Luiz Ferreira Neves Junior

Avaliação do aumento da dispersão espectral em análises de
RMN usando relaxação paramagnética

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Neves Junior, Luiz Ferreira

Avaliação do aumento da dispersão espectral em análises de RMN usando relaxação paramagnética / Luiz Ferreira Neves Junior. — São Carlos, 2021.
121 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. 2. Európio. 3. Metabólitos. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho: aos meus pais Luiz e Sueli, à minha noiva Marcella, e a todos que contribuíram de alguma maneira.

“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível, que o céu é o limite, e você é imbatível”

Adaptado de Racionais MC's

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pela orientação, ensinamentos, confiança e paciência.

Ao Pesquisador Dr. Luiz Alberto Colnago pela sabedoria, supervisão, colaboração, sugestões, piadas e por todos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Jens Øllgaard Duus, primeiramente, por aceitar seu *brazilian student*, pelo acolhimento, sugestões, inspirações.

A Pesquisadora Dra. Elaine Cristina Paris, pela amizade, disponibilidade em ajudar e solucionar dúvidas.

Aos Professores Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Laudemir Carlos Varanda pelas sugestões e discussões construtivas que tivemos durante o exame de qualificação.

Aos Professores Dr. Antônio Aprígio, Emanuel Carrilho, Álvaro José pelos estágios PAE, e tudo que tive a oportunidade de aprender com eles.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de cursar o doutorado.

À Embrapa Instrumentação por toda estrutura fornecida para a realização deste trabalho, e ao Corpo de Suporte à Pesquisa, em especial Viviane Farias.

À Universidade Técnica da Dinamarca, pela receptividade e toda estrutura disponível para a complementação deste trabalho.

À CAPES pelas duas bolsas de estudos concedidas.

À AUREMN pelas escolas que colaboram muito com a formação dos usuários.

À todos os componentes do grupo de pesquisa de Ressonância Magnética Nuclear da Embrapa Instrumentação pelas colaborações durante o doutorado.

Aos meus pais Luiz e Sueli por todo amor, apoio e confiança.

A minha namorada Marcella por toda força, amor, companheirismo, carinho e apoio.

A minha grande amiga e “irmãzinha” Renata Sala por toda ajuda, apoio, carinho, pela atenção e disponibilidade.

Ao amigo Érico “Grissa” pelas ajudas durante a pesquisa, pelas cervejas e churrascos.

Aos companheiros da República, pelas risadas, pelos churrascos e pelos momentos de descontração.

Aos componentes do grupo de pesquisa da Dr. Elaine Paris, por toda a colaboração,

RESUMO

A ideia de que mudanças em tecidos e fluídos biológicos possam ser indicativos de doenças está presente na humanidade desde a Grécia antiga. No final da década de 60 e início da de 70 foram obtidos os primeiros perfis de metabólitos de amostras biológicas. Atualmente, na era pós-genômica, é possível verificar quais rotas metabólicas foram afetadas por determinados estresses através da identificação e quantificação de moléculas de baixa massa molecular por técnicas de alta resolução. A espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear de ^1H é uma destas técnicas, e apesar de possuir muitas virtudes, devido à grande quantidade de sinais decorrentes das substâncias presentes nas amostras biológicas em sua estreita janela espectral, são obtidos espectros com extensa sobreposição de sinais. Uma possível alternativa para solucionar esse problema consiste em tentar reduzir a equivalência dos núcleos de ^1H através da introdução de espécies químicas que alterem seus ambientes magnéticos. Neste presente trabalho foram avaliadas as melhores condições para a utilização de soluções polares contendo Eu^{3+} , espécies químicas geram perturbações no deslocamento químico com alargamento de linha negligenciáveis, em amostras de metabólitos polares. Verificou-se também que os deslocamentos de sinais que se sobrepunham tornaram possível a observação de metabólitos até então negligenciáveis por este tipo de análise. Além disso, concluiu-se diante do estudo aqui apresentado que a solução não afetou significativamente os dados quantitativos, apenas diminuiu o tempo de relaxação longitudinal, sugerindo a utilização desse tipo de reagente ajuda a diminuir o tempo de utilização do equipamento, otimizando a análise e aumentando a produção de dados. De forma geral, este presente trabalho mostrou que a utilização da solução polar de Eu^{3+} em análises de metabólitos polares é recomendada, tanto do ponto de vista de identificação quanto de quantificação dos compostos presentes nessas amostras complexas.

ABSTRACT

The idea that changes in biological tissues and fluids could be indicative of disease has been present in mankind since ancient Greece. In the late 1960s and early 1970s, the first metabolite profiles of biological samples were obtained. Currently, in the post-genomic era, it is possible to verify which metabolic routes were affected by certain stresses through the identification and quantification of low molecular mass molecules by high-resolution techniques. The ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy is one of these techniques, and despite having many virtues, due to the large number of signals arising from the substances present in biological samples in its narrow spectral window, spectra with extensive signal overlap are obtained. A possible alternative to solve this problem is to try to reduce the equivalence of the ^1H nuclei by introducing chemical species that alter their magnetic environments. In this work, the best conditions for the use of polar solutions containing Eu^{3+} were evaluated, chemical species generate disturbances in the chemical displacement with negligible line widening, in samples of polar metabolites. It was also found that the displacements of overlapping signals made it possible to observe metabolites previously negligible by this type of analysis. In addition, it was concluded before the study presented here that the solution did not significantly affect the quantitative data, but only decreased the time of longitudinal relaxation, suggesting the use of this type of reagent helps to decrease the time of use of the equipment, optimizing the analysis and increasing data production. In general, this present work showed that the use of the Eu^{3+} polar solution in polar metabolite analyzes is recommended, both from the point of view of identification and quantification of the compounds present in these complex samples.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplo de “urine chart” utilizado a partir da idade média.	15
Figura 2 – Variação do deslocamento químico dos ^1H ligados aos carbonos do n-pentanol em CDCl_3 (0,40 ml de 0,300 mol.L ⁻¹) aumentando a concentração de $\text{Eu}(\text{DPM})_3$. Temperatura 30°C.	19
Figura 3 – Largura dos sinais de ressonância. Sinal largo devido à rápida taxa de relaxação transversal à esquerda, e sinal fino devido a esta taxa de relaxação transversal mais lenta à direita.	20
Figura 4 - Espectro de 60 MHz de ^1H RMN de 0,40 mL de solução de CDCl_3 contendo 0,300 M n-heptanol em diferentes razões molar [moles de $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ por mol de n-heptanol]: (a) 0,00; (b) 0,19; (c) 0,78. Temperatura 30°C.	20
Figura 5 - Sequência de pulso de inversão e recuperação.	28
Figura 6 - Sequência de pulso CPMG.	29
Figura 7 – Sequência de Spin-Eco, mostrando excitação do vetor magnetizado resultante do momento magnético dos núcleos, suas perda e retomada de coerência.	29
Figura 8 – Espectros de RMN de ^1H dos aminoácidos da Tabela 1, em tampão Citrato pD 3,0.	39
Figura 9 – Moléculas da Fenilalanina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.	41
Figura 10 – Moléculas da Glutamato indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.	42
Figura 11 – Moléculas da Arginina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.	43

Figura 12 – Moléculas da Serina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.....	44
Figura 13 – Moléculas da Valina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.....	45
Figura 14 – Região do espectro mostrando a evolução dos sinais de RMN de ^1H do aminoácido Serina, com concentração $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, em pD 3,0, diante de diferentes concentrações de Eu^{3+}	46
Figura 15 – Moléculas da Fenilalanina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.	49
Figura 16 – Moléculas da Glutamato indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.	50
Figura 17 – Moléculas da Arginina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.	51
Figura 18 – Moléculas de Serina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 .	

Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.	52
Figura 19 – Moléculas da Valina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.	53
Figura 20 - Moléculas da Fenilalanina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.....	55
Figura 21 – Moléculas da Glutamato indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.....	56
Figura 22 - Moléculas da Arginina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.....	57
Figura 23 - Moléculas de Serina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.....	58
Figura 24 - Moléculas da Valina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações	

entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.....	59
Figura 25 – Gráficos apresentando o comportamento das medidas de quantificação da concentração relativa dos aminoácidos em diferentes concentrações de Eu^{3+}	60
Figura 26 - Espectros de RMN de ^1H da mistura complexa de aminoácidos na presença de Eu^{3+}	63
Figura 27 - Expansão da região entre 0,5 e 4,5 ppm dos espectros de RMN de ^1H da Figura 26.	64
Figura 28 - Espectros de 600 MHz de RMN de ^1H monitorando a mudança do deslocamento químico dos picos através de adições sucessivas de 15 μL de solução 1,000 mol.L^{-1} de Eu^{3+} em uma solução de mistura complexa de aminoácidos livre de Eu^{3+} (coloração preta).	66
Figura 29 - Expansão da região entre 0,7 e 3,0 ppm dos espectros de RMN de ^1H da	67
Figura 30 - Expansão da região entre 2,4 e 4,4 ppm dos espectros de RMN de ^1H da	67
Figura 31 – Expansão da região entre 6,8 e 8,0 ppm dos espectros de RMN de ^1H da	68
Figura 32 - Expansão da região entre 3,5 e 4,4 ppm ppm dos três primeiros espectros de RMN de ^1H da.....	68
Figura 33 – Espectros de ^1H DOSY da mistura complexa de aminoácidos livre de Eu^{3+}	71
Figura 34 - Espectros de ^1H DOSY da mistura complexa de aminoácidos após a adição de 150 μL de solução 1,000 mol.L^{-1} de Eu^{3+}	72
Figura 35 – Evolução dos espectros de 400 MHz de RMN de ^1H de leite desnatado comercial em diferentes faixas de pD.	77
Figura 36 – Comparativo dos espectros de RMN de ^1H obtidos através dos protocolos A, B e C de preparo de amostras de leite.	78
Figura 37 – Monitoramento dos efeitos observados nos espectros de RMN de ^1H gerados pela acidificação de amostras de leite preparados pelo protocolo C.....	79
Figura 38 - Monitoramento do comportamento dos sinais presentes nos espectros de 600 MHz para RMN de ^1H da amostra extraída pelo protocolo C em pD 3,00 livre de	

Eu ³⁺ (coloração preta) submetida a adições consecutivas de 15 µL de solução 1,000 mol.L ⁻¹ de Eu ³⁺ , de baixo para cima.	80
Figura 39 - Espectros de RMN de ¹ H- ¹³ C HSQC auxiliando a identificação de metabólitos presentes na amostra real de leite.	81
Figura 40 - Espectros de 600 MHz de RMN de ¹ H de amostras extraída pelo protocolo C em pD 3,00: livre (acima), e contendo 60 mmol.L ⁻¹ de Eu ³⁺ (abaixo).	82
Figura 41 – Espectros de 400 MHz de RMN de ¹ H completos referentes a Figura 35.	93
Figura 42 – Espectros de 400 MHz de RMN de ¹ H completos referentes a Figura 36.	94
Figura 43 - Espectros de 400 MHz de RMN de ¹ H completos referentes a Figura 37.	95
Figura 44 – Espectros de 400 MHz de RMN de ¹ H completos referentes a Figura 38.	96
Figura 45 - Espectro de 600 MHz de RMN de ¹ H completo livre de Eu ³⁺ referente a Figura 40.	97
Figura 46 - Espectro de 600 MHz de RMN de ¹ H completo contendo Eu ³⁺ referente a Figura 40.	98
Figura 47 – Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 0,8 e 2,3 ppm da FONTE: Autoria própria.	99
Figura 48 - Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 1,8 e 3,0 ppm da FONTE: Autoria própria.	100
Figura 49 - Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 3,0 e 4,4 ppm da Figura 30.	101
Figura 50 - Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 6,8 e 7,9 ppm da Figura 31.	102
Figura 51 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Valina após adições de solução contendo Eu ³⁺	106
Figura 52 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Serina após adições de solução contendo Eu ³⁺	106
Figura 53 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Arginina após adições de solução contendo Eu ³⁺	107
Figura 54 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Glutamato após adições de solução contendo Eu ³⁺	107

Figura 55 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Fenilalanina após adições de solução contendo Eu^{3+}	108
Figura 56 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Histidina após adições de solução contendo Eu^{3+}	108
Figura 57 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Alanina após adições de solução contendo Eu^{3+}	109
Figura 58 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Isoleucina após adições de solução contendo Eu^{3+}	109
Figura 59 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Leucina após adições de solução contendo Eu^{3+}	110
Figura 60 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Lisina após adições de solução contendo Eu^{3+}	110
Figura 61 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Metionina após adições de solução contendo Eu^{3+}	111
Figura 62 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Prolina após adições de solução contendo Eu^{3+}	111
Figura 63 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Glicina após adições de solução contendo Eu^{3+}	112
Figura 64 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Glutamina após adições de solução contendo Eu^{3+}	112
Figura 65 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Treonina após adições de solução contendo Eu^{3+}	113
Figura 66 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Asparagina após adições de solução contendo Eu^{3+}	113
Figura 67 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Aspartato após adições de solução contendo Eu^{3+}	114
Figura 68 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Tirosina após adições de solução contendo Eu^{3+}	114
Figura 69 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão do Citrato após adições de solução contendo Eu^{3+}	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aminoácidos essenciais utilizados nos experimentos preliminares como representantes de cada tipo de cadeia lateral e subdivisões.	33
Tabela 2 – Tabela apresentando os valores dos tempos de relaxação longitudinal na ausência de Eu^{3+} , T_1^0 , para cada um dos núcleos de ^1H ligados aos carbonos de cada aminoácido identificados por numeração fixa.	47
Tabela 3 – Tabela apresentando os valores dos tempos de relaxação longitudinal com excesso de Eu^{3+} , T_1^f , para cada um dos núcleos de ^1H ligados aos carbonos de cada aminoácido identificados por numeração fixa.	48
Tabela 4 - Tabela contendo os valores médios da quantificação relativa, os valores dos desvios padrão e os valores calculados de t para cada espécie química.	61
Tabela 5 - Tabela contendo os coeficientes de difusão observados para cada espécie química e cada adição de Eu^{3+}	74
Tabela 6 - Tabela contendo as constantes de equilíbrio, K_{eq} , os coeficientes de difusão livre, D_{livre} , os valores médios dos coeficientes de difusão observados, $D_{média}$, desvio padrão e o valor calculado de t para cada espécie química. Onde: H_0 : $\mu_0 = \mu$, menor interação entre Eu^{3+} e a espécie química do aminoácido, ou menor perturbação do raio hidrodinâmico desse; H_1 : $\mu_0 \neq \mu$, maior interação entre Eu^{3+} e a espécie química do aminoácido, ou seja, maior perturbação do raio hidrodinâmico dessa espécie.	75
Tabela 7 – Tabela contendo os metabólitos de amostras de leite, monitorados nos espectros da Figura 40.	83
Tabela 8 – Tabela com os a identificação de cada aminoácido presente nas Figuras 29 a 31.	103
Tabela 9 - Tabela contendo os valores dos coeficientes de Difusão observados inicial e final dos aminoácidos presentes nas Figura 33 e 34, respectivamente.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1d	Unidimensional
AQ	Tempo de aquisição
AUREMN	Associação de Usuários de REssonância Magnética
BBO	<i>BroadBand Observed</i>
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
CPMG	Car-Purcell-Meiboom-Gill
d	Dubleto
dd	Duplo duplete
DOSY	<i>Diffusion Ordered SpectroscopY</i>
DS	<i>Dummy Scans</i>
DTU	Universidade Técnica da Dinamarca
EM	Espectrometria de Massas
FID	Decaimento livre de indução
gp	Gradiente de pulso
HMDB	<i>Human Metabolome DataBase</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy</i>
IR	Inversão recuperação
LED	<i>Longitudinal Eddy current Delay</i>
m	Multiplete
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY</i>
ns	Número de <i>Scans</i>
PC	Fosfatidicolina
PE	Fosfodietanolamina
PFGSE	Ecos de <i>spin</i> com gradientes de campo magnético pulsado
PI	Fosfatidilinositol
PL	Fosfolipídios
ppm	Parte por milhão
pr	Pré-saturação
q	Quarteto/Quadruplete
rf	RádioFrequência

RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
SPH	Esfingomielina
SW	Janela espectral
TD	Tamanho do FID
t	Tripleto
t_m	<i>Mixing time</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Tempo de difusão
$\Delta\delta$	Deslocamento químico induzido ($\delta_i - \delta_0$)
δ	Deslocamento químico ou duração do pulso de gradiente para DOSY
δ_i	Deslocamento químico do substrato complexado na concentração i de Eu^{3+}
δ_0	Deslocamento químico do substrato livre
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
T_2	Tempo de relaxação transversal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Espectroscopia de RMN	17
1.1.1	Reagente de deslocamento	17
1.2	Diffusion Ordered Spectroscopy – DOSY	21
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Materiais e reagentes	24
3.2	Instrumentação de RMN	25
3.3	Aquisição e processamento de dados	26
3.3.1	Espectros de RMN de ^1H	26
3.3.2	Medidas de T_1 utilizando Inversão-Recuperação	27
3.3.3	Medidas de T_2 utilizando CPMG	28
3.3.4	Análises quantitativas de RMN - qNMR	29
3.3.5	Análises de DOSY de ^1H	30
3.3.6	$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC	31
3.4	Avaliação do efeito dos íons Eu^{3+} em soluções contendo padrões de aminoácidos isolados	32
3.5	Avaliação do efeito do Eu^{3+} em mistura complexa de padrões de aminoácidos 33	
3.5.1	Preparo de amostras	33
3.6	Avaliação do efeito do Eu^{3+} em metabólitos presentes em amostras reais utilizando RMN de ^1H	34
3.6.1	Preparo de amostras de leite	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Avaliação dos efeitos de íons Eu^{3+} em padrões de aminoácidos isolados	38
4.2	Avaliação dos efeitos de íons Eu^{3+} em misturas complexas de padrões de aminoácidos	61
4.3	Avaliação da aplicação de íons Eu^{3+} em amostras de leite	76
5	CONCLUSÃO	84
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

APÊNDICE A - Espectros de RMN de ^1H completos	93
APÊNDICE B - Espectros de RMN de ^1H da mistura complexa livre de Eu^{3+}	99
APÊNDICE C – Tabela com a identificação dos metabólitos das figuras 29 a 31...	103
APÊNDICE D – Tabela com os valores dos coeficientes difusão dos metabólitos .	105
APÊNDICE E – Gráficos contendo a variação dos coeficientes de difusão de cada metabólito após cada adição de Eu^{3+}	106
ANEXO A – Tabela contendo os termos traduzidos até o momento pela Comissão de Nomenclatura e Tradução da AUREMN.....	116

1 INTRODUÇÃO

A ideia de que mudanças em tecidos e fluídos biológicos possam ser indicadores de doenças está presente na humanidade ao menos desde os tempos da Grécia antiga. Diagramas e ilustrações como os conhecidos “*urine charts*”, como apresentado na Figura 1, foram amplamente utilizados em diagnósticos médicos a partir da idade média. Essas projeções, basicamente, ligavam as cores, os cheiros e os sabores da urina a diferentes condições médicas.¹

Figura 1 - Exemplo de “*urine chart*” utilizado a partir da idade média.

Fonte: NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, p. 1054, 2008.

Em 1968 e 1971, foram apresentados a comunidade científica dois trabalhos distintos que buscaram obter perfis de metabólitos em amostras biológicas utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O primeiro destes trabalhos, realizado por Horning que analisou amostras de sangue, enquanto o segundo, foi produzido por Pauling que avaliou amostras de urina. Essas duas pesquisas são reconhecidas como precursoras de grandes avanços científicos gerados na compreensão de sistemas biológicos complexos.²

Atualmente, na era pós-genômica, pesquisas em diversas áreas do conhecimento humano têm testemunhado um grande aumento em estratégias que fornecem uma visão integral da regulação molecular das células e do organismo,^{3; 4} originando outras novas ciências “ômicas”, como por exemplo: a Transcriptômica, a Proteômica, e a Metabolômica.

Embora estas ciências “ômicas” sejam complementares e, de modo geral, apresentem o mesmo nível de importância quando comparadas entre si, em determinadas situações, uma mostra-se mais indicada que outra. A Metabolômica, por exemplo, apesar de ser considerada a mais recente entre as ciências “ômicas”, é especialmente útil por apresentar uma visão holística de mudanças em determinados processos metabólicos complexos que podem ser afetados por diversos fatores como genótipo, meio, estilo de vida e hábitos alimentares.^{5; 6; 7} Este tipo de análise é de fundamental importância em abordagens que buscam identificar quais rotas metabólicas foram perturbadas por um determinado estresse, como patologias, drogas ou alimentos.⁸

Os estudos metabolômicos consistem basicamente na identificação e na quantificação de uma coleção de metabólitos, moléculas com baixa massa molecular presentes em uma célula ou organismo, as quais participam das reações metabólicas requeridas para o seu crescimento, manutenção e funcionamento normal,⁹ refletindo instantaneamente suas atividades celulares.¹⁰ Na maioria dos casos, os dados são obtidos através de protocolos bem estabelecidos que empregam poderosas tecnologias de alto rendimento, como a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (RMN) e/ou como a Espectrometria de Massas (EM).^{11 - 19} Estas técnicas produzem uma vasta faixa de informações sobre metabólitos em uma única medida. Os dados obtidos são confrontados com as informações existentes em bancos de dados de metabólitos conhecidos.^{20; 21; 22} Em muitas situações, a aplicação de apenas uma dessas técnicas não é suficiente, pois ambas apresentam vantagens e desvantagens. Embora a EM seja mais sensível, geralmente seu uso está condicionado a uma prévia utilização de alguma técnica cromatográfica, enquanto isto, a RMN é mais confiável no ponto de vista da determinação de concentrações, não requer tratamento físico ou químico prévio à análise, além de não danificar os analitos.¹

1.1 Espectroscopia de RMN

A espectroscopia de RMN, em especial a de ^1H , é uma técnica bem estabelecida e poderosa para a avaliação de metabólitos em amostras biológicas.^{1; 11 - 19} Apesar de apresentar diversas vantagens como a alta resolução espectral, capacidade global de detecção, excelente reprodutibilidade, além de fácil preparo de amostras,¹⁹ em muitas situações, devido à pequena janela espectral do núcleo de ^1H e à grande quantidade de sinais decorrentes das substâncias presentes nas amostras biológicas, os espectros de RMN são obtidos com extensa sobreposição de sinais.²³ Isto pode gerar ambiguidades no assinalamento dos picos, na identificação de metabólitos e em suas quantificações.^{19; 24; 25}

Abordagens na preparação de amostras “*targeted*” estão sendo propostas para resolver as ambiguidades citadas acima, e também, para simplificar os espectros em aplicações metabolômicas.¹⁹ Fernandez-Megia et al.²⁶ e Correa et al.²⁷ descrevem a utilização de Gd^{3+} como um reagente paramagnético de relaxação de *spins* para supressão seletiva de componentes de misturas complexas. Zhang et al.¹⁹, por sua vez, utilizam nanopartículas de sílica eletricamente carregadas para alargar as linhas e diminuir a amplitude de determinados picos, ou suprimir completamente com estes sinais. Perrone et al.²⁸ e Diez-Castellnou et al.²⁹ empregam nanopartículas de ouro recobertas para saturar sinais. Em todos os casos apresentados, os resultados são decorrentes do rápido tempo de relaxação transversal, T_2 , dos metabólitos que interagem com as espécies químicas adicionadas à mistura complexa. Além disto, observaram-se em experimentos prévios, que alguns tipos de nanopartículas dispersam melhor alguns sinais de RMN.

1.1.1 Reagente de deslocamento

Os espectros de RMN de ^1H de moléculas muito simples, geralmente, não apresentam sobreposição de sinais, mas no caso de moléculas mais complexas e/ou no de misturas, é comum a existência de sobreposição de sinais, o que gera a perda de muitas informações estruturais.³⁰

Em 1969, Hinckley descobriu que a adição do aduto de piridina de Eu(DPM)_3 a uma solução de colesterol em tetracloreto de carbono gerava um importante e seletivo deslocamento de sinais do esteroide para o campo magnético baixo,^{30; 31} não sendo necessário aumentar a força do campo magnético aplicado³². Devido a essa característica, o composto utilizado recebeu o nome de reagente de deslocamento. Antes da constatação de Hinckley, sabia-se que alguns íons metálicos ocasionavam deslocamentos de sinais,³³ porém afetavam substancialmente a largura de linha dos espectros.³⁰

De forma sucinta, os reagentes de deslocamento são usados em RMN para reduzir a equivalência de núcleos através da alteração de seus ambientes magnéticos. Esses reagentes podem ser de dois tipos: solventes aromáticos ou espécies químicas paramagnéticas.^{30; 34 - 37} Nesta última classe, os reagentes de deslocamento podem atuar por dois mecanismos distintos: contato de Fermi ou pseudocontato.³¹ O primeiro altera o deslocamento químico pela transferência de densidade de *spin* eletrônico através da formação de uma ligação covalente com o núcleo metálico,³⁵ enquanto o segundo, pelo efeito do momento magnético do elétron desemparelhado.³⁵ Este mecanismo também se diferencia do primeiro pela dependência da magnitude do deslocamento com a distância do núcleo de interesse em relação ao grupo funcional, ou seja, quanto mais próximo o grupo observado estiver do grupo funcional, maior será o deslocamento sofrido,^{31; 38; 39} isto pode ser observado na Figura 2.

De acordo com Shapiro et al.⁴⁰ e Campbell⁴¹ apud Silverstein³², o mecanismo de pseudocontato é responsável pela maioria das explicações dos deslocamentos químicos induzidos gerados por reagentes de deslocamento, embora esteja claro que os prótons próximos ao sítio de complexação também sejam influenciados por interação do tipo contato de Fermi.⁴²

$$\delta_i = \delta_F + \delta_p$$

Onde: δ_F é o deslocamento químico gerado pelo mecanismo de contato de Fermi, e δ_p é gerado pelo mecanismo de pseudocontato.

Figura 2 – Variação do deslocamento químico dos ^1H ligados aos carbonos do n-pentanol em CDCl_3 (0,40 ml de 0,300 mol.L $^{-1}$) aumentando a concentração de $\text{Eu}(\text{DPM})_3$. Temperatura 30°C.

Fonte: RABENSTEIN, D. L. Applications of Paramagnetic Shift Reagents in Proton Magnetic Resonance Spectrometry. **Analytical Chemistry**. V. 43, p.1599, 1971.

Apesar de poderem ser aplicados em duas frentes na determinação estrutural, a qual uma visa diminuir a complexidade do espectro,³⁷ e a outra, diferenciar ambiguidades de sinais, os reagentes de deslocamento apresentam a desvantagem de perderem a eficácia na presença de água, o que acaba limitando o uso deste tipo de substância. Uma segunda limitação também está relacionada a solubilidade deste tipo de material em alguns solventes, por isto, o solvente mais usado nestas situações é o tetracloreto de carbono.³² Uma alternativa para driblar essa desvantagem foi a utilização de cátions de lantanídeos solúveis em meio aquoso. Porém, alguns destes aumentam a taxa de relaxação transversal, o que gera alargamento dos sinais de RMN,^{34; 43} como pode ser observado na Figura 3. De acordo com Barry, por possuírem tempo de relaxação eletrônico muito curto, os dois únicos cátions lantanídeos que geram perturbações no deslocamento químico com alargamento de linha negligenciável, são o Eu^{3+} e o Nd^{3+} .³⁷

Figura 3 – Largura dos sinais de ressonância. Sinal largo devido à rápida taxa de relaxação transversal à esquerda, e sinal fino devido a esta taxa de relaxação transversal mais lenta à direita.

FONTE: CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Oxford, Reino Unido: Elsevier, 1999.

Diante do exposto anterior, buscou-se utilizar os cátions Eu^{3+} , citados acima, tanto para a simplificação dos espectros complexos de RMN de ^1H , quanto na resolução de ambiguidade durante o assinalamento de sinais em análises de metabólitos polares, como exemplificado na Figura 4, a partir da ideia da diminuição da equivalência dos núcleos de ^1H através da alteração dos seus ambientes magnéticos.

Figura 4 - Espectro de 60 MHz de ^1H RMN de 0,40 mL de solução de CDCl_3 contendo 0,300 M n-heptanol em diferentes razões molar [moles de $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ por mol de n-heptanol]: (a) 0,00; (b) 0,19; (c) 0,78. Temperatura 30°C .

FONTE: HINCKLEY, C. C. Paramagnetic Shifts in Solutions of Cholesterol and the Dipyrindine Adduct of Trisdipivalomethanatoeuropium (III). A Shift Reagent. **Journal of the American Chemical Society**. p.5160, 1969.

1.2 Diffusion Ordered Spectroscopy – DOSY

Uma segunda solução para simplificar a análise de espectros de RMN de ^1H de misturas complexas é explorar o efeito da difusão de cada componente, quando o sinal de RMN é adquirido na presença de um gradiente de campo magnético.²⁴

As medidas de difusão utilizando-se a espectroscopia de RMN são realizadas desde 1950, com a descoberta dos ecos de *spin* por Hahn.⁴⁴ Este observou que monitorando a amplitude dos ecos de *spin* gerados por uma sequência de pulsos $[90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ\text{-}\tau\text{-(eco)-}]_n$, na presença de um gradiente linear de campo magnético estático, era possível mensurar a difusão molecular.⁴⁵ Apesar disto, a medida da difusão utilizando a sequência de ecos de *spin* de Hahn era muito onerosa, pois não permitia separar as contribuições da relaxação transversal (T_2) da difusão molecular (D)⁴⁵. Em 1954, Carr e Purcell conseguiram separar esses dois efeitos, através de uma modificação na sequência de pulso de Hahn, $90^\circ\text{-}\tau\text{-[}180^\circ\text{-}\tau\text{-(eco)-}180^\circ\text{-}\tau\text{-(eco)-}]_n$, e assim conseguiram determinar o valor da difusão da água pura a 25°C , $D=(2,5\pm0,3)\times10^{-9}\text{ m}^2\text{s}^{-1}$.⁴⁶ Apesar disto, o uso de gradientes de campo magnético estático ainda era um limitante para as medidas de difusão por RMN. Para se trabalhar com valores pequenos de coeficientes de difusão, era necessário um elevado valor de gradiente de campo, fato que implicava em um alargamento do sinal de eco obtido, e consequentemente, na diminuía muito a relação sinal-ruído.⁴⁵ A partir da década de 60, os experimentos de *spin* ecos foram aperfeiçoados, através da substituição dos gradientes estáticos por gradientes pulsados.^{47; 48; 49; 50} Estes apresentam intensidades de campo muito maiores que os primeiros.⁴⁵

A sequência da técnica de ecos de *spin* com gradientes de campo magnético pulsado ou PFGSE, por sua vez, apresenta dois pulsos de gradiente de campo com intensidade (γg) muito maior, e com duração (δ) muito menor que o tempo (τ) entre os pulsos de RF.⁴⁵

A partir do desenvolvimento da técnica PFGSE, em 1992 Morris e Johnson Jr. desenvolveram um novo método para o estudo da difusão molecular por RMN. Este ficou conhecido como *Diffusion Ordered Spectroscopy* ou DOSY.^{51; 52; 53} Esta é uma técnica considerada não invasiva, que permite discriminar e identificar os diversos componentes de uma dada mistura.⁴⁵ No experimento DOSY, os componentes da

mistura em questão são organizados em uma matriz bidimensional, com o espectro de RMN em uma dimensão e a taxa de difusão em outra.^{24; 51} A técnica DOSY, apresenta vantagens como rápida e acurada aquisição de dados, o que possibilita a obtenção de uma visão global da dinâmica dos constituintes da mistura em análise.⁴⁵ Apesar das vantagens destacadas acima, a técnica DOSY apresenta algumas desvantagens, tais como:

- Ambiguidades na atribuição de picos e na identificação de metabólitos;²⁵
- Dificuldade em obter os coeficientes de difusão individuais quando os sinais de diferentes substâncias se sobrepõem;⁵⁴
- Caso as componentes de uma mistura apresentem diferença entre os coeficientes de difusão menores do que 2, um único sinal aparecerá na dimensão da difusão;⁴⁵
- Baixa sensibilidade e elevado tempo de análise.

Rogerson et al.⁵⁵ solucionaram os problemas das ambiguidades na sobreposição dos picos e dos coeficientes de difusão de valores próximos de uma mistura contendo n-hexano, hexan-1-ol e n-heptanal utilizando um reagente de deslocamento, Eu(fod)_3 , em uma solução de CDCl_3 . Diante disto, este presente trabalho inspirou-se nos trabalhos supracitados para desenvolver uma técnica que colabore solucionando as ambiguidades no assinalamento de picos espectros de RMN de ^1H de misturas complexas de metabólitos polares, colaborando na identificação e na quantificação de espécies de interesse, e consequentemente, simplificando e/ou facilitando a análise de seus resultados.

