

Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos
Departamento de Física e Informática

*Novas metodologias de Ressonância Magnética
Nuclear para o Estudo da Dinâmica Lenta em
Materiais Orgânicos no Estado Sólido: Aplicações
em Polímeros e Proteínas*

ou

Eduardo Ribeiro de Azevêdo

USP/IFSC/SBI



8-2-001421

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. Para obtenção do título de Doutor em Ciências "Física Básica".

Orientador:
Prof. Dr. Tito José Bonagamba

São Carlos - São Paulo
2001

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

deAzevedo, Eduardo Ribeiro

Novas Metodologias de Ressonância Magnética Nuclear para o Estudo da Dinâmica Lenta em Materiais Orgânicos no Estado Sólido: Aplicações em Polímeros e Proteínas.--São Carlos, 2001.

202p.

Tese (Doutorado)--Instituto de Física de São Carlos, 2001

Orientador: Prof. Dr. Tito José Bonagamba

1.Ressonância Magnética Nuclear. 2.Polímeros.
I. Título.



**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO
DE *EDUARDO RIBEIRO DE AZEVEDO*, APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO, EM 30-11-2001.**

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. TITO JOSÉ BONAGAMBA (Orientador e Presidente) – IFSC / USP

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF – FFCLRP / USP

Prof. Dr. SAID RAHNAMAYE RABBANI – IF/USP

Prof. Dr. ROBERTO MENDONÇA FARIA – IFSC / USP

Prof. Dra. MARIA CRISTINA TERPILE – IFSC/USP

À minha esposa, Vanusa Alves de
Sousa e aos meu pais, Miguel Batista
de Azevêdo e Graziela Ribeiro de
Azevêdo.

Agradecimentos

À Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, pela oportunidade de estar vivo, aprendendo através de novas experiências e reparando os erros que outrora cometi.

Ao meu amigo e orientador Prof. Tito José Bonagamba, pela orientação, ensinamentos, idéias, discussões, confiança, atenção e amizade sempre dispensados, mesmo que em muitos momentos eu não os tenha merecido.

Ao amigo Fábio Becker Guedes, pelas valiosas discussões, amizade, sugestões e ensinamentos de vida que sempre transmitiu.

Ao Prof. Klaus Schmidt-Rohr por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelas valiosas discussões, ideias e proposições, sem as quais este trabalho não teria tido o mesmo sucesso.

À Profa. Mei Hong pela confiança depositada em minha pessoa e por todos os ensinamentos transmitidos em RMN de proteínas.

Ao Prof. Horácio Panepucci, pela amizade, ensinamentos transmitidos e por permitir sem restrições que eu seguisse o caminho que desejava.

Aos Professores do grupo de RMN do IFSC, Cláudio José Magon, Alberto Tannús, José Pedro Donoso, Maria Cristina Terrile, José Schneider, pelas discussões e pelo tratamento sempre gentil e amigo dispensado.

Ao membros da banca pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Roberto Mendonça Faria, pelos ensinamentos didáticos, oportunidades e confiança.

Aos Professores com os quais cursei disciplinas no IFSC, Lidério C. Ioriatti Jr., Rogério Trajano, Tito J. Bonagamba, Roberto Nicolau Onody, José Eduardo Castellano e José Carlos Egues.

À minha esposa Vanusa Alves de Sousa, pelo amor, amizade e compreensão sempre tão marcantes, que fazem dela o meu porto seguro. Minhas sinceras desculpas pelos momentos de ausência.

Ao Dr. Edson Luiz G. Vidotto, pela amizade, ensinamentos transmitido na área de Instrumentação e Física de RMN e pelo incansável trabalho que tornou possível a realização de muitos dos experimentos apresentados nesta tese.

Ao Dr. Mateus J. Martins, pela ajuda com os problemas computacionais.

Aos técnicos do grupo de RMN, João Gomes, Odir Canevarollo e Carlos Gazziro, pelo excelente convívio e valiosa ajuda.

Ao Dr. Detlef Reichert, pela amizade, ensinamentos, disposição e ajuda que tornaram o trabalho com as ormolitas um dos pontos fortes desta tese.

Ao Dr. Karin Dahmouche pelo rápido e eficiente trabalho na preparação das ormolitas.

Ao Dr. Patrick Judenstein pelas entusiásticas discussões acerca do trabalho com as ormolitas.

Ao meu pai, Miguel Batista de Azevêdo, aos meus irmãos, Paulo Roberto, Claudia e Luciano, às minhas cunhadas, Iraci e Sandra, aos meus sogros, Alfredo e Iracema, e aos meus sobrinhos, Danilo, Marcus Vinícius e Victor.

A amiga Maria do Rosário Zucchi, pela amizade e apoio.

Aos amigos da terra abençoada do Recife, Paulo Roberto de Araújo Campos e Viviane Moraes, pela amizade e excelente convívio durante esses anos.

Aos companheiros do Laboratório de Espectroscopia de Alta Resolução, Gerson Mantovani, Isabela Rodrigues de Souza, Marcelo Alves de Souza (que embora do IFUSP já é membro da família), André B. Baptista e os ex-LEAR: Nilson Mello, Jair C.C.Freitas, Paulo H. de Sousa, Marcus Giotto, Ednalva Vidoto e Marcos A. Silva.

Aos companheiros do Grupo de RMN, Rogério (cujo único defeito é ser flamenguista), Bernd, Rodrigo, Caio, Cássio, Bloise, Zé Fernando, Fábio Bonk, Claudia Bonardi, Fernando, João, Lucian, Leandro, Rômulo.

Aos companheiros no *Dept. of Polymer Science em Engineering* – UMASS - Amherst, Wei-Guo, Doug, Matt, Dan, Jin-Dong, Mikail(tavarish), Kay, Gabi, por todas as entusiásticas discussões e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos e conterrâneos do IFSC, Josmary, Nara, Luciara, Cristiane, Renato, João Vitor, Roberto, Queite, Sauli, Solemar.

Aos amigos do IFSC, Luiz Ramos, Serginho, Vivaldo, Marcelinho, Gustavo, Antonio Sérgio, Neemias, Henrique.

À família Bonagamba, Janice, pela ajuda com a revisão de português deste trabalho, Julia e Vitória, pela excelente convivência em Amherst e em São Carlos. .

À Rosana da Cantina, pelos cafezinhos e cinco quilos adquiridos.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para este trabalho e que por um lapso de memória esqueci de mencionar.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	xx
Capítulo 1 - Aspectos Básicos das Técnicas Modernas de Ressonância	
Magnética Nuclear	01
1.1 - Dependência da frequência de RMN com a orientação dos segmentos moleculares e padrões de pó	01
1.1.1 - <i>O Hamiltoniano de spin nuclear e a frequência de RMN.....</i>	01
1.1.2 - <i>Espectros com padrão de pó.....</i>	09
1.2 - Desacoplamento Heteronuclear	10
1.3 - Polarização Cruzada.....	12
1.4 - Rotação da Amostra em Torno do Ângulo Mágico	15
1.5 - Supressão Total de Bandas Laterais (TOSS).....	22
1.6 - Aspectos Básicos dos experimentos de RMN bidimensional.....	25
1.7 - Considerações Finais	29
1.8 - Referências.....	30

Capítulo 2 - Técnicas de RMN de <i>Exchange</i> em Estado Sólido	31
2.1 - Movimento molecular em sólidos orgânicos e as técnicas de RMN de <i>Exchange</i>	31
2.2 - RMN de <i>Exchange</i> bidimensional (<i>Exchange</i> 2D).....	32
2.2.1 - Padrão de intensidade para o espectro de <i>Exchange</i> Bidimensional ($\eta = 0$).....	34
2.2.2 - Padrão de intensidade para o espectro de <i>Exchange</i> Bidimensional ($\eta \neq 0$).....	40
2.2.3 - Distribuição de ângulos de reorientação	42
2.2.4 - A matriz de <i>exchange</i> e o experimento <i>Exchange</i> 2D no regime de movimento intermediário	45
2.2.5 - Principais limitações da técnica de <i>Exchange</i> 2D	50
2.3 - Exchange Induced Sidebands (EIS).....	51
2.4 - Aspectos experimentais envolvidos no desenvolvimento e implementação de técnicas modernas de ressonância magnética nuclear.....	54
2.4.1 - <i>Exchange</i> bidimensional no domínio do tempo	54
2.4.2 - Métodos de Transformada de Fourier em Espectroscopia Bidimensional.....	56
2.4.3 - Eliminação de artefatos devido a imperfeições experimentais em RMN através de ciclagem de fases	59
2.4.3.1 - Artefatos de polarização direta	60
2.4.3.2 - Artefatos devido à imperfeições na detecção em fase e quadratura	60
2.4.3.3 - Artefatos devidos às imperfeições dos pulsos de 180° aplicados individualmente	62
2.4.3.4 - Artefatos devidos às imperfeições nos pulsos de 180° em seqüências envolvendo pulsos sucessivos	63
2.4.3.5 - Artefatos de T_1	64
2.5 - Conclusão.....	65

2.6 - Referências.....	66
Capítulo 3 - <i>Pure Exchange Solid State NMR (PUREX): uma nova técnica para a detecção e estudo de movimentos lentos em sólidos com supressão dos segmentos rígidos</i>	68
3.1 - PUREX bidimensional (PUREX 2D).....	69
3.1.1 - <i>Princípios básicos</i>	69
3.1.2 - <i>Seqüência de pulsos PUREX 2D com refocalização do deslocamento químico</i>	70
3.1.3 - <i>Seqüência de pulsos PUREX 2D sem refocalização do deslocamento químico</i>	74
3.1.4 - <i>Ciclagem de fases na seqüência de pulsos PUREX 2D</i>	75
3.1.5 - <i>Função de modulação</i>	78
3.1.6 - <i>Sensibilidade do experimento PUREX 2D</i>	80
3.1.7 - <i>Modulação intrínseca versus multiplicação de dados</i>	81
3.2 - PUREX unidimensional (PUREX 1D).....	81
3.3 - A técnica PUREX EIS	82
3.4 - Informações sobre o movimento molecular obtidas à partir das técnicas PUREX.....	84
3.4.1 - <i>Escala de tempo do movimento molecular</i>	85
3.4.2 - <i>Fração de sítios móveis e números de sítios não equivalentes</i>	87
3.4.3 - <i>Geometria do movimento molecular</i>	88
3.5 - O experimento PUREX 1D no regime de movimento intermediário	89
3.5.1 - <i>Tempo de correlação único</i>	89
3.5.2 - <i>Distribuição de tempos de correlação</i>	93
3.6 - Intensidade PUREX 1D como função da temperatura	95
3.6.1 - <i>Regime de movimento lento</i>	95
3.6.2 - <i>Regime de movimento intermediário</i>	98

3.7 - Conclusão.....	99
3.8 - Referências.....	100
Capítulo 4 - <i>Centerband Only Detection of Exchange (CODEX):</i>	
Um método eficiente para análise da dinâmica lenta de sólidos.....	101
4.1 - RMN de <i>Exchange</i> sob Rotação da amostra em torno do ângulo mágico e sincronização com a frequência de rotação.....	101
4.2 - Apresentação do experimento CODEX.....	103
4.2.1 - <i>Reintrodução da Anisotropia de Deslocamento Químico sob MAS</i>	103
4.2.2 - <i>Princípio e seqüência de pulsos CODEX</i>	105
4.2.3 - <i>Ciclagem de fases utilizada no experimento CODEX</i>	110
4.2.4 - <i>Fator de modulação no experimento CODEX:</i>	
<i>Análise usando o tensor diferença escalado</i>	111
4.2.4.1 – <i>Tensor diferença para interações uniaxiais ($\eta = 0$)</i>	112
4.2.4.2 – <i>Tensor diferença no caso de $\eta \neq 0$</i>	113
4.2.5 - <i>Amplitude do movimento utilizando CODEX</i>	114
4.2.6 - <i>Distribuição de ângulos de Reorientação</i>	116
4.2.7 - <i>Independência com a velocidade de rotação</i>	117
4.2.8 - <i>Determinação dos parâmetros de deslocamento químico</i> <i>utilizando CODEX</i>	118
4.2.9 - <i>Experimento CODEX utilizando-se a seqüência de supressão</i> <i>de bandas laterais (TOSS)</i>	121
4.2.10 - <i>Outras informações que podem ser obtidas</i> <i>através da técnica CODEX</i>	123
4.2.11 - <i>Faixa de tempos de correlação acessíveis por CODEX</i> <i>e limitações do experimento</i>	123
4.3 - Variações do Experimento CODEX.....	125
4.3.1 - <i>CODEX de quatro períodos (4t-CODEX)</i>	125

5.3.2.2 - Determinação do tempo de correlação, fração móvel e número de sítios acessíveis ao movimento molecular	161
5.3.2.3 - Determinação da amplitude do movimento molecular utilizando CODEX.....	163
5.3.2.4 - Determinação dos valores principais do deslocamento químico utilizando a técnica CODEX com ciclo de fases modificado (CSACODEX).....	165
5.3.2.5 - CODEX como filtro dinâmico	166
5.3.2.6 - CODEX de quatro períodos (4t-CODEX) aplicado ao PMMA	167
5.4 - Conclusão.....	169
5.5 - Referências.....	169
Capítulo 6 - Resultados Experimentais II: Estudo de movimentos lentos em nanocompostos orgânico-inorgânicos e em hidrogéis protéicos por RMN de Exchange.....	171
6.1 - Estudo da dinâmica das cadeias poliméricas em torno da transição vítrea em nanocompostos siloxano/(polietileno glicol) por RMN de Exchange em ^{13}C	171
6.1.1 - Materiais e Métodos	172
6.1.1.1 - Descrição das amostras	172
6.1.1.2 - Parâmetros Experimentais	173
6.1.2 - Análise da Forma e Largura de Linha de ^{13}C	174
6.1.3 - Escala de tempo do movimento molecular lento utilizando RMN de Exchange	178
6.1.4 - Amplitude do movimento molecular lento utilizando RMN de Exchange.....	179
6.2 - Estrutura dinâmica de um hidrogel protéico:	

Um estudo por RMN de Estado Sólido	183
6.2.1 - <i>Materiais e Métodos</i>	185
6.2.1.1 - <i>Preparação das amostras para estudos de RMN</i>	185
6.2.1.2 - <i>Parâmetros Experimentais</i>	186
6.2.2 - <i>Identificação das linhas no espectro de ¹³C</i>	187
6.2.3 - <i>Movimentos Rápidos nos domínios centrais do hidrogel ACA</i>	188
6.2.4 - <i>Movimentos lentos nos zíperes de leucina</i>	191
6.2.5 - <i>Amplitude e mecanismo dos movimentos lentos</i>	193
6.2.5.1 - <i>Amplitude do movimento</i>	194
6.2.5.2 - <i>Considerações sobre a geometria do movimento</i>	195
6.3 - <i>Conclusão</i>	197
6.4 - <i>Referências</i>	198
Conclusões e Perspectivas	200
Apêndice I - Métodos Básicos de Simulação Utilizados nos Experimentos PUREX e CODEX	
Apêndice II - Versão dos Programas para Simulação das Curvas CODEX e Espectros PUREX 2D na Linguagem FORTRAN	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Definição dos ângulos de Euler α, β e γ que determinam a orientação relativa entre o Referencial de Laboratório (RL) (X_{LF}, Y_{LF}, Z_{LF}) e o SEP ($X_{SEP}, Y_{SEP}, Z_{SEP}$).....	06
Figura 1.2 – Espectros típicos de pó para as interações de Deslocamento Químico com simetrias	10
Figura 1.3 – Efeito do desacoplamento heteronuclear.....	11
Figura 1.4 – Experimento de Polarização Cruzada.....	13
Figura 1.5 – Níveis de energia	15
Figura 1.6 – Rotação da amostra na presença de um campo magnético externo, \vec{B}_0 , sob a condição de ângulo mágico.....	17
Figura 1.7 – Conjunto de bandas laterais espaçadas pela frequência de rotação da amostra, ω_r	22
Figura 1.8 – Seqüência de pulsos utilizada na aquisição do espectro TOSS.....	23
Figura 1.9 – Esquema geral de seqüências para espectroscopia bidimensional	26
Figura 1.10 – Esquema geral de detecção do espectro Correlação heteronuclear bidimensional (<i>2D Local Field Separation</i>).....	29
Figura 2.1 – Princípio do experimento de RMN de <i>Exchange</i> para a detecção de movimentos moleculares lentos.....	32
Figura 2.2 – Representação esquemática da evolução do espectro <i>Exchange</i> 2D como função de t_m para o processo de reorientação entre dois sítios descrito no texto.....	34
Figura 2.3 – Representação esquemática da relação entre a reorientação molecular e as singularidades de uma linha do espectro <i>Exchange</i> 2D	36
Figura 2.4 – Espectro de RMN de <i>Exchange</i> para um caso de excitação seletiva.....	38
Figura 2.5 – Simulações dos espectros de ^{13}C <i>Exchange</i> 2D.....	39
Figura 2.6 – Transformação entre os vários SEP's da amostra para o SEP unificado	42

Figura 2.7 – Simulação de espectros <i>Exchange</i> 2D para vários modelos de dinâmica molecular.....	44
Figura 2.8 – Seqüência de pulsos utilizada no experimento EIS	52
Figura 2.9 – Seqüência de pulsos utilizada na aquisição do espectro <i>Exchange</i> 2D via deslocamento químico	56
Figura 2.10 – Esquema básico de um receptor heterodino	61
Figura 2.11 – Esquema utilizado para a eliminação dos artefatos de T_1	65
Figura 3.1 – Seqüência de pulsos utilizada no do experimento PUREX 2D com refocalização da anisotropia de deslocamento químico	73
Figura 3.2 – Seqüência de pulsos utilizada no experimento PUREX 2D com aquisição sem refocalização da anisotropia de deslocamento químico	74
Figura 3.3 – Funções de modulação do experimento PUREX obtidas somando N funções de modulação com $\tau_1 = 250\mu s$	79
Figura 3.4 – Funções de peso Gaussiana (linha sólida), exponencial (linha pontilhada) e constante (linha tracejada) utilizadas para simular a redução das oscilações da função de modulação PUREX.....	80
Figura 3.5 – Seqüências de pulsos utilizada para aquisição do espectro PUREX 1D	82
Figura 3.6 – Seqüência de pulsos utilizadas para aquisição do espectro PUREX EIS	83
Figura 3.7 – Simulações da intensidade $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m para um processo dinâmico envolvendo dois sítios não equivalentes, para os tempos de correlação indicados	86
Figura 3.8 – Simulações da intensidade $E(t_m, \delta\tau)$ vs $\delta\tau$ para um processo dinâmico envolvendo dois sítios magneticamente não equivalentes, com ângulo de reorientação β_R	88
Figura 3.9 – Curvas típicas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m para um processo de reorientação entre dois sítios no regime de movimento intermediário	91
Figura 3.10 – Curvas típicas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. τ para um processo de reorientação entre dois sítios no regime de movimento intermediário	92
Figura 3.11 – Distribuições de tempos de correlação típicas.....	94

Figura 3.12 – Curvas simuladas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para um processo de reorientação de dois sítios com uma distribuição de tempos de correlação com largura indicada na Figura.....	95
Figura 3.13 – Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T calculadas como função dos parâmetros de Arrhenius E_a e τ_0	97
Figura 3.14 – Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T	99
Figura 4.1 – Experimento básico de MAS-Exchange com sincronização com a fase de rotação	102
Figura 4.2 – Esquemas de reintrodução de interações anisotrópicas sob MAS.....	105
Figura 4.3 – Seqüência de pulsos utilizada no experimento CODEX	107
Figura 4.4 – Curvas da intensidade de $E(t_m, \delta Nt_r)$ com função de δNt_r para um processo envolvendo dois sítios magneticamente não equivalentes	116
Figura 4.5 – Curvas da intensidade de <i>exchange</i> , $E(t_m, \delta Nt_r)$, e distribuições de ângulos de reorientação, $R(\beta_R, t_m)$, para processos envolvendo modelos específicos de reorientação molecular	117
Figura 4.6 – Gráfico de S_{\sin}/S_0 versus Nt_r com variação dos parâmetros δ , η e ω_0	121
Figura 4.7 – Seqüência de pulsos utilizada no experimento 4t-CODEX, utilizada na determinação do número de sítios acessíveis ao movimento molecular	126
Figura 4.8 – Espectro de ^{15}N da proteína ubiquitina humana	130
Figura 4.9 – Seqüência de pulsos para o experimento ^{15}N -CODEX detectado via ^{13}C	132
Figura 5.1 – Estrutura molecular esquemática das amostras utilizadas.....	138
Figura 5.2 – Espectros PUREX 2D como função de τ para a amostra de DMS.....	140
Figura 5.3 – Espectros PUREX e <i>Exchange</i> 2D para a amostra de DMS	141
Figura 5.4 – Espectros PUREX 1D do polímero iPb1	142
Figura 5.5 – Espectros PUREX 2D do polímero semicristalino iPb1 a -23°C e $t_m = 300\text{ ms}$	144
Figura 5.6 – Espectros PUREX EIS em uma mistura de iPb1 (~90%) e DMS (~10%) à temperatura ambiente (20°C).....	146
Figura 5.7 – Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m para amostras de DMS, sPP e IPb1	147

Figura 5.8 – Espectros PUREX 2D a -20°C para o polímero semicristalino IPB1 e respectivas simulações baseadas no modelo de difusão reorientacional isotrópica	149
Figura 5.9 – Espectros PUREX 2D a 5°C para o polímero semicristalino sPP e respectivas simulações baseadas no modelo de difusão reorientacional isotrópica	150
Figura 5.10 – Espectros PUREX 2D para os polímeros atático (a) e sindiotático (b) poli(propileno) 5°C acima das respectivas transições vítreas.....	151
Figura 5.11 – Curva $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para a mostra de DMS.....	153
Figura 5.12 – Orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico do carbono do grupo carbonil no PMMA e diagrama esquemático das reorientações moleculares responsáveis pela relaxação β do PMMA.....	154
Figura 5.13 – Espectros de pó do polímero PMMA	156
Figura 5.14 – Curvas experimentais, $E(t_m, \delta\tau)$ para uma amostra policristalina de DMS.....	158
Figura 5.15 – Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T para o DMS.....	158
Figura 5.16 – Curva de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T para o DMS com simulação baseada na expressão 3.18.....	159
Figura 5.17 – Espectros CODEX do ácido malônico com abundância natural de ^{13}C adquirido com frequência de rotação, $\nu_r = 5,5 \text{ kHz}$	161
Figura 5.18 – Intensidade normalizada CODEX, $E(t_m, \delta N_{tr})$, como função de t_m	162
Figura 5.19 – Intensidade <i>pure-exchange</i> CODEX normalizada $E(t_m, \delta N_{tr})$ como função de $\delta N_{tr}/2\pi$ para o DMS a 15°C , $t_m = 75 \text{ ms}$, e $\nu_r = 5,5 \text{ kHz}$	163
Figura 5.20 – Intensidade $E(t_m, \delta N_{tr})$ como função de δN_{tr} . a) Símbolos cheios: grupos CH e CH_2 para a região cristalina no iPP, medidos a 90°C , $t_m = 1 \text{ s}$, $\nu_r = 4,5 \text{ kHz}$	165
Figura 5.21 – Determinação da anisotropia de deslocamento químico	166
Figura 5.22 – CODEX para a amostra de iPB1, forma I.....	167

Figura 5.23 – Medidas do número de sítios acessíveis ao movimento dos grupos COO no polímero PMMA a 20 °C e $\nu_r = 5.5$ kHz, utilizando a técnica 4-t CODEX.....	168
Figura 6.1 – Desenho esquemático da estrutura das ormolitas do tipo I e II com diferentes porcentagens de polímeros.....	173
Figura 6.2 – Largura e forma de linha com função da temperatura.....	175
Figura 6.3 – Orientações dos sítios acessíveis ao movimento molecular utilizadas nas simulações das formas de linha como função da temperatura para as ormolitas.....	177
Figura 6.4 – Curvas de $E(t_m \delta \tau_r)$ versus t_m para as amostras estudadas.....	179
Figura 6.5 – Amplitude do movimento estudada por RMN de <i>exchange</i> em amostras de ormolitas ligadas.....	181
Figura 6.6 – Amplitude do movimento estudada por RMN de <i>exchange</i> em amostras de ormolitas não ligadas.....	182
Figura 6.7 – Proteína ACA utilizada neste estudo.....	184
Figura 6.8 – Identificação do espectro de ^{13}C do hidrogel ACA enriquecido pelo método TEASE.....	188
Figura 6.9 – Espectros de ^{13}C para o hidrogel ACA utilizado no estudo da dinâmica na escala de tempo de μs	190
Figura 6.10 – Espectros obtidos com a técnica ^{15}N -CODEX- ^{13}C do hidrogel ACA...	192
Figura 6.11 – Dependência de $D(t_m, \delta N t_r)$ com o tempo de mistura para os resíduos de Ala, Glu e Ser.....	193
Figura 6.12 – Intensidades ^{15}N -CODEX- ^{13}C como função do tempo de evolução $N t_r$	194
Figura 6.13 – Curvas simuladas $\varepsilon(\delta N t_r, \beta_R)$ versus $\delta N t_r$ para vários ângulos de reorientação, β_R superpostas com os dados experimentais.....	195
Figura 6.14 – Distribuições de ângulos de reorientação para o modelo de Difusão Rotacional Isotrópica como função de t_m/τ_c	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Dependência da frequência de RMN com a orientação dos eixos principais dos tensores que representam algumas das interações importantes em sólidos orgânicos.....	09
Tabela 2.1 – Superciclos para a compensação de imperfeições em pulsos de 180°. As barras indicam as fases negativas	64
Tabela 2.2 – Ciclo de fases necessário para eliminação de artefatos no experimento <i>Exchange 2D</i>	65
Tabela 3.1 – Ciclagem de fases utilizada no experimento PUREX 2D necessário para a seqüência mostrada na Figura 3.1	76
Tabela 3.2 – Ciclagem de fases utilizada no experimento PUREX 2D necessário para a seqüência da Figura 3.2.....	77
Tabela 3.3 – Ciclagem de fases utilizada no experimento PUREX EIS	84
Tabela 4.1 – Ciclagem de fases utilizada no experimento CODEX adquirido com a seqüência de pulsos mostrada na figura 4.3.....	110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
PUREX – *Pure Exchange Solid-State NMR*
CODEX – *Centerband-Only Detection of Exchange*
MAS – *Magic Angle Spinning*
CP – *Cross Polarization*
TOSS – *Total Suppression of Spinning Sidebands*
RF – Radiofrequência
SEP – Sistemas de Eixos Principais
OTEI's – Operadores Tensoriais Esféricos Irredutíveis
S/R – Relação Sinal/Ruído
EIS – *Exchange Induced Sidebands*
DD – *Dipolar Decoupling*
ODESSA – *One-Dimensional Exchange Spectroscopy by Sideband Alternation*
FID – *Free Induction Decay*
TPPI – *Time-Proportional Phase Incrementation*
ADC – *Analogical Digital Converter*
CYCLOPS – *Cyclically Ordered Phase Switch*
CPMG – *Carr-Purcell-Meighboom -Gill*
REDOR – *Rotational Echo DDouble Resonance*
NOESY – *Nuclear Overhauser Spectroscopy*
CSA – Chemical Shifter Anisotropy
KWW – *Kohlrausch-Williams-Watt*
TEDOR – *Transferred-Echo Double-Resonance*
DMS – DiMetil Sulfona
iPB1 – Poli(1-Buteno) isotático
Tg – Transição Vítrea
aPP – Poli(Propileno) atático
sPP – Poli(Propileno) sindiotático

Lista de Siglas e Abreviaturas

DMTA – Análise Térmica Dinâmico-Mecânica

iPP – Poli(propileno) isotático

PMMA – Poli(metacrilato de metila)

AMM – Ácido Metil Malônico

PB – Poli(1-buteno)

PP – Poli(propileno)

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

RIS – Rotational Isomeric State Model

PEG – Poli(etileno glicol)

UNESP – Universidade Estadual Paulista

DWS – *Diffusing Wave Spectroscopy*

TEASE – *Ten Amino Acid Selective and Extensive*

CP MAS – *Cross Polarization Magic Angle Spinning*

LEAR – Laboratório de Espectroscopia de Alta Resolução

Resumo

RMN de *Exchange* em estado sólido é uma importante técnica utilizada na caracterização de processos dinâmicos em ciência dos materiais. Entretanto, a utilização desta técnica no estudo de materiais complexos tem sido limitada. Neste trabalho, serão propostas novas metodologias de RMN de *Exchange* em estado sólido, que permitem analisar eficientemente movimentos moleculares na escala de tempo de milissegundos. A técnica denominada *Pure Exchange Solid-State NMR* (PUREX), provê a supressão dos segmentos rígidos dos espectros de *exchange*, tornando possível observar os segmentos com mobilidade na escala de ms seletivamente. A técnica *Centerband-Only Detection of Exchange* (CODEX), permite a observação e caracterização de reorientações moleculares lentas com a maior sensibilidade e resolução disponíveis em RMN de estado sólido, através de espectros obtidos sob rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS). Utilizando essas técnicas as funções e tempos de correlação e a geometria de movimentos moleculares lentos podem ser determinadas diretamente, sem a necessidade da utilização de modelos que relacionem as grandezas medidas e as características do movimento molecular. A utilização dos métodos apresentados, permite a identificação e caracterização da dinâmica lenta em materiais complexos, tais como polímeros amorfos, semicristalinos e proteínas. Com objetivo inicial de demonstrar as técnicas, elas foram aplicadas para confirmar detalhes da dinâmica molecular em amostras modelo. Através destas técnicas foi possível confirmar a escala de tempo e os ângulos de reorientação envolvidos na dinâmica molecular de cristais orgânicos, Dimetil Sulfona (DMS), e também para revisitar processos de relaxação local em alguns polímeros, polimetacrilato de metila (PMMA) e isotático polipropileno (iPP). As metodologias foram também aplicadas no estudo da transição vítrea em polímeros semicristalinos, isotático poli(1-buteno) (iPB1) e sindiotático polipropileno, os quais não tinham sido ainda estudados por técnicas de RMN de *Exchange*, já que neste caso a maioria dos segmentos moleculares (porção cristalina do polímero) é rígida durante a transição vítrea. Utilizando os métodos CODEX e PUREX os movimentos lentos que ocorrem na região amorfa destes polímeros em temperaturas próximas as suas temperaturas de transição vítrea foram caracterizados. Um estudo dos movimentos lentos que ocorrem em torno das temperaturas de transição vítrea nas cadeias poliméricas de dois tipos de nanocompostos híbridos siloxano/(polietileno glicol) (ormolitas) também é apresentado. Heterogeneidades nos movimentos das cadeias

poliméricas associados com a interação PEG/siloxano foram diretamente observadas através de experimentos PUREX 1D de *Exchange* 2D. Evidências da presença de movimentos de grande e pequena amplitude foram observados para os dois tipos de híbridos. Os resultados revelam que a restrição do movimento das cadeias poliméricas pelas estruturas de siloxano depende tanto do comprimento da cadeia como da natureza das interações entre as fases orgânica e inorgânica do nanocomposto. Finalmente os resultados referentes a caracterização da dinâmica molecular rápida e lenta e sua relação com as propriedades estruturais de um hidrogel protéico são apresentados. Utilizando uma versão modificada da técnica CODEX, juntamente com experimentos de polarização direta, polarização cruzada e RMN de correlação 2D, foi possível não somente confirmar a estrutura e o modelo de formação propostos para o gel, mas também determinar a geometria e a escala de tempo dos movimentos lentos que ocorrem na região de hélice do hidrogel protéico em grandes detalhes. A demonstração teórica e experimental das técnicas e suas aplicações no estudo dessas importantes classes de materiais serão apresentadas.

Abstract

Solid-State Exchange NMR is an important method to characterize details of dynamic process in materials science. However, the application of these techniques to study complex materials has been limited. In this work new solid-state Exchange NMR techniques, which allows efficient analysis of molecular motions in the millisecond time scale, are presented. The **Pure Exchange Solid-State NMR (PUREX)** method provides the suppression of the rigid segments in standard exchange spectrum, making possible to observe the slow moving moieties selectively. The **Centerband-Only Detection of Exchange (CODEX)** technique allows observing and characterizing slow segmental reorientations with the highest available NMR sensitivity and site resolution, in a magic angle spinning (MAS) NMR spectrum. Correlation functions, correlation times and information about the motional amplitude and geometry can be directly obtained using the techniques, without any model assumption. These methods allowed identifying and characterizing slow dynamics in complex materials such as, semicrystalline and amorphous polymers and proteins. To demonstrated the proposed techniques they have been applied to confirm some kwn aspect of the slow dynamics of model samples. Using the methods it was possible o confirm the time scale and the reorientation angles involved in the molecular dynamics of organic crystals, Dimethyl Sulfone (DMS), and also to revisit some relaxation process in standard polymers, such as the beta relaxation of poly(methyl metacrylate) (PMMA) and the alfa relaxation in isotactic polypropylene (iPP). The time scale and the geometry of the molecular motions responsible by these relaxation process obtained using the PUREX and CODEX techniques are in excellent agreement with the data taken from the literature, confirming the reliability of the proposed methods. Moreover, the techniques were also applied to study the slow molecular motions involved in the glass transition of semicrystalline polymers, such as isotactic poly(1-butene) form I (iPB1) and syndiotactic Polypropylene (sPP). The glass transition of these polymers had not been studied using Exchange NMR methods because most of the molecular segments (crystalline portion of the polymers) are rigid during the glass transition. Using the PUREX and CODEX methods the slow molecular reorientations within the amorphous region of the polymers were

characterized for temperatures near its glass transition. A study of the slow motions occurring around the glass transition temperature in the polymer chains of two types of siloxane/(polyethylene glycol) nanocomposites (ormolites) is also presented. Motional heterogeneities associated with PEG/ siloxane interactions were directly observed in the ^{13}C 1D-PUREX and 2D exchange data. Evidences of both small and large angle amplitude motions were directly observed for both types of hybrids. The results revealed that the hindrance to the slow molecular motions of the polymer chains due to the siloxane structures depends on the chain length and the nature of the interaction between the organic and inorganic phases. Finally the results concerning the characterization of the fast and slow dynamics and its relationship with the structural properties of a protein hidrogel are presented. Using a modified version of the CODEX technique, together with standard direct polarization, cross polarization and 2D NMR correlation experiments, it was possible not only to confirm the proposed structure and the gel formation model, but also to characterize the geometry and the time scale of the slow motions in the helical domains of the protein hidrogel in great detail. The theoretical and experimental demonstration of all proposed methods and also its applications in these important classes of material will be present.

Introdução

A Dinâmica Molecular tem importantes efeitos nas propriedades mecânicas e de condução em polímeros, na atividade de proteínas, na estabilidade de fármacos, nas propriedades de transporte em zeólitas e no comportamento de materiais amorfos em temperaturas próximas à temperatura de transição vítrea. Dinâmica rápida (com taxas superiores a 10 kHz) pode ser caracterizada por experimentos de análise de largura de linha e técnicas de relaxação. Informações mais específicas são obtidas através de experimentos de RMN de *Exchange*, onde movimentos moleculares lentos (com taxas entre 0.1 Hz e 10 kHz) são observados em termos de mudanças na frequência de RMN, a qual reflete diretamente mudanças na orientação dos segmentos moleculares. Tempos de correlação e suas distribuições, memória reorientacional, existência de heterogeneidades dinâmicas e suas dimensões, podem ser caracterizados por RMN de *Exchange 1D, 2D, 3D e reduced-4D*.

Embora estas técnicas sejam largamente utilizadas, até o presente momento elas têm se limitado ao estudo de materiais com complexidade química relativamente baixa e aos casos onde a maioria dos segmentos moleculares se reorientam na escala de tempo do experimento. Neste trabalho serão propostas duas novas técnicas capazes de superar tais limitações: "*Pure Exchange Solid State NMR*" (PUREX) e "*Centerband-Only Detection of Exchange*" (CODEX). Na técnica PUREX, a contribuição dos segmentos rígidos ou com mobilidade fora da escala de frequência de (Hz - kHz) é eliminada do espectro de *Exchange*, permitindo que os segmentos móveis nessa faixa dinâmica sejam observados direta e seletivamente. Isto permite a análise da escala de tempo, amplitude e geometria do movimento molecular em casos onde não era possível até então utilizar as técnicas de *Exchange* convencionais, tais como na elucidação dos movimentos lentos que ocorrem próximos à temperatura de transição vítrea em polímeros semicristalinos e no estudo da dinâmica local devida à relaxação β em alguns polímeros amorfos. Na técnica CODEX, a caracterização da escala de tempo, amplitude e geometria dos movimentos é feita através de espectros unidimensionais adquiridos com rotação rápida da amostra em torno do ângulo mágico (MAS), o que permite o estudo de materiais de alta complexidade química, já que as linhas relativas a diferentes grupos químicos aparecem resolvidas no espectro. Empregadas em conjunto, as técnicas PUREX e CODEX podem ser utilizadas na caracterização da dinâmica molecular de vários sistemas até então inacessíveis por técnicas

de RMN de *Exchange*. Isto será demonstrado em vários polímeros, nanocompostos orgânico-inorgânicos e proteínas, onde a aplicação das técnicas mencionadas proporcionou a obtenção de várias informações dinâmico-estruturais. Além disso, variações das técnicas propostas, as quais permitem a obtenção de novas informações sobre a dinâmica lenta de materiais orgânicos serão também apresentadas.

Portanto, três contribuições principais devem ser destacadas nesta tese. A primeira se refere à apresentação e discussão de várias características fundamentais de experimentos modernos de RMN, enfatizando as metodologias de RMN de *Exchange*, onde foi dado maior ênfase naqueles aspectos importantes no entendimento, implementação e utilização das mesmas. Uma compilação destes estudos será apresentada nos capítulos 1 e 2. O segundo está relacionado com as técnicas propostas, que representam inovações importantes, permitindo que as metodologias de *exchange* possam ser aplicadas em sistemas com maior complexidade química e morfológica. A descrição das técnicas PUREX e CODEX e os principais aspectos que envolvem a compreensão e utilização das mesmas estão apresentados nos capítulos 3 e 4. Finalmente, o terceiro ponto a ser mencionado diz respeito as aplicações apresentadas. A aplicação da técnica PUREX e CODEX em polímeros amorfos e semicristalinos, além de prover um meio de demonstração dos experimentos, proporcionou o entendimento de vários detalhes importantes da dinâmica molecular local ou global desses materiais. Foram também realizados experimentos em sistemas mais complexos, tais como nanocompostos e hidrogéis protéicos, onde várias características dinâmico-estruturais foram estudadas. Estes resultados são apresentados nos capítulos 5 e 6.

Capítulo 1 - Aspectos Básicos das Técnicas Modernas de Ressonância Magnética Nuclear

Neste capítulo alguns princípios e técnicas básicas de RMN serão discutidas, enfatizando aquelas que são importantes para o entendimento das técnicas propostas neste trabalho. Inicialmente, será feita uma breve descrição das interações de spin nuclear com o objetivo de demonstrar a dependência do espectro de RMN com os parâmetros moleculares. Então, serão discutidas resumidamente algumas técnicas convencionais de RMN, como polarização cruzada (CP, do termo em inglês *Cross Polarization*), desacoplamento (DD), do termo em inglês *Dipolar Decoupling*), rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS, do termo em inglês *Magic Angle Spinning*), supressão total de bandas laterais (TOSS, do termo em inglês *Total Suppression of Spinning Sidebands*). Serão também apresentados os princípios gerais dos experimentos de RMN bidimensional

1.1 - Dependência da frequência de RMN com a orientação dos segmentos moleculares e espectros de pó.

Em linhas gerais, a metodologia de RMN aplicada à sistemas diamagnéticos tem como objetivo extrair informações sobre as propriedades dinâmicas e estruturais dos materiais. Para isso, é preciso conhecer a relação existente entre as principais interações de spin nuclear e os parâmetros moleculares, em particular a dependência da frequência de precessão dos spins com a orientação dos segmentos moleculares. Para tratar as interações de spin nuclear de uma maneira mais quantitativa é importante que se introduza inicialmente os Hamiltonianos que descrevem tais interações. Somente uma discussão resumida será apresentada aqui, maiores detalhes podem ser encontrados na referências¹⁻³.

1.1.1 - O Hamiltoniano de spin nuclear e a frequência de RMN.

O Hamiltoniano de spin nuclear (que leva em conta somente as interações que têm influência nos estados de spin do núcleo) consiste de termos que estão relacionados com as condições experimentais empregadas e as propriedades magnéticas e elétricas da amostra. Alguns destes termos determinam a intensidade do sinal, enquanto outros definem a posição e a forma da linha espectral, dependendo do estado físico da amostra.

O Hamiltoniano de spin nuclear total pode ser decomposto em uma soma de várias parcelas correspondentes às diversas interações de spin nuclear a que o núcleo pode estar submetido. Levando em conta somente as interações mais comuns em RMN de estado sólido, o Hamiltoniano de spin nuclear pode ser escrito como:

$$H = H_Z + H_{RF} + H_{DQ} + H_D + H_Q \quad (1.1)$$

Onde H_Z , H_{RF} , H_{DQ} , H_D e H_Q , representam, respectivamente, os hamiltonianos correspondentes as interações Zeeman Nuclear, interação do sistema de spins com campos de radiofrequência, interação de deslocamento químico, interação dipolar magnética e interação quadrupolar elétrica. Para discutir a dependência da frequência de precessão dos spins com a orientação dos segmentos moleculares, inicialmente serão feitas algumas considerações sobre as interações de spin mais importantes envolvidas na técnica de RMN, as quais são:

- *Interação Zeeman Nuclear:* tem origem no acoplamento do momento magnético nuclear $\vec{\mu}^i = \gamma \hbar \vec{I}^i$ com o campo magnético estático externo $\vec{B}_0 = B_0 \hat{z}$. O Hamiltoniano que representa essa interação pode ser escrito como:

$$H_Z = -\sum_i \vec{\mu}^i \cdot \vec{B}_0 = -\sum_i \hbar (\gamma^i B_0) I_z^i = -\hbar \sum_i \omega_0^i I_z^i \quad (1.2)$$

onde γ^i é o fator giromagnético e $\omega_0^i = \gamma^i B_0$ é a frequência angular de precessão do i -ésimo núcleo sob a ação da interação Zeeman, denominada frequência de Larmor do i -ésimo núcleo. A soma sobre i cobre todos os núcleos da amostra.

- *Interação com o campo de radiofrequência (RF):* tem origem no acoplamento do spin nuclear com o campo magnético oscilante aplicado perpendicularmente a \vec{B}_0 e com frequência da ordem de ω_0 , que se encontra na faixa de radiofrequência,

$$\vec{B}_{RF} = [B_1(t) \cos(\omega t + \varphi)] \hat{x}$$

$$H_{RF} = -\sum_i \vec{\mu}^i \cdot \vec{B}_{RF} = -\hbar \cos(\omega t - \varphi) \sum_i \gamma^i B_1(t) I_x^i \quad (1.3)$$

onde $B_1(t)$, ω e $\varphi(t)$ são, respectivamente, a amplitude, a frequência e a fase do campo de RF. A interação dos spins com o campo de RF permite a manipulação das interações de spin nuclear internas, isto é, que não dependem de campos externos. Isto permite que a evolução do sistema de spins, sob a presença das interações, possa ser controlada convenientemente de modo a se obter a informação estrutural ou dinâmica desejada. De fato, a facilidade de manipulação das interações de spin nuclear internas pela

aplicação de campos de RF com amplitudes, duração e fases adequadas, representa um dos maiores avanços da RMN moderna.

- *Interação de deslocamento químico*: tem origem no acoplamento entre o spin nuclear e a nuvem de elétrons que o envolve, podendo ser representada pelo seguinte Hamiltoniano:

$$H_{DQ} = -\sum_i \vec{\mu}^i \cdot (\vec{\sigma}^i \cdot \vec{B}_0) = -\gamma^i \hbar \sum_i \vec{I}^i \cdot \vec{\sigma}^i \cdot \vec{B}_0 \quad (1.4)$$

onde $\vec{\sigma}^i$ representa um tensor simétrico de segunda ordem, denominado tensor de deslocamento químico que caracteriza a blindagem do i -ésimo sítio nuclear por sua nuvem eletrônica. \vec{I}^i , \vec{B}_0 e γ^i representam, respectivamente, o operador de spin nuclear, o vetor campo magnético e o fator giromagnético nuclear.

- *Interação dipolar magnética*: tem origem no acoplamento dipolar magnético entre os momentos magnéticos dos spins nucleares. O Hamiltoniano que representa essa interação pode ser escrito como:

$$H_D = \sum_{i < K} \left(-2\gamma^i \gamma^k \hbar \right) \sum_{\alpha, \beta=1}^3 I_\alpha^i D_{\alpha\beta} I_\beta^k \quad (1.5)$$

onde $\tilde{D}_{\alpha\beta}$ novamente representa um tensor simétrico de segunda ordem, porém de traço nulo, denominado tensor de acoplamento dipolar magnético.

- *Interação quadrupolar elétrica*: tem origem no acoplamento entre o momento de quadrupolo nuclear e o gradiente de campo elétrico do sítio do núcleo, sendo representado pelo Hamiltoniano:

$$H_Q = \sum_i \frac{e Q^i}{6 \hbar I^i (2 I^i - 1)} \vec{I}^i \cdot \vec{\nabla}^i \cdot \vec{I}^i \quad (1.6)$$

onde Q^i representa o momento de quadrupolo nuclear do núcleo i e $\vec{\nabla}^i$ é um tensor simétrico de segunda ordem que representa a segunda derivada do potencial elétrico no sítio i .

Os dois primeiros termos, H_Z e H_{RF} , dependem de fatores externos, por isso, são denominados Hamiltonianos externos, enquanto que os demais, H_{DQ} , H_D e H_Q são denominados Hamiltonianos internos.

A interação Zeeman usualmente domina o comportamento do sistema de spins nucleares, mas ela própria não contém informação estrutural. Para aplicações espectroscópicas da RMN, os campos locais a que os spins são submetidos são de

importância fundamental. Em materiais sólidos as interações de deslocamento químico, dipolar magnética e quadrupolar elétrica são extremamente sensíveis à mudanças nas orientações dos sítios moleculares dos núcleos em questão, tornando a metodologia de RMN uma das mais poderosas para elucidação da estrutura e dinâmica de sistemas em estado sólido.

Os Hamiltonianos descritos acima possuem a mesma estrutura matemática e podem ser representados por uma fórmula geral dada por:

$$H_\lambda = C^\lambda \sum_{\alpha,\beta=1}^3 I_\alpha^\lambda R_{\alpha\beta}^\lambda A_\beta^\lambda = C^\lambda \sum_{\alpha,\beta=1}^3 R_{\alpha\beta}^\lambda T_{\beta\alpha}^\lambda \quad (1.7)$$

onde λ define o tipo de interação, C^λ é uma constante que depende de constantes fundamentais (\hbar, e) e das propriedades do núcleo atômico (I, γ, Q). $T_{\alpha\beta}^\lambda$ contém a parte de spin de H_λ enquanto que $R_{\alpha\beta}^\lambda$ contém os fatores geométricos da interação, isto é, levam em conta anisotropia espacial de cada interação.

O tensor formado pelos elementos $R_{\alpha\beta}^\lambda$, de um modo geral, pode possuir todos os termos não nulos. No entanto, ele é sempre diagonalizável, isto é, sempre existirá um sistema de coordenadas onde somente os elementos $R_{xx}^\lambda, R_{yy}^\lambda, R_{zz}^\lambda$ serão diferentes de zero. Este sistema de eixos é denominado Sistemas de Eixos Principais (SEP). Geralmente, os termos diagonais de $R_{\alpha\beta}^\lambda$ no SEP ($R_{xx}^\lambda, R_{yy}^\lambda, R_{zz}^\lambda$) são descritos em termos do parâmetro de anisotropia δ , do parâmetro de simetria η e do traço do tensor τ , dados respectivamente por:

$$\delta = R_{zz}^\lambda - \tau^\lambda; \quad \eta^\lambda = \frac{R_{yy}^\lambda - R_{xx}^\lambda}{\delta^\lambda}; \quad \tau^\lambda = \frac{1}{3}(R_{xx}^\lambda + R_{yy}^\lambda + R_{zz}^\lambda) \quad (1.8)$$

O traço do tensor τ^λ é nulo para as interações quadrupolar elétrica e dipolar magnética, porém, não o é para a interação de deslocamento químico, sendo denominado deslocamento químico isotrópico (σ_{iso}). Devido à simetria axial em torno do vetor internuclear, o parâmetro η^λ é sempre nulo para a interação dipolar, enquanto que para as outras interações η^λ depende da simetria do sítio molecular em que o spin se encontra.

Como a reorientação molecular envolverá rotações dos operadores dos quais os Hamiltonianos internos são constituídos, o comportamento destes Hamiltonianos sob rotações será mais facilmente estudado se os mesmos estiverem escritos em termos de

Operadores Tensoriais Esféricos Irredutíveis (OTEI's), denotados por $T_{l,m}^\lambda$ ou $R_{l,m}^\lambda$ 1,2,4.

Escrito em termos dos OTEI's o Hamiltoniano geral H_λ será dado por:

$$H_\lambda = C^\lambda \sum_l \sum_{m=-l}^l (-1)^m R_{l,-m}^\lambda T_{l,m}^\lambda \quad (1.9)$$

onde $R_{l,-m}^\lambda$ provém de $R_{\alpha\beta}^\lambda$ e $T_{l,m}^\lambda$ de $T_{\alpha\beta}^\lambda$.

É importante que na expressão acima todas as quantidades tensoriais estejam expressas em um sistema de coordenadas único, que deve ser, a princípio, o sistema de eixos de laboratório, definido pela direção do campo magnético externo \vec{B}_0 . Os $T_{l,m}^\lambda$ já estão naturalmente expressos neste sistema de referência, pois \vec{I}_α^λ e \vec{A}_β^λ são definidos no sistema de laboratório. Por outro lado, os $R_{l,-m}^\lambda$ estão geralmente expressos no SEP. Deste modo, para expressar H_λ no sistema de laboratório deve-se encontrar a transformação de coordenadas que relacione o mesmo com o SEP. No caso dos OTEI's, essa transformação pode ser escrita em termos dos componentes de $R_{l,-m}^\lambda$ no SEP ($\rho_{l,m}^\lambda$) e das matrizes de rotação de Wigner, $\varphi_{m',m}^l(\alpha, \beta, \gamma)$ através da seguinte expressão:

$$R_{l,m}^\lambda = \sum_{m'=-l}^l \varphi_{m',m}^l(\alpha, \beta, \gamma) \rho_{l,m}^\lambda \quad (1.10)$$

onde α , β e γ são os ângulos de Euler entre o sistema referencial de laboratório (RL) e o SEP.

Em campos magnéticos de alguns Tesla as intensidades dos campos locais sentidos pelos núcleos são pequenas em relação ao campo magnético principal \vec{B}_0 . Deste modo, o deslocamento dos níveis de energia Zeeman devido às interações internas podem ser tratados como uma perturbação de primeira ordem no hamiltoniano $H_0 = \omega_0 I_z$. Como os deslocamentos nos níveis de energia em primeira ordem são dados por $E_m^{(1)} = \langle m | H_\lambda | m \rangle$, somente os termos de H_λ que são diagonais em $|m\rangle$ devem ser mantidos. Esta parte secular dos hamiltonianos internos corresponde apenas àqueles componentes que comutam com I_z . Após este processo de truncagem, os hamiltonianos internos podem ser escritos de forma geral como:

$$H_\lambda^{\text{sec}} = C^\lambda (T_{0,0}^\lambda R_{0,0}^\lambda + T_{2,0}^\lambda R_{2,0}^\lambda) \quad (1.11)$$

ou⁵.

$$H_{\lambda}^{\text{sec}} = -\sqrt{3}C^{\lambda}\tau^{\lambda}T_{0,0}^{\lambda} + \sqrt{\frac{3}{2}}C^{\lambda}\delta^{\lambda}T_{2,0}^{\lambda} \left[\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{1}{2}\eta^{\lambda}\sin^2\beta\cos 2\gamma \right] \quad (1.12)$$

onde novamente α , β e γ são os ângulos de Euler que relacionam os sistemas RL e o SEP.

Na expressão 1.12 a dependência angular se resume aos ângulos β e γ , os quais representam os ângulos polares do campo magnético principal, \vec{B}_0 , no Sistema de eixos principais da interação, tal como mostrado na figura 1.1. Desta forma, daqui em diante esses ângulos serão renomeados para θ e ϕ , respectivamente, e os ângulos α , β e γ serão utilizados para representar outras transformações de coordenadas que envolvem os três ângulos de Euler. Com esta nova notação, o Hamiltoniano secular das interações de spin nuclear internas pode ser escrito como:

$$H_{\lambda}^{\text{sec}} = -\sqrt{3}C^{\lambda}\tau^{\lambda}T_{0,0}^{\lambda} + \sqrt{\frac{3}{2}}C^{\lambda}\delta^{\lambda}T_{2,0}^{\lambda} \left[\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} + \frac{1}{2}\eta^{\lambda}\sin^2\theta\cos 2\phi \right] \quad (1.13)$$

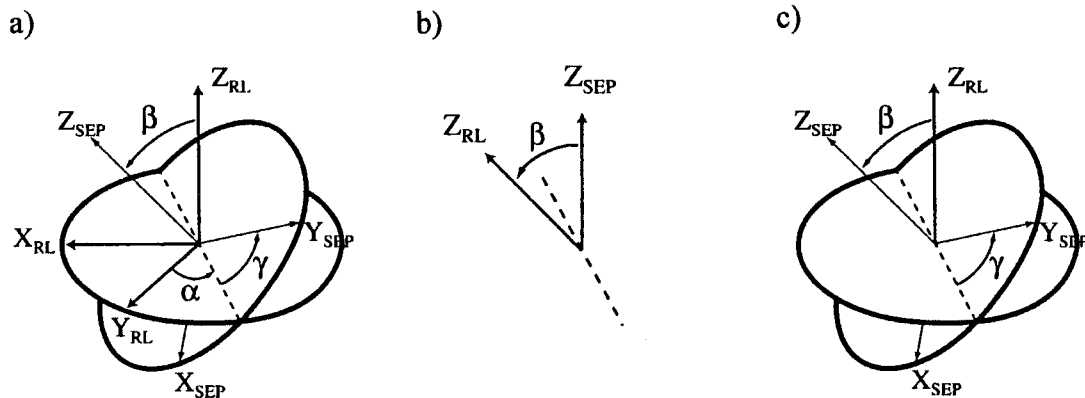


Figura 1.1 - Definição dos ângulos de Euler α , β e γ que determinam a orientação relativa entre o Referencial de Laboratório (RL) (X_{RL} , Y_{RL} , Z_{RL}) e o SEP (X_{SEP} , Y_{SEP} , Z_{SEP}). Os ângulos γ e β são as coordenadas polares do eixo z do RL (campo magnético) no SEP.

Em experimentos de RMN de ^{13}C em sólidos orgânicos, duas interações de spin nuclear são dominantes. A interação dipolar heteronuclear, ^1H - ^{13}C , e a interação de deslocamento químico para os núcleos ^{13}C . De fato, geralmente a interação dipolar ^1H - ^{13}C é suprimida utilizando-se uma técnica especial que será discutida adiante de modo que o espectro de ^{13}C resultante é determinado exclusivamente pela interação de deslocamento químico. Assim sendo, torna-se necessário tecer maiores considerações sobre essa interação e seus efeitos nos espectros observados.

Como já mencionado, a origem física da interação de deslocamento químico está na blindagem do núcleo pelas correntes eletrônicas que surgem devido a aplicação do campo magnético externo. Essas correntes produzem campos magnéticos na região do núcleo que podem contribuir para a diminuição (contribuição paramagnética) ou para o aumento (contribuição diamagnética) do campo local sentido pelo núcleo. Isto obviamente provoca uma mudança na frequência de ressonância para aquele núcleo, já que a mesma é definida essencialmente pelo campo local a que o núcleo está submetido. A direção desses campos magnéticos locais induzidos dependerá tanto da orientação do campo aplicado como da anisotropia da nuvem eletrônica onde as correntes surgem. Por exemplo, se o campo magnético principal é aplicado na direção z as correntes eletrônicas podem induzir campos locais nas três direções x,y e z, isto é a constante de blindagem, σ , para um campo principal aplicado na direção z terá valores diferentes nas três direções, σ_{zx} , σ_{zy} , σ_{zz} . Daí vê-se a necessidade de se representar essas constantes de blindagem por um tensor de segunda ordem, já que para cada direção do campo magnético aplicado podem haver três constantes distintas. Um aspecto interessante deste tensor, que representa a anisotropia do deslocamento químico, é que uma mudança na orientação do segmento molecular em que o núcleo de ^{13}C se encontra implica numa mudança no valor dos componentes individuais do tensor. Isto, pode ser melhor representado se o tensor é escrito no seu sistema de eixos principais, onde uma mudança na orientação do segmento molecular se reflete diretamente na mudança na orientação do SEP do tensor. Essas características tornam a interação de deslocamento químico para o estudo da dinâmica molecular, pois uma mudança na orientação do sistema de eixos principais do tensor pode ser diretamente associada a uma reorientação do segmento molecular. No entanto, para o entendimento dos experimentos de RMN em sólidos é fundamental perceber que as contribuições anisotrópicas da interação de deslocamento não refletem a orientação dos spins nucleares, mas sim a orientação dos segmentos moleculares onde esses spins estão localizados e para os quais as orientações dos eixos principais dos tensores são fixas.

Para quantificar os efeitos da interação de deslocamento químico no espectro de RMN é necessário explicitar o Hamiltoniano secular dessa interação. Utilizando os valores de C^λ , $T_{0,0}^\lambda$, $T_{2,0}^\lambda$ para o deslocamento químico^{1,4,6} o Hamiltoniano secular para esta interação pode ser escrito como:

$$H_{DQ}^{sec} = \gamma B_0 I_z \sigma_{iso} + \delta \gamma B_0 I_z \left[\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} + \frac{1}{2} \eta^\lambda \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \quad (1.14)$$

$$\text{Onde, } \sigma_{iso} = \frac{\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz}}{3} \quad ; \quad \delta = \sigma_{zz} - \sigma_{iso} \quad ; \quad \eta = \frac{\sigma_{yy} - \sigma_{xx}}{\sigma_{iso}} \quad (1.15)$$

O parâmetros de deslocamento químico que são dimensionais, σ_{xx} , σ_{yy} , σ_{zz} e σ_{iso} são geralmente expressos em partes por milhão da frequência de Larmor, unidade que é comumente denominada ppm. Considerando-se um Hamiltoniano composto pelo Hamiltoniano Zeeman e de deslocamento químico, tem-se:

$$H = H_z + H_{DQ}^{sec} = \gamma B_0 I_z + \gamma B_0 I_z \sigma_{iso} + \gamma B_0 \delta I_z \left[\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} + \frac{1}{2} \eta^\lambda \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \quad (1.16)$$

Os níveis de energia para spin $1/2$ e as correspondentes frequências de precessão podem ser calculadas facilmente a partir dos autovalores deste Hamiltoniano, resultando em:

$$\omega(\theta, \phi) = \omega_0 + \omega_{iso} + \delta \frac{1}{2} \left[3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \quad (1.17)$$

onde ω_{iso} representa a parte isotrópica da interação de deslocamento químico. Geralmente, em experimentos de RMN a análise da evolução dos spins é feita em um sistema de coordenadas que gira com frequência ω_0 (sistema de coordenadas girante). Neste sistema de coordenadas a frequência de precessão sob a ação do deslocamento químico é dada por:

$$\omega_{DQ}(\theta, \phi) = \omega_{iso} + \delta \frac{1}{2} \left[3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \quad (1.17a)$$

O segundo termo da equação 1.17a mostra que a frequência de RMN (frequência de precessão dos spins) sob a ação da interação de deslocamento químico depende da orientação do campo magnético no sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico. Como a orientação do SEP muda com a orientação do segmento molecular, pode-se dizer que a frequência de RMN reflete diretamente a orientação relativa entre campo magnético e segmento molecular. Portanto, cada segmento molecular específico contribui para uma linha específica com uma frequência de RMN $\omega(\theta, \phi)$.

