovina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Para o desenvolvimento e avaliação do comportamento das novas sequências de pulsos propostas foram utilizadas amostras de soluções aquosas de CuSO_4 e MnSO_4 , bem como soluções aquosas contendo as espécies complexas $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ e $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$. A escolha dessas soluções baseou-se no fato destas possuírem distintas T_1/T_2 , o que possibilitou a realização de uma análise mais completa das novas sequências de pulsos propostas perante a uma ampla faixa T_1/T_2 (de aproximadamente 1 (Cu^{2+}) até 10 ($[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$).^{65; 66}

As soluções de CuSO_4 e MnSO_4 foram preparadas em várias concentrações, especificadas em cada experimento, sendo que o preparo destas se procedeu pela diluição dos sais de CuSO_4 e MnSO_4 em água destilada, respeitando as proporções de acordo com a concentração desejada. Como é conhecido na literatura, os íons Mn^{2+} e Cu^{2+} em água formam os aquacomplexos $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.⁶⁶ Diante do exposto, para simplificar a descrição e análise dos resultados, foi assumido que a concentração dos íons metálicos em solução na forma de seus respectivos aquocomplexos, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, correspondem as concentrações das soluções de CuSO_4 e MnSO_4 .

As soluções contendo complexos de $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ e $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ foram fornecidas pelo Dr. Flávio Vinícius Crizóstomo Kock, sendo que estas fizeram parte do seu trabalho de doutorado⁶⁷ e já se encontram publicadas.^{65,67} Em consonância com a literatura, o pH da solução contendo o complexo de $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ foi ajustado para 4 a fim de favorecer a complexação deste íon. Para a preparação desta solução foi utilizada a proporção 1:2 (mol/mol íon-EDTA) nas concentrações 3,3 mM (MnSO_4) e 6,6 mM (EDTA). Para a solução contendo o complexo $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ o pH foi ajustado em 13 para garantir a formação da estrutura amínica complexa e a incorporação do hidróxido na espera de coordenação por hidrólise alcalina^{65; 67}. A proporção íon-EDTA foi 1:2 (mol/mol) e as concentrações do CuSO_4 , EDTA e NH_4OH foram 3,3 mM, 6,6 mM e 1 M, respectivamente. Para simplificação da descrição e análise dos resultados foi assumido que a concentração dos complexos $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ correspondem ao valor da concentração da solução de CuSO_4 e MnSO_4 empregados, ou seja, $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ 3,3 mM e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM.

Para estudar a aplicação dos filtros nos sinais CPMG e CWFP- T_1 (seção 5.2) e para o desenvolvimento das sequências de pulsos 2D-CWFP (seção 5.3) foi montado um sistema

semelhante ao apresentado na Figura 21. Para a estruturação deste sistema, três tubos de ensaio de 3 mm de diâmetro foram acondicionados dentro de um outro tubo de ensaio de 11 mm de diâmetro. Para cada um dos tubos internos foram colocados 500 µL de uma determinada solução, conforme indicado pelas diferentes tonalidades de azul na Figura 21. Para o estudo da aplicação dos filtros descrito na seção 5.2 foram empregadas as soluções de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 mM e $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM e 0,125 mM e para o desenvolvimento dos métodos 2D-CWFP foram utilizadas as soluções de $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM.

Com a finalidade de demonstrar a aplicabilidade dos filtros em sistemas reais foram analisadas amostras de carne bovina com diferentes teores de gordura e gordura bovina pura. Para comprovar a aplicabilidade das sequências de pulsos 2D-CWFP em amostras reais foram utilizadas amostras de carne, carne com gordura na proporção 1:1 (carne: gordura) e gordura bovina pura obtida por secagem a vácuo.

Figura 21 – Esquema de um sistema composto por três tubos de ensaio de 3 mm de diâmetro acondicionado dentro de um tubo de 11 mm de diâmetro. As diferentes tonalidades de azul indicam que há diferentes soluções nos tubos.

4.2 Espectrômetros de RMN

Para a realização do estudo, das sequências de pulsos uni e bidimensionais propostas neste trabalho, foi utilizado o espectrômetro Minispec mq 20 (Brucker, Alemanha) operando com uma frequência de 19,9 MHz para o ^1H (0,47 T) com sonda de 10 mm e pulso de 10° , 90° e 180° com larguras de 2, 18 e 35,5 µs, respectivamente, para a atenuação de pulso igual a 28 dB e pulso de 90° , 180° com larguras de 5,24 e 10,48 µs, respectivamente, para atenuação igual a 16 dB. Todos os experimentos foram realizados neste equipamento utilizando temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para complementação do estudo da sequência de pulsos 1D CWFP- T_1 também foi

utilizado o magneto SLK-1399 (Spinlock, Argentina) que opera em uma frequência de 9 MHz para ^1H (0,23T) e possui um sonda com 10 cm de diâmetro, o qual foi acoplado a um console Apollo (Tecmag, USA) que possui largura do pulso de 10° , 90° , e 180° de 1,7 μs , 15 μs , e 30 μs , respectivamente. Como esse equipamento não tem um sistema para controle da temperatura, os experimentos foram realizados com base no controle da temperatura ambiente, aproximadamente 23 °C. Ainda para o desenvolvimento do estudo dos filtros foi utilizado o magneto permanente do espectrômetro Minispec, citado anteriormente, acoplado com um console Apollo também já especificado anteriormente. Neste último caso os experimentos também foram realizados a temperatura ambiente, 23 °C.

Os experimentos de RMN-AR para a carne e a gordura foram realizados em um espectrômetro AVANCE III HD 600 (Bruker, Alemanha), que opera em uma frequência de 600,13 MHz para o núcleo de ^1H (14,1 T), equipado com uma sonda HR-MAS (*High Resolution - Magic Angle Spinning*) de 4 mm de duplo canal (^1H e ^{13}C), com gradiente de campo na direção do ângulo mágico. As amostras foram rotacionadas no ângulo mágico ($\Theta=54,74^\circ$) a 5 KHz, sendo que o ângulo mágico foi ajustado utilizando o sinal do ^{79}Br de uma amostra de KBr em pó, como referência. A homogeneidade do campo magnético foi ajustada com base no sinal do deutério proveniente da D_2O adicionada às amostras.

4.3 Sequências de pulsos e parâmetros experimentais de aquisição dos sinais

Neste trabalho foram utilizadas sequências de pulsos uni e bidimensionais provenientes da condição CWFP: CP-CWFP_{x-x}, CWFP-T₁, CPMG-CWFP-T₁ e CWFP-T₁-CPMG e para a aquisição do espectro de ^1H HR-MAS RMN foi utilizada a sequência zg (biblioteca da Bruker). Pormenores sobre a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} foram descritos na revisão de literatura e maiores especificações referente às outras três sequências de pulsos CWFP (CWFP-T₁, CPMG-CWFP-T₁ e CWFP-T₁-CPMG) são descritas e discutidas nos resultados e discussão, visto que, o desenvolvimento delas foi objeto de estudo desse trabalho. As sequências de pulsos IR, CPMG, SR-CPMG e IR-CPMG também foram utilizadas, visto que, elas são amplamente citadas na literatura e, por isso, foram utilizadas para fins de comparação com os resultados obtidos com as novas sequências propostas. Maiores especificações sobre essas sequências já foram descritas na revisão de literatura (seção 2). Os parâmetros utilizados para aquisição dos sinais utilizados neste trabalho estão descritos nas subseções a seguir de acordo com as subseções dos resultados.

4.3.1 Sequência de pulsos unidimensional CWFP- T_1

Para o estudo da sequência de pulsos 1D CWFP- T_1 todos os sinais CPMG e CWFP- T_1 (sinal CWFP- T_1 remete a expressão: sinal adquirido pelo método CWFP- T_1), foram obtidos pela aquisição de um ponto para cada $\tau/2$. Os sinais CWFP- T_1 e CPMG foram adquiridos para quatro soluções aquosas, sendo que cada uma destas continha uma das seguintes espécies complexas: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM, $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM e $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ 3,3 mM. Para a aquisição destes sinais foi utilizando 10.000 ecos, $\tau = 300 \mu\text{s}$, 32 *scans* e *RD* iguais a 3 s e 0,01 s (tempo mínimo permitido pelo espectrômetro Minispec) para as sequências de pulsos CPMG e CWFP- T_1 , respectivamente. Para a aquisição do sinal CWFP- T_1 e CPMG da água deionizada foram utilizados 45.000 ecos, $\tau = 600 \mu\text{s}$, 16 *scans* e *RD* iguais a 0,01 s e 15 s, respectivamente. Para obtenção dos sinais pelo método IR foram realizados 32 experimentos com diferentes valores de τ_r , sendo que estes apresentavam valores que aumentavam logaritmicamente de 0,002 a 30 s para a água deionizada e 0,001 a 10 s para as demais soluções. Para cada experimento o número de *scans* foi 8 e o tempo de espera entre *scans* e experimentos (*recycle delay* – *RD*) foi igual a 15 s para a água e 3 s para as demais soluções. As soluções citadas acima e a água deionizada foram analisadas em dois espectrômetros: Minispec (20 MHz), no SLK 1399 (9 MHz), sendo que em ambos os equipamentos foram utilizados os mesmos parâmetros.

Para o estudo do *RD* da sequência de pulsos CWFP- T_1 foi realizado experimentos com as sequências CWFP- T_1 e CPMG no espectrômetro Minispec utilizando a solução aquosa contendo o complexo de $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM. Para a aquisição dos sinais CWFP- T_1 e CPMG foram empregados 32 e 4 *scans* e o número de ecos foi igual a 20.000 e 5.000, respectivamente, o τ foi de 300 μs e *RD* variou em nove experimentos de $0,05T_1$ (0,0350 s) a $5T_1$ (3,5 s) em ambas as sequências. Esta mesma solução também foi analisada por IR a fim de comparar o tempo experimental entre IR e CWFP- T_1 . Para este experimento o valor de τ_r aumentou logaritmicamente de 0,003 a 6 s em 32 passos e com 4 *scans* e o sinal para a sequência de pulsos CWFP- T_1 foi adquirido utilizando os mesmos parâmetros citado anteriormente, porém utilizando 4 *scans*.

4.3.2 Aplicação de filtros nos sinais CWFP- T_1 e CPMG

O estudo da aplicação dos filtros nos sinais CWFP- T_1 e CPMG utilizando o sistema (demonstrado na Figura 21) composto por três soluções, contendo os aquacomplexos de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 mM e $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM e 0,125 mM, foi conduzido utilizando 4 *scans* e adquirindo 12000 e 3000 ecos espaçados por um τ de 300 μs , respectivamente. Estes parâmetros foram utilizados para aquisição dos sinais tanto do sistema composto pelas três componentes, quanto de cada solução isolada. Para a sequência de pulsos CPMG foi adquirido um ponto para cada $\tau/2$ e para a sequência de pulsos CWFP- T_1 foram adquiridos dois sinais com parâmetros de aquisição distintos: um sinal foi obtido pela aquisição de um ponto para cada $\tau/2$ e o outro sinal foi obtido pela aquisição de 64 pontos durante cada τ . Neste último sinal, cada conjunto de 64 pontos foi substituído pela média desses 64 pontos.

Para o estudo da carne bovina com diferentes teores de gordura e para a gordura bovina pura os sinais CWFP- T_1 e CPMG foram obtidos utilizando uma sequência de 6000 e 3500 pulsos separados por $\tau = 300 \mu\text{s}$, respectivamente. O sinal CPMG foi adquirido por um ponto em cada $\tau/2$ e para a obtenção do sinal CWFP- T_1 foram adquiridos 64 pontos durante cada τ . Como no caso anterior, cada conjunto de 64 pontos foi substituído pela média desses 64 pontos.

4.3.3 Sequências de pulsos 2D-CWFP

Para aquisição dos sinais obtidos pelas sequências de pulsos IR-CPMG e SR-CPMG para o sistema composto por três soluções dos aquacomplexos $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM, foram utilizados 32 valores de τ_r para as sequências de pulsos IR e SR, espaçados logaritmicamente de 3 ms a 15.000 ms, sendo que, para cada um desses valores de τ_r foi adquirido um sinal pelo método CPMG com 10.000 ecos e $\tau = 500 \mu\text{s}$. Já o sinal CWFP- T_1 -CPMG, resultante do sistema de três soluções, foi obtido pelo incremento logarítmico do número de ecos da sequência de pulsos CWFP- T_1 ($m/2$) de 6 até 30.000 em 32 experimentos e utilizando $\tau = 500 \mu\text{s}$, sendo que, em cada experimento foi adquirido um sinal CPMG com os mesmos parâmetros citados para as sequências de pulsos IR-CPMG e SR-CPMG. O sinal CPMG-CWFP- T_1 , para a amostra composta por três soluções, foi adquirido variando logaritmicamente o número de ecos da sequência CPMG de 3 a 10.000 em 32 experimentos e para cada experimento foi adquirido um sinal CWFP- T_1 com 30.000 ecos, sendo que para ambas as sequências de pulsos o valor de $\tau = 500 \mu\text{s}$. Nas quatro sequências os sinais foram

obtidos adquirindo um ponto para cada $\tau/2$, utilizando 32 *scans* e empregando um *RD* de 15 minutos para as sequências de pulsos IR-CPMG e CWFP-T₁-CPMG e para as sequências CPMG-CWFP-T₁ e SR-CPMG foi utilizado um valor de *RD* mínimo permitido pelo espectrômetro Minspec, 0,01 ms.

Para o estudo da carne e da gordura bovina foram adquiridos sinais utilizando as sequências de pulsos IR-CPMG e CPMG-CWFP-T₁. Para a sequência IR-CPMG foram utilizados 32 valores de τ_r espaçados logaritmicamente de 3 ms a 4000 ms, sendo que, para cada um desses valores de τ_r foi adquirido um sinal CPMG com 8.000 ecos e $\tau = 250 \mu s$. Já para a aquisição do sinal CPMG-CWFP-T₁, o número de ecos da sequência de pulsos CPMG foi espaçado logaritmicamente de 3 a 4.000 em 32 experimentos e para cada experimento foi adquirido um sinal CWFP-T₁ com 8.000 ecos, sendo que para ambas as sequências de pulsos o valor de $\tau = 500 \mu s$. Para a sequências IR-CPMG o valor do *RD* foi de 4 s, enquanto que para o método CPMG-CWFP-T₁ o valor deste parâmetro utilizado foi 0,01 s.

4.3.4 Análise de gordura e carne bovina por HR-MAS RMN

Para a aquisição dos espectros de ¹H HR-MAS RMN das amostras de carne, pedaços das amostras foram empacotadas em rotores de zircônio de 4 mm com volume de 50 μL e, para o *lock* e otimização da homogeneidade do campo magnético, 20 μL de D₂O foram adicionados. Os espectros de ¹H foram adquiridos pela sequência de pulsos *zg* (biblioteca da Bruker), com 64k pontos, uma janela espectral de 7.200 Hz e utilizando 128 *scans*. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal da água, em 4,7 ppm.

4.4- Métodos de atenuação de ruído aplicados aos sinais adquiridos por RMN-DT

Os métodos de atenuação de ruído utilizados no presente trabalho foram aplicados no sinal bruto (BR) obtido pelo método CPMG e na média (ME) do sinal adquirido pela sequência de pulsos CWFP-T₁. O sinal CPMG BR foi obtido pela aquisição de um único ponto no centro de cada eco. Já o sinal CWFP-T₁ BR foi adquirido pela aquisição de 64 pontos entre dois pulsos, sendo realizada a média, após a aquisição do sinal, para cada conjunto de 64 pontos, resultando no sinal CWFP-T₁ (ME).

A aplicação dos filtros digitais passa baixa (PB) e *wavelet* (WA) foi realizada utilizando pacotes do MatLab® designado para a execução desses filtros.^{57; 68} O filtro PB utilizado foi o IIR de 6ª ordem, do tipo *Chebyshev* e com largura de banda de passagem de 20

a 200 Hz. Juntamente com o filtro PB IIR foi realizada uma filtragem zero-fase utilizando o filtro *forward-backward*, o qual se encontra disponível no pacote MatLab®. Para aplicação do filtro WA foi usado uma função *wavelet* mãe Sym8 da família das *symlets* com níveis de decomposição 5 e 9. Ainda, como limiar de corte do ruído foi utilizado no método *wavelet* o padrão universal, já comentado na revisão de literatura.

As compressões logarítmicas (LO) e linear (LI) foram realizadas utilizando um algoritmo escrito na linguagem MatLab®. Os sinais CPMG e CWFP-T₁ foram comprimidos LI e LO em 10 dez vezes. Além disso, o sinal CWFP-T₁ também foi comprimido LI e LO 500 vezes. A aplicação do filtro SG foi realizada usando um polinômio de 2ª ordem e os subconjuntos de pontos utilizados foram 41 e 501 para os dados 1D e 71 para os dados 2D. Para aplicação deste filtro foi utilizado o programa Origin® 8.5, o qual já possui um algoritmo próprio para execução desse filtro dentre as opções de *smooth* do programa.

4.5 Processamentos dos dados unidimensionais

Os ajustes discretos dos sinais unidimensionais CPMG e CWFP-T₁ foram realizados utilizando o programa Origin® 8.5. Já a inversão destes sinais foi realizada em ambiente MatLab® utilizando um algoritmo pertencente a empresa *Schlumberger-Doll Research*, o qual é baseado no método de regularização Tikhonov e utiliza para otimização da escolha do parâmetro de suavização (α) o método BRD.⁴⁷ A fim de tornar possível a inversão dos dados CWFP-T₁ utilizando a mesma equação núcleo do método CPMG, descrita na Tabela 1, dois pré-processamentos foram aplicados aos sinais CWFP-T₁: o ajuste da fase e a correção do *offset*, os quais são demonstrados com mais detalhes na seção 5.2.

4.6 Processamento de dados bidimensionais

As aquisições dos sinais 2D utilizando o espectrômetro Minispec mq 2 (19,9 MHz ¹H) retornam em um vetor 1D, no qual os sinais 1D adquirido em cada experimento estão dispostos um abaixo do outro. Este vetor foi transformado em uma matriz 2D, na qual cada experimento passou a ser representado por uma coluna e as linhas correspondem aos dados adquiridos na dimensão direta. A transformação da disposição dos dados de vetor para matriz é pré-requisito para o processamento dos dados utilizando o programa FLI e máxima entropia. Além da transformação na matriz 2D, os dados obtidos pela sequência de pulsos CPMG-CWFP-T₁, devido a aquisição do sinal ser via CWFP-T₁ também requerem os dois pré-processamentos já

citados na seção anterior para os dados 1D: o ajuste da fase e a remoção *offset*. Esses dois pré-processamentos são requeridos para que seja possível a utilização da função núcleo de decaimento exponencial em ambas as dimensões na sequência de pulsos CPMG-CWFP-T₁. Contudo a remoção do *offset* nos sinais 2D se difere do procedimento utilizados para os dados 1D conforme é detalhado na seção 5.3.2.1.

Outro pré-processamento é a aplicação de filtros digitais, que é opcional, mas foi utilizado para aumentar a S/R dos sinais CPMG-CWFP-T₁. O filtro utilizado neste caso foi o SG de 2ª ordem com um subconjunto de pontos igual a 71.