2 OBJETIVO

O objetivo principal deste presente trabalho foi aprofundar os estudos a respeito da utilização de Eu^{3+} em soluções contendo metabólitos polares, a fim de desenvolver uma ferramenta que ajude a solucionar as ambiguidades no assinalamento dos sinais presentes em espectros complexos de RMN de ^1H , reduzindo a equivalência destes núcleos através da alteração de seus ambientes magnéticos, e consequentemente, colaborando na identificação e/ou na quantificação de espécies de interesse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção está subdividida em quatro parte. A primeira apresenta os materiais e os reagentes utilizados nas outras três subsequentes. Estas por sua vez, descreverão, respectivamente os equipamentos, a forma como os experimentos foram realizados, e como os dados foram tratados e analisados.

3.1 Materiais e reagentes

Os materiais e reagentes listados abaixo foram utilizados durante o desenvolvimento do projeto:

- Ácido L-Aspártico 99,5% (T) (Sigma);
- Ácido Cítrico 99% (Sigma);
- Ácido D-Glutâmico 99+% (Aldrich);
- Ácido L-Glutâmico 99% (TLC) (Sigma);
- DL-Alanina $\geq$ 99% (HPLC) (Sigma);
- L-Arginina $\geq$ 98% (TLC) (Aldrich);
- L-Arginina 98+% (Aldrich);
- L-Asparagina $\geq$ 98% (TLC) (Sigma);
- Cisteína $\geq$ 98% (TLC) (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de Deutério, 35 wt. %, solução em D₂O, 99,5% átomos de Deutério (Aldrich);
- Deuteróxido de Sódio, 40 wt. %, solução em D₂O 99,9% átomos de Deutério (Sigma);
- L-Fenilalanina $\geq$ 98% (TLC) (Sigma);
- Fosfato de Sódio dibásico (Dinâmica);
- Fosfato de Sódio monobásico (Dinâmica);
- Glicina 99% (TLC) (Sigma);
- D-Glutamina 98% (TLC) (Sigma);
- L-Glutamina 99-100% (Sigma);

- L-Histidina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma);
- L-Isoleucina $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma);
- L-Leucina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma);
- L-Leucina 99% (Aldrich);
- L-Lisina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma);
- L-Metionina $\geq 98\%$ (Sigma);
- L-Metionina $\geq 98\%$ (Aldrich);
- Óxido de Európio (III) 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Nitrato de L-Anserina (Sigma);
- Óxido de Deuterium 99,9% (Sigma-Aldrich);
- L-Prolina 99+% (Aldrich);
- D-Serina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma);
- L-Serina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma);
- TSP-d4 - 2,2,3,3-d4 3-(Trimetilsilil)propionato de Sódio (Sigma-Aldrich);
- L-Tirosian $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma);
- L-Treonina (Merck);
- L-Treonina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma);
- L-Tryptofano $\geq 98\%$ (HPLC) (Fluka);
- L-Valina $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma).

3.2 Instrumentação de RMN

As análises de espectroscopia de RMN de ^1H foram realizadas em quatro instrumentos diferentes, três na DTU e um na Embrapa Instrumentação. O primeiro deles é um equipamento de rotina operando por meio do *software* ICON-NMRTM 5, é composto por um magneto Bruker 400 ASCENDTM equipado com uma sonda de 5 mm do tipo CryoProbeTM Prodigy ^{15}N - ^{31}P , ^1H , ^{19}F , e um amostrador automático de 60 posições SampleXpressTM. Este instrumento opera na frequência de 400 MHz para o núcleo de ^1H , e está instalado dentro do Departamento de Química da Universidade Técnica da Dinamarca - DTU, em Kongens Lyngby, Dinamarca.

O segundo e o terceiro equipamentos, um instalado na Embrapa Instrumentação em São Carlos, SP, Brasil, e outro no Centro de RMN do Departamento de Química da DTU, Kongens Lyngby, Dinamarca. Ambos apresentam praticamente a mesma composição, exceto pela presença de um amostrador automático de 16 posições SampleXpressLite™ presente no equipamento da Embrapa Instrumentação. Esses dois equipamentos operam na frequência de 600 MHz para o núcleo de ^1H , são compostos por um magneto BrukerBZN 600'70 ASCEND™, aparelhado com uma sonda do tipo *Broadband Observe* de 5 mm PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD. Esta apresenta gradiente de campo e duas bobinas, sendo a interna otimizada para observação de núcleos entre ^{31}P e ^{15}N , enquanto a externa é otimizada para desacoplamento e observação do núcleo de ^1H e ^{19}F .

O quarto equipamento, também se encontra situado no Centro de RMN, opera na frequência de 800 MHz para o ^1H , e é formado por um magneto Oxford Instruments 2.2K 800/63, munido de uma sonda CryoProbe™ TCI de 5 mm.

Todas as aquisições de dados foram realizadas a $27,0 \pm 0,1$ °C, como descrito por Beckonert et al.⁵⁶.

No equipamento de 400 MHz para o núcleo de ^1H da DTU, as amostras eram introduzidas, e os procedimentos de *set up* do equipamento, como ajustes de *Lock*, de *Tuning* e *Matching*, de *Shimming*, calibração dos pulsos, e ajustes de ganho, da fase, de *Power* foram realizados automaticamente, enquanto nos outros equipamentos, apesar de se valerem de automatização, os ajustes foram realizados manualmente.

3.3 Aquisição e processamento de dados

3.3.1 Espectros de RMN de ^1H

Os espectros de ^1H foram adquiridos utilizando as sequências de pulsos **noesypr1d** para as sondas criogênicas, e **noesygppr1d** para a sonda BBO, como indicado por Beckonert em seu protocolo.⁵⁶ A última sequência, além de empregar pulsos para a pré-saturação do sinal da água, possui gradientes que aumentam a

qualidade dessa supressão. Além das sequências de pulso, os parâmetros usados também respeitam o protocolo citado acima, ou seja: Tempo de relaxação, $d1 = 2,0000$ s; tempo de aquisição, $AQ = 1,3599$; janela espectral, $SW = 20,0276$ ppm; *mixing time*, $t_m = 100$ ms; tamanho do FID, 32690; *dummy scans*, $DS = 4$; e número de *scans*, $ns = 128$.

Para processar os espectros de RMN de 1H adquiridos, empregou-se a técnica *zero-filling*, visando aumentar a resolução digital para 131072 pontos, quatro vezes o tamanho do FID. A linha de base e as fases foram corrigidas, além disto, foram aplicadas funções de apodização, como largura de linha da ordem de 0,3 Hz,⁵⁶ obtendo assim um espectro de qualidade superior. Para evitar efeitos de *drifts* no deslocamento químico das referências internas devido a mudanças no pH e/ou complexações com o íon Eu^{3+} , foi utilizado como referência a posição do sinal residual de supressão de água, HDO, em 4,79 ppm.^{57; 58; 59} Para realizar esta série de processamentos, e para a conversão do dado para formato .txt, valeu-se do *software* TopSpin® 3.6.1. Após a etapa de processamento, os espectros foram plotados usando o *software* Origin 8.5, e os espectros resultantes foram submetidos a análises e identificação de metabólitos empregando a literatura científica especializada, o *software* Chenomx®, e os bancos de dados BMRB® e HMDB®.

3.3.2 Medidas de T_1 utilizando Inversão-Recuperação

Após a aquisição dos espectros de RMN de 1H , foram realizadas medidas de relaxação longitudinal, T_1 , os valores foram determinados utilizando o experimento mais comum para isto, inversão-recuperação. Este experimento é composto por uma sequência de dois pulsos simples, o primeiro de 180° , que como o nome diz, inverte a população de *spins*. O vetor magnetização, agora alinhado com o eixo $-z$ receberá um pulso de 90° após um tempo τ . O vetor magnetização é monitorado até recuperar sua magnetização no eixo z . O procedimento descrito acima é repetido aumentando os valores de τ , até este apresentar um valor suficientemente longo, no qual a relaxação ocorre no intervalo entre os pulsos.⁴³

Figura 5 - Sequência de pulso de inversão e recuperação.

Fonte: CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Oxford, Reino Unido: Elsevier, 1999.

Os experimentos de inversão recuperação foram realizados nos três equipamentos da DTU, utilizando a sequência de pulso t1ir para equipamentos Bruker®, e os seguintes parâmetros: Tempo de relaxação, d1 = entre 5,00 e 10,00 s; tempo de aquisição, AQ = 0,0062479 s em F1 e 1,0223616 s em F2; janela espectral, SW = 2,0000 ppm em F1 e 20,0254 ppm em F2; tamanho do FID, 10 em F1 e 16k em F2; *dummy scans*, DS = 2; e número de *scans*, ns = 8. Os valores de T_1 para os núcleos de ^1H das espécies químicas avaliadas foram calculados com ajuda do *software* TopSpin® 3.6.1.

3.3.3 Medidas de T_2 utilizando CPMG

Subsequentemente a realização das medidas de T_1 citadas acima, foram executadas medidas do tempo de relaxação transversal ou *spin-spin*, T_2 , os valores foram determinados utilizando o experimento CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill. Este experimento que tem sua sequência de pulsos é apresentado na Figura 6, é composto por uma sequência de dois pulsos simples de rf, sendo o primeiro destes de 90° e o segundo de 180° , separados por um tempo τ .

Durante a aplicação do primeiro pulso de rf, 90° , os núcleos ativos na determinada frequência da RMN são excitados, e em seguida estes começam a perder a coerência de fase, e após um tempo τ , é aplicado o segundo pulso, 180° , visando refocar a perda de coerência e, depois de um segundo tempo τ , produzir o eco orientado. Esta sequência é repetida n vezes aumentando o tempo τ , e medindo a amplitude do eco em função do tempo.⁴³ Os efeitos de excitação do vetor magnetizado resultante do momento magnético dos núcleos, suas perda e retomada de coerência são apresentados na Figura 7 abaixo.

Figura 6 - Sequência de pulso CPMG.

Fonte: <http://triton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/eNMR1D/cpmg.html> acessado em 14 de abril de 2020.

Figura 7 – Sequência de Spin-Eco, mostrando excitação do vetor magnetizado resultante do momento magnético dos núcleos, suas perda e retomada de coerência.

Fonte: CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Oxford, Reino Unido: Elsevier, 1999.

As medidas de T_2 foram realizadas nos três equipamentos da DTU, utilizando a sequência de pulso CPMG para equipamentos Bruker®, apresentada na Figura 6, e os parâmetros usados nesses experimentos foram: Tempo de relaxação, $d1$ = entre 5,00; tempo de aquisição, AQ = 0,0099967 s em F1 e 1,0223616 s em F2; janela espectral, SW = 2,0000 ppm em F1 e 20,0254 ppm em F2; tamanho do FID, 16 em F1 e 16k em F2; *dummy scans*, DS = 2; e número de *scans*, ns = 8. Os valores de T_2 para os núcleos de ^1H das espécies químicas avaliadas foram calculados com ajuda do *software* TopSpin® 3.6.1.

3.3.4 Análises quantitativas de RMN - qNMR

As análises quantitativas de RMN ou qNMR vêm sendo realizadas desde 1963.⁶⁰ Este tipo de análise apresenta como principal vantagem a característica de analito primário, e portanto pode ser aplicado em estimativas quantitativas de compostos sem se utilizar de um padrão de referência específico.⁶¹ As análises quantitativas de RMN de ^1H tem crescido significativamente em metabolômicas nas últimas

décadas,⁶² indicando que esta é uma das técnicas mais adequadas para medidas quantitativas de misturas complexas.⁶¹ As análises de qNMR foram inicialmente realizadas no equipamento de 600 MHz para ^1H da Embrapa. Para essas foram utilizados os seguintes parâmetros: Tempo de relaxação, $d1 = 35$ s (aproximadamente $7 \cdot T_1$); tempo de aquisição, $AQ = 1,36$ s; janela espectral, $SW = 20,0254$ ppm; tamanho do FID, $TD = 32690$; *dummy scans*, $DS = 0$; e número de *scans*, $ns = 16$. As quantificações dos núcleos de ^1H foram obtidas com ajuda do *software* TopSpin® 3.6.1.

Os experimentos foram realizados em triplicata amostral, e o citrato 10 mmol.L^{-1} foi utilizado como padrão interno primário para a quantificação dos demais componentes das misturas analisadas.

3.3.5 Análises de DOSY de ^1H

Após a realização dos experimentos de apresentados acima, buscou verificar se a interação entre os íons Eu^{3+} e os aminoácidos afetavam os valores de difusão destes, como o relatado por González-García,⁶³ ou se melhoravam a dispersão dos sinais como descrito por Rogerson et al.⁵⁵. Para isto, utilizou-se a técnica conhecida como *Diffusion Ordered Spectroscopy* (DOSY), e partir deste experimento, foi possível obter os valores dos coeficientes de difusão das espécies químicas em questão. Com base nestes valores, e na equação 1 é possível inferir se os íons Eu^{3+} afetaram a difusão das espécies químicas em análise, tanto do ponto de vista organizacional, quanto conformacional e estrutural.⁴⁵

$$D_{\text{obs}} = D_{\text{livre}} f_{\text{livre}} + D_{\text{comp}} f_{\text{comp}} \quad (\text{eq. 1})$$

Em que D_{obs} equivale ao coeficiente de difusão observado; D_{livre} , ao coeficiente para o aminoácido livre; e D_{comp} , ao coeficiente do aminoácido complexado com o Eu^{3+} . O f_{livre} e o f_{comp} representam as frações molares do aminoácido livre e complexado, respectivamente.

Para a realização do experimento de DOSY, foram adquiridos dois espectros unidimensionais para cada amostra, um com 5% de gradiente de campo, e o outro, com de 95%, com o propósito de otimizar a duração do pulso do gradiente de campo e o tempo de difusão. Em ambos os casos se valeram de uma sequência de pulso

com eco estimulado e *Longitudinal Eddy current Delay sequence* (LED) com gradiente bipolar de pulsos, e pré-saturação da água durante o tempo de espera de relaxação. Essa sequência é conhecida em equipamentos Bruker como *ledbpgppr1d*.⁶⁴ Os parâmetros usados nesses experimentos foram: Tempo de relaxação, $d1 = 2,00$ s; tempo de aquisição, $AQ = 1,3631$ s; janela espectral, $SW = 20,0264$ ppm; tamanho do FID, $TD = 32k$; *dummy scans*, $DS = 0$; e número de *scans*, $ns = 4$; tempo de difusão, Δ , entre $0,075$ e $0,115$ s; duração do pulso de gradiente, $\delta = 1000,000$ μs .

Subsequentemente aos experimentos citados acima, os espectros gerados foram comparados entre si, e foi verificado se a atenuação do sinal do espectro obtido utilizando 95% do gradiente de campo correspondia a 10% da amplitude do espectro obtido aplicando 5% do gradiente de campo. Esse valor da atenuação dos sinais representa o valor ideal, e pode ser alcançado modificando os valores do tempo de difusão (Δ) e da largura do pulso do gradiente (δ). Após esses procedimentos, realizou-se um terceiro experimento, obtendo-se um espectro pseudobidimensional, variando linearmente o gradiente de 5 a 95%, utilizando os outros parâmetros obtidos no experimento anterior, e uma sequência de pulso muito semelhante à prévia, *ledbpgppr* (para equipamentos Bruker).⁶⁴ Neste experimento, foram utilizados os seguintes parâmetros: Tempo de relaxação, $d1 = 2,00$ s; tempo de aquisição, $AQ = 0,0013312$ s em F1 e $1,3631$ s em F2; janela espectral, $SW = 10,0132$ ppm em F1 e $20,0264$ ppm em F2; tamanho do FID, $TD = 16$ em F1 e $32k$ em F2; *dummy scans*, $DS = 4$; e número de *scans*, $ns = 16$; tempo de difusão, Δ , entre $0,075$ e $0,115$ s; duração do pulso de gradiente, $\delta = 1000,000$ μs .

Para finalizar, os dados adquiridos foram submetidos a um tratamento no *software* TopSpin® 3.6.1 gerando um espectro pseudobidimensional. Com as informações obtidas verificou-se a eficácia da separação dos aminoácidos presentes na mistura, e se houve mudanças significativas nos coeficientes de difusão na presença dos íons Eu^{3+} .

3.3.6 $^1H - ^{13}C$ HSQC

Os experimentos de $^1H - ^{13}C$ HSQC foram realizados de forma idêntica ao descrito por Hu et al.⁶⁵, com finalidade de colaborar com o assinalamento e a identi-

ficação de metabólitos presentes em amostras reais. Estes foram realizados utilizando a sequência de pulso *hsqcgp* para equipamentos Bruker®, e os seguintes parâmetros: Tempo de relaxação, $d1 = 1,50$ s; tempo de aquisição, $AQ = 0.0008926$ s em F1 e $0,0425984$ s em F2; janela espectral, $SW = 238,9466$ ppm em F1 e $20,0276$ ppm em F2; tamanho do FID, 256 em F1 e 1024 em F2; *dummy scans*, $DS = 16$; e número de *scans*, $ns = 64$. Os dados adquiridos foram submetidos a um tratamento no *software* TopSpin® 3.6.1 gerando um espectro bidimensional.