Obviamente, para as demais interações internas o mesmo tratamento pode ser realizado. Na Tabela 1.1 está mostrada a dependência da frequência de RMN com a orientação dos eixos principais dos tensores em alguns casos importantes para sólidos orgânicos.

Tabela 1.1 - Dependência da frequência de ressonância com a orientação dos eixos principais dos tensores que representam algumas das interações importantes em sólidos orgânicos.

<i>Interação</i>	<i>Frequência de RMN</i>
Quadrupolar Elétrica para ^2H : $I=1$ e $\eta_Q \approx 0$	$\omega_Q(\theta, \phi) = \pm \delta_Q \frac{1}{2} [3 \cos^2 \theta - 1 + \eta_Q \sin^2 \theta \cos 2\phi]$ onde: $\delta_Q = \frac{3eQeq}{4\hbar}$ e $I=1$
Dipolar Heteronuclear	$\omega_D^{\text{hetero}}(\theta, \phi) = \pm \delta_D^{\text{hetero}} \frac{1}{2} [3 \cos^2 \theta - 1]$ onde: $\delta_D^{\text{hetero}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \hbar \frac{\gamma_1 \gamma_2}{r_{1,2}^3}$
Dipolar Homonuclear	$\omega_D^{\text{homo}}(\theta, \phi) = \pm \delta_D^{\text{homo}} \frac{1}{2} [3 \cos^2 \theta - 1]$ onde: $\delta_D^{\text{homo}} = \frac{3}{2} \frac{\mu_0}{4\pi} \hbar \frac{\gamma^2}{r_{1,2}^3}$

1.1.2 - Espectros com padrão de pó.

Em um material policristalino ou completamente amorfo, os segmentos moleculares estão orientados aleatoriamente de modo que todas as orientações θ e ϕ descritas na seção anterior são possíveis. O espectro de RMN neste caso é uma superposição das linhas correspondentes às várias orientações, dando origem a um padrão bem definido denominado espectro de pó, cuja forma é determinada pelos parâmetros tensoriais δ e η da interação. A probabilidade dP de que o campo magnético \vec{B}_0 esteja orientado dentro de um ângulo sólido $d\Omega$ é dada por⁷:

$$dP = \frac{d\Omega}{4\pi} = \frac{\sin\theta d\theta d\phi}{4\pi} = \frac{d(-\cos\theta)d\phi}{4\pi} \quad (1.18)$$

Cada orientação (θ, ϕ) contribui com o mesmo fator para a intensidade espectral. Deste modo, a intensidade total será dada por este fator pesado pela probabilidade de que uma dada orientação (θ, ϕ) ocorra, isto é:

$$S[\omega(\theta, \phi)]dp = \frac{1}{4\pi} S[\omega(\theta, \phi)]d \cos\theta d\phi \quad (1.19)$$

O espectro de pó será obtido integrando-se a expressão 1.19 sob θ e ϕ dentro dos seguintes intervalos: $0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$ e $0^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$:

$$\langle S \rangle = \int S(\omega(\theta, \phi)) d\Omega = \int_0^{180^\circ} \int_0^{180^\circ} S(\omega(\theta, \phi)) d(-\cos\theta) d\phi \quad (1.20)$$

Deste modo, daqui em diante o símbolo $\langle \rangle$ indicará a média sob todas as orientações moleculares possíveis. Na Figura 1.2 estão mostrados alguns espectros de pó típicos. Uma característica importante desses espectros é a presença de singularidades (pontos de máxima amplitude). Na expressão 1.20 a intensidade espectral é dada basicamente pelo ângulo sólido $d\Omega$. Uma vez que este ângulo sólido é máximo quando o ângulo θ for igual a 90° , a posição dos máximos de intensidade do espectro será dada por: $\omega(90^\circ, \phi) = \omega_{\text{iso}} - \delta \frac{1}{2} [1 - \overline{\eta \cos 2\phi}] = \omega_{\text{iso}} - \frac{\delta}{2} [1 - \eta]$. No capítulo 2 será visto que no caso de espectros de *Exchange* bidimensional essas singularidades determinam algumas das principais características dos espectros bidimensionais em amostras estáticas.

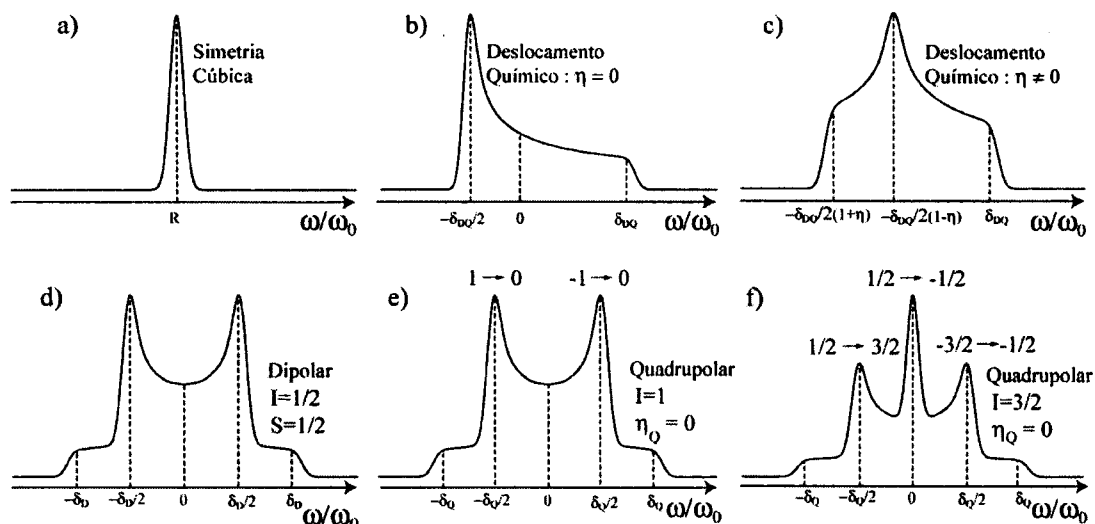


Figura 1.2 - Espectros típicos de pó para as interações de Deslocamento Químico com simetrias: a) cúbica, b) $\eta = 0$, c) $\eta \neq 0$, d) Dipolar Magnética entre dois núcleos de spin $1/2$ e distância r fixa. e) Quadrupolar Elétrica com simetria axial de um núcleo com e) spin 1 e f) spin $3/2$.

1.2 - Desacoplamento Heteronuclear.

Para núcleos com spin $1/2$, onde a interação quadrupolar não se manifesta, as interações de spin nuclear relevantes são o deslocamento químico e as interações dipolares homo e hetero nucleares. No caso específico de núcleos de ^{13}C , cuja abundância natural é

de ~1%, a interação dipolar homonuclear pode ser desprezada, restando o deslocamento químico e a interação dipolar heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Geralmente, a interação dipolar heteronuclear predomina no espectro, tornando-se extremamente difícil observar o deslocamento químico. Esta superposição torna praticamente impossível a observação de padrões de pó de deslocamento químico para ^{13}C quando interação dipolar $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ está presente. No entanto, existem técnicas tradicionais capazes de eliminar ou reduzir drasticamente os efeitos da interação dipolar $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Dentre essas técnicas, a mais correntemente utilizada é o método de desacoplamento heteronuclear por irradiação contínua, o qual será descrito simplificadaamente a seguir.

Para apresentar esta técnica, suponha uma amostra constituída de um grupo I de núcleos abundantes, por exemplo ^1H , e um grupo S de núcleos raros, por exemplo ^{13}C , ^{29}Si ou ^{15}N . Para o estudo de núcleos do grupo S, a eliminação do alargamento de linha dipolar magnético heteronuclear devido aos núcleos do grupo I é relativamente simples, e foi proposta por Sarles e Cotts⁸ em 1958. O desacoplamento é feito através da redução do campo magnético efetivo produzido pelo dipolo magnético do núcleo I ao longo da direção z, a partir da aplicação de um campo de radiofrequência (RF) contínuo em frequência igual a frequência de Larmor do grupo I. Isso faz com que o momento de dipolo magnético do núcleo I, μ_I , permaneçam em alta rotação. Deste modo, o valor médio do campo dipolar magnético na posição do núcleo S na direção z, \vec{B}_{dip} , torna-se nulo, Figura 1.3, e a interação dipolar magnética I-S não afeta o espectro de RMN do núcleo S.

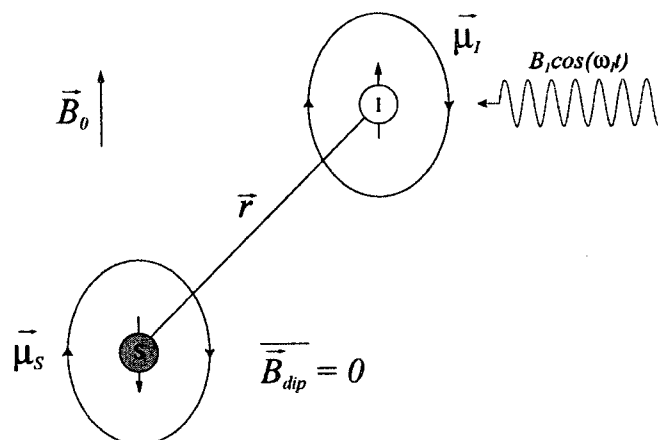


Figura 1.3 - Efeito do desacoplamento heteronuclear. Devido à rápida rotação do momento magnético do núcleo I, o seu campo dipolar local, \vec{B}_{dip} , na direção do campo \vec{B}_0 (direção z), é em média reduzido a zero no sítio do núcleo S.

O desacoplamento heteronuclear é feito durante a aquisição do sinal do núcleo S, e não introduz grandes problemas experimentais, pois as frequências de ressonância dos dois grupos de núcleos são muito distintas.

1.3 - Polarização Cruzada (CP).

A forma de excitação mais simples do sistema de spins em ressonância magnética nuclear, consiste na aplicação de um pulso de radiofrequência com duração tal que a magnetização nuclear inicialmente ao longo do eixo z seja transferida para o plano transversal onde é detectada. Como o ângulo de rotação da magnetização neste caso é de $\pi/2$ aplicada diretamente ao núcleo que se deseja observar, este esquema de excitação é conhecido como polarização direta (DP) por um pulso de $\pi/2$. Após essa perturbação (a magnetização nuclear retorna ao equilíbrio, ao longo do campo externo \vec{B}_0 , depois de um tempo característico denominado tempo de relaxação longitudinal, T_1). Para medir o sinal de RMN com a máxima magnetização nuclear em experimentos repetitivos, é necessário esperar aproximadamente $5T_1$ entre cada aquisição. O extraordinário sucesso da técnica de RMN por Transformada de Fourier se deve à obtenção de sinais de RMN, tipicamente de baixa intensidade, com alta relação sinal/ruído (S/R). Isto se deve ao fato de que, nesta técnica, o sinal de RMN é frequentemente produzido, medido e promediado, resultando em uma grande melhora na S/R. Logo, quanto menor for T_1 maior será o ganho na S/R para um dado tempo fixo de medida.

Para superar os problemas relativos à baixa sensibilidade dos núcleos raros do grupo S e seus longos tempos de relaxação longitudinais, foi proposto por Pines et al.⁹ em 1973, o método de dupla ressonância denominado *Polarização Cruzada*. A idéia básica deste método é explorar a interação dipolar magnética existente entre os núcleos do grupo I e S, de modo a permitir uma transferência da polarização entre ambos. Desta técnica, resulta um sinal de maior intensidade para os núcleos do grupo S e os experimentos podem ser realizados com um tempo de repetição definido pelo T_1 do núcleo do grupo I, o qual em geral é menor que o apresentado pelo núcleo do grupo S.

Existem algumas explicações para o experimento de polarização cruzada sendo cada uma delas mais adequadas dependendo do objetivo da discussão^{6,9}. Neste caso iremos discutir somente alguns dos conceitos básicos envolvidos no experimento de

polarização cruzada, utilizando uma descrição baseada no conceito de temperatura de spin para um sistema de dois níveis (spin 1/2). A razão das populações dos níveis de energia superior, N_- , e inferior, N_+ , é definida pela distribuição de Boltzmann por $N_-/N_+ = \exp(-\gamma B_0/KT_s)$, onde T_s é conhecida como temperatura de spin de um dado núcleo. A partir da distribuição de Boltzmann, observa-se que uma menor temperatura de spin implica em uma maior polarização dos momentos magnéticos (maior diferença de população entre os níveis) e vice-versa⁹.

Considere, como exemplo, um sistema composto de núcleos raros ^{13}C (grupo S) e ^1H (grupo I), ambos com spin 1/2, fatores giromagnéticos γ_C e γ_H , respectivamente, e acoplados entre si via interação dipolar magnética. Para aumentar a polarização dos núcleos de ^{13}C deve-se de alguma forma abaixar a temperatura de spin deste sistema.

O resfriamento de um sistema de spins requer transferência de energia do mesmo para o meio envolvente denominado rede. Este processo caracteriza o fenômeno de relaxação longitudinal. Como indicado pelas flechas na Figura 1.4, o tempo de relaxação para o sistema de ^{13}C , T_{1C} , é muito maior que o do sistema de ^1H , T_{1H} . Porém, este resfriamento envolve a temperatura da amostra ou rede.

Um outro modo de se resfriar o sistema de spins raros consiste em colocar o sistema de ^{13}C , em geral com alta temperatura de spin T_{SC} , em contato com o sistema de ^1H , previamente colocado em um estado de baixa temperatura de spin, T_{SH} . O sistema de ^1H representa um grande reservatório de “polarização” como indicado pelo grande quadrado na Figura 1.4. Deste contato resulta um grande decréscimo na T_{SC} e, conseqüentemente, um ligeiro acréscimo na T_{SH} devido a grande capacidade térmica do sistema de ^1H . Com o decréscimo em T_{SC} ocorre um considerável ganho de polarização no sistema de ^{13}C e uma desprezível perda de polarização no sistema de ^1H .

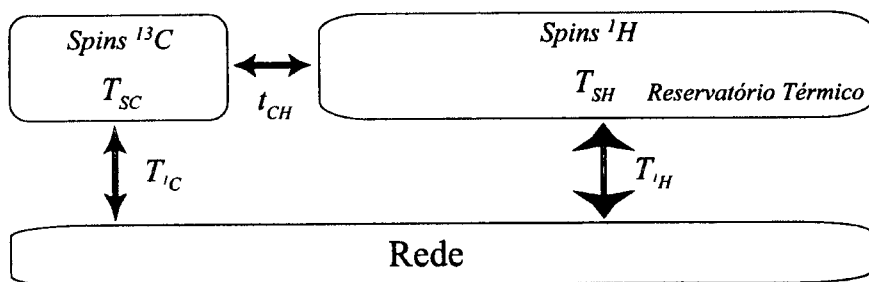
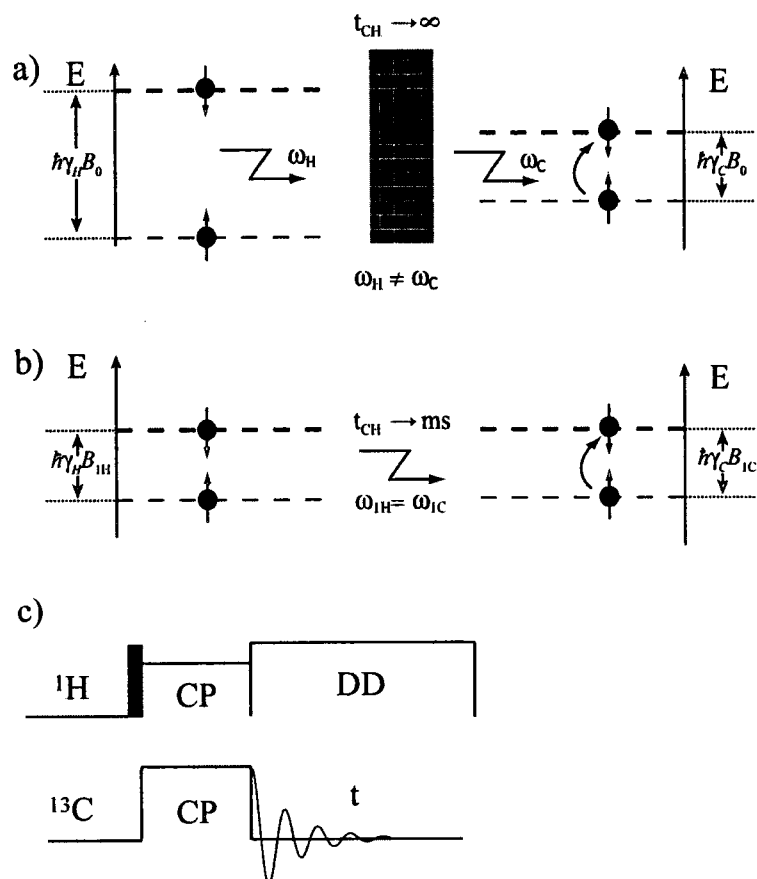


Figura 1.4 - Experimento de Polarização Cruzada⁹.

Este processo de transferência de polarização é denominado Polarização Cruzada e tem uma duração determinada pelo tempo de Relaxação Cruzada t_{CH} , o qual, em condições especiais de contato térmico, é bem curto (pelo menos duas ordens de magnitude) quando comparado com os tempos de relaxação T_{1C} e T_{1H} . Como a magnetização final de ^{13}C depende da magnetização de ^1H , o tempo de repetição do experimento será determinado pelo T_{1H} , permitindo um número muito maior de dados acumulados em um dado intervalo de tempo fixo. Além disso, a transferência de polarização pode induzir um aumento máximo na intensidade do sinal de RMN do ^{13}C de um fator $\gamma_H/\gamma_C \approx 4^9$ relativo à magnetização que seria obtida através da polarização da magnetização ao longo de \vec{B}_0 e posterior pulso $\pi/2$. Este contato térmico é estabelecido no chamado sistema girante de coordenadas se a condição de Hartmann-Hahn, $\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C}$, é satisfeita, quando os campos de RF para ^1H e ^{13}C , \vec{B}_{1H} e \vec{B}_{1C} respectivamente, são aplicados simultaneamente.

O sistema girante de coordenadas é um sistema que gira com a frequência de ressonância de cada núcleo em particular em torno de \vec{B}_0 . Em tal sistema, a frequência de precessão de Larmor γB_0 é eliminada, o que significa o desaparecimento de \vec{B}_0 . O único campo magnético que age sobre cada spin é o campo de RF estático, neste referencial, e tem o mesmo papel de \vec{B}_0 no sistema de referência do laboratório. Neste caso, pode-se observar que a condição de Hartmann-Hahn significa que os dois núcleos terão a mesma frequência de Larmor em seus respectivos sistemas girantes de coordenadas, $\omega_{1H} = \omega_{1C}$. Portanto, torna-se possível a troca de energia entre os núcleos de ^1H e ^{13}C , já que ambos se comportam como núcleos idênticos nesta situação, Figura 1.5. Na figura 1.5 também está mostrado o diagrama esquemático da seqüência de pulsos. Neste diagrama os pulsos de RF aplicados aos dois núcleos são indicados pelos retângulos, sendo os pulsos de 90° indicados em preto. Como pode ser observado, o experimento de polarização cruzada com desacoplamento heteronuclear (CPDEC) consiste basicamente na aplicação de um pulso de 90° aos núcleos abundantes, no caso ^1H , seguida da aplicação dos pulsos de RF nos dois grupos de núcleos, pulsos de contato que satisfazem a condição de Hartmann-Hahn, e finalmente a aquisição do sinal dos núcleos raros, ^{13}C , sob irradiação contínua em ressonância com os núcleo abundantes para realizar o desacoplamento heteronuclear. A partir de agora este tipo de esquema será amplamente utilizados na representação das seqüências de pulsos que serão discutidas e propostas neste trabalho.



1.4 - Rotação da Amostra em Torno do Ângulo Mágico.

Como já discutido anteriormente, em RMN de estado sólido a frequência de precessão dos spins depende da orientação dos sítios moleculares em que os mesmos se encontram com relação ao campo magnético \vec{B}_0 , fazendo com que os espectros obtidos sejam do tipo mostrado na Figura 1.2. Embora tais espectros possam trazer informações importantes sobre a estrutura e dinâmica das amostras estudadas, em sistemas mais complexos, por exemplo em polímeros com vários sítios químicos de ¹³C não equivalentes, o espectro de pó de deslocamento químico obtido é constituído pela superposição de vários espectros, cada um correspondendo a um dado sítio. Com esta superposição torna-se muito difícil separar as contribuições individuais de cada sítio para o espectro. Em 1959, Andrew et al¹⁰ e Lowe¹¹ propuseram, independentemente, um método tal que a interação dipolar

magnética hetero ou homonuclear poderia ser, a princípio, eliminada pela rotação da amostra em torno do Ângulo Mágico (MAS do inglês *Magic Angle Spinning*). Em 1962, Andrew e Eades¹² mostraram que também era possível eliminar outras interações anisotrópicas com MAS.

Pode-se notar um fator comum presente nas três interações de spin nuclear discutidas acima. Tanto a interação dipolar magnética quanto o deslocamento químico e a perturbação de primeira ordem devida à interação quadrupolar elétrica dependem do fator $(3\cos^2\theta - 1)$. Para cada uma delas, θ representa o ângulo entre \vec{B}_0 e o eixo z do sistema de eixos principais do tensor que representa cada uma destas interações.

Inicialmente será feita uma descrição mais qualitativa deste método, tomando como exemplo uma amostra onde ocorre a interação dipolar magnética hetero ou homonuclear. O campo dipolar magnético local produzido pelo núcleo 1 no sítio do núcleo 2 ao longo da direção z, \vec{B}_{dip} , é diretamente proporcional ao termo $(3\cos^2\theta - 1)$, o qual descreve a anisotropia da interação dipolar magnética. Se este termo fosse nulo, os campos locais dipolares se anulariam. Igualando-o a zero, encontra-se que $\theta = 54,74^\circ$, onde tal ângulo é conhecido como *ângulo mágico*, θ_m .

Sabe-se que, na prática, todos os ângulos θ podem ocorrer em um sólido policristalino e, conseqüentemente, largas linhas de ressonância surgirão. Deve-se então, de algum modo, levar todos estes ângulos em média para a condição de ângulo mágico. Isto pode ser conseguido girando a amostra em torno de um eixo que está inclinado de um ângulo θ_m com relação ao campo magnético externo \vec{B}_0 , Figura 1.6a.

O efeito da rotação da amostra em torno do ângulo mágico pode ser visto na Figura 1.6b, onde os diferentes vetores internucleares com distintos θ_{ij} são girados sobre cones diversos mas, devido à alta rotação, suas direções permanecem em média ao longo do eixo de rotação, o qual é comum a todos. Desta forma obtém-se $\langle\theta_{ij}\rangle = \theta_m$ e a interação dipolar se anula.

O mesmo raciocínio pode ser desenvolvido para as interações deslocamento químico anisotrópico e quadrupolar elétrica de primeira ordem.

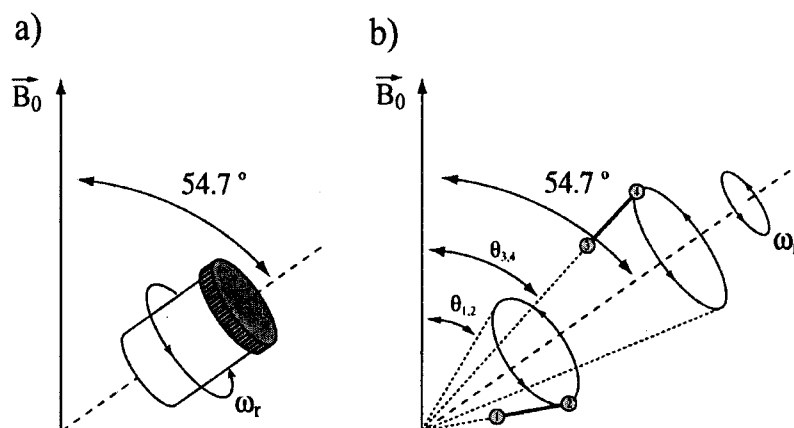


Figura 1.6 - a) Rotação da amostra na presença de um campo magnético externo, \vec{B}_0 , sob a condição de ângulo mágico. b) Pela rotação em torno do ângulo mágico o valor médio de todos os ângulos torna-se igual a 54.74° , $\langle\theta_{12}\rangle = \langle\theta_{34}\rangle = 54.74^\circ$ sendo que $\theta_{12} \neq \theta_{34}$.

A frequência de rotação deve ser no mínimo comparável às larguras de linha obtidas com a amostra estática. Como o \vec{B}_{dip} produzido pela interação dipolar magnética é diretamente proporcional ao momento magnético $\vec{\mu}$, e este por sua vez é proporcional ao fator giromagnético γ , os núcleos que apresentarem altos valores de γ (^1H , ^{19}F) implicarão em altas frequências de rotação para a aplicação de MAS.

Quando o núcleo sob medida pertence ao grupo S, a largura de linha é predominantemente devida à interação dipolar magnética deste com algum núcleo abundante do grupo I. Neste caso, pode-se utilizar o desacoplamento heteronuclear para estreitar a linha e utilizar, simultaneamente, a rotação em ângulo mágico com uma frequência bem mais baixa.

Uma vez que o deslocamento químico é dependente do valor do fator giromagnético e da intensidade do campo externo \vec{B}_0 , as frequências de rotação são proporcionais aos mesmos e, geralmente, tecnicamente acessíveis para vários núcleos atômicos e campos magnéticos disponíveis.

No caso da interação quadrupolar elétrica, os alargamentos das linhas satélites são geralmente muito intensos (dezenas de kHz) tornando quase que impossível girar a amostra em frequências tão altas.

Nos casos em que se necessita girar a amostra com frequências da ordem da realidade instrumental (~ 30 KHz), a resolução final do espectro, que pode ser comparável à

dos líquidos, depende somente de quanto o ajuste do ângulo mágico é preciso. Um erro de 1° no ajuste do ângulo mágico implica em aumento de 2% na largura de linha⁵.

Uma vez que algumas das principais técnicas que serão apresentadas neste trabalho envolve a rotação da amostra em torno do ângulo mágico para supressão da anisotropia de deslocamento químico, é importante que se faça uma demonstração mais quantitativa da técnica MAS neste caso. Nessas circunstâncias, a correspondente frequência de RMN no sistema de coordenadas girante da interação será dada pela equação 1.17, isto é:

$$\omega(\theta, \phi) = \omega_{iso} + \frac{1}{2} \delta (3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi) \quad (1.21)$$

Discutindo simplifcadamente, o principal efeito da rotação da amostra em torno do ângulo mágico na expressão 1.21 é introduzir uma dependência temporal periódica nos ângulos θ e ϕ . Deste modo, a parte anisotrópica da frequência de RMN também varia periodicamente no tempo, com período igual ao período de rotação da amostra. Tal dependência temporal faz com que a fase acumulada devida à evolução sob a anisotropia de deslocamento químico seja igual a zero em cada período, fazendo com que em média o espectro não contenha tal contribuição, isto é:

$$\int_0^{t_r} \omega(\theta(t), \phi(t)) dt = \int_0^{t_r} \omega(t) dt = 0 \quad (1.22)$$

$$\omega(\theta(t), \phi(t)) = \omega_{iso} + \frac{1}{2} \delta (3 \cos^2 \theta(t) - 1 - \eta \sin^2 \theta(t) \cos 2\phi(t))$$

Para calcular exatamente a intensidade do espectro de RMN sob MAS é necessário considerar agora um outro sistema de coordenadas denominado sistema de referência do rotor (SR), onde o eixo z coincide com o eixo de rotação da amostra. Para calcular a frequência de RMN sob MAS será utilizada aqui a descrição em termos de funções f , a serem definidas adiante, que pode ser encontrada com maiores detalhes nas referências 6 e 7. Inicialmente é necessário expressar tanto o tensor de deslocamento químico (expresso geralmente no SEP) quanto o vetor unitário que representa a direção do campo magnético externo $\vec{b}_0 = \vec{B}_0 / |\vec{B}_0|$ (expresso no sistema de laboratório) no sistema de coordenadas do rotor. Após essas transformações, as expressões para essas quantidades ficam dadas por:

$$\vec{b}_0^{SR} = \begin{pmatrix} \text{sen}\theta_m \cos(\omega_r t) \\ \text{sen}\theta_m \text{sen}(\omega_r t) \\ \cos\theta_m \end{pmatrix} = \sqrt{\frac{2}{3}} \begin{pmatrix} \cos(\omega_r t) \\ \text{sen}(\omega_r t) \\ \sqrt{\frac{1}{2}} \end{pmatrix} \quad (1.23)$$

$$\vec{\sigma}^{SR} = \tilde{T}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \vec{\sigma}^{SEP} \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \quad ,$$

onde $\alpha_R, \beta_R, \gamma_R$ são os ângulos de Euler que definem a rotação do SEP para o sistema de referência do rotor, representada pela matriz de rotação $\tilde{T}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$, $\theta_m = 54.7^\circ$ é o ângulo mágico e ω_r é a frequência angular de rotação da amostra.

Com \vec{b}_0 e $\vec{\sigma}$ escritos no SR, a frequência de RMN pode ser calculada da seguinte forma:

$$\omega(t) = \omega_0 (\vec{b}_0^{SR} \cdot \vec{\sigma}^{SR} \cdot \vec{b}_0^{SR}) = \omega_{iso} + \omega(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t)$$

onde,

$$\omega(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t) = C_1 \cos(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t) \quad (1.24)$$

Onde ω_0 é a frequência de Larmor e os coeficientes C_1, C_2, S_1, S_2 são definidos

por:

$$C_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}) = -\delta \sqrt{2} \frac{1}{2} \sin 2\beta_{SR} \left(1 + \frac{1}{3} \eta \cos 2\alpha_{SR} \right) \quad (1.25)$$

$$C_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}) = \delta \left\{ \frac{1}{2} \sin^2 \beta_{SR} - \frac{1}{6} \eta (1 + \cos^2 \alpha_R) \cos 2\alpha_{SR} \right\} \quad (1.26)$$

$$S_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}) = -\delta \frac{\eta}{3} \sqrt{2} \sin \beta_{SR} \sin 2\alpha_{SR} \quad (1.27)$$

$$S_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}) = -\delta \frac{\eta}{3} \cos \beta_{SR} \sin 2\alpha_{SR} \quad (1.28)$$

Conhecendo a frequência de RMN, o sinal detectado, $g(t)$, para uma orientação específica representada pelos ângulos de Euler, $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$, poderá ser calculado através da seguinte expressão:

$$g(t) = \exp(i\omega_{iso} t) g'(t)$$

onde,

$$g'(t) = \exp \left\{ i \int_0^t \omega(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \right\} = f^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{SEP}) f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t, \sigma^{SEP}) \quad (1.29)$$

e

$$f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma, \sigma^{SEP}) = \exp \left\{ i \frac{1}{\omega_r} \left[C_1 \text{sen } \gamma + \frac{1}{2} C_2 \text{sen}(2\gamma) - S_1 \cos \gamma_{SR} - \frac{1}{2} S_2 \cos(2\gamma) \right] \right\}$$

As funções $f^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{SEP})$ e $f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t, \sigma^{SEP})$ são denominadas funções f^7 .

Usando agora as relações definidas em termos de funções delta de Dirac, $\delta(x - x_0)$:

$$\begin{aligned} e^{iz \cos \varphi} &= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \delta(\theta - \varphi) e^{izs \cos \theta} d\theta \\ e^{iz \sin \varphi} &= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \delta(\theta - \varphi) e^{izs \sin \theta} d\theta \\ 1 &= \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \delta(\theta - \gamma - \omega_r t) d\theta \end{aligned} \quad (1.30)$$

Tem-se:

$$g'(t) = f^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{SEP}) \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \delta(\theta - \gamma_{SR} - \omega_r t) f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \theta, \sigma^{SEP}) d\theta \quad (1.31)$$

Expandindo a função δ em termos de um conjunto de ondas planas:

$$\delta(\theta - \gamma - \omega_r t) = \sum_{N=-\infty}^{N=+\infty} e^{iN(\theta - \gamma_{SR} - \omega_r t)} \quad (1.32)$$

Obtém-se :

$$\begin{aligned} g'(t) &= \sum_{N=-\infty}^{N=+\infty} e^{iN\omega_r t} e^{iN\gamma} f^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{PAS}) \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{iN\theta} f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \theta, \sigma^{PAS}) d\theta \\ g'(t) &= \sum_{N=-\infty}^{N=+\infty} e^{iN\omega_r t} e^{iN\gamma} f^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{PAS}) F_N(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{PAS}) \end{aligned} \quad (1.33)$$

onde $F_N(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{SEP})$ representa a transformada de Fourier de $f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \theta, \sigma^{SEP})$ em relação a θ .

O sinal $g(t)$ representa o sinal detectado para uma dada orientação dos segmentos moleculares, deste modo, para calcular o sinal detectado no experimento é necessário integral sobre todas as orientações possíveis de $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$, considerando a probabilidade $P(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$ de que cada orientação ocorra. Portanto, tem-se a seguinte expressão para o sinal temporal detectado no experimento MAS:

$$S(t) = \int_0^{2\pi} d\alpha_{SR} \int_0^{\pi} \sin \beta_{SR} d\beta_{SR} \int_0^{2\pi} d\gamma_{SR} P(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) e^{i\omega_{iso} t} g(t) \quad (1.34)$$

Para o caso do espectro de pó, onde todas as orientações são igualmente prováveis $P(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) = \frac{1}{8\pi^2}$, a integração em gama introduz uma nova transformada de Fourier, de modo que:

$$S(t) = \sum_{N=-\infty}^{N=\infty} e^{i\omega_{iso}t} e^{iN\omega_r t} I_N^{MAS} \quad (1.35)$$

onde

$$I_N^{MAS} = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\alpha_{SR} \int_0^{\pi} \sin \beta_{SR} d\beta_{SR} F_N^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{SEP}) F_N(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{SEP}) \quad (1.36)$$

sendo:

$$F_N(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{SEP}) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{iN\gamma} f_N^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{SEP})$$

A transformada de Fourier da expressão 1.35 resulta no espectro MAS, $S(\omega)$, que, como pode ser visto na figura 1.7, é constituído por um conjunto de picos discretos com frequências de ressonância $\omega = \omega_{iso} + N\omega_r$ e intensidade I_N^{MAS} . O pico localizado em ω_{iso} é denominado banda central e reproduz o espectro que seria obtido caso não existisse a anisotropia da interação. Já as linhas adicionais que aparecem igualmente espaçadas de $N\omega_r$ são denominadas bandas laterais. A integração sobre todas as orientações em I_N^{MAS} dá origem a um padrão que reproduz aproximadamente o espectro de pó e, deste modo, o conjunto banda central mais bandas laterais possuem a amplitude modulada pelo padrão de pó da amostra como mostrado na Figura 1.7. Como a posição da banda central é independente da frequência de rotação da amostra, se essa frequência é tal que todas as bandas laterais se encontram fora da faixa de frequência do padrão de pó então somente a banda central aparecerá no espectro, contendo apenas a contribuição isotrópica da interação. No entanto, nem sempre esta condição é satisfeita e nestes casos são necessários esquemas especiais de supressão de bandas laterais^{5,13-15}. Um dessas técnicas, denominada *Total Supression of Sidebands* (TOSS)¹³, é a base da técnica de Exchange Induced Sidebands (EIS)¹⁶ que será discutida na próxima seção.

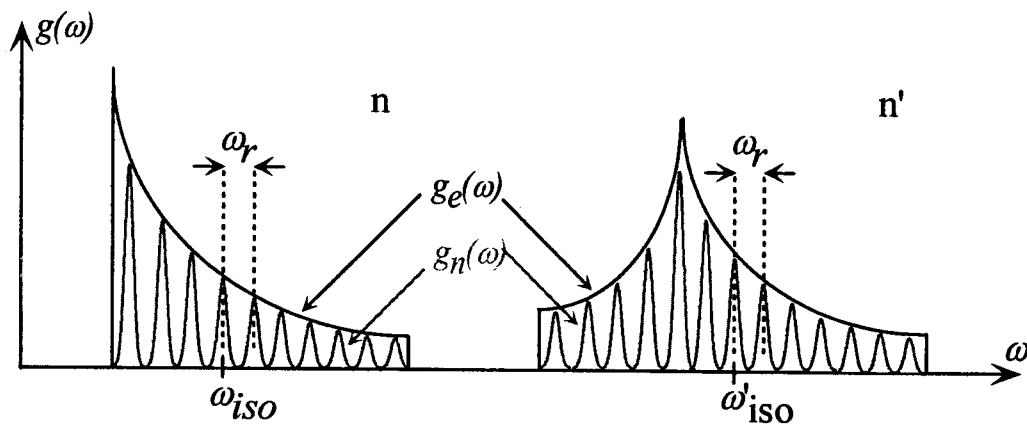


Figura 1.7 - Conjunto de bandas laterais espaçadas pela frequência de rotação da amostra, ω_r . $S_e(\omega)$ e $S_n(\omega)$ representam os espectros de pó e o padrão de bandas laterais, respectivamente.

Um outro aspecto importante é o efeito da rotação da amostra na frequência de RMN. A frequência de RMN sob MAS pode ser calculada de acordo com a expressão 1.32, onde nota-se que a frequência de RMN adquire uma dependência temporal com período igual a um período de rotação, ou seja:

$$\omega_{iso} + \omega \left(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r \left(t + \frac{2\pi}{\omega_r} \right) \right) = \omega_{iso} + \omega (\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t) \quad (1.37)$$

Ou ainda,

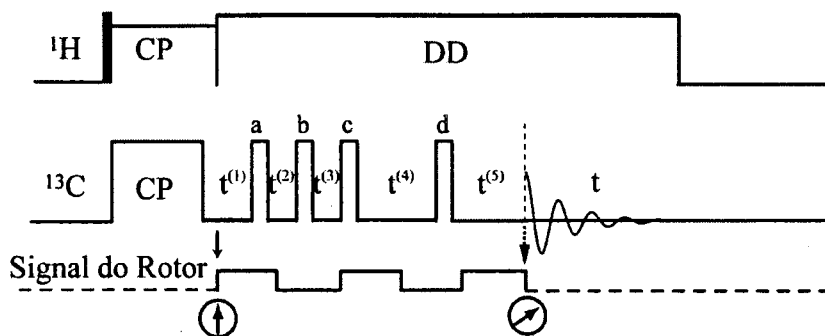
$$\int_0^{t_r} [\omega_{iso} + \omega (\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t)] dt = \omega_{iso} t_r \quad (1.38)$$

$$\int_0^{t_r} \omega (\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t) dt = 0$$

Portanto, a anisotropia da interação é promediada a zero em cada período de rotação, ou seja, a fase acumulada devido a evolução sob a parte anisotrópica da interação de deslocamento químico se anula em cada período de rotação. Este fato, será extensivamente discutido no capítulo 3 e, como será visto, tem implicações fundamentais no tipo de experimento que se propõe neste trabalho.

1.5 - Supressão Total de Bandas Laterais (TOSS).

O experimento TOSS proposto por Dixon¹³ consiste na supressão das bandas laterais do espectro MAS através da aplicação de uma seqüência de pulsos especial, que está mostrada na figura 1.8.



$^1\text{H}90^\circ$	$^1\text{H-CP}$	$^{13}\text{C-CP}$	a	b	c	d	receptor
-x	y	y	y	-y	$\pm y$	$\mp x$	x
x	y	y	y	-y	$\pm y$	$\mp x$	-x
-x	y	-x	-x	x	$\mp x$	$\pm y$	y
x	y	-x	-x	x	$\mp x$	$\pm y$	-y
-x	y	-y	-y	y	$\mp y$	$\pm x$	-x
x	y	-y	-y	y	$\mp y$	$\pm x$	x
-x	y	x	x	-x	$\pm x$	$\mp y$	-y
x	y	x	x	-x	$\pm x$	$\mp y$	y

Figura 1.8 - Seqüência de pulsos utilizada na aquisição do espectro TOSS. Os pulsos de $90^\circ(\pi/2)$ estão indicados em preto, enquanto que os pulsos a,b,c e d são pulsos de $180^\circ(\pi)$. O sinal do rotor indicado na figura representa a fase da rotação da amostra, sendo que o período da função quadrada representada é igual ao período de rotação. O ciclo de fases necessário para compensar as imperfeições experimentais na amplitude e fase dos pulsos de RF também está mostrado abaixo da seqüência. A utilização eficiente deste experimento requer velocidades de rotação com estabilidade superior a 5 Hz e um excelente ajuste dos pulsos de 180° .

A idéia básica deste experimento é manipular a freqüência de evolução sob MAS através da aplicação de pulsos de RF de 180° . Esta manipulação se dá de tal forma a eliminar a fase acumulada que dá origem as bandas laterais. Uma interpretação não matemática da seqüência TOSS é muito difícil, visto que envolve freqüência de precessão dependentes do tempo o que é difícil de ser visualizado. No entanto, matematicamente torna-se muito fácil de ver a eliminação das bandas laterais no sinal adquirido no experimento TOSS. Como será demonstrado logo a seguir, a seqüência de pulsos TOSS essencialmente suprime o termo $f^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, \sigma^{SEP})$ na equação 1.29, fazendo com que $g(t)$ seja:

$$g(t) = e^{i\omega_{rot}t} f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t, \sigma^{SEP}) \quad (1.39)$$

Seguindo os mesmos passos desde a equação 1.29 a 1.35 na seção anterior, o sinal temporal integrado sobre todas as orientações $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$ é dado por:

$$\begin{aligned}
 S_{TOSS}(t) &= \sum_{N=-\infty}^{N=+\infty} e^{i\omega_{iso}t} e^{iN\omega_r t} \frac{1}{8\pi^2} \int_0^{2\pi} d\alpha_{SR} \int_0^{\pi} \sin \beta_{SR} d\beta_{SR} \int_0^{2\pi} d\gamma e^{iN\gamma} F_N(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{SEP}) \\
 &= \sum_{N=-\infty}^{N=+\infty} e^{i\omega_{iso}t} e^{iN\omega_r t} \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\alpha_{SR} \int_0^{\pi} \sin \beta_{SR} d\beta_{SR} F_N(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{SEP}) \delta_{N,0} \\
 &= \sum_{N=-\infty}^{N=+\infty} e^{i\omega_{iso}t} \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\alpha_{SR} \int_0^{\pi} \sin \beta_{SR} d\beta_{SR} F_0(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \sigma^{SEP}) \delta_{N,0} \\
 &= I^{TOSS} e^{i\omega_{iso}t}
 \end{aligned} \tag{1.40}$$

Para se obter o espectro TOSS deve-se tomar a transformada de Fourier da expressão 1.40, que resulta em:

$$S_{TOSS}(\omega) = I^{TOSS} \delta(\omega - \omega_{iso}) \tag{1.41}$$

Portanto, o espectro adquirido, $S_{TOSS}(\omega)$, é constituído somente por uma linha central com amplitude dada por I^{TOSS} centrado na frequência ω_{iso} , isto é as bandas laterais são eliminadas do espectro.

Para entender como a seqüência de pulsos faz com que sinal detectado para um dada orientação, $g(t)$, seja dado pela expressão 1.39 é necessário acompanhar a evolução da frequência de RMN sob MAS durante a seqüência de pulsos mostrada na Figura 1.8. Cada pulso de 180° , aplicado no instante $t^{(n)}$ inverte a frequência de precessão de cada isocromata, conjunto de magnetizações precessionando com mesma frequência. Deste modo, a fase efetiva acumulada pela magnetização na evolução desde após a polarização cruzada até o final da aquisição do sinal é dada por:

$$\begin{aligned}
 \phi_{eff}(t) &= \int_0^{t^{(1)}} \omega(t) dt - \int_{t^{(1)}}^{t^{(2)}} \omega(t) dt + \int_{t^{(2)}}^{t^{(3)}} \omega(t) dt - \int_{t^{(3)}}^{t^{(4)}} \omega(t) dt + \int_{t^{(4)}}^{t^{(5)}+t} \omega(t) dt \\
 \phi_{eff}(t) &= \phi(t + t^{(5)}) - 2\phi(t^{(4)}) + 2\phi(t^{(3)}) - 2\phi(t^{(2)}) + 2\phi(t^{(1)}) - \phi(0)
 \end{aligned} \tag{1.42}$$

Com a condição:

$$-2\phi(t^{(4)}) + 2\phi(t^{(3)}) - 2\phi(t^{(2)}) + 2\phi(t^{(1)}) - \phi(0) = 0 \tag{1.43}$$

Tem-se.

$$\phi_{eff}(t) = \phi(t + t^{(5)}) \tag{1.44}$$

Assim,

$$g'(t) = e^{i\phi_{eff}(t)} = e^{i\phi(t+t^{(5)})} = f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \tilde{\gamma}_{SR} + \omega_r t, \sigma^{SEP}) \tag{1.45}$$

onde $\tilde{\gamma}_{SR} = \gamma_{SR} + \omega_r t$.

Explicitando a expressão 1.45 em termos dos parâmetros das equações 1.25 a 1.28 tem-se:

$$\begin{aligned}
 & (-C_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cos \gamma_{SR} + S_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \sin \gamma_{SR}) 2 \sum_n (-1)^n \sin(\omega_r t^{(n)}) + \\
 & (S_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cos \gamma_{SR} - C_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \sin \gamma_{SR}) \left(1 + 2 \sum_n (-1)^n \cos(\omega_r t^{(n)}) \right) + \\
 & -\frac{1}{2} (-C_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cos 2\gamma_{SR} + S_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \sin 2\gamma_{SR}) 2 \sum_n (-1)^n \sin(2\omega_r t^{(n)}) + \\
 & \frac{1}{2} (S_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cos 2\gamma_{SR} - C_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \sin 2\gamma_{SR}) \left(1 + 2 \sum_n (-1)^n \cos(2\omega_r t^{(n)}) \right) = 0
 \end{aligned} \tag{1.46}$$

Como a ação da seqüência de pulsos é independente das orientações $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$, cada termo deve anular-se independentemente, pois a evolução de cada isocromata pode ser tratada individualmente. Isto implica no seguinte conjunto de equações:

$$\begin{aligned}
 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} + \sum_n (-1)^n 2 \begin{pmatrix} \cos(\omega_r t^{(n)}) \\ \sin(\omega_r t^{(n)}) \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \\
 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} + \sum_n (-1)^n 2 \begin{pmatrix} \cos(2\omega_r t^{(n)}) \\ \sin(2\omega_r t^{(n)}) \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}
 \end{aligned} \tag{1.47}$$

Resolvendo este conjunto de equações, os intervalos de tempo entre pulsos $t^{(1)}$, $t^{(2)}$, $t^{(3)}$ e $t^{(4)}$ podem ser determinados. Outra condição a ser cumprida é que o deslocamento químico isotrópico deve ser refocalizado em $t^{(5)}$, isto é:

$$\omega_{iso}(t^{(5)} - t^{(4)}) - \omega_{iso}(t^{(4)} - t^{(3)}) - \omega_{iso}(t^{(3)} - t^{(2)}) - \omega_{iso}(t^{(2)} - t^{(1)}) - \omega_{iso}t^{(1)} = 0 \tag{1.48}$$

O que implica em:

$$t^{(5)} = 2t^{(4)} - 2t^{(3)} + 2t^{(2)} - t^{(1)} \tag{1.49}$$

Então, é possível calcular também o intervalo de tempo $t^{(5)}$ a partir de $t^{(1)}$, $t^{(2)}$, $t^{(3)}$ e $t^{(4)}$.

Embora o experimento TOSS seja bastante eficiente na eliminação de bandas laterais, trata-se de um experimento bastante sensível a imperfeições nos pulsos de RF. Sendo assim, para compensar estas imperfeições o ciclo de fase mostrado na Figura 1.8 deve ser utilizado⁶.

1.6 - Aspectos Básicos dos experimentos de RMN bidimensional.

Um espectro bidimensional $S(\omega_1, \omega_2)$, é obtido através da aquisição de um conjunto de dados como função de duas variáveis temporais t_1 e t_2 e subsequente transformada de Fourier bidimensional. Existem várias seqüências de pulsos que dão origem a espectros bidimensionais, no entanto, todas elas possuem a estrutura básica mostrada na Figura 1.9⁶.

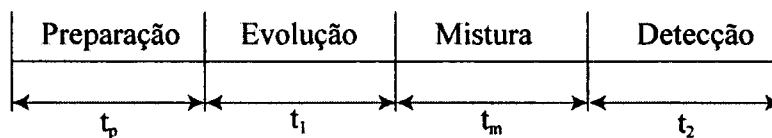


Figura 1.9- Esquema geral de seqüências para espectroscopia bidimensional.

No período de preparação um estado de não equilíbrio é criado, isto é, a magnetização de equilíbrio inicialmente ao longo do eixo z é transferida para o plano transversal. Isto pode ser feito com um simples pulso 90° ou com alguma seqüência mais sofisticada como polarização cruzada, múltiplos pulsos para excitação seletiva, etc. No período de mistura, os spins evoluem livremente sob a presença da interação de spin nuclear, o que codifica a informação sobre as características dessa interação em suas freqüências de precessão. A evolução sob a presença de alguma interação específica pode ser conseguida aplicando-se alguma seqüência de pulsos que privilegie tal interação. Por exemplo, em um sistema onde as interações de deslocamento químico e dipolar heteronuclear definem o espectro, pode-se aplicar a seqüência de desacoplamento heteronuclear para eliminar a interação dipolar e codificar apenas a interação de deslocamento químico. No período de mistura, a informação armazenada na evolução dos spins durante o período t_1 é transferida para a dimensão t_2 . Finalmente, durante o período t_2 o sinal é detectado.

De um modo geral os experimentos bidimensionais têm três objetivos básicos:

- a) Separar interações. Neste caso duas interações distintas são separadas ao longo das duas dimensões espectrais.
- b) Correlacionar evoluções em diferentes instantes de tempo. Nesta categoria encontra-se o experimento de *Exchange 2D*, que correlaciona as freqüências de evolução sob a presença da interação de deslocamento químico em dois instantes de tempo diferentes.
- c) Ver o “invisível”. Neste caso os experimentos bidimensionais permitem obter informações sobre transições de spin invisíveis por observação direta do sinal de RMN, tais como transições de quantum múltiplo.

Com o intuito de entender com maiores detalhes a obtenção dos espectros bidimensionais é interessante considerar uma seqüência de pulsos particular. Uma vez que todas as técnicas propostas e utilizadas neste trabalho são baseadas na metodologia de *Exchange 2D*, a mesma será utilizada como exemplo, sendo que no próximo capítulo será feita uma descrição pormenorizada sobre as características desta metodologia. Na seqüência de pulsos utilizada no experimento de *Exchange 2D* para ^{13}C , mostrado na figura 1.10, o período de preparação é constituído por uma seqüência de pulsos de polarização cruzada, resultando no aparecimento de uma magnetização transversal de ^{13}C ao final deste período⁹. A direção inicial desta magnetização será a mesma que a do pulso de polarização cruzada (CP) aplicado ao núcleo de ^{13}C . Assumindo que esse pulso possua fase y , esta magnetização inicial estará ao longo da direção y , M_y ⁹. Após este período de preparação segue o período de evolução, que neste caso constitui-se de um período de duração t_1 onde a seqüência de desacoplamento heteronuclear é aplicada, resultando na evolução da magnetização nuclear somente sob a interação de deslocamento químico. Deste modo, no sistema de coordenadas girante, onde a precessão de Larmor não aparece, pode-se dizer que a magnetização inicial executa um movimento de precessão em torno do eixo z , com frequência $\omega_{DQ}(\theta, \phi)$ dada pela expressão 1.17a, isto é:

$$M(t_1) = M_0 e^{-\frac{t_1}{T_2}} \left\{ \cos(\omega_{DQ} t_1) \hat{x} + \text{sen}(\omega_{DQ} t_1) \hat{y} \right\} \quad (1.50)$$

Após o período t_1 um pulso de radiofrequência de 90° , pulso b) na figura 1.10, com fase x armazena a componente cosseno da magnetização no eixo- z durante um período denominado período de mistura, t_m , enquanto que a componente seno defasa no plano transversal. Portanto, após este período de mistura a magnetização z é dada por:

$$M(t_1) = M_0 e^{-\frac{t_1}{T_2}} \cos(\omega_{DQ} t_1) \hat{z} \quad (1.51)$$

Finalmente, esta magnetização é novamente conduzida ao plano transversal pelo segundo pulso de 90° , onde evolui resultando em:

$$M(t_1, t_2) = M_0 e^{-\frac{t_1}{T_2}} e^{-\frac{t_2}{T_2}} \cos(\omega_{DQ} t_1) \left\{ \cos(\omega_{DQ} t_2) \hat{x} + \text{sen}(\omega_{DQ} t_2) \hat{y} \right\} \quad (1.52)$$

Se o sinal é detectado em fase e quadratura durante t_2 então pode-se escrever o sinal detectado como:

$$S(t_1, t_2) = Ae^{-\frac{t_1}{T_2}} e^{-\frac{t_2}{T_1}} \cos(\omega_{DQ}t_1) \exp(i\omega_{DQ}t_2) \quad (1.53)$$

O termo $A \exp(i\omega_{DQ}t_2)$ corresponde ao sinal de RMN convencional como função do tempo, FID (*Free Induction Decay*), porém com amplitude modulada por um termo que depende da evolução do sistema durante o período t_1 . Se este experimento é repetido seguidamente sendo o período t_1 sucessivamente incrementado, obter-se-á um conjunto de FIDs, com diferentes amplitudes, correspondentes ao fator de modulação $\cos(\omega_{DQ}t_1)$. Como pode ser observado este conjunto de FIDs corresponde a um sinal temporal bidimensional, que pode ser digitalizado e armazenado em uma matriz bidimensional, que contém as amplitudes dos sinais como função de t_1 e t_2 tal como ilustrado na figura 10b. O próximo passo na obtenção do espectro 2D é a transformada de Fourier bidimensional. Fazendo inicialmente a transformada em t_2 , FT_2 , que consiste em fazer uma transformada de Fourier para cada FID adquirido em t_1 , obtêm-se a figura 1.10c, que é essencialmente um conjunto de espectros convencionais com amplitudes moduladas pelo fator $\cos(\omega_{DQ}t_1)$. Finalmente, considerando somente a parte positiva das frequências, a transformada de Fourier é aplicada considerando t_1 como variável temporal, FT_1 , resultando no espectro bidimensional mostrado na figura 1.10d. Nesta descrição, foi considerado que a frequência de deslocamento químico era a mesma antes e depois de t_m . Além disso, foi assumido implicitamente que para todos os segmentos moleculares da amostra a orientação do campo magnético externo no sistema de eixos principais era a mesma, únicos θ e ϕ , o que resultou em picos estreitos centrados na frequência ω_{DQ} nas duas dimensões do espectro. Se no entanto, a frequência de evolução da magnetização for diferente antes e depois de t_m , o que pode ocorrer se a orientação dos segmentos moleculares mudar durante esse período, a frequência espectral será diferente ao longo das duas dimensões do espectro 2D, o que indicará que houve movimento molecular. De fato, informações específicas como os ângulos de reorientação e a escala de tempos desses movimentos podem ser diretamente extraídos deste espectro, mas o procedimento utilizado para extrair tais informações e as formas de interpretação do espectro serão discutidos em detalhes nos próximos capítulos. Os esquemas de transformada de Fourier utilizados em espectroscopia bidimensional

também são um tanto quanto mais complexos que os apresentados aqui e serão discutidos com mais detalhes no próximo capítulo.

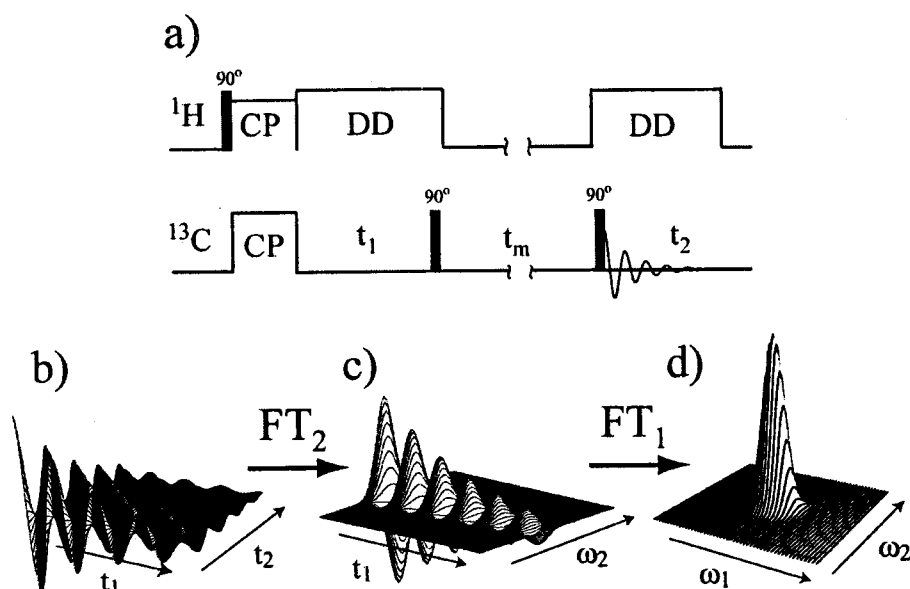


Figura 1.10 – Exemplo do esquema de aquisição utilizado em espectroscopia bidimensional. A) Sequência de pulso *Exchange* 2D utilizada como exemplo. b) Gráfico bidimensional da matriz de dados que contém os sinais adquiridos como função dos tempos de evolução t_1 e t_2 . Gráfico da matriz de dados após a transformada de Fourier em t_2 . c) Espectro bidimensional após a segunda transformada de Fourier.

1.7 – Considerações Finais.

Neste capítulo foi apresentada uma compilação simplificada de alguns conceitos e metodologias fundamentais para o entendimento de experimentos de RMN pulsado em alto campo magnético. Técnicas como desacoplamento nuclear, polarização cruzada e rotação da amostra em torno do ângulo mágico, são hoje metodologias convencionais utilizadas rotineiramente no estudo de materiais orgânicos e inorgânicos e representam poderosas ferramentas no estudo da dinâmica e estrutura desses materiais. Além disso, tais técnicas serão os blocos básicos das seqüências de pulsos mais avançadas que serão propostas e/ou discutidas neste trabalho. No próximo capítulo, as principais técnicas de RMN de *Exchange*, que são a base deste trabalho, serão discutidas em detalhes.

1.8 - Referências.

- [1] Bonagamba, T. J. *Espectroscopia de Alta Resolução em Sólidos por RMN (Tese de Doutorado)*; Universidade de São Paulo: São Carlos, 1991.
- [2] Freitas, J. C. C. *Espectroscopia de Alta Resolução por Ressonância Magnética Multinuclear Aplicada ao Estudo de Zeólitas (Dissertação de mestrado)*; Universidade de São Carlos: São Carlos, 1994.
- [3] Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*; 3rd ed.; Springer-Verlag: Heidelberg (Germany), 1990; Vol. 1.
- [4] Rose, M. E. *Elementary Theory of Angular Momentum*; USA.; 1957; Vol. 1.
- [5] Bonagamba, T. J. *Supressão de Bandas Laterais em Experimentos de RMN com Rotação da Amostra em Torno do Ângulo Mágico (Tese de Livre Docência)*; Universidade de São Paulo: São Carlos, 1997.
- [6] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; 1st ed.; Academic Press: London, 1994; Vol. 1.
- [7] Haeberlen, U. *High Resolution NMR in Solids*; 1st ed.; Academic Press: London, 1976; Vol. supplement 1.
- [8] Sarles, L. R.; Cotts, R. M. *Phys. Rev.* 1958, *111*, 853.
- [9] Pines, A.; Gibby, M. G.; Waugh, J. S. *J. Chem. Phys.* 1973, *59*, 569.
- [10] Andrew, E. R.; Bradbyry, A.; Eades, R. G. *Nature* 1959, *183*, 1802.
- [11] Lowe, I. J. *Phys. Rev. Lett.* 1959, *2*, 285.
- [12] Andrew, E. R.; Eades, R. G. *Discuss. Faraday Soc.* 1962, *34*, 569.
- [13] Dixon, W. T. *J. Chem. Phys.* 1982, *77*, 1800.
- [14] Bonagamba, T. J.; Panepucci, H. *J. Magn. Reson.* 1993, *103*, 103.
- [15] Vidoto, E. A. *Supressão de Bandas Laterais Através da Técnica de Rotação da Amostra em Torno do Ângulo Mágico (Dissertação de Mestrado)*; Universidade de São Paulo: São Carlos, 1995.
- [16] Yang, Y.; Schuster, M.; Blümich, B.; Spiess, H. W. *Chem. Phys. Lett.* 1987, *139*, 239-243.
- [17] Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; 1st ed.; Clarendon Press: Oxford, 1987; Vol. 14.