Após os pré-processamentos, a inversão dos dados foi realizada em parceria com um pesquisador da empresa *Schlumberger-Doll Research* utilizando o algoritmo FLI,^{14; 34} o qual, assim como o 1D, está escrito em ambiente MatLab® e é uma patente da empresa *Schlumberger-Doll Research*. Com o auxílio do programa FLI, a matriz de dados pré-processada foi reduzida pelo o método TSVD e processada utilizando a regularização Tikhonov, sendo que, a otimização da escolha do parâmetro de suavização (α), para os dados experimentais, foi realizado pelo método BRD.^{18; 47} Para os sinais simulados foi escolhido um valor de α baseado no conhecimento prévio sobre o sistema, sendo que para todos os sinais simulados analisados foi utilizado o mesmo valor de α ($\alpha = 2,5$). Esse procedimento foi utilizado porque os sinais foram simulados sem ruído e o método BRD não consegue ajustar o α para este tipo de sinais, uma vez que, o ajuste do α ótimo por esse método é dependente do desvio padrão do ruído.

Algumas matrizes de dados 2D também foram processadas utilizando o método de regularização máxima entropia. Este processamento foi realizado em parceria com a pesquisadora francesa Corinne Rondeau-Mouro do IRSTEA (*Institut national de recherche en sciences et Technologies pour l'environnement et l'agriculture*).

Tanto no método FLI quanto no de máxima entropia foram utilizadas as mesmas equações núcleo de inversão. A dimensão direta, de todas as quatro sequências de pulsos 2D, foi invertida utilizando a mesma equação núcleo de decaimento exponencial indicada pela função núcleo da sequência de pulsos CPMG na Tabela 1. Para a inversão da dimensão indireta, nos métodos IR-CPMG e CWFP-T₁-CPMG foi usada a mesma função para inversão, que foi a função núcleo demonstrada na Tabela 1 para o método IR. A dimensão indireta das sequências de pulsos SR-CPMG e CPMG-CWFP foram processadas empregando as funções núcleo comumente utilizadas nos métodos SR e CPMG, respectivamente, (Tabela 1).⁴⁶

4.7 Parâmetros usados na simulação dos sinais 2D

A simulação dos sinais resultantes da aplicação das sequências de pulsos IR-CPMG, SR-CPMG e CPMG-CWFP- T_1 foi realizada utilizando as equações descritas na Tabela 1 e considerando-se um sistema composto por três componentes, cujos valores de T_1 são iguais a 1.760 ms, 640 ms e 100 ms e de T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms, nesta ordem. Os sinais IR-CPMG e SR-CPMG foram simulados atribuindo 32 valores de τ para a equação IR e SR da Tabela 1, respectivamente, os quais foram espaçados em intervalos logarítmicos de 3 a 15.000 ms. A sequência de pulsos CPMG, para ambos os métodos, foi simulada utilizando número de ecos igual a 30.000 e 10.000, sendo que o τ utilizado em cada caso foi 500 e 170 μ s, respectivamente. Para simular os sinais adquiridos com a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 foi considerado que ambas as dimensões representavam decaimentos exponenciais igualmente ao descrito para a equação CPMG na Tabela 1. Para simulação da dimensão indireta desta sequência de pulsos foi utilizado 32 valores diferentes de τ , na equação CPMG (Tabela 1), espaçados em intervalos logarítmicos de 1,5 a 5.000 ms. A simulação da sequência de pulsos CWFP- T_1 procedeu-se pela aplicação de 30.000 e 10.000 ecos, sendo que em cada caso o τ foi de 500 e 1.500 μ s, nesta ordem. Para todos os casos os sinais foram simulados sem ruído e considerando as intensidades dos sinais CPMG e CWFP- T_1 equivalentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sequência de pulsos unidimensional CWFP- T_1

Para a realização deste estudo inicialmente foi feita uma análise teórica do comportamento da constante de tempo T^* utilizando a Equação 13 apresentada na introdução. Para isso, foram mantidos fixos determinados valores de T_1 e T_2 e o valor de T^* foi mensurado para vários ângulos θ partindo de 0° a 180° . Os resultados obtidos foram semelhantes aos demonstrados na Figura 22, pela linha azul contínua, ou seja, conforme θ se aproxima de zero a constante de tempo T^* se aproximou dos valores do tempo de relaxação T_1 e quanto mais próximo de 180° o θ for mais similar a constante de tempo T^* é de T_2 sendo que para θ igual a 0° e 180° os valores de T^* são exatamente iguais aos valores de T_1 e T_2 , respectivamente.

Com base no estudo teórico, foram realizados ensaios laboratoriais a fim de comprovar experimentalmente a influência do ângulo dos pulsos (θ) na constante de tempo T^* . Para isto, foram realizados diversos experimentos variando o ângulo θ da sequência CP-CWFPx-x (Figura 11) de 10° a 180° de 10° em 10° , conforme apresentado na Figura 22. Neste estudo, em um mesmo experimento, todos os pulsos da sequência CP-CWFPx-x apresentavam o mesmo ângulo. Nos casos em que foi utilizado pulsos com ângulos pequenos ($\theta = 10^\circ, 20^\circ$ e 30°) foi empregada uma atenuação de pulso maior (23 dB) do que pulso com ângulos grandes (15 dB para $\theta = 180^\circ, 170^\circ, 160^\circ, \dots, 40^\circ$), a fim de minimizar os erros relacionados com a exatidão do ângulo do pulso. Ainda, de forma a tornar a análise abrangente, foram estudadas três soluções contendo complexos que possuem diferentes T_1/T_2 : $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM (●), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM (▲) e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM, cujas T_1/T_2 são aproximadamente 1,0, 4,5 e 2,6, respectivamente. Os resultados experimentais encontrados estão representados pelos símbolos (●, ▲ e ■) na Figura 22, onde também são apresentados os resultados teóricos (linha contínua azul) utilizando a Equação 13 e os valores de T_1 e T_2 das três soluções em estudo.

O estudo experimental, apresentado na Figura 22, comprovou os resultados obtidos teoricamente: quanto mais próximo de 180° for o θ mais a constante de tempo T^* se aproxima dos valores do tempo de relaxação T_2 obtidos pelo método CPMG: 92,73 ms ($[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$), 92,88 ms ($[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$) e 91,67 ms ($[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$). Já para valores pequenos de θ , a constante de tempo T^* se aproxima dos valores do tempo de relaxação T_1 obtidos pelo método IR: 98,87 ms ($[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$), 417,98 ms ($[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$) e 230,58 ms ($[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$). Este efeito é mais pronunciado para as soluções cuja T_1/T_2 é maior do que 1, visto que para razões T_1/T_2 próximas

a 1 o valor de T^* praticamente não se altera devido ao valor de T_1 ser próximo ao de T_2 , conforme foi observado para a solução contendo o aquacomplexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

Figura 22 – Variação do T^* obtido com a sequência CP-CWFPx-x em função do ângulo dos pulsos θ para soluções contendo complexos: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM (●), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM (▲) e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM (■). Curvas em linha contínua azul são os valores de T^* calculados utilizando a Equação 13.

Fonte: figura adaptada da referência⁶⁹.

Contudo, observa-se na Figura 22 que os valores experimentais de T^* para θ igual a 10° se desviam tanto do formato da curva descrita pelos outros ângulos quanto dos valores de T^* para o ângulo de 10° obtidos teoricamente. Este fato é mais visível em casos onde a T_1/T_2 é superior a 1, como é o caso das soluções contendo os complexos $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (▲) e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ (■). Isso ocorre porque quando se utiliza pulsos com ângulos pequenos a faixa dinâmica entre o EQE e o EE do sinal adquirido pelo CP-CWFPx-x é muito pequena, conforme é demonstrado no estudo apresentado na Figura 23.

Na Figura 23 são apresentados os sinais obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFPx-x para uma solução contendo o complexo de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM utilizando o ângulo dos pulsos θ da sequência CP-CWFPx-x iguais a 90° (a), 50° (b), 30° (c) e 10° (d). Nessa figura também é possível observar que a faixa dinâmica entre o EQE ao EE decresce conforme vai diminuindo o ângulo θ , sendo que, a faixa dinâmica mínima é obtida quando θ é igual a 10° . Conforme a faixa dinâmica vai decrescendo a confiabilidade dos ajustes dos sinais também diminui e, consequentemente, os resultados ficam susceptíveis a erros, justificando assim as diferenças entre valores de T^* experimentais e teóricos apresentados na Figura 22 para o ângulo de 10° .

Figura 23– Sinais obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFPx-x para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM usando todos os pulsos das sequências de pulsos com os seguintes ângulos θ igual a 90° (a), 50° (b), 30° (c) e 10° (d).

Fonte: figura adaptada da referência⁶⁹.

Entretanto, como o objetivo foi utilizar pulsos com ângulos pequenos na sequência de pulsos CP-CWFPx-x, já que nestas condições T^* se aproximar do valor do tempo de relaxação T_1 , buscou-se um meio de aumentar a faixa dinâmica do sinal nesta condição. A alternativa encontrada foi a utilização de ângulos superiores a 10° no primeiro pulso da sequência de pulsos CP-CWFP conforme apresentado na Figura 24, a qual ilustra três sinais obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFPx-x, para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. Esses sinais foram obtidos utilizando o primeiro pulso da sequência CP-CWFPx-x (Figura 11) com θ igual a 10° (a), 90° (b) e 180° (c) e empregando nos pulsos que compõem a sequências de n pulsos $\theta = 10^\circ$. Analisando estes três sinais foi possível inferir que a faixa dinâmica entre o EQE ao EE aumenta proporcionalmente ao aumento do ângulo do primeiro pulso. Dessa forma, a faixa dinâmica é maior para o sinal que apresenta o primeiro pulso com ângulo de 180° (Figura 24 (c)).

Tendo em vista os resultados obtidos com o estudo apresentado na Figura 24, foram refeitos os experimentos para o ângulo de 10° apresentados na Figura 22, substituindo o ângulo θ do primeiro pulso da sequência de pulsos CP-CWFPx-x por 180° e ângulo θ da sequência de n pulsos foi mantido igual a 10° . Os valores de T^* obtido com estes novos experimentos estão apresentados na Figura 25 juntamente com os valores de T^* obtidos para os demais valores de θ (20° até 180°) já mostrados na Figura 22. A principal diferença entre a Figura 22 e a Figura 25 é que nesta os valores de T^* para os ângulos de 10° , para as três soluções estudadas, estão de acordo como resultado teórico (linha azul sólida). Estes resultados confirmam que o aumento da faixa dinâmica do EQE ao EE, proporcionada pela aplicação do primeiro pulso com ângulo

de 180° , permite a obtenção de ajustes mais confiáveis do sinal proporcionando assim a diminuição de erros na medição em casos onde se utiliza θ com valores pequenos.

Figura 24 – Sinais obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFPx-x para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM utilizando ângulo θ de 10° para os pulsos que compõe a sequência de n pulsos do método CP-CWFPx-x e $\tau = 300 \mu\text{s}$. Os três sinais se diferem com relação ao ângulo do primeiro pulso da CP-CWFPx-x, sendo este 10° (a), 90° (b) e 180° (c).

Fonte: figura adaptada da referência⁶⁹.

Figura 25 – Variação do T^* obtido com a sequência de pulsos CP-CWFPx-x em função do ângulo θ dos pulsos para soluções contendo complexos: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM ($\bullet$), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM ($\blacktriangle$) e $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM ($\blacksquare$). Os experimentos referentes a $\theta = 10^\circ$ foram realizados usando um ângulo de 180° no primeiro pulso e 10° nos n pulsos que compõem a sequência CP-CWFP-x-x. Curvas em linha contínua azul representam os valores de T^* calculados utilizando a Equação 13.

Com base nos resultados obtidos com o estudo da influência dos ângulos θ dos pulsos na constante de tempo T^* foi possível confirmar que a utilização da combinação de um pulso com ângulo de 180° espaçado por $\tau/2$ de uma sequência de n pulsos de 10° x e 10° -x foi

promissora para a determinação do valor aproximado da constante de tempo T_1 . Em virtude destes resultados, esta nova sequência de pulsos proposta passou a ser denominada de CWFP- T_1 , sendo o seu diagrama de pulsos apresentado na Figura 26. Nesta figura é possível notar que assim como os métodos CWFP x - x , os n pulsos de ângulos pequenos (indicados por θ) estão alternados com fase x e $-x$ e espaçados por tempo τ , sendo que, este tempo τ entre os pulsos segue a condição da sequência de pulsos CWFP: $T_2^* > \tau \ll T_2$. O ângulo da série de n pulsos foi designado como θ , porque podem ser utilizados ângulos menores que 10° , visto que quanto mais próximo de zero for θ maior a similaridade de T^* com a constante de tempo T_1 , conforme é previsto pela Equação 13. Não obstante, é preciso ter cautela com ângulos muito baixos ($>10^\circ$), pois quanto mais próximo de zero for o θ menor será a S/R. Além disso, por não ser possível utilizar experimentalmente $\theta = 0^\circ$ sempre haverá uma pequena diferença entre o valor de T_1 obtido pelo método CWFP- T_1 em relação ao determinado pela sequência de pulsos IR, sendo que, para um determinado ângulo θ , essa diferença tende a aumentar conforme a T_1/T_2 aumenta, visto que, a Equação 13 é dependente das constantes de tempo T_1 e T_2 .

Figura 26 – Esquema referente a sequência de pulsos CWFP- T_1 , onde θ representa ângulos pequenos de 10° ou 5° , τ o tempo entre os pulsos θ e n é o número de vezes que o pulso θ_x e θ_{-x} são repetidos.

A sequência de pulsos CWFP- T_1 é similar à técnica *single-scan Fourier transform* (SSFT), método proposto por Look e Locker e aperfeiçoado por Karpstein e colaboradores.^{9; 70} Ambas as técnicas são designadas para medir a constante de tempo T_1 , entretanto a CWFP- T_1 está sendo aplicada em RMN-DT e a SSFT foi empregada em RMN-AR. Apesar de serem utilizadas em diferentes áreas da RMN ambas as técnicas possuem sequências de pulsos similares: um pulso de 180° seguido por m pulsos com ângulos pequenos. Contudo, na técnica CWFP- T_1 , o ângulo dos pulsos da sequência de n pulsos é igual ou menor que 10° , enquanto que, na técnica SSFT, esse ângulo é geralmente 30° . Além disso, o método CWFP- T_1 segue a condição de onda contínua, ou seja, o τ respeita a condição $T_2^* < \tau \ll T_2$, sendo que este é da ordem de $300 \mu s$. Já na SSFT o tempo entre os pulsos é da ordem segundos (2,5 e 6 s). Ainda, pela sequência de pulsos CWFP- T_1 a constante de tempo T_1 é obtida diretamente pelo ajuste

semilogarítmico do sinal, enquanto que pelo método SSFT, além do ajuste semilogarítmico do sinal SSFT (T_1^*), é também necessário à aplicação da seguinte equação de correção: $1/T_1^* = 1/T_1 - \ln \cos(\theta) / \tau$, na qual θ é o ângulo dos pulsos que compõe uma série de n pulsos e τ o tempo entre os pulsos.⁷⁰

Com o intuito de expandir o estudo da sequência de pulsos CWFP- T_1 foi avaliado seu comportamento perante valores de T_1 longo e curto, bem como para diferentes razões T_1/T_2 . Para este fim utilizou-se as seguintes amostras: água deionizada e três soluções aquosas contendo complexos de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM, $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM e $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ 3,3 Mm. Estas soluções foram utilizadas por possuírem íons paramagnéticos, os quais na forma de aquacomplexos ou complexados com EDTA afetam na relaxação dos núcleos dos hidrogênios do solvente. O comportamento dos tempos de relaxação das espécies complexas utilizadas já se encontram consolidadas literatura^{65; 66}, sendo que estas foram escolhidas para este estudo por terem as características desejadas: T_1/T_2 que variam de 1 a 10 e valores de T_1 que abrangem o intervalo de 100 milissegundo a 3 segundos. Os resultados deste estudo estão apresentado na Tabela 2.

A análise das cinco soluções foi realizada em dois espectrômetros distintos: Minispec (20 MHz), cujo campo magnético é homogêneo quando comparado a espectrômetros de RMN-DT; e SLK 1399 (9 MHz), para o qual a homogeneidade de campo é inferior ao equipamento citado anteriormente. Para cada uma das cinco amostras, foi determinado o valor de T_1 pelas sequências de pulsos IR e CWFP- T_1 . Para a última sequência de pulsos foram realizados dois experimentos: um utilizando ângulo $\theta = 5^\circ$ e outro $\theta = 10^\circ$, sendo que, em ambos os casos a largura do primeiro pulso foi igual a 180° . Os valores de T_1 resultantes destas medidas estão dispostos na Tabela 2.

Analizando a Tabela 2 é possível notar que os valores de T_1 obtidos pela sequência de pulsos CWFP- T_1 são muito similares aos obtidos pela sequência de pulsos IR, mostrando assim que os resultados obtidos com a nova sequência de pulsos proposta são confiáveis. O método IR foi utilizado como comparativo por ser o método usualmente citado na literatura para mensuração da constante de tempo T_1 . Em geral, também foi observado na Tabela 2 que os valores de T_1 obtidos com o ângulo θ igual a 5° são mais próximos aos encontrados pelo método IR do que os obtidos utilizando o ângulos θ igual a 10° , corroborando com o que é previsto pela Equação 13. Além disso, os resultados obtidos com a sequência de pulsos CWFP- T_1 com ângulo $\theta = 10^\circ$ apresentaram um comportamento previsto pela Equação 13: o percentual de diferença do valor de T_1 mensurado pelo método CWFP- T_1 em relação ao determinado pelo método IR aumentou proporcionalmente com o aumento da T_1/T_2 da amostra. Esse mesmo efeito não foi

notável para os experimentos utilizando a sequência de pulsos CWFP- T_1 com $\theta = 5^\circ$, porque para este ângulo a diferença entre os valores de T_1 medido por ambas as técnicas (CWFP- T_1 e IR) é praticamente da ordem do erro da medida. Contudo, a sequência de pulsos CWFP- T_1 mostrou maior precisão que o método IR, visto que na maioria dos casos os desvios padrões dos experimentos obtido pela sequência de pulsos CWFP- T_1 foram inferiores aos obtidos pelo método IR.

Tabela 2 – Valores da constante de tempo T_1 mensuradas pelas sequências de pulsos IR, CWFP- T_1 com θ da sequência de n pulsos igual a 10° e 5° para água deionizada e soluções aquosas contendo os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,25 mM, $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ 3,3 mM e $[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$ 3,3 mM.

	<i>Amostras</i>	<i>T₁ IR (ms)</i>	<i>T₁ CWFP- T₁ ($\theta=5^\circ$)(ms)</i>	<i>T₁ CWFP-T₁ ($\theta=10^\circ$) (ms)</i>	<i>T₁/T₂</i>
Minispec	Água deionizada	2.818 ± 36	2.827 ± 18	2.812 ± 9	$\sim 1,1$
	$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	$103,0 \pm 0,3$	$103,0 \pm 0,1$	$102,0 \pm 0,1$	$\sim 1,1$
	$[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	$401,0 \pm 0,4$	$400,0 \pm 1,0$	$389,0 \pm 0,7$	$\sim 4,3$
	$[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$	$486,0 \pm 2,0$	$490,0 \pm 1,0$	$480,0 \pm 0,4$	$\sim 3,5$
	$[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$	$605,0 \pm 4,0$	$604,0 \pm 0,5$	$573,0 \pm 0,3$	$\sim 10,0$
SLK1399	Água deionizada	2.943 ± 88	2.881 ± 8	2.990 ± 11	$\sim 1,3$
	$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	$74,0 \pm 0,3$	$73,0 \pm 0,1$	$72,0 \pm 0,1$	$\sim 1,2$
	$[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	$200,0 \pm 2,0$	$195,0 \pm 0,5$	$189,0 \pm 0,4$	$\sim 2,7$
	$[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$	$542,0 \pm 5,0$	$522,0 \pm 1,0$	$502,0 \pm 0,2$	$\sim 1,9$
	$[\text{Cu}(\text{EDTA})(\text{NH}_3)(\text{OH})]^{3-}$	$344,0 \pm 1,0$	$340,0 \pm 1,0$	$301,0 \pm 1,0$	$\sim 10,0$

Tabela adaptada da referência⁶⁹.