3.4 Avaliação do efeito dos íons Eu^{3+} em soluções contendo padrões de aminoácidos isolados

Para a avaliação dos efeitos do íon Eu^{3+} em análises de RMN, inicialmente foram realizadas titulações em três soluções $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ do íon em questão inicialmente em pH 1,0, com solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH, a fim de identificar a faixa de pH que iniciava a precipitação de espécies químicas contendo o íon Eu^{3+} .

Após estipular o valor máximo de pH, e conseqüentemente do pD, buscou-se verificar se existia uma condição ideal ou que sobressaísse frente as outras para a avaliação dos efeitos dos íons Eu^{3+} frente aos metabólitos. Para isto, foram elaboradas soluções aquosas $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de cada um dos aminoácidos apresentados na Tabela 1. Estas foram preparadas em tubos de polipropileno de 2,0 mL do tipo Eppendorf, e tiveram seus solventes removidos através do uso de um concentrador a vácuo Speedvac Thermo Scientific modelo Savant. Após este procedimento, as amostras foram ressuspensas por quatro soluções de tampão Citrato 10 mmol.L^{-1} com força iônica 150 mmol.L^{-1} em D_2O , cada uma em uma faixa de pD diferente: 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0. A escolha do tampão Citrato se deve a sua faixa tamponante entre pH 2,15 e 7,40.

Depois de analisadas, as soluções citadas acima receberam a adição de diferentes quantidades de Eu^{3+} : 25; 50; 75; 100 e 125 mmol.L^{-1} .

Foram adquiridos espectros de ^1H , e realizadas medidas de T_1 e T_2 para cada uma das condições apresentadas acima.

Tabela 1 – Aminoácidos essenciais utilizando nos experimentos preliminares como representantes de cada tipo de cadeia lateral e subdivisões.

Aminoácidos essenciais		
Nome	Cadeia Lateral	Subdivisão
Valina	Apolar	-
Serina	Polar	Não carregada
Glutamato	Polar	Carga negativa
Arginina	Polar	Carga positiva
Fenilalanina	Polar	Aromática

FONTE: Autoria Própria.

3.5 Avaliação do efeito do Eu^{3+} em mistura complexa de padrões de aminoácidos

Nesta subseção serão apresentados como os experimentos de espectroscopia de RMN na frequência do núcleo ^1H foram realizados para uma mistura complexa contendo os 20 aminoácidos essenciais.

3.5.1 Preparo de amostras

3.5.1.1 Mistura complexa de metabólitos

Para avaliar os efeitos gerados pelos íons Eu^{3+} em análises metabolômicas utilizando a RMN, produziu-se uma mistura complexa com os 20 (vinte) aminoácidos, inspirada nos trabalhos de Zhang et al.^{19; 20}, e de forma semelhante à descrita no item 3.4. Esta mistura foi preparada em uma concentração uniforme de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de cada um dos 20 aminoácidos essenciais. Em seguida foram adicionados $600 \mu\text{L}$

dessa mistura complexa em tubos de polipropileno de 2,0 mL do tipo Eppendorf, que em seguida foram submetidos a remoção do solvente em um concentrador a vácuo Speedvac Thermo Scientific modelo Savant da DTU. O material resultante foi res-suspendido por 540 μL de uma solução produzida em D_2O de tampão Citrato de concentração 10 mmol.L^{-1} , força iônica 150 mmol.L^{-1} e pD 3,00.

3.5.1.2 Soluções de Eu^{3+}

A solução 100 mmol.L^{-1} de Eu^{3+} foi formada a partir do óxido de Európio (III), Eu_2O_3 , que foi solubilizado seguindo o procedimento adaptado de Heller e colaboradores⁶⁶, e descrito abaixo:

- Em um copo de Becker de foram adicionados aproximadamente 20 mL de água Mili-Q e 0,500 mL de HCl 37%, e 0,43975 g de Eu_2O_3 . O HCl pode ser adicionado de forma lenta, observando a completa dissolução do sal;
- A solução ácida foi aquecida até aproximadamente 90°C ;
- O volume da solução foi reduzido através da evaporação do solvente, e foi adicionado, aproximadamente 50 mL de água Mili-Q. Esta etapa foi repetida exaustivamente, até a neutralização do pH do meio;
- Após atingir um pH neutro, o volume da solução de Eu^{3+} foi reduzido e transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL, o qual teve seu volume completado com água Mili-Q, obtendo-se assim uma solução de 100 mmol.L^{-1} de Eu^{3+} . Para a utilização em experimentos de RMN, o solvente hidrogenado era substituído por deuterados, de forma similar a descrita no subtítulo 3.5.1.1.

Também foram produzidas soluções de concentração $1,000 \text{ mol. L}^{-1}$ de Eu^{3+} concentrando volumes V de soluções de 100 mmol.L^{-1} de Eu^{3+} , e ressuspendendo em volume $0,1 V$, de maneira similar a descrita no parágrafo anterior.

3.6 Avaliação do efeito do Eu^{3+} em metabólitos presentes em amostras reais utilizando RMN de ^1H

Nesta subseção serão apresentados como os experimentos de espectroscopia de RMN na frequência do núcleo ^1H foram realizados para amostras reais.

Para os experimentos que serão apresentados a seguir foram utilizados dois equipamentos, o 400 MHz da DTU e o 600 MHz da Embrapa Instrumentação.

3.6.1 Preparo de amostras de leite

Devido à necessidade de se trabalhar com o material na faixa de pH inferior a 6,00 nas avaliações do efeito de íons Eu^{3+} em amostras reais de leite, foram realizados testes preliminares visando observar o comportamento destas amostras diante da variação de pH.

Primeiramente foram separadas alíquotas de 1,000 mL de leite desnatado comercial em 30 tubos de polipropileno 2,0 mL do tipo Eppendorf. Três destes foram separadas, enquanto as outras 27 foram acidificadas com ácido clorídrico concentrado 37%, e tiveram seus pHs monitorados por um pHmetro Hanna Instruments HI 1093B. Após esta acidificação, as 30 amostras foram submetidas a centrifugação em uma centrífuga VWR Micro Star 17R a 10000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado para remover o precipitado formado após a adição do ácido.

Após o preparo de amostras citado acima, as amostras foram analisadas no equipamento da DTU.

Após analisar os espectros de RMN de ^1H adquiridos, e verificar as modificações que foram geradas pela acidificação das amostras, buscou-se um método mais eficiente para realizar a extração de metabólitos presentes no leite, e avaliar os efeitos dos íons Eu^{3+} nesta matriz. Visando isto foram realizados três tipos de extrações de metabólitos. Os dois primeiros métodos que serão nomeados a partir de agora como protocolo A e protocolo B, seguem os procedimentos descritos respectivamente por Wu et al.⁶⁷ e por Lu et al.⁶⁸ apud Yanibada et al.⁶⁹.

O protocolo A, basicamente, consistiu na adição de 1,000 mL de metanol gelado em 500 μL de leite desnatado em um tubo de polipropileno do tipo Eppendorf de 2,000 mL. A mistura resultante foi submetida a um vortex, e em seguida armazenada

por 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em uma centrífuga no Laboratório do grupo BioMicS do IQSC da USP. Após este procedimento, 1,000 mL do sobrenadante foi transportado para um outro tubo de polipropileno do tipo Eppendorf.

O protocolo B por sua vez, consistiu no emprego de 1,000 mL de diclorometano em 500 μL de leite desnatado em um tubo de polipropileno do tipo Eppendorf de 2,000 mL. As amostras foram submetidas a vortex por 20 s cada, e em seguida foram centrifugadas a 8000 g durante 20 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cerca de 400 μL de fase aquosa foi transferida para outro tubo de polipropileno do tipo Eppendorf.

Enquanto os dois primeiros procedimentos buscaram a maior fidelidade ao descrito por Yanibada,⁶⁹ o terceiro método, denominado protocolo C, pode ser considerado uma espécie de *pot-pourri* do método de extração de metabólitos polares e lipofílicos de tecidos usando metanol/clorofórmio/água descrito por Beckonert et al.⁵⁶, do protocolo de extração de duas fases por Andreas et al.⁷⁰ e também do protocolo de Praticò et al.⁷¹. Neste preparo de amostras, também se utilizou para cada amostra, 500 μL de leite desnatado comercial, 800 μL de diclorometano e 400 μL de metanol. As amostras foram colocadas em um vortex por 20 s. Após isto, foram armazenadas em gelo por 15 minutos, e posteriormente, centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nesse caso, cerca de 600 μL da fase aquosa foram transferidos para outro tubo do tipo Eppendorf.

Nos protocolos A e C apresentados acima, após a transferência da fase aquosa sobrenadante a um Eppendorf, removeu-se os solventes em um concentrador a vácuo Speedvac Thermo Scientific modelo Savant no IQSC da USP. Os materiais resultantes foram ressuspensos com 540 μL de D_2O , homogeneizados com ajuda de um equipamento de vortex, e transferidos para tubos de 5 mm de RMN. No protocolo B, não houve a remoção do solvente, porém adicionou-se 140 μL de D_2O visando realizar *Lock* da amostra.

As amostras citadas acima também foram acidificadas, porém o procedimento ocorreu de maneiras distintas para essas amostras. As obtidas pelo protocolo A e C receberam a adição de pequenas porções de solução de cloreto de deutério Sigma-Aldrich contendo 35% em massa de DCl em D_2O com mais de 99% átomos de D, enquanto as amostras produzidas pelo protocolo B receberam ácido clorídrico concentrado contendo 37%. O pH dessas amostras foi também aferido com o pHmetro

Hanna Instruments HI 1093B. Após prontas as amostras foram analisadas no equipamento da Embrapa Instrumentação citado anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de facilitar a leitura e a compreensão do texto, este capítulo foi dividido em três partes. A primeira é constituída pelos estudos dos efeitos gerados por íons Eu^{3+} em soluções padrões de aminoácidos isolados. A segunda, por sua vez, utiliza-se de uma mistura complexa dos padrões citados acima, e a terceira apresenta a aplicação do íon Eu^{3+} em amostras reais de leite. Além disto, devido à complexidade de alguns espectros de RMN de ^1H em algumas situações, apenas determinadas regiões destes serão apresentadas, visando sempre facilitar a leitura e a análise dos leitores. Nesses determinados casos, os espectros completos estarão à disposição no Apêndice A.

4.1 Avaliação dos efeitos de íons Eu^{3+} em padrões de aminoácidos isolados

Para a avaliação dos efeitos do íon Eu^{3+} em análises de RMN, foram inicialmente realizadas três titulações com solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH em soluções $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ do íon em questão inicialmente em pH 1,0. Este experimento visou encontrar a faixa de pH a qual ocorria a precipitação de espécies químicas contendo Európio. Essa precipitação foi observada em pH próximo a 6,0, concordando com dados obtidos na literatura, os quais indicam a formação do complexo *aqua*, composto por duas moléculas de água na primeira esfera de coordenação no íon Eu^{3+} , como descrito por Heller e colaboradores.⁷² Em consequência a esse fato, estipulou-se o valor de pH 5,7 ou pD em 6,0 como a faixa máxima a ser trabalhada.

Após encontrar do valor máximo de pH, e consequentemente do pD, para a pesquisa, prosseguiram-se com as análises de RMN de ^1H , buscando descobrir a condição ideal, que incluía pD do meio e concentração de íons Eu^{3+} presentes na solução. Para isto, foram preparadas soluções padrão dos cinco aminoácidos citados na Tabela 1 em quatro faixas de pD: 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0. A partir destas amostras, foram realizadas as medidas de RMN de ^1H , T_1 e T_2 .

Na Figura 8 são apresentados os espectros de RMN de ^1H dos aminoácidos em pD 3,00 adquiridos nessa primeira batelada, e as posições dos sinais ali mostrados são considerados os valores iniciais dos deslocamentos químicos ou δ_0 das espécies avaliadas.

Figura 8 – Espectros de RMN de ^1H dos aminoácidos da Tabela 1, em tampão Citrato pD 3,0.

FONTE: Autoria própria.

Posteriormente a esta primeira batelada de medidas, iniciaram-se as sucessivas adições de Eu^{3+} , e a realização de suas medidas de RMN. As soluções avaliadas apresentavam seis concentrações de Eu^{3+} : 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mmol.L^{-1} de Eu^{3+} . Nesta última verificou-se perda da resolução dos sinais e, conseqüentemente, da qualidade dos espectros, o que impediu a análise e, portanto, essa condição foi descartada. Diante desse fato, estipulou-se para esta classe de experimentos a faixa de trabalho entre 0 e 100 mmol.L^{-1} de Eu^{3+} .

As relações entre as diferentes concentrações de Eu^{3+} e os deslocamentos químicos induzidos³⁴ de cada um dos núcleos de ^1H da Fenilalanina, do Glutamato, da Arginina, da Serina e da Valina, nas quatro faixas de pD apontadas, são mostra-

das nas Figuras 9 a 13, respectivamente. Nelas é possível notar que os sinais de RMN dos ^1H deslocam-se, com raras exceções, de forma praticamente linear e proporcional para campo magnético alto, o que indica que os núcleos de ^1H tornam-se mais blindados conforme adiciona-se Eu^{3+} . A partir dessa proporcionalidade entre aumento do deslocamento químico do substrato complexado e o aumento da concentração de Eu^{3+} no meio, pode-se inferir que há uma rápida troca química entre os substratos livres e complexados, de acordo com a equação descrita por Reuben et al.⁴²:

$$\frac{1}{\tau_i} \gg 2\pi\delta_i$$

Onde: τ_i é o tempo de vida do aduto substrato- Eu^{3+} ; δ_i é o deslocamento químico do aduto Substrato- Eu^{3+} .

Ainda analisando as Figuras 9 a 13, percebe-se que os núcleos de ^1H que sofrem a maior perturbação, em relação ao deslocamento químico, são os ligados ao Carbono β , indicados pelo número 2 nas figuras citadas acima. Conforme os núcleos de ^1H se distanciam dessa posição, menor é o efeito do Eu^{3+} sofrido por eles. Este fato concorda com o descrito por Rabenstein³⁸. Além disto, como pode ser observado nas Figuras 9 a 13, o comportamento dos núcleos de ^1H são muito semelhantes mesmo com as modificações nos valores de pD. Isto pode ser explicado, pois as espécies químicas estudadas nessas situações, encontram-se com praticamente todas suas populações em *Zwitterion*.

A partir de todas essas constatações apresentadas, e somadas ao fato do Eu^{3+} possuir elétron não pareado sugere-se que este possa ser considerado um reagente de deslocamento, e que atua majoritariamente através do mecanismo de pseudocontato, de acordo com Shapiro⁴⁰ e Campbell⁴¹ apud Silverstein³². Segundo Eaton e Phillips⁷³, McCarthy e Nakamoto⁷⁴, Keller e Schwarzhans⁷⁵, todos estes citados por Rabenstein³⁸, o mecanismo de pseudocontato pode ser definido como o resultado da interação direta entre os dipolos magnéticos dos elétrons do metal com os dipolos magnéticos do núcleo ligante. Este tipo de interação é transmitida através do espaço, mesmo quando não há ligações covalentes.⁷⁶

Figura 9 – Moléculas da Fenilalanina indicando a posição dos carbonos aos quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 10 – Moléculas da Glutamato indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 11 – Moléculas da Arginina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 12 – Moléculas da Serina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria Própria.

Figura 13 – Moléculas da Valina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentados os deslocamentos químicos induzidos de cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H em diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

A Figura 14 expõe uma sequência de espectros de RMN de ^1H do aminoácido Serina, em tampão Citrato em pD 3,00, com diferentes concentrações de espécies de Eu^{3+} . Nessa figura pode-se observar a influência do íon metálico na conformação das espécies químicas relacionadas ao aminoácido Serina, e conseqüentemente, no ambiente magnético de seus núcleos de ^1H através das mudanças na forma, na multiplicidade e no deslocamento químico dos sinais. Os sinais iniciais do multipletto e do dd estão, respectivamente, em 3,98 ppm e em 3,88 ppm. Estes são deslocados

de forma a ocorrer uma sobreposição de sinais de forma a gerar um singlete na concentração de 25 mmol.L⁻¹ de Eu³⁺. Diante deste fato pode-se aferir que os núcleos de ¹H em questão são afetados pelo Eu³⁺ de forma a estarem em ambientes magnéticos equivalentes.³⁵ Já na concentração de 50 mmol.L⁻¹ nota-se a inversão na ordem dos sinais, ou seja, o multipletto mostra-se mais blindado, enquanto o dd, menos. Para as concentrações de 75 e 100 mmol.L⁻¹, a inversão se mantém, apenas a distância entre os deslocamentos químicos dos sinais é ampliada. Nessa última avaliação, de maior concentração de Eu³⁺, após o sinal do dd após alcançar um determinado valor de deslocamento químico, o qual parece ocorrer a saturação do efeito, esse começa a retornar a sua posição de origem original. Com exceção deste último efeito, todos os anteriores ocorreram de forma similar para a faixa de pD 5,00. Nas outras duas faixas de pD, apenas foi observada a inversão da posição dos sinais da Serina.