Capítulo 2 - Técnicas de RMN de *Exchange* em Estado Sólido

Neste capítulo, os princípios básicos de algumas das principais técnicas de RMN de *Exchange* em estado sólido serão discutidas, enfatizando as informações sobre a escala de tempo e geometria do movimento molecular que podem ser obtidas por tais técnicas, bem como suas limitações. Além disso, serão também discutidos os principais detalhes que devem ser observados quando na implementação dos experimentos. Procurar-se-á discutir com mais detalhes somente as técnicas que serão utilizadas como blocos básicos das novas metodologias que serão propostas e discutidas nos capítulos 3 e 4.

2.1 - Movimento molecular em sólidos orgânicos e as técnicas de RMN de *Exchange*.

A Dinâmica Molecular tem importantes efeitos nas propriedades mecânicas e de condução em polímeros¹, na atividade de proteínas², na estabilidade de fármacos³, nas propriedades de transporte em zeólitas⁴ e no comportamento de materiais amorfos em temperaturas próximas à temperatura de transição vítrea⁵. Dinâmica rápida (que acontecem com escalas de tempo características superiores a 0,1 ms) pode ser caracterizada por experimentos de análise de largura de linha⁶⁻⁸ e técnicas de relaxação⁶. Informações mais específicas são obtidas através de experimentos de RMN de *Exchange*, onde movimentos moleculares lentos (que acontecem com escalas de tempo características de 10 s a 0,1 ms) são observados em termos de mudanças na frequência de RMN, a qual reflete diretamente mudanças na orientação dos segmentos moleculares. Tempos de correlação⁹ e suas distribuições^{10,11}, memória reorientacional^{12,13}, existência de heterogeneidades dinâmicas e suas dimensões¹⁴⁻¹⁶, podem ser caracterizados por técnicas de *1D*, *2D*, *3D* e *reduced-4D Exchange*¹⁰⁻¹³.

Uma característica geral dos experimentos de RMN de *Exchange* é o monitoramento da frequência de precessão dos spins localizados num dado segmento molecular em diferentes instantes de tempo. Os intervalos de tempo em que ocorrem as codificações das frequências são separados por períodos de espera, denominados tempos de mistura, normalmente muito mais longos que os tempos de evolução. Devido à dependência da frequência de RMN com a orientação dos segmentos moleculares, uma mudança na orientação de um dado segmento implica diretamente na mudança da

freqüência de precessão de um spin nuclear localizado no mesmo. Isto significa que, a observação da freqüência de RMN em diferentes instantes de tempo representa o monitoramento das orientações sucessivas de um dado segmento durante o movimento molecular.

2.2 - RMN de Exchange bidimensional (Exchange 2D).

No experimento de RMN de Exchange bidimensional as freqüências de RMN dos spins de um dado segmento molecular são medidas em dois instantes de tempo diferentes e correlacionadas através de um mapa bidimensional (espectro 2D). As interações mais comuns utilizadas como sondas para o movimento molecular em experimentos de Exchange são o deslocamento químico dos núcleos de ^{13}C e a interação quadrupolar em núcleos de ^2H . Uma vez que neste trabalho as técnicas desenvolvidas utilizam apenas a interação de deslocamento químico, a descrição do experimento será feita somente para o caso desta interação. A seqüência de pulsos utilizada no experimento de RMN de Exchange 2D para ^{13}C está mostrada na Figura 2.1. Após a excitação, os spins evoluem no plano transversal somente sob a ação da interação de deslocamento químico, já que essa evolução se dá sob desacoplamento heteronuclear. Após um intervalo de tempo t_1 , a magnetização é armazenada na direção z de modo que não executa movimento de precessão durante o tempo de mistura t_m . Finalmente, a magnetização é novamente colocada para evoluir no plano transversal, onde o sinal é detectado. O espectro bidimensional obtido correlaciona as freqüências de evolução durante t_1 (ω_1) e t_2 (ω_2).

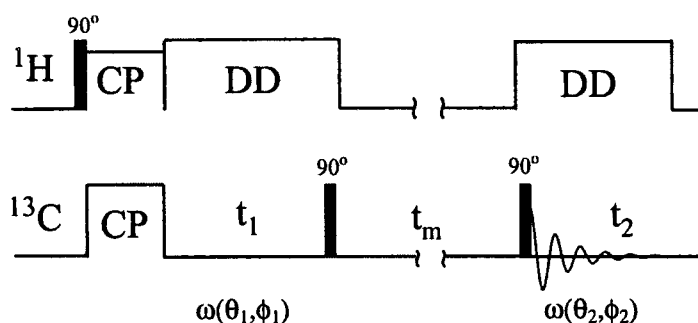


Figura 2.1 - Princípio do experimento de RMN de Exchange para a detecção de movimentos moleculares lentos. A freqüência de RMN é medida em dois períodos de evolução diferentes separados pelo tempo de mistura (t_m). A reorientação molecular durante t_m é detectada através na mudança da freqüência de RMN. Os tempos de evolução t_1 e t_2 devem ser muito menores que t_m afim de evitar que movimentos moleculares ocorram durante t_1 e t_2 . Novamente CP = Polarização cruzada, DD = Descoplamento Dipolar.

Devido à dependência da frequência de RMN com a orientação dos segmentos moleculares, sem a presença de movimentos moleculares com escala de tempo da ordem de t_m , as frequências de precessão dos spins antes e depois deste período são iguais, dando origem a um espectro onde a intensidade está confinada à região onde $\omega_1 = \omega_2$ (diagonal do espectro). No entanto, se os segmentos moleculares se reorientam durante t_m as frequências de RMN serão diferentes em t_1 e t_2 , implicando no aparecimento de picos na região fora da diagonal do espectro ($\omega_1 \neq \omega_2$). A forma de aquisição do sinal bem como as metodologias utilizadas para obtenção do espectro 2D serão discutidas adiante. Por agora será considerado apenas que o espectro *Exchange* 2D, $S(\omega_1, \omega_2; t_m)$ representa a densidade de probabilidade conjunta de encontrar um dado spin evoluindo com frequência ω_1 antes e ω_2 depois de t_m ¹⁰. Esta interpretação em termos de probabilidade conjunta pode ser demonstrada rigorosamente e está apresentada na referência 10, porém ele pode ser obtida intuitivamente, se for levado em conta que o espectro 2D reflete de fato uma correlação entre duas orientações de um dado segmento molecular em dois instantes de tempo distintos. Esta probabilidade pode ser expressa em termos da probabilidade condicional $S(\omega_2; t_m | \omega_1)$, que representa a probabilidade de que o spin tenha evoluído com frequência ω_2 durante t_2 condicional a ter evoluído com frequência ω_1 em t_1 , de modo que:

$$S(\omega_1, \omega_2; t_m) = S(\omega_2; t_m | \omega_1)P(\omega_1) \quad (2.1),$$

onde $P(\omega_1)$ representa a probabilidade de que o spin tenha frequência ω_1 durante t_1 .

Para entender melhor a interpretação probabilística dos espectros *Exchange* 2D, será considerado um sistema idealizado, onde existam apenas duas orientações possíveis e, portanto, duas frequências de RMN para os diversos segmentos moleculares da amostra. Neste caso, o movimento molecular estará restrito a essas duas orientações, tratando-se de um processo de reorientação entre dois sítios, que serão denominados A e B. Supondo que as populações dos dois sítios sejam iguais, para $t_m = 0$ a probabilidade de se encontrar um spin localizado no sítio A antes de t_m e num sítio B depois de t_m será nula e o espectro *Exchange* 2D resultante será como mostrado na Figura 2.2a. À medida que t_m aumenta, a probabilidade $S(\omega_1, \omega_2; t_m)$, com $\omega_1 \neq \omega_2$, deixa de ser nula, fazendo com que picos com frequências (ω_A, ω_B) e (ω_B, ω_A) comecem a aparecer no espectro, Figura 2.2b. No caso em que t_m é longo o suficiente para que os dois sítios possam ser acessados com igual

probabilidade, a intensidade dos picos fora da diagonal será igual à dos picos diagonais, Figura 2.2c. Neste caso, a razão ($S_{Exchange}/S_{total}$) entre o volume dos picos fora da diagonal e volume total do espectro 2D será igual a $1/2$ e representa exatamente a probabilidade de ocupação de cada sítio. Em um processo envolvendo M sítios não equivalentes com mesma probabilidade de acesso, a razão ($S_{Exchange}/S_{total}$) será igual a $(1-1/M)$. Portanto, o número de sítios acessíveis à reorientação molecular pode ser a princípio extraído do espectro de *Exchange* 2D.

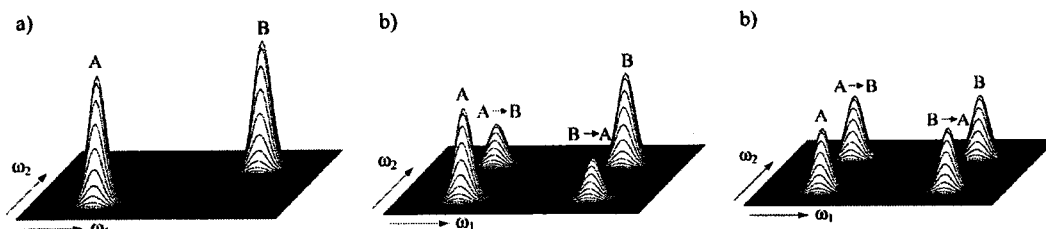


Figura 2.2 - Representação esquemática da evolução do espectro *Exchange* 2D como função de t_m para o processo de reorientação entre dois sítios descrito no texto. a) $t_m = 0$. b) $t_m =$ intermediário. c) $t_m = \infty$.

Embora o exemplo anterior seja ilustrativo no entendimento do processo de *Exchange*, ele não representa uma situação real. De fato, os experimentos de RMN são geralmente realizados em amostras policristalinas ou amorfas, onde os segmentos moleculares podem assumir qualquer orientação em relação ao campo magnético principal, \vec{B}_0 . Por este motivo, a simples comparação entre o espectro de pó medido antes e depois de t_m não traz nenhuma informação sobre o movimento molecular. Mesmo que os segmentos moleculares se reorientem durante t_m , o espectro de pó medido durante t_2 será obtido à partir da média sobre suas novas orientações e a informação sobre o processo de reorientação é perdida. No entanto, a correlação entre as frequências de precessão antes e depois de t_m na forma de um espectro 2D representa mais do que a simples comparação dos espectros de pó antes e depois de t_m , pois a frequência de precessão depois do tempo de mistura está condicionada a frequência de precessão antes do mesmo via reorientação molecular.

2.2.1 - Padrão de intensidade para o espectro *Exchange* bidimensional ($\eta = 0$).

Para utilizar e entender os experimentos de *Exchange* é necessário sobretudo entender como os processos de reorientação molecular afetam os espectros de RMN de

Exchange. Deste modo, nesta seção será descrito em detalhes as relações entre a reorientação molecular e o espectro detectado.

Para sistemas policristalinos as características dos espectros de pó unidimensionais são determinadas pelos elementos do tensor que representam a interação de spin nuclear. Nos experimentos de RMN bidimensional estes fatores também influenciam no espectro final, mas outras dependências são adicionadas devido à aquisição da segunda dimensão em frequência. Como já discutido, no caso da RMN de *Exchange* 2D em estado sólido, o espectro bidimensional traz informações sobre movimentos moleculares com taxas da ordem de Hz a kHz. Neste caso, o padrão de intensidade espectral depende tanto da escala de tempo quanto da amplitude e geometria do desses movimentos. Para entender a maneira com que a informação sobre as reorientações moleculares emerge do espectro *Exchange* 2D, inicialmente será considerado o caso em que o tensor de deslocamento químico possui simetria axial ($\eta = 0$). Neste caso, a dependência da frequência com a orientação do Sistema de Eixos Principais do tensor (SEP) relativamente a \vec{B}_0 é dada por:

$$\omega(\theta) = \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (2.2)$$

Como o interesse principal aqui é a parte da frequência que depende da orientação do SEP, a parte isotrópica da interação foi omitida. No caso $\eta = 0$, a orientação do SEP e, conseqüentemente, do segmento molecular em relação ao campo magnético principal pode ser descrita por um único ângulo definido pelo eixo z do SEP e o campo magnético \vec{B}_0 , θ . Considerando que a reorientação do eixo z do SEP tenha mudado de θ_1 para θ_2 durante t_m , com ângulo de reorientação β_R , o ângulo θ_2 poderá ser qualquer ângulo sobre a superfície cônica definida por θ_1 e β_R , tal como ilustrado na Figura 2.3a. Traduzindo em termos de frequências de RMN, isto significa que os spins que precessionaram com frequências $\omega(\theta_1)$ antes de t_m irão precessionar com um conjunto de frequência $\omega(\theta_2)$, definidas basicamente pelo ângulo de reorientação, β_R . Desta forma, o padrão espectral obtido dependerá do ângulo de reorientação.

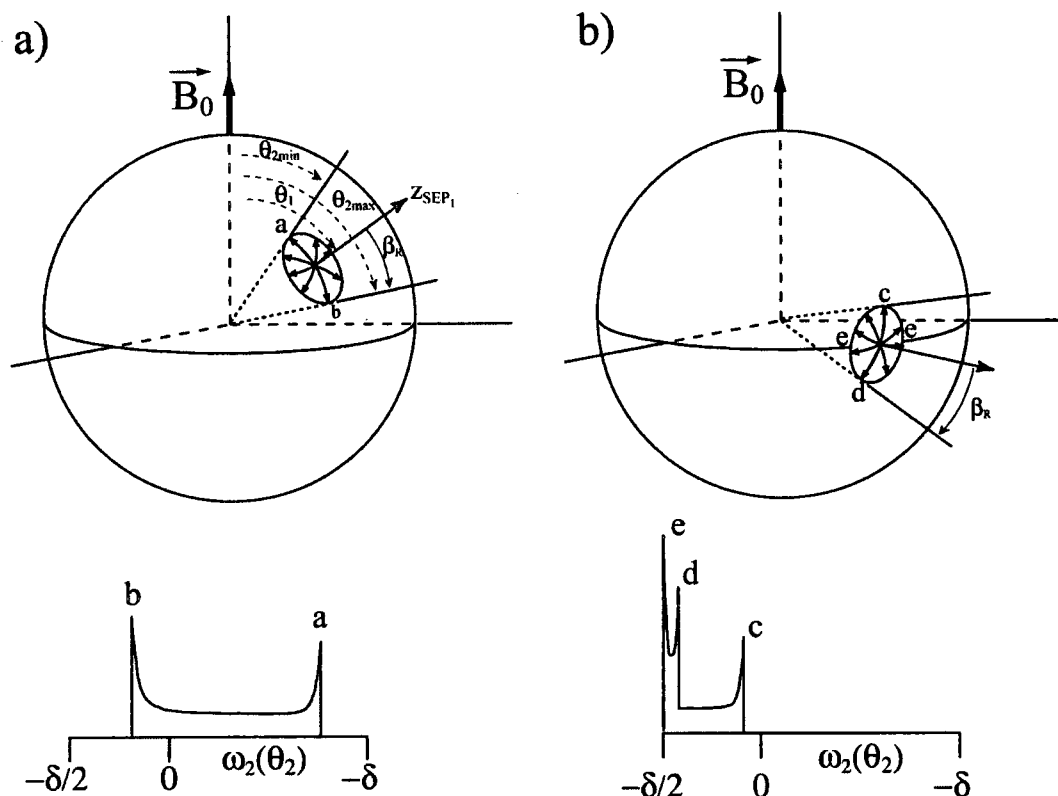


Figura 2.3 - Representação esquemática da relação entre a reorientação molecular e as singularidades de uma linha do espectro *Exchange 2D*.

Uma maneira simples de entender o padrão de intensidades no espectro *Exchange 2D* é determinando o conjunto de singularidades, pontos de máxima amplitude, deste espectro. Analisando uma linha do espectro 2D com ω_1 , e conseqüentemente θ_1 fixo, após uma reorientação por um ângulo β_R as singularidades no espectro de pó podem ser determinadas como aqueles pontos em que uma grande variação do ângulo θ_2 impliquem em pequenas variações na freqüência de RMN correspondente. No caso em que $\theta_1 + \beta_R < 90^\circ$, essas singularidades aparecerão para os ângulos $\theta_{2\min} = \theta_1 - \beta_R$ e $\theta_{2\max} = \theta_1 + \beta_R$, Figura 2.3a. Para o caso $\theta_1 + \beta_R \geq 90^\circ$, surgirá uma outra singularidade para $\theta_2 = 90^\circ$, a qual é natural do espectro de pó em ω_2 , pico *e* da Figura 2.3b. Essa singularidade independe do ângulo de reorientação, pois simplesmente reflete o espectro de pó em ω_2 . Em resumo, considerando uma única orientação dos segmentos moleculares antes de t_m , após uma reorientação dos segmentos por um ângulo β_R , padrões de pó do tipo mostrado na Figura 2.3 seriam observados na dimensão $\omega_2(\theta_2)$. Uma representação gráfica desta situação está mostrada na Figura 2.4b. Para o caso de um espectro 2D, Figura

2.4a, a seleção dos segmentos com orientação θ_1 é indicada na dimensão ω_1 , onde o espectro apresentado é uma função delta. Após a reorientação molecular, o espectro na dimensão ω_2 consiste de um espectro de pó cuja forma é definida pelas características geométricas da reorientação molecular. Este exemplo mostra também uma característica fundamental dos experimentos de *Exchange*. Para se obter informações sobre a reorientação molecular é necessário observar a frequência ω_2 dos núcleos que precessionaram com frequência ω_1 antes de t_m , não bastando analisar o espectro de pó antes e depois de t_m , que contém as orientações integradas. Logo, a seleção dos segmentos com frequência ω_1 é essencial na realização dos experimentos de RMN de *Exchange*. No espectro 2D isto é feito para cada linha do espectro gerando um padrão bidimensional que traz informações sobre a reorientação molecular. Este mesmo raciocínio permite entender o princípio da maioria dos experimentos unidimensionais. Excitando seletivamente somente uma parte do espectro de pó, se houver reorientação molecular durante o tempo de mistura obter-se-á um espectro de pó onde novamente todas as frequências estarão presentes e a forma do mesmo dependerá da geometria do movimento, tal como mostrado na Figura 2.4b. Este experimento foi um dos primeiros experimentos a serem utilizados para estudar o movimento molecular lento em sólidos, sendo a seqüência de pulsos conhecida como SELDON¹⁷ utilizada para promover a excitação seletiva. Uma outra forma de se realizar experimentos de *Exchange* unidimensionais é fazendo com que a amplitude do sinal ou espectro detectado seja modulado por uma função que dependa de alguma relação entre as frequências anisotrópicas antes e depois de t_m . Neste caso, a seleção está implícita na função que correlaciona as duas frequências. Este é o caso de técnicas do tipo Ecos estimulados, EIS e ODESSA, e será o princípio básico das técnicas unidimensionais de *Exchange* que serão propostas neste trabalho.

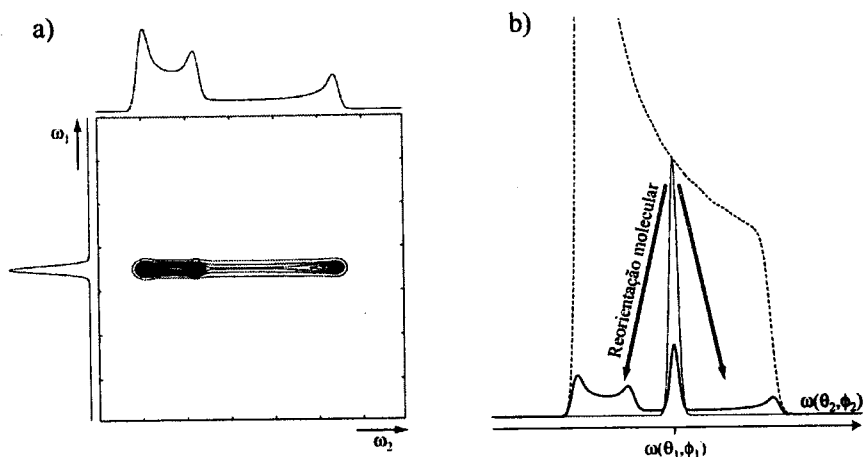


Figura 2.4 - Espectro de RMN de *Exchange* para um caso de excitação seletiva. a) 2D b) 1D.

Para quantificar a discussão é necessário considerar a expressão para as frequências de RMN correspondentes às singularidades do espectros. Para a singularidade ocorrendo em $(\theta_1, \theta_2 = \theta_1 \pm \beta_R)$ tem-se:

$$\begin{pmatrix} \omega_1 \\ \omega_2 \end{pmatrix} = \frac{\delta}{2} \begin{pmatrix} 3 \cos^2 \theta_1 - 1 \\ 3 \cos^2(\theta_1 \pm \beta_R) - 1 \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

Esta expressão representa a equação paramétrica de uma elipse, cujos semi-eixos a e b e a excentricidade são dados respectivamente por:

$$a = \left| \frac{3}{4} \delta \sqrt{2} \cos \beta_R \right|; b = \left| \frac{3}{4} \delta \sqrt{2} \sin \beta_R \right|; \text{excentricidade} = \frac{b}{a} = \tan \beta_R \quad (2.4)$$

Portando, o padrão de máximos do espectro 2D será uma figura elíptica, cuja excentricidade está diretamente relacionada com o ângulo de reorientação. Se o movimento molecular se restringe a saltos discretos entre duas orientações, o ângulo de reorientação, β_R , pode ser extraído diretamente do espectro 2D. Em casos de movimentos com geometria mais complexa, a determinação dos ângulos de reorientação deve ser obtida através da simulação do espectro que pode ser obtida utilizando-se métodos conhecidos. Na referência 13, os procedimentos utilizados na simulação de espectro *Exchange* 2D podem ser encontrados com detalhes.

O conjunto de singularidades para $\theta_2 = 90^\circ$ e $\theta_1 = 90^\circ$, dará origem a linhas no espectro 2D que se estenderão desde a extremidade da elipse até o ponto $(\omega_1(90^\circ), \omega_2(90^\circ))$, isto é, o espectro de pó em ω_1 e ω_2 , respectivamente. Um conjunto de gráficos de contorno referentes a espectros 2D simulados para saltos discretos de vários ângulos estão mostrados

na Figura 2.5b. Mesmo para pequenas variações do ângulo de reorientação, mostrados na parte superior da figura, os espectros são bem distintos, mostrando que os ângulos de reorientação podem ser determinados com boa precisão nos experimentos de *Exchange* 2D. Pode-se ver ainda que no espectro simulado da Figura 2.5a, com ângulo de reorientação de 108° , as projeções do espectro nas duas dimensões são iguais, sendo o próprio espectro de pó. Isto confirma a discussão anterior, onde a simples análise do espectro de pó antes e depois de t_m não traz nenhuma informação sobre o movimento molecular.

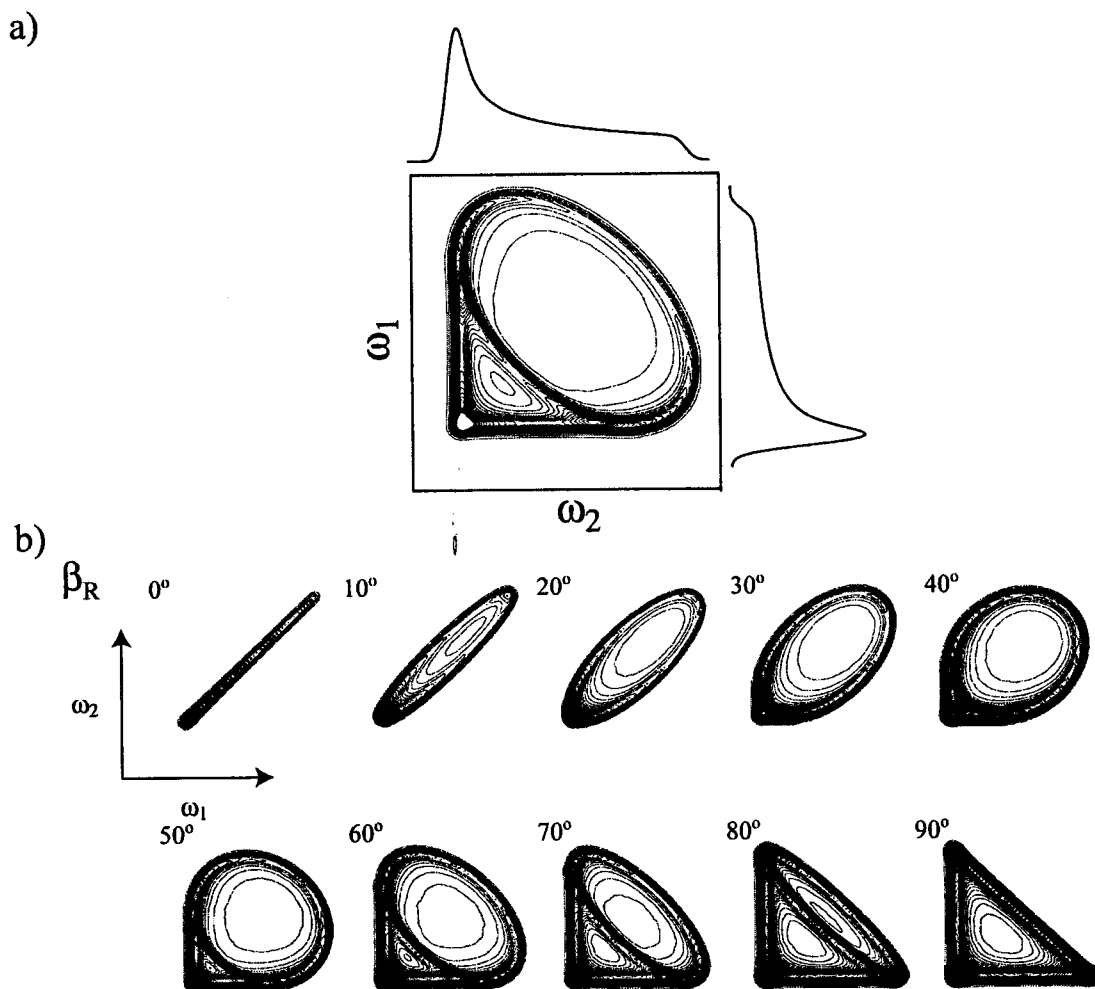


Figura 2.5 - Simulações dos espectros de ^{13}C *Exchange* 2D. a) $\beta_R = 60^\circ$. b) Para vários ângulos de reorientação discretos.

Um aspecto que merece destaque em RMN de *Exchange* 2D é que neste experimento a geometria do movimento é extraída diretamente do espectro, isto é, não é necessário assumir nenhum modelo adicional que correlacione o processo de *exchange* com o movimento molecular. Outras técnicas, como relaxação dielétrica ou mesmo outras metodologias de RMN também podem trazer informações sobre a geometria do

movimento. No entanto, geralmente a extração das informações depende da utilização de modelos específicos que correlacionam as quantidades medidas e os parâmetros do movimento molecular.

2.2.2 – Padrão de intensidade para o espectros Exchange bidimensional ($\eta \neq 0$).

Na seção anterior foi discutido que, no caso em que o tensor de deslocamento químico possui simetria axial ($\eta = 0$), o processo de *Exchange* é definido unicamente pela reorientação do eixo z do SEP. No caso de simetria não-axial, onde $\eta \neq 0$, os três ângulos de Euler (α, β, γ) que definem a reorientação do sistema de eixos principais devem ser considerados, o que torna o cálculo do espectro mais complexo.

Para analisar o espectro 2D no caso de $\eta \neq 0$, é vantajoso ver a situação à partir de um sistema de eixos principais unificado. Neste sistema de coordenadas, todos os diferentes SEP's existentes na amostra são superpostos e as diferentes orientações destes sistemas de eixos são representadas por uma distribuição de orientações dos campos magnéticos, tal como mostrado na Figura 2.6a. Em um experimento de *Exchange* 2D a frequência de precessão antes de t_m calculada no SEP unificado depende basicamente do tensor de deslocamento químico e da orientação do campo magnético \vec{B}_0 neste sistema de coordenadas, sendo dada por¹³:

$$\omega = \omega_0 (\vec{b}_0^{SEP})^T \cdot \tilde{\sigma} \cdot (\vec{b}_0^{SEP}) \quad (2.5),$$

Onde novamente $\vec{b}_0^{SEP} = \frac{\vec{B}_0^{SEP}}{B_0}$ é o vetor unitário que representa a orientação do campo magnético no SEP unificado e $\tilde{\sigma}$ é o tensor de deslocamento químico no mesmo sistema de coordenadas.

Para calcular a frequência depois de t_m é necessário que o tensor de deslocamento químico também seja expresso no SEP unificado. Logo, após uma reorientação envolvendo os ângulos de Euler (α, β, γ), o tensor de deslocamento químico poderá ser escrito como:

$$\tilde{\sigma}_2 = R(\alpha, \beta, \gamma) \cdot \tilde{\sigma} \cdot R^{-1}(\alpha, \beta, \gamma) \quad (2.6)$$

onde a matriz de rotação $R(\alpha, \beta, \gamma)$ é definida de acordo com a convenção de Mehring¹⁸.

Portanto, a frequência de RMN depois da reorientação é:

$$\omega_2 = \vec{b}_0^{SEP} \cdot \vec{\sigma}_2 \cdot \vec{b}_0^{SEP} \quad (2.7)$$

Como a orientação do campo magnético externo no SEP é definida exclusivamente pelas coordenadas polares θ e ϕ do vetor \vec{b}_0^{SEP} tem-se que:

$$\vec{b}_0^{SEP} = \begin{pmatrix} \cos \phi \sin \theta \\ \sin \phi \sin \theta \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

Para obter o espectro de pó, os ângulos θ e ϕ são incrementados dentro do intervalo $0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$ e $0^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$, com cada orientação (θ, ϕ) contribuindo com $(-d \cos \theta)$ para a intensidade do espectro.

O procedimento discutido acima está ilustrado esquematicamente na Figura 2.6a e b. Este procedimento foi utilizado em muitos dos programas desenvolvidos para simular os espectros *Exchange* 2D mostrados neste trabalho. Para maiores detalhes sobre os procedimentos utilizados nas simulações consultar as referências 10,11 e 13 e os apêndices I e II.

Nas Figura 2.6c está mostrada a simulação de um espectro de *Exchange* 2D para simetria não-axial, obtido à partir do procedimento descrito anteriormente

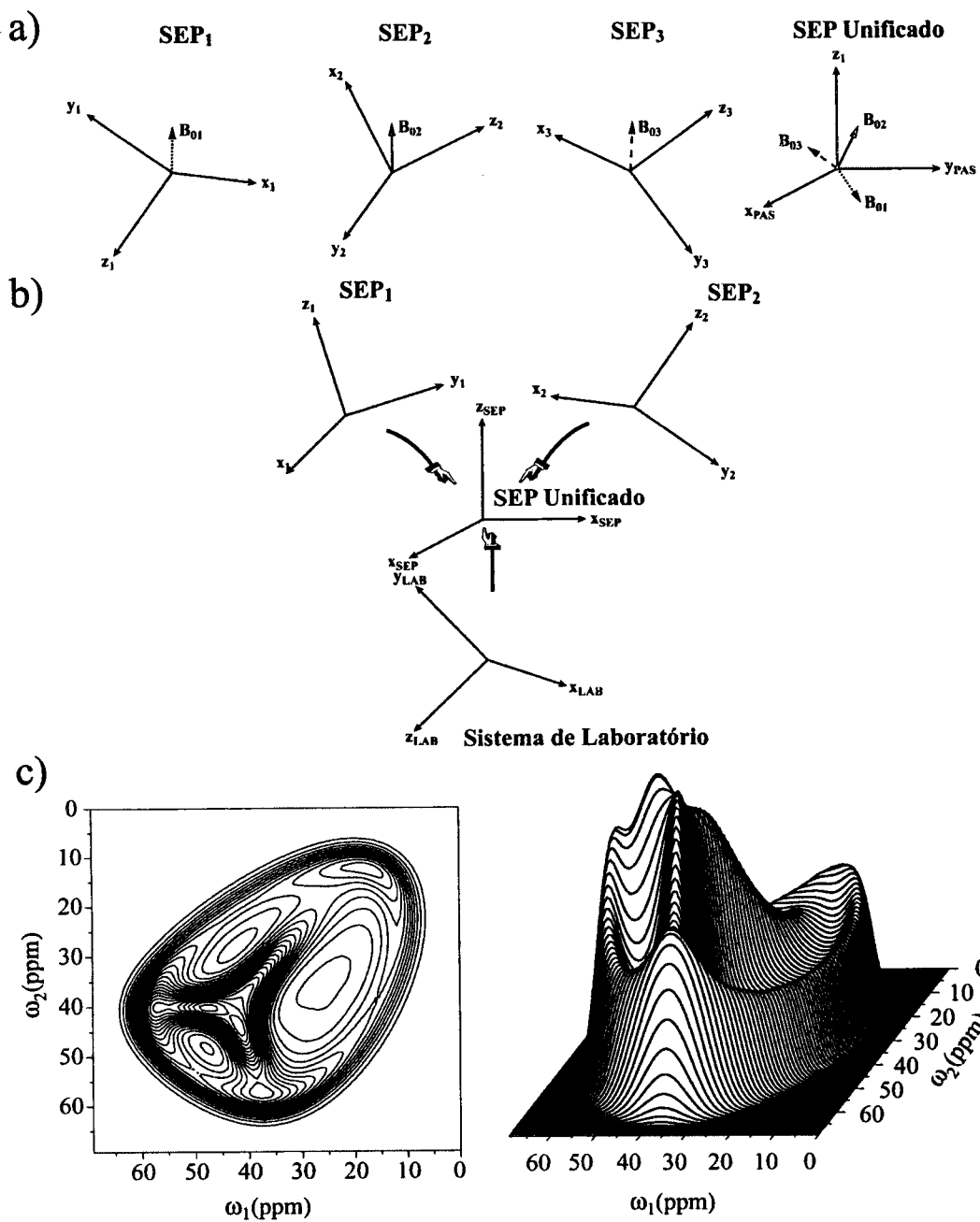


Figura 2.6 - a) Transformação entre os vários SEP's da amostra para o SEP unificado. b) Transformações de coordenadas utilizadas nas simulações de espectros *Exchange* 2D. c) Espectro *Exchange* 2D para $\eta = 0,85$.

2.2.3 - Distribuição de ângulos de reorientação.

Na seção anterior foram discutidos os espectros *Exchange* 2D nos casos onde a reorientação molecular ocorre com ângulos de reorientação β_R bem definidos. No entanto, em muitos casos, principalmente em sistemas amorfos, o movimento molecular envolve

distribuições de ângulos de reorientação. Estas distribuições também pode ser estimadas à partir do experimento *Exchange* 2D.

Particularmente para o caso em que $\eta = 0$, o espectro final será uma superposição dos vários espectros para cada ângulos de reorientação pesados pela probabilidade de ocorrência de cada um deles, $P_f^{\beta_R}(\beta_R)$ com $0 \leq \beta_R \leq 180^\circ$. Reorientações por ângulos β_R e $180^\circ - \beta_R$ são idênticas do ponto de vista de RMN, pois levam à mesma variação na frequência. Deste modo, é possível restringir o domínio de β_R ao intervalo $0 \leq \beta_R \leq 90^\circ$. Neste caso, a função de distribuição de ângulos de reorientação fica:

$$P^{\beta_R}(\beta_R) = P_f^{\beta_R}(\beta_R) + P_f^{\beta_R}(180^\circ - \beta_R) \quad (2.9)$$

A expressão que relaciona o espectro final com os sub-espectros obtidos para cada valor de β_R é portanto:

$$S(\omega_1, \omega_2) = \int_0^{90^\circ} S_{\beta_R}(\omega_1, \omega_2) P^{\beta_R}(\beta_R) d\beta_R \quad (2.10)$$

Através deste procedimento é possível simular o espectro *Exchange* 2D para uma dada distribuição de ângulos de reorientação, permitindo a proposição de modelos para a geometria da reorientação molecular. Existem alguns modelos estabelecidos que descrevem a dinâmica molecular. Geralmente, é possível calcular $P^{\beta_R}(\beta_R)$ para esses modelos e conseqüentemente simular o espectro de *Exchange* 2D correspondente, possibilitando a escolha do modelo mais adequado para descrever as reorientações moleculares estudadas. Alguns desses modelos são: a) reorientações discretas (*discrete jumps*)^{10,11,13}, característico de movimentos que ocorrem entre algumas orientações moleculares preferenciais; b) reorientações aleatórias (*random jumps*)^{10,11,13}, característico de movimentos onde não existem orientações preferenciais, de modo que a reorientação molecular pode ocorrer com mesma probabilidade entre quaisquer orientações; c) difusão rotacional uniaxial (*uniaxial rotational diffusion*)^{10,11,13}, característico de sistemas onde existe um eixo preferencial de rotação; d) difusão rotacional isotrópica (*isotropic rotational diffusion*), característico de sistemas com reorientações isotrópicas em pequenos passos; e) reorientações difusas restritas, característico de sistemas com mobilidade restrita, por exemplo no caso vibrações em torno de um eixo.

Na Figura 2.7 estão mostrados alguns espectros *Exchange* 2D simulados para os modelos de reorientações discreta, reorientações aleatórias, difusão rotacional uniaxial e difusão rotacional isotrópica.

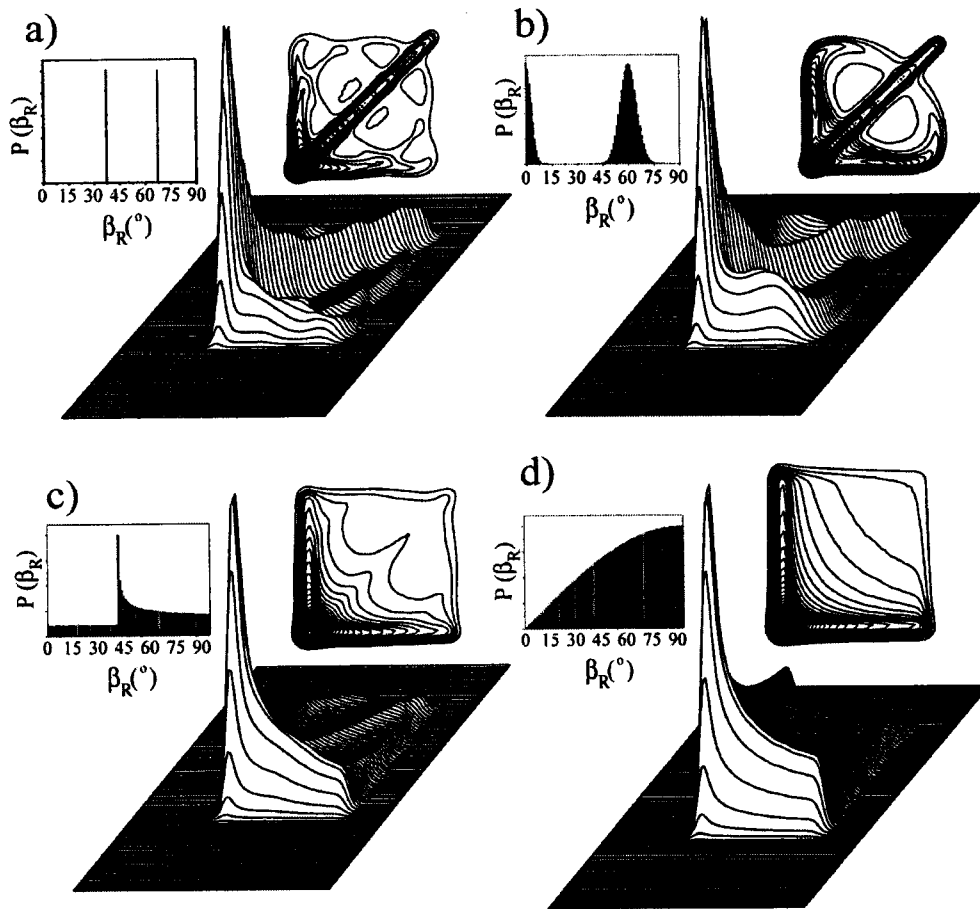


Figura 2.7 - Simulação de espectros *Exchange* 2D para vários modelos de dinâmica molecular. a) Saltos discretos entre dois sítios. b) Saltos discretos com distribuição de ângulos de reorientação. c) Difusão rotacional uniaxial. d) Reorientações aleatórias ou difusão rotacional isotrópica no limite de $t_m = \infty$. As distribuições de ângulos de reorientação utilizadas nas simulações bem como os respectivos gráficos de contorno estão mostradas no topo de cada figura. Os métodos de simulação utilizados estão descritos nas referências 10,11,13.

Até o momento, a dependência do espectro de *Exchange* 2D com o t_m , que se manifesta no espectro através da dependência, $P^{\beta_R}(\beta_R, t_m)$ foi omitida. Na realidade, através desta dependência é possível também obter informações importantes, tais como funções de correlação, tempos de correlação e suas distribuições. Entretanto, para acompanhar a evolução do espectro como função de t_m é necessário que vários espectros 2D sejam adquiridos. Isto é de certa forma inviável, pois o tempo de experimento torna-se demasiadamente longo. Todavia, existem as versões unidimensionais dos experimentos de *Exchange*, tais como *Exchange* 1D com excitação seletiva (SELDON)¹⁷, Ecos

Estimulados¹⁹, *Exchange* 1D com análise das bandas laterais (ODESSA)^{20,21} e *Exchange Induced Sidebands*(EIS)²², que tornam factível a obtenção da escala de tempo do movimento molecular através de experimentos de *Exchange*. Alguns aspectos importantes sobre a dependência dos espectros de *Exchange* com o tempo de mistura serão discutidas em maiores detalhes adiante.

2.2.4 - A matriz de exchange e o experimento *Exchange* 2D no regime de movimento intermediário.

O movimento molecular em RMN de sólidos geralmente é classificado em três regimes de acordo com a escala de tempo ou frequência em que eles ocorrem. No regime rápido, os movimentos ocorrem com frequências da ordem de MHz. Neste caso, a frequência desses movimentos é muito superior à anisotropia das interações internas de RMN e, portanto, o movimento molecular promedia a anisotropia das interações a zero, fazendo com que tais movimentos só possam ser observados através de experimentos de relaxação longitudinal²⁴. No regime intermediário, a frequência dos movimentos moleculares é da ordem de kHz. Nesta faixa de frequência o movimento molecular promedia parcialmente as interações de RMN, fazendo com que seja possível se obter informação sobre tais movimentos através da análise da forma da linha, bem como através de medidas de tempos de relaxação transversal e longitudinal no sistema girante de coordenadas, T_2 e $T_{1\rho}$, respectivamente²⁵. Movimentos lentos ocorrem com frequências inferiores a kHz e geralmente só podem ser observadas por RMN de *Exchange*. No caso de movimentos termicamente ativados, a frequência dos mesmos dependerá da temperatura, que a princípio é um parâmetro livre que pode ser ajustado de tal modo que o movimento molecular ocorra dentro de uma faixa de frequências acessível a um determinado tipo de experimento. No entanto, esta descrição só é válida no caso de sistemas onde todos os movimentos moleculares ocorrem com frequências iguais ou semelhantes, definidas pela temperatura. Em sistemas mais complexos, tais como polímeros, nanocompostos, proteínas ou outros materiais amorfos, normalmente o movimento molecular ocorre segundo uma distribuição de frequências, isto é, o tempo médio em que ocorre uma mudança da orientação molecular, tempo de correlação, varia ao longo da amostra. Em outras palavras pode-se dizer que o movimento molecular ocorre segundo uma distribuição de tempos de correlação, o que faz com que em uma dada temperatura haja ao mesmo tempo segmentos

se movendo no regime de movimento intermediário e lento, dependendo da distribuição de tempos de correlação. No ponto de vista do experimento de *Exchange*, segmentos movendo-se no regime intermediário possuem tempos de correlação comparáveis aos períodos de evolução do experimento, t_1 e t_2 . Neste contexto, a descrição do experimento de *Exchange* deve ser feita de modo a se considerar o efeito do movimento molecular durante os tempos de evolução. Nestes casos, parte da riqueza do experimento de *Exchange* é perdida mas, mesmo assim, algumas informações interessantes podem ser obtidas. Para isso, é necessário utilizar uma forma alternativa na descrição do experimento de *Exchange*, que é baseado na teoria de processos de estacionários de Markov e no formalismo da matriz de *Exchange*. Antes de prosseguir com a análise do experimento de *Exchange* para o regime intermediário, uma breve descrição deste formalismo será apresentada, sendo que uma descrição mais detalhada pode ser encontrada nas referências^{13,26}.

Em termos estatísticos pode-se dizer que o processo de *Exchange* é governado pela probabilidade de que ocorra uma reorientação molecular entre duas orientações acessíveis. A evolução dessa probabilidade como função do tempo pode ser tratada com relativa facilidade e representa uma importante classe de processos estocásticos estacionários de Markov. Mesmo processos estocásticos contínuos (isto é, difusos) podem ser tratados por discretização com um número de sítios suficientemente grande. Para processos de Markov estacionários, onde a probabilidade de um dado evento ocorrer só depende da situação do sistema em um instante imediatamente anterior, a probabilidade W_n de que uma partícula ocupe um sítio $n = 1, \dots, N$ em um dado instante, t , tendo a mesma partido do sítio 1 em $t = 0$, pode ser descrita pela seguinte equação mestre²⁶:

$$\frac{dW_n}{dt} = \sum_{m=1}^N \Pi_{nm} W_m \Rightarrow \frac{d\vec{W}}{dt} = \tilde{\Pi} \vec{W} \quad (2.11)$$

$W_m(t)$ é a probabilidade condicional $W(m, t|1, 0)$ de encontrar uma partícula no sítio m num instante, t , qualquer, tendo a mesma ocupado o sítio 1 no instante $t = 0$. Para considerar uma posição inicial qualquer o vetor \vec{W} deve ser substituído por uma matriz \tilde{W} , e a equação 2.11 fica então dada por.:

$$\frac{dW(n, t|k, 0)}{dt} = \sum_{m=1}^N \Pi_{nm} W(m, t|k, 0) \Rightarrow \frac{d\tilde{W}}{dt} = \tilde{\Pi} \tilde{W} \quad (2.12)$$

Os elementos da matriz de *Exchange* Π_{nm} para $m \neq n$ são as probabilidades de transição do sítio m para n (uma fração Π_{nm} de W_m é transferida para W_n por unidade de tempo). É interessante notar que os elementos diagonais Π_{mm} não representam as probabilidades de transição de m para m . Estes termos não podem ser também a probabilidade de permanecer em m , pois de acordo com a equação 2.11 $\tilde{\Pi}\vec{W}$ representa uma mudança em \vec{W} com o tempo. Ao invés disso, Π_{nm} é sempre menor que zero, e seu valor em módulo representa a probabilidade de transição do sítio m para qualquer outro lugar. Portanto, $\Pi_{mm} = -\sum_{n(\neq m)} \Pi_{nm}$, que é equivalente a:

$$\sum_{m=1}^N \Pi_{nm} = 0. \quad (2.13)$$

A solução formal para a equação mestre 2.11, pode ser escrita como:

$$\vec{W}(t) = e^{\tilde{\Pi}t} \vec{W}(0) \quad (2.14)$$

Como mostrado na referência 13, a matriz exponencial da expressão 2.14 pode ser avaliada se a matriz R que diagonaliza $\tilde{\Pi}$ for conhecida. A relação dos elementos matriciais de $e^{\tilde{\Pi}t}$ como função dos auto-valores e auto-vetores de $\tilde{\Pi}$ é dada por:

$$\left(\tilde{D}^{-1} e^{\tilde{\Pi}t} \tilde{D}\right)_{jk} = \delta_{jk} e^{\pi_j t} \quad (2.15)$$

onde π_j são os auto valores de $\tilde{\Pi}$ e \tilde{D} é a matriz onde a j -ésima coluna contém o autovetor de $\tilde{\Pi}$ correspondente ao auto valor π_j 13,26.

Uma vez descritos os processos de *Exchange* em termos das probabilidades condicionais $W_j(t)$, a extensão para o caso do espectro de RMN de *Exchange* é direta. Tal como discutido na seção 1.4.1, o espectro de *Exchange* 2D representa uma probabilidade condicional. Deste modo, se cada frequência de precessão possível for encarada como um sítio acessível ao movimento molecular, o processo de *exchange* entre esses sítios que é observado no espectro de *Exchange* 2D também pode ser descrito diretamente em termos de uma equação mestre envolvendo a matriz de *exchange*:

$$\frac{dS(\omega_2, t_m | \omega_1, 0)}{dt} = \sum_{\omega=1}^N \Pi_{\omega_1, \omega} S(\omega, t_m | \omega_1, 0) \quad (2.16)$$

onde foi assumido que o processos de *exchange* ocorre entre N frequências discretas. Deste modo, a dependência do processo de *exchange* como função de t_m é dada pela solução da equação 2.16, que em termos matriciais fica dada por:

$$\tilde{S}(t_m) = e^{\tilde{H}_m} \tilde{S}(0) \quad (2.17)$$

Neste caso, as matrizes $\tilde{S}(t_m)$ e $\tilde{S}(0)$ são formadas por elementos do tipo $S(\omega_2, t_m | \omega_1, 0)$ que representam uma mudança de orientação de modo que a frequências de RMN iniciais e finais são caracterizadas dadas por ω_1 e ω_2 , respectivamente. Numa amostra policristalina as frequências ω_1 e ω_2 acessíveis são aquelas dadas pela expressão 1.17, de modo que na expressão 2.17 cada ω_1 e ω_2 representam possíveis frequências iniciais e finais correspondentes a uma orientação dos segmentos moleculares. Deste modo a mudança de frequência de uma dado ω_1 para um dado ω_2 será definida pela matriz de exchange. Portanto, para calcular a dependência em t_m do espectro de exchange deve-se tomar a média sobre todas as orientações possíveis (iniciais e finais) dos segmentos moleculares, média do pó. Deste modo, a dependência do processo de *exchange* com o tempo de mistura pode ser calculada a partir do formalismo da matriz de *exchange*. Como discutido anteriormente, no regime de movimentos lentos não há movimento durante o período de evolução e, desta forma, os spins de cada sítio evoluem independentemente com frequência definida pela orientação do segmento molecular. Desprezando os efeitos da relaxação transversal, esta evolução durante o tempo t pode ser representada pelo seguinte operador matricial:

$$\tilde{S}(t) = e^{i\tilde{\omega}t} \quad (2.18)$$

Onde a matriz $\tilde{\omega}$ é uma matriz diagonal cujos elementos são as frequências de cada sítio i, ω_i . Para N sítios magneticamente não-equivalentes,

$$\tilde{\omega} = \begin{pmatrix} i\omega_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & i\omega_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & i\omega_N \end{pmatrix} \quad (2.19)$$

De acordo com a Figura 2.8, o experimento *Exchange* 2D no regime de movimentos lentos é caracterizado por um período de evolução t_1 , onde os spins evoluem segundo a frequência de cada sítio, seguido de um período de mistura, t_m , onde não há evolução e somente o processo de *exchange* ocorre e, finalmente, um período de detecção, t_2 , onde os spins evoluem novamente de acordo com a anisotropia de deslocamento químico. Deste modo, a evolução do sistema de spins em cada sítio no experimento de

Exchange 2D pode ser calculada através do produto de três matrizes, representando respectivamente a evolução durante t_1 , t_m e t_2 13,26:

$$\tilde{S}(t_1, t_2, t_m) = e^{i\tilde{\omega}_1 t_1} e^{(\tilde{\Gamma}) t_m} e^{i\tilde{\omega}_2 t_2} \quad (2.20)$$

O sinal detectado em RMN é a soma sobre o sinal de todos os sítios (soma sobre todos os elementos da matriz), ponderada pela probabilidade de ocupação de cada um, o que pode ser representado por:

$$S(t_1, t_2, t_m) = \sum e^{i\tilde{\omega}_1 t_1} e^{(\tilde{\Gamma}) t_m} e^{i\tilde{\omega}_2 t_2} \tilde{P} \quad (2.21)$$

Onde a soma é realizada sobre todos os elementos da matriz e \tilde{P} é a matriz diagonal cujos elementos são as probabilidades de ocupação de cada sítio, P_i ,

$$\tilde{P} = \begin{pmatrix} P_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & P_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & P_N \end{pmatrix} \quad (2.22)$$

Portanto, através da expressão 2.22 o sinal obtido no experimento *Exchange* 2D no domínio do tempo pode ser calculado e a transformada de Fourier bidimensional deste sinal resulta no espectro de *Exchange* 2D.

A grande vantagem do formalismo da matriz de *exchange* é que o mesmo pode ser utilizado para calcular os espectros em qualquer regime do movimento molecular. Neste caso, a única modificação necessária é considerar o efeito do movimento durante os períodos de evolução. Isto pode ser feito inserindo a matriz de *exchange* na matriz de evolução 2.18, que passa a ser escrita como:

$$\tilde{S}(t) = e^{(\tilde{\Gamma} + i\tilde{\omega}) t} \quad (2.23)$$

Substituindo essa expressão na equação 2.21, o sinal de *exchange* 2D no domínio do tempo pode ser calculado por:

$$S(t_1, t_2, t_m) = \sum e^{(\tilde{\Gamma} + i\tilde{\omega}) t_1} e^{(\tilde{\Gamma}) t_m} e^{(\tilde{\Gamma} + i\tilde{\omega}) t_2} \tilde{P} \quad (2.24)$$

Esta expressão permite que se possa obter alguma informação sobre movimentos no regime intermediário em experimentos de *exchange* já que a forma do espectro é ligeiramente alterada neste regime.

2.2.5 - Principais limitações da técnica de Exchange 2D.

Embora a técnica de *Exchange* 2D seja a mais tradicional das técnicas de RMN de *Exchange* ela possui duas limitações fundamentais.

A primeira dessas limitações está relacionada com o fato de que a mesma tem sido utilizada somente no estudo de sistemas em que a maior parte dos segmentos moleculares da amostra se reorientam em escalas de tempo da ordem t_m . Caso contrário, o espectro se apresenta com uma intensa diagonal, que se sobrepõe completamente ao sinal dos segmentos móveis. Isto é particularmente ruim para a análise de movimentos de baixa amplitude, cujo espectro se encontra próximo à diagonal. No entanto, mesmo quando o movimento é de grande amplitude, a presença da diagonal pode inviabilizar o estudo, pois, geralmente, uma diagonal intensa implica na presença de artefatos fora da mesma. Portanto, se a fração dos segmentos que se reorientam é pequena, a amplitude do sinal fora da diagonal muitas vezes se encontra abaixo do nível desses artefatos, tornando muito difícil a detecção deste sinal. Um exemplo desta limitação é o estudo do movimento da região amorfa de polímeros semicristalinos em temperaturas próximas às suas transições vítreas. Neste caso, o sinal proveniente da região cristalina do polímero, que geralmente é imóvel durante a transição vítrea, produz uma intensa diagonal no espectro 2D e os artefatos causados pela presença dessa diagonal impede que o padrão de *Exchange* seja visualizado.

A segunda limitação diz respeito à resolução espectral. Os padrões bidimensionais obtidos nos experimentos de *Exchange* são padrões de pó e, por este motivo, o experimento é geralmente limitado ao estudo de sistemas com baixa complexidade química. Se o sistema estudado possui um grande número de sítios distintos de ^{13}C , ocorre a superposição dos padrões de pó de cada um deles, fazendo com que seja praticamente impossível examinar o padrão de *Exchange*. Uma solução para este problema é o enriquecimento específico em ^{13}C de um dado sítio, o que permite a observação do mesmo seletivamente. Embora essa solução seja bastante utilizada, ela possui alguns inconvenientes. O primeiro deles é que trata-se de um processo complicado, algumas vezes quase impossível, e bastante oneroso. O segundo é que em amostras enriquecidas os núcleos de ^{13}C começam a interagir através da interação dipolar ^{13}C - ^{13}C . Esta interação homonuclear faz com que possa haver transferência de polarização entre esses núcleos durante o tempo de mistura. O efeito desta transferência de polarização no espectro

Exchange 2D é idêntico a uma reorientação molecular entre os dois sítios envolvidos no processo. Portanto, torna-se difícil distinguir se o processo de *Exchange* ocorreu por movimento molecular ou por transferência de magnetização. Este problema é geralmente evitado, mantendo os níveis de enriquecimento baixos, o que torna o processo ainda mais difícil. Embora a difusão da polarização de spins seja um efeito indesejado quando os experimentos de *Exchange* são utilizados para o estudo do movimento molecular, este mesmo fenômeno pode ser utilizado para obter informações sobre a estrutura dos materiais. Um exemplo disso pode ser encontrado na referência 38 onde a conformação das cadeias poliméricas do poli(óxido etileno) complexado em para-nitrofenol foi determinada utilizando experimentos de *exchange*.

2.3 - *Exchange Induced Sidebands* (EIS).

Como foi discutido em seção anterior, a determinação de tempos e funções de correlação em experimentos de *Exchange* envolve a aquisição de um conjunto de espectros com diferentes tempos de misturas. Desta forma, a análise dessa dependência utilizando espectros unidimensionais torna-se desejável. Uma das técnicas unidimensionais utilizadas para este fim foi desenvolvida por Yang et. al.²² e denominada *Exchange Induced Sidebands* (EIS). Nesta técnica, a evolução da amplitude das bandas laterais de um espectro unidimensional em função de t_m , fornece diretamente a função de correlação para o movimento molecular.

O experimento EIS é uma combinação da técnica TOSS com o experimento de *Exchange* tal como ilustrado na Figura 2.8. Neste experimento, a magnetização é armazenada no eixo z exatamente onde começaria a aquisição do eco gerado após a seqüência TOSS, isto é no ponto $t^{(5)}$. Durante o tempo de mistura, que deve ser igual a um múltiplo inteiro do período de rotação, a magnetização não evolui no plano transversal e, portanto, nada acontece a não ser a reorientação molecular. Após t_m , a magnetização é transferida novamente para o plano transversal onde é detectada sob MAS. Através da escolha adequada da fase do pulso de 90° imediatamente antes de t_m , tanto o componente cosseno(real) como o seno (imaginário) da magnetização são armazenados na direção z em aquisições sucessivas e o sinal é somado. Deste modo, se não ocorrer mudança na frequência durante t_m , este período não tem outro efeito a não ser permitir relaxação longitudinal. Portanto, a forma do espectro obtido será idêntica ao espectro adquirido com

TOSS, isto é, sem a presença de bandas laterais. Entretanto, se ocorre mudança na frequência durante t_m , a condição TOSS não é mais cumprida e as bandas laterais são reintroduzidas no espectro, juntamente com uma redução na amplitude da banda central.