Além de a sequência de pulsos CWFP- T_1 fornece resultados confiáveis, ela também requer menor tempo de experimento que a técnica IR. Isso é decorrente do fato de que a CWFP- T_1 determina T_1 em um único experimento e ainda não necessita de um *RD* de aproximadamente $5T_1$ (Figura 27 (a)), enquanto que o método IR, além de necessitar de vários experimentos para determinação de T_1 , ele ainda requer *RD* de aproximadamente $5T_1$ para que 99,9% da magnetização retorne ao equilíbrio.⁴ Desta forma, quanto maior for o T_1 menor será o tempo total de experimento da técnica CWFP- T_1 com relação ao método IR, uma vez que para este o *RD* será maior quanto maior for o valor da constante de tempo T_1 e como consequência maior será o tempo experimental total.

A técnica SR também é um método conhecido na literatura para determinação de T_1 , porém menos utilizado que o IR. O método SR, da mesma forma que a sequência de pulsos CWFP- T_1 , não requer um RD de aproximadamente $5T_1$, porém assim como o IR, requer vários experimentos para determinar T_1 conforme é possível comprovar em sua descrição na seção 2.1.2 da introdução. Desta forma, o método CWFP- T_1 também demanda menor tempo experimental que o método SR, já que possibilita a mensuração de T_1 em um único experimento.

Para reforçar o argumento de que a sequência de pulsos CWFP- T_1 é independente do tempo de espera entre *scans* e experimentos (*recycle delay* – RD) foi realizado um estudo utilizando uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM. Para este estudo foram realizados nove experimentos, nos quais o RD das sequências de pulsos CPMG e CWFP- T_1 foi espaçado logaritmicamente de $0,05T_1$ (0,0350 s) a $5T_1$ (3,5 s). Conforme já era esperado não houve diferença na faixa dinâmica do sinal para os diferentes tempos de espera (Figura 27 (a)). Isso decorre do fato de ter sido utilizado pulsos de ângulo pequeno (θ). Assim, a maior parte da magnetização já se encontra no equilíbrio térmico no final do experimento. Esse comportamento é uma vantagem da sequência de pulsos CWFP- T_1 , já que normalmente as outras sequências de pulsos são dependentes desse tempo, conforme é possível observar na Figura 27 (b), onde é mostrada a diminuição da faixa dinâmica do sinal adquirido pelo método CPMG conforme o RD se distancia de $5T_1$.

Figura 27 – Sinais obtidos para uma solução contendo o aquacomplexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM utilizando as sequências de pulsos CWFP- T_1 (a) e CPMG (b) com variação do RD de $0,05T_1$ (35 ms) a $5T_1$ (3,5 s).

Um exemplo de que a técnica CWFP- T_1 é mais rápida do que o método IR é exemplificado na determinação de T_1 para solução do aquacomplexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM.

Para essa análise pela técnica IR, com uma variação de τ_r de 0,003 a 6 s em 32 passos e com 4 *scans*, foi necessário um tempo de experimento de aproximadamente 10 minutos. Já pela CWFP- T_1 , utilizando 4 *scans* $\tau = 300 \mu s$ e 20.000 ecos, o tempo de experimento foi de aproximadamente 35 segundos. Entretanto, apesar de a CWFP- T_1 ser uma técnica rápida ela tem uma desvantagem que é a baixa S/R, conforme pode ser observado na Figura 28: em (a) são mostrados os sinais obtidos pela sequência CWFP- T_1 e pelo método IR para solução do aquacomplexo $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ 0,1 mM utilizando os parâmetros citados anteriormente. Como para o experimento de IR somente são obtidos valores referentes à intensidade do FID para cada valor de τ_r , a S/R deste método foi determinada pelo sinal FID obtido com a solução do aquacomplexo $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ 0,1 mM (Figura 28 (b)), sendo encontrado um valor de aproximadamente 240. Para esta solução a S/R do método CWFP- T_1 demonstrou ser aproximadamente sete vezes inferior que a S/R do sinal FID. Na literatura já são conhecidos alguns artifícios para melhorar a S/R do sinal de RMN,⁴⁶ sendo que alguns desses processamento e seus efeitos nas sequências de pulsos CWFP- T_1 e CPMG são discutidos na seção 5.2.

Figura 28 – Em (a) são mostrados os sinais obtidos pelas sequências de pulsos CWFP- T_1 (sinal em preto) e pelo método IR (bolinhas e linha vermelha) e em (b) é apresentado o sinal do FID. Todos esses sinais foram obtidos para uma solução contendo o aquacomplexo $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ 0,1 mM e utilizando 4 *scans*.

Fonte: figura adaptada da referência⁶⁹.

5.2 Aplicação de métodos para redução do ruído em sinais adquiridos pelos métodos CWFP- T_1 e CPMG

Assim como em outros métodos espectroscópicos, na RMN-DT a banda do sinal e a banda do ruído sobrepõem-se. Esse fato pode acarretar na ocultação de algumas informações em certos casos onde a intensidade do ruído é muito alta. Por isso, é comum a utilização de

filtros em diversas técnicas espectroscópicas para aumentar a S/R, entretanto, na RMN-DT esses artifícios ainda são poucos utilizados. Por esse motivo, no presente trabalho, foram estudados cinco métodos de atenuação de ruído em sinais CPMG e CWFP- T_1 .

Nos espectrômetros de RMN já são usados filtros analógicos ou digitais para a supressão do ruído fora da região espectral ou região de interesse. Entretanto, esses filtros geralmente são ajustados para uma banda de passagem bem maior do que a largura espectral. Normalmente, a largura de banda dos filtros analógicos ou digitais do espectrômetro é definida por cerca de duas ordens de magnitude da largura da banda do sinal, nesse caso largura do FID, a fim de evitar distorções. Na Figura 29 (a) – sinal em azul (escala de tempo inferior) é ilustrado o sinal FID para uma solução contendo o complexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,02 mM com uma relaxação transversal efetiva (T_2^*) de 0,5 ms. Para o caso dessa amostra, a TF do FID apresenta uma banda larga com uma largura à meia altura de 650 Hz, conforme é mostrado na Figura 29 (b) – sinal em azul (escala de frequência inferior). Para a aquisição dos sinais de eco e CWFP a largura da banda dos filtros digitais ou analógicos dos espectrômetros também é ajustada de forma similar à apresentada para o FID para evitar supressão de parte do sinal de RMN.

Figura 29 – (a) Sinal FID (sinal azul) e sinal obtido com o método CPMG (sinal vermelho) utilizando uma solução contendo complexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,02 mM, cujo $T_2^* = 0,5$ ms e $T_2 = 680$ ms. (b) Transformada de Fourier do sinal FID (em azul) e do sinal obtido com o método CPMG (em vermelho), demonstrado na (a), sendo que as respectivas larguras à meia altura da banda espectral da TF desses sinais são de 650 Hz e 0,47 Hz.

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

Contudo, após a aquisição os sinais obtidos com as sequências de pulsos CPMG e CWFP- T_1 passam a ser governados pelo decaimento de T_2 ou de T_1 , respectivamente. Como esses decaimentos são mais longos que T_2^* , consequentemente, mais estreita é a banda do espectro obtido pela TF desses sinais. A Figura 29 (b) (sinal vermelho - escala de tempo superior) mostra um exemplo de espectro obtido pela TF de um sinal CPMG adquirido

utilizando uma solução contendo o complexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,02 mM, cujo $T_2 = 680$ ms (Figura 29 (a) - sinal vermelho - escala de tempo superior). Para este caso, o espectro da TF do sinal CPMG é mais de três ordens de grandeza mais estreito do que a largura do espectro para o sinal FID. Isso torna possível a utilização de filtros digitais após a aquisição dos sinais com uma banda de passagem de várias ordens de grandeza mais estreita da que foi usada no espectrômetro antes da aquisição do sinal. Consequentemente, a utilização de filtros digitais após a aquisição permite uma maior atenuação do ruído, sem perdas de informação do sinal. Maiores detalhes sobre a aplicação do filtro digital após a aquisição do sinal são discutidos na seção 5.2.2.

5.2.1 – Pré-processamento do sinal adquirido pelo método CWFP- T_1

Os sinais obtidos pelo método CWFP- T_1 passaram por dois pré-processamentos para que pudesse ser obtida a distribuição de tempo de T_1 utilizando a mesma equação núcleo utilizada no método CPMG (Tabela 1). O primeiro pré-processamento foi o ajuste de fase do sinal de tal forma a se obter um sinal que decai exponencialmente. Como o sinal CWFP- T_1 representa um crescimento exponencial, esse requisito pode ser obtido multiplicando o sinal CWFP- T_1 por menos um, ou ainda, a fase do receptor pode ser ajustada de forma a se adquirir um sinal CWFP- T_1 no formato de decaimento exponencial, conforme é mostrado na Figura 30 (a). O outro pré-processamento aplicado ao sinal CWFP- T_1 é a correção de *offset*, o qual é realizado pela soma de um valor satisfatório que transforme o sinal CWFP- T_1 em um decaimento exponencialmente a zero, conforme ilustrado na Figura 30 (b).

Figura 30 – Pré-processamento do sinal CWFP- T_1 : (A) componente real do sinal após a correção de fase adequada para obter um decaimento exponencial; e (B) sinal após a correção do *offset*.

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

5.2.2 – Análise de um sistema composto por três soluções aquosas

Para estudar o comportamento dos filtros digitais foi montado um sistema composto por três soluções, conforme o esquema apresentado na Figura 21 (b) na seção 4.1. Em cada tubo de 3 mm continha 500 μL de uma solução aquosa contendo um dos seguintes complexos: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 mM (T_1) e $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM (T_2) e 0,125 mM (T_3). Os sinais brutos (BR) e filtrados obtidos por essas sequências de pulsos estão apresentados nas Figura 31 (a) e Figura 32 (a), respectivamente, sendo que as respectivas distribuições dos tempos de relaxação desses sinais estão mostradas nas mesmas figuras em (b).

Os tempos de relaxação T_1 e T_2 foram medidos para cada solução isolada e seus valores foram determinados pelo ajuste discreto dos sinais individuais, sendo estes resultados indicados pelas linhas tracejadas na Figura 31 (b) e Figura 32 (b). Conforme apresentado nessas figuras, a solução complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 mM apresentou $T_1 \sim T_2$ ($T_{11} \sim T_{21} = 0,021$ s) e as soluções contendo complexo $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM e 0,25 mM exibiram valores de T_1 ($T_{12} = 0,130$ s e $T_{13} = 0,520$ s) aproximadamente quatro vezes maior que o de T_2 ($T_{22} = 0,03$ s e $T_{23} = 0,130$ s). Esse sistema, composto por três componentes, foi utilizado a fim de simular uma amostra com multicomponentes, visto que as amostras com um ou dois tempos de relaxação são simples de serem analisadas por meio de ajustes exponenciais.¹⁷ Além disso, por ter sido utilizada a mesma quantidade (500 μL) de cada uma das três soluções, que compõem o sistema em estudo, esperava-se obter com a distribuição dos tempos de relaxação T_1 e T_2 três sinais de mesma proporção de área (1:1:1).

Os sinais BR apresentados na Figura 31 (a) e Figura 32 (a) foram obtidos pela aquisição de um ponto na metade do tempo entre dois pulsos consecutivos das sequências de pulsos CWFP- T_1 e CPMG, respectivamente. Conforme já era o esperado o sinal BR obtido com a sequência CPMG tem uma S/R 6,5 vezes maior ($S/R=130$) quando comparada com o sinal BR adquirido pela sequência de pulsos CWFP- T_1 ($S/R=20$). Tal fato é decorrente de que na última sequência de pulsos foram utilizados pulsos de ângulos pequenos, acarretando sinais de baixa intensidade. Entretanto, na sequência de pulsos CWFP- T_1 , a intensidade do sinal é constante entre dois pulsos consecutivos, tornando possível a aquisição de mais de um ponto entre dois pulsos. Utilizando-se desse artifício foi realizado um experimento, no qual foram adquiridos 64 pontos durante cada τ . Posteriormente, foi feita a média de cada conjunto de 64 pontos, sendo obtido o sinal apresentado na Figura 31 (a) com a denominação ME (média), cuja S/R é 42, esse procedimento proporcionou um aumento da S/R em aproximadamente duas vezes em relação ao sinal CWFP- T_1 BR. Ressalta-se que na sequência de pulsos CPMG não é

recomendada a aquisição de vários pontos entre os pulsos, visto que somente no centro do eco ($\tau/2$) a intensidade do sinal é independente da homogeneidade do campo magnético. Por essa razão, para a sequência de pulsos CPMG foi adquirido somente um ponto em $\tau/2$, sendo denominado o resultando dessa aquisição de sinal CPMG bruto (BR).

Figura 31 – (a) - Sinais CWFP- T_1 bruto e filtrados e suas respectivas ILT (b) obtidos para uma amostra composta por três soluções aquosas contendo os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 mM (T_{11}), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM (T_{12}), e 0,125 mM (T_{13}); (a) BR é o sinal CWFP- T_1 adquirido, denominado de sinal bruto; ME é o sinal CWFP- T_1 após realizar a média do conjunto de 64 pontos adquiridos durante cada τ ; PB é o sinal CWFP- T_1 ME filtrado usando o filtro passa banda com uma largura de banda de ± 200 Hz; LI e LO são a compressão do sinal CWFP- T_1 ME em dez vezes utilizando métodos de compressão linear e logarítmico, respectivamente; SG é o sinal CWFP- T_1 ME filtrado utilizando o método Savitzky-Golay de 2ª ordem com um subconjunto de 41 pontos e WA é o sinal CWFP- T_1 ME filtrado utilizando o método *wavelet* com uma onda Symlet do tipo Sym8 e uma decomposição de nível 5. As linhas verticais pontilhadas em vermelho em (b) indicam os valores de T_1 individuais para cada solução.

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

Na Figura 31 (b), pela ILT do sinal CWFP- T_1 BR, não foi possível separar os três picos correspondentes aos três valores do tempo de relaxação T_1 , sendo visível apenas uma banda larga resultante da sobreposição das três componentes. Esse fato é decorrente da baixa S/R do sinal CWFP- T_1 BR, pois, como já é conhecido na literatura, devido a ILT ser um problema mal condicionado essa acaba sendo instável frente a alguns fatores. A S/R é um desses fatores que afeta a ILT, levando redução da resolução conforme a S/R é diminuída.¹⁷ Dessa forma, a resolução aumenta proporcionalmente ao aumento S/R, conforme pode ser comprovado na ILT do sinal CWFP- T_1 ME. Nesse caso, devido à S/R ser aproximadamente o dobro em relação ao

sinal CWFP- T_1 BR, já há uma melhora na resolução na distribuição de T_1 , com relação a ILT do sinal CWFP- T_1 BR, sendo possível realizar a distinção dos três picos referente a distribuição de T_1 . Todavia os valores de T_1 não correspondem exatamente aos valores reais indicados pela linha vermelha tracejada (Figura 31 (b) – CWFP- T_1 ME).

Figura 32 – (a) - Sinais CPMG bruto e filtrados e suas respectivas ILT (b) obtidos para uma amostra composta por três soluções aquosas contendo os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 50 M (T_{21}), $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 1 mM (T_{22}), e 0,125 mM (T_{23}); (a) BR é o sinal CPMG adquirido, denominado de sinal bruto; PB é o sinal CPMG BR filtrado usando o filtro passa baixa com uma largura de banda de ± 200 Hz; LI e LO são a compressão do sinal CPMG BR em dez vezes utilizando métodos de compressão linear e logarítmico, respectivamente; SG é o sinal CPMG BR filtrado utilizando o método Savitzky-Golay de 2ª ordem com um subconjunto de 41 pontos e WA é o sinal CPMG BR filtrado utilizando o método *wavelet* com uma onda Symlet do tipo Sym8 e uma decomposição de nível 5; As linhas verticais pontilhadas em vermelho em (b) indicam os valores de T_1 individuais para cada solução.

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

Conforme já esperado a ILT do sinal CPMG BR apresentou uma resolução superior à do sinal CWFP- T_1 BR e ME devido a sua S/R do seu sinal ser 130 (Figura 32 (a)). Não obstante, apesar desta melhora na resolução, na ILT do sinal CPMG BR somente dois picos estão presentes, ou seja, não foi possível separar as três distribuições de T_2 pertencentes às três soluções (Figura 32 (b)). Nessa ILT a área do pico com tempo de relaxação T_2 mais curto é aproximadamente duas vezes maior do que a área do pico com maior tempo de relaxação T_2 , indicando que T_{21} e T_{22} estão completamente sobrepostos. Ao contrário do que ocorreu com o sinal CWFP- T_1 a aplicação de filtro não resolveu os três picos referentes à distribuição de T_2 ,

apenas reduziu a largura da linha, conforme pode ser observado na Figura 32 (b). Esses resultados estão de acordo com a literatura, ou seja, a ILT não consegue resolver picos que estão separados por uma distância de $\lambda \leq 0,2$, mesmo para altos valores de S/R.¹⁷ Onde λ é a diferença entre o $\log_{10}$ do tempos de relaxação mais longo e mais curto, ou seja, neste caso é a diferença entre o $\log_{10}$ do tempos de relaxação T_{22} (0,03 s) e T_{21} (0,021 s) resultando em λ de 0,15, valor este inferior ao do limite de resolução da ILT.¹⁷

O primeiro método de filtragem estudado foi o filtro digital da classe IIR do tipo PB. A Figura 33 (a) mostra o efeito da aplicação desse filtro no sinal CWFP- T_1 utilizando uma banda de corte de ± 200 Hz. As oscilações no início do sinal da Figura 33 (a) estão em concordância com a literatura, a qual prevê que filtros digitais da classe IIR podem causar distorções de fase, as quais possibilitam o surgimento de oscilações no início do sinal no domínio do tempo.⁵² Entretanto, essas oscilações precisam ser removidas antes do sinal ser processado pela ILT, visto que essas geram picos inexistentes no espectro de distribuição do tempo de relaxação. A parte do sinal que se aconselha apagar na Figura 33 (a) está indicada pela linha vertical tracejada, contudo, se estas oscilações forem removidas, a área e os valores das componentes com menores valores de distribuição dos tempos de relação T_1 ou T_2 serão afetadas, conforme é abordado na discussão da Figura 34 (a). Diante disso, um recurso para corrigir essas distorções, sem ser necessário remover os pontos iniciais do sinal, é a utilização do método zero-fase forward-backward associado ao filtro digital IIR. Conforme pode ser comprovado na Figura 33(b) o método de correção de fase resolve o problema da oscilação no início do sinal CWFP- T_1 ME.

Figura 33 – Sinal CWFP- T_1 ME após a aplicação do filtro digital passa banda (PB) de resposta de impulso infinito (IIR) usando uma largura de banda de corte de ± 200 Hz sem (a) e utilizando (b) o método de correção de fase *forward-backwards*. A linha vertical tracejada em (a) indica parte do filtro que precisa ser cortada para evitar distorções na ILT.