Figura 14 – Região do espectro mostrando a evolução dos sinais de RMN de ¹H do aminoácido Serina, com concentração 2,5 mmol.L⁻¹, em pD 3,0, diante de diferentes concentrações de Eu³⁺.

FONTE: Autoria própria.

Além do efeito no deslocamento químico, os reagentes de deslocamento aumentam as taxas de relaxação longitudinal e transversal. Apesar de não existirem

relações bem definidas entre as taxas de relaxação e características estruturais como aquelas dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento *spin-spin*,⁴³ através dessas taxas de relaxação pode-se, respectivamente, obter importantes considerações a respeito da geometria de um complexo e suas conformações, e determinar, para uma larga extensão, a largura de linha de um sinal de ressonância específico.³⁴ Além disto, um importante pré-requisito para análise quantitativa é garantir que o tempo de espera entre o pulso de excitação e a relaxação seja suficiente para permitir a relaxação da maioria dos núcleos.⁷⁷ Na tabela 2 são apresentados os valores dos tempos de relaxação longitudinal para os núcleos de ^1H dos aminoácidos estudados na ausência de Eu^{3+} , ou seja, T_1^0 , enquanto na Tabela 3, na presença de 100 mmol.L^{-1} , ou seja, T_1^f . Os valores de T_1^0 variam de 0,71 a 4,50 s, enquanto os de T_1^f , de 0,08 a 2,31s.

Tabela 2 – Tabela apresentando os valores dos tempos de relaxação longitudinal na ausência de Eu^{3+} , T_1^0 , para cada um dos núcleos de ^1H ligados aos carbonos de cada aminoácido identificados por numeração fixa.

AA	pD	T_1^0 (s)					
		1	2	2	3	4	5
Phe	3,00	2,84	0,89	0,90	2,68	3,39	3,18
	4,00	2,87	0,90	0,91	2,70	3,38	3,17
	5,00	2,66	0,87	0,88	2,67	3,46	3,30
	6,00	2,94	0,92	0,93	2,71	3,42	3,20
Glu	3,00	2,45	0,99	-	1,21	-	-
	4,00	3,12	1,06	-	1,29	-	-
	5,00	3,24	1,06	-	1,27	-	-
	6,00	3,11	1,07	-	1,29	-	-
Arg	3,00	2,32	0,77	-	0,82	0,91	-
	4,00	1,94	0,71	-	0,73	0,83	-
	5,00	2,33	0,75	-	0,80	0,89	-
	6,00	2,03	0,72	-	0,75	0,87	-
Ser	3,00	4,50	1,72	-	-	-	-
	4,00	4,28	1,72	-	-	-	-
	5,00	4,18	1,69	-	-	-	-
	6,00	4,20	1,73	-	-	-	-
Val	3,00	3,67	2,03	-	1,28	1,17	-
	4,00	3,24	2,16	-	1,25	1,17	-
	5,00	3,23	2,09	-	1,29	1,18	-
	6,00	3,61	2,02	-	1,29	1,19	-

FONTE: Autoria própria.

Tabela 3 – Tabela apresentando os valores dos tempos de relaxação longitudinal com excesso de Eu^{3+} , T_1^i , para cada um dos núcleos de ^1H ligados aos carbonos de cada aminoácido identificados por numeração fixa.

AA	pD	T_1^i (s)					
		1	2	2	3	4	5
Phe	3,00	0,32	0,22	0,10	0,74	1,96	1,64
	4,00	0,24	0,21	0,15	0,81	2,31	1,90
	5,00	0,32	0,26	0,20	0,87	2,27	0,20
	6,00	-	-	-	0,74	0,28	-
Glu	3,00	0,25	0,21	-	0,21	-	-
	4,00	0,14	0,23	-	0,20	-	-
	5,00	-	0,14	-	0,10	-	-
	6,00	-	0,12	-	0,08	-	-
Arg	3,00	-	0,15	-	0,82	0,22	-
	4,00	-	0,24	-	0,73	0,32	-
	5,00	0,21	0,25	-	0,80	0,30	-
	6,00	0,32	0,27	-	0,75	0,45	-
Ser	3,00	0,33	0,30	-	-	-	-
	4,00	0,31	0,33	-	-	-	-
	5,00	0,38	0,38	-	-	-	-
	6,00	0,50	0,43	-	-	-	-
Val	3,00	-	-	-	0,29	0,31	-
	4,00	0,38	-	-	0,41	0,45	-
	5,00	-	-	-	0,67	0,67	-
	6,00	0,26	-	-	0,53	0,55	-

FONTE: Autoria própria.

Nas Figuras 15 a 19 são apresentados os valores obtidos das medidas de relaxação longitudinal relativas, T_1^i/T_1^0 . Em geral, nelas é possível observar uma tendência na diminuição de T_1^i conforme aumenta-se a concentração da espécie Eu^{3+} no meio, concordando com o aumento das da taxa de relaxação longitudinal, R_1 , como descrito por Cockerill et al.³⁴.

$$R_1 = \frac{1}{T_1}$$

Figura 15 – Moléculas da Fenilalanina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 16 – Moléculas da Glutamato indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 17 – Moléculas da Arginina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 18 – Moléculas de Serina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 19 – Moléculas da Valina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Longitudinal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_1^i e o Tempo de Relaxação Longitudinal para amostra livre de Eu^{3+} , T_1^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria

A diminuição nos valores de T_1 , sem perda substancial na qualidade dos espectros de RMN de ^1H , é de grande valor para as análises quantitativas de RMN ou qNMR, isto se deve a considerável diminuição do tempo de máquina. Pode-se usar como exemplo os experimentos descritos na subdivisão 3.3.4, na qual utiliza-se número de scans, $ns = 16$, e tempo de relaxação, $d1 = 35$ s (aproximadamente $7 \cdot T_1$), o que acarretaria em pelo menos 9 minutos e 20 segundos. Levando em consideração os dados apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 15 a 19, o tempo de experimento

cairia para 4 minutos e 16 segundos para o caso da Fenilamina, em pD 4,00, em que $T_1^i/T_1^0 = 0,68$.

A relaxação transversal, T_2 , está intimamente ligada a uma característica de fundamental importância para a qualidade do espectro de RMN de ^1H de misturas complexas, a largura de linha. As larguras dos sinais de ressonância são inversamente proporcionais ao T_2^* . Um rápido T_2^* corresponde a um rápido desfoque, perda de coerência, da magnetização transversal à qual corresponde em tornar correlações em uma grande diferença de frequências entre os vetores e, consequentemente, uma maior extensão (largura de linha) na dimensão da frequência, como observado na Figura 3. Nas Figuras 20 a 24 são apresentados os valores obtidos das medidas de Relaxação Transversal relativa, T_2^i/T_2^0 . Nestas é possível observar o aumento do decaimento de T_2^i conforme aumenta-se a concentração da espécie Eu^{3+} no meio, concordando com o descrito por Cockerill et al.³⁴.

Figura 20 - Moléculas da Fenilalanina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 21 – Moléculas da Glutamato indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 22 - Moléculas da Arginina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 23 - Moléculas de Serina indicando a posição dos carbonos aos quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Figura 24 - Moléculas da Valina indicando a posição dos carbonos ao quais os núcleos de ^1H monitorados estão ligados. Abaixo são apresentadas suas relações entre os Tempos de Relaxação Transversal para uma determinada concentração de Eu^{3+} , T_2^i e o Tempo de Relaxação Transversal livre de Eu^{3+} , T_2^0 . Obteve-se esta razão para cada núcleo de ^1H monitorados por espectros de RMN de ^1H nas diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Após analisar o comportamento das espécies químicas citadas na Tabela 1 na presença de distintas concentrações de Eu^{3+} , através dos dados de deslocamento químico induzido, e dos valores das relaxações longitudinais e transversais, constatou-se que o pD não altera significativamente o comportamento das amostras supracitadas.

Em seguida, foram realizadas avaliações dos efeitos do Eu^{3+} sobre a quantificação de espécies presentes na amostra em RMN de ^1H . Nessa etapa, optou-se por

utilizar apenas a espécie avaliada e o citrato, que além de atuar como tampão, também foi considerado padrão interno. Os valores obtidos são relativos a primeira medida a qual era livre de Eu^{3+} . A partir dos dados obtidos, verificou-se que apesar da concentração das espécies avaliadas apresentarem oscilações diante de diferentes concentrações de Eu^{3+} , essas não extrapolaram a estreita faixa de $\pm 2,50\%$ do valor médio das medidas. Esta constatação pode ser melhor observada na Figura 25.

Figura 25 – Gráficos apresentando o comportamento das medidas de quantificação da concentração relativa dos aminoácidos em diferentes concentrações de Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Após analisar os valores da quantificação relativa apresentados na Figura 25, acima, seus dados foram avaliados por teste de hipóteses do tipo Teste t bicaudal com nível de confiança de 95%, no qual as hipóteses consistem:

- $H_0: \mu_0 = \mu$, ou seja, os valores médios de quantificação relativa variam dentro de um limite aceitável;

- $H_1: \mu_0 \neq \mu$, os valores médios de quantificação relativa variam além do limite aceitável;

Todos os valores de t atendem a hipótese H_0 , ou seja, encontram-se dentro da faixa aceitável, entre -2,7764 e 2,7764, e são apresentados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4 - Tabela contendo os valores médios da quantificação relativa, os valores dos desvios padrão e os valores calculados de t para cada espécie química.

	Média	D. Padrão	T
Val	1,0041	0,0121	0,67966
Glu	1,0036	0,0074	0,9682
Phe	1,0041	0,0175	0,47255
Ser	0,9969	0,0044	-1,403
Arg	0,9992	0,0064	-0,2368

FONTE: Autoria própria.

Os dados apresentados acima, não excluem a utilização de outras formas de quantificação a partir da utilização de Referências Eletrônicas ou capilares lacrados contendo referências internas com valores de concentração conhecidos como por exemplo: TSP-d4, TMS, DSS, entre outros.

4.2 Avaliação dos efeitos de íons Eu^{3+} em misturas complexas de padrões de aminoácidos

Após verificar que não uma condição ideal, pelo menos na avaliação preliminar contendo os cinco aminoácidos isolados, e verificar que a quantificação não foi afetada pela adição de Eu^{3+} , foram realizados experimentos de RMN de ^1H de misturas complexas contendo os 20 aminoácidos essenciais de forma similar aos anteriores, na ausência e na presença de Eu^{3+} em diferentes concentrações.

Os primeiros dados adquiridos consistem na avaliação dos efeitos de diferentes campos magnéticos B_0 , e por isto, foram obtidos em 9,4; 14,1 e 18,8 Tesla, representando respectivamente equipamentos de RMN operando nas frequências de 400, 600 e 800 MHz para o núcleo de ^1H . Esses experimentos foram conduzidos com as mesmas amostras, e visaram verificar se o campo magnético influenciaria o deslocamento químico induzido.

Nas Figura 26 e 27, pode-se observar que os espectros de RMN de ^1H para a mistura complexa de aminoácidos contendo Eu^{3+} não apresentaram diferenças na posição dos deslocamentos químicos dos sinais, quando estes estão em escala de ppm. A partir dessa informação, pode-se concluir que os diferentes campos magnéticos dos equipamentos não influenciam nos efeitos gerados pela presença dos íons Eu^{3+} nas amostras.

Visando a identificação dos sinais de RMN de ^1H da mistura complexa em soluções contendo espécies Eu^{3+} , foi realizado um monitoramento da evolução da posição desses sinais diante do aumento da concentração desse íon no meio a partir de sucessivas adições de 15 μL de solução $1,000 \text{ mol.L}^{-1}$ de Eu^{3+} . Aproveitando-se destas amostras, realizou-se também um estudo dos efeitos da presença de íons Eu^{3+} sobre a difusão das espécies presentes na solução analisada. Para efetuar esses estudos, após cada adição foram adquiridos espectros de RMN de ^1H e ^1H DOSY.

Figura 26 - Espectros de RMN de ^1H da mistura complexa de aminoácidos na presença de Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 27 - Expansão da região entre 0,5 e 4,5 ppm dos espectros de RMN de ^1H da Figura 26.

FONTE:

Autoria

própria

O monitoramento da evolução dos sinais foi realizado adicionando-se 15 μL de solução de $1,000 \text{ mol.L}^{-1}$ de Eu^{3+} , e é apresentado de forma completa na Figura 28. Devido à complexidade e à quantidade de informações apresentadas nessa figura, optou-se por dividi-la em regiões contendo faixas de deslocamento químico menores. Quando se examina o espectro de RMN de ^1H da amostra livre de Eu^{3+} , percebe-se que esse pode ser dividido em três regiões distintas: de 0,70 a 3,00 ppm; de 2,40 a 4,40 ppm e de 6,80 a 8,00 ppm. Estas regiões são exibidas, respectivamente, pelas Figuras 29 a 31. As identificações dos picos componentes destes espectros de RMN de ^1H são apresentados no APÊNDICE B, enquanto a Tabela 8 resumindo isto, no APÊNDICE C.

Analizando as Figuras 29 a 31, nota-se que tanto a primeira quanto a última são regiões de fácil identificação dos metabólitos, e com raras sobreposições de sinais. Estas sobreposições podem ser solucionadas de forma simples através da deconvolução dos sinais utilizando ferramentas como o *software* Chemnox. Em contrapartida, a região entre 2,50 e 4,50 é caracterizada grande sobreposição de sinais e ambiguidades na identificação dos sinais, e pode ser considerada a região de maior interesse para o uso do reagente descrito aqui neste trabalho.

Analizando as Figuras supracitadas, após a primeira adição de Eu^{3+} , observa-se dois eventos: o primeiro consiste no aumento da intensidade dos sinais. Isto se deve a diminuição do tempo de relaxação longitudinal e a manutenção do tempo de aquisição, AQ, e do tempo de relaxação, d1, o que proporciona uma recuperação mais rápida do vetor magnetização, e consequentemente, reestabelecimento da componente longitudinal z. O segundo evento corresponde ao surgimento de sinais, como: um duplete em 2,75 ppm, e um dd em 3,60 ppm, ambos não identificados; e outro dd em aproximadamente 3,20 ppm referente a Tirosina. Na Figura 32 nota-se no espectro da segunda adição, a dispersão do multiplete em 3,80 ppm do espectro da amostra livre de Eu^{3+} em três multipletos entre 3,65 e 3,80 ppm. Nessa figura também se constata a evolução da formação de um “singlete” em 3,90 ppm a partir dos multipletos relativo a Serina próximos a 4,00 ppm, de forma semelhante com o descrito no capítulo anterior. Além deste fato, ocorre uma outra separação mais eficiente dos sinais sobrepostos entre 4,03 e 4,15 ppm originando, após a segunda adi-

ção de Eu^{3+} , duplos dupletos isolados referentes a Fenilalanina, a Histidina, a Asparagina e ao Triptofano.

Figura 28 - Espectros de 600 MHz de RMN de ^1H monitorando a mudança do deslocamento químico dos picos através de adições sucessivas de 15 μL de solução 1,000 mol.L^{-1} de Eu^{3+} em uma solução de mistura complexa de aminoácidos livre de Eu^{3+} (coloração preta).

FONTE: Autoria própria.

Figura 29 - Expansão da região entre 0,7 e 3,0 ppm dos espectros de RMN de ^1H da Figura 28.

FONTE: Autoria própria.

Figura 30 - Expansão da região entre 2,4 e 4,4 ppm dos espectros de RMN de ^1H da Figura 28.

FONTE: Autoria própria.

Figura 31 – Expansão da região entre 6,8 e 8,0 ppm dos espectros de RMN de ^1H da

Figura 28.

FONTE: Autoria própria.

Figura 32 - Expansão da região entre 3,5 e 4,4 ppm ppm dos três primeiros espectros de RMN de ^1H da Figura 28

FONTE: Autoria própria.