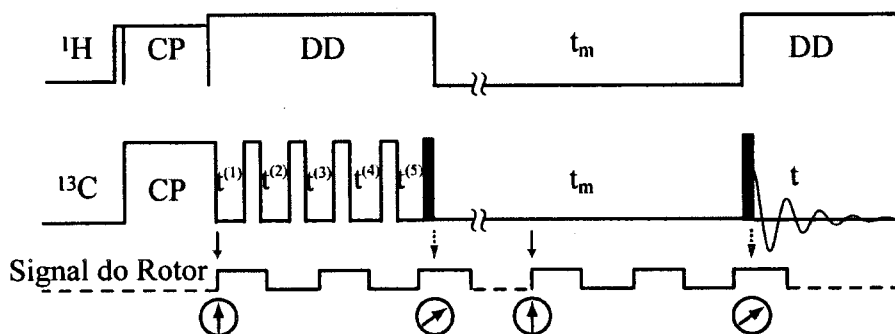


Figura 2.8 - Sequência de pulsos utilizada no experimento EIS. A sincronização do experimento com a frequência de rotação da amostra é indicada pelo sinal do rotor. No início e no final de t_m a fase da rotação da amostra (sinal do rotor na mesma posição) é a mesma, o que implica que t_m é um múltiplo do período de rotação.

Para dar uma descrição mais quantitativa do experimento EIS, alguns dos conceitos discutidos na seção 1.4 e 1.5 serão utilizados. Na seção 1.4 foi mostrado que o sinal complexo para um determinado segmento molecular no instante $t^{(5)}$ é dado por $g(t) = e^{i\omega_{iso}t} f(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^5, \sigma^{SEP})$. Desconsiderando a frequência isotrópica ω_{iso} , como no experimento EIS os componentes seno e cosseno da magnetização são armazenados separadamente na direção z durante t_m , o sinal obtido ao final de t_m é o sinal MAS com a amplitude modulada pela parte real ou imaginária de $f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^5, \sigma^{SEP})$, isto é:

$$g^{EIS}(t; t_m)_{\text{Re}}^{\text{Im}} = \frac{\text{Re}}{\text{Im}} \left[f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^5, \sigma_i^{SEP}) \right] g^{MAS}(t + t^5 + t_m) \quad (2.25)$$

onde,

$$g^{MAS}(t + t^5 + t_m) = f_2^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^5 + \omega_r t_m, \sigma_j^{SEP}) f_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^5 + \omega_r t_m + \omega_r t, \sigma_j^{SEP})$$

Na expressão 2.25 os números 1 e 2 indicam as funções f antes e depois de t_m , enquanto que os índices i e j indicam os tensores de deslocamento químico nos sítios i e j entre os quais o movimento molecular ocorreu.

Após a combinação apropriada dos sinais obtidos com a parte real e imaginária armazenados durante t_m , o sinal EIS no domínio do tempo para um conjunto particular de ângulos de Euler (α, β, γ) é dado por²⁷:

$$g^{EIS}(t, t_m) = \sum_{i,j} e^{(\tilde{H}t_m)_{i,j}} P_i [g_{Re}^{ij}(t; t_m) + g_{Im}^{ij}(t; t_m)] \quad (2.26)$$

Onde P_i é a população de equilíbrio do sítio com tensor de deslocamento químico σ_i , \tilde{H} é novamente matriz de *Exchange*.

Se não ocorrer reorientação molecular durante t_m , a matriz de *exchange* será diagonal e com a soma em i, j o expoente será nulo. Neste caso, desprezando os efeitos de relaxação, o sinal EIS será dado por:

$$g^{EIS}(t; t_m) = \sum_i P_i [g_{Re}^i(t; t_m) + ig_{Im}^i(t; t_m)] \quad (2.28)$$

O que pode ser rescrito como:

$$g^{EIS}(t; t_m) = \sum_i P_i \left[f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s, \sigma_i^{SEP}) \right. \\ \cdot f_1^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s + \omega_r t_m, \sigma_i^{SEP}) \\ \left. \cdot f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s + \omega_r t_m + \omega_r t, \sigma_i^{SEP}) \right] \quad (2.29)$$

Como t_m é um múltiplo do período de rotação e as funções f são periódicas com período t_r , tem-se que:

$$g^{EIS}(t; t_m) = \sum_i P_i \left[f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s, \sigma_i^{SEP}) \right. \\ \cdot f_1^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s, \sigma_i^{SEP}) \\ \left. \cdot f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s + \omega_r t, \sigma_i^{SEP}) \right] \quad (2.30)$$

Considerando que $f_1^*(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s, \sigma_i^{SEP}) f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s, \sigma_i^{SEP}) = 1$, tem-se:

$$g^{EIS}(t; t_m) = \sum_i P_i f_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t^s + \omega_r t, \sigma_i^{SEP}) \quad (2.31)$$

Logo, na ausência de reorientação molecular, a condição TOSS é cumprida e não apareceram bandas laterais no espectro. No entanto, se ocorrerem reorientações moleculares durante t_m a condição TOSS será perturbada e bandas laterais induzidas pelo processo de *Exchange* surgirão no espectro, daí o nome *Exchange Induced Sidebands*. É conveniente notar que a amplitude das bandas laterais é pesada pela função $e^{\tilde{H}t_m}$ que contém a dependência do processo de reorientação molecular com o tempo de mistura. Sendo assim, através da medida da amplitude das bandas induzidas por *Exchange*, pode-se obter informações sobre o movimento molecular lento. De fato, através de um estudo comparativo feito por Favre et al.²⁷ entre as várias técnicas utilizadas na determinação de tempos de correlação para processos lentos, a técnica EIS apresentou resultados bastante satisfatórios.

Embora a técnica EIS seja realizada com rotação da amostra em torno do ângulo mágico, ela ainda é uma técnica de baixa resolução, pois é necessário que as bandas laterais sejam mantidas no espectro, sacrificando a resolução espectral.

2.4 - Aspectos experimentais envolvidos no desenvolvimento e implementação de técnicas modernas de ressonância magnética nuclear.

2.4.1 - Exchange bidimensional no domínio do tempo.

Até o momento os experimentos de *Exchange* 2D foram discutidos sem levar em consideração os aspectos experimentais envolvidos na aquisição do espectro. Uma vez que no desenvolvimento e implementação de novas seqüências de pulsos é imprescindível conhecer todos os aspectos envolvidos, nesta seção serão discutidos alguns princípios básicos envolvidos na aquisição do espectro, transformada de Fourier do sinal adquirido, bem como alguns detalhes que devem ser levados em conta para se obter um espectro livre de artefatos. Uma vez que mais adiante será necessário diferenciar a frequência de precessão dos spins da frequência observada no espectro de RMN, a partir de agora o símbolo Ω será reservado para simbolizar a frequência de precessão dos spins, enquanto que o símbolo ω indicará a frequência observada no espectro de RMN.

As técnicas apresentadas neste trabalho utilizam a interação de deslocamento químico como sonda para o movimento molecular. Os núcleos de maior interesse são o ^{13}C e o ^{15}N , que possuem baixa abundância natural, o que permite desprezar a interação dipolar homonuclear na evolução do sistema de spins. Outro aspecto importante é que os experimentos são realizados sob a condição de desacoplamento heteronuclear, eliminando o efeito da interação dipolar heteronuclear. Portanto, a evolução do sistema de spins será determinada exclusivamente pela interação de deslocamento químico, o que torna o tratamento mais simples. Obviamente, a situação é mais complexa quando uma interação *mais complicada*, como a quadrupolar elétrica, é utilizada como sonda para o movimento molecular no experimento de *Exchange* 2D. No entanto, ainda é possível realizar um tratamento analítico utilizando-se o formalismo do operador densidade em uma base adequada, tal como discutido na referência 23.

A seqüência de pulsos utilizada para adquirir o espectro *Exchange* 2D e a evolução do operador densidade, neste caso completamente equivalente à evolução das

magnetizações, como feito no capítulo anterior, está mostrado na Figura 2.9. O experimento consiste inicialmente na polarização do spin $\frac{1}{2}$ através de alguma seqüência de polarização cruzada, normalmente através da seqüência de Hartman-Hahn. Em seguida, a magnetização transversal evolui sob a ação da interação de deslocamento químico e ao final do tempo de evolução t_1 , dependendo da fase do primeiro pulso de 90° (pulso b), os componentes $\cos(\Omega_1 t_1)$ ou $\sin(\Omega_1 t_1)$ são armazenados na direção z , enquanto que os termos transversais remanescentes defasam durante o tempo de mistura, já que o campo de desacoplamento é desligado durante este período. Durante t_m ocorre a reorientação molecular. Após o último pulso de 90° (pulso c), a magnetização z é novamente transferida para o plano transversal, onde é detectada. Os sinais resultantes são então dados por:

$$S_c(t_1, t_2) = \langle \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \rangle \quad (2.32a)$$

$$S_s(t_1, t_2) = \langle \sin(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \rangle \quad (2.32b),$$

onde a primeira expressão refere-se ao sinal adquirido quando o pulso b é aplicado com fase na direção x e a segunda refere-se ao sinal adquirido quando a fase deste pulso b está na direção y . O símbolo $\langle \rangle$ novamente representa a média sobre todas as possíveis orientações do segmento molecular, média do pó.

Como já mostrado no capítulo 1, na obtenção do sinal bidimensional, t_1 é incrementado em intervalos igualmente espaçados e um conjunto de FIDs (sinais unidimensionais, do inglês *Free Induction Decay*) são adquiridos, digitalizados e armazenados em uma matriz de dados bidimensional. O espectro 2D é então obtido através da transformada de Fourier bidimensional desta matriz de dados.

Um outro procedimento essencial para a aquisição correta do sinal bidimensional do qual se obtém o espectro de *Exchange* é a ciclagem das fases dos pulsos de RF. A ciclagem de fases dos pulsos é utilizada à princípio para selecionar a coerência quântica que se deseja observar no espectro ^{13,23} e também para se obter um espectro livre de artefatos.

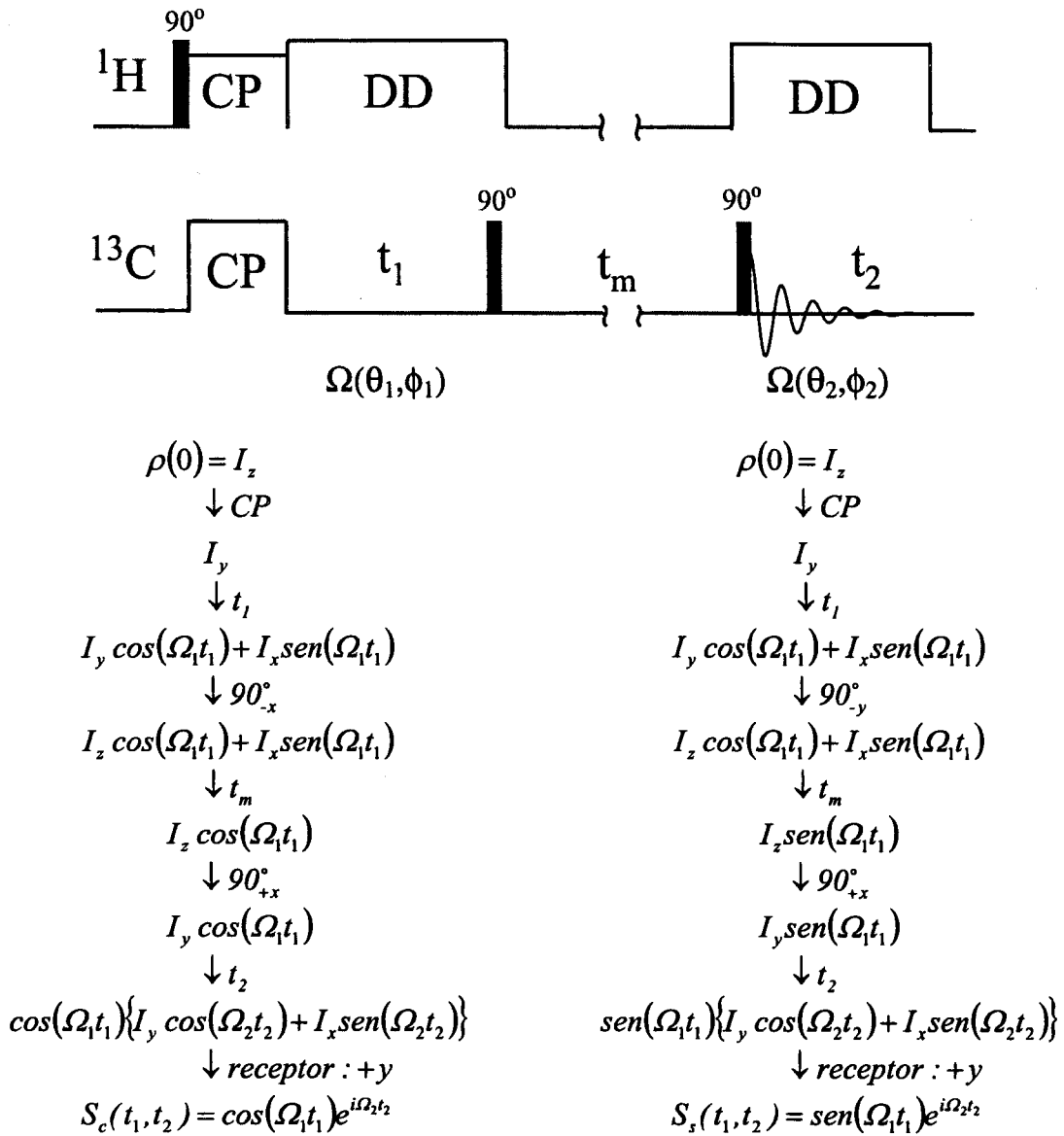


Figura 2.9 - Sequência de pulsos utilizada na aquisição do espectro *Exchange* 2D via deslocamento químico. A evolução dos termos importantes do operador densidade (neste caso a mesma evolução do vetor magnetização) também está mostrada na figura.

2.4.2 - Métodos de Transformada de Fourier em Espectroscopia Bidimensional.

Uma vez que é possível medir separadamente os sinais $S_c(t_1, t_2)$ e $S_s(t_1, t_2)$ a forma mais trivial de se combinar estes sinais seria assumindo um como a parte real e o outro como a parte imaginária do sinal complexo, isto é:

$$S(t_1, t_2) = \langle S_c(t_1, t_2) \rangle + i \langle S_s(t_1, t_2) \rangle = \langle e^{i \Omega_1 t_1} e^{i \Omega_2 t_2} \rangle \quad (2.33)$$

A transformada de Fourier bidimensional deste sinal é obtida tomando-se a transformada de Fourier sucessivamente em t_2 e em t_1 , isto é:

$$\begin{aligned}
 F(\omega_1, \omega_2) &= FT_{2D}\{S(t_1, t_2)\} = FT_1 FT_2 \left\langle \left\langle e^{i\Omega_1 t_1} e^{i\Omega_2 t_2} \right\rangle \right\rangle \\
 &= \langle (A_1(\omega_1 - \Omega_1) + iD_1(\omega_1 - \Omega_1))(A_2(\omega_2 - \Omega_2) + iD_2(\omega_2 - \Omega_2)) \rangle \quad (2.34) \\
 &= \left\langle \left(A_1(\omega_1 - \Omega_1)A_2(\omega_2 - \Omega_2) - D_1(\omega_1 - \Omega_1)D_2(\omega_2 - \Omega_2) \right) + \right. \\
 &\quad \left. i(D_1(\omega_1 - \Omega_1)A_2(\omega_2 - \Omega_2) + A_1(\omega_1 - \Omega_1)D_2(\omega_2 - \Omega_2)) \right\rangle
 \end{aligned}$$

A presença do componente dispersivo ($D_1 D_2$) na parte real da transformada, provoca uma distorção de fase severa no espectro 2D, usualmente conhecida como *phase twist*^{28,29}. Na verdade a presença do *phase twist* está relacionada com o fato que para se obter um espectro com quadratura de fase na dimensão ω_1 não basta combinar os sinais com na expressão 2.33, mas esquemas especiais devem ser utilizados. Existem alguns esquemas padrão para solucionar este problema. Os mais conhecidos são: a) a aquisição fora de ressonância em t_1 ¹³, b) o método desenvolvido por States et al.³⁰, denominado States ou alternativamente aquisição de dados hipercomplexos e c) o método denominado *Time-Proportional Phase Incrementation* (TPPI)^{31,32}.

O método de aquisição fora de ressonância é o mais simples e a idéia é a mesma da aquisição simples fora de ressonância em experimentos unidimensionais. Após a evolução t_1 , somente a componente cosseno da magnetização é armazenado durante t_m , resultando em um sinal dado por $\cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2}$. A transformada de Fourier deste sinal é:

$$\begin{aligned}
 F_c(\omega_1, \omega_2) &= FT_{2D}\{S_c(t_1, t_2)\} = \text{Re}\left(FT_1\left[\text{Re}\left(FT_2\left[\cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2}\right]\right)\right]\right) = \\
 &= \text{Re}\left(FT_1\left[\text{Re}\left(\cos(\Omega_1 t_1)(A_2 + iD_2)\right)\right]\right) \\
 &= \text{Re}\left(FT_1\left[\left\langle \frac{1}{2}(e^{i\Omega_1 t_1} + e^{-i\Omega_1 t_1}) \right\rangle A_2(\omega_2 - \Omega_2)\right]\right) \quad (2.35) \\
 &= \frac{1}{2}\langle (A(\omega_1 - \Omega_1) + A(\omega_1 + \Omega_1))A_2(\omega_2 - \Omega_2) \rangle
 \end{aligned}$$

onde o índice c indica o componente cosseno. Assumindo $A(\omega_1 + \Omega_1) = 0$ para $\omega_1 \geq 0$. Isto é equivalente a assumir $A(\omega_1 - \Omega_1) = 0$ para $\omega_1 \leq 0$, o que pode ser obtido através da escolha da frequência de detecção ω_R ligeiramente fora da região do espectro (técnica fora de ressonância). Tem-se então:

$$F_c(\omega_1, \omega_2) = \frac{1}{2}\langle A_1(\omega_1 - \Omega_1)A_2(\omega_2 - \Omega_2) \rangle \quad \text{para } \omega_1 \geq 0 \quad (2.36)$$

A expressão 2.36 mostra que o espectro não contém componentes dispersivos e, portanto, não há problemas de distorções de fase.

No método States, após a evolução t_1 tanto a componente cosseno da magnetização quanto a seno são armazenados durante t_m . Neste caso, a transformada de Fourier do sinal obtido para a componente seno é dada por:

$$\begin{aligned}
 F_s(\omega_1, \omega_2) &= FT_{2D}\{S_s(t_1, t_2)\} = Re\left\{FT_1\left[Re\left\{FT_2\left\langle sen(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \right\rangle\right\}\right]\right\} = \\
 &= Re\left\{FT_1\left[Re\left\{sen(\Omega_1 t_1)(A_2 + iD_2)\right\}\right]\right\} = \\
 &= Re\left\{FT_1\left[\left\langle \frac{i}{2}(e^{i\Omega_1 t_1} - e^{-i\Omega_1 t_1}) \right\rangle A_2(\omega_2 - \Omega_2)\right]\right\} = \\
 &= \frac{i}{2}\left\langle (A(\omega_1 - \tilde{\omega}_1) - A(\omega_1 + \Omega_1))A_2(\omega_2 - \Omega_2) \right\rangle
 \end{aligned} \tag{2.37}$$

Para obter o espectro com quadratura de fase em ω_1 , no método States as transformadas dos sinais seno e cosseno são combinadas de modo que:

$$\begin{aligned}
 F_{States}(\omega_1, \omega_2) &= Re\{F_c(\omega_1, \omega_2)\} - Im\{F_s(\omega_1, \omega_2)\} = \\
 &= A_1(\omega_1 - \Omega_1)A_2(\omega_2 - \Omega_2)
 \end{aligned} \tag{2.38}$$

Novamente, obtém-se um espectro sem as distorções de fase. Este método é equivalente a aquisição em fase e quadratura nos espectros unidimensionais.

O método TPPI consiste basicamente em incrementar a fase da componente da magnetização detectada por 90° cada vez que t_1 for incrementado. Por exemplo no experimento *Exchange* 2D mostrado na Figura 2.1, isto é realizado incrementando a fase dos pulsos imediatamente antes de t_m por $\pi/2$ (ou 90°) a cada incremento em t_1 . O sinal detectado pode ser escrito como:

$$S(t_1, t_2) = \left\langle \cos\left(\Omega_1 t_1 + \frac{\pi}{2\delta} t_1\right) e^{i\Omega_2 t_2} \right\rangle \tag{2.39}$$

onde δ é o intervalo de amostragem em t_1 (*dwell time*) ($\delta = 1/2f_1$). Para incrementos pares ($t_1 = n_p \delta$) a fase adicional é um múltiplo de π , enquanto que para incrementos ímpares ($t_1 = n_i \delta$) esta fase é um múltiplo de $\pi/2$. O sinal para incrementos pares e ímpares, já com a transformada de Fourier em t_2 , é dado por:

$$\begin{aligned}
 S_p(t_1, \omega_2) &= \left\langle \cos(\Omega_1 t_1) \cos\left(\frac{\pi}{2\delta} t_1\right) A_2 \right\rangle = \\
 &= \left\langle \frac{1}{2} \left[\cos\left(\left(\Omega_1 - \frac{\pi}{2\delta}\right) t_1\right) + \cos\left(\left(\Omega_1 + \frac{\pi}{2\delta}\right) t_1\right) \right] A_2 \right\rangle \\
 S_i(t_1, \omega_2) &= \left\langle \sin(\Omega_1 t_1) \sin\left(\frac{\pi}{2\delta} t_1\right) A_2 \right\rangle = \\
 &= \left\langle \frac{1}{2} \left[-\cos\left(\left(\Omega_1 - \frac{\pi}{2\delta}\right) t_1\right) + \cos\left(\left(\Omega_1 + \frac{\pi}{2\delta}\right) t_1\right) \right] A_2 \right\rangle
 \end{aligned} \tag{2.40}$$

onde $A_2 = A_2(\omega_2 - \Omega_2)$. Somando os sinais:

$$S_{TPPI}(t_1, \omega_2) = S_i(t_1, \omega_2) + S_p(t_1, \omega_2) = \left\langle \cos\left(\left(\Omega_1 + \frac{\pi}{2\delta}\right) t_1\right) A_2 \right\rangle \tag{2.41}$$

Com a transformada de Fourier em t_1 obtém-se:

$$S_{TPPI}(\omega_1, \omega_2) = \left\langle \left(A\left(\omega_1 - \Omega_1 - \frac{\pi}{2\delta}\right) + A\left(\omega_1 + \Omega_1 + \frac{\pi}{2\delta}\right) \right) A_2(\omega_1 - \Omega_1) \right\rangle \tag{2.42}$$

Logo, o resultado é um par de espectros sem distorção de fase em $-\Omega_1 - \pi/2\delta$ e $\Omega_1 + \pi/2\delta$. δ deve ser escolhido para evitar efeitos de *aliasing* no espectro. É conveniente notar a diferença entre as expressões 2.36 e 2.42. Enquanto em 2.36 a amplitude de cada espectro é multiplicada por um fator $1/2$ isso não acontece em 2.42. Além disso, o fator extra $\pi/2\delta$ permite que o efeito de *aliasing* seja evitado através da escolha adequada do parâmetro δ , ainda que o espectro seja adquirido em ressonância.

2.4.3 - Eliminação de artefatos devido a imperfeições experimentais em RMN através de ciclagem de fases.

Técnicas modernas de RMN geralmente envolvem a aplicação de vários pulsos de RF combinados com períodos de evolução, com o objetivo de codificar no sinal de RMN a informação específica que se deseja obter. Para que esse objetivo seja alcançado, as fases dos pulsos devem ser escolhidas adequadamente de acordo com a evolução desejada para o sistema de spins. No entanto, vários fatores experimentais podem vir a interferir na seleção do sinal desejado, comprometendo a qualidade dos resultados obtidos. Muitos desses fatores estão associados a imperfeições nos pulsos de RF e no próprio sistema de aquisição (imperfeições de *hardware*), enquanto outros estão relacionados diretamente com a evolução do sistema de spins, que em muitos casos leva ao aparecimento de sinais

espúrios, os quais não contêm informação sobre o processo estudado. Em ambos os casos, os problemas podem ser minimizados ou mesmo eliminados utilizando-se métodos de ciclagem de fase. Estes métodos consistem basicamente na mudança das fases dos pulsos de RF e do receptor de forma controlada durante a aquisição do sinal com o objetivo de selecionar o sinal desejado e eliminar os sinais espúrios. Algumas dessas imperfeições e a ciclagem de fases utilizada na supressão dos mesmos serão discutidas à seguir.

2.4.3.1 - Artefatos de polarização direta.

Um detalhe importante do experimento de Polarização Cruzada que não foi discutido anteriormente é a possibilidade do pulso de RF de contato Hartman-Hahn sobre o núcleo de ^{13}C agir como um pulso de excitação direta produzindo magnetização transversal. A menos que $\gamma B_1 t_c = n\pi$, com n ímpar, após um experimento de CP haverão duas magnetizações transversais de ^{13}C , uma proveniente do processo de polarização cruzada e a outra devida à polarização direta deste núcleo pelo pulso de contato. Como a magnetização devida à polarização direta está 90° fora de fase em relação à magnetização resultante da polarização cruzada, o resultado da superposição das duas é o aparecimento de um artefato que se manifesta como uma distorção de fase do espectro obtido³³. Para eliminar este artefato é necessário suprimir a contribuição da magnetização devida à polarização direta, o que pode ser feito através de um procedimento simples de ciclagem de fases. Em um experimento de polarização cruzada, a inversão da fase do pulso de 90° no núcleo de ^1H implica na inversão do sinal da magnetização de ^{13}C ³³. Por outro lado, essa inversão de fase não altera o sinal da magnetização de ^{13}C devido a polarização direta pelo pulso de contato. Deste modo, subtraindo-se duas aquisições sucessivas obtidas com a inversão do pulso de ^1H as magnetizações originadas da polarização cruzada se somarão, enquanto que as magnetizações devidas à polarização direta se cancelarão. A subtração dos sinais é feita através da inversão da fase do receptor entre as duas aquisições.

2.4.3.2 - Artefatos devidos às imperfeições na detecção em fase e quadratura.

O esquema padrão de aquisição do sinal nos espectrômetros de RMN modernos é a detecção em fase e quadratura. Para ilustrar simplificadaamente este processo de detecção é necessário considerar o esquema do receptor heterodino mostrado na Figura 2.10³⁴.

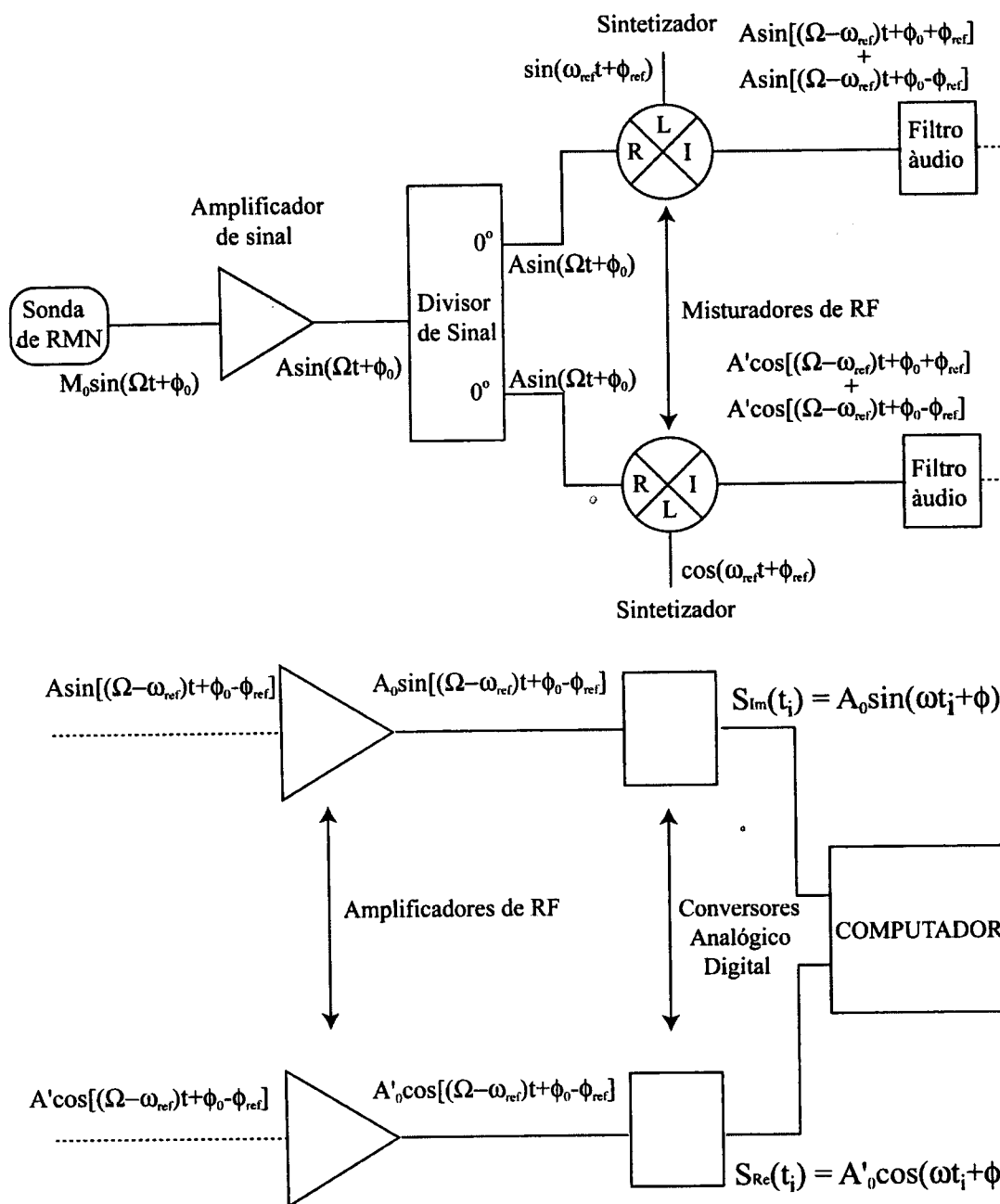


Figura 2.10 - Esquema básico de um receptor homodino.

Neste caso, o sinal de RMN, com frequência Ω , entra no receptor diretamente em um divisor de potência ($0^\circ, 0^\circ$), o qual divide o sinal de RMN em dois sinais de RF idênticos. Estes dois sinais com frequência Ω são destinados a dois misturadores, nos quais já foram introduzidos sinais de RF de referência provenientes da saída principal do sintetizador, divididos por um divisor de potência ($0^\circ, 90^\circ$) e com frequência ω_{ref} . Ω e ω_{ref} são próximas, sendo que a diferença entre elas, ω , está contida na faixa de áudio, o que permite a digitalização do sinal. A frequência diferença ω é selecionada na saída dos

misturadores de RF através de um filtro passa baixa (filtro de áudio). No ramo superior da Figura 2.10 o sinal de referência introduzido no misturador foi $\sin(\omega_{\text{ref}}t + \phi_{\text{ref}})$, resultando na detecção do sinal $S_{\text{Im}}(t_i) = A_0 \sin(\omega t_i + \phi)$. Se o sinal de referência introduzido no misturador é $\cos(\omega_{\text{ref}}t + \phi_{\text{ref}})$, tal como mostrado no ramo inferior da Figura 2.10, o sinal detectado será $S_{\text{Im}}(t_i) = A'_0 \cos(\omega t_i + \phi')$. Se as operações de *hardware* executadas no ramos superior e inferior da Figura 2.10, são idênticas, então $A_0 = A'_0$ e $\phi = \phi'$. Os dois sinais podem ser combinados de modo a resultar em $S(t_i) = S_{\text{Re}}(t_i) + iS_{\text{Im}}(t_i) = A_0 e^{i(\omega t_i + \phi)}$, cuja transformada de Fourier resulta no espectro de RMN adquirido em fase e quadratura. Entretanto, os componentes de *hardware* do ramo superior da Figura 2.10 certamente não são idênticos aos do ramo inferior, o que resulta em $A_0 \neq A'_0$ e $\phi \neq \phi'$. Isto faz com que a detecção em fase e quadratura não seja perfeita, resultando no aparecimento de artefatos relacionados com essa imperfeição. Esses artefatos são eliminados por um esquema de ciclagem de fases denominado CYCLOPS. O esquema CYCLOPS consiste em deslocar a fase de todos os pulsos de RF da seqüência e do receptor em passos de 90° em aquisições sucessivas. Isso faz com que em algumas aquisições a parte real (componente cosseno) do sinal seja adquirida no ramo superior do receptor e a parte imaginária (componente seno) no ramo inferior e em outras a situação seja invertida, resultando no cancelamento da imagem de quadratura³³.

2.4.3.3 - Artefatos devidos às imperfeições dos pulsos de 180° aplicados individualmente.

Os pulsos de refocalização de 180° são comuns a várias seqüências de pulsos de RMN. No entanto, se o ângulo de rotação desses pulsos não é exatamente de 180° , é comum o aparecimento de artefatos no espectro resultante. Isto acontece porque em seqüências com muitos pulsos de RF de 180° um erro no ângulo de rotação de um pulso de refocalização dá origem a magnetizações ou coerências quânticas residuais, que acabam aparecendo sobrepostas ao sinal observado. Em seqüências de pulsos envolvendo um ou alguns pulsos de 180° existe um esquema de ciclos de fases denominado EXORCYCLE²⁸, que minimiza os artefatos espectrais causados pela imperfeição de pulsos de 180° . Normalmente, o EXORCYCLE é realizado mudando a fase do pulso de 180° por 0° , 90° , 180° , 270° e invertendo a fase do receptor a cada dois ciclos. No entanto, uma forma alternativa é uma combinação do EXORCYCLE com o esquema de CYCLOPS, o que é

feito mantendo-se a fase do pulso de 180° fixa e variando-se a fase de todos os outros pulsos de seqüência em passos de 90° e novamente invertendo a fase do receptor a cada dois ciclos. Este esquema funciona bem quando não existe um número excessivo de pulsos de 180° no experimento. Caso contrário, outros esquemas de ciclos de fase mais elaborados devem ser utilizados para minimizar os efeitos das imperfeições dos pulsos de 180° .

2.4.3.4 - Artefatos devidos às imperfeições nos pulsos de 180° em seqüências envolvendo pulsos sucessivos.

Um único pulso de 180° funciona razoavelmente bem na inversão da magnetização, desde que ele tenha a duração correta e que não seja aplicado muito fora de ressonância. De fato, alguns estudos³⁵ mostraram que erros de até 10% na duração de pulsos de 180° ainda são aceitáveis em se tratando de um único pulso. No entanto, a situação se complica quando uma seqüência de pulsos de 180° é aplicada. Nesses casos, os erros provocados pela imperfeição de cada um dos pulsos se acumulam, comprometendo o resultado final. Entretanto, existe uma série de possíveis esquemas de ciclagem de fase dos pulsos de 180° , denominados superciclos, que podem ser utilizados para minimizar as imperfeições experimentais. Muitos desses esquemas já foram aplicados em seqüências de múltiplos ecos, tais como (*Carr-Purcell-Meighboom-Gill*)CPMG³⁶ e (*Rotational Echo Double Resonance*) REDOR³⁷. Os esquemas de ciclagem de fase variam de acordo com o número de pulsos de 180° presentes na seqüência de pulsos. Na Tabela 2.1 estão mostrados alguns desses esquemas. O esquema mais utilizado é o denominado *xy-8*, que consiste em aplicar os pulsos de RF com uma fases *x y x y x y x*, repetindo a cada 8 pulsos³⁶. Nos casos em que o número de pulsos é múltiplo de 8, o ciclo de fases pode ser interrompido, às custas de alguma perda em sua eficiência. Como será visto no próximo capítulo, nos experimentos utilizados neste trabalho o número de pulsos de 180° é variado para se obter informações sobre a geometria do movimento molecular. Deste modo, os diferentes esquemas mostrados na Tabela 2.1 são utilizados de acordo com o número de pulsos aplicados.

Tabela 2.1 – Superciclos para a compensação de imperfeições em pulsos de 180°. As barras indicam as fases negativas.

Super-ciclo	Fases da RF
xy-4	$(xyxy)^n$
xy-8	$(xyxy yxyx)^n$
xy-16	$(xyxy yxyx \overline{xyxy} \overline{yxyx})^n$
xy-32	$(xyxy yxyx \overline{xyxy} \overline{yxyx} \overline{\overline{xyxy}} \overline{\overline{yxyx}})^n$
xy-64	$\left(\begin{array}{l} xyxy yxyx \overline{xyxy} \overline{yxyx} \overline{\overline{xyxy}} \overline{\overline{yxyx}} \\ \overline{\overline{xyxy}} \overline{\overline{yxyx}} xyxy yxyx \overline{\overline{xyxy}} \overline{\overline{yxyx}} \overline{\overline{xyxy}} \overline{\overline{yxyx}} \end{array} \right)^n$

2.4.3.5 - Artefatos de T_1 .

Em experimentos de RMN de *Exchange* é comum o aparecimento de artefatos denominados artefatos de T_1 . Para entender a origem do artefato de T_1 , suponha que na amostra existam duas espécies cujos tempos de relaxação longitudinal dos spins sejam muito diferentes, sendo um deles mais curto do que o tempo de evolução na seqüência de *Exchange* bidimensional $T_1 \ll t_1$. Após a excitação através de polarização cruzada, os spins com T_1 curto relaxam rapidamente e, ao final do tempo de evolução, a magnetização correspondente a esses spins retornam a direção z. Esta magnetização é transferida novamente para o plano transversal devido ao segundo pulso, mas relaxa novamente e, ao final de t_m , está alinhada ao longo da direção z. Após o último pulso, esta magnetização é transferida para o plano transversal e então detectada como um sinal espúrio. Todavia, este sinal não contém a codificação correta em t_1 e isso implica que aparecerá no espectro bidimensional um artefato, conhecido como artefato de T_1 . Para eliminar este sinal espúrio, um esquema bem simples de ciclagem de fases pode ser utilizado. Neste esquema, a fase do segundo pulso é invertida em duas aquisições sucessivas e os sinais resultantes de cada uma das aquisições são subtraídos através da inversão da fase do receptor. Isto faz com que a magnetização desejada seja armazenada em +z em uma das aquisições e -z na outra, produzindo sinais com diferença de fase de 180° que se somam ao final da seqüência devido a inversão da fase do receptor. Por outro lado, conforme esquematizado na Figura 2.11, a magnetização dos spins com T_1 muito curto não depende da fase do segundo pulso, pois é resultante da relaxação longitudinal durante t_m e, desta forma, os sinais correspondentes às duas aquisições são idênticos, havendo o cancelamento dos mesmos quando subtraídos.

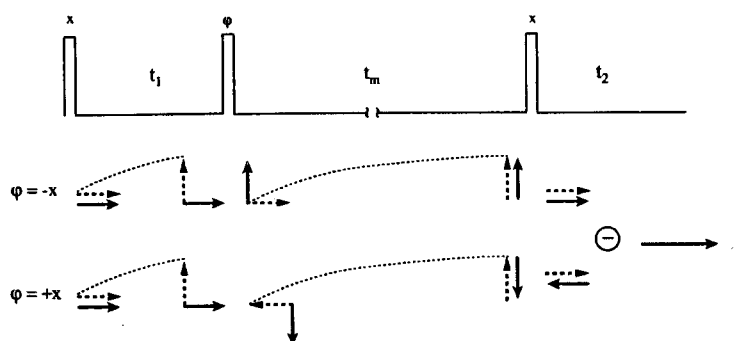


Figura 2.11 – Esquema utilizado para a eliminação dos artefatos de T_1 . Através da alternância da fase do pulso ϕ e do receptor, somente o componente da magnetização que evolui completamente durante t_1 é adquirido.

Os esquemas de ciclagem básicos de fase discutidos anteriormente serão utilizados para montar os ciclos de fase mais complexos a serem utilizados nas técnicas que serão propostas neste trabalho. Desta forma, dependendo das características da seqüência de pulsos, vários desses esquemas deverão ser combinados para obter a ciclagem de fase total do experimento. Por exemplo, a ciclagem de fase necessária em um experimento *Exchange* 2D inclui os esquemas para eliminação de artefatos de polarização direta, T_1 e imperfeições na detecção em fase e quadratura, resultando no ciclo de fases mostrado na Tabela 2.2. Para obter o ciclo de fases completo da tabela 2.2 as fases dos pulsos *a, b, c*, e do receptor devem ser alternadas de $0^\circ, 90^\circ, 180^\circ$ e 270° conforme indicado pelo símbolo ϕ .

Tabela 2.2 - Ciclo de fases necessário para eliminação de artefatos no experimento *Exchange* 2D. O símbolo ϕ indica o incremento de 90° da fase.

$^1\text{H}90^\circ$	A	b	c	Receptor	Componente
$\pm y$	$+y+\phi$	$-x+\phi$	$+x+\phi$	$\pm y+\phi$	$\cos(\Omega_1 t_1)$
$\pm y$	$+y+\phi$	$+x+\phi$	$+x+\phi$	$\pm y+\phi$	$\cos(\Omega_1 t_1)$
$\pm y$	$+y+\phi$	$+y+\phi$	$-y+\phi$	$\pm x+\phi$	$\text{sen}(\Omega_1 t_1)$
$\pm y$	$+y+\phi$	$-y+\phi$	$-y+\phi$	$\pm x+\phi$	$\text{sen}(\Omega_1 t_1)$

2.5 - Conclusão.

Neste capítulo foram discutidos os fundamentos básicos e as principais técnicas de RMN de *Exchange*. O objetivo desta discussão, além de introduzir os experimentos, foi mostrar como os mesmos podem ser utilizados no estudo de movimentos moleculares lentos. Os aspectos experimentais envolvidos na implementação das técnicas e bem como as limitações das mesmas também foram apresentados. Com base nestas limitações, nos próximos capítulos serão propostas novas metodologias que objetivam superar as limitações mais comuns dos experimentos de RMN de *Exchange*.

2.6 - Referências.

- [1] Connor, T. M.; Read, B. E.; Willians, G. *J. Appl. Chem.* **1964**, *14*, 74-81.
- [2] Palmer, A. G.; Williams, J.; McDermott, A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13293-13310.
- [3] Andronis, V.; Zografi, G. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 835-842.
- [4] Favre, D. E.; Schaefer, D. J.; Auerbach, S. M.; Chmelka, B. F. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 5852-5855.
- [5] McKenna, G. B. *Comp. Mater. Sci.* **1995**, *4*, 349-360.
- [6] Schaefer, J.; Stejskal, E. O.; McKay, R. A.; Dixon, W. T. *Macromolecules* **1984**, *17*, 1107.
- [7] Spiess, H. W. *Rotation of Molecules and Nuclear Spin Relaxation*; 1st ed.; Diehl, P., Fluck, E. and Kosfeld, R., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1978; Vol. 15, pp 59-214.
- [8] Schmidt-Rohr, K.; Clauss, J.; Spiess, H. W. *Macromolecules* **1992**, *25*, 3273.
- [9] Röessler, E. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *128*, 330-335.
- [10] Wefing, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1219-1233.
- [11] Wefing, S.; Kaufmann, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1234-1244.
- [12] Schmidt-Rohr, K.; Kulik, A. S.; Beckham, H. W.; Ohlemacher, A.; Pwelzik, U.; Spiess, H. W. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4733 - 4745.
- [13] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; 1st ed.; Academic Press: London, 1994; Vol. 1.
- [14] Tracht, U.; Wilhelm, M.; Heuer, A.; Feng, H.; Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 2727-2730.
- [15] Tracht, U.; Wilhelm, M.; Heuer, A.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*, 460-470.
- [16] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 3020-3023.
- [17] Tekely, P.; Brondeau, J.; Elbayed, K.; Retournard, A.; Canet, D. *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 509.
- [18] Mehring, M. *High Resolution NMR Spectroscopy in Solids*; Springer-Verlag: Germany, 1982; Vol. 11.
- [19] Fujara, F.; Wefing, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1986**, *97*, 2928.

- [20] Reichert, D.; Zimmermann, H.; Tekely, P.; Poupko, R.; Luz, Z. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 245-258.
- [21] Gèrardy-Montouillout, V.; Malveau, C.; Tekely, P.; Olender, Z.; Luz, Z. *J. Magn. Reson.* **1996**, *A123*, 7-15.
- [22] Yang, Y.; Schuster, M.; Blümich, B.; Spiess, H. W. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *139*, 239-243.
- [23] Schmidt, C.; Blümich, B.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **1988**, *79*, 269-290.
- [24] Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*; 3rd ed.; Springer-Verlag: Heidelberg (Germany), 1990; Vol. 1.
- [25] Abragam, A. *Principles of Nuclear Magnetism*; Oxford Science Publications: Oxford, 1996.
- [26] Kaufmann, S.; Wefing, S.; Schaefer, D.; Spiess, W. *J. Chem. Phys.* **1990**, *1*, 197-214.
- [27] Favre, D. E.; Schaefer, D. J.; Chmelka, B. F. *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 261-279.
- [28] Bodenhausen, G.; Freeman, R.; Niedermeyer, R.; Turner, D. *J. Magn. Reson.* **1977**, *26*, 133.
- [29] Keller, J.; Neuhaus, D. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 454.
- [30] States, D.; Haberkorn, R. A.; Ruben, J. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 286.
- [31] Moarion, D.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *113*, 967.
- [32] Redfield, A. G.; Kunz, S. D. *J. Magn. Reson.* **1975**, *19*, 250.
- [33] Reichert, D.; Hempel, G. *Concepts in Magnetic Resonance* **2001**, *submitted*.
- [34] Bonagamba, T. J. *Espectroscopia de Alta Resolução em Sólidos por RMN (Tese de Doutorado)*; Universidade de São Paulo: São Carlos, 1991.
- [35] Garbow, J. R.; Gullion, T. *Chemical Physics Letters* **1992**, *192*, 71.
- [36] Engelsberg, M.; Yannoni, C. S. *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 393.
- [37] Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57-83.
- [38] Harris, D. J.; Bonagamba, T. J.; Hong, M.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 3375-3381.

Capítulo 3 - *Pure Exchange Solid State NMR (PUREX): uma nova técnica para a detecção e estudo de movimentos lentos em sólidos com supressão dos segmentos rígidos*

Na seção 1.4.5 foi discutido que o uso técnicas de *Exchange* tradicionais tem sido limitado aos casos onde a maioria dos segmentos são móveis na escala de tempo de 1 ms - 1 s. Caso contrário, a presença dominante do sinal dos segmentos rígidos impede que os segmentos móveis possam ser detectados eficientemente. Neste capítulo será proposta algumas novas técnicas de RMN de *Exchange*, denominadas *Pure-Exchange Solid State NMR (PUREX)*¹, onde tais limitações são superadas. Através da combinação de modulação e subtração espectral, o sinal dos segmentos rígidos é suprimido, resultando num espectro de *exchange* onde o sinal provém exclusivamente dos segmentos que se reorientam na escala de tempo de 1ms - 1s. A versão bidimensional do experimento PUREX resulta num espectro *Exchange* 2D com supressão da diagonal, onde as informações sobre a geometria do movimento emergem diretamente do padrão espectral. Em RMN de solução vários métodos foram desenvolvidos para se obter este tipo de supressão da diagonal, incluindo a subtração de espectros diagonais², modulação do espectro por uma função de excitação induzida pela seqüência de pulsos³ e remoção digital do sinal diagonal no domínio do tempo⁴. Em estado sólido somente alguns casos de subtração de um espectro puramente diagonal foram utilizados, mas não produziram uma remoção completa da diagonal. O método apresentado aqui é bastante similar ao de Baur e Kessler³, o qual produz uma modulação no espectro NOESY(*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) 2D que suprime a diagonal do mesmo. Neste caso, o espectro final possui intensidades positivas e negativas o que não representa uma grande limitação no caso de líquidos. Contudo, em RMN de estado sólido é fundamental produzir uma modulação puramente positiva, o que é alcançado com a técnica PUREX. A versão unidimensional do experimento PUREX dá origem a espectros de pó 1D, cuja intensidade está diretamente associada ao movimento molecular. Informações sobre a escala de tempo do movimento podem ser obtidas à partir da análise da intensidade do espectro PUREX 1D como função do tempo de mistura. Independentemente, a análise da intensidade espectral como função de um tempo de evolução extra característico do experimento PUREX, τ , leva a informações sobre a amplitude e geometria do movimento molecular. Será apresentada

também uma variação da técnica EIS, PUREX EIS, que dá origem a um espectro MAS 1D obtido com rotação lenta da amostra em torno do ângulo mágico. Neste experimento, a amplitude das bandas laterais e da banda central estão diretamente ligadas ao movimento molecular.

3.1 - PUREX bidimensional (PUREX 2D).

3.1.1 - Princípios básicos.

O objetivo desta técnica é a supressão do sinal provenientes dos segmentos rígidos do espectro de *Exchange* 2D. A idéia básica do método é introduzir períodos de evolução extras na seqüência de pulsos *Exchange* 2D de modo que o sinal detectado seja modulado por uma função $\left\langle \text{sen}^2\left((\Omega_1 - \Omega_2)\frac{\tau}{2}\right) \right\rangle$, onde Ω_1 e Ω_2 são, respectivamente, as freqüências de precessão dos spins localizados em um dado segmento molecular antes e depois de t_m e τ é a duração dos períodos de evolução extras introduzidos na seqüência de pulsos. Uma descrição mais detalhada de como obter esta modulação seno-quadrado será dada mais adiante. Por agora é suficiente perceber que modular o sinal detectado por $\left\langle \text{sen}^2\left((\Omega_1 - \Omega_2)\frac{\tau}{2}\right) \right\rangle$ significa modular o espectro *Exchange* 2D pela mesma função, isto é:

$$S_{PUREX}(\omega_1, \omega_2) = 2 \left\langle \text{sen}^2\left((\Omega_1 - \Omega_2)\frac{\tau}{2}\right) \right\rangle S(\omega_1, \omega_2) \quad (3.1)$$

onde $S(\omega_1, \omega_2)$ representa o espectro de *Exchange* convencional e o símbolo $\langle \rangle$ a média sobre todas as possíveis orientações dos segmentos moleculares do sólido. Note a diferença entre a freqüência de precessão dos spins Ω_1 e Ω_2 e as dimensões de freqüência do espectro 2D ω_1 e ω_2 .

Na ausência de movimento molecular durante t_m , $\Omega_1 = \Omega_2$, e, conseqüentemente, $S_{PUREX}(\omega_1, \omega_1) = 0$. Portanto, aqueles segmentos que não executam reorientações moleculares durante t_m não contribuem para o espectro 2D. Isto implica diretamente na eliminação da diagonal do espectro. Para os segmentos que sofreram reorientações moleculares durante t_m e portanto $\Omega_1 \neq \Omega_2$, o espectro PUREX é o espectro *Exchange* 2D

modulado pela função $\left\langle \text{sen}^2\left((\Omega_1 - \Omega_2)\frac{\tau}{2}\right) \right\rangle$, a qual será denominada função de modulação. A mesma informação sobre a geometria do movimento contida no espectro *Exchange* 2D também está presente no espectro PUREX, contudo a supressão da diagonal do espectro permite que os segmentos móveis sejam observados seletivamente.

3.1.2 - Sequência de pulsos PUREX 2D com refocalização do deslocamento químico.

A forma mais eficiente de se obter a modulação seno-quadrado é baseada nas seguintes igualdades trigonométricas:

$$\text{sen}^2\left((\Omega_1 - \Omega_2)\frac{\tau}{2}\right)S(\omega_1, \omega_2) = \frac{1}{2}(1 - \cos((\Omega_1 - \Omega_2)\tau))S(\omega_1, \omega_2) \quad (3.2)$$

$$\cos((\Omega_1 - \Omega_2)\tau)S(\omega_1, \omega_2) = [\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_2\tau) + \text{sen}(\Omega_1\tau)\text{sen}(\Omega_2\tau)]S(\omega_1, \omega_2) \quad (3.3)$$

Nesta proposta, a modulação seno quadrado pode ser obtida combinando três espectros. Um deles não-modulado e os demais modulados por $\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_2\tau)$ e $\sin(\Omega_1\tau)\sin(\Omega_2\tau)$, respectivamente. Os dois termos da direita na equação 3.3 são obtidos introduzindo na sequência *Exchange* 2D dois períodos de evolução extras com duração τ , sendo um antes e outro depois de t_m , conforme ilustrado na Figura 3.1. A seleção dos termos $\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_2\tau)$ e $\sin(\Omega_1\tau)\sin(\Omega_2\tau)$ é feita através da escolha adequada das fases dos pulsos denominados *d* e *f* na Figura 3.1. Para se obter o sinal modulado por $\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_2\tau)$, a magnetização transversal, criada na direção *y* pela sequência CP, evolui durante t_1 onde adquire a codificação necessária para a aquisição do espectro 2D. Após este período, o componente $\cos(\Omega_1 t_1)$ desta magnetização é armazenada na direção *z*, onde permanece durante todo o período t_z . O outro componente permanece no plano transversal, onde relaxa rapidamente devido ao efeito da interação dipolar heteronuclear. A partir daí, a magnetização é novamente transferida para o plano transversal, onde evolui durante τ . Ao final deste período, tem-se uma modulação extra $\cos(\Omega_2\tau)$ e $\sin(\Omega_2\tau)$ para as componentes *x* e *y* da magnetização, respectivamente. O pulso de 180° antes do pulso *e*, não muda a direção da magnetização, mas somente o sentido da componente seno, o que pode ser compensado pela inversão da fase do receptor. Portanto, com a escolha adequada da fase do pulso *d*, tanto a magnetização pesada por $\cos(\Omega_1\tau)$ como por $\sin(\Omega_1\tau)$ podem ser armazenadas ao longo de *z* durante t_m . Após o tempo de mistura, o pulso *f* leva a

magnetização z modulada novamente para o plano transversal, onde ela evolui durante o segundo período τ . Ao final deste período, novamente uma modulação extra $\cos(\Omega_2\tau)$ e $\sin(\Omega_2\tau)$ para as componentes x e y são obtidas. Um desses componentes é armazenado durante o período t_z , sendo finalmente transferido para o plano transversal onde é detectado. Portanto, o sinal detectado terá um fator de modulação que é definido pelas fases dos pulsos d e e e, através da escolha apropriada dessas fases, é possível adquirir um sinal com amplitude modulada por $\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_2\tau)$ ou $\sin(\Omega_1\tau)\sin(\Omega_2\tau)$. Isto pode ser observado passo a passo na evolução da magnetização representada pelo operador densidade, mostrada na Figura 3.1c.

Para se obter o sinal não-modulado necessário para a composição da modulação seno quadrado seria suficiente fazer $\tau = 0$ no esquema anterior. Entretanto, na aquisição dos sinais modulados a magnetização sofre a ação da relaxação transversal durante os períodos de evolução, resultando na diminuição da amplitude do sinal de um fator $\exp(-2\tau/T_2)$. Sendo assim, é necessário que o sinal não-modulado também possua este fator de decréscimo. Isto é conseguido utilizando-se a seqüência de pulsos ilustrada na Figura 3.1b. Neste caso, a seqüência possui o mesmo número de pulsos e períodos de relaxação que a seqüência utilizada na aquisição do espectro modulado por $\cos((\Omega_1 - \Omega_2)\tau)$. A presença do esquema de pulsos $\tau - 180^\circ - \tau$ na primeira metade da seqüência de pulsos faz com que um eco de Hahn seja produzido imediatamente antes de t_m , isto é, a evolução sob a ação da interação de deslocamento químico é refocalizada, fazendo com que a magnetização seja a mesma que ao final de t_z , porém com um decréscimo de amplitude de $\exp(-2\tau/T_2)$. Fica claro agora o porquê da presença do pulso de 180° *sem função* na seqüência utilizada para obter o espectro modulado. Como o experimento PUREX envolve a combinação de sinais obtidos com seqüências de pulsos diferentes, é necessário que as mesmas tenham exatamente o mesmo número de pulsos e períodos de relaxação, o que justifica o aparecimento do pulso de 180° também na seqüência mostrada na Figura 3.1. É interessante notar que não é necessário adquirir o espectro modulado por $\sin(\Omega_1\tau)\sin(\Omega_2\tau)$ na seqüência de pulsos 3.1b, já que, devido à refocalização do deslocamento químico, este componente não contribui para o sinal e somente ruído estaria sendo adquirido. Este fato representa um ganho em tempo de experimento.

Portanto, com a escolha adequada dos pulsos d e e na Figura 3.1, pode-se obter os sinais:

$$S_{cc}(t_1, t_2) = e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \cos(\Omega_1 \tau) \cos(\Omega_2 \tau) \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \quad (3.4)$$

$$S_{ss}(t_1, t_2) = e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \sin(\Omega_1 \tau) \sin(\Omega_2 \tau) \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \quad (3.5)$$

$$S_1(t_1, t_2) = e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \quad (3.6)$$

Onde o fator $e^{-\frac{2\tau}{T_2}}$ foi introduzido para levar em conta a relaxação T_2 durante τ . Combinando estes sinais de forma adequada tem-se:

$$\begin{aligned} S_{PUREX}(t_1, t_2) &= S_1(t_1, t_2) - S_{cc}(t_1, t_2) - S_{ss}(t_1, t_2) \\ &= 2e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \sin^2\left(\frac{(\Omega_1 - \Omega_2)\tau}{2}\right) \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \end{aligned} \quad (3.7)$$

Tomando a média sobre as possíveis orientações dos segmentos moleculares obtém-se:

$$S_{PUREX}(t_1, t_2) = \left\langle 2e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \sin^2\left(\frac{(\Omega_1 - \Omega_2)\tau}{2}\right) \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} \right\rangle \quad (3.7)$$

Supondo que a evolução durante t_1 tenha sido fora de ressonância a transformada de Fourier bidimensional em t_1 e t_2 da expressão 3.7, dará origem a um espectro

bidimensional de *Exchange* $S(\omega_1, \omega_2)$ modulado pela função $\left\langle 2e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \sin^2\left(\frac{(\Omega_1 - \Omega_2)\tau}{2}\right) \right\rangle$

que é essencialmente a expressão 3.1 com um fator multiplicativo constante em toda a faixa espectral.

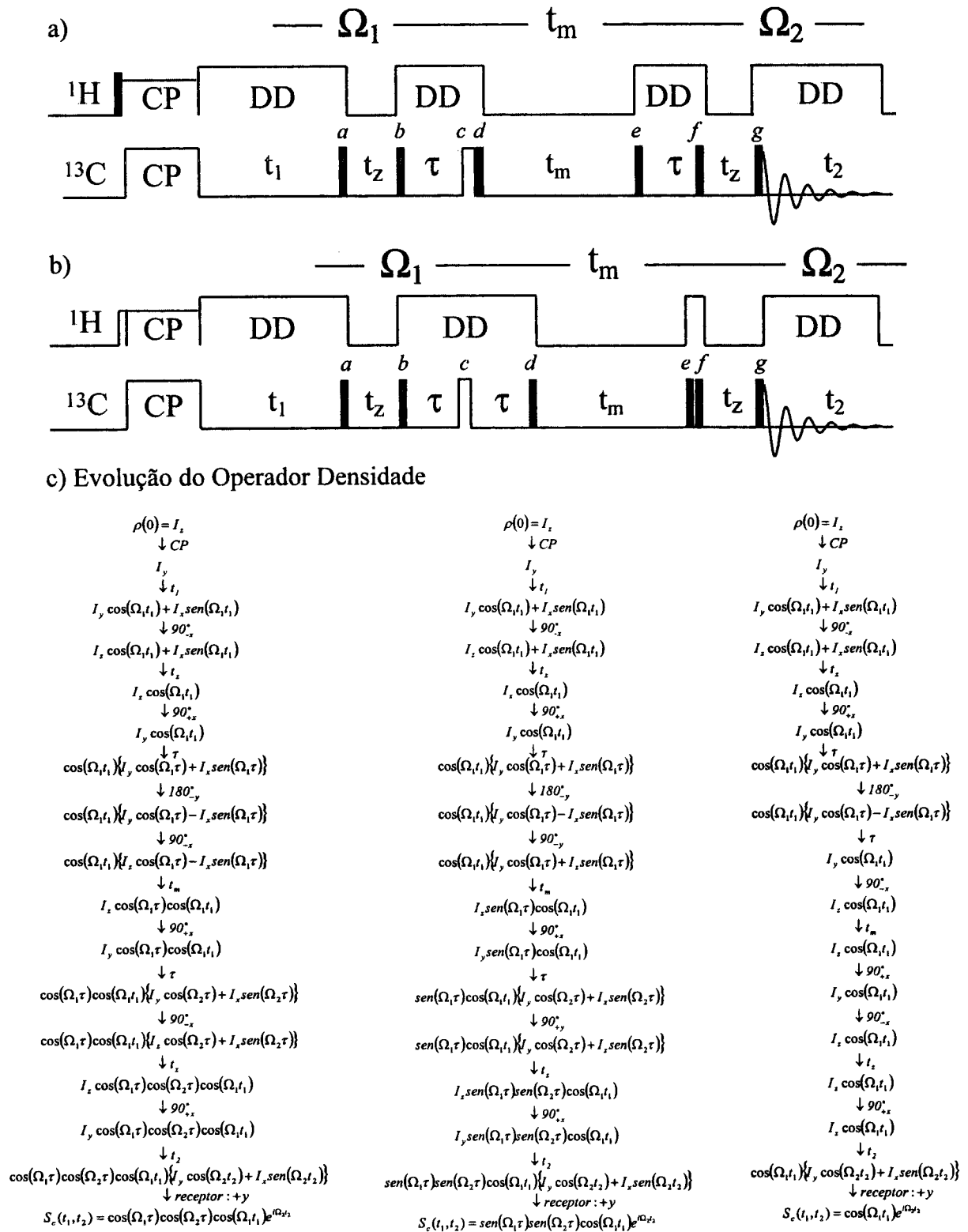


Figura 3.1- Seqüência de pulsos utilizada no do experimento PUREX 2D com refocalização da anisotropia de deslocamento químico. a) Seqüência utilizada na obtenção da modulação $\cos(\omega_1 - \omega_2)\tau$. b) seqüência para obtenção do sinal sem modulação em τ . c) Evolução do operador densidade para cada um dos casos: primeira coluna - modulação $\cos\omega_1\tau\cos\omega_2\tau$; segunda coluna - modulação $\sin\omega_1\tau\sin\omega_2\tau$; terceira coluna - sinal não-modulado. Os pulsos de 90° estão indicados em preto, enquanto que os de 180° no canal de ^{13}C estão indicados em branco.