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

Tanto os sinais (a) quanto as distribuições do tempo de relaxação (b), mostradas nas Figura 31 e Figura 32 para o filtro PB, são provenientes da aplicação do filtro PB da classe IIR associados ao método de correção de fase *forward-backwards*. Esse método de filtragem melhorou a S/R dos sinais CWFP- T_1 e CPMG em aproximadamente seis e quatro vezes, respectivamente. Consequentemente, a resolução dos espectros de distribuição dos tempos de relaxação também aumentaram, no caso dos espectros de distribuição de T_1 (Figura 31 (b)), o aumento da resolução permitiu identificar os três picos correspondentes às três soluções em estudo. Além disso, as áreas desses três picos (0, 92:1, 0:0,98) se assemelham aos valores reais (1:1:1). Já no caso da distribuição de T_2 (Figura 32 (b)) a utilização do filtro PB somente diminuiu a largura de linha dos picos, o que indica um ganho na resolução quando comparado com a distribuição de T_2 do sinal CPMG-RA. Porém, não foi possível separar os dos picos referente aos sinais T_{21} e T_{22} devido a proximidades destes sinais ($\lambda \leq 0,2$).

Contudo, quanto menor for o tamanho da banda de passagem do filtro PB maior será o aumento da S/R; todavia, as oscilações iniciais do sinal também serão mais intensas. Esse efeito pode ser observado no sinal de linha contínua, mostrado na Figura 34 (a), o qual foi obtido pela aplicação do filtro PB-IIR no sinal CWFP- T_1 utilizando uma banda de corte ± 20 Hz. Na mesma figura é possível observar que a amplitude das oscilações e a propagação delas no decorrer do eixo x são maiores que as apresentadas na Figura 33 (a), na qual foi utilizada uma passa banda de ± 200 Hz. Consequentemente, esse aumento das oscilações no sinal CWFP- T_1 também afeta o espectro de distribuição dos tempos de T_1 . A Figura 34 (b) mostra o que ocorre no espectro de distribuição de tempo T_1 quando removemos a quantidade de pontos indicada pela linha vertical pontilhada na Figura 34 (a). Na Figura 34 (b) é possível observar que o pico referente a componente com menor valor de T_1 foi totalmente eliminado e ainda a área e o valor de T_1 da componente com valor de $T_1 = 130$ ms foi reduzida, efeito que tende a ser cada vez mais intenso quanto menor for a banda de corte do filtro PB.

A associação do método de correção de fase *forward-backwards* ao filtro digital PB-IIR com banda de passagem de ± 20 Hz removeu as oscilações iniciais do sinal CWFP- T_1 , conforme é demonstrado na Figura 34 (a) pelo sinal de linha pontilhada. Entretanto, apesar de não ter oscilações iniciais, o sinal resultante desse processo apresenta um decaimento mais abrupto nos primeiros 0,025 s em relação ao sinal CWFP- T_1 real mostrado na Figura 31 (a). Além disso, a ILT do sinal representado, na Figura 34 (a), pelo sinal de linha pontilhada apresentou distorções tanto na área quanto nos valores de todas as componentes de T_1 conforme pode ser observado na Figura 34 (c). Essas distorções são decorrentes da utilização de bandas de corte muito estreitas no filtro PB, a qual acaba eliminando não somente ruído como também

parte do sinal com informação de interesse. Em decorrência desse fato, podemos dizer que os filtros digitais PB são sensíveis ao tamanho de banda de corte escolhida. Dessa forma, para uma banda de corte muito grande a S/R não terá um aumento muito grande, em contrapartida, se a banda de corte for muito pequena as informações sobre a amostra serão distorcidas. No caso desse estudo, a banda de corte de 200 Hz mostrou ser adequada para filtrar o ruído sem distorcer as informações do nosso sistema em análise.

Figura 34 – (a) Sinal CWFP- T_1 ME após a aplicação do filtro PB – IIR, utilizando uma banda de corte 20 Hz, sem (sinal com linha contínua) e com (sinal pontilhado) o método de correção de fase forward-backward, com suas respectivas distribuições de tempo em (b) e (c). A linha vertical pontilhada (a) indica a região em que o sinal CWFP- T_1 filtrado sem o método de correção de fase é deletada a fim de remover as oscilações iniciais e a linha tracejada em (b) indicam os valores de T_1 individuais para cada solução (T_{11} , T_{12} e T_{13}).

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

A compressão dos dados foi outro método utilizado neste trabalho para melhorar a S/R dos sinais CWFP- T_1 ME e CPMG RA, os quais foram comprimidos logaritmicamente (LO) e linearmente (LI) dez vezes, resultando nos sinais CWFP- T_1 LI e LO e CPMG LI e LO apresentados na Figura 31 (a) Figura 32 (a), respectivamente. O aumento da S/R dos sinais CWFP- T_1 ME e CPMG BR pelo método de compressão LI foi de aproximadamente cinco e três vezes, enquanto que pelo método de compressão LO esse aumento foi de aproximadamente quatro e duas vezes, respectivamente. Apesar de ambos os métodos de compressão terem melhorado a S/R, o método LO demonstrou menor ação sobre o ruído. Isso ocorre, porque a intensidade do ruído está distribuída de forma desigual no decorrer do sinal comprimido LO, visto que o número de pontos do sinal é comprimido LO e decai logaritmicamente no decorrer do sinal, resultando em um sinal com mais pontos no início e menos pontos no final. Dessa forma, como o número de pontos está associado não somente ao sinal de interesse mas também ao ruído, na compressão LO, temos um sinal mais ruidoso no início e com uma atenuação maior do ruído no final.⁴⁶ Assim, a intensidade do ruído no início do sinal comprimido LO contribuiu

para que esse apresentasse uma menor S/R do que os sinal comprimido LI, uma vez que a S/R é calculada baseando-se no desvio padrão médio do ruído sobre toda a extensão do sinal.

Apesar de o sinal comprimido LO ter menor S/R que o LI, a distribuição de T_1 do sinal CWFP- T_1 LO apresentou maior resolução do que a distribuição de T_1 do sinal CWFP- T_1 LI. Isso é consequência de o sinal comprimido LO ter maior quantidade de pontos na região em se concentra grande parte da informação do sistema, que é a parte inicial do sinal. Além disso, os valores de T_1 obtidos pela compressão LO apresentam maior similaridade aos valores reais do que os obtidos pela compressão LI. Entretanto, em ambos os métodos de compressão, as razões das áreas dos três picos da distribuição de T_1 são similares às esperadas para o sistema em análise (1:1:1). Por outro lado, a distribuição de T_2 dos sinais CPMG LI e LO apresentaram resoluções semelhantes. Contudo, apesar de os dois picos apresentarem largura de linha reduzida em relação ao sinal CPMG BR, os picos T_{21} e T_{22} ainda se encontram sobrepostos pelo mesmo motivo já discutido anteriormente.

Quanto maior for o nível de compressão do sinal, maior será o aumento da S/R. Porém, é preciso ter prudência na proporção da compressão dos dados, visto que sinais muito comprimidos podem acabar perdendo ou distorcendo informações reais dos sinais, conforme é exemplificado na Figura 35 pela ILT do sinal CWFP- T_1 ME comprimido LI 500 vezes. Nesse caso é possível observar que o pico T_{11} foi suprimido totalmente e, ainda, o valor do tempo de relaxação do pico T_{12} sofreu distorções. Diferentemente da compressão LI, a compressão LO do sinal CWFP- T_1 ME em 500 vezes quase não gerou distorção e não resultou em perdas de informações na distribuição de T_1 (Figura 35 – ILT LO), entretanto ocorreu uma perda de resolução devido a redução do número de pontos do sinal.

O filtro Savitzky-Golay também foi um dos métodos estudados para filtrar os sinais CWFP- T_1 ME e CPMG RA, sendo que os resultados da aplicação deste filtro utilizando um polinômio de 2ª ordem e um subconjunto de 41 pontos são demonstrados nos sinais CWFP- T_1 SG e CPMG SG da Figura 31 (a) e da Figura 32 (a), respectivamente. A aplicação desse filtro proporcionou o aumento da S/R do sinal CWFP- T_1 para 363, como consequência, o espectro de distribuição de T_1 para o sinal CWFP- T_1 SG demonstrou resolução suficiente para separar completamente os três. Além disso, os valores de T_1 e as áreas dos três picos, obtidos com a ILT do sinal CWFP- T_1 SG, são semelhantes aos valores reais. Sinais ainda menos ruidosos podem ser obtidos com o filtro SG se o número do subconjunto de pontos for aumentado. Contudo, é preciso ter cautela na escolha do tamanho do subconjunto de pontos, visto que um subconjunto de pontos muito grande pode distorcer as informações do sistema em estudo, conforme é exemplificado na Figura 35 pela ILT SG, a qual foi obtida pela inversão do sinal

CWFP- T_1 ME filtrado pelo método SG utilizando um polinômio de 2ª ordem e um subconjunto de 501 pontos. Nesse caso foi possível comprovar que subconjunto de 501 pontos gerou distorções nos valores de T_1 dos picos T_{11} e T_{12} .

Figura 35 – Distribuições de T_1 obtidas pela ILT do sinal CWFP- T_1 ME filtrado. LI e LO correspondem à compressão linear e logarítmica em 500 vezes; SG representa a aplicação do filtro Savitzky-Golay de 2ª ordem utilizando um subconjunto de 501 pontos. WA refere-se à aplicação do filtro *wavelet* utilizando a função Sym8 e nível de decomposição igual a nove. As linhas verticais tracejadas indicam os valores de T_1 individuais para cada solução (T_{11} , T_{12} e T_{13}).

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

A aplicação do filtro SG no sinal CPMG RA aumentou a S/R desse sinal em aproximadamente seis vezes (Figura 31 (b) - SG). Isso fez com que a distribuição de T_2 SG apresentasse uma resolução um pouco superior a encontrada pelo filtro PB-IIR e pelos métodos de compressão LI e LO. Porém, similar aos outros filtros, na ILT-SG os picos T_{21} e T_{22} se mantiveram sobrepostos.

O último filtro estudado neste trabalho foi o *wavelet* (WA), que já vem sendo aplicado para a redução de ruído em sinais de relaxação transversal advindo da análise de meios porosos.^{59; 72} Neste trabalho o filtro WA foi aplicado utilizando a TDW, a função Sym8 e um limiar de corte universal.⁷³ Os sinais CWFP- T_1 ME e CPMG RA filtrados por esse método estão apresentados na Figura 31 (a) e Figura 32 (a) representados pela sigla WA.

O filtro WA foi o que teve maior efeito sobre o ruído dos filtros analisados neste trabalho, sendo que ele aumentou a S/R dos sinais CWFP- T_1 ME e CPMG RA em aproximadamente seis e sete vezes, respectivamente. Como observado nos outros filtros a

resolução não foi suficiente para separar os picos T_{21} e T_{22} (Figura 32 (b) - WA). Todavia, a distribuição de T_1 para o sinal CWFP- T_1 WA apresentou picos com larguras de linhas mais estreitas que os outros métodos de filtragem, ademais, a distribuição de T_1 para o filtro WA apresentou valores de T_1 e áreas muito similares aos reais.

Da mesma forma que os outros filtros a aplicação do WA deve ser realizada com prudência a fim de evitar distorções das informações. A ILT WA da Figura 35 demonstra a aplicação do filtro WA, no sinal CWFP- T_1 ME, utilizando a função Sym8 e nível de decomposição nove (máximo nível de decomposição desta função). Na figura é possível observar que o valor de distribuição de T_1 do pico T_{11} se desloca para valores maiores que o real, demonstrando assim que este nível de decomposição é inadequado para filtrar o sinal CWFP- T_1 ME.

É importante ressaltar que neste estudo os tempos de relaxação foram invertidos utilizando o método BRD para otimizar a escolha do α ótimo. Contudo, se o parâmetro de regularização α for forçado para valores pequenos é possível melhorar a resolução sem aumentar a S/R. No entanto, como é conhecido na literatura, quando o α é forçado a valores pequenos em sinais muito ruidosos artefatos podem surgir possibilitando falsas interpretações dos resultados.⁵⁹ Ainda, em sinais muito ruidosos, como o caso do sinal CWFP- T_1 RA, mesmo utilizando alfas inferiores ao fornecido pelo método BRD não foi possível resolver os três picos. Por fim, é importante destacarmos que os resultados do efeito da S/R na ILT, apresentados até o momento, são baseados em uma amostra simples composta por três soluções. Porém, conforme o sistema vai tornando-se mais complexo, como por exemplo em rochas, mais intensas são as distorções nas ILT de sinais ruidosos e, dessa forma, mais importante se torna obter uma boa S/R a fim de se obter um resultado verdadeiro.⁵⁹

5.2.3 Análise da gordura em carne bovina utilizando os sinais filtrados CWFP- T_1 e CPMG

As sequências de pulsos CPMG, IR, CWFP e CWFP- T_1 têm sido empregadas intensivamente para estudos de características físicas, químicas e sensorial de carne.^{74; 75; 76; 77} Nesses estudos, a aplicação do filtro WA, de função Sym8 e nível de decomposição igual a cinco, foi utilizada para analisar amostras de carne bovina com diferentes teores de gordura. Esse filtro foi selecionado para análise, porque é um dos métodos discutidos na seção anterior que se demonstrou maior atuação sobre o ruído e ao mesmo tempo não distorceu as informações sobre o sistema em análise. Nesse estudo, a aquisição do sinal CWFP- T_1 ocorreu da mesma maneira citada anteriormente para obtenção CWFP- T_1 ME, por isso, nesta seção os sinais CWFP- T_1 também serão designados de CWFP- T_1 ME. As ILTs desses sinais obtidos com as

amostras de carne bovina, com (sinais de linha de cor azul) e sem (sinais tracejados de cor preta) aplicação do filtro WA, estão apresentadas na Figura 36 (a) e (b), respectivamente. Nesta figura o teor de gordura aumenta nas amostras de (i) para (iii): carne magra (CM-i), carne com baixo teor de gordura (CBTG-ii), carne com alto teor de gordura (CATG-iii) (1:1 – carne: gordura), e gordura pura (GP-iv).

Para todas as amostras de carne bovina e de gordura bovina, os sinais CPMG e CWFP-T₁-ME apresentaram razões S/R similares: aproximadamente 160 e 20, respectivamente. A aplicação do filtro WA proporcionou um aumento de aproximadamente 10 vezes na S/R do sinal de ambas as sequências de pulsos. Levando-se em consideração que para obter os sinais CPMG e CWFP-T₁-ME foram utilizadas quatro *scans*, para obter uma resolução equivalente à proporcionada pelo filtro WA foi necessário realizar experimentos com 512 *scans*, o que demanda longos tempos experimentais.

Conforme é possível observar na Figura 36 (i-linha contínua azul), a aplicação do filtro WA, apesar de aumentar a S/R, não melhorou muito a resolução das ILT de ambos os sinais CPMG e CWFP-T₁-ME obtidos com a amostra de CM. Neste caso, o filtro WA afetou ligeiramente a largura de linha dos espectros, os picos ficaram levemente mais estreitos e as componentes que se encontravam em baixa concentração foram realçadas. Resultados similares a esses são conhecido na literatura: o aumento da S/R não tem grande impacto sobre a resolução da ILT para espectros de uma componente.¹⁷

A aplicação do filtro WA não causou grandes alterações, de modo geral, nas distribuições de tempo T₂ das amostras de carne bovina (Figura 36 (b-i e b-iii)) e tampouco na amostra de gordura bovina (Figura 36 (b-iv)). Isso ocorreu porque o sinal CPMG já apresenta uma boa S/R. Por outro lado, a ILT do sinal CWFP-T₁-ME das amostras com CATG e GP foram fortemente afetadas pelo filtro WA. As ILT do sinal CWFP-T₁-ME dessas amostras sem filtro são uma banda larga (Figura 36 (a-iii e a-iv) - linha preta tracejada) que não possibilita distinguir as diferentes componentes da amostra. Já a ILT do sinal filtrado (Figura 36 (a-iii e – a-iv) - linha contínua azul) permitiu resolver as componentes presentes nas amostras, o que indica que os filtros são métodos vantajosos, visto que possibilitam alcançar uma boa resolução na distribuição dos tempos de relaxação mesmo quando os sinais apresentam baixa S/R.

Vários estudos têm demonstrado que o tempo de relaxação transversal tem grande potencial para o estudo de carnes.^{76; 77; 78} Bertram et al. encontraram que a ILT dos sinais CPMG obtidos com amostras de carne de porco apresentam três picos diferentes que estão correlacionados aos diferentes ambientes em que a água se encontra: água ligada a proteínas (T₂₁ ~ 1- 10 ms), água presa dentro de miofibrilas (T₂₂ ~ 40 – 60 ms) e água fora das células

musculares ($T_{23} \sim 150 - 400$ ms).⁷⁷ A ILT dos sinais obtidos com a sequência de pulsos CPMG para todas as amostras de carne bovina e para a amostra de gordura bovina também possibilitaram identificar três picos correlacionados com os hidrogênios da água/lipídios em diferentes ambientes. A presença de água e lipídios na CM e na GP foi comprovada por experimentos de RMN-AR discutidos na seção 5.4.

Figura 36 – Distribuição dos tempos de relaxação T_1 e T_2 obtidos pela ILT dos sinais CWFP- T_1 ME (a) e CPMG RA (b) sem (linha tracejada preta) e com filtro WA (linha contínua azul). Estes sinais foram adquiridos para amostras de carne bovina com diferentes teores de gordura: (i) carne magra (CM), (ii) carne com baixo teor de gordura (CBTG) e (iii) carne com alto teor de gordura (CATG-1:1 – carne:gordura) e (iv) para uma amostra gordura bovina pura (GP).

Fonte: figura adaptada da referência⁷¹. Com permissão de John Wiley and Sons.

Não há relatos na literatura sobre a determinação do teor de gordura em carne bovina utilizando a relaxação transversal. Contudo, de acordo com o espectro de T_2 foi possível constatar que as áreas das três componentes da CM aumentam de acordo com o aumento da quantidade de gordura nas amostras (Figura 36 (b de i para iv)). Além disso, os valores das componentes T_{21} e T_{23} , que possuem valores iguais a 6 e 181 ms para a amostra de CM (Figura 36 (b-i)), vão se deslocando para valores mais próximos aos da GP ($T_{21} = 12$ ms e $T_{23} = 157$ ms - Figura 36 (b-iv)), conforme o teor de gordura aumenta nas amostras. Em contrapartida, apesar de a área da componente T_{22} aumentar com o aumento da gordura, seu valor permanece praticamente constante entre as amostras de carne com diferentes teores de gordura e a gordura (~ 45 ms). Isso significa que tanto a água presa na miofibrila quanto a gordura apresentam o mesmo valor para a componente T_{22} .