No quarto espectro adquirido, após a adição de 45 μL da solução 1,000 mol.L^{-1} de Eu^{3+} , evidencia-se na Figura 29 que os multipletos situados entre 2,47 e 2,59 ppm, referentes à Glutamina e ao Glutamato, desmembram-se em diversos sinais entre 2,33 e 2,50 ppm, diferenciando essas duas espécies químicas. O duplete em 2,73 ppm, não identificado, constatado após a primeira adição que se encontrava sobreposto pelo tripleto relativo a Metionina em 2,64 ppm, agora mostra-se como um singleto ainda no mesmo deslocamento químico. Esta perda de multiplicidade ocorre de forma semelhante ao que ocorreu com os sinais da Serina anteriormente. Este aminoácido por sua vez, volta a apresentar multipletos como seus sinais. Ainda nessa mesma concentração de Eu^{3+} , em 2,93 ppm é possível observar a presença de um duplo duplete proveniente da Cisteína que se situava sob um tripleto referente a Lisina em 3,10 ppm. Outros fatos que podem ser reportados para essa mesma condição, são maiores isolamentos de sinais como os dos duplos dupletos da região entre 4,00 e 4,10 ppm, e de uma completa separação entre um duplete da Tirosina e um tripleto do Triptofano, anteriormente sobrepostos em um único sinal em 7,24 ppm, como observado na Figura 31.

No quinto espectro de RMN de ^1H obtido ocorre uma visível perda na resolução espectral, porém a região dos sinais aromáticos ainda permanece com boa qualidade nos sinais, com diminuição da sobreposição dos picos. Há poucas modificações no resto do espectro, apenas o surgimento de um tripleto não identificado em 1,32 ppm e de outro referente a Isoleucina, que se mostra completamente isolado de outros sinais. Este último, torna-se mais evidente quando se analisa o sexto espectro, esse tripleto que estava inicialmente justaposto por um multipletto entre 1,25 e 1,35 ppm. Os sinais de duplos dupletos entre 2,90 e 3,05 ppm, identificados primariamente como Asparagina, foram deslocados para a região entre 2,50 e 2,60 ppm. Estes sinais sofreram nas etapas anteriores modificações em sua forma e, conseqüentemente em suas multiplicidades. Além destes fatos descritos, os sinais da Prolina e da Treonina, inicialmente 4,18 e 4,30, respectivamente, inverteram as posições no espectro, passando este último para o deslocamento químico 4,02 ppm, enquanto o primeiro para 4,07 ppm. Uma inversão similar ocorre entre os sinais de tripleto e dubleto, ambos referentes a Fenilalanina na região entre 7,24 e 7,36 ppm.

No sétimo espectro de RMN de ^1H , após a adição de 90 μL de solução de $1,000 \text{ mol. L}^{-1}$ de Eu^{3+} , observa-se que ocorre a total separação dos aminoácidos presentes na faixa entre 3,70 e 4,10 ppm, o que inclui a Cisteína, a Prolina, a Serina, a Treonina, a Tirosina e o Triptofano. A partir desta concentração de Eu^{3+} , constata-se também, uma perda significativa de resolução dos sinais. Nos espectros de RMN de ^1H subsequentes, não são verificadas mudanças significativas em comparação ao sétimo, apenas dois desvencilhamentos de dois sinais no nono, ou penúltimo espectro, que consistem de um tripleto em 1,69 ppm, e de um dubleto em 3,66 ppm.

Com o propósito de verificar se a interação entre o Eu^{3+} e os aminoácidos afetava os coeficientes de difusão, como citado por Morris⁵³ e por González-García⁶³, foram realizados experimentos de DOSY para a solução livre e as contendo diferentes concentrações de Eu^{3+} . Os espectros pseudobidimensionais obtidos para esse experimento são ilustrados da amostra livre de Eu^{3+} e após todas as adições realizadas e descritas nos parágrafos anteriores, são apresentadas respectivamente nas Figuras 33 e 34. Nestas imagens não foi possível verificar visualmente mudanças significativas nos valores de coeficientes de difusão observados das espécies químicas envolvidas. Em virtude disto,

e com o intuito de atestar se realmente ocorreram modificações ou não nos valores dos coeficientes de difusão para cada aminoácido em cada adição, estes foram calculados com ajuda do *software* Bruker TopSpin 3.6.1, e em seguida, esses valores foram avaliados por teste de hipóteses do tipo Teste t bicaudal com nível de confiança de 95%, no qual as hipóteses consistem:

- H_0 : $\mu_0 = \mu$, ou seja, menor interação entre Eu^{3+} e a espécie química do aminoácido, ou menor perturbação do raio hidrodinâmico desse;

- H_1 : $\mu_0 \neq \mu$, ou seja, maior interação entre Eu^{3+} e a espécie química do aminoácido, ou seja, maior perturbação do raio hidrodinâmico dessa espécie;

Figura 33 – Espectros de ^1H DOSY da mistura complexa de aminoácidos livre de Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 34 - Espectros de ^1H DOSY da mistura complexa de aminoácidos após a adição de 150 μL de solução 1,000 mol.L^{-1} de Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Os valores dos coeficientes de difusão obtidos e os tratamentos estatísticos são reportados, respectivamente, nas Tabela 5 e Tabela 6, enquanto os gráficos são apresentados no APÊNDICE E – Gráficos contendo a variação dos coeficientes de difusão de cada metabólito após cada adição de Eu^{3+} .

A partir dos coeficientes de difusão e da Equação 2 foram calculadas as constantes de equilíbrio, K_{eq} , para cada espécie de aminoácido em cada uma das adições de Eu^{3+} . Os valores obtidos foram listados na Tabela 6.

$$K_{\text{eq}} = (\mathbf{D}_{\text{livre}} + \mathbf{D}_{\text{Obs}})/(\mathbf{D}_{\text{obs}} - \mathbf{D}_{\text{comp}}) \quad (\text{eq. 2})$$

A Equação 2 foi obtida da Equação 1, onde:

$$\mathbf{X}_{\text{livre}} + \mathbf{X}_{\text{comp}} = 1 \quad (\text{eq. 3})$$

E da equação da constante de equilíbrio:

$$K_{eq} = \frac{[AAEu]^{3+}}{[AA][Eu^{3+}]} \quad (\text{eq. 4})$$

Proveniente da equação química:

Tabela 5 - Tabela contendo os coeficientes de difusão observados para cada espécie química e cada adição de Eu³⁺.

	Dlivre	Dobs1	Dobs3	Dobs4	Dobs5	Dobs6	Dobs7	Dobs8	Dobs9	Dobs10
Val	7,06E-10	5,73E-10	5,42E-10	5,35E-10	5,07E-10	4,86E-10	4,68E-10	-	4,64E-10	4,49E-10
Ser	8,41E-10	6,60E-10	-	5,81E-10	-	-	-	-	-	-
Arg	6,31E-10	4,96E-10	4,65E-10	6,64E-10	3,73E-10	4,49E-10	4,24E-10	6,55E-10	5,44E-10	5,11E-10
Glu	7,01E-10	5,50E-10	5,11E-10	5,13E-10	4,81E-10	4,71E-10	4,50E-10	-	4,24E-10	4,19E-10
Phe	5,99E-10	5,19E-10	5,18E-10	4,93E-10	4,78E-10	4,46E-10	4,62E-10	-	4,40E-10	4,05E-10
His	6,29E-10	-	5,22E-10	4,95E-10	4,99E-10	4,80E-10	5,13E-10	4,37E-10	4,27E-10	4,85E-10
Ala	8,02E-10	6,38E-10	5,95E-10	6,03E-10	5,40E-10	5,23E-10	5,67E-10	1,11E-09	1,11E-09	-
Ile	7,05E-10	5,48E-10	5,38E-10	5,13E-10	5,41E-10	4,76E-10	4,68E-10	-	4,56E-10	4,47E-10
Leu	6,54E-10	5,39E-10	5,18E-10	5,03E-10	4,91E-10	4,52E-10	4,61E-10	-	4,51E-10	4,38E-10
Lys	6,31E-10	5,12E-10	5,02E-10	4,97E-10	5,05E-10	4,64E-10	4,65E-10	5,95E-10	5,28E-10	4,70E-10
Met	6,94E-10	6,53E-10	6,03E-10	5,72E-10	5,85E-10	4,76E-10	4,67E-10	-	2,79E-10	3,78E-10
Pro	9,92E-10	6,28E-10	5,27E-10	5,08E-10	5,05E-10	5,04E-10	4,94E-10	-	4,86E-10	4,90E-10
Gly	9,91E-10	7,90E-10	5,37E-10	5,35E-10	4,15E-10	5,27E-10	5,30E-10	-	5,19E-10	5,03E-10
Gln	7,16E-10	5,68E-10	4,99E-10	5,13E-10	4,81E-10	4,71E-10	4,50E-10	-	4,32E-10	4,21E-10
Cys	-	6,17E-10	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr	7,31E-10	5,94E-10	5,51E-10	5,24E-10	4,60E-10	4,58E-10	4,83E-10	-	4,65E-10	4,69E-10
Asn	8,28E-10	6,12E-10	4,94E-10	3,62E-10	6,31E-10	6,27E-10	7,76E-10	4,59E-10	7,72E-10	7,68E-10
Asp	9,36E-10	6,22E-10	6,07E-10	6,60E-10	8,33E-10	9,17E-11	1,67E-09	2,31E-09	5,36E-09	-
Tyr	5,68E-10	5,22E+00	4,56E-10	4,75E-10	4,63E-10	4,44E-10	4,46E-10	4,60E-10	4,13E-10	4,10E-10
Trp	5,41E-10	5,10E-10	5,19E-10	4,78E-10	4,88E-10	4,78E-10	4,54E-10	-	4,66E-10	4,32E-10
AC	6,14E-10	5,00E-10	3,22E-10	8,74E-10	7,18E-10	6,13E-10	6,73E-10	-	5,45E-10	5,38E-10

FONTE: Autoria própria.

Tabela 6 - Tabela contendo as constantes de equilíbrio, K_{eq} , os coeficientes de difusão livre, D_{livre} , os valores médios dos coeficientes de difusão observados, $D_{média}$, desvio padrão e o valor calculado de t para cada espécie química. Onde: $H_0: \mu_0 = \mu$, menor interação entre Eu^{3+} e a espécie química do aminoácido, ou menor perturbação do raio hidrodinâmico desse; $H_1: \mu_0 \neq \mu$, maior interação entre Eu^{3+} e a espécie química do aminoácido, ou seja, maior perturbação do raio hidrodinâmico dessa espécie.

AA	K_{eq}	D_{livre}	$D_{Média}$	D. Padrão	t	-1,86 < t < 1,86
Val	0,971613	7,06E-10	5,2E-10	7,45E-11	-7,307	$H_0: \mu = \mu_0$
Ser		8,41E-10	2,1E-10	3,41E-10	-5,566	
Arg		6,31E-10	5,2E-10	1,01E-10	-3,276	
Glu	0,970051	7,01E-10	5E-10	8,12E-11	-7,377	
Phe	0,965749	5,99E-10	4,8E-10	5,35E-11	-6,422	
His		6,29E-10	4,5E-10	1,62E-10	-3,305	
Ala	0,994956	8,02E-10	2,7E-08	8,21E-08	0,946	
Ile	0,968962	7,05E-10	5,2E-10	7,46E-11	-7,452	
Leu	0,977096	6,54E-10	5E-10	6,30E-11	-7,325	
Lys	0,999239	6,31E-10	5,2E-10	5,54E-11	-6,184	
Met		6,94E-10	5,2E-10	1,27E-10	-4,062	$H_0: \mu = \mu_0$
Pro	0,999489	9,92E-10	5,7E-10	1,55E-10	-8,230	
Gly	1,014441	9,91E-10	5,9E-10	1,69E-10	-7,079	
Gln	0,982323	7,16E-10	5E-10	8,54E-11	-7,413	
Cys		0,00E+00	6,2E-11	1,95E-10	0,949	
Thr	0,990945	7,31E-10	5,3E-10	8,54E-11	-7,110	
Asn		8,28E-10	6,3E-10	1,56E-10	-3,750	
Asp		9,36E-10	1,3E-09	1,58E-09	0,709	
Tyr	0,988621	5,68E-10	0,5219	1,65E+00	0,949	
Trp		5,41E-10	4,8E-10	3,18E-11	-5,284	
AC		6,14E-10	7,2E-10	4,18E-10	0,790	

FONTE: Autoria própria.

Diante dos dados observados, percebe-se que a maioria dos aminoácidos se enquadra na hipótese H_1 , $\mu_0 \neq \mu$. Apenas a Alanina, o Aspartato e a Tirosina incluem-se na hipótese H_0 . Apesar dessas variações dos valores dos coeficientes de difusão, estes ainda se mantiveram na mesma ordem de grandeza, em $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, o que corrobora com a hipótese do mecanismo majoritário de ação do Eu^{3+} sobre os aminoácidos ser o pseudocontado, o que consiste em uma interação entre os dipolos magnéticos dos elétrons do metal com os dipolos magnéticos do núcleo ligante.

4.3 Avaliação da aplicação de íons Eu^{3+} em amostras de leite

Os espectros de 400 MHz de RMN de ^1H analisando o efeito da acidificação, mas amostras de leite desnatado comercial são apresentados na Figura 35. Nesta é possível observar que o espectro de leite sem adição de ácido, ou seja em pH 6,88, possui sinais largos e um certo nível de comprometimento na qualidade da linha da sua linha de base. Estes sinais correspondem a macromoléculas presentes que podem esconder sinais de metabólitos relevantes⁶⁹. Ainda na Figura 35, foi constatada a diminuição do alargamento de sinais, o aumento na linearidade da linha de base, além do aumento na intensidade de alguns sinais, em decorrência da precipitação ácida de macromoléculas. Além dessas informações a respeito da qualidade do espectro, ligadas principalmente a perda de determinadas macromoléculas, foram observados *drifts* nos deslocamentos químicos de alguns sinais, como por exemplo dos dois dubletos do citrato. Estes foram os sinais que apresentaram as variações mais significativas, sendo que o primeiro dubleto foi deslocado de 2,51 ppm ou 1005,50 Hz, em pH 6,88, para 2,85 ppm ou 1142,04 Hz, em pH 1,48, enquanto o segundo variou de 2,69 ppm ou 1079,66 Hz para 3,04 ppm ou 1217,56 Hz, para os mesmos pHs citados anteriormente. Apesar dos deslocamentos químicos induzidos, as constantes de acoplamento dos dubletos do citrato mantiveram seus valores praticamente inalterados, além disto não foram observadas perdas de sinais significativos para a análise. Diante destas informações preliminares decidiu-se por prosseguir com os experimentos subsequentes.

Figura 35 – Evolução dos espectros de 400 MHz de RMN de ^1H de leite desnatado comercial em diferentes faixas de pD.

FONTE: Autoria própria.

Os experimentos que deram sequência a avaliação dos efeitos dos íons Eu^{3+} frente a amostras reais, como o leite, foram realizados no equipamento da Embrapa Instrumentação. Os espectros de 600 MHz de RMN de ^1H comparando protocolos A, B e C são apresentados na Figura 36. Nesta observa-se apenas diferenças pontuais, como a presença de dois singletos que só estão presentes no espectro da amostra extraída pelo protocolo A, e outros dois que também só estão no espectro amostra do protocolo B. Além disto, nesta amostra constatou-se menor intensidade dos sinais dos metabólitos, provavelmente ocasionado pela presença de uma quantidade superior de macromoléculas.

Figura 36 – Comparativo dos espectros de RMN de ^1H obtidos através dos protocolos A, B e C de preparo de amostras de leite.

FONTE: Autoria própria.

Como não foram verificadas diferenças significativas na qualidade dos espectros de RMN de ^1H adquiridos, prosseguiu-se acidificando as amostras, e consequentemente, acompanhando o comportamento dos metabólitos frente a outras variáveis. Após esta primeira etapa, iniciou-se a avaliação das amostras após a adição dos íons Eu^{3+} e o monitoramento dos seus efeitos em espectros de RMN de ^1H . Após a adição da espécie química em questão, foram observadas, em algumas situações a formação de colóides, em particular nas amostras preparadas utilizando os protocolos A e B, o que inviabilizou a aquisição dos seus espectros de RMN de ^1H . Devido a ocorrência desse fato, apenas as amostras obtidas através do protocolo C foram utilizadas na avaliação dos efeitos gerados pela adição de Eu^{3+} em amostras reais de leite. Diante das informações aqui apresentadas, pode-se inferir que o protocolo de extração C é o mais adequado para essa finalidade.