3.1.3 - Seqüência de pulsos PUREX 2D sem refocalização do deslocamento químico.

Uma outra seqüência de pulsos alternativa para se obter os espectros PUREX está mostrada na Figura 3.2. Neste caso, somente uma seqüência de pulsos é utilizada. Neste esquema, adquire-se um sinal com o t_m adequado para caracterizar o movimento molecular e t_z curto (1 ms por exemplo). A fases dos pulsos de RF c e e e do receptor são escolhidas de modo que os componentes $\text{sen}(\Omega_1\tau)\text{sen}(\Omega_2\tau)$ e $\text{cos}(\Omega_1\tau)\text{cos}(\Omega_2\tau)$ sejam adquiridos e somados em aquisições sucessivas. Como anteriormente, obter-se-á um sinal modulado por $\text{cos}[(\Omega_1\tau - \Omega_2\tau)]$. Procedendo da mesma forma, porém utilizando t_m curto, de modo que não haja movimento molecular durante esse período, e t_z longo, de modo a manter a soma $t_z + t_m$ igual ao experimento anterior, o sinal modulado por $\text{cos}[(\Omega_1\tau - \Omega_1\tau)] = 1$ será obtido. Portanto, essas duas aquisições fornecem exatamente os sinais não-modulado e modulado por $\text{cos}[(\Omega_1\tau - \Omega_2\tau)]$ necessários para produzir a modulação $\text{sin}^2[(\Omega_1 - \Omega_2)\tau/2]$ do experimento PUREX.

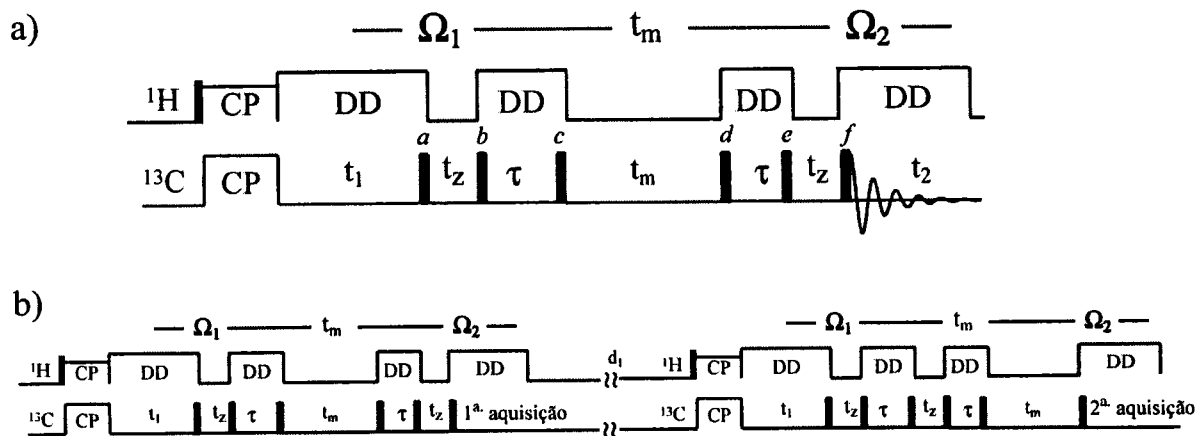


Figura 3.2 - Seqüência de pulsos utilizada no experimento PUREX 2D com aquisição sem refocalização da anisotropia de deslocamento químico. a) A mesma seqüência de pulsos é utilizada para adquirir o sinal modulado e não-modulado somente com uma inversão entre os períodos t_m e t_z . b) Seqüência de pulsos PUREX 2D com dois pontos de aquisição.

A seqüência de pulsos apresentada na Figura 3.2 possui a vantagem de ser totalmente simétrica em relação a t_m e não possuir pulsos de 180° . Além disso, exatamente a mesma seqüência é utilizada para obter os sinais modulados e não-modulados. A desvantagem dessa aproximação é que a evolução sob a interação de anisotropia de deslocamento químico não é refocalizada durante τ , tornando necessário adquirir os sinais modulados por $\text{sen}(\Omega_1\tau)\text{sen}(\Omega_1\tau)$ e $\text{cos}(\Omega_1\tau)\text{cos}(\Omega_1\tau)$ também no espectro de referência.

Isto implica em um tempo de aquisição maior em relação à seqüência da Figura 3.1, onde somente o componente $\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_1\tau)$ necessita ser adquirido, já que o componente $\sin(\Omega_1\tau)\sin(\Omega_1\tau)$ é nulo devido à refocalização do deslocamento químico no sinal de referência. Portanto, se o experimento PUREX 2D for realizado com a seqüência mostrada na Figura 3.2 o tempo do experimento é $\frac{1}{4}$ mais longo.

3.1.4 - Ciclagem de fases na seqüência de pulsos PUREX 2D.

Como discutido no capítulo 2, a ciclagem de fases é fundamental na seleção do sinal desejado e eliminação de sinais espúrios que podem resultar em artefatos experimentais.

O esquema de ciclagem de fases utilizado para aquisição do componente $\cos(\Omega_1\tau)\cos(\Omega_2\tau)$ na seqüência PUREX 2D da Figura 3.1 está mostrado na Tabela 3.1. Os oito ciclos iniciais realizam: a) correção do artefato de T_1 para o tempo de mistura: alternância de 180° da fase do pulso *d* e compensação com a fase do pulso *g*. b) correção do artefato de T_1 para o primeiro t_z : alternância de 180° da fase do pulso *a* e compensação com a fase do pulso *g*. c) implementação da detecção em fase e quadratura perfeita: ciclo $+x -x +y -y$ do pulso *g* e do receptor. A correção das imperfeições do pulso de 180° é realizada através do incremento das fases dos pulsos $^{13}\text{C-CP}$, *a*, *b* e *d* em passo de 90° , enquanto a fase do pulso de 180° é mantida constante (combinação dos esquemas CYCLOPS e EXORCICLE), formando um bloco de 32 passos. O próximo passo é a alternância de 180° das fases dos pulsos $^1\text{H-}90^\circ$ e do pulso *e* para correção do artefato de polarização direta. Finalmente, a inversão da fase pulso do *f* e do receptor é utilizada para corrigir o artefato de T_1 para o segundo t_z . O ciclo final é constituído por um total de 128 aquisições. O ciclo de fases para aquisição do componente $\sin(\Omega_1\tau)\sin(\Omega_1\tau)$ é obtido simplesmente pelo deslocamento de 90° em todas as fases do pulso *d*, no sentido horário, e do pulso *f*, no sentido anti-horário.

Tabela 3.1- Ciclagem de fases utilizada no experimento PUREX 2D necessário para a seqüência mostrada na Figura 3.1. O número sobrescrito indica quantas vezes cada bloco deve ser repetido.

Pulsos	Fases
$^1H-90^\circ$	$\left((+y)^{32}(-y)^{32} \right)^2$
^1H-CP	$(x)^{128}$
$^{13}C-CP$	$\left((+y)^8(-x)^8(-y)^8(+x)^8 \right)^4$
<i>a</i>	$\left((-x)^4(+x)^4(-y)^4(+y)^4(+x)^4(-x)^4(+y)^4(-y)^4 \right)^4$
<i>b</i>	$\left((+x)^8(-y)^8(-x)^8(+y)^8 \right)^4$
<i>c</i>	$(-y)^{128}$
<i>d</i>	$\left((-x+x)^4(+y-y)^4(+x-x)^4(-y+y)^4 \right)^4$
<i>e</i>	$\left((+x)^{32}(-x)^{32} \right)^2$
<i>f</i>	$(-x)^{64}(+x)^{64}$
<i>g</i>	$(+x-x-x+x+y-y-y+y)^{16}$
Receptor	$\left(\begin{array}{l} (+y+y-y-y+x+x-x-x-y-y+y+y-x-x+x+x)^4 \\ (-y-y+y+y-x-x+x+x+y+y-y-y+x+x-x-x)^4 \end{array} \right)^4$

O esquema de ciclagem de fases utilizada na seqüência PUREX 2D da Figura 3.2a está mostrado na Tabela 3.2. Os dois primeiros passos eliminam os sinais espúrios devido a relaxação T_1 durante o primeiro período t_z , e suprime o sinal dos núcleos de ^{13}C diretamente polarizados através da inversão dos pulsos de 1H e do receptor. Nos próximos três passos (completando 8 ciclos) as fases dos pulsos *f* e do receptor são incrementadas em passos de 90° , mas mantendo constante a fase do pulso *c*. Com isso é realizado um esquema de CYCLOPS, bem como cancelamento da magnetização transversal remanescente após t_z . A combinação dos sinais $\cos\Phi_1\cos\Phi_2$ e $\sin\Phi_1\sin\Phi_2$ é obtida no próximo passo. A inversão do pulso *c*, em combinação com a fase do receptor, realiza a correção do artefato de T_1 durante t_m . Finalmente, o cancelamento da magnetização transversal remanescente após t_m é feito através do ciclo de quatro passos realizado no pulso *d*. A inversão do pulso *e* em combinação com o receptor realiza a correção do artefato de T_1 durante o segundo período t_z . Um total de 128 ciclos de fase são necessários.

Tabela 3.2- Ciclagem de fases utilizada no experimento PUREX 2D necessário para a seqüência da Figura 3.2. O número sobrescrito indica quantas vezes cada bloco deve ser repetido.

Pulsos	Fases
$^1H -90^\circ$	$(+x - x)^{64}$
^1H-CP	$(+y)^{128}$
$^{13}C-CP$	$(+x)^{128}$
<i>a</i>	$(+y)^{128}$
<i>b</i>	$(-y)^{128}$
<i>c</i>	$\left((-y)^8(-x)^8(+y)^8(+x)^8\right)^4$
<i>d</i>	$\left((+y)^8(+x)^8\right)^2\left((-y)^8(-x)^8\right)^2\left((-x)^8(+y)^8\right)^2\left((+x)^8(-y)^8\right)^2$
<i>e</i>	$(-y)^{64}(-x)^{64}$
<i>f</i>	$\left((+y)^2(-x)^2(-y)^2(+x)^2\right)^4$
Receptor	$\left(\begin{array}{l} (+x - x + y - y - x + x - y + y - x + x - y + y + x - x + y - y) \\ (-x + x - y + y + x - x + y - y + x - x + y - y - x + x - y + y) \\ (-x + x - y + y + x - x + y - y + x - x + y - y - x + x - y + y) \\ (+x - x + y - y - x + x - y + y - x + x - y + y + x - x + y - y) \\ (-x + x - y + y + x - x + y - y + x - x + y - y - x + x - y + y) \\ (+x - x + y - y - x + x - y + y - x + x - y + y + x - x + y - y) \\ (+x - x + y - y - x + x - y + y - x + x - y + y + x - x + y - y) \\ (-x + x - y + y + x - x + y - y + x - x + y - y - x + x - y + y) \end{array} \right)$

Além da ciclagem de fases adequada, outro cuidado deve ser tomado na implementação do experimento PUREX. Uma vez que o experimento envolve a subtração de dois sinais, é necessário que os mesmos sejam adquiridos quase que simultaneamente, pois efeitos de instabilidade do espectrômetro podem levar ao aparecimento de artefatos. Neste contexto, é necessário utilizar um esquema de aquisição em blocos, onde as seqüências de pulsos utilizadas para adquirir os sinais modulado e não-modulado são alternadas a cada ciclo de fases completo, isto é 128 aquisições. Alternativamente, uma seqüência de pulsos combinada pode ser utilizada. Ao final da aquisição do espectro não-modulado espera-se um intervalo d_1 para que a magnetização volte ao equilíbrio ao longo da direção z , e então a seqüência utilizada na obtenção do sinal modulado é aplicada de modo que em um segundo ponto de aquisição o espectro modulado é adquirido. Deste modo, a ciclagem de fases utilizada na aquisição do sinal modulado e não-modulado é aplicada quase que simultaneamente e qualquer mudança nas condições experimentais

ocorrida durante a aplicação da seqüência implicará em efeitos similares nos dois sinais. Este esquema de aquisição está ilustrado na Figura 3.2b.

3.1.5 - Função de modulação.

A função de modulação ideal deveria ser igual a zero ao longo da diagonal e ao mesmo tempo ser plana fora da mesma. A função de modulação $\sin^2((\Omega_1 - \Omega_2)\tau/2)$ do experimento PUREX, embora elimine a contribuição diagonal, produz uma modulação adicional fora da mesma. Na realidade, isto não é um problema extremamente grave, pois a interpretação dos experimentos de *Exchange* quase sempre é feita através de simulação do espectro e neste caso a função de modulação pode ser inserida facilmente na simulação. Mesmo assim, é interessante obter um espectro final onde as ondulações fora da diagonal, causadas pela modulação seno quadrado, sejam minimizadas. Isto pode ser obtido através da combinação de espectros modulados por $\sin^2((\Omega_1 - \Omega_2)\tau/2)$ adquiridos com diferentes valores de τ , de modo que o espectro PUREX passa a ser escrito como:

$$S_{PUREX}(\omega_1, \omega_2) = 2 \left\langle \sum_{m=1,2,3,\dots}^N \text{sen}^2 \left((\Omega_1 - \Omega_2) \frac{m\tau_1}{2} \right) \right\rangle S(\omega_1, \omega_2) \quad (3.8)$$

A função de modulação é então dada por:

$$W(\Delta\Omega) = \sum_{m=1,2,3,\dots}^N \text{sen}^2 \left((\Omega_1 - \Omega_2) \frac{m\tau_1}{2} \right) \quad (3.9)$$

Como todos os pontos ao longo de uma linha reta paralela à diagonal têm a mesma diferença de frequência $(\Omega_1 - \Omega_2)$ é suficiente graficar a função de modulação ao longo de qualquer linha reta perpendicular a mesma. Na Figura 3.3 está mostrado o gráfico da função 3.9 com $N = 1, 4, 8$ e 16 e $\tau_1 = 250 \mu\text{s}$. Com apenas quatro valores de τ o perfil fora da diagonal já é razoavelmente plano. Obviamente, com mais valores de τ a função se aproxima cada vez mais da função de modulação ideal.

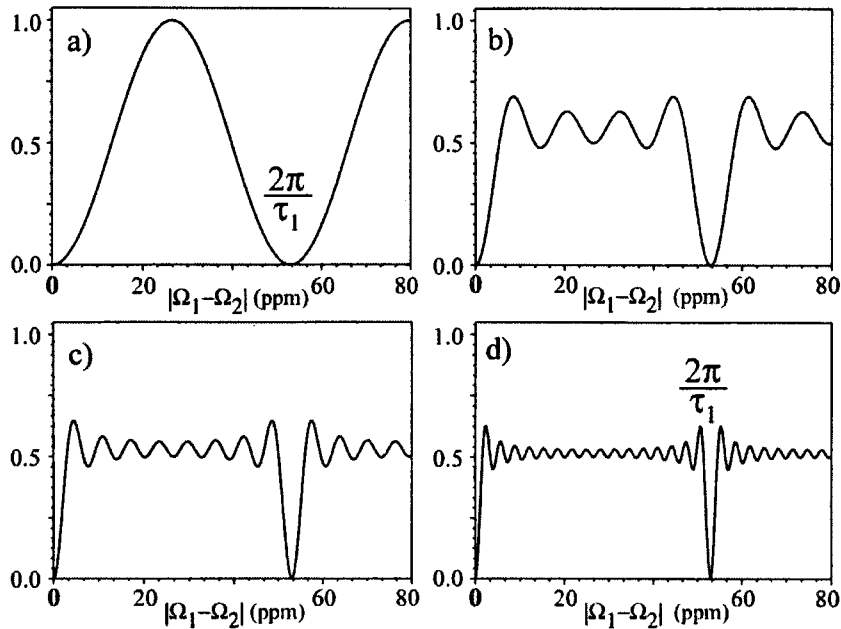


Figura 3.3 - Funções de modulação do experimento PUREX obtidas somando N funções de modulação com $\tau_1 = 250\mu\text{s}$. a) $N = 1$. b) $N = 4$. c) $N = 8$. d) $N = 16$. A função de modulação aproxima-se de uma constante na faixa de $0 \leq |\Omega_1 - \Omega_2| \leq 2\pi/\tau$, mas permanece igual a zero em $|\Omega_1 - \Omega_2| = 0$.

É possível modificar a função de modulação, por exemplo para diminuir as ondulações mostradas na Figura 3.3. Isto pode ser conseguido através da mudança do peso $f(m\tau_1)$ do m -ésimo sub-espectro. Uma relação de Fourier bastante simples pode ser estabelecida entre $W(\Delta\Omega)$ e $f(\tau)$:

$$\begin{aligned}
 W(\Delta\Omega) &\stackrel{(a)}{=} \sum_{m=1,2,\dots}^N f(m\tau_1)(1 - \cos(\Delta\Omega m\tau_1)) \\
 &\stackrel{(b)}{=} F - \text{Re} \left(\sum_{m=1,2,\dots}^N f(m\tau_1) \exp(i\Delta\Omega m\tau_1) \right) \\
 &\stackrel{(c)}{=} F - \text{Re} \left(\int_{-\infty}^{+\infty} f(\tau) \exp(i\Delta\Omega\tau) d\tau \right) \\
 &\stackrel{(d)}{=} F - \text{Re}(FT(f))
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

Onde :

$$F = \sum_{m=1,2,\dots}^N f(m\tau_1)$$

onde o passo b é permitido porque $f(m\tau_1)$ é puramente real. No passo c a relação entre a transformada de Fourier discreta e contínua foi utilizada, o que é válido se t_1 é menor que o inverso da largura espectral (quando a condição de amostragem de Nyquist é cumprida).

O termo constante F da equação 3.10 corresponde às regiões planas na Figura 3.3, enquanto que $\text{Re}(FT(f))$ é responsável pelos zeros e ondulações. Por exemplo, se $f(m\tau_1)$ é uma função exponencial, então a função de modulação decairá a zero como uma função lorentziana, tal como pode ser visto na Figura 3.4.

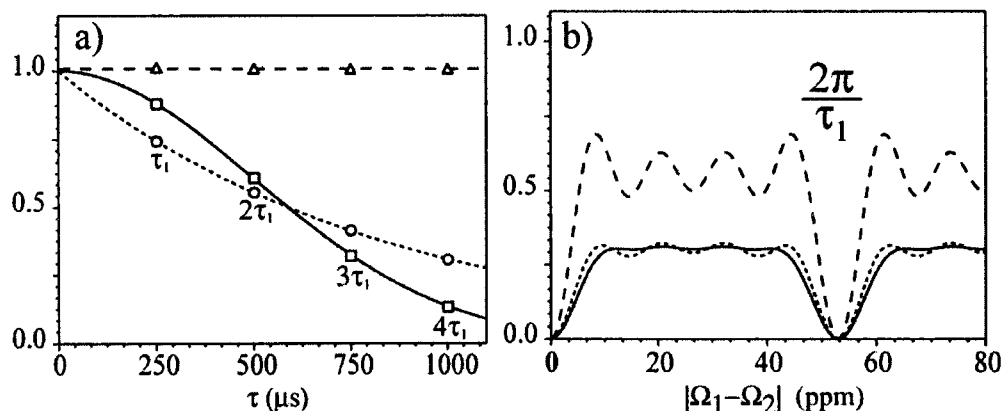


Figura 3.4 - a) Funções de peso Gaussiana (linha sólida), exponencial (linha pontilhada) e constante (linha tracejada) utilizadas para simular a redução das oscilações da função de modulação PUREX. Os pontos discretos indicam a amplitude dessas funções para $\tau = 250, 500, 750, 1000 \mu\text{s}$. b) Funções de modulação obtidas somando quatro funções de modulação com $\tau_1 = 250, 500, 750, 1000 \mu\text{s}$ pesadas pelas funções mostradas em a).

3.1.6 - Sensibilidade do experimento PUREX 2D.

A sensibilidade da técnica PUREX 2D é obviamente menor que a da técnica de *Exchange* 2D, uma vez que envolve a combinação de pelo menos três sinais. De fato, para um único valor de τ , o ponto mais intenso do espectro PUREX tem intensidade igual a cerca de 2/3 do espectro de *Exchange* 2D para o mesmo tempo de experimento. Para um espectro obtido a partir da soma de vários espectros com diferentes valores de τ , a intensidade média do espectro PUREX é 1/3 da intensidade do espectro de *Exchange* 2D. Por outro lado, como será demonstrado adiante, o processo de subtração reduz bastante os artefatos produzidos pelo padrão diagonal e permite que o sinal seja adquirido com um número menor de incrementos em t_1 , fazendo com que a perda de sensibilidade no experimento PUREX não seja tão grande quando comparado com o experimento *Exchange* 2D.

3.1.7 - Modulação intrínseca versus multiplicação de dados.

É importante notar a diferença entre a modulação intrínseca do sinal por $\sin^2((\Omega_1 - \Omega_2)\tau/2)$ e a multiplicação do espectro *Exchange* 2D por $\sin^2((\omega_1 - \omega_2)\tau/2)$; aqui Ω_1 e Ω_2 são as frequências de precessão dos spins, enquanto ω_1 e ω_2 são as coordenadas de frequência do espectro *Exchange* 2D. Com a modulação intrínseca o método PUREX 2D não só suprime a intensidade exatamente ao longo da diagonal, mas também o alargamento natural da diagonal e os artefatos provocados pela presença da mesma. Além disso, efeitos pequenos de tempo morto e também instabilidade do espectrômetro frequentemente causam distorções de linha de base no padrão diagonal intenso, as quais podem ter intensidade similar ao padrão de *Exchange* e não podem ser removidos por nenhum método de pós-processamento³. O experimento PUREX com aquisições em bloco para eliminar os efeitos de instabilidade do espectrômetro, reduzem estes artefatos por mais de uma ordem de magnitude.

3.2 - PUREX unidimensional (PUREX 1D).

A técnica PUREX unidimensional é uma versão simplificada da técnica bidimensional. Sendo assim, as discussões acima se aplicam também neste caso. A seqüência de pulsos utilizada na obtenção do espectro PUREX 1D é obtida a partir da seqüência 2D, eliminando o período de evolução t_1 e o primeiro filtro z. Isto resulta na seqüência mostrada na Figura 3.5.

Procedendo da mesma forma que no caso bidimensional, a modulação no sinal PUREX 1D pode ser calculada, resultando em:

$$S(t) = e^{-\frac{2\tau}{T_2}} (1 - \cos((\Omega_1 - \Omega_2)\tau)) e^{i\Omega_2 t} = e^{-\frac{2\tau}{T_2}} (2 \sin^2((\Omega_1 - \Omega_2)\tau/2)) e^{i\Omega_2 t} \quad (3.11)$$

Novamente, só contribuirão para o sinal aqueles spins em que $\Omega_1 \neq \Omega_2$. O resultado é um espectro de pó, cuja intensidade é proveniente somente daqueles sítios que se reorientam durante o tempo de mistura, com alguma modulação relacionada com o valor de τ e de $|\Omega_1 - \Omega_2|$. Portanto, a escolha de τ determina se grandes ou pequenas mudanças de frequência serão observadas. O espectro PUREX 1D pode ser considerado como a projeção do espectro 2D na direção ω_2 .

Tendo em vista o carácter seletivo da técnica PUREX 1D, é natural a comparação com outras técnicas similares, como por exemplo a técnica de *Exchange* com excitação seletiva SELDOM⁵. Esta técnica consiste basicamente na excitação seletiva de parte do espectro de pó seguido de um tempo de mistura e detecção. Se a reorientação molecular ocorre, observa-se o aparecimento de sinal fora da região excitada, vide Figura 2.4 no capítulo 2. A desvantagem deste método é que a excitação seletiva elimina grande parte do sinal, fazendo com que a sensibilidade da técnica seja menor que do experimento PUREX, onde aproximadamente metade do sinal dos sítios que se reorientaram são detectados para um único valor de τ .

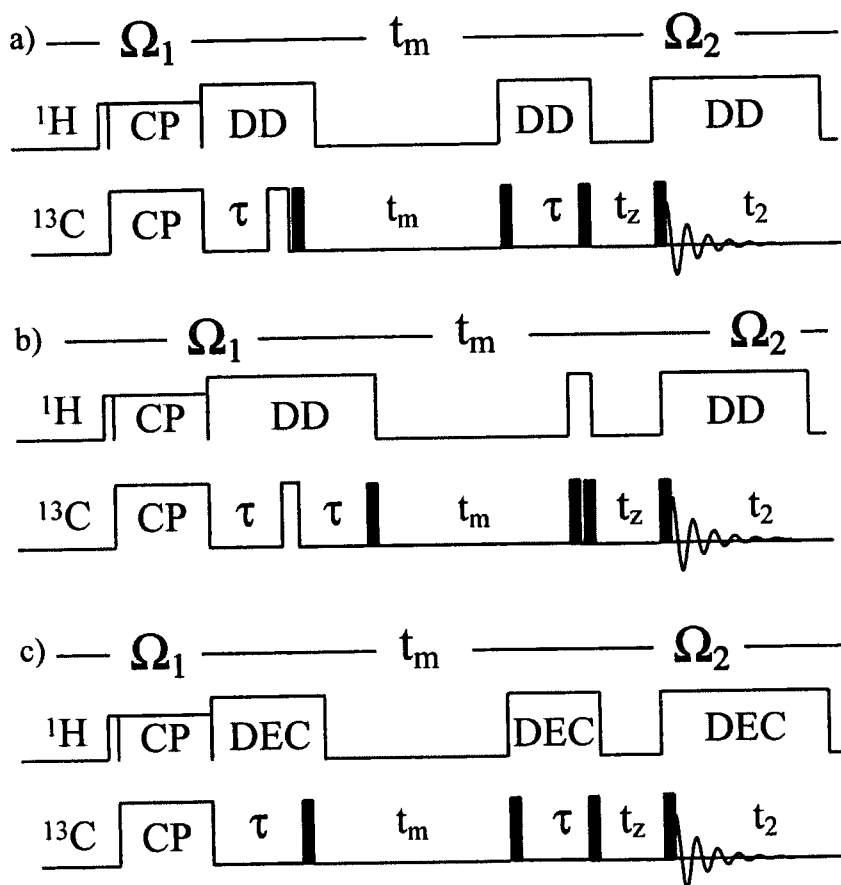


Figura 3.5 - Seqüências de pulsos utilizada para aquisição do espectro PUREX 1D. a) e b) Seqüências utilizadas no experimento PUREX 1D com refocalização do deslocamento químico. c) Seqüência utilizada no experimento PUREX 1D sem refocalização do deslocamento químico.

3.3 - A técnica PUREX EIS.

A técnica PUREX EIS (*Exchange Induced Sidebands*) opera de maneira diferente que o método PUREX para amostras estáticas. Ela é baseada na técnica EIS, discutida no

capítulo anterior, onde a presença de sítios que sofrem reorientação molecular leva ao aparecimento de bandas laterais e diminuição da banda central. Caso contrário, o sinal é o mesmo que em uma seqüência de pulsos TOSS convencional. A diferença entre os sinais EIS e TOSS dá origem ao espectro PUREX EIS, que contém somente a contribuição proveniente dos sítios móveis. Como será mostrado na figura 5.6 do capítulo 5, o espectro PUREX EIS exibe uma banda central cuja intensidade é proveniente dos segmentos móveis e um conjunto de bandas laterais invertidas, com integral igual a banda lateral.

As seqüências de pulsos utilizadas no experimento PUREX EIS estão mostradas na Figura 3.6. As duas seqüências são essencialmente idênticas, exceto pela troca entre os dois períodos z , t_m e t_z . Deste modo, novamente todos os efeitos de relaxação e de imperfeição de pulsos são virtualmente idênticos e os espectros resultantes podem ser subtraídos sem a necessidade de utilizar nenhum fator de escala.

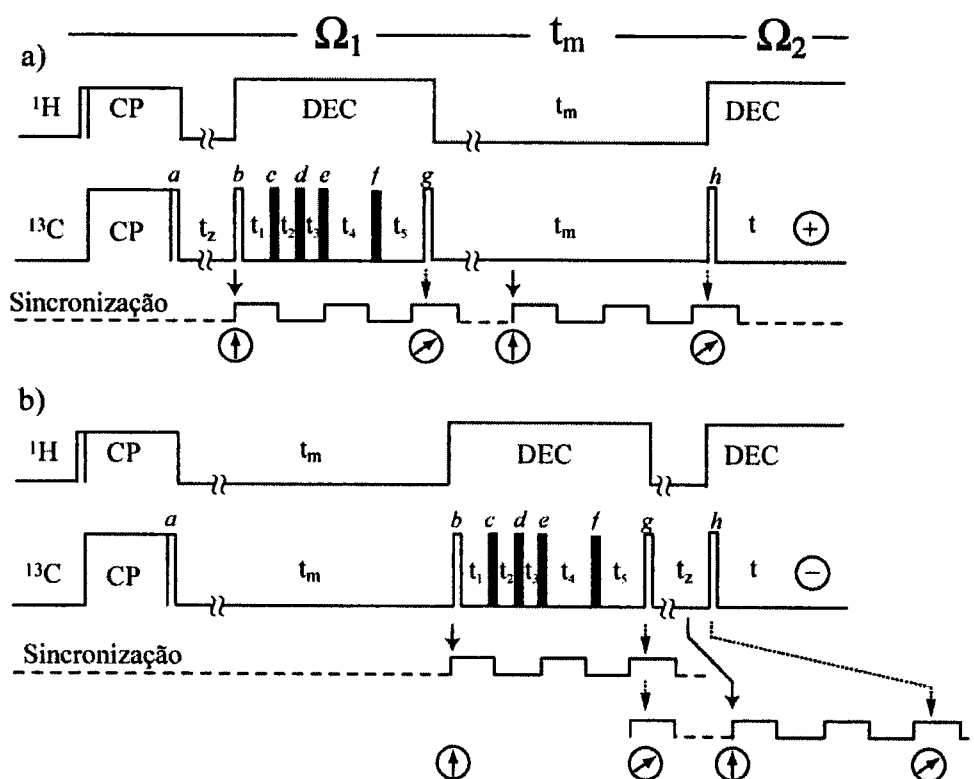


Figura 3.6 - Seqüência de pulsos utilizadas para aquisição do espectro PUREX EIS. a) Seqüência utilizada na obtenção do sinal EIS⁶. b) Seqüência utilizada na obtenção do sinal TOSS⁷ com tempo de mistura inserido. Os pulsos de 180° estão indicados em preto. Os sinais obtidos são subtraídos a cada ciclo de 64 aquisições.

Assim como no experimento EIS, a parte mais importante na ciclagem de fases no experimento PUREX EIS é a combinação dos componentes real e imaginário da

magnetização, dos quais somente um pode ser armazenado na direção z durante t_m . Para evitar artefatos espectrais, o esquema de ciclagem de fases mostrado na Tabela 3.3 é utilizado. O ciclo de fases é apresentado de modo a eliminar artefatos de polarização direta, relaxação longitudinal e imperfeições dos pulsos de 180° da seqüência TOSS.

Tabela 3.3 - Ciclagem de fases utilizada no experimento PUREX EIS.

Pulsos	Fases
$^1H-90^\circ$	$(+y)^{16}(-y)^{32}(+y)^{16}$
^1H-CP	$(+x)^{128}$
$^{13}C-CP$	$(+y-x-y+x)^8$
<i>a</i>	$(-x-y+x+y)^8$
<i>b</i>	$(+x+y-x-y)^8$
<i>c</i>	$(-x-y+x+y)^8$
<i>d</i>	$(+x+y-x-y)^8$
<i>e</i>	$\left((-x-y+x+y)^2(+x+y-x-y)^2\right)^2$
<i>f</i>	$\left((+y-x-y+x)^2(-y+x+y-x)^2\right)^2$
<i>g</i>	$(-x-y+x+y-y+x+y-x)^4(+x+y-x-y+y-x-y+x)^4$
<i>h</i>	$(+x+y-x-y+y-x-y+x)^8$
Receptor	$(-y+x+y-x)^2(+y-x-y+x)^4(-y+x+y-x)^2$
	$(+y-x-y+x)^2(-y+x+y-x)^4(+y-x-y+x)^2$

3.4 - Informações sobre o movimento molecular obtidas à partir das técnicas PUREX.

Nesta seção serão apresentadas algumas das informações sobre o movimento molecular que podem ser obtidas à partir do experimento PUREX, juntamente com algumas vantagens das técnicas. Por enquanto será discutida somente a forma com que tais informações emergem do experimento, sendo que no capítulo 5 será apresentada a demonstração experimental e aplicações de cada um dos tópicos discutidos.

3.4.1 - Escala de tempo do movimento molecular.

A técnica PUREX 1D pode ser utilizada com eficiência para a obtenção de tempos e funções de correlação de movimentos moleculares com escala de tempo típicas entre 1 ms a 1s. A dependência do processo de *Exchange* com o tempo de mistura no experimento PUREX 1D é idêntica ao experimento de *Exchange* convencional adquirido na forma de ecos estimulados⁸. De fato, no experimento de ecos estimulados, os tempos de correlação são obtidos diretamente através do monitoramento da amplitude do sinal como função de t_m . Isto se dá pois como em todo experimento de *Exchange* a escala de tempo do movimento molecular está diretamente relacionado com o tempo de mistura. De fato, demonstrado nas referências 8 e 14 a forma com que a amplitude de *Exchange* varia como função de t_m está diretamente relacionada com a função de correlação do movimento molecular. No caso de um único tempo de correlação, esta função de correlação é exponencial, isto é, $\phi(t_m, \tau_c) = e^{-\frac{t_m}{\tau_c}}$, onde τ_c é o tempo de correlação do movimento. Sendo assim obter a curva de exchange como função de t_m significa conhecer a função de correlação do movimento molecular lento. No caso do experimento PUREX 1D, a análise da amplitude do espectro como função de t_m provê a mesma informação. Seguindo a análise dos ecos estimulados feita por Fujara et. al.⁸ para reorientações entre sítios discretos, a amplitude normalizada do espectro PUREX como função de t_m , para $\delta\tau$ fixo, está relacionada com a função de correlação $\phi(t_m, \tau_c)$ do movimento molecular através da seguinte expressão:

$$\begin{aligned} E(t_m, \delta\tau) &= \frac{S_0 - S}{S_0} = \frac{f_m(M-1)}{M} C(t_m, \tau_c) \langle 2\text{sen}^2[(\Omega_1 - \Omega_2)\tau] \rangle = \\ &= f(t_m)G(\tau) \\ f(t_m) &= \frac{f_m(M-1)}{M} C(t_m, \tau_c); G(\tau) = \langle 2\text{sen}^2[(\Omega_1 - \Omega_2)\tau] \rangle \end{aligned} \quad (3.12)$$

onde f_m representa a fração de sítios envolvida no movimento molecular, M o número de sítios magneticamente não equivalentes acessíveis. S e S_0 representam, respectivamente, as intensidades dos espectros modulado e de referência no experimento PUREX 1D. A função $C(t_m, \tau_c)$ está relacionada com a função de correlação do movimento molecular, $\phi(t_m, \tau_c)$, de tal forma que $C(t_m, \tau_c) = 1 - \phi(t_m, \tau_c)$.

O gráfico da amplitude $E(t_m, \delta\tau)$ como função de t_m provê informação direta sobre o tempo de correlação do movimento molecular lento. Na figura 3.7 estão ilustradas as curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ como função de t_m , obtidas à partir da expressão 3.12, assumindo uma função de correlação exponencial, $\phi(t_m, \tau_c) = e^{-\frac{t_m}{\tau_c}}$. Foram utilizados diferentes tempos de correlação que produzem curvas facilmente distinguíveis.

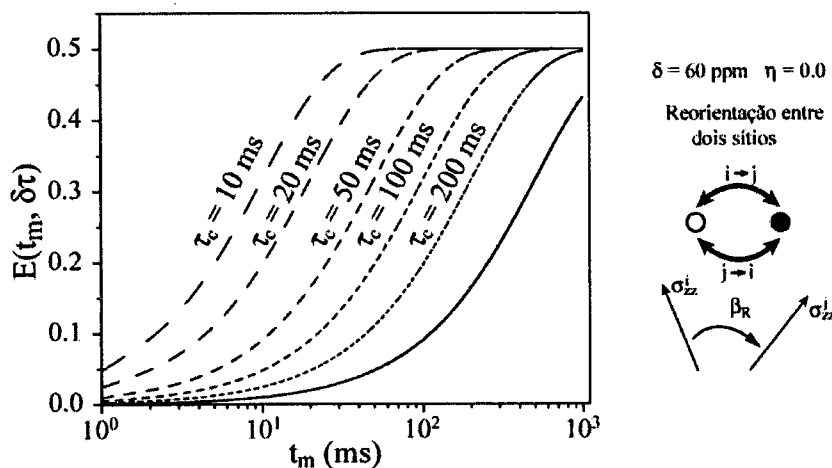


Figura 3.7 - Simulações da intensidade $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m para um processo dinâmico envolvendo dois sítios não equivalentes, para os tempos de correlação indicados.

Uma vantagem evidente da técnica PUREX é que a análise é feita no domínio de frequências, o que permite que o experimento possua alguma resolução espectral. De fato, embora o espectro PUREX seja um espectro típico de pó, em sistemas com poucos grupos químicos ainda é possível separar as contribuições de cada um deles. Na técnica de ecos estimulados o sinal é analisado no domínio do tempo, e, portanto, não existe nenhuma resolução espectral.

As funções e tempos de correlação que caracterizam o movimento molecular podem ser obtidos também pela técnica PUREX EIS. O aumento da amplitude da bandas laterais ou do decréscimo da banda central como função de t_m provê diretamente a função de correlação que caracteriza o movimento molecular. Outros experimentos de *Exchange* podem ser utilizados na obtenção da escala de tempo dos movimento lentos em sólidos⁸⁻¹⁰. Alguns deles, como o experimento de excitação seletiva SELDON⁵ ou mesmo ecos estimulados, podem se considerados “inferiores” ao experimento PUREX, tanto por questões de sensibilidade como por resolução espectral. No entanto, alguns experimentos capazes de obter tal informação com grande sensibilidade foram propostos recentemente. Nestes experimentos^{9,10} a amplitude das bandas laterais obtidas após a aplicação da

seqüência de pulsos são utilizadas para obter informações precisas sobre os tempos de correlação dos movimentos lentos em sólidos. Além disso, devido à simplicidade do experimento, a sensibilidade do mesmo é pelo menos uma ordem de magnitude maior que a do experimento PUREX 1D. Entretanto, a realização de experimentos estáticos é vantajosa em alguns aspectos, como por exemplo, a faixa de variação de temperatura em sondas modernas de RMN é quase sempre maior quando as mesmas não são equipadas com sistema de rotação da amostra.

3.4.2 - Fração de sítios móveis e números de sítios não equivalentes.

A fração de sítios envolvidos no movimento molecular lento, f_m , pode ser estimada através da razão entre as intensidades do espectro PUREX 1D e do espectro de referência correspondente, $E(t_m, \delta\tau)$. De acordo com a expressão 3.12, no limite $t_m \gg \tau_c$ e $\tau \gg 1/\Delta\Omega$, E_∞ está relacionado com f_m e com o número de sítios envolvidos no movimento molecular, M , através da seguinte expressão⁸:

$$E_\infty = f_m (M - 1) / M \quad (3.13)$$

Por exemplo, no caso em que todos os segmentos moleculares de uma amostra, $f_m = 1$, executam um movimento entre três sítios não equivalentes, $M = 3$, obter-se-á $E_\infty = \frac{2}{3}$. Os limites de f_m podem ser obtidos a partir da equação 3.13, resultando em:

$$E_\infty < f_m \leq 2E_\infty \quad (3.14)$$

É interessante notar que as quantidades f_m e M são interdependentes na expressão 3.13. Deste modo, para determiná-las sem ambigüidades é necessário que uma delas seja conhecida. Isto é um fator limitante, visto que na maioria das vezes as duas grandezas são desconhecidas. Geralmente, informações sobre a geometria e conformação molecular podem ajudar na definição de um desses parâmetros. É possível também utilizar outras técnicas auxiliares na análise. No próximo capítulo será apresentada uma nova técnica de RMN onde é possível determinar o número de sítios acessíveis ao movimento molecular sem ambigüidades e este fator poderá ser utilizado na expressão 3.13 para obter a fração móvel.

3.4.3 - Geometria do movimento molecular.

A amplitude e geometria do movimento molecular podem também ser estudadas utilizando a versão unidimensional do experimento PUREX. A intensidade normalizada $E(t_m, \delta\tau)$ é obtida diretamente à partir da expressão 3.12. Nesta expressão, a diferença de frequência $|\Omega_1 - \Omega_2|$ depende da amplitude do movimento molecular, isto é, do ângulo de reorientação, e da anisotropia do deslocamento químico, $\delta = \sigma_{zz} - \sigma_{iso}$, já que as frequências individuais Ω_1 e Ω_2 dependem de δ . Deste modo, se a anisotropia de deslocamento químico é conhecida, o gráfico de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. $\delta\tau$, para t_m fixo, dá origem a uma curva que está diretamente relacionada com a amplitude do movimento. Para valores curtos de $\delta\tau$, somente segmentos que se reorientam por grandes ângulos contribuem para $E(t_m, \delta\tau)$ enquanto que para $\delta\tau$ longo, movimentos envolvendo grandes e pequenos ângulos são observados. Na Figura 3.8 está ilustrada a curva $E(t_m, \delta\tau)$ vs. $\delta\tau$ para um processo de reorientação entre dois sítios com ângulo de reorientação β_R . Pode-se notar que para ângulos pequenos, $\beta_R < 40^\circ$, as curvas podem ser facilmente distinguidas entre si, enquanto que para $\beta_R > 40^\circ$ elas são praticamente idênticas. Isto demonstra que esta técnica é bastante sensível à reorientações de pequena amplitude, o que caracteriza uma vantagem em relação a técnica 2D *Exchange* onde é muito difícil caracterizar a geometria de movimentos com ângulos de reorientação menores que 15° . No capítulo 5, o uso da técnica PUREX 1D na análise da geometria do movimento molecular será discutida com maiores detalhes.

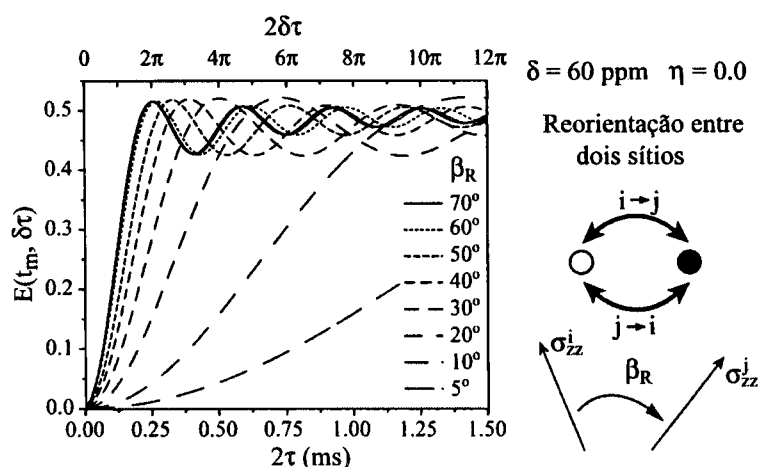


Figura 3.8 - Simulações da intensidade $E(t_m, \delta\tau)$ vs. $\delta\tau$ para um processo dinâmico envolvendo dois sítios magneticamente não equivalentes, com ângulo de reorientação β_R .

3.5 - O experimento PUREX 1D no regime de movimento intermediário.

3.5.1 - Tempo de correlação único.

Como já discutido na seção anterior, no regime de movimentos lentos a técnica PUREX 1D pode ser utilizada para obter informações tanto sobre a escala de tempo quanto sobre a amplitude do movimento molecular.

No caso em que o tempo de correlação do movimento molecular estudado for da ordem ou inferior a 1 ms, a expressão 3.12 não é válida, o que limita a técnica ao estudo de movimentos com tempos de correlação no intervalo de 1 ms a 1 s, denominado janela dinâmica do experimento. A não validade da expressão 3.12 para movimentos no regime intermediário está associada a dois aspectos principais. Em primeiro lugar, a premissa de que não há movimento durante os tempos de evolução, τ , não é válida no caso de movimento molecular no regime intermediário. Tais movimentos durante τ promediam a interação de deslocamento químico neste período, de modo que o fator de modulação $G(\tau)$ não pode ser escrito simplesmente como $\langle 2\text{sen}^2[(\Omega_1 - \Omega_2)\tau] \rangle$. O outro fator está relacionado com o espectro de referência S_0 . No regime de movimento lento, este espectro é adquirido normalmente com $t_m = t_z \sim 1$ ms, de modo que os efeitos da reorientação molecular não são observados neste espectro. Todavia, no regime intermediário os tempos de correlação são da ordem de t_z , fazendo com que os efeitos do movimento molecular também apareçam em S_0 . Portanto, para entender efetivamente como movimentos no regime intermediário afetam o sinal PUREX 1D é necessário calcular os efeitos destes movimentos na amplitude $E(t_m, \delta\tau)$.

O formalismo da matrix de *exchange*, discutido no capítulo 2, pode ser facilmente utilizado para prever o sinal obtido pela técnica PUREX 1D em qualquer regime de movimento molecular. Para isso, é necessário calcular o sinal obtido no experimento modulado, S , e de referência, S_0 , separadamente. No entanto, é interessante notar que em ambas aquisições a seqüência de pulsos é idêntica a menos do intercâmbio entre t_m e t_z . Além disso, o fator de modulação da seqüência PUREX 1D é definido basicamente pela evolução até o início do segundo período-z, o que faz com que os sinais S e S_0 possam ser calculados neste ponto. Os fatores de relaxação podem ser desprezados sem perda de generalidade, pois em $E(t_m, \delta\tau)$ esses fatores desaparecem devido à divisão $(S-S_0)/S_0$.

Seguindo o formalismo de Kalfmann et. al.^{11,12}, a função complexa que representa a magnetização do sistema de spins em $t = \tau + t_m + \tau$, para um dado ciclo de fases da seqüência PUREX 1D, pode ser calculada como:

$$G_-(\tau, t_m) = \sum e^{(\tilde{n}-i\tilde{\omega})\tau} e^{(\tilde{n})t_m} e^{(\tilde{n}+i\tilde{\omega})\tau} \tilde{p} \quad (3.15)$$

Novamente a soma é realizada sobre todos os elementos da matriz. No caso do regime de movimentos lentos, o sinal obtido na técnica PUREX 1D é calculado combinando os componentes da magnetização modulados por $\cos(\omega_1\tau)\cos(\omega_2\tau)$ e $\sin(\omega_1\tau)\sin(\omega_2\tau)$, respectivamente, de modo que $S = [\cos(\omega_1\tau)\cos(\omega_2\tau) + \sin(\omega_1\tau)\sin(\omega_2\tau)]$. No caso de regime intermediário, esta combinação pode ser obtida diretamente à partir da função G tomando-se a parte real da mesma¹¹ de modo que:

$$S = S(\tau, t_m) = \text{Re}\{G_-(\tau, t_m)\} \quad (3.16)$$

O sinal de referência pode ser calculado somente substituindo t_m por t_z , logo:

$$S_0 = S(\tau, t_z) = \text{Re}\{G_-(\tau, t_z)\} \quad (3.17)$$

Portanto, a amplitude normalizada $E(t_m, \delta\tau)$ fica:

$$\begin{aligned} E(t_m, \delta\tau) &= (S_0 - S) / S_0 = \\ &= \frac{\text{Re}\{G_-(\tau, t_z)\} - \text{Re}\{G_-(\tau, t_m)\}}{\text{Re}\{G_-(\tau, t_z)\}} \end{aligned} \quad (3.18)$$

Esta expressão permite que a amplitude $E(t_m, \delta\tau)$ seja calculada como função de t_m e τ em qualquer regime de movimento, o que permite extrair informações sobre o movimento molecular no regime intermediário, onde os tempos de correlação envolvidos são da ordem de 10 μ s a 1 ms. Movimentos com tempos de correlação inferiores a 10 μ s promediam totalmente a anisotropia de deslocamento químico durante os tempos de evolução, impossibilitando o estudo de tais movimentos utilizando PUREX.

Na Figura 3.9 estão mostradas as curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m para diversos tempos de correlação no regime lento e intermediário, considerando novamente uma reorientação molecular entre dois sítios. Como já mencionado, espera-se que dois efeitos principais afetem a amplitude $E(t_m, \delta\tau)$ no caso de movimento no regime intermediário: a promediação parcial da anisotropia de deslocamento químico durante os períodos de evolução, τ , e o efeito de *exchange* no espectro de referência. Na Figura 3.9a as simulações das curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m foram realizadas com $t_z = 10^{-9}$ s de modo que os efeitos da

reorientação molecular não são observados no espectro de referência. Para tempos de correlação da ordem ou maiores que ~ 5 ms, as curvas são idênticas às apresentadas na Figura 3.7, indicando que a expressão 3.18 inclui o limite de movimentos lentos. No entanto, para tempos de correlação menores que 5 ms, a amplitude final E_∞ decai à medida que o tempo de correlação diminui até se anular totalmente quando $\tau_c \sim 10 \mu\text{s}$. É importante enfatizar que este decaimento resulta somente da promediação do CSA durante τ , já que neste caso t_z é muito menor que os tempos de correlação utilizados. O limite experimental mínimo para t_z é da ordem 100 μs , pois é necessário garantir que haja tempo suficiente para que a magnetização transversal remanescente em t_m seja destruída pelo acoplamento dipolar C-H, que é tipicamente da ordem de dezenas de kHz. Devido à esta limitação experimental, é impossível garantir que não haja o efeito do movimento molecular no espectro de referência. Na Figura 3.8b estão mostradas curvas simuladas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m para $t_z = 500 \mu\text{s}$, onde pode ser observado que o decaimento de E_∞ com τ_c é mais rápido se comparado com a Figura 3.8a. Isto advém do fato de que no regime intermediário a intensidade S_0 é diminuída devido ao *exchange*, o que implica no decréscimo de $E(t_m, \delta\tau)$. No entanto, a taxa de decréscimo de E_∞ está diretamente ligada com a taxa de variação dos tempos de correlação no regime intermediário, que podem então serem determinados através da análise de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m .

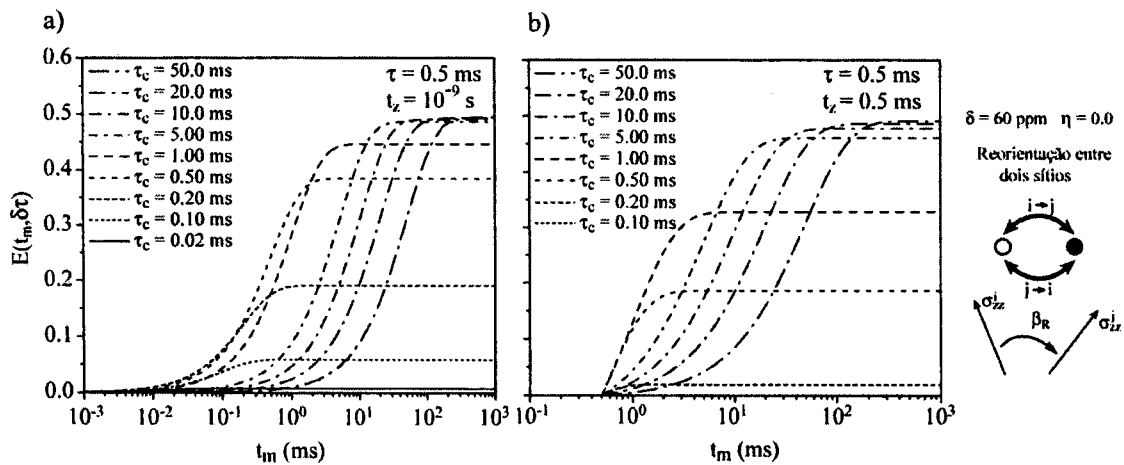


Figura 3.9 - Curvas típicas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. t_m para um processo de reorientação entre dois sítios no regime de movimento intermediário.

Um outro aspecto importante diz respeito à dependência das curvas $E(t_m, \delta\tau)$ vs. τ no regime de movimento intermediário. Como já discutido anteriormente, esta dependência traz informação direta sobre a geometria do movimento molecular e é importante conhecer o comportamento de tais curvas no regime intermediário. Na Figura 3.10 estão mostradas

curvas $E(t_m, \delta\tau)$ vs. τ para vários tempos de correlação. Nota-se o mesmo decréscimo de E_∞ observado no caso das curvas em função de t_m . Além disso, uma pequena distorção na forma da curva pode ser observada para tempos de correlação menores que 1 ms, a qual está relacionada com a promediação parcial do CSA durante τ . Como a fase acumulada que define a modulação no espectro PUREX 1D depende basicamente de $|(\Omega_1 - \Omega_2)\tau|$ espera-se que o efeito da promediação do CSA em Ω_1 e Ω_2 apareça para maiores valores de τ , o que pode ser observado na Figura. No entanto, o crescimento inicial da curva não parece variar muito com o tempo de correlação, indicando que a informação sobre amplitude do movimento molecular pode ser obtida mesmo no regime intermediário. Isto é particularmente importante no caso em que se deseja estudar movimentos com uma larga distribuição de tempos de correlação, pois nestes casos parte dos segmentos podem estar realizando reorientações moleculares com tempos de correlação entre 10 μ s e 1 ms e irão contribuir para a curva PUREX 1D de forma diferente que os segmentos se movendo com tempos de correlação de 1 ms a 1 s. No entanto, como pode ser observado na Figura 3.9, as curvas como função de τ podem ser simuladas como se todos os segmentos estivessem no regime lento para se obter informação sobre a geometria do movimento ainda com uma boa aproximação. Obviamente, se tal procedimento for utilizado, um fator de escala deverá ser utilizado.

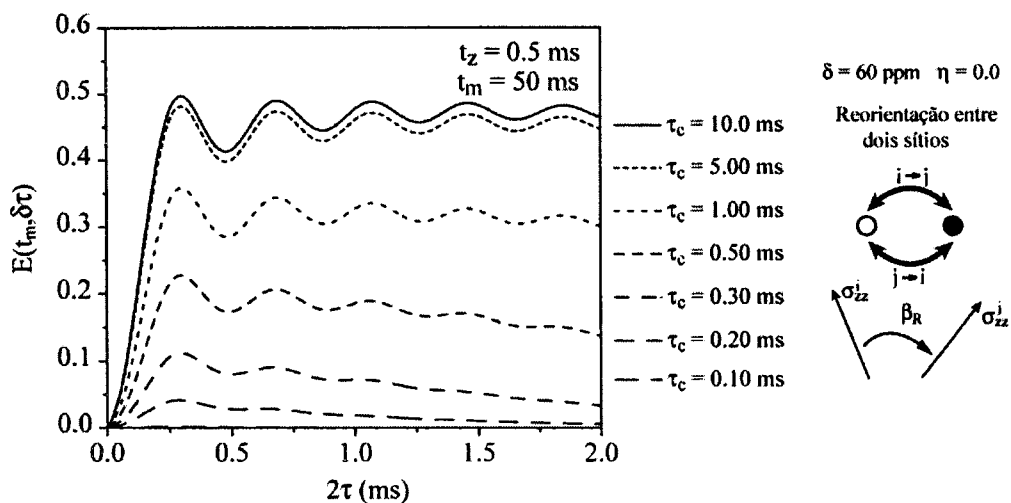


Figura 3.10 - Curvas típicas de $E(t_m, \delta\tau)$ vs. τ para um processo de reorientação entre dois sítios no regime de movimento intermediário.

3.5.2 - Distribuição de tempos de correlação.

Um aspecto importante da análise do movimento molecular por RMN de *exchange* é a sensibilidade do mesmo à distribuição de tempos de correlação. Uma vez que a janela dinâmica observável neste experimento está entre 0.1 ms e 1 s, se o movimento molecular envolve distribuições de tempos de correlação com largura superior a essa janela, segmentos que se movem com tempos de correlação mais curtos que ~0.1 ms aparecerão como se fossem rígidos no experimento. Com respeito aos segmentos que se movem com tempos de correlação dentro da janela dinâmica observável, alguns estarão no regime intermediário, enquanto que outros se moverão no regime de movimentos lentos. Deste modo, para simular exatamente as curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m e $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ e obter informações sobre a distribuição de tempos de correlação é importante utilizar a expressão 3.19, que é exata em todos os regimes do movimento molecular.

Processos dinâmicos em sistemas heterogêneos geralmente não podem ser caracterizados por um único tempo de correlação. Isto se dá basicamente devido ao fato de que o movimento molecular de cada segmento específico depende de sua vizinhança, o que faz com que diferentes segmentos se movam com tempos de correlação distintos. Essas diferenças nos tempos de correlação podem geralmente ser expressas em termos de uma função distribuição de tempos de correlação, $g_\tau(\tau_c)$. Neste caso, a função de correlação pode ser representada por uma superposição de funções exponenciais pesadas por $g_\tau(\tau_c)$, o que pode ser expresso por:

$$\Phi(t) = \int_0^{\infty} g_\tau(\tau_c) e^{-t/\tau_c} d\tau_c \quad ; \quad \int_0^{\infty} g_\tau(\tau_c) d\tau_c = 1 \quad (3.19)$$

A distribuição de tempos de correlação pode ser expressa como a transformada de Laplace inversa da função de correlação, isto é:

$$g_\tau(\tau_c) = \int_0^{\infty} \Phi(t) e^{-t/\tau_c} dt \quad (3.20)$$

Geralmente, a função de correlação em processos com a presença de distribuições de tempos de correlação é aproximada por uma função do tipo $\exp(-(t/\tau_c)^\beta)$, denominada função Kohlrausch-Williams-Watt (KWW)¹³ ou *stretched exponential*. A transformada de Laplace desta função pode ser calculada numericamente utilizando a equação 3.20. Uma outra aproximação comum é representar a distribuição de tempos de correlação por uma função analítica do tipo *log-Gaussian*¹⁴, que pode ser expressa por:

$$g_{\tau}(\ln \tau_c) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(\ln \tau_c - \ln \tau_{c0})^2}{2\sigma^2}} \quad (3.21)$$

O centro desta função é $\tau_{c0} = \exp\langle \ln \tau_c \rangle$ e sua largura total em décadas a $1/e$ da altura máxima, é definida como:

$$\Delta\sigma = \log|e^{2\sigma}| \approx 0.87\sigma \quad (3.22)$$

Na Figura 3.11 estão mostrados alguns exemplos de distribuições de tempos de correlação obtidas à partir das funções KWW e *log-Gaussian*.