Renou et al., utilizando a sequência de pulsos IR, também encontraram em amostras de carne bovina três componentes associadas a relaxação longitudinal em 10 ms (T_{11}), 100 ms (T_{12}) e entre 300 a 500 ms (T_{13}).⁷⁵ Como o principal objetivo dos autores nesse estudo era determinar o teor de gordura presente em carne, a componente T_{11} foi desconsiderada no estudo, visto que está se refere à água ligada à proteína. As outras duas componentes T_{12} e T_{13} foram associadas à gordura e à água fora das células musculares, respectivamente. As distribuições de T_1 obtida pela ILT do sinal CWFP- T_1 -ME filtrado (Figura 36 (a) linha contínua azul) para as quatro amostras também demonstraram a presença de três componentes. Nas amostras de CM (i) e CBTG (ii) há dois picos com áreas relativamente baixas que se encontram em aproximadamente 25 ms (T_{11}) e 85 ms (T_{12}) e um outro pico com área predominante no espectro em aproximadamente 370 ms (T_{13}). Nas amostras de CATG (iii) e de GP (iv) o T_{13} diminuiu para 350 ms e 314 ms, respectivamente, e o valor da componente T_{12} de ambas as amostras aumentou para aproximadamente 100 ms. Além do mais, a área do pico T_{12} da amostra de CATG (iii) se torna maior que a área do pico T_{13} e ainda na amostra de GP (iv) a área do pico T_{12} se torna quatro vezes superior que a do pico T_{13} . Esses resultados estão de acordo com o estudo de Renou et al., visto que a área do pico T_{12} aumenta de acordo com o aumento da gordura, indicando sua correlação com a gordura, e ainda, o pico T_{13} diminuiu conforme o teor de carne na amostra for diminuindo, mostrando sua correlação com a gordura e água fora das células musculares.

No estudo reportado por Renou et al. os autores encontraram uma correlação entre a população (P_a) de T_1 e o conteúdo de gordura (CG), determinado pelo método Soxhlet. A equação de correlação linear encontrada pelos autores foi $CG = 1,06 P_a + 0,3$, cujo valor de P_a foi calculado pela equação: $P_a = (100 \times A) / (A + B)$, na qual A e B são a amplitude das componentes T_{12} e T_{13} , respectivamente. Utilizando a equação de correlação encontrada por Renou et al. e substituindo as amplitudes das componentes T_{12} e T_{13} pelas áreas destes picos, obtidas pela ILT do sinal CWFP- T_1 - ME filtrado por WA (Figura 36 (a) – linha contínua azul) foi determinado o teor de gordura aproximada das amostras de carnes e da amostra de GP. Os resultados obtidos desse cálculo indicam que as amostras de CM, CBTG, CATG e GP têm um teor de gordura aproximado de 3, 20, 62 e 85%, respectivamente. As percentagens de gorduras para as amostras de CM (Figura 36 (a-i)) e de CBTG (Figura 36 (a-ii)) corroboram com os resultados encontrados por Renou et al., os quais encontraram teores de gordura entre 3 e 40%. A amostra de CATG (Figura 36 (a-iii)) também apresentou resultados dentro do esperado, uma vez que ela foi formulada para obter-se uma razão de 1:1 (carne: gordura). Ademais, a carne também apresenta fração de gordura intramuscular – conforme é comprovado pelo espectro de

^1H da CM na seção 5.4 (Figura 52 (c)) – justificando a percentagem superior a 50% de gordura encontrada na amostra de CATG. Ainda, o teor de gordura inferior a 100% para a amostra de GP (Figura 36 (a – iv)) pode ser explicado devido à presença de 10% de água na gordura subcutânea – em consonância com o espectro de ^1H GP na seção 5.4 (Figura 52 (b)) – e devido à curva de calibração proposta pelos autores não abranger amostras acima de 50% de gordura.

5.3 Sequências de pulsos 2D-CWFP

Neste trabalho também foram implementadas técnicas de RMN 2D utilizando a sequência de pulsos CWFP- T_1 como método para medir T_1 na dimensão indireta e direta: CWFP- T_1 -CPMG e CPMG-CWFP- T_1 , respectivamente. O principal propósito desse estudo foi avaliar sequência de pulsos CWFP- T_1 para o desenvolvimento de sequências de pulsos 2D (2D-CWFP). Além disso, o método CPMG-CWFP- T_1 foi proposto com a finalidade de avaliar se a aquisição do sinal pela dimensão de T_1 gera mapas com características distintas dos mapas obtidos por sinais adquiridos pela dimensão de T_2 , os quais são usualmente obtidos pelas técnicas IR-CPMG e SR-CPMG.

Nas seções 5.3.1 e 5.3.2 são detalhadas as sequências de pulsos 2D provenientes da CWFP e nas seções 5.3.3 e 5.3.4 são apresentados os resultados experimentais e simulados obtidos com as sequências de pulsos 2D-CWFP. Nessas seções são apresentadas e discutidas as vantagens e desvantagens das sequências de pulsos 2D-CWFP em relação aos métodos SR-CPMG e IR-CPMG. Nestas seções, as expressões: sinais CPMG-CWFP- T_1 , CWFP- T_1 -CPMG, SR-CPMG e IR-CPMG fazem referência aos sinais adquiridos utilizando as sequências de pulso CPMG-CWFP- T_1 , CWFP- T_1 -CPMG, SR-CPMG e IR-CPMG, respectivamente.

5.3.1 Sequência de pulsos bidimensional CWFP- T_1 -CPMG

Na Figura 37 é representado o esquema da sequência de pulsos da CWFP- T_1 -CPMG. Nesta figura a primeira parte representa a sequência de pulsos CWFP- T_1 , na qual n é o número de vezes que os pulsos θx e $\theta-x$ são aplicados. Já a segunda etapa é caracterizada pela sequência de pulsos CPMG, onde m representa o número de vezes que o pulso de $180^\circ y$ é aplicado. No método CWFP- T_1 -CPMG, a aquisição do sinal é realizada pela sequência de pulsos CPMG, visto que nesse caso essa é a dimensão direta.

O método CWFP- T_1 -CPMG é composto por vários experimentos, sendo que no primeiro experimento o valor de n é pequeno e vai aumentando nos experimentos consecutivos.

Os valores de n são dependentes da matriz em análise e a sua variação é logarítmica. Diferente de n , o valor de m não se altera entre um experimento e outro, porém seu valor também é dependente da matriz em análise. Esta sequência requer um RD de aproximadamente $5T_1$.

Figura 37 – Esquema da sequência de pulsos 2D CWFP- T_1 -CPMG, onde τ representa o tempo entre os pulsos, $\theta_x/-x$ um ângulo pequeno ($\geq 10^\circ$), n indica quantas vezes os pulsos de θ_x e θ_{-x} são aplicados na sequência de pulsos CWFP- T_1 e m o número de vezes que o pulso 180°_y é aplicado no método CPMG.

5.3.2 – Sequência de pulsos bidimensional CPMG-CWFP- T_1

A Figura 38 mostra o esquema da sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 , na qual o número de ecos da sequência de pulsos CPMG (m) aumenta logaritmicamente com o decorrer dos experimentos, enquanto que o número de ecos da sequência de pulsos CWFP- T_1 ($n/2$) é mantido constante, sendo que o sinal é adquirido pela sequência de pulsos CWFP- T_1 . Dessa forma, no método CPMG-CWFP- T_1 são adquiridos vários sinais 1D CWFP- T_1 com amplitude modulada pelo sinal CPMG. Consequentemente, a CWFP- T_1 gera a dimensão direta, enquanto a CPMG estabelece a dimensão indireta.

Figura 38 – Esquema da sequência de 2D CPMG-CWFP- T_1 , onde τ é o tempo entre os pulsos, m é o número de pulsos de 180°_y aplicados na sequência de pulsos CPMG, $\theta_x/-x$ é um ângulo pequeno (5° ou 10°) e n indica o número de vezes que os pulsos de θ_x e θ_{-x} são aplicados na sequência CWFP- T_1 .

Conforme é possível ver na Figura 38, o bloco correspondente à sequência de pulsos CWFP- T_1 se difere do método CWFP- T_1 1D (Figura 26) com relação ao primeiro pulso antes

da sequência de n pulso de ângulos pequenos, sendo que na sequência de pulsos 2D ao invés de um pulso de $180^\circ x$, é aplicado um pulso de $90^\circ x$. Essa diferença é decorrente do fato de a magnetização já se encontrar no plano xy , devido à sequência de pulsos CPMG ser aplicada antes da CWFP- T_1 . Assim, no método CPMG-CWFP- T_1 o pulso $90^\circ x$ é aplicado na amplitude máxima do eco formado na CPMG, fazendo com que a magnetização resultante do eco da sequência de pulsos CPMG seja direcionada para $-M_0$.

5.3.2.1 – Pré-processamento do sinal CPMG-CWFP- T_1

Para ser possível gerar os mapas 2D para os sinais adquiridos com a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 utilizando duas funções núcleos de decaimento exponencial foi necessário o ajuste de fase e a remoção do *offset* desses, a fim de se obter sinais que decaem exponencialmente a zero. Para que não fosse necessário ajustar manualmente a fase dos sinais após a aquisição, a fase do receptor do equipamento foi ajustada de forma a se adquirir uma matriz de dados com sinais CWFP- T_1 que decaem exponencialmente, conforme demonstrado na Figura 39 pelos sinais cinza. Já a correção de *offset* foi conduzida após a aquisição dos sinais por um procedimento usualmente utilizado na literatura para dados 2D.

A correção de *offset* em sequências de pulsos 2D é bem conhecida na literatura, visto que sinais que não decaem a zero levam à geração de artefatos intensos nos mapas 2D.^{18; 79} Essas correções são comumente empregadas em dados 2D adquiridos pela sequência de pulsos CPMG, visto que neste método pode ocorrer a formação de *offset*, caso a ciclagem das fases dos pulsos seja incorreta. Nesses casos, o *offset* é corrigido pela subtração da última coluna de todas as outras, ou seja, o último experimento é subtraído de todos os experimentos, inclusive dele mesmo.¹⁸ Esse mesmo procedimento foi utilizado na sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 , conforme demonstra na Figura 39, na qual os sinais em cinza representam os sinais obtidos com o primeiro experimento utilizando a sequências de pulsos CPMG-CWFP- T_1 antes (sinal cinza que não decai a zero) e após (sinal cinza que decai a zero) a subtração do sinal obtido com o último experimento, representado pelo sinal em preto que não decai a zero. A linha em preto com amplitude zero ao longo do eixo x é o sinal obtido com o último experimento, pelo método CPMG-CWFP- T_1 , após a subtração por ele mesmo. Analisando essa figura é possível observar que o procedimento de remoção do *offset* acarreta no decréscimo da S/R do sinal em aproximadamente duas vezes, sendo este um fator indesejável, visto que a S/R afeta na geração dos mapas 2D, conforme discutido nas próximas seções. As outras três sequências de pulsos 2D não passaram por esses dois pré-processamentos porque a dimensão de aquisição já é via

CPMG, e a função núcleo de inversão é própria para este dado, além disso, a ciclagem de fases para esta sequência de pulsos foi realizada de forma apropriada, evitando a formação de *offset*.

Figura 39 – Os sinais em cinza representam os sinais obtidos com o primeiro experimento utilizando a sequências de pulsos CPMG-CWFP- T_1 antes (sinal cinza que não decai a zero) e após (sinal cinza que decai a zero) a subtração do sinal obtido com o último experimento (sinal em preto que não decai a zero). A linha em preto com amplitude zero ao longo do eixo x é o sinal obtido com o último experimento após a subtração por ele mesmo.

5.3.3 Resultados experimentais das sequências de pulsos 2D-CWFP

Os estudos das sequências de pulsos 2D foram iniciados com a implementação tanto das sequências de pulsos propostas neste trabalho quanto dos métodos IR-CPMG e SR-CPMG, no espectrômetro Minispec mq da Bruker de 20 MHz para o ^1H .

As avaliações iniciais dessa sequência de pulsos compreenderam a análise de um sistema constituído por três tubos de 3 mm, conforme descrito na seção 4.1 e demonstrado na Figura 21. Cada tubo de 3 mm continha 500 μL de uma solução aquosa de um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,02 mM e 0,1 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. Como em cada tubo havia a mesma quantidade de amostra (500 μL) esperava-se obter mapas 2D com três sinais de mesma proporção de área: 1:1:1. A fim de identificar as constantes de tempos de relaxação que pertence a cada solução, foi realizado um estudo prévio dessas soluções isoladas, sendo obtido, pela técnica IR, valores de T_1 iguais a $1710,6 \pm 36,7$ ms, $686,5 \pm 33,8$ ms e $99,1 \pm 3,9$ ms e valores de T_2 , mensurados pelo método CPMG, iguais a $647,7 \pm 19,1$ ms, $156,9 \pm 7,6$ ms e $92,5 \pm 3,1$ ms para as respectivas soluções aquosas contendo os complexos de $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,02 mM e 0,1 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. Este estudo possibilitou a designação da T_1/T_2 para cada uma das soluções: aproximadamente 2,6, 4,2 e 1,1, nesta ordem. Para facilitar a discussão estas soluções foram designadas como T_3 , T_2 e T_1 , respectivamente.

5.3.3.1 – Comparação entre os sinais obtidos pelas sequências de pulsos 2D-CWFP com os obtidos pelas técnicas IR-CPMG e SR-CPMG

Os sinais obtidos para o sistema complexo composto por três soluções utilizando as sequências de pulsos convencionais e os métodos 2D-CWFP, utilizando os parâmetros descritos na seção 4.3.3, estão apresentados na Figura 40, onde é possível visualizar que os sinais obtidos pelas sequências de pulsos CWFP-T₁-CPMG e CPMG-CWFP-T₁ são similares aos obtidos pelas sequências de pulsos IR-CPMG e SR-CPMG, respectivamente. Entretanto, diferente dos outros três métodos 2D, na CPMG-CWFP-T₁, o sinal é adquirido na dimensão de T₁. Os três métodos que adquirem o sinal pela sequência de pulsos CPMG (CWFP-T₁-CPMG, IR-CPMG e SR-CPMG) apresentaram S/R similares (aproximadamente 800 para o sinal CPMG adquirido no último experimento da sequência IR-CPMG/SR-CPMG), já o método CPMG-CWFP-T₁ por adquirir o sinal pela sequência de pulsos CWFP-T₁ apresentou uma S/R seis vezes menor que as outras técnicas.

Figura 40 – Sinais experimentais obtidos pelas sequências de pulsos IR-CPMG (a), SR-CPMG (b), CWFP-T₁-CPMG (c) e CPMG-CWFP-T₁ (d), para um sistema composto por três soluções aquosas contendo os seguintes complexos: [Mn(H₂O)₆]²⁺ 0,1 mM e 0,02 mM e [Cu(H₂O)₆]²⁺ 10 mM.

5.3.3.2 – Análise do tempo experimental das sequências de pulsos 2D - CWFP

O método CWFP- T_1 -CPMG não demonstrou vantagem com relação ao tempo de experimento, visto que ele é da ordem do tempo de experimento da sequência de pulsos IR-CPMG. Por outro lado, a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 demonstrou tempo experimental inferior ao método IR-CPMG, uma vez que, assim como o método SR-CPMG, a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 não depende de um RD de aproximadamente $5T_1$. Isso acontece porque na sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 a dimensão de aquisição é por CWFP- T_1 e esse método, conforme já descrito na seção 5.1, não depende do RD . A fim de fundamentar essa afirmação é demonstrado na Figura 41 os primeiros 4 s do 1º (sinal com amplitude máxima igual a 1) e do 32º (sinal com amplitude máxima igual a zero) sinais adquiridos pela sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 utilizando um RD de aproximadamente $5T_1$ (sinal de cor vermelha) e 0,01 s (sinal de cor preta). Nessa figura é possível notar que, independentemente do RD , a amplitude do sinal se mantém constante desde o primeiro até o último experimento. Por isso, o sinal CPMG-CWFP- T_1 adquirido utilizando um RD de 0,01 s, demonstrado na Figura 40 - (d) não gerou distorções de informações no seu mapa 2D (Figura 44 (b)), conforme é demonstrado na seção 5.3.3.3.

Figura 41 – Primeiros 4 s do 1º (amplitude máxima igual a um) e do 32º (amplitude máxima igual a zero) sinal normalizado obtido pela sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 para um sistema composto por três soluções aquosas, a quais continham um dos seguintes complexos: $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ 10 mM. O sinal de cor vermelha foi obtido utilizando o valor do $RD = 5T_1$ e sinal de cor preta foi adquirido usando o valor de $RD = 0,01$ s.

Por outro lado, na sequência de pulsos IR-CPMG à medida que o valor do RD decresce as intensidades dos sinais relacionados aos menores valores de τ_r também são reduzidas,

conforme pode ser observado na Figura 42 (a) para o sinal obtido pela sequência de pulsos IR-CPMG utilizando o sistema composto por três soluções e RD de 0,01 s. Isso ocorre porque, para valores de τ_r pequeno, quanto mais o valor RD se afastar da condição de $5T_1$, menor será a proporção da magnetização que retorna ao equilíbrio antes da realização de um novo experimento. Por outro lado, mesmo para valores de RD inferiores a $5T_1$, quanto maior for o valor de τ_r maior será a proporção da magnetização que retorna ao equilíbrio antes do próximo experimento, permitindo assim obter um FID com uma amplitude mais próxima do valor correto.

As distorções causadas no sinal IR-CPMG pela utilização de RD muito curto refletem no mapa 2D gerado com esse sinal, conforme é mostrado na Figura 42 (b). Nessa figura, a razão da área das componentes T_1 , T_2 e T_3 são reduzidas de 1:1:1 para 0,63: 0,51: 0,51, ao mesmo tempo em que surgem dois artefatos intensos no mapa na região inferior do mapa onde a T_1/T_2 é menor que 1.

Figura 42 – Demonstração do efeito da utilização de um RD de 0,01 nos sinais (a) e no mapa 2D (b) obtido pelo método IR-CPMG: (a) 32 sinais experimentais obtidos pelo método IR-CPMG para o sistema complexo composto por três soluções aquosas que continham um dos seguintes complexos: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. Mapa 2D obtido para o sinal (a) utilizando o método FLI. A linha tracejada em preto em (b) indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1.

Como na sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 não é requerido um RD de aproximadamente $5T_1$ o tempo de experimento é menor que o da sequência de pulsos IR-CPMG quando $T_1 \sim T_2$. Contudo, para $T_1 \gg T_2$ ambas as sequências têm tempo experimentais similares, visto que a sequência CPMG-CWFP- T_1 necessita de mais tempo para adquirir o sinal por T_1 do que o método IR-CPMG, onde o sinal é adquirido por T_2 . Entretanto, como em muitos casos o valor de T_1 é desconhecido, na maioria das vezes, os valores de RD acabam sendo

superestimados a fim de garantir que a condição $RD \geq 5T_1$ seja satisfeita. Isso implica em tempos experimentais muito maiores do que se fosse utilizados valores de RD que correspondessem a condição real de $5T_1$. Nesse caso, a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 sempre tem o tempo experimental menor que o IR-CPMG, mesmo na condição $T_1 \gg T_2$.

Como na amostra composta por três soluções, o valor T_1 da componente com o maior valor de T_1 era conhecido, foi possível estimar um RD que respeitasse a condição de $5T_1$. Partindo deste princípio, para os parâmetros descritos na seção 4.3.3 o tempo experimental total para a amostra composta por três soluções foi de 4 horas e 30 minutos para a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 , 2 horas para o método SR-CPMG e 6 horas e 15 minutos para as sequências CWFP- T_1 -CPMG e IR-CPMG. Para a amostra em questão, há componentes em que T_1 não é similar a T_2 , por esse motivo a sequência SR-CPMG teve menor tempo experimental que a CPMG-CWFP- T_1 , visto que a aquisição do sinal pela dimensão de T_1 requer mais tempo do que pela dimensão de T_2 . Todavia, para amostras onde $T_1 \sim T_2$ ambas as sequências de pulsos, SR-CPMG e CPMG-CWFP- T_1 , têm tempos experimentais semelhantes.