O monitoramento da variação dos deslocamentos químicos dos sinais das amostras obtidas pelo protocolo C em pH ácidos é apresentado na Figura

37. Esse acompanhamento vislumbrou identificar os deslocamentos químicos de cada metabólito nos espectros de RMN de ^1H adquiridos de amostras em meio ácido a partir das informações da amostra mais próxima a faixa neutra de pH.

Figura 37 – Monitoramento dos efeitos observados nos espectros de RMN de ^1H gerados pela acidificação de amostras de leite preparados pelo protocolo C.

FONTE: Autoria própria.

O monitoramento realizado na Figura 38 possui objetivos semelhantes ao da figura anterior, observar o efeito gerado pela adição de diferentes concentrações de Eu^{3+} sob o deslocamento dos sinais de RMN de ^1H de metabólitos presentes em amostras de leite. Na figura supracitada é possível observar uma tendência de variação dos deslocamentos químicos em direção a campo magnético alto. Nessa mesma figura, também se verifica que após as adições o Citrato não apresenta deslocamento químico negativo, como observado na

Figura 28, indicando competição no consumo de Eu^{3+} com outras espécies químicas presentes na solução, como por exemplo proteínas e fosfolípidos.

Em nenhuma das condições apresentadas nas Figura 37 Figura 38 foram observados alargamentos significativos de sinais de RMN de ^1H , tão pouco variações significativas nas constantes de acoplamento. A única perda de qualidade espectral observada foi *J-modulation* no espectro da amostra em pD 4,5 da Figura 37. Diante disto, podemos afirmar que a utilização do Eu^{3+} , mesmo que em diferentes faixas de pD, não prejudicam a qualidade e nem a resolução dos sinais dos espectros de RMN de ^1H analisados.

Figura 38 - Monitoramento do comportamento dos sinais presentes nos espectros de 600 MHz para RMN de ^1H da amostra extraída pelo protocolo C em pD 3,00 livre de Eu^{3+} (coloração preta) submetida a adições consecutivas de 15 μL de solução 1,000 mol.L^{-1} de Eu^{3+} , de baixo para cima.

FONTE: Autoria própria.

A identificação e o assinalamento dos sinais de RMN de ^1H das amostras de leite foram realizados com ajuda da literatura, e de experimentos auxili-

ares como os espectros de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC descritos por Hu et al.⁶⁵, e mostrados na Figura 40.

Figura 39 - Espectros de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC auxiliando a identificação de metabólitos presentes na amostra real de leite.

FONTE: Autoria própria.

Após a identificação, o comportamento dos metabólitos de interesse monitorados nas amostras de leite, antes e depois da adição de Eu^{3+} , são apresentados de forma mais comparativa na Figura 40, e resumida na Tabela 7.

Frente as informações apresentadas, nota-se que apesar das pequenas variações nos valores dos deslocamentos químicos das espécies que ocorrem devido à grande concentração dos metabólitos foi possível desvencilhar sinais sobrepostos, como por exemplo o singlete identificado como 6, referentes a Colina e/ou Fosfocolina, a partir da adição de $30\ \mu\text{mol}$ de Eu^{3+} . Desta forma, podemos perceber o valor que este tipo de ferramenta pode agregar na identificação de metabólitos de interesse específico, resolvendo ambiguidades no assinalamento dos picos, na identificação dos metabólitos, e consequentemente simplificando suas quantificações^{19; 24; 25}.

Figura 40 - Espectros de 600 MHz de RMN de ^1H de amostras extraída pelo protocolo C em pD 3,00: livre (acima), e contendo 60 mmol.L $^{-1}$ de Eu^{3+} (abaixo).

FONTE: Autoria própria.

Tabela 7 – Tabela contendo os metabólitos de amostras de leite, monitorados nos espectros da Figura 40.

#	Metabólito	Multiplicidade		J/Hz		$\Delta\delta/\text{Hz}$
		inicial	final	inicial	final	
	Citrato ^{69; 70; 78}	d	D	15,88	15,98	7,84
		d	D	15,90	15,90	81,94
1	PE ⁷⁹	m	M	-	-	14,45
2	Creatina ^{69; 70} / Fosfocreatina ⁶⁹	s	S	-	-	24,01
3	Creatinina ^{69; 70; 78}	s	S	-	-	21,83
4	SHP ⁷⁹	s	S	-	-	41,31
5	PI ⁷⁹	t	S	7,14	-	114,86
6	Colina ^{69; 70} e PC ^{69; 70; 79}	s	S	-	-	-
6'	PC ^{69; 70}	s	S	-	-	21,41
6''	Colina ^{69; 70}	s	S	-	-	7,97
7	Lecitina ⁶⁵	s	S	-	-	21,63
8	Carnitina ⁶⁹	s	S	-	-	76,15
9	Betaína ⁶⁹	s	S	-	-	81,42
	Lactose ^{69; 70; 78}	dt	M	8,46	8,46	10,21

FONTE: Autoria própria.

Diante dos resultados apresentados nesta subseção, e apesar de agregar etapas e carecer de dados mais abrangentes, a utilização de Eu^{3+} em análises metabolômicas mostrou-se eficiente e promissora do ponto de vista de identificação de substâncias “mascaradas” por sobreposições, e consequentemente, negligenciáveis até o presente momento.

5 CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados na seção anterior, das informações obtidas na literatura e no objetivo do projeto, pode se concluir que:

- O Eu^{3+} poderá ser utilizado para estudos mais detalhados e concisos de metabólitos polares e/ou outras misturas complexas de substâncias polares, deslocando sinais que se sobrepõe a outros, e assim, tornando possível a observação de compostos até então negligenciáveis;

- A utilização desse tipo de reagente deve ser adaptada a cada tipo de amostra, lembrando que sua utilização deve ser realizada exclusivamente em meio ácido, ou seja, as amostras necessitam ser estáveis em faixas de pD ácidos, menores que 6,00;

- Praticamente todos os metabólitos avaliados foram afetados pelo Eu^{3+} , mesmo que em diferentes intensidades;

- Os picos de que sofreram os maiores efeitos do Eu^{3+} , e consequentemente, tiveram seus sinais mais deslocados foram os núcleos de ^1H ligados aos carbonos β . Este efeito diminui com a distância deste sítio de interação. Além disto, apesar da observação de perturbações significativas nos valores dos coeficientes de difusão dos aminoácidos aqui analisados, e consequentemente, nos seus valores do raio hidrodinâmico, não se pode afastar a hipótese de que as interações entre os íons Eu^{3+} e esses metabólitos, se deram majoritariamente pelo mecanismo de pseudocontato;

- Não foram observadas mudanças significativas nos dados obtidos que justificassem a sua não utilização em experimentos de quantificação via RMN. Ao contrário disto, diante da diminuição do tempo de relaxação longitudinal, T_1 , a utilização desse tipo de reagente ajuda a diminuir o tempo de utilização do equipamento, otimizando a análise e aumentando a produção de dados.

Diante do apresentado acima, recomenda-se a utilização de solução polar de Eu^{3+} em análises de misturas complexas de metabólitos polares, tanto do ponto de vista da identificação, quanto da quantificação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, London, v. 455, p. 1054-1056, 2008.

2 COBRA, P. F. **Aplicações de ressonância magnética nuclear em estudos metabolômicos de processos biológicos**. Orientador: Luiz Alberto Colnago. 2016. 102 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

3 WATKINS, S. M.; GERMAN, J. B. Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 512-516, 2002.

4 WHITFIELD, P. D.; GERMAN, A. J.; NOBLE, P. J. M. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 549-555, 2004.

5 JACOBS, D. M.; SPIESSER, L.; GARNIER, M.; ROO, N. D.; DORSTEN, F. V.; HOLLEBRANDS, B.; VETZEN, E. V.; DRAIJER, R.; DUYNHOVEN, J. V. SPE-NMR metabolite sub-profiling of urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, p. 2349-2361, 2012.

6 FATTUONI, C.; PALMAS, F.; NOTO, A.; FANOS, V.; BARBERINI, L. Perinatal Asphyxia: A review from a metabolomics perspective. **Molecules**, Basel, v. 20, p. 7000-7016, 2015.

7 LAMICHHANE, S.; YDE, C. C.; SCHMED, M. S.; JENSEN, H. M.; MEIER, S. BERTRAM, H. C. Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of human feces. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 87, p. 5930-5937, 2015.

8 GRIFFIN, J. L.; SHOCKCOR, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 4, n. 7, p. 551-561, 2004.

9 DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **Analyst**, Cambridge, v. 130, n. 5, p. 606-625, 2005.

10 HALOUSKA, S.; FENTON, R. J.; BARLETTA, R. G.; POWERS, R. Predicting the in vivo mechanism of action for drug leads using NMR metabolomics. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 7, n. 1, p. 6, 2012.

11 NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; KINROSS, J. M.; DARZI, A. W.; TAKATS, Z.; LINDON, J. C. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. **Nature**, London, v. 491, n. 7424, p. 384-392, 2012.

12 HUANG, Y. Q.; CAL, S. H.; ZHANG, Z. Y.; CHEN, Z. High-resolution two-dimensional J-Resolved NMR spectroscopy for biological systems. **Biophysical Journal**, St. Louis, v. 106, n. 9, p. 2061-2070, 2014.

13 HUANG, Y. Q.; ZHANG, Z. Y.; CHEN, H.; FENG, J. H.; CAI, S. H.; CHEN, Z. A high-resolution 2D J-resolved NMR detection technique for metabolite analyses of biological samples. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 9, 2015.

14 SOUTHAM, A. D.; EASTON, J. M. STENTIFORD, G. D.; LUDWING, C. ARVANITIS, T. N.; VIANI, M. R. Metabolic changes in flatfish hepatic tumours revealed by NMR-based metabolomics and metabolic correlation networks. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 7, n. 12, p. 5277-5285, 2008.

15 BYEON, I. J. L.; AHN, J.; MITRA, M.; BYEON, C. H.; HERCIK, K.; HRITZ, J.; CHARLTON, L. M.; LEVIN, J. G.; GRONENBORN, A. M. NMR structure of human restriction factor APOBEC3A reveals substrate binding and enzyme specificity. **Nature Communications**, London, v. 4, p. 11, 2013.

16 DE GRAAF, R. A.; BEHAR, K. L. Detection of cerebral NAD(+) by in vivo ^1H NMR spectroscopy. **NMR in Biomedicine**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 802-809, 2014.

17 WANG, Y. L.; BOLLARD, M. E.; KEUN, H.; ANTTI, H.; BECKONERT, O.; EBBELS, T. M.; LINDON, J. C.; HOLMES, E.; TANG, H. R.; NICHOLSON, J. K. Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 323, n. 1, p. 26-32, 2003.

18 WEYBRIGHT, P.; MILLIS, K.; CAMPBELL, N. CORY, D. G., SINGER, S. Gradient, high-resolution, magic angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact cells. **Magnetic Resonance in Medicine**, Hoboken, v. 39, n. 3, p. 337-345, 1998.

19 ZHANG, B.; XIE, M. Z.; BRUSCHWEILER, L. L.; BINGOL, K.; BRUSCHWEILER, R. Use of charged nanoparticles in NMR-based metabolomics for spectral simplification and improved metabolite identification. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 87, n. 14, p. 7211-7217, 2015.

20 ZHANG, B.; YUAN, J.; BRUSCHWEILER, R. Differential attenuation of NMR signals by complementary ion-exchange resin beads for De Novo Analysis of complex metabolomics mixtures. **Chemistry A European Journal**, Weinheim, v. 23, p. 9239-9243, 2017.

21 BINGOL, K.; BRUSCHWEILER, R. Knowns and unknowns in metabolomics identified by multidimensional NMR and hybrid MS NMR methods. **Current opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 43, p. 17-24, 2017.

22 JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 17, p. 451-459, 2016.

23 LE GUENNEC, A.; GIRAUDAU, P.; CALDARELLI, S. Evaluation of Fast 2D NMR for Metabolomics. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 86, n. 12, p. 5946-5954, 2014.

24 VIEL, S.; ZIARELLI, F.; CALDARELLI, S. Enhanced diffusion-edited NMR spectroscopy of mixtures using chromatographic stationary phases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 17, p. 9696-9698, 2003.

25 BINGOL, K.; BRÜSCHWEILER, R. Multidimensional approaches to NMR-based metabolomics. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 86, p. 10, 2014.

26 FERNANDEZ-MEGIA, E.; CORREA, J.; NOVOA-CARBALLAL, R.; RIGUERA, R. Paramagnetic NMR relaxation in polymeric matrixes: sensitivity enhancement and selective suppression of embedded species (^1H and ^{13}C PSR filter). **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 129, n. 49, p. 15164-15173, 2007.

27 CORREA, J.; PINTO, L. F.; RIGUERA, R.; FERNANDEZ-MEGIA, E. Predicting PSR filters by transverse relaxation enhancements. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 87, n. 1, p. 760-767, 2015.

28 PERRONE, B.; SPRINGHETTI, S.; RAMADORI, F.; RASTRELLI, F.; MANCIN, F. "NMR Chemosensing" using monolayer-protected nanoparticles as receptors. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 135, p. 11768-11771, 2013.

29 DIEZ-CASTELLNOU, M.; SALVIA, M. V.; SPRINGHETTI, S. RASTRELLI, F.; MANCIN, F. Nanoparticle-assisted affinity NMR spectroscopy: high sensitivity detection and identification of organic molecules. **Chemistry A European Journal**, Weinheim, v. 22, p. 16957-16963, 2016.

30 SANDERS, J. K. M.; WILLIAMS, D. H. Shift reagents in NMR spectroscopy. **Nature**, London, v. 240, p. 6, 1972.

31 HINCKLEY, C. C. Paramagnetic shifts in solutions of cholesterol and the dipyrindine adduct of trisdipivalomethanatoeuropium (III). A shift reagent. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, p. 3, 1969.

32 SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, 1979.

33 HORROCKS JR., W. D.; TAYLOR, R. C.; LAMAR, G. N. Isotropic proton magnetic resonance shifts in π -bonding ligands coordinated to paramagnetic nickel (II) and cobalt(II) acetylacetonates. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 86, p. 8, 1964.

- 34 COCKERILL, A. F.; DAVIES, G. L. O.; HARDEN, R. C.; RACKHAM, D. M. Lanthanide shift reagents for nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Reviews**, Washington, v. 73, n. 6, p. 553-588, 1973.
- 35 MAYO, B. C. Lanthanide shift reagents in nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 49-74, 1973.
- 36 FLOCKHART, B. D.; JONAS, J. Lanthanide shift reagents in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, v. 6, n. 1, p. 69-130, 1976.
- 37 BARRY, C. D.; NORTH, A. C. T.; GLASEL, J. A.; WILLIAMS, R. J. P.; XAVIER, A. V. Quantitative determination of mononucleotide conformations in solution using lanthanide ion shift and broadening NMR probes. **Nature**, London, v. 232, n. 5308, p. 236-245, 1971.
- 38 RABENSTEIN, D. L. Applications of paramagnetic shift reagents in proton magnetic resonance spectrometry: analysis of alcohol mixtures. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 43, n. 12, p. 1599-1605, 1971.
- 39 EATON, D. R.; JOSEY, A. D.; PHILLIPS, W. D.; BENSON, R. E. Hyperfine contact shifts and spin density distributions in some nickel(II) chelates. **Discussions of the Faraday Society**, Cambridge, v. 34, n. 0, p. 77-87, 1962.
- 40 SHAPIRO, B. L.; HLUBUCEK, J. R.; SULLIVAN, G. R.; JOHNSON, L. F. Lanthanide-induced shifts in proton nuclear magnetic resonance spectra. I. Europium-induced shifts to higher fields. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 93, n. 13, p. 3281-3283, 1971.
- 41 CAMPBELL, J. R. Lanthanide chemical shift reagents. **Aldrichimica Acta**, Milwaukee, v. 4, p. 55, 1971.
- 42 REUBEN, J.; LEIGH, J. S. Effects of paramagnetic lanthanide shift reagents on the proton magnetic resonance spectra of quinoline and pyridine. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 94, n. 8, p. 2789-2793, 1972.
- 43 CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR techniques in organic chemistry**. Oxford: Elsevier, 1999.
- 44 HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, College Park, v. 80, n. 4, p. 580-594, 1950.
- 45 DE SOUZA, A. A.; LAVERDE, A. Using nuclear magnetic resonance spectroscopy to study molecular diffusion in liquids: the DOSY technique. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 25, n. 6A, p. 1022-1026, 2002.