Uma vez conhecida a função distribuição $g(\tau_c)$, as intensidades S e S_0 , medidas no experimento PUREX 1D ou mesmo 2D, podem ser calculadas à partir da superposição das intensidades calculadas para um dado τ_c , S_{τ_c}

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\tau_c} g_{\tau}(\ln \tau_c) d \ln \tau_c \quad ; \quad S_0 = \int_{-\infty}^{\infty} S_{0\tau_c} g_{\tau}(\ln \tau_c) d \ln \tau_c \quad (3.23)$$

onde S_{τ_c} e $S_{0\tau_c}$ podem ser calculados à partir da expressão 3.16 e 3.17.

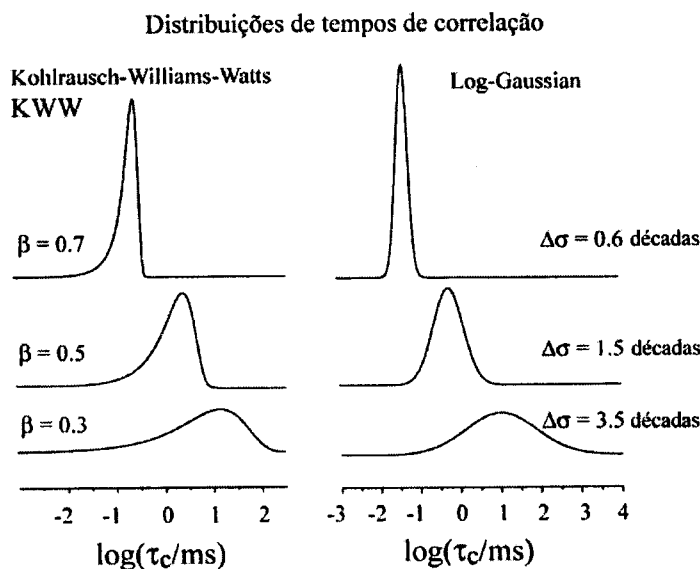


Figura 3.11- Distribuições de tempos de correlação típicas: a) KWW e b) log-Gaussian

Na Figura 3.12 estão mostradas as curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ calculadas para um caso hipotético de reorientação entre dois sítios com diferentes distribuições de tempos de correlação log-Gaussian. O principal efeito observado é o decréscimo do valor E_{∞} com a largura de $g(\tau_c)$. Isto se deve ao fato de que para distribuições de tempos de correlação somente uma fração dos segmentos móveis será observada no experimento PUREX 1D.

Obviamente, tal fração diminui com o aumento da largura de $g(\tau_c)$. Portanto, se a geometria do movimento molecular é conhecida, a largura da distribuição de tempos de correlação poderá ser estimada simplesmente através do valor de E_∞ .

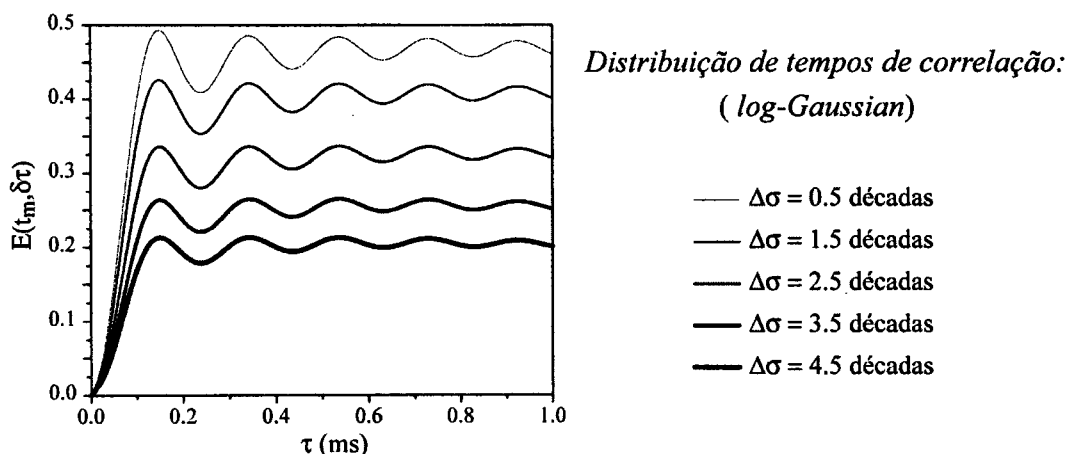


Figura 3.12 - Curvas simuladas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para um processo de reorientação de dois sítios com uma distribuição de tempos de correlação com largura indicada na Figura.

3.6 - Intensidade PUREX 1D como função da temperatura.

A determinação dos tempos de correlação de processos dinâmicos como função da temperatura permite obter a energia de ativação do movimento molecular através do tradicional gráfico de Arrhenius. No entanto, no caso em que o processo dinâmico envolve um único tempo de correlação, através do experimento PUREX é possível determinar a energia de ativação sem a necessidade de medir os tempos de correlação para cada temperatura. Isto pode ser feito através da determinação da intensidade $E(t_m, \delta\tau)$ como função da temperatura para um dado t_m e τ escolhido de modo que $\delta\tau \gg 1$.

3.6.1 - Regime de movimento lento.

No caso em que o movimento molecular pode ser caracterizado por um único tempo de correlação, $\tau_c > 5$ ms, a função $C(t_m, \tau_c)$ pode ser expressa por uma função exponencial dada por:

$$C(t_m, \tau_c) = \left(1 - e^{-\frac{t_m}{\tau_c}} \right) \quad (3.24)$$

Considerando especificamente a intensidade PUREX 1D, $E(t_m, \delta\tau)$, tem-se que no limite $\delta\tau \gg 1$:

$$E(t_m, \delta\tau) = E_\infty \left(1 - e^{-\frac{tm}{\tau_c}} \right) ; \text{ onde: } E_\infty = f_m \left(1 - \frac{1}{M} \right) \quad (3.25)$$

Considerando agora um processo do tipo Arrhenius, o tempo de correlação como função da temperatura é descrito por:

$$\tau_c = \tau_0 e^{\frac{E_a}{KT}} \quad (3.26)$$

onde E_a (energia de ativação) e τ_0 são os parâmetros da curva de Arrhenius. Inserindo essa expressão em 3.25, tem-se:

$$E(t_m, \delta\tau) = E_\infty \left(1 - \exp \left(-\frac{tm}{\tau_0} e^{-\frac{E_a}{KT}} \right) \right) \quad (3.27)$$

Usando esta expressão é possível simular a curva de $E(t_m, \delta\tau)$ como função da temperatura para o regime de movimentos lentos. Esta curva dependerá de E_a e τ_0 , que poderão então ser determinados através do ajuste da curva com os resultados experimentais. Outro detalhe que se deve levar em conta é que a intensidade $E(t_m, \delta\tau)$ só pode ser calculada pela expressão 3.27 no caso de movimentos lentos de modo que não é válida para $\tau_c < 1$ ms. Na verdade, E_a e τ_0 podem ser obtidos diretamente dos dados experimentais definindo uma nova função a partir de $E(t_m, \delta\tau)$. Para definir esta função é necessário considerar a seguinte relação, obtida a partir da equação 3.25:

$$1 - \frac{E(tm, \delta\tau)}{E_\infty} = e^{-\frac{tm}{\tau_c}} \quad (3.28)$$

Tomando o logarítmico natural em ambos os lados da equação 3.28 e multiplicando por (-1), tem-se:

$$-\ln \left(1 - \frac{E(tm, \delta\tau)}{E_\infty} \right) = \frac{tm}{\tau_c} \quad (3.29)$$

Substituindo o tempo de correlação e usando a função de Arrhenius,

$$-\ln \left(1 - \frac{E(tm, \delta\tau)}{E_\infty} \right) = \frac{tm}{\tau_0} e^{-\frac{E_a}{KT}} \quad (3.30)$$

Tomando o logaritmo natural novamente,

$$\ln \left(-\ln \left(1 - \frac{E(tm, \delta\tau)}{E_\infty} \right) \right) = \frac{-E_a}{KT} + \ln \left(\frac{tm}{\tau_0} \right) \quad (3.31)$$

Portanto, o gráfico desta quantidade com função de $1/T$ é uma linha reta, cujos coeficientes angulares e lineares só dependem de E_a e τ_0 para t_m fixo no experimento. Obviamente esta expressão só é válida na região:

$$0 < E(t_m \delta \tau) < E_\infty \quad (3.32)$$

Na Figura 3.13 está mostrada a dependência de $E(t_m \delta \tau)$ versus temperatura para diferentes E_a e τ_0 .

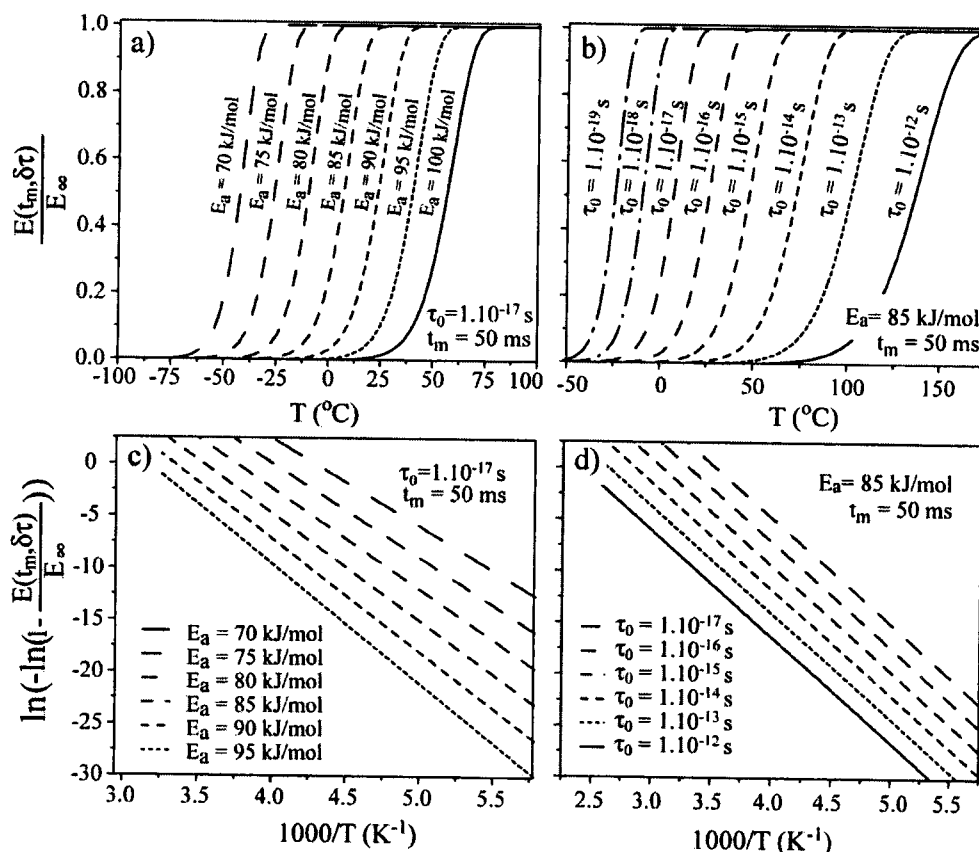


Figura 3.13 – Curvas de $E(t_m \delta \tau)$ versus T calculadas como função dos parâmetros de Arrhenius E_a e τ_0 . a) $E(t_m \delta \tau)$ versus T como função da energia de ativação: Somente um deslocamento da curva em temperatura é observado. b) $E(t_m \delta \tau)$ versus T como função de τ_0 : Além do deslocamento em temperatura, uma variação na taxa de crescimento da curva é observado. c) Gráfico onde a energia de ativação é obtida do coeficiente angular da reta para vários E_a . d) Gráfico onde o parâmetro τ_0 é obtido do coeficiente linear da reta para vários valores desse parâmetro.

Na Figura 3.13a observa-se que o efeito da variação da energia de ativação nestas curvas é um deslocamento das mesmas em temperatura. Por outro lado, além de um deslocamento em temperatura, a variação de τ_0 implica também na mudança da taxa de crescimento da mesma. Como a variação desses dois parâmetros tem efeitos similares na curva de $E(t_m \delta \tau)$ versus T , os gráficos mostrados na Figura 3.13c e d tornam-se úteis, já

que neles a energia de ativação pode ser estimada diretamente do coeficiente angular da reta, enquanto que τ_0 pode ser obtido à partir do coeficiente linear. Isto pode ser observado na figura 3.13c e d. O método discutido aqui permite uma rápida estimativa da energia de ativação quando o movimento ocorre com tempo de correlação único. Em termos de tempo de medida isto pode significar uma grande vantagem, pois para se obter uma curva $E(t_m\delta\tau)$ versus T somente uma média de $E(t_m\delta\tau)$ por temperatura é necessária, enquanto que para obter o gráfico de Arrhenius tradicional o tempo de correlação deve ser determinado à partir das curvas de $E(t_m\delta\tau)$ versus t_m o que significa que pelo menos 10 valores de $E(t_m\delta\tau)$ devem ser medidos para cada temperatura, já que é necessário obter os tempos de correlação individuais.

No entanto, a maioria dos problemas dinâmicos de interesse em física e ciência de materiais envolvem distribuições de tempos de correlação. Neste casos, a análise das curvas de $E(t_m\delta\tau)$ versus T tornam-se um tanto mais complexas. Estes estudos ainda estão em andamento e não serão apresentados neste trabalho, sendo uma extensão natural do mesmo.

3.6.2 - Regime de movimento intermediário.

No regime de movimento intermediário a curva $E(t_m, \delta\tau)$ como função da temperatura pode ser simulada utilizando a expressão 3.18 e assumindo uma dependência conhecida do tempo de correlação com a temperatura, Arrhenius por exemplo. Na Figura 3.14a um conjunto de curvas calculadas para diferentes energias de ativação está mostrado. Uma variação similar a da Figura 3.13 é observada. No entanto, neste caso observa-se também o decréscimo da amplitude $E(t_m, \delta\tau)$ para valores maiores de temperaturas. Este decréscimo está relacionado com a promediação da anisotropia de deslocamento químico característico de movimentos no regime intermediário. Um outro efeito interessante é que o decréscimo de $E(t_m, \delta\tau)$ depende também do tempo de mistura no experimento de referência, t_z . Esta dependência pode ser facilmente entendida à luz da análise feita anteriormente, pois quanto mais longo o período t_z maior será o efeito de *exchange* no espectro de referência e, portanto, mais rápido será o decaimento de $E(t_m, \delta\tau)$. Obviamente, tal decaimento também depende da anisotropia de deslocamento químico e do período τ , mas para valores de t_z típicos, pode-se dizer que o efeito de *exchange* durante t_z domina o decaimento.

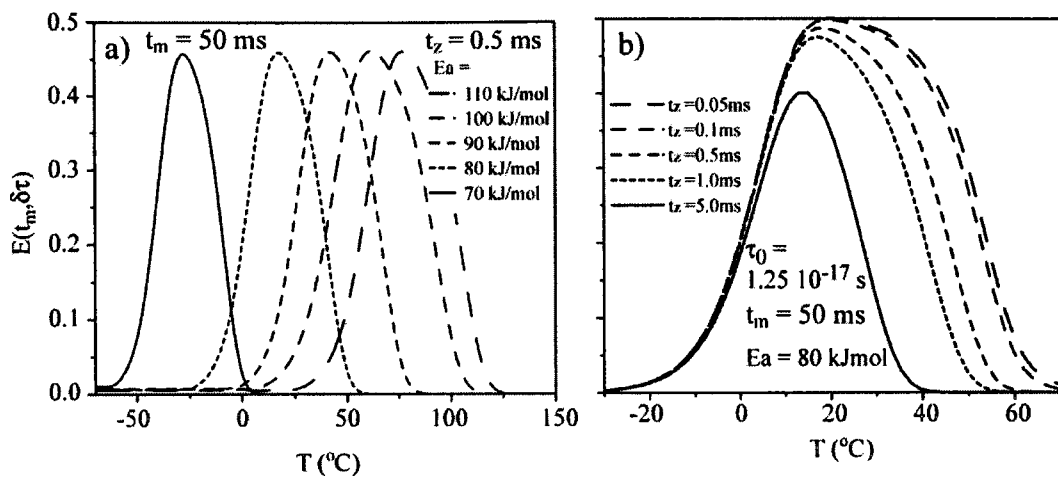


Figura 3.14 - Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T . a) em função da energia de ativação, E_a . b) em função do período t_z . Ambas as curvas foram calculadas utilizando a equação 3.18.

3.7 - Conclusão.

Neste capítulo foram apresentadas novas técnicas de RMN de Exchange, denominadas *Pure-Exchange Solid State NMR (PUREX)* que executam a supressão dos segmentos rígidos na escala de tempo de 1 ms - 1 s. A versão bidimensional da técnica leva às mesmas informações que a técnica *Exchange 2D*, porém com a supressão da diagonal do espectro, possibilitando que a mesma possa ser aplicada mesmo nos casos onde a maioria dos segmentos não se move na escala de tempo de 1 ms - 1s. A versão unidimensional da técnica provê uma forma eficiente para a determinação dos tempos de correlação dos movimentos lentos, além de poder ser utilizada na obtenção da amplitude desses movimentos. A técnica PUREX EIS, pode também ser utilizada na obtenção de tempos de correlação, com a vantagem da maior sensibilidade proporcionada pela rotação lenta da amostra em torno do ângulo mágico. Entretanto, existem muitos fatores experimentais que podem comprometer a utilização dessa técnica, como por exemplo as imperfeições decorrentes do uso da seqüência TOSS. Foi apresentada também a análise da técnica PUREX 1D no regime de movimentos intermediários ($\tau_c \sim 10 \mu s - 1 ms$), onde foi demonstrado que com o tratamento adequado, este experimento também pode ser utilizado no estudo de movimentos moleculares que ocorrem nesta escala de tempo. A análise da amplitude de *exchange*, a qual pode ser medida pelas técnicas PUREX, como função da temperatura consiste de uma nova aproximação para obtenção da energia de ativação de processos lentos. Um fator limitante de todas as técnicas apresentadas é a baixa resolução espectral, já que elas não podem ser aplicadas com rotação rápida em torno do ângulo mágico. Deste modo, torna-se muito difícil utilizar as mesmas para o estudo de materiais

quimicamente mais complexos sem o enriquecimento isotópico em ^{13}C . No entanto, isto é uma limitação geral das técnicas de *Exchange* em sólidos. No próximo capítulo serão propostas outras técnicas que permitem analisar movimentos lentos com a mais alta resolução e sensibilidade decorrentes da utilização da rotação rápida da amostra em torno do ângulo mágico. Uma discussão mais minuciosa de alguns tópicos apresentados neste capítulo e que são comuns às todas técnicas apresentadas neste trabalho também será feita no próximo capítulo.

3.8 - Referências.

- [1] deAzevedo, E. R.; Bonagamba, T. J.; Schmidt-Rohr, K. *J. Mag. Reson.* **2000**, *142*, 86-96.
- [2] Bodenhausen, G.; Ernst, R. R. *Mol. Phys.* **1982**, *47*, 319-328.
- [3] Baur, M.; Kessler, H. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 877-882.
- [4] Zhu, G.; Choy, W. Y.; Song, G.; Sanctuary, B. C. *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 176-178.
- [5] Tekely, P.; Brondeau, J.; Elbayed, K.; Retournard, A.; Canet, D. *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 509.
- [6] Yang, Y.; Schuster, M.; Blümich, B.; Spiess, H. W. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *139*, 239-243.
- [7] Dixon, W. T. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 1800.
- [8] Fujara, F.; Welfing, S.; Spiess, W. H. *J. Chem. Phys.* **1986**, *97*, 2928.
- [9] Gèrardy-Montouillout, V.; Malveau, C.; Tekely, P.; Olender, Z.; Luz, Z. *J. Magn. Reson.* **1996**, *A123*, 7-15.
- [10] Reichert, D.; Zimmermann, H.; Tekely, P.; Poupko, R.; Luz, Z. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 245-258.
- [11] Kaufmann, S.; Wefing, S.; Schaefer, D.; Spiess, W. *J. Chem. Phys.* **1990**, *1*, 197-214.
- [12] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; 1st ed.; Academic Press: London, 1994; Vol. 1.
- [13] Cumbera, F. L.; Sanchez-Bajo, F.; Guiberteau, F.; Solier, J. D. *J. Mat. Sci.* **1993**, *28*, 5397-5397.
- [14] Schaefer, D.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 7944-7953.
- [15] Favre, D. E.; Schaefer, D. J.; Chmelka, B. F. *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 261-279.

Capítulo 4 – *Centerband Only Detection of Exchange (CODEX): Um método eficiente para análise da dinâmica lenta de sólidos*

As técnicas de RMN de *Exchange* utilizam a anisotropia das interações de spin nuclear para obter informações sobre movimentos lentos em sólidos. Deste modo, é natural pensar que é preciso que essa anisotropia apareça no espectro para que o experimento seja realizado. Ou seja, os espectros deveriam ser adquiridos sem rotação da amostra em torno do ângulo mágico, ou o padrão de bandas laterais deveria ser observado. No entanto, isto reduz a resolução espectral dos experimentos, tornando muito difícil utilizar RMN de *Exchange* para estudar sistemas constituídos por vários grupos químicos. Esta limitação pode ser contornada em parte através de enriquecimento químico isotópico de núcleos ^{13}C ou ^2H em sítios específicos da amostra, fazendo com que linha de ressonância observada seja proveniente sobretudo daquele sítio. Porém, esta solução, além de difícil, já que este processo de enriquecimento não é trivial, é muito cara.

Neste capítulo, apresentaremos um novo método capaz de observar reorientações moleculares lentas (com taxas entre 0.1 Hz e 10 kHz) com alta sensibilidade e resolução espectral decorrentes da utilização da técnica de rotação da amostra em torno do ângulo mágico. Inicialmente, uma descrição detalhada da técnica denominada *Centerband-Only Detection of Exchange (CODEX)*¹⁻³ será apresentada. Uma descrição das principais informações que podem ser obtidas por CODEX, bem como a teoria utilizada na análise será feita em seguida. Finalmente, serão descritas duas variantes da técnica CODEX utilizadas para analisar eficientemente a dinâmica lenta em proteínas.

4.1 - RMN de *Exchange* sob rotação da amostra em torno do ângulo mágico e sincronização com a frequência de rotação.

Os primeiros experimentos de RMN de *Exchange* sob MAS (*MAS-Exchange*) foram introduzidos por Kentgens et al¹. A inovação crucial deste trabalho foi a introdução da sincronização da seqüência de pulsos com a frequência de rotação da amostra, fazendo com que o tempo de mistura seja igual a um múltiplo inteiro do período de rotação. Isto faz com que a fase da rotação seja exatamente a mesma no início e no final do período de mistura, conforme ilustrado na figura 4.1. Esta sincronização é fundamental para

experimentos de MAS-Exchange, pois, caso contrário, as reorientações dos segmentos moleculares relativas ao campo externo que ocorrem devido à rotação macroscópica da amostra se sobreporiam aos efeitos do movimento molecular intrínseco. Recentemente, também foram introduzidas versões unidimensionais deste experimento²⁻⁴, as quais também utilizam estes esquemas de sincronização. Uma característica comum a todos os experimentos de MAS-Exchange é que os mesmos utilizam o padrão de bandas laterais para analisar o movimento molecular. Sendo assim, é muito difícil que tais experimentos sejam utilizados para sistemas com vários grupos químicos devido a superposição entre essas bandas.

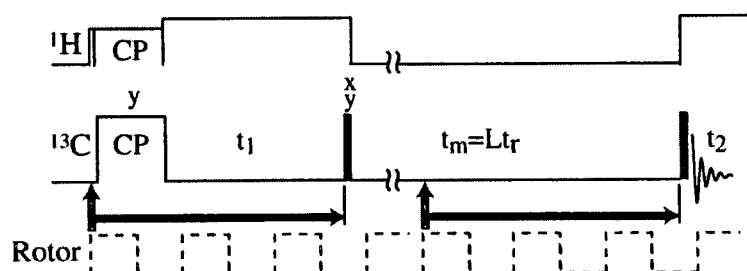


Figura 4.1 - Experimento básico de MAS-Exchange com sincronização com a fase de rotação.

Para tempos de mistura da ordem de alguns períodos de rotação, a sincronização da seqüência de pulsos pode ser realizada simplesmente pela temporização precisa dos pulsos de RF, isto é, fazendo $t_m = Lt_r$, onde L é um número inteiro. Obviamente, isto só é válido se a freqüência de rotação for estável o bastante para que o período de rotação não varie muito durante t_m . No entanto, para valores de t_m mais longos, a simples temporização da seqüência não é suficiente, pois variações muito pequenas na freqüência de rotação já provocam uma perda de coerência de fase muito grande. Por exemplo, para freqüências de rotação típicas da ordem de 5KHz, uma variação de 1 Hz na freqüência de rotação resulta em um desvio de $\pm 36^\circ$ na fase do rotor para $t_m = 100$ ms e em uma incerteza completa da fase para $t_m \approx 1$ s. Portanto, nestes casos, a sincronização deve ser ativada através de pulsos de sincronismo. Um sinal óptico proveniente do detetor de rotação é transformado em sinal de sincronismo por meio de um *trigger* Schmidt. Este sinal é basicamente uma onda quadrada com período igual ao período de rotação, tal como indicado pela linha tracejada na figura 4.1. Deste modo, a transição alto-baixo ou baixo-alto é utilizada para disparar a seqüência de pulsos. Baseado neste tipo de sincronismo, é possível aplicar pulsos na mesma fase de rotação até centenas de rotações depois. Na prática, o disparo da seqüência

por um sinal de sincronismo durante pulsos de RF deve ser evitado, pois uma falha no sinal de sincronismo pode implicar em manter a RF ligada indefinidamente.

4.2 - Apresentação do experimento CODEX

As principais características do experimento CODEX serão apresentadas nesta seção, enfatizando os princípios básicos, a seqüência de pulsos, e o procedimento utilizado na análise dos dados. Uma vez que este experimento envolve o princípio de reintrodução da anisotropia de interações de spin nuclear sob MAS, este princípio será descrito antes da apresentação da técnica.

4.2.1 – Reintrodução da Anisotropia de Deslocamento Químico sob MAS.

Como discutido no capítulo 1, no experimento de RMN de *Exchange* a anisotropia da interação de spin nuclear define a dependência da frequência de RMN com a orientação molecular. No entanto, sob MAS a frequência de RMN devida à anisotropia da interação adquire uma dependência temporal periódica, com período igual ao período de rotação da amostra⁵. Assim, a fase acumulada devido evolução sob a parte anisotrópica da interação se anula em cada período de rotação, tal como ilustrado na figura 4.2a, isto é,

$$\Phi = \int_0^{t_r} (\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR} + \omega_r t) dt = \int_0^{t_r} \Omega(t) dt = 0 \quad (4.1)$$

onde t_r é o período de rotação e $\Omega(t)$ é a parte anisotrópica da frequência de precessão dos spins sob MAS⁵. Novamente utiliza-se aqui o símbolo Ω para indicar que esta é a frequência de precessão dos spins sob MAS e não a dimensão de frequência no espectro de RMN. Deste modo, a expressão para $\Omega(t)$ é dada pela expressão 1.24 do capítulo 1.

Portanto, não é possível realizar um experimento de RMN de *Exchange* convencional com rotação rápida em torno do ângulo mágico, já que a anisotropia da interação não estaria presente, impossibilitando a codificação da reorientação molecular na frequência de RMN. Para codificar a reorientação molecular é necessário evitar o cancelamento da fase acumulada, o que pode ser conseguido através de uma técnica conhecida como reintrodução da anisotropia das interações de spin nuclear, ou princípio REDOR, pois o mesmo foi inicialmente introduzido por Gullion et. al.⁶ no experimento denominado *Rotational Echo Double Resonance* (REDOR). Neste método, um pulso de 180° é

introduzido na metade do período de rotação, tal como esquematizado na figura 4.2b. Isto faz com que a frequência de precessão dos spins seja invertida naquele ponto, fazendo com que a fase acumulada em t_r seja dada por:

$$\Phi = - \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt + \int_{t_r/2}^{t_r} \Omega(t) dt \quad (4.2)$$

Usando:

$$\int_0^{t_r} \Omega(t) dt = \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt + \int_{t_r/2}^{t_r} \Omega(t) dt = 0 \Rightarrow \int_{t_r/2}^{t_r} \Omega(t) dt = - \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt \quad (4.3)$$

Tem-se,

$$\Phi = - \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt + \int_{t_r/2}^{t_r} \Omega(t) dt = - \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt - \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt = -2 \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt \quad (4.4)$$

O sinal de $-$ é simplesmente uma questão de convenção, já que dependerá do sentido de rotação da amostra. Porém em experimentos com rotação em torno do ângulo mágico essa convenção é totalmente geral, visto que a inversão do sinal não altera nenhum aspecto do tratamento, que produz resultados idênticos se o sinal é invertido. De acordo com a expressão 4.4, a fase acumulada em $t = t_r$ não é mais nula, isto é, a anisotropia da interação é reintroduzida pela aplicação do pulso de 180° . Inserindo outro pulso de 180° em t_r , o sinal negativo da equação 4.4 é invertido e o processo pode ser repetido durante N períodos de rotação, conforme ilustrado na figura 4.2c. Neste caso, a fase acumulada ao final destes N períodos será dada por:

$$\Phi = N \left(- \int_0^{t_r/2} \Omega(t') dt' + \int_{t_r/2}^{t_r} \Omega(t') dt' \right) = -2N \int_0^{t_r/2} \Omega(t') dt' \quad (4.5)$$

Portanto, é possível reintroduzir completamente a anisotropia do deslocamento químico através da aplicação de um trem de pulsos de 180° , sincronizados adequadamente com o período de rotação da amostra. Por outro lado, a parte isotrópica da interação de spin nuclear é refocalizada por este tipo de trem de pulsos. De fato, o fator N indicado na equação 4.5 significa ainda que é possível amplificar o efeito da anisotropia de deslocamento químico no espectro, pois um aumento no número de períodos de rotação, N , implica em um aumento da fase acumulada.

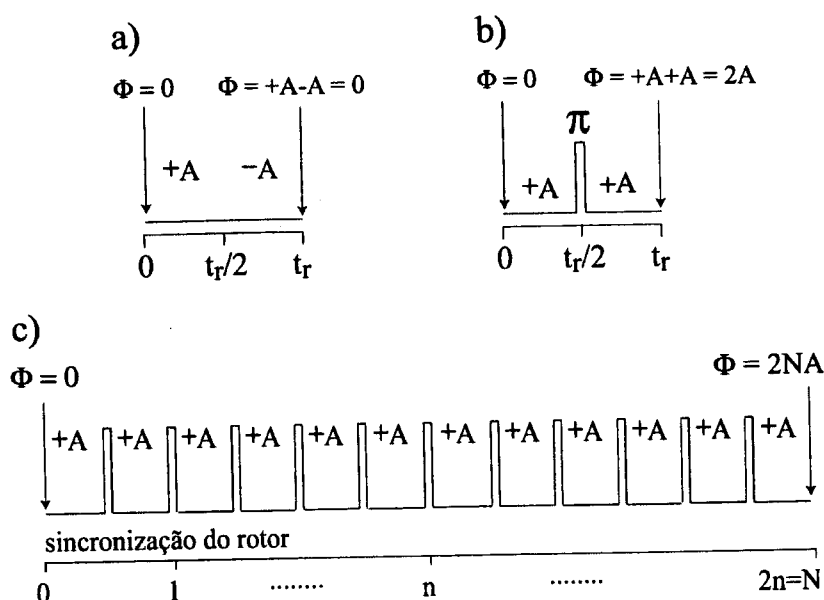


Figura 4.2 - Esquemas de reintrodução de interações anisotrópicas sob MAS. a) A fase acumulada em um período de rotação se anula. b) Com a introdução de um pulso de 180° na metade do período de rotação a anisotropia da interação é reintroduzida e duplicada. c) Seqüência de pulsos necessário para reintroduzir a anisotropia durante vários períodos de rotação com amplificação da fase de um fator $2N$.

4.2.2 – Princípio e seqüência de pulsos CODEX

De um modo simplificado, CODEX é um experimento de eco-estimulado sob MAS, com a reintrodução do deslocamento químico anisotrópico⁶. Na figura 4.3 está ilustrada a seqüência de pulsos CODEX. Depois da polarização cruzada (ou excitação por um pulso de 90°), a magnetização evolue sob a ação da interação do deslocamento químico anisotrópico, reintroduzida pelo conjunto de pulsos de 180° espaçados de $t_r/2$. Então, depois de $N/2$ períodos de rotação, a magnetização é armazenada na direção z durante o tempo de mistura, t_m , durante o qual o movimento pode ocorrer. O tempo de mistura é um múltiplo inteiro do período de rotação. Em aquisições sucessivas, a fase dos pulsos de 90° aplicados antes de t_m pode ser mudada de 90° , de modo que ambos os componentes da magnetização, $\cos\Phi_1$ e $\sin\Phi_1$, possam ser armazenados alternadamente. Depois de t_m , um novo pulso de 90° é aplicado, fazendo com que a magnetização armazenada seja transferida novamente para o plano transversal. Como t_m é um múltiplo inteiro do período de rotação, a fase da magnetização no início do segundo período de evolução é a mesma que no fim do primeiro. Após o tempo de mistura, cada componente evolui durante outros $N/2$ períodos de rotação, adquirindo uma fase Φ_2 ao final deste período. Neste instante, a magnetização é modulada por $\cos\Phi_1 \exp(i\Phi_2)$ ou $\sin\Phi_1 \exp(i\Phi_2)$ de acordo com a fase dos

pulsos de 90° envolvendo o tempo de mistura. A próxima etapa da seqüência de pulsos é um filtro-z, onde durante um período denominado t_z , uma das componentes é armazenada em z e a outra defasa totalmente no plano transversal sem a presença de desacoplamento heteronuclear. De acordo com a fase do primeiro pulso do filtro-z, a parte real de $\exp(i\Phi_2)$, $\cos\Phi_2$, ou imaginária, $\sin\Phi_2$, pode ser selecionada. Em resumo, manipulando as fases dos pulsos de 90° da seqüência, pode-se obter um sinal modulado por $\cos\Phi_1\cos\Phi_2$ ou $\sin\Phi_1\sin\Phi_2$ em aquisições sucessivas, ou seja, o sinal adquirido depois do último pulso de 90° será modulado por este fator. Combinando apropriadamente estas duas aquisições através da fase do receptor, pode-se obter o seguinte fator de modulação:

$$\cos\Phi_1\cos\Phi_2 - \sin\Phi_1\sin\Phi_2 = \cos(\Phi_1 + \Phi_2) = \text{Re}\{\exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\} \quad (4.6)$$

Onde as fases Φ_1 e Φ_2 são dadas por:

$$\Phi_1 = -N \int_0^{t_r/2} \Omega_1(t) dt \quad ; \quad \Phi_2 = N \int_0^{t_r/2} \Omega_2(t) dt \quad (4.7)$$

e $\Omega_1(t)$ e $\Omega_2(t)$ são as freqüências de RMN devido a parte anisotrópica da interação de deslocamento químico antes e depois de t_m . É interessante notar que, na expressão 4.6, a fase Φ_2 tem sinal contrário a Φ_1 . Isto se dá porque depois de t_m a freqüência inicial de evolução é a mesma que no início deste período, ou seja, 180° defasada em relação a fase logo depois da excitação como pode ser visto na expressão 4.4. Na Figura 4.3 está mostrada a evolução dos componentes da magnetização durante a seqüência CODEX para as fases indicadas. Como pode ser observado com a composição de fases adequada pode-se gerar a modulação mostrada em 4.6.

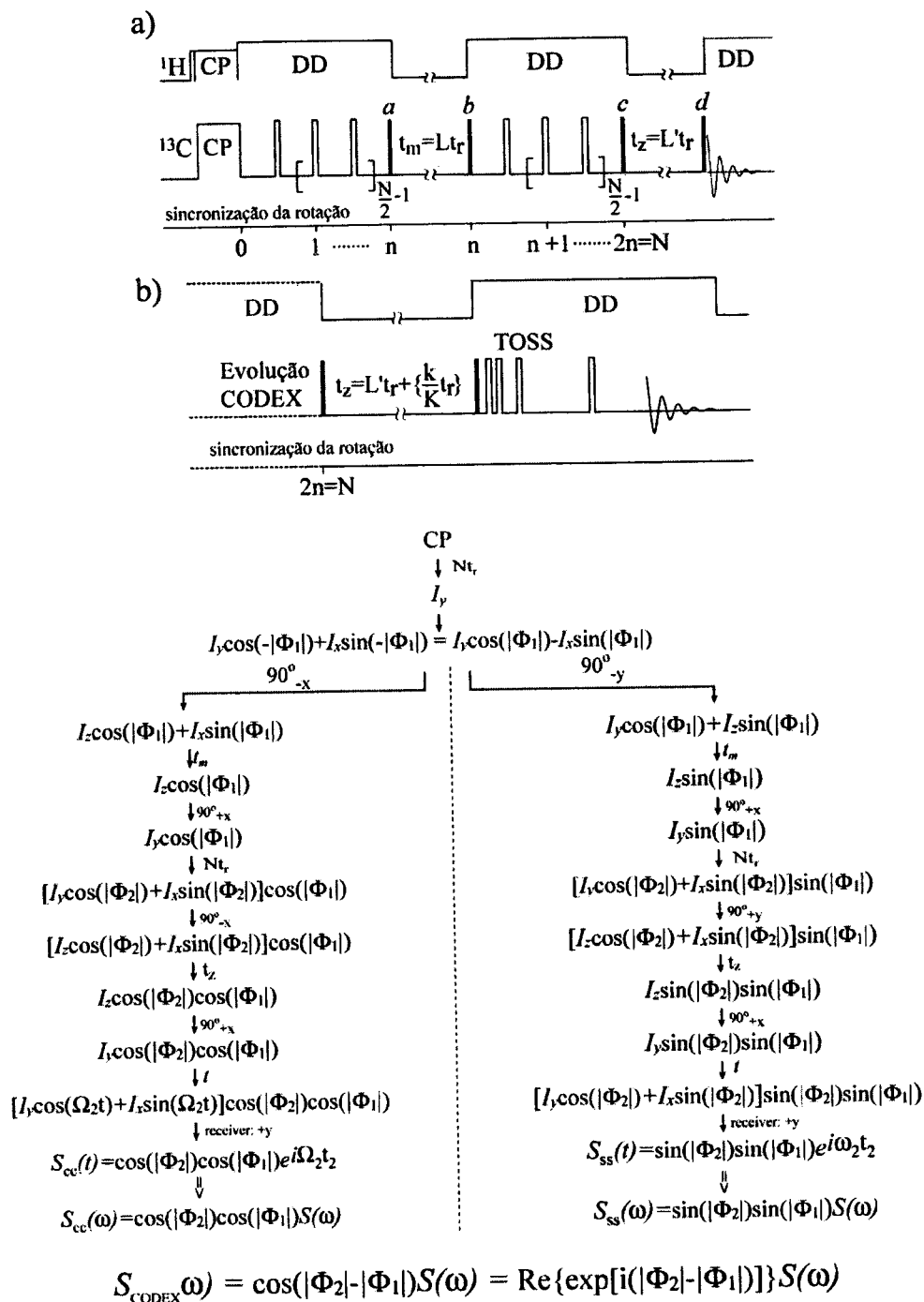


Figura 4.3 - Seqüência de pulsos utilizada no experimento CODEX. a) Seqüência de pulsos básica; b) Esquema de aquisição com eliminação das bandas laterais utilizando a seqüência TOSS; c) Evolução dos operadores de spin (magnetizações) durante a seqüência de pulsos CODEX. Através da escolha adequada dos pulsos *a* e *c* a modulação CODEX pode ser imposta ao sinal.

No caso da ausência de movimento molecular durante t_m , $\Phi_1 + \Phi_2 = |\Phi_1| - |\Phi_2| = 0$, exceto por um pré-fator de 0,5 o sinal é efetivamente o mesmo que no caso onde não houvesse pulsos de 90° aplicados. Portanto, a magnetização é refocalizada ao longo da sua direção original e um eco é formado imediatamente antes do

filtro-z. Nestas condições, o fator de modulação do sinal detectado é igual a 1. Por outro lado, se houver reorientação molecular durante t_m tem-se $\Phi_1 + \Phi_2 \neq 0$ e a refocalização dos spins não será completa e, conseqüentemente, a amplitude do sinal adquirido dependerá da diferença de fase $|\Phi_1| - |\Phi_2|$. A defasagem dos spins devida ao *Exchange* durante t_m é observada individualmente, com alta sensibilidade, para cada sítio nuclear como um decréscimo na intensidade das linhas detectadas. Para suprimir as bandas laterais durante a detecção, a seqüência TOSS⁷ pode ser utilizada antes da detecção. Uma vez que a perda de coerência de fase devido ao movimento pode quebrar a simetria cilíndrica em torno do eixo de rotação da amostra^{7,8}, que é necessária na seqüência TOSS, a duração do intervalo t_z é incrementada com K passos dentro de um período do rotor. Isto garante a supressão de todas as bandas laterais de ordem nK (maiores detalhes serão discutidos na seção 4.2.9).

Portanto, no experimento CODEX básico a amplitude do sinal será dada por:

$$S(t_m, \delta Nt_r) = \text{Re} \left\langle \left\{ \exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)] \right\} \right\rangle \text{Relax}(t_m, Nt_r) \quad (4.8)$$

Onde $\langle \rangle$ indica a média sob todas as orientações dos segmentos moleculares possíveis e $\text{Relax}(t_m, Nt_r) = \exp(-t_m/T_1)\exp(-Nt_r/T_2)$ é um fator introduzido para levar em conta a relaxação durante t_m e Nt_r , que não foi levada em conta até o momento. É interessante observar que $S(t_m, \delta Nt_r)$ depende essencialmente da diferença entre as fases Φ_1 e Φ_2 , que por sua vez depende do tempo de mistura, do tempo total de evolução Nt_r e da anisotropia do deslocamento químico, δ . Os efeitos da relaxação transversal (T_2) durante Nt_r e longitudinal (T_1) durante t_m , representados pelo fator $R(t_m, Nt_r)$, podem ser compensados adquirindo um espectro de referência $S(0, \delta Nt_r)$, o qual é obtido fazendo t_m curto o bastante para não haver movimento molecular durante este período e escolhendo t_z de modo que a soma $t_m + t_z$ seja igual à utilizada no experimento para obter $S(t_m, \delta Nt_r)$. Deste modo, a amplitude do sinal de referência contém os mesmo efeitos de relaxação que o sinal CODEX, porém, sem o efeito do movimento molecular. Os gráficos da razão $D(t_m, \delta Nt_r) = S(t_m, \delta Nt_r)/S(0, \delta Nt_r)$ em função de t_m e δNt_r podem então ser utilizados para caracterizar, respectivamente, o tempo de correlação e a geometria do movimento molecular lento.

Freqüentemente, é vantajoso subtrair o espectro CODEX $S(t_m, \delta Nt_r)$ do espectro de referência $S(0, \delta Nt_r)$, para se obter um espectro CODEX somente dos segmentos que se

reorientam durante t_m . Este espectro, denominado *pure-exchange* CODEX, pode ser útil como um filtro de sinais em um sistema de múltiplos componentes, baseado em sua mobilidade lenta. Similarmente ao caso PUREX 1D a intensidade normalizada *pure-exchange* CODEX é definida por:

$$E(t_m, \delta N t_r) = \frac{\Delta S(t_m, \delta N t_r)}{S(0, \delta N t_r)} = \frac{S(0, \delta N t_r) - S(t_m, \delta N t_r)}{S(0, \delta N t_r)} \quad (4.9)$$

Na descrição do experimento CODEX apresentada anteriormente, o fator de modulação puramente real era obtido devido à aplicação do bloco pulso($\pi/2$)- t_z -pulso($\pi/2$) (filtro-z) antes da aquisição. No entanto, mesmo sem aplicação deste filtro, adquirindo a metade do eco estimulado formado e fazendo a transformada de Fourier, obter-se-á um espectro sem distorção de fase. Isto implica que a defasagem é um fator real, não introduzindo distorção no espectro. Para provar esta afirmação é necessário considerar o fator de modulação imediatamente antes do filtro-z. Como discutido anteriormente, combinando apropriadamente os componentes $\cos\Phi_1$ e $\sin\Phi_1$ este fator será dado por:

$$\cos\Phi_1 \exp(i\Phi_2) + i \sin\Phi_1 \exp(i\Phi_2) = \exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)] \quad (4.6)$$

que a princípio não é um número real. No entanto, é necessário lembrar que em equilíbrio dinâmico (balanço detalhado) reorientações moleculares de uma orientação i para j ocorrem com mesma probabilidade que de j para i . Deste modo, essas duas contribuições devem ser combinadas. A fase acumulada em uma reorientação $i \rightarrow j$, Φ_1 , é igual em módulo e de sinal oposto à fase acumulada em uma reorientação $j \rightarrow i$, Φ_2 . Deste modo:

$$\begin{aligned} \Phi_1^{i \rightarrow j} &= -\Phi_2^{j \rightarrow i} \\ e \quad \Phi_1^{j \rightarrow i} &= -\Phi_2^{i \rightarrow j} \end{aligned} \quad (4.7)$$

O decaimento do sinal observado no experimento CODEX leva em conta ambos os processos, $i \rightarrow j$ e $j \rightarrow i$, sendo portanto a média de $\exp[i(\Phi_1^{i \rightarrow j} + \Phi_2^{j \rightarrow i})]$ e $\exp[i(\Phi_1^{j \rightarrow i} + \Phi_2^{i \rightarrow j})]$:

$$\begin{aligned} D(t_m, \delta N t_r) &= \frac{S(t_m, \delta N t_r)}{S(0, \delta N t_r)} = \frac{1}{2} \langle \exp[i(\Phi_1^{i \rightarrow j} + \Phi_2^{j \rightarrow i})] + \exp[i(\Phi_1^{j \rightarrow i} + \Phi_2^{i \rightarrow j})] \rangle \\ &= \frac{1}{2} \langle \exp[i(\Phi_1^{i \rightarrow j} + \Phi_2^{i \rightarrow j})] + \exp[-i(\Phi_1^{i \rightarrow j} + \Phi_2^{i \rightarrow j})] \rangle \\ &= \langle \cos(\Phi_1^{i \rightarrow j} + \Phi_2^{i \rightarrow j}) \rangle = \text{Re} \langle \exp[i(\Phi_1^{i \rightarrow j} + \Phi_2^{i \rightarrow j})] \rangle \end{aligned} \quad (4.8)$$

Logo, o fator de modulação é puramente real, mesmo sem a presença do filtro-z.

4.2.3 – Ciclagem de fases utilizada no experimento CODEX.

O esquema de ciclagem de fases utilizada na seqüência CODEX está mostrado na Tabela 4.1. Os dois primeiros passos eliminam os sinais espúrios devidos à relaxação T_1 durante o período t_z , e suprime o sinal dos núcleos de ^{13}C diretamente polarizados através da inversão dos pulsos de ^1H e do receptor. Nos próximos três passos (completando 8 ciclos) as fases dos pulsos d e do receptor são incrementadas em passos de 90° , mas mantendo constante a fase do pulso c . Com isso é realizado um esquema de CYCLOPS, bem como cancelamento da magnetização transversal remanescente após t_z . A combinação dos sinais $\cos\Phi_1\cos\Phi_2$ e $\sin\Phi_1\sin\Phi_2$ é obtida no próximo passo. A inversão do pulso a , em combinação com a fase do receptor, realizam a correção do artefato de T_1 durante t_m . Finalmente, o cancelamento da magnetização transversal remanescente após t_m é feito através do ciclo de quatro passos realizado no pulso b . O pulsos de 180° são aplicados seguindo um esquema xy-8, descrito na tabela 2.1 capítulo 2.

Tabela 4.1- Ciclagem de fases utilizada no experimento CODEX adquirido com a seqüência de pulsos mostrada na figura 4.3.

Pulsos	Fases
$^1\text{H} - 90^\circ$	$(+x - x)^{64}$
$^1\text{H} - \text{CP}$	$(+y)^{128}$
$^{13}\text{C} - \text{CP}$	$(+x)^{128}$
a	$\left((-y)^8 (-x)^8 (+y)^8 (+x)^8 \right)^4$
b	$\left((+y)^8 (+x)^8 \right)^2 \left((-y)^8 (-x)^8 \right)^2 \left((-x)^8 (+y)^8 \right)^2 \left((+x)^8 (-y)^8 \right)^2$
c	$(-y)^{64} (-x)^{64}$
d	$\left((+y)^2 (-x)^2 (-y)^2 (+x)^2 \right)^4$
Receptor	$\left(\begin{array}{l} (+x - x + y - y - x + x - y + y)^2 \\ (-x + x - y + y + x - x + y - y)^4 \\ (+x - x + y - y - x + x - y + y)^2 \end{array} \right)^2$

Assim como no experimento PUREX, um esquema de aquisição em blocos é utilizado, onde as seqüências de pulsos utilizadas para adquirir os sinais $S(t_m, \delta N t_r)$ e $S(0, \delta N t_r)$ são alternadas a cada ciclo de fases completo, isto é 128 aquisições.

4.2.4 – Fator de modulação no experimento CODEX – Análise usando o tensor diferença escalado.

Como discutido na seção anterior no experimento CODEX, a informação sobre a dinâmica molecular é obtida a partir da intensidade normalizada $D(t_m, \delta Nt_r)$ ou $E(t_m, \delta Nt_r)$. Portanto, para caracterizar a geometria do movimento utilizando a seqüência de pulsos CODEX, a dependência do fator de modulação $D(t_m, \delta Nt_r)$ com a geometria do movimento molecular deve ser conhecida. Obviamente, todo o tratamento que será feito aqui é válido também para o experimento PUREX, pois este envolve exatamente os mesmos fatores de modulação. A fase total acumulada $\Phi_1 + \Phi_2$, se relaciona com $D(t_m, \delta Nt_r)$ através da seguinte expressão:

$$\begin{aligned}
 D(t_m, \delta Nt_r) &= \frac{S(t_m, \delta Nt_r)}{S(0, \delta Nt_r)} \\
 &= \text{Re}\langle \exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)] \rangle \\
 &= \text{Re}\langle \exp[i(|\Phi_1| - |\Phi_2|)] \rangle \\
 &= \text{Re}\left\langle \exp\left[\int_0^{t_r/2} (N\Omega_2(t) - N\Omega_1(t)) dt \right] \right\rangle \\
 &= \text{Re}\langle \exp[i\Phi^\Delta(\delta Nt_r, \alpha_R, \beta_R, \gamma_R)] \rangle
 \end{aligned} \tag{4.10}$$

Onde $(\alpha_R, \beta_R, \gamma_R)$ são os ângulos de Euler que relacionam o sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico antes e depois de t_m . A intensidade normalizada do espectro *Pure Exchange* CODEX, $E(t_m, \delta Nt_r)$, é obtida a partir de $D(t_m, \delta Nt_r)$,

$$E(t_m, \delta Nt_r) = 1 - D(t_m, \delta Nt_r) = 1 - \text{Re}\langle \exp[i\Phi^\Delta(\delta Nt_r, \alpha_R, \beta_R, \gamma_R)] \rangle \tag{4.11}$$

onde α_R, β_R e γ_R são os ângulos de Euler que relacionam os SEP's do tensor de deslocamento químico, antes e depois de t_m , tal como discutido no capítulo 1. Os índices R referem-se a reorientação molecular.

De acordo com o equação 4.11, a fase $\Phi^\Delta(\delta Nt_r, \alpha_R, \beta_R, \gamma_R)$ pode ser considerada como a fase adquirida durante o intervalo de $t_r/2$ sob a ação da diferença de frequência $\tilde{\sigma}$. Esta diferença pode ser obtida a de um tensor de segunda ordem, o qual será denominado tensor diferença de deslocamento químico escalado, sendo dado por:

$$N\tilde{\Omega}^\Delta = N(\tilde{\Omega}_1 - \tilde{\Omega}_2) \quad (4.12)$$

onde:

$$(\tilde{\Omega}_1 - \tilde{\Omega}_2) = \omega_0(\tilde{\sigma}_1 - \tilde{\sigma}_2)$$

Deste modo, o tensor $(\tilde{\Omega}_1 - \tilde{\Omega}_2)$ reflete diretamente a mudança ocorrida no tensor de deslocamento químico com uma dimensão de frequência. A diferença de frequência de precessão, $\tilde{\Omega}_1 - \tilde{\Omega}_2$, pode ser obtida à partir do tensor diferença à partir da seguinte relação:

$$\Omega_1 - \Omega_2 = \vec{b}_0^T (\tilde{\Omega}_1 - \tilde{\Omega}_2) \vec{b}_0 \quad (4.12a)$$

Para codificar o movimento molecular na amplitude do espectro CODEX é necessário que a fase $\Phi^\Delta(\delta N t_r, \alpha_R, \beta_R, \gamma_R)$ adquira um valor apreciável. Para que isso ocorra, a diferença de frequência $\Omega_1 - \Omega_2$ deve ser comparável a frequência de rotação ω_r . Sendo assim, a largura da anisotropia do tensor diferença escalado (faixa de valores principais) $|N\Omega_{33}^\Delta - N\Omega_{11}^\Delta|$ relativa à frequência de rotação determina se há um defasamento significativo devido à anisotropia da interação, isto é, se o experimento é sensível a reorientação molecular. De fato, como já discutido, é possível amplificar este efeito através do aumento de números de períodos de rotação, N , de modo que a condição $|N\Omega_{33}^\Delta - N\Omega_{11}^\Delta| \gg \omega_r$ seja cumprida.

4.2.4.1 – Tensor diferença escalado para interações uniaxiais ($\eta = 0$)

Tal como discutido no capítulo 1, no caso de interações uniaxiais ($\eta = 0$) a reorientação molecular pode ser descrita por um único ângulo de reorientação, β_R , entre o eixo principal da interação, zz , antes e depois de t_m . Para interações uniaxiais, como nos casos da interação dipolar entre pares de spins, interação quadrupolar em ^2H e em muitos casos para o tensor de deslocamento químico, os valores principais do tensor diferença escalado podem ser calculados analiticamente. Para fazer um tratamento utilizando o tensor diferença é importante analisar este tensor em um sistema de coordenada adequado. De fato, é possível achar um novo sistema de eixos principais onde este tensor é diagonal. O procedimento de diagonalização pode ser encontrado em detalhes na referência ⁸. No caso específico de $\eta = 0$, o parâmetro de assimetria do tensor diferença escalado é sempre unitário, $\eta^\Delta = (\Omega_{22}^\Delta - \Omega_{11}^\Delta) / (\Omega_{33}^\Delta - \Omega_{iso}^\Delta) = 1$, e os dois dos eixos principais fazem um ângulo

de 45° com o bissetor entre os dois eixos z dos SEP's originais antes e depois da reorientação molecular, independente da geometria do movimento ⁹. O terceiro eixo principal do tensor diferença é perpendicular aos dois eixos principais dos SEP's antes e depois da reorientação. Os valores principais do tensor diferença são:

$$\begin{aligned}\Omega_{22}^\Delta &= 0 \\ \Omega_{33}^\Delta &= -\Omega_{11}^\Delta = \left(\frac{\delta}{2} \left(3 \cos^2 \left(\frac{\beta_R}{2} + 45^\circ \right) - 1 \right) - \frac{\delta}{2} \left(3 \cos^2 \left(\frac{\beta_R}{2} - 45^\circ \right) - 1 \right) \right) = \\ &= \frac{3}{2} \delta \sin \beta_R\end{aligned}\quad (4.13)$$

O ângulo β_R é o ângulo de reorientação, isto é, o ângulo entre os eixos z dos SEP's do tensor de deslocamento químico antes e depois de t_m . A faixa de valores principais do tensor diferença $|\Omega_{11}^\Delta - \Omega_{33}^\Delta|$, isto é, a faixa de possíveis frequências diferença é:

$$|\Omega_{33}^\Delta - \Omega_{11}^\Delta| = 3|\delta| \sin \beta_R = |\Omega_{33} - \Omega_{11}| 2 \sin \beta_R \quad (4.14)$$

onde foi usado $|\Omega_{33} - \Omega_{11}| = \frac{3}{2}|\delta|$ para $\eta = 0$. Isto mostra que, para ângulos de reorientação $\beta_R < 45^\circ$, existe uma dependência linear com o ângulo de reorientação β_R , o que permite a detecção relativamente fácil de movimentos de pequena amplitude. Isto se compara favoravelmente com a dependência mais comum $\frac{1}{2}(3\cos^2\beta_R - 1)$ encontrada no experimento de *Exchange 2D*, que é praticamente constante para ângulos de reorientação para $\beta_R < 15^\circ$.

4.2.4.2 – Tensor diferença para interações não axiais ($\eta \neq 0$)

No caso mais geral, a reorientação dos eixos principais deve ser descrita em termos de três transformações de coordenadas. Isto é equivalente a dizer que a reorientação molecular deve ser descrita por três ângulos de Euler, α_R , β_R e γ_R entre os SEPs inicial e final.

Assim como para $\eta = 0$, o cálculo de $|\Omega_{11}^\Delta - \Omega_{33}^\Delta|$ para valores de η arbitrários leva inicialmente a uma dependência linear com os ângulos de reorientação β_R e $\epsilon_R = \alpha_R + \gamma_R$. Isto pode ser provado considerando-se o tensor diferença para pequenos valores de β_R e ϵ_R . Uma rotação no sistema de eixos principais pode ser descrita por uma matriz de rotação de Euler $\tilde{T}(\alpha_R, \beta_R, \gamma_R) = \tilde{T}(-\gamma_R)\tilde{T}(-\beta_R)\tilde{T}(-\alpha_R)$ conforme descrito na referência ⁸. Essas matrizes são dadas por:

$$\begin{aligned} \tilde{T}(-\alpha_R) &= \begin{pmatrix} \cos \alpha_R & \text{sen} \alpha_R & 0 \\ -\text{sen} \alpha_R & \cos \alpha_R & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}; \tilde{T}(-\beta_R) = \begin{pmatrix} \cos \beta_R & 0 & -\text{sen} \beta_R \\ 0 & 1 & 0 \\ \text{sen} \beta_R & 0 & \cos \beta_R \end{pmatrix} \\ \tilde{T}(-\gamma_R) &= \begin{pmatrix} \cos \gamma_R & \text{sen} \gamma_R & 0 \\ -\text{sen} \gamma_R & \cos \gamma_R & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (4.15)$$

Para pequenos ângulos,

$$\tilde{T}(-\beta_R) \sim \begin{pmatrix} 1 & 0 & -\beta_R \\ 0 & 1 & 0 \\ \beta_R & 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} + \beta_R \begin{pmatrix} 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} = 1 + \beta_R \tilde{B} \quad (4.16),$$

onde se define a matriz B, cujos únicos elementos não nulos são $B_{13} = -B_{31} = -1$.