Essa foi a primeira vez em que a constante de tempo T_1 foi utilizada como dimensão direta de forma conveniente, visto que experimentos que utilizam a dimensão direta em T_1 geralmente são baseados nas sequências de pulsos CPMG-IR e CPMG-SR, as quais demandam tempo experimental. Chandrasekera et al. (2008), propuseram recentemente uma sequência de pulsos 2D com dimensão de aquisição em T_1 que correlaciona T_1 - T_2 -deslocamento químico e que apresenta tempo experimental inferior ao método IR-CPMG. Porém, essa sequência é limitada a espectrômetros de alta resolução, os quais têm capacidade de determinação do deslocamento químico.¹⁰

5.3.3.3 – Comparação entre os mapas obtidos pelas sequências de pulsos 2D-CWFP com os obtidos pelas técnicas IR-CPMG e SR-CPMG

A Figura 43 (i), (ii) e (iii) apresenta as projeções de 1D das distribuições de tempo T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidos pelo método FLI para os sinais IR-CPMG, SR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG, respectivamente. Nessas projeções é possível observar que as sequências IR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG apresentaram resoluções similares e o método SR-CPMG demonstrou uma resolução um pouco inferior em comparação aos outros dois métodos em ambas as dimensões: T_1 e T_2 . Devido à similaridade dos resultados obtidos pelas sequências IR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG na Figura 44 é mostrado somente o mapa obtido com o sinal adquirido pela sequências CWFP- T_1 -CPMG (mapa-CWFP- T_1 -CPMG – (a)), o qual foi obtido

pelo método FLI. Nesta mesma figura em (b) é mostrado o mapa para o sinal adquirido com o método SR-CPMG (mapa-SR-CPMG) usando o método de processamento FLI, no qual é possível observar uma resolução levemente inferior ao mapa-CWFP- T_1 -CPMG, concordando assim com o resultado mostrado para as projeções 1D dos tempos de relaxação dos mapas dessa sequência de pulsos. Apesar dessa diferença, para ambos os mapas (mapa-CWFP- T_1 -CPMG e mapa-SR-CPMG) é possível observar que as três componentes se separam totalmente mesmo que na distribuição 1D de T_2 (Figura 43 – b (i), (ii) e (iii)) as componentes T_{21} e T_{22} estejam sobrepostas. Por fim, a correlação da área dos sinais no mapa 2D corresponde aos valores esperados para esta amostra (1:1:1).

Figura 43 – Projeções 1D da distribuição de tempo de T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidas pelo método FLI para os sinais adquiridos utilizando as sequências de pulsos: IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii), CWFP- T_1 -CPMG (iii), CPMG-CWFP- T_1 (iv) e CPMG-CWFP- T_1 -SG (v) para a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM (T_2) e 0,02 mM (T_3) e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM (T_1). As linhas tracejadas verticais indicam os valores de T_1 e T_2 resultantes do método IR-CPMG (i).

Na Figura 43, as linhas verticais tracejadas indicam os valores de T_1 ((a) – 1707,5 ms, 699,7 ms e 99,4 ms) e T_2 ((b) – 653,8 ms, 151,3 ms e 93,3 ms) mensurados pela sequência de pulsos IR-CPMG, com a finalidade de facilitar a análise dos tempos de relaxação. Levando-se

em consideração essa informação, foi possível observar que os valores das constantes de tempo T_1 e T_2 determinados pelas três sequências de pulsos, IR-CPMG, SR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG são similares entre as três sequências e aos valores obtidos pelos métodos 1D. Os pequenos desvios dos valores T_1 obtidos pela sequência de pulsos CWFP- T_1 -CPMG, em relação aos mensurados pelas outras duas sequências de pulsos, estão de acordo com o comportamento da sequência de pulsos CWFP- T_1 apresentados na seção 5.1: os valores de T_1 obtidos pela sequência de pulsos CWFP- T_1 tendem a ser ligeiramente inferiores aos obtidos pelo método IR, sendo que essa diferença tem propensão a aumentar de acordo com o aumento da T_1/T_2 .

Figura 44 – Mapas 2D obtidos do processamento dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos CWFP- T_1 -CPMG (a), SR-CPMG (b) e CPMG-CWFP- T_1 (c) utilizando o método de processamento FLI. Estes sinais foram obtidos com a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. A linha tracejada em preto indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1.

Diferente das outras três sequências de pulsos, no mapa 2D obtido com o sinal CPMG-CWFP- T_1 (mapa-CPMG-CWFP- T_1) as três componentes não se separaram totalmente, conforme pode ser observado na Figura 44 (c), na qual é mostrado o mapa-CPMG-CWFP- T_1 gerado pelo método FLI. Nessa figura, apesar de ser possível identificar as componentes T_1 , T_2 e T_3 , elas apresentam uma correlação de área (1, 14:0, 87:0,99) que se difere um pouco da correlação esperada para a amostra composta por três soluções (1:1:1). Na Figura 43 (iii), na qual são mostradas as projeções 1D dos tempos de relaxação do mapa-CPMG-CWFP- T_1 (Figura 44 (c)), é possível identificar, em (a)-(iii), três componentes na projeção de T_1 em 90,7 ms, 647,4 ms, e 1652,7 ms. Por outro lado, na projeção 1D de T_2 (Figura 43 (b)-(iii)) somente são identificados dois picos alargados em 110,5 e 652 ms, sendo que o primeiro valor corresponde a sobreposição das componentes T_{21} e T_{22} . Essa diferença de resolução entre o mapa-CPMG-CWFP- T_1 e os outros mapas 2D obtidos pelas outras três sequências de pulsos é reflexo da baixa S/R do sinal adquirido com o método CPMG-CWFP- T_1 . Isso é consequência de que, além de o sinal adquirido pelo método CPMG-CWFP- T_1 ter uma S/R aproximadamente 6 vezes inferior à obtida pelos outros métodos, o pré-processamento para remoção do *offset* (descrito na Figura 39) reduz ainda mais a S/R do sinal CPMG-CWFP- T_1 em aproximadamente duas vezes. Assim, o mapa-CPMG-CWFP- T_1 é obtido com sinais que têm uma S/R aproximadamente doze vezes inferior aos sinais utilizados pelos métodos IR-CPMG, SR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG para gerar os mapas 2D.

Com o intuito de melhorar a S/R do sinal obtido com o método CPMG-CWFP- T_1 foi aplicado o filtro digital SG de 2ª ordem utilizando um subconjunto de 71 pontos, gerando um sinal que foi denominado de CPMG-CWFP- T_1 -SG. Esse filtro foi escolhido porque, conforme já demonstrado na seção 5.2, dentre os filtros propostos neste trabalho, é um dos que mais proporcionou aumento da S/R do sinal de RMN-DT sem causar distorções das informações da amostra. O sinal CPMG-CWFP- T_1 -SG e com seu respectivo mapa 2D (mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG) obtido pelo método FLI, são mostrados na Figura 45 (a) e (b), respectivamente. A aplicação do filtro aumentou a S/R do sinal CPMG-CWFP- T_1 em proximamente seis vezes, propiciando assim o aumento da resolução do mapa 2D-CPMG-CWFP- T_1 e, consequentemente, tornou possível a identificação das três componentes por sinais distintos e com relação de área corresponde ao esperado (1:1:1), conforme pode ser observado na mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG (Figura 45 (b)). O aumento da resolução mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG se confirma nas suas projeções 1D de T_1 e T_2 , conforme pode ser observado na Figura 43 (v), onde é possível notar, na projeção de T_1 (a), a presença de três picos em 96,2 ms, 627,5 ms e 1695,7 ms e, na projeção de T_2 , um pico bem separado em 649,8 ms e outros dois praticamente

sobrepostos em 151,7 ms e 88,6 ms. O fato de a componente T_{12} apresentar maior diferença em relação ao valor de T_1 obtido pelo método IR-CPMG, do que T_{11} e T_{13} , está de acordo com o comportamento da sequência de pulsos CWFP- T_1 , uma vez que a componente T_{12} é a que apresenta maior T_1/T_2 (4,2).

Figura 45 - (a) Sinais experimentais adquiridos com a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 após a aplicação do filtro SG de 2ª ordem utilizando um subconjunto de 71 pontos (CPMG-CWFP- T_1 -SG). (b) mapa 2D obtido pelo processado do sinal (a) pelo método FLI. Os sinais em (a) foram obtidos para o sistema composto por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. A linha tracejada em preto em (b) indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1.

A projeção de T_1 , obtida com o mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG (Figura 43 (a) – (v)), apresentou melhor resolução, não somente em relação à projeção de T_1 do mapa-CPMG-CWFP- T_1 (Figura 43 (a) – (iv)) mas também em relação às distribuições de T_1 obtidas pelas outras três sequências de pulsos: IR-CPMG, SR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG - Figura 43 (a) – (i), (ii) e (iii). Por outro lado, mesmo a aplicação do filtro ter aumentado a resolução na projeção 1D de T_2 do mapa-CPMG-CWFP- T_1 (Figura 43 (b) – (v)), em relação as outras três sequências de pulsos (Figura 43 (b) – (i), (ii) e (iii)) o mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG teve menor resolução na dimensão de T_2 . Esses resultados indicam que a dimensão de aquisição tem mais resolução que a dimensão indireta, assim os sinais obtidos pelos métodos IR-CPMG, CWFP- T_1 -CPMG e SR-CPMG propiciam a obtenção de mapas com melhor resolução na dimensão de T_2 , enquanto que o sinal CPMG-CWFP- T_1 -SG origina mapas com melhor resolução na dimensão de T_1 .

Resultados similares foram encontrados quando o sinal obtido com a sequência de pulsos IR-CPMG e o sinal CPMG-CWFP- T_1 -SG, foram processados com o método máxima entropia, conforme é mostrado na Figura 46. Nessa figura é possível observar que a largura de linha espectral é mais estreita na dimensão de T_2 (b) da sequência de pulsos IR-CPMG (linha

preta) e na dimensão de T_1 (a) para o método CPMG-CWFP- T_1 -SG (linha vermelha). A fim de confirmar esses resultados foi realizado um estudo por meio de sinais simulados, o qual é discutido na seção 5.3.4.

Figura 46 – Projeções 1D da distribuição de tempo de T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidos pelo processamento dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos: IR-CPMG (linha preta) e CPMG-CWFP- T_1 -SG (linha vermelha) utilizando o método máxima entropia. Os sinais IR-CPMG foram adquiridos utilizando a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM.

Ainda, foi possível observar que os aspectos dos sinais nos mapas 2D são correlacionados com a sequência de pulsos que é empregada na dimensão direta: os sinais do mapa 2D adquiridos pela sequência de pulsos CWFP- T_1 (Figura 45 (b)) apresentaram uma característica mais arredondada, enquanto que nos mapas 2D adquiridos pelo método CPMG (Figura 44 (a) e (b)) são mais alongados. Mapas com características similares também foram obtidos quando os sinais IR-CPMG e CPMG-CWFP- T_1 -SG, foram processados pelo método máxima entropia, conforme é possível observar na Figura 47 (a) e (b), respectivamente.

É importante ressaltar que se for utilizado valores menores de α , do que os encontrados pelo método BRD, o mapa CPMG-CWFP- T_1 seria similar ao mapa CPMG-CWFP- T_1 -SG. Contudo, assim como já mencionado para os dados 1D, isso somente é possível porque estamos trabalhando com um sistema simples de três soluções. Já para o caso de amostras complexas artefatos podem surgir, distorcendo nas informações da amostra. Além disso, quando o sinal CPMG-CWFP- T_1 -SG foi processado utilizando o método máxima entropia (tal método não depende do ajuste do parâmetro α), foram encontrados resultados similares aos obtidos pelo método FLI, utilizando o ajuste do α pelo método BRD mostrado na Figura 44 (c).

Figura 47 – Mapas 2D obtidos do processamento dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos IR-CPMG (a) e CPMG-CWFP- T_1 -SG utilizando o método de processamento máxima entropia. Estes sinais foram obtidos com a amostra composta por três soluções aquosa, sendo que cada uma das soluções era composta por um determinado complexo: $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 0,1 mM e 0,02 mM e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 10 mM. A linha tracejada em preto indica a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1.

Os próximos estudos foram direcionados apenas à sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 , visto que a CWFP- T_1 -CPMG tem tempo experimental e resultados similares aos obtidos pelos métodos IR-CPMG.

5.3.4 Análise da resolução em mapas 2D utilizando sinais simulados

Sinais simulados foram utilizados para avaliar o efeito na resolução dos mapas 2D frente ao número de pontos total da matriz 2D de dados e frente às diferentes equações núcleo utilizadas para o processamento dos dados. Além disso, as simulações também foram aplicadas para analisar se a dimensão de aquisição, por ter centenas de vezes mais pontos que a dimensão indireta, tem melhor resolução que a dimensão indireta. Sinais simulados foram utilizados para esse estudo porque neles é possível controlar a variável S/R, possibilitando o estudo da resolução dos mapas 2D frente às outras variáveis de interesse, mantendo a variável ruído fixa. Partindo desse pressuposto, sinais similares aos obtidos pelos métodos CPMG-CWFP- T_1 , IR-CPMG e SR-CPMG foram simulados sem ruído e utilizando valores das constantes de tempo T_1 (1.760 ms, 640 ms e 100 ms) e T_2 (690 ms, 160 ms e 90 ms) similares aos valores experimentais descritos na seção 5.3.3.

5.3.4.1 Estudo da influência do número de pontos total da matriz de dados 2D na resolução dos mapas 2D

Nos dados experimentais demonstrados anteriormente, a matriz de dados 2D gerada pelo método CPMG-CWFP- T_1 apresentou três vezes mais pontos que as matrizes de dados 2D adquiridas pelos métodos SR-CPMG e IR-CPMG. A obtenção de matrizes com tamanhos diferentes é decorrente do fato de que a amostra composta por três soluções apresenta componentes com valor de $T_1 \gg T_2$. Dessa forma, como foi utilizado o mesmo τ para as três sequências, foi necessário adquirir mais pontos pelo método CPMG-CWFP- T_1 , o qual adquire o sinal pela dimensão de T_1 , do que pelos métodos IR-CPMG SR-CPMG, que adquirem o sinal pela dimensão de T_2 . Partindo desse pressuposto, o primeiro estudo simulado foi direcionado para analisar se a variação do número de pontos da dimensão direta afeta na resolução de ambas as dimensões: T_1 e T_2 , sendo que os resultados desse estudo estão demonstrado na Figura 48.

Figura 48 – Projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método FLI para sinais simulados da sequência de pulsos IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii) e CPMG-CWFP- T_1 utilizando $\alpha = 2,5$. As linhas contínuas vermelha e preta e a linha tracejada azul indicam o número de pontos da dimensão direta iguais a 30.000, 10.000 e 1.000, respectivamente, para ambos os casos a dimensão indireta foi simulada com 32 pontos. Para a simulações desses sinais foram utilizadas as constantes de tempo T_1 de valor igual a 1.760 ms, 640 ms e 100 ms e T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms, esses sinais forma simulados em ruído.

Na Figura 48 são mostradas as projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método FLI para sinais simulados das sequências de pulsos IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii) e CPMG-CWFP- T_1 utilizando 30.000 (linha vermelha) e 10.000 (linha preta) pontos na dimensão direta, para ambos os casos a dimensão indireta foi simulada com 32 pontos. Para o processamento desses dados foi utilizado o parâmetro α fixo ($\alpha = 2,5$), uma vez que, o método de ajuste desse parâmetro, no caso desse estudo o método BRD, é dependente do desvio padrão do ruído. Analisando a Figura 48 é possível perceber que, para as três sequências de pulsos, quando variamos o número de pontos da dimensão direta de 10.000 para 30.000, praticamente, não há diferença na resolução de ambas as dimensões.

Todavia, quando o número de pontos da dimensão indireta é mantido fixo (32 pontos) e o número de pontos da dimensão direta é reduzido de 30000 para 1000 pontos (Figura 48 - linha azul tracejada) para as três sequências de pulsos: IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii) e CPMG-CWFP- T_1 (iii) e em ambas as dimensões ((a) - T_1 e (b) - T_2) ocorre perda de resolução. Contudo, isso é uma inferência do método FLI quando utilizamos um valor de α fixo para sinais com diferentes números de pontos na dimensão direta. Resultados similares a esse foram observados quando utilizamos o método FLI associado ao método de ajuste de α BRD para processar dados experimentais. Nesse caso, assim como mostrado na Figura 48, conforme o número de pontos dos dados experimentais foi reduzido os mapas 2D foram perdendo resolução. Contudo, este é um efeito associado ao método de processamento FLI, visto que quando o sinal simulado com matriz de dados 2D 1.000×32 pontos, foi processado pelo método máxima entropia não houve perdas de resolução em relação aos sinais com matriz de dados 30000×32 e 10.000×32 , conforme é mostrado na Figura 49. Nesta figura as projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidas pelas sequências de pulsos IR-CPMG (i), SR-CPMG (iii) e CPMG-CWFP- T_1 (iii) as quais apresentaram resoluções similares para as três matrizes de dados com diferentes números de pontos, conforme é ilustrado pelas linhas contínuas vermelha (30.000×32 pontos) e preta (10.000×32 pontos) e pela linha tracejada azul (10.00×32).

Dessa forma, pode-se inferir que o efeito na resolução dos mapas 2D perante a redução do número de pontos total da matriz de dados 2D é dependente do método de processamento dos dados. No entanto, a diferença de número de pontos da dimensão direta utilizada experimentalmente, entre as sequências de pulsos CPMG-CWFP- T_1 (30.000 pontos) e os métodos SR-CPMG e IR-CPMG (10.000 pontos), não foi de magnitude suficiente para afetar as resoluções dos mapas gerados pelo método FLI.

Figura 49 – Projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método máxima entropia para sinais simulados da sequência de pulsos IR-CPMG (i), SR-CPMG (ii) e CPMG-CWFP- T_1 . As linhas contínuas vermelha e preta e a linha tracejada azul indicam o número de pontos da dimensão direta iguais a 30.000, 10.000 e 10.00, respectivamente, para ambos os casos a dimensão indireta foi simulada com 32 pontos. Para a simulações desses sinais foram utilizadas as constantes de tempo T_1 de valor igual a 1.760 ms, 640 ms e 100ms e T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms, esses sinais forma simulados em ruído.

5.3.4.2 Estudo da influência do número de pontos da dimensão de aquisição 2D na resolução dos mapas 2D e da equação núcleo

A fim de analisar se a dimensão de aquisição tem maior resolução do que a dimensão indireta foram comparadas, na Figura 50, as projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) dos mapas 2D obtidos pelo método FLI com $\alpha = 2,5$ para os sinais simulados para as sequências de pulsos IR-CPMG, SR-CPMG e CPMG-CWFP- T_1 com números de pontos da dimensão direta e indireta 10.000 e 32, respectivamente. Analisando essas projeções de T_1 e T_2 foi possível demonstrar que as sequências de pulsos IR-CPMG e SR-CPMG, apresentam maior resolução na dimensão de T_2 , enquanto para no método CPMG-CWFP- T_1 há maior resolução na dimensão de T_1 . Então, podemos afirmar que a dimensão de aquisição das sequências de pulsos 2D, por ter dezenas a centenas de vezes mais pontos que a dimensão indireta, sempre terá melhor resolução que a dimensão indireta. Assim, como na sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 , o sinal é adquirido pelo método CWFP- T_1 , sempre terá mais resolução na dimensão de T_1 , enquanto as sequências de pulsos SR-CPMG e IR-CPMG, por adquirirem o sinal pelo método CPMG, sempre terão mais resolução na dimensão de T_2 . Resultados similares foram obtidos quando os

sinais simulados IR-CPMG, SR-CPMG e CPMG-CWFP- T_1 com números de pontos da dimensão direta (10.000) e indireta (32) foram processados utilizando o método máxima entropia.