- 46 CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, College Park, v. 94, n. 3, p. 13, 1954.
- 47 MCCALL, D. W.; DOUGLASS, D. C.; ANDERSON, E. W. Self-diffusion studies by means of nuclear magnetic resonance spin echo techniques. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, Cambridge, v. 67, n. 3, p. 5, 1963.
- 48 STEJSKAL, E. O. Use of spin echoes in a pulsed magnetic-field gradient to study anisotropic, restricted diffusion and flow. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 43, n. 1, 1965.
- 49 STEJSKAL, E. O.; TANNER, J. E. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 42, n. 1, p. 5, 1965.
- 50 STILBS, P. Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 1-45, 1987.
- 51 MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. Diffusion-ordered 2-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 114, n. 8, p. 3139-3141, 1992.
- 52 MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. Resolution of discrete and continuous molecular-size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR-spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 115, n. 10, p. 4291-4299, 1993.
- 53 MORRIS, K. F.; STILBS, P.; JOHNSON, C. S. Analysis of mixture based on molecular-size and hydrophobicity by means of diffusion-ordered 2D NMR. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 2, p. 211-215, 1994.
- 54 NILSSON, M.; MORRIS, G. A. Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered H-1 spectra without multiplet structure. **Chemical Communications**, Cambridge, n. 9, p. 933-935, 2007.
- 55 ROGERSON, A. K.; AGUIALAR, J. A.; NILSSON, M.; MORRIS, G. A. Simultaneous enhancement of chemical shift dispersion and diffusion resolution in mixture analysis by diffusion-ordered NMR spectroscopy. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 47, n. 25, p. 7063-7064, 2011.
- 56 BECKONERT, O.; KEUN, H. C.; EBBELS, T. M. D.; BUNDY, J. G.; HOLMES, E.; LINDON, J.; NICHOLSON, J. K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 11, p. 2692-2703, 2007.

- 57 GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 62, n. 21, p. 7512-7515, 1997.
- 58 DE MARCO, A. pH dependence of internal references. **Journal of Magnetic Resonance**, Maryland Heights, v. 26, n. 3, p. 527-528, 1977.
- 59 FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; GOTTLIEB, H. E.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B. M.; BERCAW, J. E.; GOLDBERG, K. I. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**, Washington, v. 29, n. 9, p. 2176-2179, 2010.
- 60 JUNGnickel, J. L.; FORBES, J. W. Quantitative measurement of hydrogen types by integrated nuclear magnetic resonance intensities. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 35, n. 8, p. 938-942, 1963.
- 61 BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 5-26, 2012.
- 62 LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omics information recovery. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 11, 2008.
- 63 GONZÁLEZ-GARCIA, T.; MARGOLA, T.; SILVAGNI, A.; MANCIN, F.; RASTRELLI, F. Chromatographic NMR spectroscopy with hollow silica spheres. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 128, p. 2783-2787, 2016.
- 64 WU, D. H.; CHEN, A. D.; JOHNSON, C. S. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. **Journal of Magnetic Resonance Series A**, Maryland Heights, v. 115, n. 2, p. 260-264, 1995.
- 65 HU, F.; FURIHATA, K.; ITO-ISHIDA, M.; KAMINOGAWA, S.; TANOKURA, M. Nondestructive observation of bovine milk by nmr spectroscopy: analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 16, p. 4969-4974, 2004.
- 66 HELLER, A.; BARKLEIT, A.; BERNHARD, G. Chemical specification of trivalent actinides and lanthanides in biological fluids: The dominant binding form of Curium (III) and Europium (III) in human urine. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 24, n. 2, p. 193-203, 2011.
- 67 WU, J.; DOMELLOF, M.; ZIVKOVIC, A. M.; LARSSON, G.; OHMAN, A.; NORDING, M. I. NMR-based metabolite profiling of human milk: a pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 469, n. 3, p. 626-632, 2016.

68 LU, J.; BOEREN, S.; HOOIJDONK, T. V.; VERVOORT, J.; HETTINGA, K. Effect of the DGAT1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 98, n. 5, p. 3460-3469, 2015.

69 YANIBADA, B.; BOUDRA, H.; DEBRAUWER, L.; MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; CANLET, C. Evaluation of sample preparation methods for NMR-based metabolomics of cow milk. **Heliyon**, London, v. 4, n. 10, p. e00856, 2018.

70 ANDREAS, N. J.; HYDE, M. J.; GOMEZ-ROMERO, M.; LOPEZ-GONZALVEZ, M. A.; VILLASENOR, A.; WIJEYESEKERA, A.; BARBAS, C.; MODI, N.; HOLMES, E., GARCIA-PEREZ, I. Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 36, n. 18, p. 2269-2285, 2015.

71 PRATICÒ, G.; CAPUANI, G.; TOMASSINI, A.; BALDASSARRE, M. E.; DELFINI, M.; MICCHELI, A. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 28, n. 2, p. 95-101, 2014.

72 HELLER, A.; BARKLEIT, A.; BERNHARD, G. Chemical speciation of trivalent actinides and lanthanides in biological fluids: the dominant in vitro binding form of curium(III) and europium(III) in human urine. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 24, p. 193-203, 2011.

73 EATON, D. R.; PHILLIPS, W. D.; WAUGH, J. S. Nuclear magnetic resonance of paramagnetic molecules. **Advances in Magnetic and Optical Resonance**, San Diego, v.1, p.103-148, 1965.

74 MCCARTHY, P. J.; NAKAMOTO, K. **Spectroscopy and structure of metal chelate compounds**. New York: John Wiley and Sons, 1968.

75 KELLER, H. J.; SCHWARZHANS, K. E. Magnetic resonance of paramagnetic complexes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, Weinheim, v. 9, n. 3, p. 196-205, 1970.

76 LA MAR, G. N. Isotropic shifts of some ionic complexes of cobalt(II) and nickel(II): evidence for ion pairing. **Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 41, n. 10, p. 7, 1964.

77 WEVERS, R. A.; ENGELKE, U.; WENDEL, U.; DE JONG, J. G.; GABREELS, F. J.; HEERSCHAP, A. Standardized method for high-resolution ¹H-NMR of cerebrospinal fluid. **Clinical Chemistry**, Birmingham, v. 41, n. 5, p. 744, 1995.

78 SUNDEKILDE, U. K.; POULSEN, N. A.; LARSEN, L. B.; BERTRAM, H. C. Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between

milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 96, n. 1, p. 290-299, 2013.

79 MONAKHOVA, Y. B.; BETZGEN, M.; DIEHL, B. W. K. ^1H NMR as a release methodology for the analysis of phospholipids and other constituents in infant nutrition. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 8, n. 41, p. 7493-7499, 2016.

APÊNDICE A - Espectros de RMN de ^1H completos

Figura 41 – Espectros de 400 MHz de RMN de ^1H completos referentes a Figura 35.

FONTE: Autoria própria.

Figura 42 – Espectros de 400 MHz de RMN de ^1H completos referentes a Figura 36.

FONTE: Autoria própria.

Figura 43 - Espectros de 400 MHz de RMN de ^1H completos referentes a Figura 37.

FONTE: Autoria própria.

Figura 44 – Espectros de 400 MHz de RMN de ^1H completos referentes a Figura 38.

FONTE: Autoria própria.

Figura 45 - Espectro de 600 MHz de RMN de ^1H completo livre de Eu^{3+} referente a Figura 40.

FONTE: Autoria própria.

Figura 46 - Espectro de 600 MHz de RMN de ^1H completo contendo Eu^{3+} referente a Figura 40.

FONTE: Autoria própria.

APÊNDICE B - Espectros de RMN de ^1H da mistura complexa livre de Eu^{3+} .

Figura 47 – Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 0,8 e 2,3 ppm da Figura 29.

FONTE: Autoria própria.

Figura 48 - Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 1,8 e 3,0 ppm da Figura 29.

FONTE: Autoria própria.

Figura 49 - Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 3,0 e 4,4 ppm da Figura 30.

FONTE: Autoria própria.

Figura 50 - Assinalamento dos picos dos metabólitos da região entre 6,8 e 7,9 ppm da Figura 31.

FONTE: Autoria própria.

APÊNDICE C – Tabela com a identificação dos metabólitos das figuras 29 a 31

Tabela 8 – Tabela com os a identificação de cada aminoácido presente nas Figuras 29 a 31

Nome do metabólito	Abreviações		Deslocamento Químico		multiplic.
			(Hz)	(ppm)	
Isoleucina	Ile	I	588,00	0,98	T
Leucina	Leu	L	601,40	1,00	Dd
Valina	Val	V	620,03	1,03	D
Isoleucina	Ile	I	631,20	1,05	D
Valina	Val	V	650,95	1,08	D
Isoleucina	Ile	I	783,66	1,31	M
Treonina	Thr	T	822,86	1,37	D
Isoleucina	Ile	I	891,26	1,49	M
Alanina	Ala	A	913,65	1,52	D
Lisina	Lys	K	932,72	1,55	M
Arginina	Arg	R	1058,47	1,76	M
Lisina	Lys	K	1063,18	1,77	M
Leucina	Leu	L	1063,22	1,77	M
Isoleucina	Ile	I	1170,70	1,95	M
Prolina	Pro	P	1171,72	1,95	M
Lisina	Lys	K	1171,89	1,95	M
Arginina	Arg	R	1172,24	1,95	M
Prolina	Pro	P	1226,82	2,04	M
Glutamato	Glu	E	1227,52	2,05	M
Glutamina	Gln	Q	1271,92	2,12	M
Metionina	Met	M	1294,99	2,16	M
Metionina	Met	M	1306,32	2,18	S
Glutamina	Gln	Q	1338,96	2,23	M
Valina	Val	V	1392,87	2,32	M
Prolina	Pro	P	1436,19	2,39	M
Glutamina	Gln	Q	1513,97	2,52	M
Glutamato	Glu	E	1518,48	2,53	M
Metionina	Met	M	1612,81	2,69	T
Aspartato	Asp	D	1675,69	2,79	Dd
Citrato*	AC		1677,50	2,80	D
Asparagina	Asn	N	1722,60	2,87	Dd
Citrato*	AC		1745,71	2,91	D

Aspartato	Asp	D	1761,69	2,94	Dd
Asparagina	Asn	N	1800,32	3,00	Dd
Lisina	Lys	K	1842,60	3,07	T
Tirosina	Tyr	Y	1860,50	3,10	Dd
Fenilalanina	Phe	F	1903,64	3,17	Dd
Tirosina	Tyr	Y	1949,56	3,25	Dd
Arginina	Arg	R	1974,3	3,29	T
Fenilalanina	Phe	F	2001,57	3,34	Dd
Triptofano	Trp	W	2011,00	3,35	Dd
Prolina	Pro	P	2039,48	3,40	M
Histidina	His	H	2058,54	3,43	Dd
Prolina	Pro	P	2075,4	3,46	M
Triptofano	Trp	W	2121,87	3,54	Dd
Glicina	Gly	G	2165,24	3,61	S
Treonina	Thr	T	2185,58	3,64	D
Valina	Val	V	2197,54	3,66	D
Isoleucina	Ile	I	2234,33	3,72	D
Leucina	Leu	L	2273,35	3,79	M
Tirosina	Tyr	Y	2275,78	3,79	Dd
Arginina	Arg	R	2291,92	3,82	T
Lisina	Lys	K	2298,24	3,83	T
Alanina	Ala	A	2302,31	3,84	Q
Aspartato	Asp	D	2340,16	3,90	Dd
Metionina	Met	M	2348,35	3,91	Dd
Asparagina	Asn	N	2397,69	4,00	Dd
Serina	Ser	S	2411,8	4,02	M
Fenilalanina	Phe	F	2428,24	4,05	Dd
Triptofano	Trp	W	2467,84	4,11	Dd
Prolina	Pro	P	2506,32	4,18	Dd
Cisteina	Cys	C	2547,87	4,25	Dd
Treonina	Thr	T	2582,27	4,30	M
Tirosina	Tyr	Y	4166,01	6,94	D
Tirosina	Tyr	Y	4343,68	7,24	D
Triptofano	Trp	W	4347,05	7,25	T
Triptofano	Trp	W	4397,36	7,33	T
Triptofano	Trp	W	4420,18	7,37	S
Fenilalanina	Phe	F	4424,64	7,37	D
Fenilalanina	Phe	F	4452,56	7,42	T
Histidina	His	H	4466,93	7,44	S
Fenilalanina	Phe	F	4483,72	7,47	T
Triptofano	Trp	W	4551,46	7,59	D
Triptofano	Trp	W	4667,29	7,78	D
Histidina	His	H	5231,19	8,72	S

FONTE: Autoria própria.

APÊNDICE D – Tabela com os valores dos coeficientes difusão dos metabólitos

Tabela 9 - Tabela contendo os valores dos coeficientes de Difusão observados inicial e final dos aminoácidos presentes nas Figuras 33 e 34, respectivamente.

Metabólito	D_{obs. inicial} ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	D_{obs. final} ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
Valina	7,06	4,04
Serina	8,41	5,07
Arginina	6,31	4,80
Glutamato	7,01	4,35
Fenilalanina	5,99	4,44
Histidina	6,29	4,75
Alanina	8,02	4,91
Isoleucina	7,05	5,04
Leucina	6,54	4,43
Lisina	6,31	4,41
Metionina	6,94	4,83
Prolina	9,92	5,39
Glicina	9,91	6,12
Glutamina	7,16	4,91
Cisteína		
Treonina	7,31	5,04
Asparagina	8,28	4,91
Aspartato	9,36	3,72
Tirosina	5,68	4,29
Triptofano	5,41	4,25
Citrato	6,14	3,32

FONTE: Autoria própria.

APÊNDICE E – Gráficos contendo a variação dos coeficientes de difusão de cada metabólito após cada adição de Eu^{3+} .

Figura 51 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Valina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 52 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Serina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 53 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Arginina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 54 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Glutamato após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 55 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Fenilalanina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 56 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Histidina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 57 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Alanina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 58 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Isoleucina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 59 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Leucina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 60 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Lisina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 61 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Metionina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 62 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Prolina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 63 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Glicina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 64 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Glutamina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 65 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Treonina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 66 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Asparagina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 67 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Aspartato após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 68 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão da Tirosina após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

Figura 69 – Variação dos valores dos coeficientes de difusão do Citrato após adições de solução contendo Eu^{3+} .

FONTE: Autoria própria.

ANEXO A – Tabela contendo os termos traduzidos até o momento pela Comissão de Nomenclatura e Tradução da AU-REMN.

Termo	Tradução recomendada	Outras traduções aceitas
Singlet	Simpleto	
Doublet	Dupleto	
Triplet	Tripleto	
Quartet	Quarteto	Quadrupleto
Quintet	Quinteto	Quintupleto
Sextet	Sexteto	
Septet	Septeto	
Octet	Octeto	
Multiplet	Multipleto	
Low frequency	Baixa frequência	
High frequency	Alta frequência	
Chemical shift	Deslocamento químico	
Shielding/ deshielding	Blindagem/ desblindagem	
Folding	Rebatimento	
Background gradient	Gradiente de fundo	
Radiation damping	Dissipação de radiação	
Spin-lattice relaxation time in the rotating frame	Tempo de relaxação spin-rede no sistema de coordenadas rotatória	
Optimum contact time	Tempo de contato ótimo	
Relaxation	Relaxação	
Delay	Tempo de espera	
^1H NMR	RMN de hidrogênio ou RMN de ^1H	
^{13}C NMR	RMN de carbono-13 ou RMN de ^{13}C	
Delayed contact time	Mantê-lo em inglês, seguido da explicação pertinente à técnica	
Dipolar dephasing	Defasamento dipolar	
FID	Decaimento livre de indução	
Broadband decoupled spectrum	Espectro com desacoplamento em banda larga	
Phase factor	Fator de fase	

Off-resonance	Fora de ressonância	
NOE enhancement	Aumento da intensidade do sinal pelo efeito Overhauser	Intensificação de/do sinal pelo efeito Overhauser
Two-dimensional	Bidimensional	
Purging pulse	Pulso de purga	
Relayed coherence transfer spectroscopy	Espectroscopia por transferência consecutiva de coerência	
Signal averaging	Promediação do sinal	
Tumbling correlation time	Tempo de correlação reorientacional	
Shimming	Mantê-lo em inglês, seguido da explicação pertinente	
Lock	Mantê-lo em inglês, seguido da explicação pertinente	
Zero-filling	Preenchimento com zeros	
Probe	Sonda	
Spin-tickling	Titilação de spins	Cócegas de spins
Eddy currents	Corrente de Foucault	
2D NMR	RMN bidimensional	RMN em duas dimensões ou RMN 2D
NOE	Efeito Overhauser nuclear	Efeito de Overhauser nuclear
Window function	Função de apodização	
Relaxivity	Relaxividade	
Spin lock	Trava de spin	Travamento de spins

FONTE: auremn.org/TERMOS_TRADUZIDOS.pdf acessado em 28/06/19.