Similarmente, pode-se mostrar que:

$$\tilde{T}(-\gamma_R) \tilde{T}(-\alpha_R) \sim 1 + (\alpha_R + \gamma_R) \tilde{C} = 1 + \varepsilon_R \tilde{C} \quad (4.17),$$

onde os elementos não nulos de \tilde{C} são $C_{12} = -C_{21} = 1$. Assim, em primeira ordem em β_R e ε_R o tensor diferença pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} \tilde{\Omega}^\Delta &= \omega_0 \tilde{T}(\alpha_R, \beta_R, \gamma_R) \tilde{\sigma}^{SEP} \tilde{T}^T(\alpha_R, \beta_R, \gamma_R) - \omega_0 \tilde{\sigma}^{SEP} \\ &\equiv \omega_0 \beta_R \left(\tilde{D} \tilde{\sigma}^{SEP} + (\tilde{D} \tilde{\sigma}^{SEP})^T \right) + \omega_0 \varepsilon_R \left(\tilde{C} \tilde{\sigma}^{SEP} + (\tilde{C} \tilde{\sigma}^{SEP})^T \right) \end{aligned} \quad (4.18),$$

onde,

$$\tilde{D} = \tilde{R}(-\gamma_R) \tilde{B} \tilde{R}(-\alpha_R) = \begin{pmatrix} 0 & 0 & -\cos \alpha_R \\ 0 & 0 & \text{sen} \alpha_R \\ \cos \alpha_R & \text{sen} \alpha_R & 0 \end{pmatrix} \quad (4.19)$$

Como β_R e ε_R aparecem como fatores multiplicativos das matrizes, eles irão multiplicar os valores principais das matrizes depois da diagonalização. Portanto, o tensor diferença depende linearmente desses ângulos de reorientação.

4.2.5 - Amplitude do movimento utilizando CODEX

No capítulo anterior, discutimos brevemente que a amplitude e geometria do movimento molecular poderiam ser obtidas à partir da análise da intensidade normalizada 1D PUREX como função do tempo de evolução τ . Similarmente, na técnica CODEX a geometria e amplitude do movimento molecular podem ser estudados através da análise da amplitude normalizada, $D(t_m, \delta Nt_r)$ ou $E(t_m, \delta Nt_r)$ como função do tempo de evolução, Nt_r ou equivalentemente em função de δNt_r . Entretanto, para se obter tal informação é

necessário comparar os dados experimentais com curvas simuladas à partir da expressão 4.11 pesadas pelo fator $f_m(1-1/M)$ para levar em conta a fração móvel e o número de sítios entre os quais o movimento molecular ocorre. Nos experimentos PUREX 1D, a simulação de tais curvas envolve basicamente o cálculo da frequência de RMN antes e depois do processo de reorientação molecular para um dado conjunto de ângulos de reorientação, α_R , β_R e γ_R . Estas frequências são então utilizadas para calcular o fator de modulação como função de $\delta\tau$. No caso da técnica CODEX, basicamente o mesmo procedimento pode ser realizado, porém o cálculo das fases é mais complexo, pois envolve o cálculo da frequência de RMN sob MAS. De fato, as expressões que descrevem a rotação em torno do ângulo mágico, apresentadas no Capítulo 1, são utilizadas nas simulações. Na figura 4.4 estão mostradas algumas curvas de $E(t_m, \delta N t_r)$ contra $\delta N t_r$ para diversos ângulos de reorientação β_R . Por simplicidade, as simulações foram realizadas utilizando-se $\eta = 0$, de modo que somente o ângulo β_R é importante para a reorientação molecular. Pode-se notar que as curvas para $\beta_R < 60^\circ$ podem ser facilmente distinguidas entre si, enquanto que para $90^\circ < \beta_R < 60^\circ$ as curvas são praticamente idênticas. Isto demonstra a alta sensibilidade da técnica CODEX na determinação da geometria de movimentos de pequena amplitude, conforme discutido na análise do tensor diferença. Por outro lado, para movimentos de grande amplitude a sensibilidade da técnica em relação a β_R deixa a desejar, sendo difícil determinar o ângulo de reorientação precisamente à partir de um experimento CODEX. O fato da geometria do movimento estar exclusivamente contida na dependência de $E(t_m, \delta N t_r)$ com $\delta N t_r$, enquanto que a informação sobre os tempos de correlação na dependência com t_m , faz com que a técnica CODEX seja, em tese, superior às técnicas de análise da forma de linha, que dependem simultaneamente desses dois parâmetros, sendo também menos sensível à geometria do movimento.

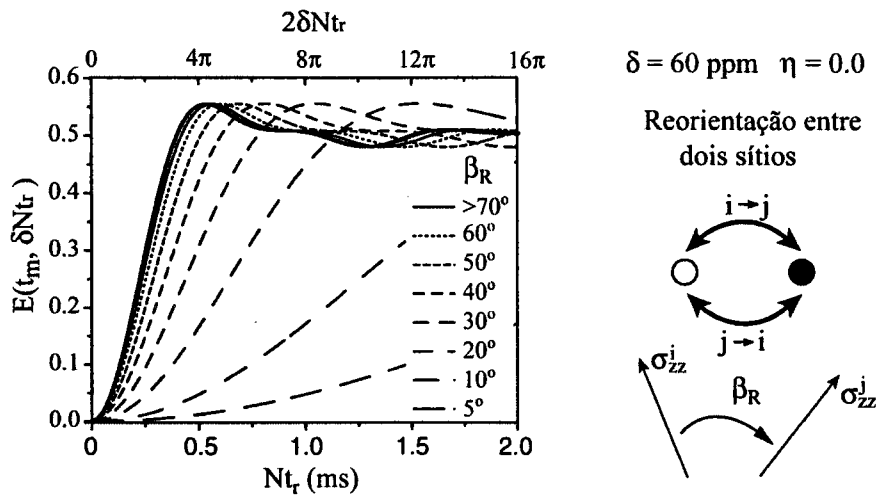


Figura 4.4 - Curvas da intensidade de $E(t_m, \delta N t_r)$ com função de $\delta N t_r$ para um processo envolvendo dois sítios magneticamente não equivalentes.

4.2.6 - Distribuição de ângulos de Reorientação.

Muitos processos dinâmicos, principalmente em sistemas amorfos, não ocorrem com ângulos de reorientação específicos, mas envolvem uma distribuição de ângulos. No caso de interações uniaxiais, essa distribuição de ângulos de reorientação pode ser caracterizada por uma função $P^{\beta_R}(\beta_R, t_m)$. Admitindo que a curva de intensidade de *Exchange* para um determinado ângulo de reorientação seja $\varepsilon(\delta N t_r, \beta_R)$, estas distribuições também podem ser estimadas num experimento CODEX. Nestes casos, as curvas $E(t_m, \delta N t_r)$ são superposições das curvas com valores específicos de β_R , pesadas pela distribuição de ângulos de reorientação $P^{\beta_R}(\beta_R, t_m)$:

$$E(t_m, \delta N t_r) = \int_0^{90^\circ} P^{\beta_R}(\beta_R, t_m) \varepsilon(\delta N t_r, \beta_R) d\beta_R \quad (4.20)$$

onde $\varepsilon(\delta N t_r, \beta_R)$ são as curvas CODEX para cada ângulo de reorientação β_R e t_m fixo. Deste modo, a curva $E(t_m, \delta N t_r)$ poderá ser simulada para um dado $P^{\beta_R}(\beta_R, t_m)$ e comparada com os resultados experimentais. É interessante notar que, enquanto todas as curvas individuais $\varepsilon(\delta N t_r, \beta_R)$ têm a mesma forma em geral, a forma de sua superposição $E(t_m, \delta N t_r)$ é diferente. Na figura 4.5 estão mostradas as distribuições de ângulos de reorientação $P^{\beta_R}(\beta_R, t_m)$ e as curvas $E(t_m, \delta N t_r)$ correspondentes para alguns modelos típicos de movimento molecular. Uma discussão mais detalhada desses modelos pode ser encontrada na referência ⁸. No limite $t_m \gg \tau_c$ as curvas CODEX obtidas para os

movimentos isotrópicos, Figura 4.5b, c e d são idênticas, indicando que não é possível distinguir entre os mesmos. No entanto, essa discriminação poder ser feita analisando o comportamento das curva $E(t_m, \delta N t_r)$ versus $\delta N t_r$, obtidas com diferentes tempos de mistura.

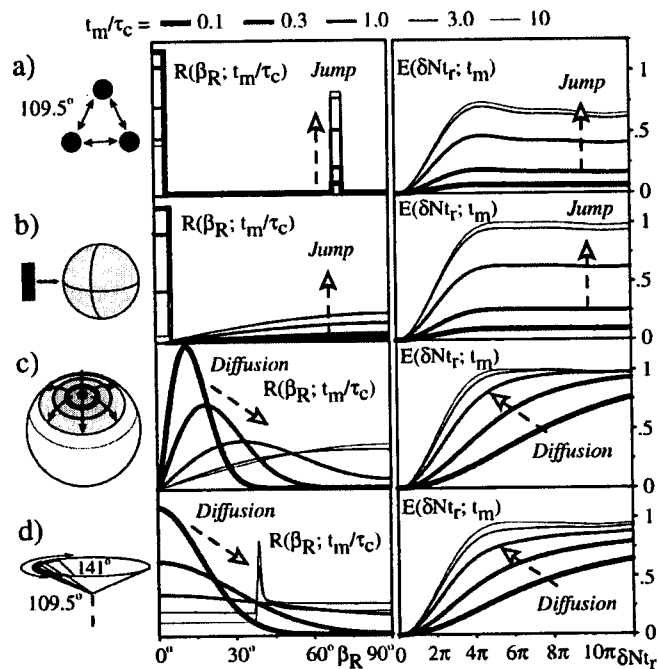


Figura 4.5 - Curvas da intensidade de *exchange*, $E(t_m, \delta N t_r)$, e distribuições de ângulos de reorientação, $R(\beta_R, t_m)$, para processos envolvendo modelos específicos de reorientação molecular: a) Reorientação entre três sítios; b) Reorientações aléatórias; c) Difusão rotacional isotrópica e d) Difusão rotacional uniaxial.

4.2.7 – Independência com a velocidade de rotação.

Uma visão alternativa para o experimento CODEX, que é utilizada tradicionalmente no experimento REDOR⁶, é considerar $N t_r$ como sendo o tempo evolução total sob a ação da anisotropia de deslocamento químico. Neste caso, a fase acumulada Φ^Δ pode ser escrita como:

$$\Phi^\Delta = N \left\{ \int_0^{\frac{t_r}{2}} \Omega_1(t) dt - \int_0^{\frac{t_r}{2}} \Omega_2(t) dt \right\} = |\Phi_1| - |\Phi_2| \quad (4.21)$$

Substituindo as frequências pela expressão 1.24 do capítulo 1, obtém-se para as fases acumuladas:

$$\begin{aligned}
 |\Phi_i| &= N \int_0^{\frac{t_r}{2}} \Omega_i(t) dt & (4.22) \\
 &= N \int_0^{\frac{t_r}{2}} \left\{ C_1^i \cos(\gamma_i + \omega_r t) + C_2^i \cos(2\gamma_i + 2\omega_r t) + S_1^i \text{sen}(\gamma_i + \omega_r t) + \right. \\
 &\quad \left. + S_2^i \text{sen}(2\gamma_i + 2\omega_r t) \right\} dt
 \end{aligned}$$

Os coeficientes C_1^i , S_1^i , C_2^i , S_2^i são aqueles dados nas expressões 1.25 a 1.28 do capítulo 1 e os ângulos $\alpha_i, \beta_i, \gamma_i$ são os ângulos de Euler que representam a orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico antes, $i = 1$, ou depois, $i = 2$, de t_m , relativa ao sistema de coordenadas do rotor. Os dois primeiros termos da expressão se anulam, e o resultado das demais integrais leva a:

$$|\Phi_i| = N \frac{\delta}{\omega_r} \left\{ \bar{S}_1(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) - \frac{1}{2} \bar{S}_2(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) \right\} / \delta = N \frac{\delta}{\omega_r} \chi_i \left(\frac{t_r}{2} \right) \quad (4.23)$$

Os coeficientes \bar{S}_1 e \bar{S}_2 são dados por:

$$\begin{aligned}
 \bar{S}_1(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) &= S_1 \cos \gamma_i - C_1 \text{sen} \gamma_i & (4.24) \\
 \bar{S}_2(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) &= S_2 \cos 2\gamma_i - C_2 \text{sen} 2\gamma_i
 \end{aligned}$$

Deste modo, a fase acumulada no experimento CODEX pode ser expressa por:

$$\Phi^\Delta = |\Phi_1| - |\Phi_2| = N \frac{\delta}{\omega_r} \left\{ \chi_1 \left(\frac{t_r}{2} \right) - \chi_2 \left(\frac{t_r}{2} \right) \right\} = \delta N t_r \left\{ \chi_1 \left(\frac{t_r}{2} \right) - \chi_2 \left(\frac{t_r}{2} \right) \right\} \quad (4.25)$$

A fase total acumulada Φ^Δ pode ser expressa diretamente em função do tempo de evolução total, Nt_r , sendo independente da frequência de rotação da amostra. Devido à essa independência com ω_r , a técnica CODEX pode ser utilizada com altas frequências de rotação. Somente quando a largura dos pulsos de RF representa mais que 10% do período de rotação e o número de pulsos é muito grande, uma deterioração significativa da eficiência do experimento é esperada.

4.2.8 – Determinação dos parâmetros de deslocamento químico utilizando CODEX.

Como amplamente discutido anteriormente, na análise quantitativa ou semi quantitativa das curvas CODEX em termos da amplitude do movimento, a anisotropia de deslocamento químico δ deve ser conhecida. Ela pode ser obtida usando uma seqüência de pulsos bastante similar à seqüência CODEX. Nesta seqüência de pulsos, o bloco 90° - t_m -

90° é substituído por um pulso de 180°, resultando no sinal S_{180° , ou por nenhum pulso, resultando no sinal S_0 . Isto resulta em uma defasagem relativa dada por:

$$\begin{aligned} \frac{S_{180^\circ}(Nt_r)}{S_0(Nt_r)} &= \left\langle \exp(i2N \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt) \right\rangle = \left\langle \exp\left(iNt_r \Phi\left(\frac{t_r}{2}\right)\right) \right\rangle = \\ &= \frac{1}{2} \left\langle \cos\left(\frac{2}{2\pi} \delta Nt_r \chi\left(\frac{t_r}{2}\right)\right) \right\rangle = \\ &= \frac{1}{2} \left\langle \cos\left\{2Nt_r \left[\bar{S}_1(\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta) - \frac{1}{2} \bar{S}_2(\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta)\right] / 2\pi\right\} \right\rangle \end{aligned} \quad (4.27)$$

Depois de tomar a média em α , β e γ , esta curva de decaimento dependerá somente dos parâmetros de anisotropia, δ , e assimetria, η , do deslocamento químico, que poderão ser determinados utilizando uma rotina de ajuste de dados.

Alternativamente, a seqüência CODEX, com uma ligeira mudança no ciclo de fases, também pode ser utilizada para medir a anisotropia de deslocamento químico. Adquirindo somente o componente da magnetização modulado por seno-seno na seqüência de pulsos CODEX e mantendo o tempo de mistura curto, para evitar que ocorra reorientação molecular durante este período, a modulação do sinal CODEX normalizado pelo sinal de referência será:

$$\begin{aligned} \frac{S_{\sin}(Nt_r)}{S_0(Nt_r)} &= \left\langle \sin^2\left(2N \int_0^{t_r/2} \Omega(t) dt\right) \right\rangle = \frac{1}{2} \left\langle 1 - \cos\left(2Nt_r \Phi\left(\frac{t_r}{2}\right)\right) \right\rangle = \\ &= \frac{1}{2} \left\langle 1 - \cos\left\{2Nt_r \left[\bar{S}_1(\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta) - \frac{1}{2} \bar{S}_2(\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta)\right] / 2\pi\right\} \right\rangle \end{aligned} \quad (4.28)$$

Logo, a modulação também dependerá somente dos parâmetros de anisotropia, δ , e assimetria, η , do deslocamento químico, que poderão ser determinados tal como anteriormente. A principal vantagem deste método é que não é necessário subtrair dois sinais obtidos com seqüências de pulsos diferentes. A referência S_0 é obtida a partir da seqüência CODEX com o ciclo de fases completo tal como anteriormente.

Para demonstrar a sensibilidade da técnica na determinação de δ e η , na figura 4.6c estão mostradas algumas curvas S_{\sin}/S_0 versus Nt_r simuladas para diferentes valores de δ e $\eta = 0$. Através deste gráfico podemos observar que para valores menores de δ as curvas podem ser facilmente distinguidas, enquanto que para valores maiores as curvas são praticamente idênticas. Isso mostra que a precisão do experimento CODEX é maior na

determinação da anisotropia de deslocamento químico em grupos com delta $\delta < 40$ ppm, que é o caso da maioria dos grupos alifáticos. Pode se concluir ainda que o parâmetro de anisotropia define essencialmente a inclinação inicial da curva, o que é verdade independentemente de η , como pode ser visto na figura 4.6d. De fato, como pode ser observado na figura 4.6c, a técnica é praticamente insensível a variações de η . Deste modo, a técnica CODEX pode ser utilizada na determinação do parâmetro de anisotropia com uma precisão razoável, porém não é possível obter informação sobre o parâmetro de assimetria a partir dessa metodologia. No gráfico mostrado na figura 4.6a o valor do campo magnético principal B_0 e conseqüentemente a frequência de Larmor ω_0 foi variado, mantendo-se δ e η constantes. Observa-se que a inclinação inicial da curva aumenta com o campo magnético, o que mostra uma limitação experimental da técnica, pois para campos magnéticos mais altos é necessário utilizar altas velocidades de rotação da amostra para adquirir os primeiros pontos da curva, N_T curto. Na realidade, isto é uma limitação geral da técnica CODEX para a determinação de reorientações por grandes ângulos em grupos com grande anisotropia de deslocamento químico. Neste casos, em geral, velocidades geralmente superiores a 10 kHz devem ser utilizadas, o que requer a utilização de sondas de alta eficiência. Apesar da pouca precisão do experimento na determinação do parâmetro de assimetria, uma vantagem da técnica é que a determinação do parâmetro de anisotropia δ é totalmente independente de η . Isto se compara favoravelmente com outros métodos, por exemplo, a determinação dos parâmetros do tensor através de bandas laterais, onde é difícil separar a contribuição, dos parâmetros de assimetria e anisotropia para os dados experimentais.

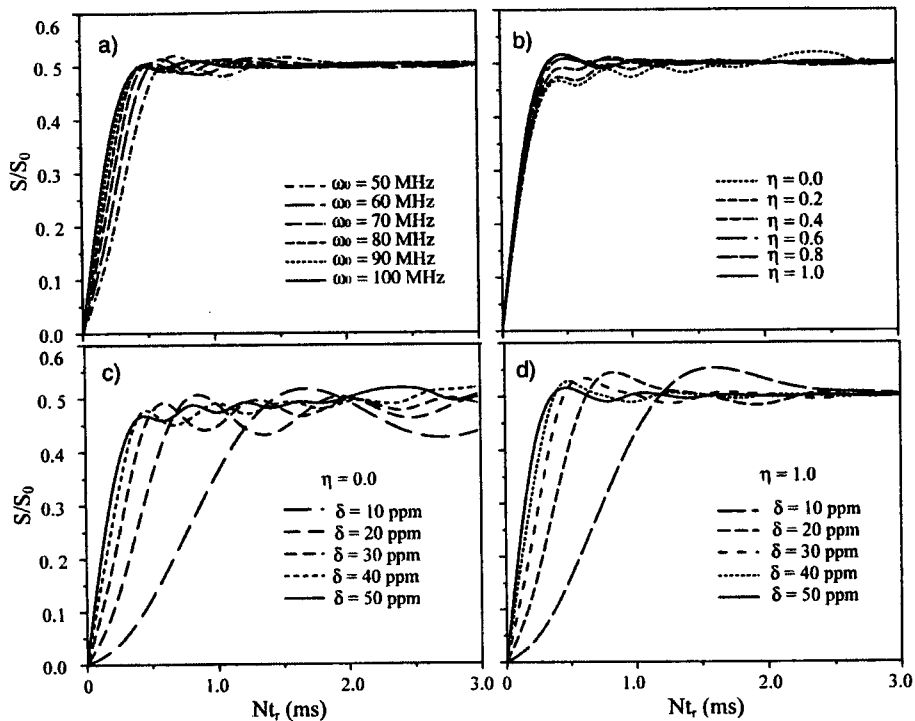


Figura 4.6 - Gráfico de S_{sim}/S_0 versus Nt_r com variação dos parâmetros δ , η e ω_0 : a) Variação da frequência ω_0 com $\delta = 50$ ppm, $\eta = 0,5$ e $\sigma_{isso} = 30$ ppm; b) Variação de η com $\delta = 50$ ppm e $\sigma_{isso} = 30$ ppm; c) Variação de δ com $\eta = 0,0$ e $\sigma_{isso} = 30$ ppm e d) Variação de δ com $\eta = 1,0$ e $\sigma_{isso} = 30$ ppm.

4.2.9 – Experimento CODEX utilizando-se a seqüência de supressão total de bandas laterais (TOSS).

A técnica CODEX pode ser utilizada com altas velocidades de rotação de modo a permitir a eliminação das bandas laterais. Contudo, devido às limitações práticas na obtenção de altas velocidades de rotação, algumas bandas laterais freqüentemente permanecem no espectro. Para removê-las, o esquema mostrado na figura 4.3b, o qual envolve TOSS e a incrementação da duração do filtro-z, pode ser utilizado. Como é bem conhecido, não é possível eliminar as bandas laterais em experimentos MAS 2D utilizando-se somente a técnica TOSS ⁸, sendo necessário algum esquema adicional para alcançar este objetivo. No caso da técnica CODEX, que também envolve a combinação de sinais assim como os experimentos MAS 2D, isto também acontece, de modo que não é possível obter a supressão das bandas laterais simplesmente através da utilização da seqüência TOSS antes da aquisição. Deste modo, será apresentado a seguir um esquema que pode ser utilizado para conseguir a eliminação das bandas laterais.

Considerando uma orientação do SEP relativa ao sistema do rotor (α_{2SR} , β_{2SE} , γ_{2SR}) imediatamente antes do filtro-z. Depois do filtro-z de duração,

$$Lt_r + kt_r / K \quad (\text{com } L, k, K, \text{ inteiros positivos}) \quad (4.29)$$

o sinal detectado depois da seqüência TOSS será:

$$\begin{aligned} & d(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) f(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR} + \omega_r (Lt_r + kt_r / K + t)) \\ & = d(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) f(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR} + 2\pi k / K + \omega_r t) \end{aligned} \quad (4.30)$$

onde f é a função discutida no capítulo 1. O termo $d(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR})$ é o fator de modulação de amplitude real obtido no experimentos CODEX, expressão 4.10, que também envolve a orientação do SEP relativa ao sistema do rotor antes de t_m ($\alpha_{1SR}, \beta_{1SR}, \gamma_{1SR}$). Seguindo o mesmo raciocínio utilizado no capítulo 1, a intensidade da N-ésima banda lateral será dada por:

$$I_N(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) = d(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) \exp(i(\gamma_{2SR} + 2\pi k / K)N) F_N(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}) \quad (4.31)$$

A duração do filtro-z é incrementada em K passos de duração $k = t_r/K, k = 0, \dots, K-1$, e os sinais são adicionados em aquisições sucessivas. Isto pode ser considerado como uma aproximação experimental da integral em γ_{2SR} necessária na supressão das bandas laterais utilizando TOSS em experimentos unidimensionais.

Neste caso, a intensidade da N-ésima banda lateral será dada por:

$$\begin{aligned} \bar{I}_N(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) & = d(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) \exp(i\gamma_{2SR}N) F_N(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}) \sum_{k=0}^{K-1} \exp\left(ik \frac{K}{N} 2\pi\right) \\ & = d(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}, \gamma_{2SR}) F_N(\alpha_{2SR}, \beta_{2SR}) \exp(i\gamma_{2SR}N) K \delta_{mK, N} \quad \text{com } m \text{ inteiro} \end{aligned} \quad (4.32)$$

onde foi utilizado:

$$\sum_{k=0}^{K-1} \exp\left(ik \frac{K}{N} 2\pi\right) = \frac{1 - \{e^{i2\pi N / K}\}^K}{1 - e^{i2\pi N / K}} = \frac{1 - e^{i2\pi N}}{1 - e^{i2\pi N / K}} = \delta_{mK, N} K \quad (4.33)$$

Este resultado significa que para K incrementos somente as bandas laterais de ordem mK serão observadas. Em outras palavras, a banda central ($N=0$) estará sempre presente, enquanto que as bandas laterais, com exceção das $\pm K$ -ésimas bandas, serão completamente suprimidas. Como a intensidade das bandas laterais decai rapidamente com a sua ordem, usualmente $K=5$ incrementos já são suficientes. O esquema de aquisição com filtro-z incrementado não reduz, em nenhum sentido, a sensibilidade. Ele somente aumenta o número de aquisições mínimas $K*64$ para um ciclo de fases com 64 passos.

Este método de supressão de bandas laterais com TOSS e soma artificial em γ_{2SR} pode também ser aplicado para qualquer experimento 2D-MAS de modo a suprimir as bandas laterais.

4.2.10 – Outras informações que podem ser obtidas através da técnica CODEX.

Na seção 3.4 do capítulo anterior foram discutidas as informações sobre o movimento molecular que podem ser obtidas utilizando a técnica PUREX 1D. Uma vez que a técnica CODEX pode ser encarada com a versão da técnica PUREX 1D com rotação em torno do ângulo mágico, toda a discussão realizada na seção 3.4 também é válida neste caso. Sendo assim, através da técnica CODEX também é possível obter a função e o tempo de correlação do movimento molecular através da dependência da curva CODEX com t_m , o número de sítios e a fração de sítios móveis através do limite assintótico de $E(t_m, \delta N_{T_r})$ e ainda a energia de ativação e distribuição de tempos de correlação através da dependência de $E(t_m, \delta N_{T_r})$ com a temperatura. Obviamente, todas estas informações obtidas com a grande vantagem da alta resolução que caracteriza a técnica CODEX.

4.2.11 – Faixa de tempos de correlação acessíveis por CODEX e limitações do experimento.

O experimento CODEX é sensível a taxas de movimentos no intervalo de ~ 0.1 Hz a ~ 5 kHz. Movimentos muito lentos, que requerem tempos de mistura muito longos, podem ser melhor estudados por CODEX do que por outras técnicas de RMN de *Exchange*. A alta sensibilidade da técnica permite detecção de $\sim 10\%$ da intensidade de *Exchange* já com $t_m = 0,1\tau_c$, o que a torna menos sensível à perda de intensidade por relaxação T_1 e ao aumento da duração do experimento, quando o tempo de mistura excede o tempo de repetição. *Exchange* devido à difusão de spin¹⁰ induzido pelo acoplamento dipolar entre os núcleos de ^{13}C , é uma das maiores limitações das técnicas de RMN de *Exchange*. A difusão de spin também provoca mudança na frequência durante o tempo de mistura, pois esta depende da orientação entre os sítios entre os quais a difusão ocorreu. Isto faz com que os efeitos da difusão de spin e do movimento molecular apareçam de forma idêntica nos espectros de *Exchange*. Mesmo neste aspecto, a técnica CODEX é superior, pois sua alta sensibilidade permite a redução do nível de enriquecimento em ^{13}C , diminuindo o problema da difusão de spin. De fato, recentemente esta característica da técnica foi testada e os resultados apresentados mostram que utilizando-se CODEX com altas frequências de rotação¹⁰ é possível quase que eliminar o efeito da difusão de spin entre núcleos de ^{13}C não protonados e diminuir sensivelmente este efeito para grupos CH. Foi mostrado ainda

que, mesmo neste limite de altas rotações para núcleos CH_2 e CH_3 , o efeito não é reduzido, comprovando o papel fundamental da interação heteronuclear entre carbono e hidrogênio no efeito da difusão de spin entre núcleos de ^{13}C . Em sistemas biológicos, geralmente o enriquecimento da amostra em ^{13}C e ^{15}N é quase que obrigatório por razões de sensibilidade. Isto agrava muito o problema da difusão de spins entre núcleos de ^{13}C e torna-se muito difícil utilizar CODEX para estudar a dinâmica lenta tais sistemas. No entanto, na seção seguinte será apresentada uma variante da técnica CODEX que torna tais estudos possíveis.

No entanto, na ausência de movimento molecular, os efeitos da difusão de spins podem ser utilizados para obter informações sobre a conformação molecular através da técnica CODEX. Se pares ^{13}C - ^{13}C são enriquecidos seletivamente o experimento pode ser utilizado para mediar a razão entre as conformações *trans* e *gauche* em polímeros via difusão de spins entre esses pares. Se um par ^{13}C - ^{13}C está em conformação *gauche*, a orientação relativa entre os eixos principais dos tensores de deslocamento químico dos dois carbonos é diferente do caso da conformação *trans*. Mais precisamente, na conformação *gauche*, se seguirmos um modelo de RIS¹¹, o ângulo de torção é de 60° enquanto na conformação *trans* é de 180° . Sendo assim, a difusão de spin entre segmentos com conformação *gauche* é similar a uma rotação de 60° em torno da ligação ^{13}C - ^{13}C entre dois sítios e a curva CODEX irá decair como tal. Já para a conformação *trans*, que seria equivalente a uma rotação de 180° , não se observará decaimento na curva CODEX, já que as orientações 180° e 0° são equivalentes. Portanto, através da análise do decaimento da curva CODEX para difusão de spin pode-se determinar a razão *trans/gauche* entre pares de ^{13}C em sólidos orgânicos¹².

A principal limitação da técnica CODEX está associada com as reorientações rápidas, as quais não são detectadas. No experimento CODEX, assim como em qualquer experimento de *Exchange*, é necessário que não haja movimento molecular durante os períodos de evolução. Entretanto, mesmo que isso ocorra, ainda ocorrerá diminuição na amplitude do sinal CODEX. A forte dependência com o tempo de evolução e a independência com o tempo de mistura irá identificar este limite. Para movimentos muito rápidos, as frequências de precessão serão promediadas pelo movimento durante os períodos de evolução. Isto faz com que não seja possível observar diferenças entre as frequências antes e após t_m , já que a frequência promediada pelo movimento não dependerá

da orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico antes e depois de t_m . Portanto, segmentos que se reorientam rapidamente aparecerão no experimento CODEX como se fossem imóveis e o devido cuidado deve ser tomado para separar essas duas porções do espectro.

Movimentos rápidos, com taxas excedendo 10 kHz, podem ser detectados através de outros experimentos. Informações mais detalhadas sobre a dinâmica rápida pode ser obtida por análise de forma de linha para $^2\text{H}^{13}$ e relaxação T_2^{13} . Se o processo de enriquecimento da amostra com deutério não for possível, bandas laterais dipolares ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$) podem ser analisadas. Informações mais semi-quantitativas podem também ser obtidas por medidas de tempos de relaxação $T_{1\rho}^{14}$, alargamento de linhas sob MAS¹⁵ ou estreitamento de anisotropia de deslocamento químico. O experimento WISE¹⁶, ou sua versão unidimensional, pode qualitativamente identificar segmentos com movimentos de alta frequência (> 300 kHz), e mobilidade de grande amplitude.

4.3 – Variações do Experimento CODEX.

Nesta seção serão apresentadas algumas técnicas derivadas da técnica CODEX, de onde se pode obter informações complementares aos experimentos PUREX e CODEX.

4.3.1 – CODEX de quatro períodos (4t-CODEX).

Como discutido no último capítulo, a fração de sítios móveis, f_m , e o número de sítios acessíveis à reorientação molecular, M , estão relacionados com $E(t_m, \delta\tau)$ ou, equivalentemente no caso do experimento CODEX, com $E(t_m, N\tau)$, no limite $t_m \gg \tau_c$ e $\delta N\tau \gg 1$ através da seguinte expressão:

$$E_\infty = f_m (M - 1) / M \quad (4.34)$$

Deste modo, em geral, não é possível determinar f_m e M independentemente a partir de E_∞ . Para superar essa limitação, nesta seção será apresentada uma variação do experimento CODEX, o qual será denominado CODEX de quatro períodos ou, abreviadamente, 4t-CODEX. Esta técnica consiste basicamente na concatenação de duas seqüências de pulsos CODEX. Deste modo, a seqüência de pulsos para este experimento, mostrada na figura 4.7, é constituída de dois blocos distintos. O primeiro bloco, formado pelos dois primeiros períodos de evolução $t_1 + t_2$ e os períodos-z t_{ma} e t_{mb} , é executado

como uma seqüência de *pure-exchange* CODEX, isto é, dois espectros com t_{ma} e t_{mb} invertidos são adquiridos e subtraídos. No segundo bloco, formado pelos dois últimos tempos de evolução e os períodos t_{mc} e t_z , o sinal é adquirido como em uma seqüência CODEX convencional. Procedendo desta forma, os segmentos moleculares móveis na escala de tempo de 1 ms - 1 s, são selecionados no experimento de *pure-exchange* CODEX com tempo de mistura t_{ma} , e o comportamento dinâmico destes segmentos selecionados é analisado em um experimento CODEX com tempo de mistura t_{mc} . Os efeitos de relaxação T_1 podem ser eliminados mantendo o período-z total, $t_{mc} + t_z$, com duração fixa, não sendo necessário tomar a diferença na segunda parte do experimento.

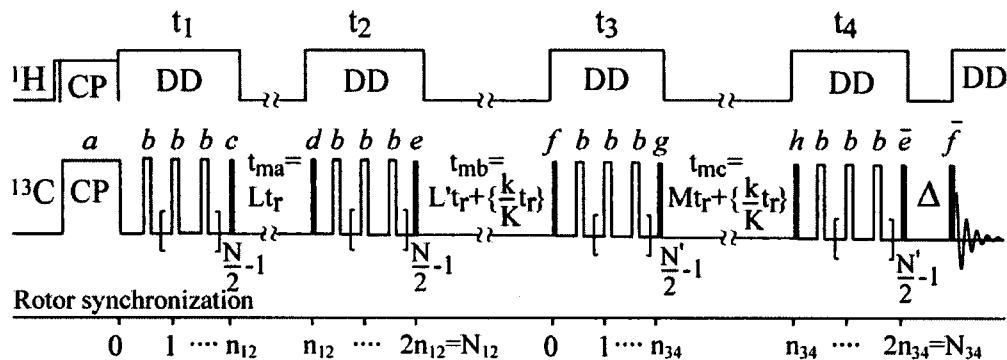


Figura 4.7 - Seqüência de pulsos utilizada no experimento 4t-CODEX, utilizada na determinação do número de sítios acessíveis ao movimento molecular.

Para mostrar quantitativamente como este experimento pode ser utilizado para obter informação sobre o número de sítios M , é necessário considerar a seguinte intensidade normalizada:

$$D_{4t}(t_{ma}, t_{mc}) = \frac{S(t_{ma}, t_{mc})}{S(t_{ma} = 0, t_{mc} = 0)} = \frac{S(t_{ma}, t_{mc})}{S(0,0)} \quad (4.35)$$

Obviamente, a intensidade $D(t_{ma}, t_{mc})$ também depende dos períodos de evolução, $t_1 + t_2 = N_{12}t_r$ e $t_3 + t_4 = N_{34}t_r$. Contudo, para simplificar a notação esta dependência será omitida. De fato, como será demonstrado, o resultado final não depende de $t_1 + t_2$. Inicialmente será assumido que $\delta N_{34}t_r \gg 1$.

No experimento com t_{ma} curto, isto é, sem seleção dos segmentos móveis, o sinal tem o mesmo decaimento que em um experimento CODEX regular, porém, escalado por um fator 0,5. Uma vez que este fator aparece em todas as intensidades que serão

discutidas, ele não será considerado no tratamento. Assim, o sinal de referência sem seleção dos segmentos móveis será,

$$D_{4t}(t_{ma} = 0, t_{mc} = 0) = 1 \quad (4.36)$$

para t_{mc} curto e

$$D_{4t}(t_{ma} = 0, t_{mc} = \infty) = (1 - f_m) + f_m 1/M \quad (4.37)$$

para t_{mc} longo. A seleção durante $N_{12}t_r$ e t_{ma} irá reduzir o sinal dos segmentos móveis por um fator $r(t_{ma}, \delta N_{12}t_r)$, onde:

$$\begin{aligned} r(0, \delta N_{12}t_r) &= r(t_{ma}, 0) = 1 \\ r(t_{ma} \gg \tau_c, \delta N_{12}t_r) &= 1/M \end{aligned} \quad (4.38)$$

Já a fração de segmentos rígidos $(1-f_m)$ permanecerá a mesma. Deste modo, o sinal para t_{mc} curto será:

$$D_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 0) = (1 - f_m) + r(t_{ma})f_m 1/M \quad (4.39)$$

onde a dependência com $\delta N_{12}t_r$ em $r(t_{ma}, \delta N_{12}t_r)$ foi omitida. Para t_{mc} longo e $\delta t_3 + \delta t_4 = \delta N_{34}t_r \gg 1$, os componentes decaem para uma fração $1/M$ do sinal com t_{mc} curto, e o sinal resultante será:

$$D_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = \infty) = (1 - f_m) + r(t_{ma})f_m 1/M^2 \quad (4.40)$$

Tomando agora as seguintes diferenças entre as intensidades, obtém-se:

$$ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 0) = D_{4t}(t_{ma} = 0, t_{mc} = 0) - D_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 0) = f_m(1 - r/M) \quad (4.41)$$

para t_{mc} curto e

$$\begin{aligned} ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = \infty) &= D_{4t}(t_{ma} = 0, t_{mc} = \infty) - D_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = \infty) = \\ &= f_m(1 - r/M)(1/M) \end{aligned} \quad (4.42)$$

para t_{mc} longo. A nomenclatura “ED” foi utilizada para indicar que o sinal é de *pure-exchange* (E) com respeito a t_{ma} , porém, é um sinal CODEX regular, (D), com respeito a t_{mc} . A razão entre estas duas intensidades é dada por:

$$\frac{ED_{4t}(t_{ma}, \infty)}{ED_{4t}(t_{ma}, 0)} = \frac{1}{M} \quad (4.43)$$

Esta razão só depende do número de sítios M, que pode então ser obtido diretamente. Este valor pode então ser utilizado na expressão 4.34 para obter f_m .

O resultado apresentado na expressão 4.43 é independente de t_{ma} e $N_{12}t_r$, porém, se esses períodos forem muito curtos as intensidades de *exchange* $ED_{4t}(t_{ma}, \infty)$ e

$ED_{4t}(t_{ma}, 0)$ serão pequenas e um número maior de promediações serão necessárias na aquisição do sinal.

Na obtenção da expressão 4.43 foi assumido $\delta N_{34}t_r \gg 1$. Porém, isto nem sempre é possível de se obter por causa da relaxação T_2 durante este período. Nos casos em que esta condição não é cumprida, $r(t_{ma}, \delta N_{34}t_r) > 1/M$, de modo que,

$$D_{4t}(t_{ma}, \infty) = (1 - f_m) + \frac{r(t_{ma})f_m}{M} r(t_{mc}, \delta N_{34}t_r) \quad (4.44)$$

As intensidades diferença, são dadas agora por:

$$ED_{4t}(t_{ma}, 0) = f_m \left(1 - \frac{r(t_{ma})}{M}\right) \quad (4.45)$$

e

$$ED_{4t}(t_{ma}, \infty) = f_m (1 - r(t_{ma})/M) r(t_{mc}, \delta N_{34}t_r) \quad (4.46)$$

A razão entre elas é então,

$$\frac{ED_{4t}(t_{ma}, \infty)}{ED_{4t}(t_{ma}, 0)} = r(t_{mc}, \delta N_{34}t_r) \quad (4.47)$$

Obviamente, no caso de $\delta N_{34}t_r \gg 1$, $r(t_{ma}, \delta N_{34}t_r) = 1/M$. A forma de $r(t_{ma}, \delta N_{34}t_r)$ pode ser obtida à partir de um experimento CODEX regular, cuja intensidade de *Exchange* pode ser descrita como:

$$D(t_m, \delta Nt_r) = (1 - f_m) + r(t_m, \delta Nt_r) f_m \quad (4.48)$$

Onde obtém-se:

$$r(t_m, \delta Nt_r) = \{D(t_m, \delta Nt_r) - (1 - f_m)\} / f_m \quad (4.50)$$

Deste modo, mesmo que somente alguns pontos de $ED_{4t}(t_{ma}, \infty) / ED_{4t}(t_{ma}, 0)$ sejam medidos, a curva completa pode ser prevista, através do ajuste da curva $D(t_m, \delta Nt_r)$, deslocada e escalada de acordo com a equação 4.50 simplesmente variando f_m . Deste modo, o número de sítios pode ser obtido à partir do valor de $r(t_m, \delta Nt_r)$ para $\delta Nt_r \gg 1$ da curva prevista.

O conceito de segmentos móveis e imóveis considerado aqui pode ser generalizado para outras discussões. Em geral, sítios que não sofrem reorientação molecular durante t_{ma} podem ser tratados como imóveis. De fato, a ausência de reorientação molecular pode estar relacionada com o tempo de correlação, $\tau_c \gg t_{ma}$ ou com a amplitude do movimento, já

que reorientações por ângulos muito pequenos não produzem defasagem suficiente durante $\delta N_{12} t_r$.

Informações similares àquelas obtidas pela técnica *Reduced 4D-Exchange* e *Reduced 4D-Echo*¹⁷ também podem ser obtidas utilizando-se a técnica 4t-CODEX.

4.3.2 – ¹⁵N CODEX com detecção em ¹³C (¹⁵N-CODEX-¹³C).

A possibilidade de se realizar experimentos de *Exchange* com rotação rápida da amostra em torno do ângulo mágico através da técnica CODEX imediatamente abre a possibilidade de um grande número de possíveis aplicações para a técnica. Uma das aplicações mais óbvias é a utilização da técnica no estudo de sistemas mais complexos que os até então estudados por técnicas de *Exchange* convencionais. Entre esses sistemas, o estudo de movimentos lentos em proteínas em estado sólido é uma área quase que completamente inexplorada. De fato, somente alguns poucos trabalhos foram publicados até o momento e entre eles a maioria foi realizada em proteínas simples. A principal razão que tem limitado esses estudos é a pouca sensibilidade e resolução das técnicas de *Exchange* convencional, que utilizam espectros de pó ou padrões de bandas laterais. Isto é particularmente grave em sistemas como proteínas, já que a complexidade química e morfológica desses materiais é muito grande, o que torna muito difícil a análise dos padrões de pó ou das bandas laterais resultantes. Um outro fator agravante é que, devido à complexidade do sistema, a sensibilidade, mesmo em experimentos convencionais de RMN, é muito baixa, tornando o enriquecimento isotópico em ¹³C desses materiais quase que obrigatório.

Para caracterizar eficientemente os movimentos lentos nos diversos segmentos de proteínas é desejável utilizar técnicas de *Exchange* que possam ser realizadas sob rotação rápida da amostra em torno do ângulo mágico combinada com enriquecimento isotópico. Assim sendo, a utilização da técnica CODEX é imprescindível no que se refere a resolução espectral. No entanto, como discutido na seção 4.2.11, mesmo sob rotação muito rápida da amostra para diminuir os efeitos da difusão de spins, em proteínas altamente enriquecidas em ¹³C, o experimento CODEX não pode ser usado por causa da difusão de spins que ocorre rapidamente. Por exemplo, na proteína ubiquitina humana seletiva e extensivamente enriquecida em ¹³C, a difusão de spins entre núcleos de ¹³C mediada pelo

acoplamento com os núcleos de ^1H foi observada com tempos característicos menores que 100 ms^{18} . Em proteínas enriquecidas uniformemente, este tempo é ainda menor.

Por outro lado, geralmente para se evitar efeitos de relaxação quadrupolar devido aos núcleos de ^{14}N , o enriquecimento extensivo em ^{13}C e isotópico em ^{15}N são utilizadas nos estudos de proteínas. Deste modo, os núcleos de ^{15}N também podem ser utilizados como sonda para estudo do movimento molecular através da técnica CODEX. O deslocamento químico do ^{15}N é uma sonda ideal para movimentos lentos nas cadeias principais de proteínas. A largura da anisotropia de deslocamento químico para ^{15}N é relativamente constante nos vários aminoácidos, o que pode ser visto na Figura 4.8, que mostra um espectro de ^{15}N estático da proteína ubiquitina humana. Embora o espectro mostrado represente a soma de 76 sítios de ^{15}N , o pico principal do espectro pode ser razoavelmente ajustado por um único padrão de pó com $\delta = 100\text{ ppm}$ e $\eta = 0.20$ (linha tracejada).

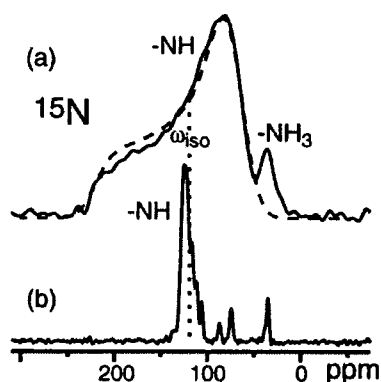


Figura 4.8 - Espectro de ^{15}N da proteína ubiquitina humana. (a) O espectro de pó (linha sólida) resultante de todos os 76 resíduos é aproximadamente ajustado com $\delta = 100\text{ ppm}$ e $\eta = 0,2$ (linha tracejada), indicando a uniformidade da anisotropia de deslocamento químico do ^{15}N . (b) Correspondente espectro MAS demonstrando a limitada resolução espectral. Os espectros foram obtidos utilizando uma sonda de tripla ressonância de 4mm em um espectrômetro Bruker DSX-300 operando em 7 Tesla. Desacoplamento de prótons de 102-125 kHz foi aplicado, com esquema de modulação de fase de dois pulsos (TPPM). Os pulsos utilizados tem durações típicas de $4\ \mu\text{s}$ para ^{13}C e $5,5\ \mu\text{s}$ para ^{15}N .

Outra vantagem é que o tensor de deslocamento químico é quase axial, ($\eta = 0.2$), além de ter um sistema de eixos principais com orientação bem conhecida em relação aos eixos moleculares para diversos aminoácidos, o que facilita a análise dos ângulos de reorientação. No entanto, o mais importante é que os núcleos de ^{15}N são muito menos abundantes que os núcleos de ^{13}C em proteínas e o acoplamento dipolar ^{15}N - ^{15}N é 6.3 vezes menor que para ^{13}C - ^{13}C à mesma distância. Deste modo, mesmo com

enriquecimento uniforme de ^{15}N , o acoplamento dipolar médio entre os núcleos de ^{15}N é suficientemente fraco para que a difusão de spin seja desprezível na escala de tempo menor 500 ms. Por outro lado, devido à uniformidade na anisotropia de deslocamento químico do ^{15}N , não é possível obter resolução espectral suficiente para resolver os picos provenientes dos diferentes aminoácidos, mesmo sob rotação rápida da amostra em torno do ângulo mágico, ver figura 4.8b. Isto pode ser um problema, já que a análise do movimento nas diferentes partes da amostra é desejável. Portanto, um experimento que contasse com a baixa probabilidade de difusão de spin do ^{15}N combinada com a superior resolução espectral, característica da aquisição em ^{13}C , seria muito interessante. Nos parágrafos seguintes, será apresentada uma seqüência de pulsos de tripla ressonância capaz de atingir tal objetivo. Nesta técnica, os espectro de ^{15}N -CODEX são detectados via ^{13}C , possibilitando que o movimento em diversos aminoácidos em diferentes sítios da proteína possa ser estudado independentemente ²².

Na seqüência de pulsos mostrada na Figura 4.9, a magnetização de ^{15}N , criada por polarização cruzada ^1H - ^{15}N , evolui inicialmente durante uma seqüência de pulsos CODEX. Pulsos de 180° em ^{13}C são aplicados no meio de cada período de evolução, com o objetivo de refocalizar o acoplamento dipolar ^{15}N - ^{13}C . Após a evolução sob a seqüência CODEX, a magnetização de ^{15}N estará modulada pelo fator $\langle \text{Re}\{\exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\} \rangle$, com Φ_1 e Φ_2 sendo as fases acumuladas devido à evolução sob a anisotropia de deslocamento químico de ^{15}N . Após o segundo período z (t_z), a magnetização de ^{15}N é transferida para ^{13}C por um trem de pulsos do tipo TEDOR (*Transferred-Echo Double-Resonance* NMR)¹⁹, durante o qual a interação dipolar ^{15}N - ^{13}C proporciona a transferência de polarização. A evolução da coerência quântica de ^{15}N durante o período TEDOR, segue o seguinte esquema:

$$\begin{aligned}
 N_x \langle \text{Re}\{\exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\} \rangle &\xrightarrow{H_D \propto N_z C_z} N_y C_z \langle \text{sen}\Phi_3 \rangle \cdot \langle \text{Re}\{\exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\} \rangle & (4.51) \\
 \xrightarrow{\text{pulsos } -90^\circ} & N_z C_y \langle \text{sen}\Phi_3 \rangle \cdot \langle \text{Re}\{\exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\} \rangle \\
 \xrightarrow{H_D \propto N_z C_z} & C_x \langle \text{sen}\Phi_3 \rangle \cdot \langle \text{sen}\Phi_4 \rangle \cdot \langle \text{Re}\{\exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\} \rangle
 \end{aligned}$$

onde Φ_3 e Φ_4 são, respectivamente, as fases acumuladas antes e depois do par de pulsos de 90° devido à evolução sob a interação dipolar ^{15}N - ^{13}C . N_i e C_i são os operadores de spin para os núcleos de ^{15}N e ^{13}C , respectivamente. Como $\text{sen}\Phi_3$ e $\text{sen}\Phi_4$ são fixos pelo período TEDOR, as magnetizações de ^{13}C e, portanto, as intensidades das linhas no espectro, serão moduladas pelo mesmo fator que o sinal de ^{15}N -CODEX. Deste modo, a escala de tempo e

a amplitude do movimento molecular poderão ser determinadas monitorando-se o decaimento das linhas de carbono como função do tempo de mistura e do tempo de evolução da mesma forma que no experimento CODEX. No capítulo 6, a aplicação desta técnica no estudo de uma proteína será discutido em detalhes.

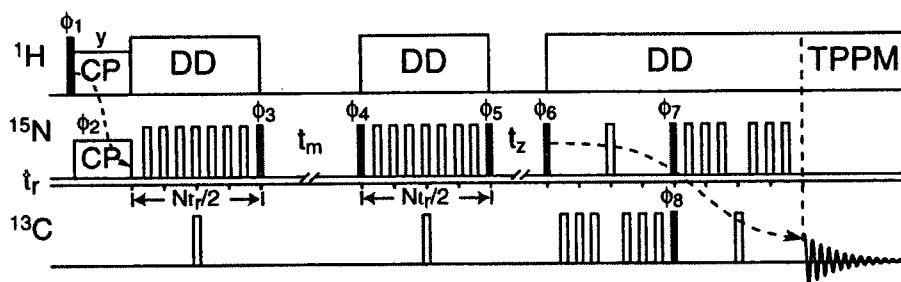


Figura 4.9 - Sequência de pulsos para o experimento ^{15}N -CODEX detectado via ^{13}C . No final do segundo período-z a sequência TEDOR transfere a magnetização de ^{15}N para ^{13}C .

4.5 – Conclusão.

Neste capítulo foram apresentadas novas técnicas de MAS-Exchange, que podem ser utilizadas eficientemente no estudo da dinâmica molecular lenta em sólidos orgânicos. A técnica CODEX permite obter informações específicas sobre a dinâmica molecular lenta, tais como ângulos de reorientação e suas distribuições e tempos de correlação e suas distribuições. Utilizando CODEX, essas informações são obtidas para cada sítio químico individualmente o que é de fundamental importância na análise de movimentos locais, responsáveis por muitos processos de relaxação anelástica em sólidos. Isto permite ainda que a técnica possa ser utilizada em sistemas cuja complexidade química impedia o uso da RMN de Exchange em amostras estáticas. A técnica 4t-CODEX apresentada aqui permite que o número de sítios acessíveis ao movimento molecular e a fração de segmentos móveis possam ser obtidas diretamente. Finalmente, outra variante da técnica CODEX, denominada ^{15}N -CODEX com detecção em ^{13}C , permite contornar o problema da difusão de spins e utilizar a técnica em sistemas biológicos onde o enriquecimento da amostra em ^{13}C é praticamente obrigatório. A demonstração experimental das técnicas apresentadas aqui, bem como aplicações das mesmas no estudo da dinâmica molecular de alguns sistemas serão apresentadas nos capítulos 5 e 6.

4.5 – Referências.

- [1] deAzevedo, E. R.; Bonagamba, T. J.; Hu, W.-H.; Schmidt-Rohr, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8411-8412.
- [2] deAzevedo, E. R.; Hu, W.-H.; Bonagamba, T. J.; Schmidt-Rohr, K. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8988.
- [3] Schmidt-Rohr, K.; deAzevedo, E. R.; Bonagamba, T. J. *Encyclopedia of NMR* **2001**, *submitted*.
- [4] Kentgens, A. P. M.; de Boer, E.; Weeman, W. S. *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 6859-6866.
- [5] Reichert, D.; Zimmermann, H.; Tekely, P.; Poupko, R.; Luz, Z. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 245-258.
- [6] Gérardy-Montouillout, V.; Malveau, C.; Tekely, P.; Olender, Z.; Luz, Z. *J. Magn. Reson.* **1996**, *A123*, 7-15.
- [7] Yang, Y.; Schuster, M.; Blümich, B.; Spiess, H. W. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *139*, 239-243.
- [8] Haeberlen, U. *High Resolution NMR in Solids*; 1st ed.; Academic Press: London, 1976; Vol. supplement 1.
- [9] Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57-83.
- [10] Dixon, W. T. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 1800.
- [11] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; 1st ed.; Academic Press: London, 1994; Vol. 1.
- [12] Terao, T.; H, M.; Saika, A. *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 3816.
- [13] Reichert, D.; Bonagamba, T. J.; Schmidt-Rohr, K. *J. Magn. Reson.* **2000**.
- [14] Flory, P. J. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*; Wiley-Interscience: New York, 1969.
- [15] Harris, D. J.; Bonagamba, T. J.; Hong, M.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 3375-3381.
- [16] Spiess, H. W. *Rotation of Molecules and Nuclear Spin Relaxation*; 1st ed.; Diehl, P., Fluck, E. and Kosfeld, R., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1978; Vol. 15, pp 59-214.
- [17] Schaefer, J.; Stejskal, E. O.; McKay, R. A.; Dixon, W. T. *Macromolecules* **1984**, *17*, 1107.
- [18] Reichert, D.; Hempel, G.; Zimmermann, H.; Tekely, P.; Poupko, R.; Luz, Z.; Favre, E.; Chmelka, B. F. *Appl. Magn. Reson.* **1999**, *17*, 315-327.

- [19] Schmidt-Rohr, K.; Clauss, J.; Spiess, H. W. *Macromolecules* **1992**, *25*, 3273.
- [20] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 3020-3023.
- [21] Hong, M.; Jakes, K. *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 71.
- [22] deAzevedo, E. R.; Kennedy, S. B.; Hong, M. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *321*, 43-48
- [23] Hing, A.; Vega, S.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 205.

Capítulo 5 - Resultados Experimentais I: Estudo da dinâmica molecular lenta em homopolímeros e cristais orgânicos utilizando as técnicas PUREX e CODEX

O objetivo deste capítulo é aplicar as técnicas proposta neste trabalho no estudo de alguns processos dinâmicos já conhecidos em polímeros e cristais orgânicos. Para isso, serão utilizados vários materiais que apresentam processos dinâmicos lentos já estudados por outras técnicas e que serão revisitados utilizando os experimentos PUREX e CODEX. Deste modo, pretende-se demonstrar as principais características das técnicas bem como a potencialidade das mesmas. Serão apresentados os estudos realizados através das técnicas PUREX 1D, 2D e PUREX-EIS e CODEX. No próximo capítulo serão apresentadas aplicações mais específicas onde utilizou-se PUREX e CODEX no estudo de materiais orgânicos não convencionais.

5.1 - Amostras utilizadas.

As amostras utilizadas nos experimentos PUREX e CODEX foram:

- a) Dimetilsulfona (DMS), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, O DMS é um cristal orgânico que exhibe à temperatura ambiente rotações em torno do eixo principal da molécula com tempo de correlação de aproximadamente 15 ms. Tal rotação resulta em uma reorientação do eixo z principal do tensor de deslocamento químico, σ_{zz} , de 108° , produzindo um espectro 2D *exchange* com uma padrão de máximos elípticos bem definido, correspondente a tal reorientação¹. A amostra foi adquirida junto a Aldrich e utilizada na forma de pó.
- b) Poli(1-buteno) isotático (iPB1), forma I, $[\text{CH}_2\text{-CH-R}]_n$ com $\text{R}=\text{CH}_2\text{-CH}_3$. O iPB1 é um polímero semi-cristalino com dois sítios de carbono na cadeia principal e dois na cadeia lateral. Assim como muitas outras poliolefinas, o iPB1 pode possuir várias formas de cristal, sendo a forma I, (hexagonal distorcida) e forma II (tetragonal) as mais estáveis. A forma II é sempre produzida quando a resina é cristalizada por fusão e resfriamento a temperatura ambiente. Contudo, no decorrer do tempo naturalmente se transforma na forma mais estável, forma I, sendo que a transformação total à temperatura ambiente se completa em aproximadamente em 1 semana. A porção cristalina do iPB1, forma I, possui uma cadeia de conformação helicoidal formando

uma hélice 3_1 enquanto que a forma II se apresenta como uma hélice 4_1^2 . Tanto a forma I quanto a forma II têm temperaturas de transição vítrea (T_g) de aproximadamente -25 °C. Estudos utilizando RMN de *exchange*², mostraram que próximo a T_g reorientações moleculares de grande amplitude ocorrem na cadeia principal da forma II do iPB. No entanto, para a forma I foi obtido um espectro predominante diagonal, com apenas algumas indicações da presença de movimentos moleculares na escala de tempo de 1 ms - 1s. Estes movimentos foram atribuídos à transição vítrea da região amorfa do polímero, porém, devido a presença predominante do padrão diagonal, não foi possível analisar tais reorientações moleculares em detalhes. Sendo assim, o iPB1, forma I, é um candidato potencial para a aplicação da técnica PUREX, já que a supressão do padrão diagonal permitirá a observação seletiva do padrão de *exchange* dos segmentos móveis. As amostras de iPB1, alto peso molecular (570 kDA), utilizadas nos experimentos PUREX foram obtidas da Aldrich. As amostras recebidas foram preparadas para estudos de RMN por fusão a aproximadamente 150 °C, seguida de resfriamento lento à temperatura ambiente durante algumas semanas para garantir a transformação completa para a forma I.

- c) *Poli(propileno) atático* (aPP) $[\text{CH}_2\text{-CH-R-}]_n$ com $\text{R}=\text{CH}_3$, (Peso molecular médio de 102 kDA). É um polímero amorfo com temperatura de transição vítrea de -15 °C. A transição vítrea deste polímero foi extensivamente estudada por várias técnicas RMN de *Exchange*, onde se observou a presença tanto de movimentos conformacionais³ como reorientações aleatórias⁴. As amostras estudadas aqui são as mesmas da referência³, sendo fornecidas pelo prof. Klaus Schmidt-Rohr.
- d) *Poli(propileno) sindiotático* (sPP) $[\text{CH}_2\text{-CH-R-}]_n$ com $\text{R}=\text{CH}_3$, (Peso molecular médio de 100 KDA). O sPP também é uma poliolefina, que se cristaliza como uma hélice 4_1 , ver figura 5.1, Estudos de relaxação dielétrica e relaxação dinâmico-mecânica (DMTA) nesses polímeros indicam a presença de reorientações lentas em temperaturas em torno de 0° C. Tais reorientações são atribuídas à transição vítrea da região amorfa do sPP. Novamente, por se tratar de um polímero semicristalino, não foi possível estudar esses movimento utilizando RMN de *Exchange*, já que a maior parte do sinal provém da porção cristalina do polímero que é rígida na escala de tempo de 1 ms. As amostras de sPP, também obtidas da Aldrich, foram preparadas para estudos de RMN por fusão a 200 °C, seguida de resfriamento à temperatura ambiente.