Os resultados simulados corroboram com os resultados experimentais obtidos na seção 5.3.3. Todavia, é importante ressaltar que nos resultados experimentais o mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG demonstrou melhor resolução na dimensão de T_1 , do que os mapas obtidos pelas outras sequências de pulsos, ainda que este tenha sido gerado com um sinal duas vezes mais ruidoso que os sinais obtidos com as sequências de pulsos IR-CPMG, SR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG. Logo, se um subconjunto de pontos maior fosse utilizado no filtro SG, a S/R seria aumentada e, provavelmente, seria obtida uma resolução ainda maior na dimensão de T_1 pelo método CPMG-CWFP- T_1 . No entanto, esse procedimento não foi aplicado, pois a utilização de um subconjunto de pontos muito grande no filtro SG pode gerar distorções nas informações da amostra, conforme já discutido na seção 5.2. Além do mais, acima de uma determinada S/R (~500) a melhora na resolução começa a ser cada vez menos significativa. Ainda, é relevante destacarmos que a sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 somente apresentou aumento de resolução na dimensão de T_1 quando associada ao filtro, visto que sem filtros a S/R desse sinal, utilizando poucos *scans*, é baixa.

Figura 50 – Projeções 1D de T_1 (a) e T_2 (b) obtidas de mapas 2D gerados pelo método FLI para sinais simulados da sequência de pulsos IR-CPMG (sinal preto), SR-CPMG (sinal vermelho) e CPMG-CWFP- T_1 (sinal azul) utilizando 10.000 na dimensão direta e 32 na dimensão indireta. Para a simulações desses sinais foram utilizadas as constantes de tempo T_1 de valor igual a 1.760 ms, 640 ms e 100ms e T_2 690 ms, 160 ms e 90 ms.

Na Figura 50, também é possível observar que apesar de nas duas sequências de pulsos IR-CPMG e SR-CPMG o método CPMG ser utilizado como dimensão direta, o método IR-CPMG (linha vermelha) apresenta melhor resolução tanto na dimensão de T_1 (a) quanto na de T_2 (b) em relação ao método SR-CPMG. Esses resultados estão vinculados com a combinação

das funções núcleo utilizadas para gerar a matriz núcleo – K_0 . Então, podemos dizer que a combinação das funções núcleo utilizadas no método IR-CPMG contribuem para obtenção de um mapa com melhor resolução do que a combinação das equações núcleo utilizadas para processar os dados adquiridos com o método SR-CPMG. Contudo, como a função núcleo utilizada no processamento é determinada de acordo com a matriz de dados adquirida experimentalmente, pode-se afirmar que o experimento IR-CPMG gera uma matriz de dados que favorece a resolução dos mapas 2D em comparação aos métodos SR-CPMG.

Esses resultados simulados estão de acordo com os resultados experimentais demonstrados na Figura 43, onde é possível observar que o método IR-CPMG (i) teve melhor resolução em ambas as dimensões: T_1 (a) e T_2 (b), em relação ao método SR-CPMG (ii). Ainda, nessa figura é possível observar que os métodos IR-CPMG (i) e CWFP- T_1 -CPMG (iii) possuem resolução semelhantes tanto na dimensão de T_1 quanto na de T_2 . Isso é decorrente do fato de ambos os métodos gerarem matrizes de dados semelhantes e, por conseguinte, foram processados com as mesmas funções núcleos.

5.3.5 – Análise de gordura em carne bovina utilizando as sequências de pulsos CPMG-CWFP- T_1 e IR-CPMG

A utilização das constantes de tempo T_1 e T_2 para analisar carne/carne com gordura é constantemente citada na literatura, conforme já relatado neste trabalho. Porém, não é muito comum o emprego de experimentos 2D de correlação das constantes de tempo para analisar esse tipo de amostra. Nesta seção, foi explorada a aplicação das sequências 2D CPMG-CWFP- T_1 e IR-CPMG para a análise de carne bovina magra (CM), carne bovina com alto teor de gordura (CATG - proporção 1:1) e gordura bovina pura secada a vácuo (GPS). As sequências CPMG-CWFP- T_1 e IR-CPMG foram escolhidas a fim de analisar e comparar as informações obtidas entre os mapas gerados por dimensão de aquisição em T_1 e em T_2 . A sequência IR-CPMG foi escolhida como sequência de aquisição pelo método CPMG, porque, apesar de ter maior tempo experimental, esse apresenta melhor resolução em relação ao método SR-CPMG, conforme já discutido anteriormente.

Nos sinais CPMG-CWFP- T_1 adquiridos com as três amostras: CM, CATG e GPS foi aplicado um filtro SG utilizando um subconjunto de 71 pontos e um polinômio de 2ª ordem – sinal CPMG-CWFP- T_1 -SG. Esse sinal sem remoção do *offset* apresentou uma S/R de aproximadamente 2 vezes inferior ao do método IR-CPMG: ~ 900 para a GPS e ~1.500 para a CM e 1.900 para a CATG, essas S/R foram determinada para o sinal CPMG adquirido no último

experimento da sequência IR-CPMG. Os mapas 2D obtidos com o método de processamento FLI para os sinais CPMG-CWFP-T₁-SG e IR-CPMG para as três amostras estudadas (CM, CATG, GPS) estão apresentados na Figura 51. Esses mapas, da mesma forma que foi identificado para a amostra de três soluções, apresentaram diferentes disposições dos sinais vinculadas com a sequência utilizada na dimensão de aquisição do sinal.

Em consonância com as informações da literatura e com os resultados 1D apresentado na seção 5.2.3, o mapa 2D para a amostra de CM apresentou um pico majoritário correspondente a água presa dentro das miofibrilas (denominada de componente T₁), cuja correlação T₁-T₂ é de 350-42 ms para o método CPMG-CWFP-T₁ (Figura 51 (a-i)) e 540-42 ms para o método IR-CPMG (Figura 51 (b-i)). A diferença, entre o valor de T₁ obtido pelo método CWFP-T₁ em relação ao método IR, está relacionada principalmente ao fato de a T₁/T₂ da componente T₁ ser aproximadamente 13. Dessa forma, esse resultado está de acordo com as especificidades da sequência CWFP-T₁ citadas anteriormente: a diferença dos valores de T₁ obtido pelo método CWFP-T₁ em relação ao método IR é maior para quanto maior for a T₁/T₂ da componente em análise.⁶⁹

De acordo com proposto por Bertrame et al., no mapa de CM (Figura 51 (a e b-i)) há um sinal que se refere a água fora das células musculares (denominado de componente T₂) com correlação dos tempos de relaxação T₁-T₂ igual a 550 – 215 ms para o método CPMG-CWFP-T₁ e 900 – 215 ms para o método IR-CPMG. Nesse caso a diferença entre os valores de T₁ obtidos pelos métodos CWFP-T₁ e IR são explicadas pelo fato de a T₁/T₂ ser aproximadamente 4 e pela baixa intensidade do sinal T₂, visto que sinais de baixa intensidade são mais susceptíveis ao deslocamento de posição na ILT.

No mapa 2D para a amostra de CATG (Figura 51 (ii)) foi possível observar que o sinal correspondente a água presa nas miofibrilas (componente T₁) não teve alteração nos valores de correlação T₁-T₂ em relação ao mapa da carne magra. Não obstante, a relaxação e a intensidade da componente T₂ mapa da amostra de CATG foram alterados com relação aos obtidos com o mapa para a amostra de CM. Esse efeito é decorrente do fato de o mapa da GPS (Figura 51-iii) ter um sinal com correlação T₁-T₂ (215-107 ms – CPMG-CWFP-T₁ e 215-130 ms – IR-CPMG) próxima ao da componente T₂ da CM, denominada de componente T₂'. Desta forma, quando a carne e gordura estão juntas os sinais T₂ e T₂' se sobrepõem gerando um sinal denominado de T₂'' com correlação T₁-T₂ de 242-107 ms para o método CPMG-CWFP-T₁ (Figura 51 (a-ii)) e aproximadamente 340-170 ms para o método IR-CPMG (Figura 51 (b-ii)).

O outro sinal presente nos mapas de ambos os métodos para a amostra de CATG com correlação T₁-T₂ 95-42 ms (CPMG-CWFP-T₁) e 107-42 ms (IR-CPMG) também foi atribuído

como componente da gordura (denominado de componente T_3). Essa atribuição foi baseado nos resultados apresentados nos mapas de GPS da Figura 51 (iii), no qual é possível comprovam por ambos os métodos que a gordura bovina é composta por dois sinais: T_2' (T_1 - T_2 : 215-107 ms – CPMG-CWFP- T_1 e 215-130 ms – IR-CPMG) e T_3 (T_1 - T_2 : 80-42 ms para ambos os métodos). Além disso, esses resultados estão de acordo com a literatura, visto que é comum encontrar dois sinais nas distribuições dos tempos de relaxação de lipídios, os quais estão associados às diferentes mobilidades da cadeia desses compostos.⁸⁰

Contudo, apesar dos mapas de ambas as sequências serem semelhantes, no mapa-CPMG-CWFP- T_1 -SG, para as amostras de GPS e CATG, as informações referentes à gordura se separaram em dois sinais, enquanto que no mapa-IR-CPMG as informações da gordura são expressas em apenas um sinal alongado na diagonal.

Os valores dos tempos de relaxação obtidos pelos experimentos 2D para a amostra de CATG são similares aos encontrados pelos métodos 1D – demonstrados na seção 5.2.3. Entretanto, em relação aos espectros da distribuição dos tempos de relaxação 1D a identificação das duas componentes da gordura e da componente da carne não é evidente, visto que os sinais da gordura estão sobrepostos com o sinal da carne conforme é possível observar ao comparar os mapas 2D (Figura 51) com as distribuições 1D dos tempos de relaxação T_1 e T_2 para a amostra de carne com gordura (Figura 36). A componente da gordura representada por T_3 nos mapas para amostra de CATG está sobreposta na distribuição 1D de T_2 com a componente T_1 da água presa na miofibrila da carne em aproximadamente 45 ms. Já a componente da gordura representada por T_2' e T_2'' nos mapas de GPS e de CATG está sobreposta com o sinal de carne na distribuição 1D de T_1 entre 350-370 ms. Além disso, a componente T_2 na amostra de CM não foi identificada nas distribuições 1D de T_1 da Figura 36. Devido à baixa intensidade dessa componente, ela provavelmente está sobreposta com a componente majoritária da água presente dentro das miofibrilas em aproximadamente 370 ms.

Utilizando a área dos picos das componentes da gordura (T_2'' e T_3 da Figura 51 (ii)) também foi possível determinar a percentagem aproximada de gordura da amostra de CATG, sendo encontrado um teor de 52% para o método CPMG-CWFP- T_1 -SG e 45% para a sequência de pulso IR-CPMG. Esses valores estão próximos a proporção da amostra (1:1 carne: gordura) mesmo a componente T_2'' não ser puramente gordura. Também foi possível determinar pelas áreas dos sinais T_2' e T_3 , dos mapas obtidos para a amostra de gordura pura, a percentagem de cada componente presente na gordura, sendo encontrado valores de 25 (T_2') e 75% (T_3) pelo método IR-CPMG e 70 (T_2') e 30% (T_3) pelo método CPMG-CWFP- T_1 -SG.

Figura 51 – Mapas 2D obtidos dos sinais adquiridos pelas sequências de pulsos: (b) IR-CPMG e (a) CPMG-CWFP- T_1 -SG para uma amostra de carne magra (CM-i), carne com alto teor de gordura (CATG-ii) e gordura pura obtida por secagem a vácuo (GPS-iii). Para a obtenção desses mapas foi utilizado o método de processamento FLI. As linhas tracejadas em preto e vermelho indicam a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1 e 2, respectivamente.

Os sinais presentes no mapa da CM e CATG com baixa intensidade e $T_1/T_2 > 2$ (acima da linha vermelha tracejada) podem ser correlacionados com a água ligada a proteína, visto que estes se encontram em regiões de elevada razão T_1/T_2 , característica essa atribuída a baixa mobilidade da água nesta condição: levando ao aumento no valor de T_1 e diminuição do valor de T_2 , conforme previsto na literatura.²¹ Devido à baixa intensidade desses sinais e a alta T_1/T_2 é comum o deslocamento dos valores das correlações dos tempos de relaxação T_1 - T_2 apresentada entre os mapas CPMG-CWFP- T_1 -SG (Figura 51 (a-i)) e IR-CPMG (Figura 51 (b-i)). Ainda, os sinais de baixa intensidade próximos com correlação T_1 - T_2 próximo a 20 – 10 ms referem-se à água ligada a gordura conforme já discutido nas análises 1D da carne com gordura (seção 5.2.3).

5.4 – Análise de gordura e carne bovina por HR-MAS RMN

Os espectros de RMN das amostras de CM, GP e GPS, em alta resolução, usando sondas convencionais resultaram em sinais alargados, não permitindo a caracterização dos sinais da água e da gordura. Por isso, as análises foram realizadas com a sonda HR-MAS, a qual minimizou as distorções causadas pela heterogeneidade da amostra, permitindo assim a obtenção de uma resolução quase que similar as obtidas em espectros de amostras em solução. Na Figura 52 são apresentados os espectros de ^1H HR-MAS RMN adquiridos para as amostras de CM, GP e GPS. Esses espectros permitem confirmar a presença de água e lipídios nas amostras de carne e gordura e desta forma reiteram os resultados discutidos nas seções 5.2.3 e 5.3.5.

O espectro de ^1H HR-MAS RMN da amostra de GPS (Figura 52 (a)) apresenta sinais característico aos encontrados na literatura para lipídios.^{81; 82} Isso é resultado do fato de a gordura bovina ser composta principalmente por triacilglicerol. Os principais ácidos graxos que a compõe são o ácido oleico (cerca de 50%) e os ácidos graxos saturados: palmítico e esteárico (35 %). Os demais ácidos graxos presentes na gordura bovina representam 15 %. ⁸¹ O espectro de ^1H HR-MAS RMN da amostra de GPS foi interpretado de acordo com a literatura, sendo que os ^1H em negrito são responsáveis pela geração dos respectivos sinais: sinal 1: $-\text{CH}_3$ terminal; sinal 2: $-(\text{CH}_2)_n-$; sinal 3: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$; sinal 4: $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$; sinal 5: $-\text{CH}_2-\text{COO}-$; sinais 6: $-\text{CH}_2-\text{OCO}-\text{R}$; sinal 7: $-\text{CH}-\text{OCO}-\text{R}$; sinal 8: $-\text{CH}=\text{CH}-$.

No espectro de ^1H HR-MAS RMN da amostra de GPS não foi observado o sinal de deslocamento químico (δ) da água em $\delta = 4,7$. Isso indica que a secagem a vácuo praticamente eliminou a água presente na amostra e por isso não foi observado o seu sinal característico nos

mapas da amostra GPS (Figura 51-iii). Já para a amostra GP é observado no espectro de ^1H em (Figura 52-b) um sinal com $\delta = 4,7$, confirmando que a amostra GP *in natura* apresenta água em sua composição, em consonância com a discussão da seção 5.2.3.

Figura 52 – Espectros de ^1H -HR-MAS RMN obtidos em um espectrômetro de 600 MHz para amostras de gordura bovina pura secada a vácuo (GPS-a), gordura bovina pura (GP-b) e carne magra (CM-c). Em (c) o espectro em cinza mostra a região do espectro de ^1H para a CM ampliada 200 vezes.

No espectro de ^1H da CM (Figura 52-c linha preta) é confirmado que a água é a componente majoritária. Não obstante, quando o espectro foi ampliado em 200 vezes (Figura 52-c linha cinza) foi possível notar que há vários sinais devidos aos metabólitos presentes na carne. Nesta ampliação observa-se um sinal intenso referente aos hidrogênios presentes nos grupos $-(\text{CH}_2)_n$, sinal 2 da Figura 52 (a). Isso corrobora com a discussão da seção 5.2.3 de que a carne analisada apresenta uma pequena quantidade de gordura intramuscular. Contudo, essa quantidade não foi suficiente para originar sinais relacionados a gordura nos mapas da CM (Figura 51-i).

6 CONCLUSÃO

Os estudos da sequência de pulsos 1D CWFP- T_1 demonstraram que esse é um método simples e rápido para determinação da constante de tempo T_1 , com duração experimental da ordem da sequência de pulsos CPMG. Além disso, os resultados obtidos pelo método CWFP- T_1 são similares aos encontrados pelo método IR. O principal inconveniente da sequência de pulsos CWFP- T_1 é a baixa S/R, no entanto, a aplicação de filtros foi demonstrada nesse trabalho como uma estratégia efetiva para contornar este inconveniente.

Frente aos resultados obtidos com a amostra composta por três soluções foi possível demonstrar que a aplicação de filtros após a aquisição dos sinais CWFP- T_1 e CPMG é uma forma de redução do ruído que não aumenta o tempo experimental. Vale ressaltar que a seleção inadequada do parâmetro que determina o grau de filtragem pode gerar interpretações imprecisas dos dados. Dentre os filtros apresentados, os que demonstraram ser mais eficazes na redução do ruído sem distorcer as informações da amostra foram o *wavelet* (WA) e o Savitzky-Golay (SG). Além disso, a aplicação do filtro WA em sinais CWFP- T_1 de carne bovina com gordura e gordura bovina permitiu obter melhor resolução da distribuição de T_1 desses sinais, o que possibilitou a determinação do teor de gordura das amostras analisadas. Ainda, esse estudo demonstrou que a sequência de pulsos CWFP- T_1 é um bom método para determinação do teor de gordura em carne bovina e, possivelmente, também em outros tipos de carne.

Com relação às sequências de pulsos 2D-CWFP, o método CWFP- T_1 -CPMG demonstrou resultados similares ao apresentado pelo método IR-CPMG, tanto com relação ao tempo experimental e a S/R quanto com relação a disposição das informações no mapa 2D. Por outro lado, o método CPMG-CWFP- T_1 apresenta tempo experimental inferior ao método IR-CPMG para amostras com $T_1 \sim T_2$ e $T_1 > T_2$; e tempo similar ao método SR-CPMG para amostras com $T_1 \sim T_2$. Entretanto o método CPMG-CWFP- T_1 demonstrou uma S/R seis vezes inferior aos outros três métodos, por isso foi aplicado o filtro SG nos sinais provenientes desse método. A aplicação desse filtro permitiu o aumento da S/R do sinal CPMG-CWFP- T_1 em aproximadamente seis vezes.

O mapa 2D obtido com o sinal CPMG-CWFP- T_1 , após a aplicação do filtro SG, apresentou maior resolução na dimensão de T_1 , em relação aos outros três métodos de determinação da correlação T_1 - T_2 utilizados neste trabalho. Fato esse que é decorrente da sequência de pulsos CWFP- T_1 constituir a dimensão de aquisição do método CPMG-CWFP- T_1 . Por fim, por ter sido adquirido experimentalmente, para amostra composta por três soluções, um número três vezes a mais de pontos na sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 do que nos

métodos SR-CPMG, IR-CPMG e CWFP- T_1 -CPMG, praticamente não afetou a resolução dos mapas. Entretanto, quando reduzimos o número de pontos em dez vezes, a resolução dos mapas 2D gerados pelo método FLI é reduzida, enquanto a resolução dos mapas 2D gerados pelo método máxima entropia não é afetada. Dessa forma, podemos inferir que a técnica CPMG-CWFP- T_1 possui tempo experimental da ordem da sequência de pulsos SR-CPMG, contudo, quando associado à um método de redução de ruído, apresenta melhor resolução na dimensão de T_1 do que as técnicas que adquirirem o sinal pela dimensão de T_2 .

A sequência de pulso CPMG-CWFP- T_1 associada ao filtro SG demonstrou ser um bom método para o estudo de carne com gordura e gordura pura, visto que esse propiciou a obtenção de mapas com melhor distinção entre os dois sinais pertencentes à gordura do que o método IR-CPMG. Dessa maneira, podemos concluir que a utilização da constante de tempo T_1 como dimensão de aquisição tem vantagens sobre o emprego do tempo de relaxação T_2 na dimensão de aquisição para o caso da amostra de carne com gordura.

Ainda, os espectros de ^1H de HR-MAS RMN ajudaram a confirmar os resultados discutidos sobre a carne e a gordura obtidos por experimentos de RMN-DT 1D e 2D.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo das aplicações da sequência de pulsos CPMG-CWFP- T_1 deve ser ampliado para outras amostras a fim de avaliar o potencial dessa técnica frente a outros sistemas. Além disso, outras equações núcleos que possam ser utilizadas para processar o sinal CPMG-CWFP- T_1 e não que requeiram o pré-processamento de remoção do *offset* devem ser estudadas. Ainda, recomenda-se que outros métodos, que têm grande potencial de aplicação na RMN-DT e que foram identificados no decorrer deste trabalho, sejam objetos de estudos futuros. Um desses métodos se refere à correlação entre a sequência CWFP- T_1 e a técnica de determinação do coeficiente de difusão (D) em um experimento 2D, a fim de determinar a correlação D- T_1 . O outro método é fundamentado na determinação rápida da correlação T_1 - T_2 por meio de uma técnica *pseudo* 2D que correlaciona os sinais adquiridos em experimentos 1D com a sequências CWFP- T_1 e CPMG.

REFERÊNCIAS

- 1 PAULETA, S. R.; MOURA, J. J. G. RMN biomolecular: desenvolvimentos recentes aplicações modernas da RMN à biologia. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, Lisboa, v. 117, p. 31-35, 2010.
- 2 SILVA, R. O. **A espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa: estruturas moleculares, mecanismos de reação e metabolômica**. 2010. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, DEpartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- 3 LEAL, A. P. F. **Aplicação do método de ressonância magnética nuclear para identificação e quantificação de polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135**. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2013.
- 4 VOLD, R. L.; WAUGH, J. S. Measurement of spin relaxation in complex systems. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 48, n. 8, p. 3831-3832, 1968.
- 5 MARKLEY, J. L.; HORSLEY, W. J.; KLEIN, M. P. Spin-lattice relaxation measurements in slowly relaxing complex spectra. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 55, n. 7, p. 3604-3605, 1971.
- 6 MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, New York, v. 29, n. 8, p. 688-691, 1958.
- 7 PATEL, J. P.; HSU, S. L. Development of low field NMR technique for analyzing segmental mobility of crosslinked polymers. **Journal of Polymers Science, Part B: Polymer Physics**, Hoboken, v. 56, p. 639-642, 2018.
- 8 WILLIAMSON, N. H.; RÖDING, M.; GALVOSAS, P.; MIKLAVCIC, S. J.; NYDÉN, M. Obtaining T1-T2 distribution functions from 1-dimensional T1 and T2 measurements: the pseudo 2-D relaxation model. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 269, p. 186-195, 2016.
- 9 LOOK, D. C.; LOCKER, D. R. Nuclear spin-lattice relaxation measurements by tone-burst modulation. **Physical Review Letters**, New York, v. 20, n. 18, p. 987-989, 1968.
- 10 CHANDRASEKERA, T. C.; MITCHELL, J.; FORDHAM, E.J.; GLADDEN, L.F.; JOHNS, M.L. Rapid encoding of T1 with spectral resolution in n-dimensional relaxation correlations. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 194, p. 256-161, 2008.
- 11 MITCHELL, J.; HURLIMANN, M. D.; FORDHAM, E. J. A rapid measurement of T1/T2: the DECPMG sequence. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 200, n. 2, p. 198-206, 2009.
- 12 VENANCIO, 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**, San Diego, v. 173, n. 1, p. 34-39, 2005.

- 13 MONARETTO, T.; ANDRADE, F. D.; MORAES, T. B.; SOUZA, A. A.; DE AZEVEDO, E. R.; COLNAGO, L. A. On resonance phase alternated CWFP sequences for rapid and simultaneous measurement of relaxation times. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 259, p. 174-178, 2015.
- 14 VENKATARAMANAN, L.; SONG, Y.-Q.; HURLIMANN, M. D. Solving Fredholm integrals of the first kind with tensor product structure in 2 and 2.5 dimensions. **IEEE Transactions on Signal Processing**, New York, v. 50, p. 1017-1026, 2002.
- 15 DENG, F.; XIAO, L.; LIAO, G.; ZONG, F.; CHEN, WEILIANG. A New approach of two-dimensional the NMR relaxation measurement in flowing fluid. **Applied Magnetic Resonance**, Wien, v. 45, n. 2, p. 179-192, 2014.
- 16 DENG, F.; XIAO, L.; CHEN, W.; LIU, H.; LIAO, G.; WANG, M.; XIE, Q. Rapid determination of fluid viscosity using low-field two-dimensional NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 247, p. 1-8, 2014.
- 17 SONG, Y.-Q.; VENKATARAMANAN, L.; BURCAW, L. Determining the resolution of Laplace inversion spectrum. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 122, n. 10, p. 104104, 2005.
- 18 MITCHELL, J.; CHANDRASEKERA, T. C.; GLADDEN, L. F. Numerical estimation of relaxation and diffusion distributions in two dimensions. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Amsterdam, v. 62, p. 34-50, 2012.
- 19 GIL, V. S. M.; GERALDES, C. C. G. F. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1012 p.
- 20 COATES, R. G.; XIAO, L.; PRAMMER, G. M. **NMR logging: principles and applications**. Houston: Gulf Publishing Company, 1999. 251 p.
- 21 CLARIDGE, T. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2016. 552 p.
- 22 FREITAS, C. C. J.; BONAGAMBA, J. T. **Fundamentos e aplicações de ressonância magnética nuclear**. Rio de Janeiro: Associação de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear, 1999.
- 23 CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, New York, v. 94, n. 3, p. 630-638, 1954.
- 24 HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, New York, v. 80, n. 4, p. 580-594, 1950.
- 25 BRADFORD, R.; CLAY, C.; STRICK, E. A steady-state transient technique in nuclear induction. **Physical Review**, New York, v. 84, n. 1, p. 157-158, 1951.
- 26 CARR, H. Y. Steady-state free precession in nuclear magnetic resonance. **Physical Review Letters**, New York, v. 1, n. 11, p. 429-430, 1958.

- 27 FREEMAN, R.; HILL, H. D. W. Phase and intensity anomalies in fourier transform NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 4, n. 3, p. 366-383, 1971.
- 28 AZEREDO, R. B. D.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, n. 11, p. 2401-2405, 2000.
- 29 MORAES, T. B.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Applications of continuous wave free precession sequences in low-field, time-domain NMR. **Applied Sciences**, Basel, v. 9, n. 7, p. 1312, 2019-03-29 2019.
- 30 AZEREDO, R.; COLNAGO, L.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, n. 11, p. 2401-2405, 2000.
- 31 AZEREDO, R. B. D.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Flow sensitivity and coherence in steady-state free spin precession. **Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, Melville, v. 64, n. 1, p. 1-4, 2001.
- 32 AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUZA, A. A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession - practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 478, n. 2, p. 313-320, 2003.
- 33 DE ANDRADE, F. D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L. A. Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles. **Talanta**, London, v. 84, n. 1, p. 84-88, 2011.
- 34 SONG, Y. Q.; VENKATARAMANAN, L.; HÜRLIMANN, M. D.; FLAUM, M.; FRULLA, P.; STRALEY, C. T1-T2 correlation spectra obtained using a fast two-dimensional Laplace inversion. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 154, n. 2, p. 261-268, 2002.
- 35 LEE, J. H.; LABADIE, C.; SPRINGER, C. S.; HARBISON, G. S. Two-dimensional inverse Laplace transform NMR: altered relaxation times allow detection of exchange correlation. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 115, n. 17, p. 7761-7764, 1993.
- 36 MONEILHET, L.; KORB, J. P.; MITCHELL, J.; MCDONALD, P. J. Observation of exchange of micropore water in cement pastes by two-dimensional T2-T2 nuclear magnetic resonance relaxometry. **Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, Melville, v. 74, n. 6, p. 061404-1-061404-9, 2006.
- 37 HÜRLIMANN, M. D.; VENKATARAMANAN, L. Quantitative measurement of two-dimensional distribution functions of diffusion and relaxation in grossly inhomogeneous fields. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 157, n. 1, p. 31-42, 2002.
- 38 HÜRLIMANN, M. D.; BURCAW, L.; SONG, Y.-Q. Quantitative characterization of food products by two-dimensional D-T2 and T1-T2 distribution functions in a static gradient. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 297, n. 1, p. 303-311, 2006.

- 39 SONG, Y.-Q. A 2D NMR method to characterize granular structure of dairy products. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 324-334, 2009.
- 40 SCHOENFELDER, W.; GLÄSER, H.; MITREITER, I.; STALLMACH, F. Two-dimensional NMR relaxometry study of pore space characteristics of carbonate rocks from a Permian aquifer. **Journal of Applied Geophysics**, Amsterdam, v. 65, n.1, p. 21-29, 2008.
- 41 WEBER, D.; MITCHELL, J.; MCGREGOR, J.; GLADDEN, L. F. Comparing strengths of surface interactions for reactants and solvents in porous catalysts using two-dimensional NMR relaxation correlations. **The Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 113, n. 16, p. 6610-6615, 2009.
- 42 MCDONALD, P. J.; KORB, J. P.; MITCHELL, J.; MONTEILHET, L. P. J. Surface relaxation and chemical exchange in hydrating cement pastes: a two-dimensional NMR relaxation study. **Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, Melville, v. 72, n. 1, p. 011409-1-011409-9, 2005.
- 43 SONG, M. K.; JONATHAN, M.; HAMOUDA, J.; GLADDEN, F. L. Simultaneous monitoring of hydration kinetics, microstructural evolution, and surface interactions in hydrating gypsum plaster in the presence of additives. **Journal of Materials Science**, London, v.10, p. 5282-5290, 2010.
- 44 MCDONALD, P. J.; MITCHELL, J.; MULHERON, M.; APTAKER, P. S.; KORB, J.; MONTEILHET, L. Two-dimensional correlation relaxometry studies of cement pastes performed using a new one-sided NMR magnet. **Cement and Concrete Research**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 303-309, 2007.
- 45 DUNN, K. J.; BERGMAN, D. J.; LATORRACA, G. A. NMR data acquisition and inversion. *In*: DUNN, K. J.; BERGMAN, D. J.; LATORRACA, G. A **Nuclear magnetic resonance petrophysical and logging applications**. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. v. 32, p. 165-196.
- 46 MITCHELL, J.; GLADDEN, L. F.; CHANDRASEKERA, T. C.; FORDHAM, E. J. Low-field permanent magnets for industrial process and quality control. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Amsterdam, v. 76, p. 1-60, 2014.
- 47 P. BUTLER, J.; A. REEDS, J.; V. DAWSON, S. Estimating solutions of first kind integral equations with nonnegative constraints and optimal smoothing. **SIAM Journal on Numerical Analysis**, Philadelphia, v. 18 n.3, p. 381-397, 1981.
- 48 MARIETTE, F.; GULLEMENT, J. P.; TELLIER, C.; MARCHAL, P. Continuous relaxation time distribution decomposition by MEM. *In*: MARIETTE, F.; GULLEMENT, J. P.; TELLIER, C.; MARCHAL, P. **Signal treatment and signal analysis in NMR**. Amsterdam: Elsevier, 1996. v.18, p. 218-234.
- 49 MOSKAU, D. Application of real time digital filters in NMR spectroscopy. **Concepts in Magnetic Resonance**, Hoboken, v.15, n. 2, p.164-176, 2002

- 50 SIEMENS. **Introduction to Filters: FIR versus IIR**. Alemanha, 29 ago. 2018. Disponível em: <https://community.plm.automation.siemens.com/t5/Testing-Knowledge-Base/Introduction-to-Filters-FIR-versus-IIR/ta-p/520959> . Acesso em: 22 de março de 2019.
- 51 GUSTAFSSON, F. Determining the Initial States in Forward-Backward Filtering. **IEEE Transactions on Signal Processing**, New York, v. 44, n. 4, p. 988-992, 1996.
- 52 SMITH, S. W. **The scientist and engineer's guide to digital signal processing**. 2. ed. California: Technical Publishing, 1999.
- 53 DWIVEDI, S. Comparison and implementation of different types of iir filters for lower order & economic rate. **International Journal of Engineering Studies and Technical Approach**, New Delhi, v. 1, n. 10, p. 15-26, 2015.
- 54 SCHAFER, R. W. What is a Savitzky-Golay Filter? **IEEE Signal Processing Magazine**, Nova York, v. 28, n. 4, p. 111-117, 2011.
- 55 SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least square rocedure. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1972.
- 56 STEINIER, J.; TERMONIA, Y.; DELTOUR, J. Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 44, n. 11, p. 1906-1909, 1972.
- 57 MISITI, M.; MISITI, Y.; OPPENHEIM, G.; POGGI, J. **Wavelet toolbox for use with MATLAB: user's guide**. Natick:The MathWorks, 2018a.
- 58 CASTILHO, J. E.; DOMINGUES, M. O.; PAGAMISSE, A.; MENDES, O. **Introdução ao mundo das wavelets**. São Carlos: Sociedade Brasileira de Matemática Aplicada e Computacional, 2012.
- 59 GE, X.; FAN, Y.; LI, J.; WANG, Y.; DENG, S. Noise reduction of nuclear magnetic resonance (NMR) transversal data using improved wavelet transform and exponentially weighted moving average (EWMA). **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 251, p. 71-83, 2014.
- 60 STPHANE, M. **A wavelet tour of signal processing: the sparse way**. 3. ed. Orlando: Academic Press, 2008.
- 61 REIS, A. J. R.; SILVA, A. P. A. D. Aplicação da transformada wavelet discreta na previsão de carga a curto prazo via redes neurais. **Sba: Controle & Automação Sociedade Brasileira de Automatica**, Campinas, v. 15, p. 101-108, 2004.
- 62 MISITI, M.; MISITI, Y.; OPPENHEIM, G.; POGGI, J. **Wavelet toolbox for use with MATLAB: user's guide**. Natick :The MathWorks, 2009.
- 63 MENG, X.; XIE, R.; LI, C.; HU, F.; LI, C.; ZHOU, C. An NMR log echo data de-noising method based on the wavelet packet threshold algorithm. **Journal of Geophisics and Enginnering**, Oxford, v.12, n. 6, p. 956-968, 2015.

- 64 DONOHO, D. L.; JOHNSTONE, J. M. Ideal spatial adaptation by wavelet shrinkage. **Biometrika**, London, v. 81, n. 3, p. 425-455, 1994.
- 65 KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: an alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 122, p. 144-148, 2015.
- 66 COBRA, P.F.; GOMES, B. F.; MITRE, C. I. N.; BARBOSA, L. L.; MARCONCINI, L. Z.; COLNAGO, L. A. Measuring the solubility product constant of paramagnetic cations using time-domain nuclear magnetic resonance relaxometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 121, p. 14-15, 2015.
- 67 KOCK, F. V. C. **Análise relaxométricas para compostos de coordenação contendo íons paramagnéticos em solução**. 2018. Tese (Doutorado em Química - Química Analítica e Inorgânica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.
- 68 THE MATHWORKS. **Signal processing toolbox for use with MATLAB: user's guide**. Natick: The MathWorks, 2001.
- 69 MORAES, T. B.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Rapid and simple determination of T1 relaxation times in time-domain NMR by continuous wave free precession sequence. **Journal Magnetic Resonance**, San Diego, v. 270, p. 1-6, 2016.
- 70 KAPTEIN, R.; DIJKSTRA, K.; TARR, C. E. A single-scan fourier transform method for measuring spin-lattice relaxation times. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 24, n. 2, p. 295-300, 1976.
- 71 MONARETTO, T.; SOUZA, A.; MORAES, T. B.; BERTUCCI-NETO, V.; RONDEAU-MOURO, C.; COLNAGO, L. A. Enhancing signal-to-noise ratio and resolution in low-field NMR relaxation measurements using post-acquisition digital filters. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, edição especial, p. 1-10, 2018.
- 72 MA, S.; KONG, L.; CHEN, J. An improved NMR signal de-noising algorithm based on wavelet transform. **Journal of Computational Information Systems**, Norwalk, v. 13, p. 4651-4659, 2011.
- 73 DONOHO, D. L.; JOHNSTONE, I. M. Minimax estimation via wavelet shrinkage. **The Annals of Statistics**, Ohio, v. 26, n. 3, p. 879-921, 1998.
- 74 SANTOS, P. M.; CORREA, C. C.; FORATO, L. A.; TULLIO, R. R.; CRUZ, G. M.; COLNAGO, L. A. A fast and non-destructive method to discriminate beef samples using TD-NMR. **Food Control**, Oxford, v. 38, p. 204-208, 2014.
- 75 RENOU J, P.; KOPP, J.; VALIN, C. Use of low resolution NMR for determining fat content in meat products. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 23-29, 1985.

76 PEREIRA, F. M. V.; PFLANZER, S. B.; GOMIG, T.; GOMES, C. L.; DE FELICIO, P. E.; COLNAGO, L. A. Fast determination of beef quality parameters with time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, London, v. 108, p. 88-91, 2013.

77 BERTRAM, H. C.; PURSLOW, P. P.; ANDERSEN, H. J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 4, p. 824-829, 2002.

78 BERTRAM, H. C.; DØNSTRUP, S.; KARLSSON, A. H.; ANDERSEN, H. J. Continuous distribution analysis of T2 relaxation in meat-an approach in the determination of water-holding capacity. **Meat Science**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 279-285, 2002.

79 VAN LANDEGHEM, M.; HABER, A.; LACAILLERIE, D. J.; BLÜMICH, B. Analysis of multisite 2D relaxation exchange NMR. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, London, v. 36A, n. 3, p. 153-169, 2010.

80 BERMAN, P.; MEIRI, N.; COLNAGO, L. A.; MORAES, T. B.; LINDER, C.; LEVI, O.; PARMET, Y.; SAUNDERS, M.; WIESMAN, Z. Study of liquid-phase molecular packing interactions and morphology of fatty acid methyl esters (biodiesel). **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, n. 12, p. 1-16, 2015.

81 KODANI, Y.; MIYAKAWA, T.; KOMATSU, T.; TANOKURA, M. NMR-based metabolomics for simultaneously evaluating multiple determinants of primary beef quality in Japanese Black cattle. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1297, p. 1-13, 2017.

82 SANTOS, R. C. D.; CHAGAS, E. A.; MELO FILHO A. A.; TAKAHASHI, J. A.; MONTERO, I. F.; DOS SANTOS, G. F.; CHAGAS, P. C.; DE MELO, A. C. G. R. Chemical characterization of oils and fats from Amazonian fruits by ¹H NMR. **Chemical Engineering Transactions**, Milan, v. 64, p. 235-240, 2018.