- e) *Poli(propileno) isotático* (iPP) $[\text{CH}_2\text{-CH-R-}]_n$ com $\text{R}=\text{CH}_3$ (Peso molecular médio de 570 KDA) é uma poliolefina que se cristaliza como uma hélice 3_1 , ver figura 5.1. A dinâmica molecular responsável pelos processos de relaxação anelástica do iPP é bem conhecida. Estudos de relaxação dielétrica e dinâmico-mecânica neste polímero mostraram a ocorrência de um intenso processo de relaxação à 90°C ^{5,6}. Tal processo, conhecido como relaxação α , foi atribuído reorientações moleculares com escala de tempo da ordem de segundos, resultantes da propagação de defeitos na região cristalina desses polímeros⁷. Estudos de RMN de *Exchange* mais recentes mostraram que tais processos de reorientação podem ser descritos por rotações em torno da hélice, que ocorrem entre três sítios distinguíveis por RMN⁸.
- f) *Poli(metil metacrilato)* (PMMA) $[-\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)(\text{CO})\text{-O-CH}_3\text{-}]_n$ atático (Peso molecular médio de 35 KDA). O PMMA é um polímero vítreo cuja origem da relaxação β à temperatura ambiente foi atribuída à rotação do grupo lateral com concomitante rearranjo da cadeia principal. A amostra foi aquecida ligeiramente acima de sua T_g (105°C) e então moldada em forma cilíndrica com diâmetro ligeiramente inferior ao diâmetros da bobina de RF ou do rotor, de modo a obter o máximo fator de preenchimento.
- g) *Ácido Metil Malônico*, $(\text{HO}_2\text{CCH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H})$. O AMM também é um cristal o qual não apresenta nenhum mecanismo de reorientação molecular lenta à temperatura ambiente e será utilizado aqui somente como referência para a ausência de movimento molecular.

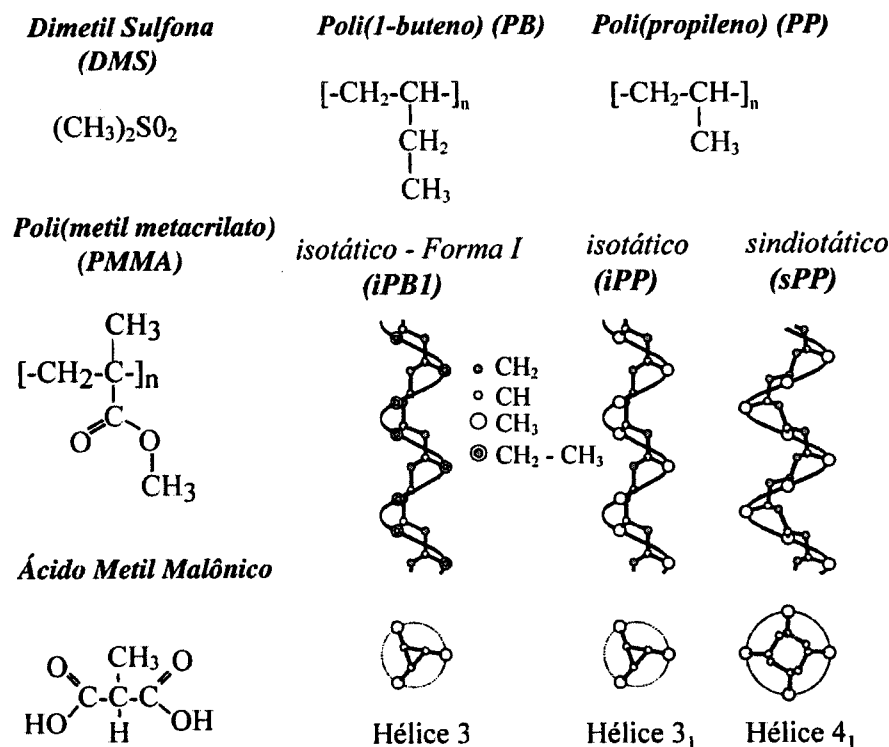


Figura 5.1 - Estrutura molecular esquemática das amostras utilizadas.

5.2 - A técnica *Pure-Exchange Solid-State NMR (PUREX)*.

5.2.1 - *Parâmetros Experimentais*.

As técnicas PUREX 1D e 2D e PUREX-EIS, discutidas no capítulo 3, foram implementadas e testadas utilizando inicialmente um espectrômetro BRUKER DSX300 com frequência de ¹³C de 75 MHz, localizado no Dept. of Polymer Science and Engineering-University of Massachusetts-Amherst-MA-EUA, utilizando uma sonda BRUKER de dupla ressonância com bobina de 5 mm. As técnicas também foram implementadas e testada no espectrômetro VARIAN Unit-INOVA-400 com frequência de ¹³C de 100 MHz, localizado Instituto de Física de São Carlos-SP utilizando uma sonda DOTY com bobina de 10 mm. Parâmetros específicos tais como largura dos pulsos de RF, amplitude do campo de desacoplamento e temporização da seqüência serão apresentados individualmente em cada aplicação.

5.2.2 - Demonstração experimental da técnica PUREX.

Nesta seção serão apresentados os experimentos utilizados para demonstração da técnica PUREX 1D e 2D e PUREX-EIS. O objetivo aqui é discutir experimentalmente os aspectos mais técnicos discutidos no capítulo 3, tais como: a remoção dos segmentos rígidos na escala de tempo de 1 ms a 1 s, a modulação espectral resultante, a sensibilidade do experimento. Estes experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker descrito anteriormente.

5.2.2.1 - PUREX 2D para o DMS.

A técnica PUREX 2D foi demonstrada inicialmente em uma amostra de DMS. Os espectros 2D foram adquiridos utilizando a seqüência de pulsos mostrada na Figura 3.1 em modo fora de ressonância na dimensão t_1 ou ω_1 , usando pulsos de 90° de 3,9 e 4,0 μs para ^{13}C e ^1H , respectivamente. Amplitude do campo de desacoplamento de ^1H de aproximadamente $\gamma B_1/2\pi = 70$ kHz, tempo de polarização cruzada de 800 μs e tempo de aquisição t_2 de $\sim 6,2$ ms foram utilizados. Na dimensão t_1 , 40 pontos com incrementos de 48 μs foram adquiridos. Quatro espectros com valores de $\tau = 250, 500, 750$ e 1000 μs foram adquiridos e posteriormente adicionados para obter um padrão plano fora da diagonal, tal como discutido no capítulo 3. O tempo de mistura utilizado no experimento foi de 50 ms. As simulações foram feitas utilizando um programa desenvolvido em FORTRAN. O ângulo de reorientação e os valores principais do tensor de deslocamento químico utilizados nas simulações foram $\beta_r = 108^\circ$ e $\sigma_{xx} = 63,5$ ppm, $\sigma_{yy} = 60,7$ ppm, $\sigma_{zz} = 6,0$ ppm, respectivamente.

Na Figura 5.2 está mostrado o conjunto de espectros PUREX 2D individuais adquiridos com $\tau = 250, 500, 750$ e 1000 μs para a amostra de DMS, juntamente com as respectivas simulações. A modulação periódica do espectro e a remoção do padrão diagonal são claramente observados. Os espectros experimental e simulado, obtidos através da soma desses padrões estão mostrado na Figura 5.3. Neste caso, um padrão elíptico excitado quase que uniformemente é observado. Somente as extremidades das elipse são suprimidas porque o incremento τ utilizado foi ligeiramente mais longo que o ideal. Para referência, um padrão de *exchange* para a amostra de DMS adquirido com a seqüência de pulsos da Figura 3.1b. Como pode ser observado, os artefatos devidos à aquisição

insuficiente em t_1 (efeitos de truncamento), são claramente removidos no espectro PUREX 2D.

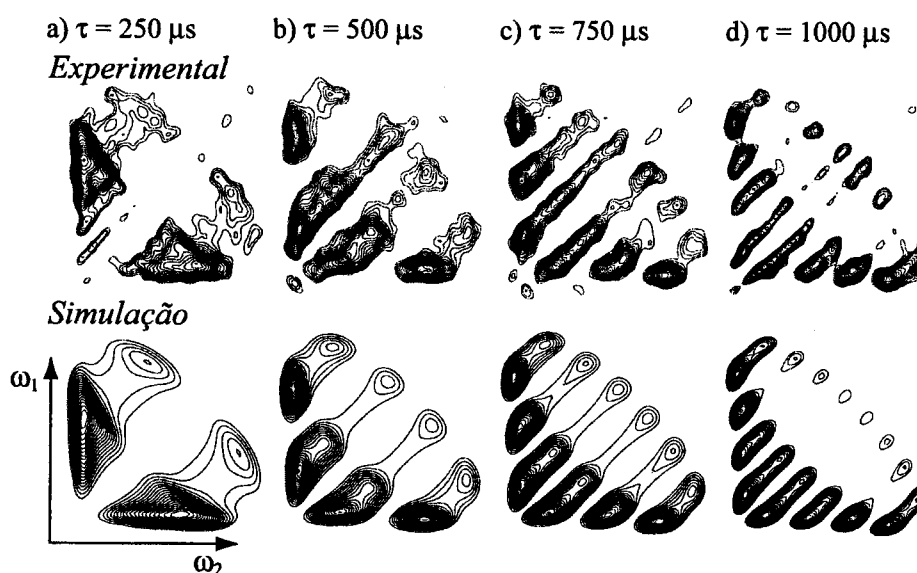


Figura 5.2 - Espectros PUREX 2D como função de τ para a amostra de DMS.

Os espectros PUREX 2D para o DMS demonstram que a técnica provê padrões de *exchange* bidimensionais com remoção quase que completa da diagonal e dos artefatos relacionados sem perda significativa de sinal. Como já discutido no capítulo 3, a sensibilidade do experimento PUREX 2D é ligeiramente menor que do experimento *Exchange* 2D convencional. Para um único valor de τ , a intensidade máxima do espectro tem 2/3 da intensidade do mesmo ponto no espectro *Exchange* 2D para o mesmo tempo de experimento. Quando alguns valores de τ são adicionados, a intensidade média no espectro PUREX é 1/3 da obtida no espectro *Exchange* 2D. No entanto, outros fatores compensam essa perda de sensibilidade. Em particular, um número menor de incrementos em t_1 pode ser adquirido no espectro PUREX 2D. Isto é possível porque o espectro PUREX exibe uma redução significativa dos artefatos de truncamento relacionados com a componente diagonal. Para reduzir esses artefatos num experimento de *exchange* convencional, um grande número de pontos em t_1 devem ser adquiridos. Isto acontece porque no domínio das frequências o sinal diagonal está restrito a uma estreita faixa na dimensão ω_1 o que implica num decaimento lento no domínio do tempo. Por outro lado, o sinal proveniente dos segmentos móveis está disperso em toda a região espectral e, por conseguinte, decai rapidamente no domínio do tempo. Portanto, para valores de t_1 mais longos a intensidade de *exchange* não contribui significativamente para o sinal e o acréscimo no número de

incrementos em t_1 somente aumenta o tempo de medida e o nível de ruído na técnica *Exchange* 2D..

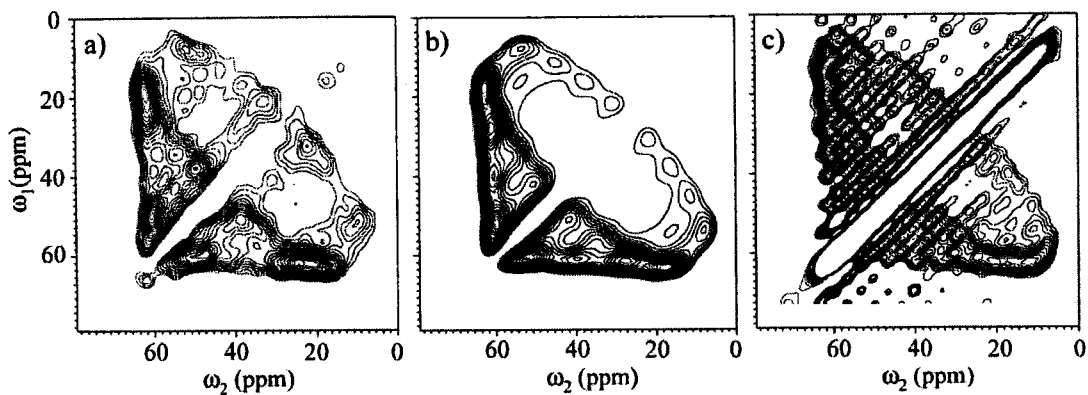


Figura 5.3 - Espectros PUREX e *Exchange* 2D para a amostra de DMS. a) Espectro PUREX 2D obtido pela soma dos espectros adquiridos com 250, 500, 75 e 1000 μ s. b) Correspondente simulação dos espectro mostrado em a. c) Espectro *Exchange* 2D adquirido com a seqüência de pulsos de PUREX de referência mostrada na figura 3.1b. Estes experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker descrito anteriormente.

5.2.2.2 - PUREX 1D e 2D para o polímero iPB1, forma I.

Os espectros PUREX 1D foram adquiridos com 256 aquisições, usando pulsos de 90° com duração de 3,9 μ s e 3,3 μ s para ^{13}C e ^1H , respectivamente. O tempo de contato para polarização cruzada utilizado nos experimentos foi de 500 μ s e o tempo de aquisição de 6,2 ms. Foram ainda utilizados tempos de evolução τ de 500 μ s e $t_m = 1, 10, 100,$ e 1000 ms. Os espectros 2D PUREX foram adquiridos com 192 médias usando pulsos de 90° com duração de 3,9 μ s e 3,3 μ s para ^{13}C e ^1H , respectivamente. Outros parâmetros importantes utilizados no experimento foram: tempo de contato para polarização cruzada de 500 μ s e tempo de aquisição em t_2 de 6,2 ms. 32 valores de t_1 foram utilizados com incremento de 48 μ s.

Alguns experimentos utilizando a técnica *Exchange* 2D foram realizados no polímero iPB1(forma) I à -23°C , ligeiramente acima de sua temperatura de transição vítrea. Esses experimentos mostraram um padrão quase que puramente diagonal, somente com uma ligeira indicação da presença de *exchange* na região próxima a diagonal espectral². Utilizando a técnica PUREX, este processo dinâmico pode ser caracterizado com detalhes.

Na Figura 5.4a está mostrada uma série de espectros PUREX 1D adquiridos com $t_m = 1, 10, 100$ e 1000 ms num tempo total de experimento de 7 h, juntamente com o espectro de pó regular. Na parte inferior os deslocamentos químicos isotrópicos dos quatro sítios que contribuem para o espectro estão indicados. O aumento da intensidade com t_m mostra que o movimento molecular fica significativo na escala de tempo de 10 ms e em 100 ms o processo de *exchange* já é praticamente completo. Depois de $t_m = 1$ s ocorre uma redução expressiva dos sinais provenientes dos grupos laterais devido à relaxação longitudinal. Na Figura 5.4b, o espectro PUREX 1D do iPB1, adquirido com $t_m = 1$ s, pode ser comparado com o espectro de referência adquirido com a seqüência de pulsos da Figura 3.5b. Este espectro corresponde aproximadamente a 20% da intensidade do espectro de referência.

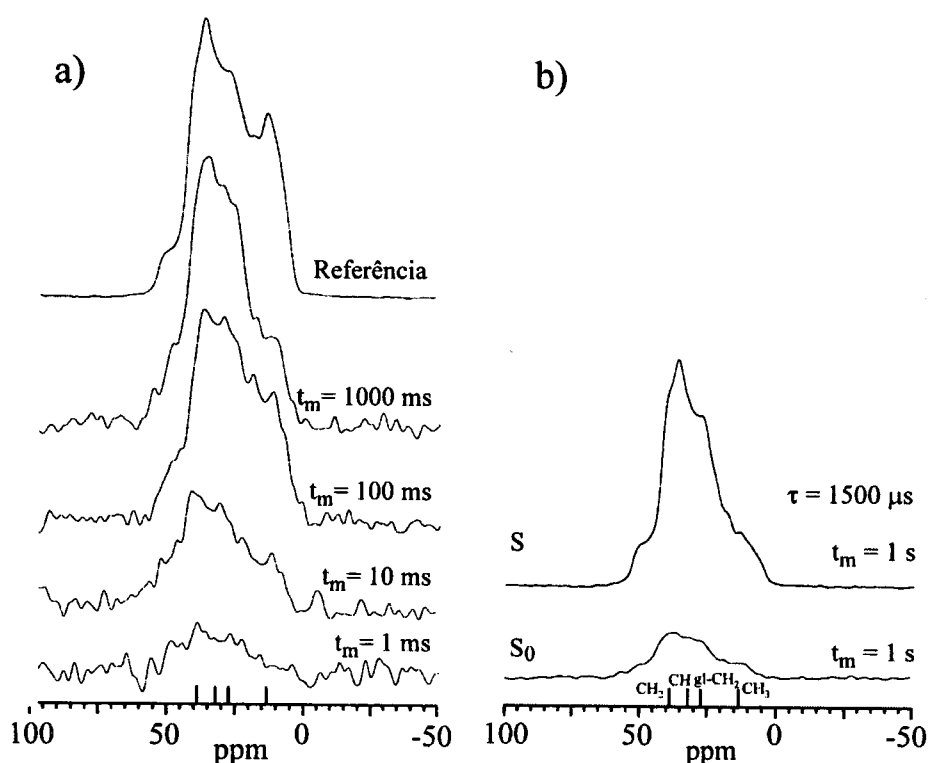


Figura 5.4 - Espectros PUREX 1D do polímero iPB1. a) Espectros em função de t_m . B) Comparação entre os espectros de referência, S_0 , e o espectros PUREX 1D para $t_m = 1$ s.

A série de espectros PUREX 1D apresentado na figura 5.4 mostra que este método é eficiente na detecção de mobilidade parcial, mesmo em um polímero com múltiplos sítios. Os grupos móveis podem ser identificados e, se o número de sítios acessíveis ao processo dinâmico for conhecido, a fração móvel pode ser estimada através da equação 3.13. No caso do iPB1, por tratar-se de um movimento difusivo ($M = \infty$) pode-se concluir que

aproximadamente 20% de cada tipo de grupo químico é móvel na escala de tempo de 1 ms - s.

Os espectros PUREX 2D para o iPB1 com $t_m = 300$ ms e $\tau = 500$ e 1000 μ s, Figura 5.5, confirmam os resultados obtidos nos espectros 1D. Todas as partes do espectro apresentam intensidade significativa, confirmando que o movimento envolve todos os sítios do iPB1. A intensidade diagonal é drasticamente reduzida, porém alguma intensidade remanescente ainda pode ser observada. Parte dessa intensidade pode ser certamente atribuída a artefatos experimentais, entretanto o alargamento natural ou induzido do sinal fora, mas muito próximo da diagonal, também pode dar origem a este sinal remanescente. O espectro PUREX 2D, Figura 5.5c, exibe um intenso padrão de *exchange* onde o espectro apresentado na referência² exibia somente indicação da presença de *exchange*, confirmando que o mesmo tipo de movimento é observado aqui. Com objetivo de fazer uma comparação mais direta, um espectro *Exchange* 2D de referência adquirido com a seqüência de pulsos da Figura 3.1b está mostrado na Figura 5.5d. Neste espectro foram utilizados 128 incrementos em t_1 de modo a evitar os artefatos de truncamento. Como pode ser observado na figura, mesmo sem artefatos de truncamento, a intensidade de *exchange* não pode ser claramente observada devido à sua superposição pelo padrão diagonal. O decréscimo do nível de contorno não revela o padrão de *exchange* mais claramente. De fato, como observado na Figura 5.5e, o padrão fora diagonal contém uma quantidade substancial de artefatos, os quais são dificilmente evitados, pois têm origem em instabilidades intrínsecas do espectrômetro de RMN. Um ponto que merece destaque é que os espectros PUREX 2D mostrados na figura foram adquiridos com 32 incrementos em t_1 , enquanto que os espectros *Exchange* 2D foram adquiridos com 128 incrementos. Uma vez que cada espectro PUREX 2D resulta da combinação de três sinais, o tempo total utilizado na aquisição do padrão mostrado na figura 5.5c foi somente 1.5 vezes o tempo utilizado na aquisição do espectro *Exchange* 2D. Na figura 5.5f está mostrado o resultado da multiplicação do espectro da Figura 5.5d pela função $\{\text{sen}^2[(\omega_1 - \omega_2)\tau_1] + \text{sen}^2[(\omega_1 - \omega_2)\tau_2]\}$, com $\tau_1 = 500$ μ s e $\tau_2 = 1$ ms. A multiplicação foi aplicada antes da apodização gaussiana utilizada no processamento do espectro. Embora o padrão diagonal também seja suprimido neste caso, os artefatos fora da diagonal permanecem, tornando a observação do padrão de *exchange* ainda muito difícil. De fato, a modulação intrínseca do espectro PUREX por $\text{sen}^2[(\Omega_1 - \Omega_2)\tau/2]$ é significativamente diferente da multiplicação do espectro *Exchange* 2D por $\text{sen}^2[(\omega_1 - \omega_2)\tau]$. Com a modulação intrínseca, o método PUREX suprime não somente

a intensidade exatamente na diagonal, mas também todos os artefatos espectrais associados com a presença do sinal dos segmentos rígidos. Por outro lado, a multiplicação dos dados após a aquisição remove a intensidade exatamente na diagonal, mas os artefatos são mantidos, impedindo a visualização do padrão de *exchange*. O valor de τ utilizado na aquisição do espectro PUREX 2D foi ligeiramente maior que o ideal, pois as extremidades do espectro não são excitadas eficientemente. No entanto, isto não invalida nenhuma das discussões desta seção.

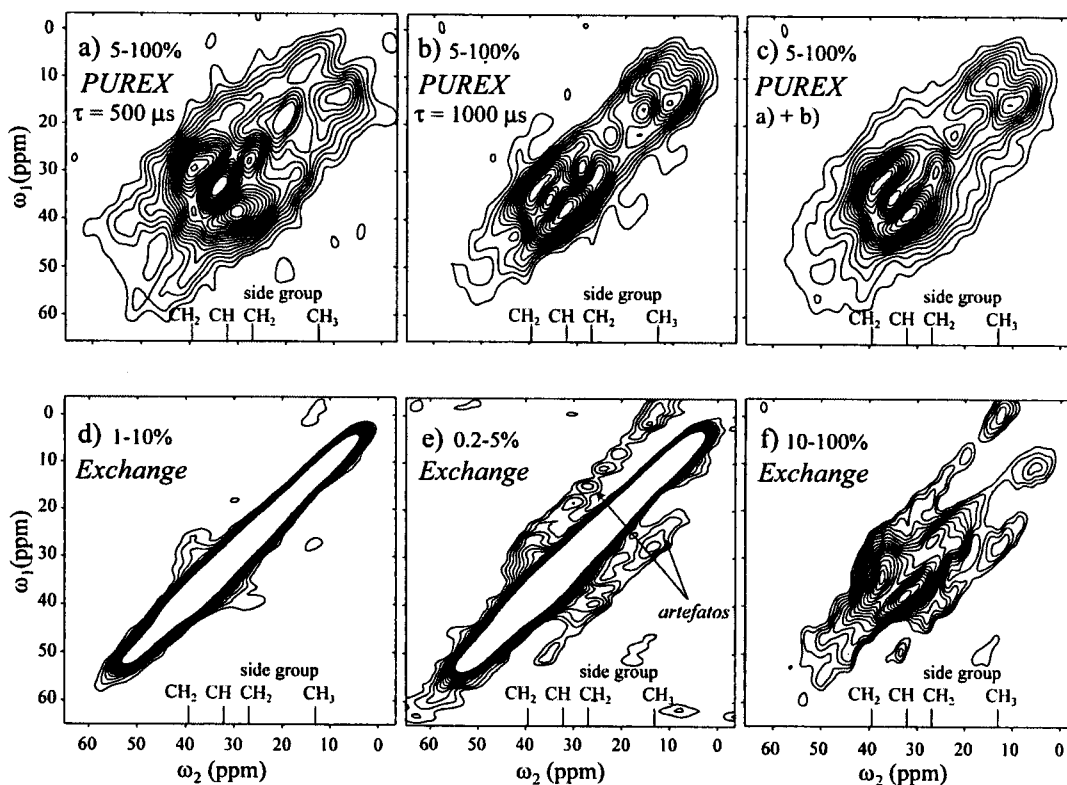


Figura 5.5 - Espectros PUREX 2D do polímero semicristalino iPB1 a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $t_m = 300\text{ ms}$. No topo do espectro estão mostrados os níveis de contorno utilizados nos gráficos. As porcentagens mostradas são em relação a intensidade máxima. a) Espectro PUREX 2D com $\tau = 500\text{ }\mu\text{s}$. b) Espectro PUREX 2D com $\tau = 1000\text{ }\mu\text{s}$. c) Soma dos espectros mostrados em a e b. d) Espectro *Exchange* 2D correspondente para comparação. e) Mesmo que em d com níveis de contorno mais baixos. f) Espectro obtido após a multiplicação do espectro *Exchange* 2D por $\{\text{sen}^2[(\omega_1 - \omega_2)\tau_1] + \text{sen}^2[(\omega_1 - \omega_2)\tau_2]\}$.

O exemplo do iPB1 mostra que em RMN de estado sólido de baixa resolução é fundamental se produzir uma modulação seno-quadrado ao invés da modulação seno usada previamente em experimentos NOESY em RMN de solução⁹. Na modulação seno, uma parte do espectro de pó fica negativa e o resultado da superposição dos sinais proveniente dos vários sítios do iPB1 resultaria em um cancelamento significativo e conseqüente perda de sinal.

Portanto, os resultados mostrados demonstram que a técnica PUREX 2D é uma combinação eficiente de modulação espectral e subtração de espectro diagonal. Neste contexto, é importante salientar que a simples subtração do espectro diagonal, obtido com $t_m = 1$ ms, não provê uma supressão completa do padrão diagonal. Se o espectro diagonal é medido com o mesmo número de aquisições e subtraído sem nenhum fator de escala, um padrão diagonal negativo será obtido. Isto acontece porque a intensidade da diagonal é reduzida na parte do espectro proveniente dos segmentos que se reorientam durante t_m . Se um fator de escala é aplicado ao espectro puramente diagonal antes da subtração, a diagonal proveniente dos sítios que se reorientam será removida, mas a diagonal proveniente dos sítios rígidos não o será totalmente.

5.2.2.3 - PUREX EIS.

Os experimentos PUREX EIS foram demonstrados utilizando um composto modelo constituído da mistura de ~90% de iPB1 e ~10% (13 mg) de DMS. O espectro EIS da Figura 5.6a, adquirido com velocidade de rotação da amostra de 1 kHz e $t_m = 50$ ms, mostra somente um pequeno pico referente ao DMS, cuja amplitude é menor que um quarto da amplitude do maior pico do iPB1(CH). Neste espectro, somente uma pequena banda lateral induzida por *exchange* é observada. O espectro PUREX EIS adquirido sob as mesmas condições, mostra uma banda lateral negativa induzida por *exchange* e uma intensa banda central de sinal oposto para o DMS, Figura 5.6b. É importante observar que a linha central detectada está relacionada com o movimento molecular da mesma forma que as bandas laterais. Nenhum sinal do iPB1 é detectado no espectro PUREX EIS, mostrando que à temperatura ambiente nenhum processo dinâmico lento ocorre neste polímero. Para o tempo de mistura de 2 ms nenhum sinal é observado, pois nestas condições quase nenhum movimento ocorre durante t_m para o DMS. Portanto, somente a intensidade induzida por *exchange* é detectada neste experimento.

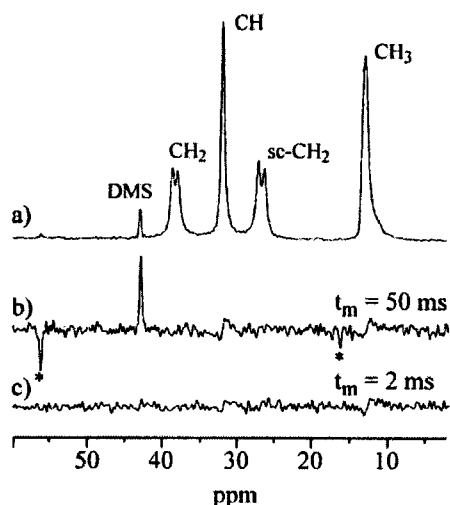


Figura 5.6 - Espectros PUREX EIS em uma mistura de iPB1 (~90%) e DMS (~10%) à temperatura ambiente (20°C). a) Espectro EIS convencional. b) Espectro PUREX EIS com $t_m = 50$ ms. c) Espectro PUREX EIS com $t_m = 1$ ms. Estes experimentos foram realizados utilizando uma sonda Bruker com rotação em torno do ângulo mágico, utilizando pulsos de com duração de 3,5 e 4,0 μ s para ^1H e ^{13}C , respectivamente. A amplitude do campo de desacoplamento utilizada foi de ~80 kHz. As bandas laterais induzidas por *Exchange* estão indicadas por asterísticos.

A técnica PUREX EIS tem boa sensibilidade mesmo quando comparada com o experimento EIS regular: enquanto a subtração utilizada no experimento PUREX EIS dobra o nível de ruído, este fator é compensado pela detecção da intensa banda central relacionada com o *exchange*, a qual tem magnitude superior a todas as bandas laterais tomadas em conjunto.

5.2.3 - Informações sobre o movimento molecular obtidas à partir das técnicas PUREX.

Na seção 3.5 do capítulo 3 foi demonstrado teoricamente e através de simulações que as técnicas PUREX podem ser utilizadas eficientemente para obter informações específicas sobre o movimento molecular lento. O objetivo desta seção é demonstrar a aplicação da técnica PUREX na determinação das escalas de tempos, geometrias e amplitudes de movimentos lentos em sólidos orgânicos. Os resultados apresentados nesta seção foram realizados no espectrômetro VARIAN Unit-INOVA-400 do IFSC, utilizando a seqüência de pulsos sem a refocalização da anisotropia de deslocamento químico, Figura 3.2. Tipicamente, foram utilizados pulsos de RF com duração 4,0 e 4,5 μ s para ^1H e ^{13}C , respectivamente, e amplitude do campo de desacoplamento de ~60 kHz.

5.2.3.1 - Escala de tempo do movimento molecular utilizando PUREX 1D.

Como discutido no capítulo 3, através da dependência da amplitude PUREX 1D normalizada, $E(t_m, \delta\tau)$ com o tempo de mistura, é possível estimar o tempo de correlação que caracteriza o movimento molecular lento. Na figura 5.7a está mostrada a curva de $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m obtida para o DMS à temperatura ambiente com $\tau = 500 \mu\text{s}$. O ajuste da curva experimental com uma curva do tipo $[1 - \exp(-t_m/\tau_c)]$ provê diretamente o tempo de correlação do movimento molecular. Neste caso, o tempo de correlação obtido foi de (16 ± 2) ms, que está em excelente acordo com o obtido por outras técnicas¹⁰. Uma vez que neste caso $\delta\tau = 6\pi$ e para o DMS todos os segmentos se movem à temperatura ambiente, o valor de equilíbrio da curva, E_∞ , fornece o número de sítios acessíveis ao movimento molecular. Neste caso, $E_\infty = 1/2$, confirmando que a reorientação molecular ocorre entre dois sítios para o DMS.

Um exemplo mais complexo da utilização da técnica PUREX 1D na determinação da escala de tempo do movimento molecular é o caso dos movimentos lentos na região amorfa de polímeros semicristalinos em temperaturas próximas de suas T_g 's. Na figura 5.7b estão mostradas as curvas $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m para a os polímeros sPP e iPB em temperaturas ligeiramente acima de suas respectivas T_g 's. Nestes casos, as curvas $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m não podem ser ajustadas por funções exponenciais como no caso do DMS, o que sugere que o movimento ocorre segundo uma distribuição de tempos de correlação. De fato, o ajuste da curva por uma função do tipo KWW, discutida no capítulo 3, provê o tempo de correlação médio e o parâmetro β o qual está relacionado com a largura da distribuição de tempos de correlação. Os valores obtidos estão mostrados na figura.

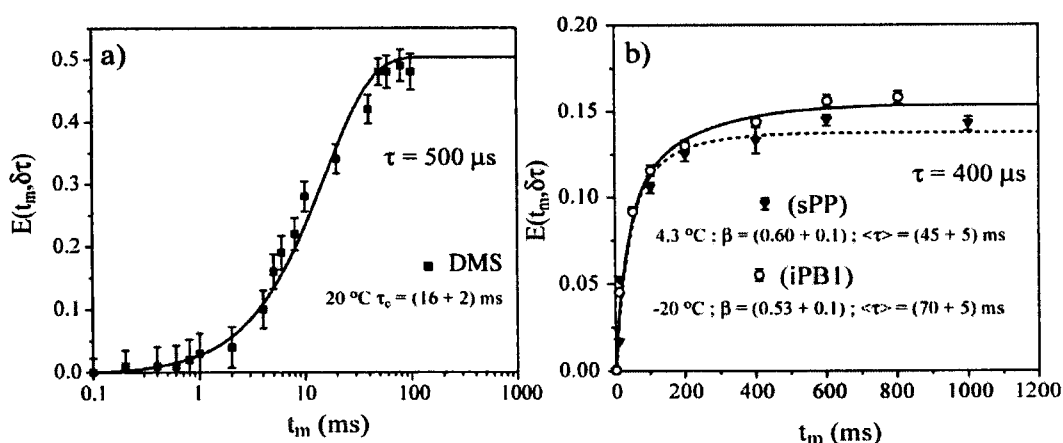


Figura 5.7 - Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m para amostras de DMS, sPP e IPB1.

5.2.3.2 - Geometria do movimento molecular lento utilizando PUREX 2D.

Para exemplificar o caso de determinação da geometria do movimento molecular utilizando a técnica PUREX 2D, novamente será considerado o caso dos movimentos lentos nos polímeros sPP e iPB1.

As técnicas RMN de *Exchange* foram e têm sido largamente empregadas na elucidação de detalhes sobre processos de relaxações anelásticas em polímero amorfo e semicristalinos¹¹. No caso particular da transição vítrea em polímeros, essas técnicas foram empregadas sobretudo no estudo de polímeros amorfos, onde a geometria dos movimentos moleculares responsáveis por esse processo de relaxação pôde ser determinada diretamente. Na maioria dos sistemas estudados foi concluído que o movimento molecular não envolve somente reorientações entre as diferentes conformações acessíveis previstas no modelo de RIS¹² (*trans-gauche isomerization*)^{4,8,13}. Além dos movimentos conformacionais¹³, ficou demonstrado que as cadeias podem executar reorientações moleculares aleatórias, as quais podem ser descritas por um modelo de difusão rotacional isotrópica¹⁴. No entanto, nenhum trabalho havia sido realizado sobre os mesmos processos em polímeros semicristalinos, pois, como já mencionado, neste tipo de polímero a maioria dos segmentos não participam da transição vítrea, o que impediu a utilização de técnicas de *Exchange* 2D convencionais nestes estudos.

Os espectros apresentados seção 5.2.2.2 obtidos para a amostra de iPB1, não apresentam nenhum padrão elíptico definido, o que sugere que o movimento molecular observado é essencialmente isotrópico. Para confirmar este fato, os espectros para o iPB1 forma I foram readquiridos com valores de $\tau = 200$ e $400 \mu\text{s}$. Esses valores de τ foram escolhidos de modo a garantir uma função de modulação que permitisse a observação de todo padrão espectral, evitando o corte das extremidades do espectro. Na figura 5.8 estão apresentados os espectros PUREX 2D do polímero iPB1 – forma I a -20°C . Este espectro possui as mesmas características do espectro apresentado na figura 5.5, sendo as pequenas diferenças atribuídas aos diferentes valores de τ utilizados. A distribuição de ângulos de reorientação pode ser obtida para o modelo de difusão reorientacional isotrópica^{14,15} utilizando os valores de $\langle\tau_c\rangle$ e β obtidos a partir da curva mostrada na Figura 5.7b. A partir desta distribuição de reorientação e das anisotropias de deslocamento químico de cada grupo, o espectro PUREX 2D pôde ser simulado de acordo com o discutido no capítulo 2. As simulações correspondentes estão apresentadas na figura.

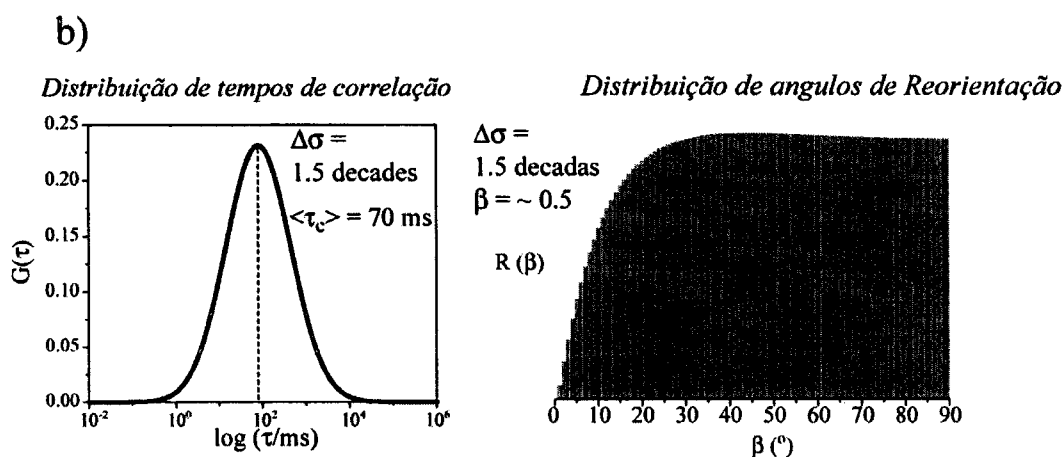
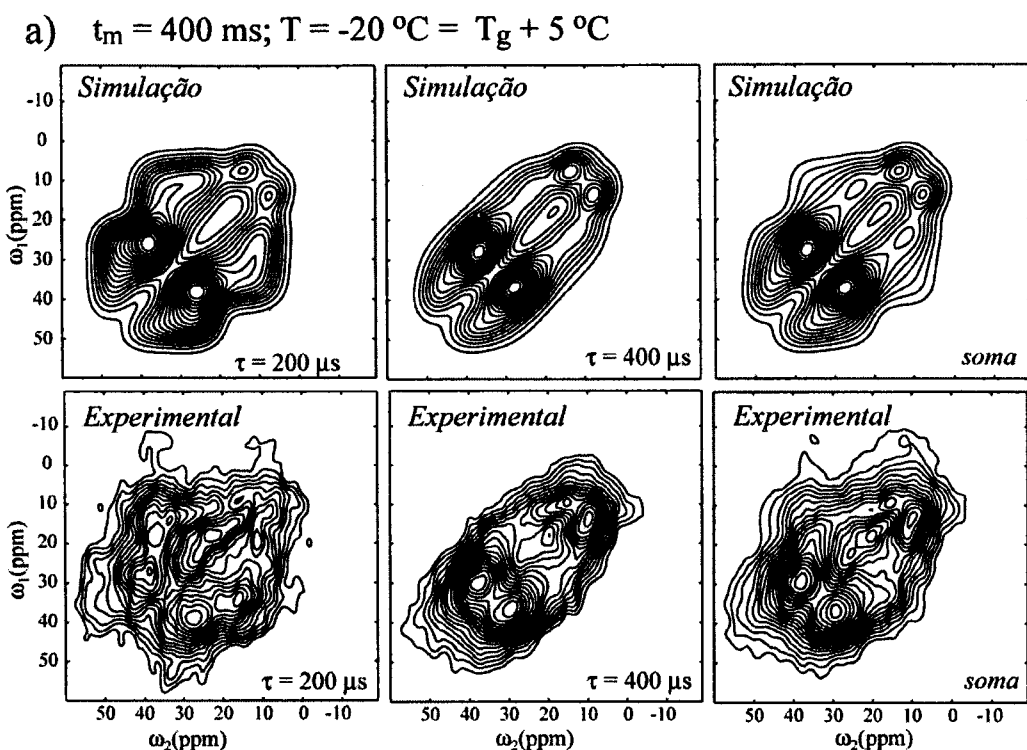


Figura 5.8 - Espectros PUREX 2D a -20°C para o polímero semicristalino IPB1 e respectivas simulações baseadas no modelo de difusão reorientacional isotrópica. Por simplicidade, foi utilizada uma distribuição de tempos de correlação do tipo log-gaussian com mesma largura que a correspondente função KWW.

Um outro exemplo de movimentos lentos em torno da transição vítrea pode ser encontrado no polímero semicristalino poli(propileno) sindiotático (sPP). O sPP é um bom exemplo de aplicação da técnica PUREX, pois o poli(propileno) atático, aPP, que é totalmente amorfo, foi um dos polímeros cuja transição vítrea foi mais estudada por RMN de *Exchange*^{4,11}. Deste modo, a comparação entre os movimentos responsáveis pela transição vítrea no polímero semicristalino e o correspondente amorfo é mais direta já que eles apresentam essencialmente a mesma estrutura química, apresentando diferenças

somente na conformação da cadeia polimérica⁶. Na figura 5.9 estão mostrados os espectros PUREX 2D obtidos para o sPP e as respectivas simulações, distribuição de tempos de correlação e ângulos de reorientação.

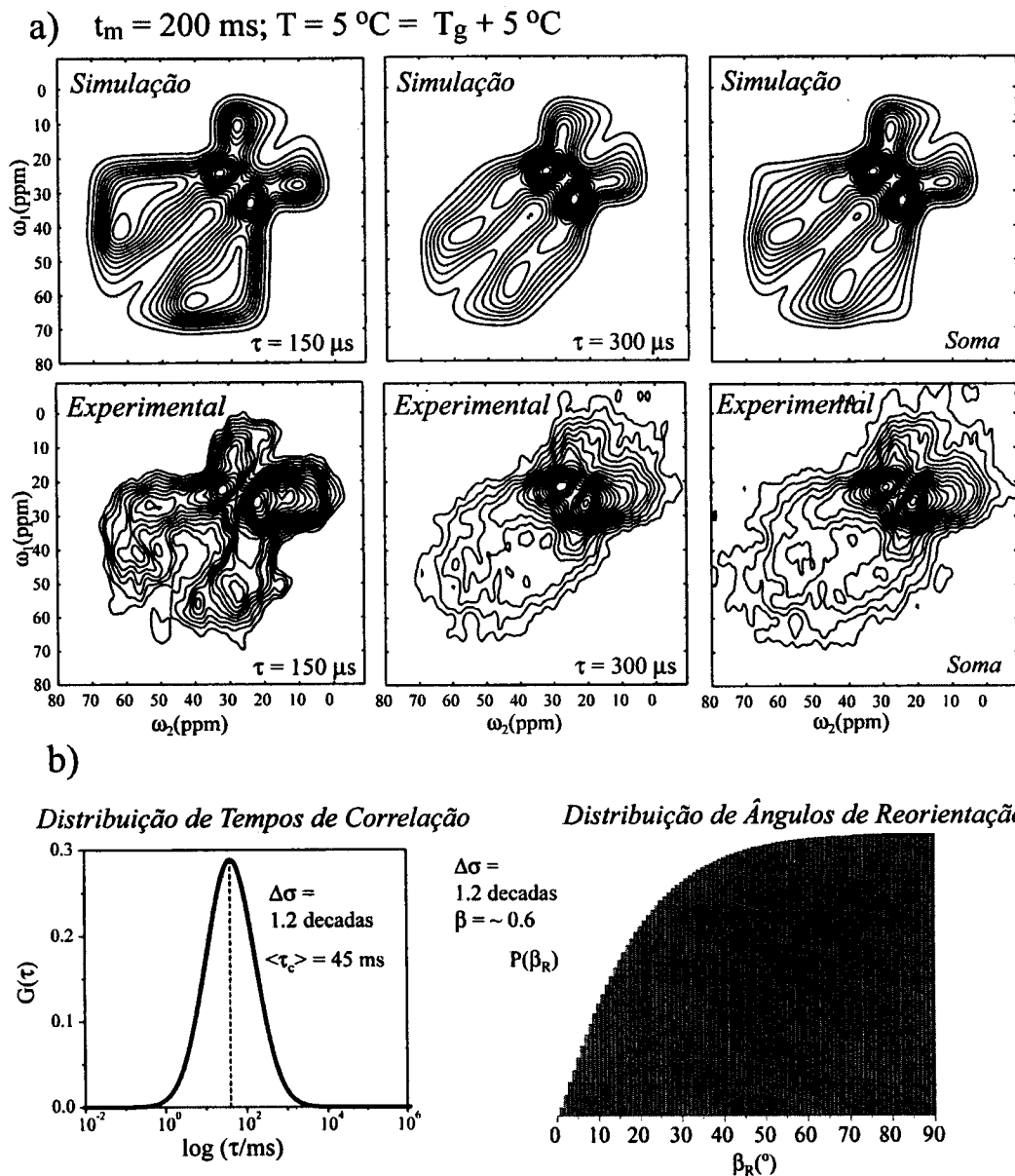


Figura 5.9 - Espectros PUREX 2D a 5 °C para o polímero semicristalino sPP e respectivas simulações baseadas no modelo de difusão reorientacional isotrópica. Por simplicidade, foi utilizada uma distribuição de tempos de correlação do tipo log-gaussian com mesma largura que a correspondente função KWW.

Os resultados apresentados mostram que os movimentos moleculares lentos responsáveis pela transição vítrea dos polímeros semicristalinos sPP e iPB1 podem ser bem representados utilizando o modelo tradicional de difusão reorientacional isotrópica, assim como nos casos dos polímeros amorfos. Embora se espere que nesses polímeros a presença da interface amorfo-cristalino modifique o comportamento dinâmico das cadeias

amorfos em torno da transição vítrea, isto não é revelado no experimento PUREX 2D, mas pode ser observado no espectro CODEX do iPB1, mostrado na Figura 5.22. Maiores detalhes sobre esse tópico serão apresentados na seção 5.3.2.5. Deste modo, estes experimentos mostram o comportamento global das cadeias que executam reorientações moleculares lentas em torno da transição vítrea, não sendo possível separar os movimentos provenientes dos segmentos moleculares localizados no interior da região amorfa daqueles situados na interface amorfo-cristalino. Isto é demonstrado através da comparação do espectro PUREX 2D do sPP e do aPP para $\tau = 150 \mu\text{s}$, Figura 5.10, onde a semelhança entre os dois espectros é notória.

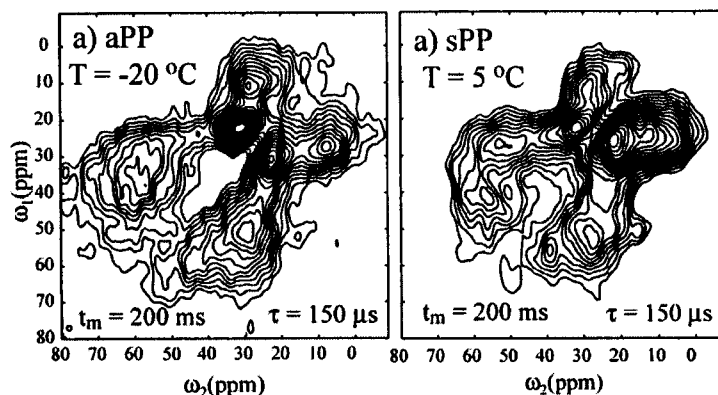


Figura 5.10 - Espectros PUREX 2D para os polímeros atático (a) e sindiotático (b) poli(propileno) 5 °C acima das respectivas transições vítreas.

Um outro aspecto importante a ser discutido neste ponto diz respeito às larguras das distribuições de tempos de correlação. As larguras das distribuições obtidas para os dois polímeros semicristalinos são consideravelmente menores que os valores descritos na literaturas para polímeros totalmente amorfos. Por exemplo, na referência 4 foi encontrada uma distribuição de tempos de correlação de aproximadamente 3 décadas ($\beta \sim 0.3$), para o aPP 5 °C acima de sua transição vítrea. Neste trabalho, a distribuição de tempos de correlação é extraída com grande precisão diretamente do espectro *Exchange* 2D. Estas pequenas distribuições de tempos de correlação observadas aqui são um tanto quanto inesperadas, já que a presença da região cristalina deveria aumentar a heterogeneidade do sistema e consequentemente a distribuição de tempos de correlação dos movimentos moleculares lentos. No entanto, deve-se ressaltar que, devido à pobre relação sinal ruído do espectro PUREX 2D, não é possível obter a distribuição de tempos de correlação diretamente deste espectro e o valor de β extraído da curva $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m não representa exatamente a distribuição de tempos de correlação no caso difusão rotacional

isotrópica. A verdadeira relação entre o valor de β obtido em curvas de t_m nos experimentos de *exchange* e a distribuição de tempos de correlação ainda é motivo de alguma controvérsia e atualmente estamos iniciando um estudo mais aprofundado sobre esse tópico, o qual deveremos dar continuidade brevemente. O que se pode afirmar com certeza é que a obtenção de curvas $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m não exponenciais revela a presença de uma distribuição de tempos de correlação, o que é esperado para esse tipo de sistema. A baixa relação sinal ruído dos espectros PUREX 2D apresentados não é fruto somente da menor sensibilidade da técnica, mas também das características do sistema (somente ~20% do sinal é detectável). Além disso, quando comparado com os experimentos de Schaefer et. al.⁴ a situação é ainda pior, pois nestes casos foram realizados experimentos *Exchange* 2D em ^2H utilizando amostras seletivamente deuteradas. Isto faz com que a sensibilidade desses experimentos à distribuição de tempos de correlação sejam pelo menos uma ordem de grandeza maior que os experimentos PUREX 2D apresentados aqui. No entanto, a utilização de amostras seletivamente enriquecidas, seja em ^2H ou ^{13}C , não resolve o problema de superposição do sinal da diagonal, já que não é possível enriquecer seletivamente somente os segmentos da região amorfa do polímero. Neste sentido, os experimentos realizados aqui são os primeiros e únicos experimentos de RMN de *Exchange* aplicados ao estudo da dinâmica lenta da transição vítrea das cadeias amorfas em polímeros semicristalinos.

5.2.3.3 - Amplitude e geometria do movimento molecular lento utilizando PUREX 1D.

No capítulo 3 foi mostrado que também é possível obter informações sobre a amplitude e geometria do movimento molecular lento através da análise da amplitude $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ . De fato, esta análise só pode trazer informações específicas, como por exemplo a reorientação individual de um dado grupo químico, no casos de movimentos em moléculas mais simples, tais como o DMS, ou movimentos locais onde o sinal do grupo que se reorienta pode ser separado do sinal dos demais grupos moleculares. Caso contrário, a superposição dos vários padrões de pó torna difícil analisar o movimento individual de cada grupo. De fato, a mesma limitação existia no caso PUREX 2D, mas naquele caso a situação não era tão grave, já que o caráter bidimensional do experimentos faz com que as regiões do espectro correspondentes a cada grupo químico ainda possam ser separadas para moléculas com menos de 4 grupos. Uma primeira demonstração da utilização da técnica na

determinação da amplitude de movimentos moleculares lentos foi realizada utilizando novamente a amostra de DMS. Na Figura 5.11 estão apresentadas a curva de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ e a respectiva simulação. Novamente utilizou-se o conhecido modelo de reorientação entre dois sítios com ângulo de reorientação $\beta_R = 108^\circ$ e valores principais do tensor de deslocamento químico $\sigma_{xx} = 63,5$ ppm, $\sigma_{yy} = 60,7$ ppm, $\sigma_{zz} = 6,0$ ppm. A concordância entre as curvas experimental e simulada é excelente.

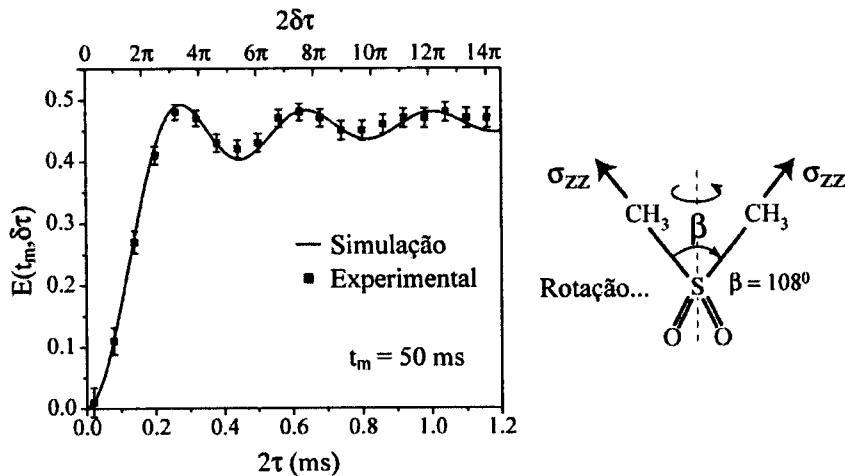


Figura 5.11 - Curva $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para a amostra de DMS. A simulação mostrada foi realizada com base no processo de dois sítios indicado na figura.

Embora o DMS seja uma amostra modelo muito apropriada para o teste deste método, o movimento de grande amplitude que acontece neste caso não permite que a sensibilidade do método à reorientações por pequenos ângulos seja testada. Para demonstrar este aspecto da técnica é necessário aplicá-la em algum tipo de movimento molecular onde ocorram reorientações por pequenos ângulos. Um exemplo de tais movimentos pode ser encontrado na relaxação beta do poli(metil metacrilato) (PMMA).

O Poli(metil metacrilato), cuja estrutura molecular está mostrada na figura 5.12a, é um importante polímero industrial cujas propriedades mecânicas e dielétricas são fortemente afetadas pelo processo de relaxação beta⁶, que é freqüentemente considerado como um exemplo de relaxação local em polímeros amorfos.

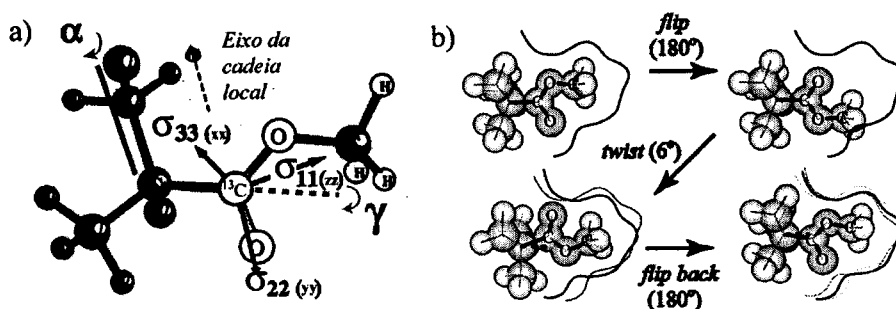


Figura 5.12 - Orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico do carbono do grupo carbonil no PMMA e diagrama esquemático das reorientações moleculares responsáveis pela relaxação beta do PMMA. α representa o ângulo de *twist* em torno da cadeia principal e γ representa o ângulo de rotação em torno da ligação C-C. Os ângulos de Euler que relacionam a orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico do ^{13}C do grupo carbonil e um sistema de eixos moleculares com eixo z ao longo da ligação C-C (indicado pela linha tracejada na figura) são: a) Para a rotação de 180° em torno da ligação C-C acompanhada pelo *twist* de α° : orientação original ($27^\circ, 90^\circ, 0^\circ$); após a rotação de 180° ($\alpha^\circ, 90^\circ, \gamma=180^\circ$). b) Para as rotações em torno da cadeia principal: orientação original ($27^\circ, 90^\circ, 0^\circ$); após a reorientação ($\alpha^\circ, 90^\circ, 0^\circ$). Os valores principais do tensor são $\sigma_{xx} = 112$ ppm, $\sigma_{yy} = 258$ ppm, $\sigma_{zz} = 268$ ppm.

Em concordância com estudo de relaxação dielétrica e dinâmico-mecânica^{6,16}, investigações detalhadas de amostras de PMMA isotopicamente enriquecidas em ^{13}C e ^2H foram realizadas utilizando experimentos de RMN uni, bi e tridimensional¹⁷. Este estudos mostraram que a relaxação β no PMMA envolve tanto reorientações de 180° dos grupos laterais, como rotações de pequenos ângulos em torno da cadeia principal. Estes experimentos mostraram também que somente um fração dos grupos laterais realizam as rotações de 180° , que foi estimada como sendo 0,5 para o PMMA. De fato, através desses estudo, um modelo molecular detalhado para a relaxação β no PMMA foi proposto. Na figura 5.12b este modelo é apresentado de forma esquemática. Devido à sua assimetria, após a rotação de 180° o grupo lateral não se acomoda mais em sua antiga vizinhança local. Deste modo, é necessário que haja uma rotação simultânea em torno da cadeia principal, indicada como *twist* na figura, que faz com que a orientação do grupo lateral se adapte a nova vizinhança. Isto faz com que após outra consecutivas de 180° o grupo lateral não retorne exatamente à sua posição antes da primeira rotação. Além disso, nem todos os segmentos executam essas rotações de 180° e aqueles que não o fazem executam somente movimentos de pequena amplitude em torno da cadeia principal. Portanto, as reorientações moleculares observadas são uma compostas por três componentes distintos: a) Uma reorientação entre dois sítios do grupo lateral, que é acompanhada pelo *twist* da cadeia principal, que provoca uma grande mudança na orientação do sistema de eixos principais

do tensor de deslocamento químico (reorientação por grande ângulo). Esta componente corresponde aos grupos laterais que executam uma ou um número ímpar de rotações de 180° acompanhadas dos respectivos twists durante t_m . b) Uma rotação em torno da cadeia principal, que provoca somente uma pequena mudança na orientação do sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico (reorientação por pequeno ângulo). Esta componente corresponde aos grupos laterais que executam dois ou um número par de rotações de 180° acompanhadas dos respectivos twists durante t_m . c) Rotações em torno da cadeia principal, que provocam somente pequenas mudanças na orientação do sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico (reorientação por pequeno ângulo). Esta componente corresponde aos segmentos cujos grupos laterais não executam as rotações de 180° e somente executam rotações por pequenos ângulos durante t_m .

Para quantificar os resultados obtidos nos experimentos de *exchange* é necessário conhecer as orientações dos eixos principais do tensor de deslocamento químico. Na Figura 5.12a a orientação dos eixos principais deste tensor para um ^{13}C pertencente ao grupo carbonil está mostrada. A utilização do ^{13}C do grupo carboxil como sonda para o movimento molecular é particularmente útil por algumas razões. Em primeiro lugar, a anisotropia de deslocamento químico deste grupo é muito maior que a dos demais grupos no PMMA, o que facilita a análise da reorientação molecular por RMN de *Exchange*. Além disso, a interação com os oxigênios faz com que o deslocamento químico isotrópico deste grupo seja muito diferente dos demais, o que permite que o padrão de pó referente a esses carbonos possa ser observado independentemente, tal como ilustrado na figura 5.13a. Finalmente, a orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico muda para todos os processos responsáveis pela relaxação beta no PMMA. Observe que uma rotação de 180° do grupo lateral irá mudar drasticamente a orientação do eixo z (indicado por $\sigma_{11} = \sigma_{zz}$ na figura 5.12) do sistema de eixos principais tratando-se de uma reorientação por grandes ângulos. Por outro lado, os ângulos de *twist* envolvidos no processo são em média em torno de 6° . De fato, uma distribuição de ângulos de *twist* é esperada já que os mesmos dependem da vizinhança local de cada grupo lateral. As orientações dos eixos principais dos tensores antes e depois da reorientação molecular em relação a um sistema de eixos fixo com eixo z coincidindo com a ligação C-C, estão mostradas na legenda da figura para os três componentes a) b) e c) mencionados anteriormente. Utilizando os valores principais extraídos do padrão de pó e essas orientações é possível simular as curvas $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ independentemente para cada um dos processos discutidos.

Na figura 5.13 estão mostradas as curvas experimentais $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ obtidas a partir do sinal do grupo carbonil no PMMA à temperatura ambiente. O carácter bimodal da curva é claramente observado, correspondendo as reorientações de grande e pequena amplitude. A simulação dessa curva, baseada no processos de três componente descrito anteriormente, e está mostrada na Figura 5.12 juntamente com a curva para cada processo individual. A simulação total foi realizada seguindo a seguinte expressão:

$$E(t_m, \delta\tau) = A E_a(t_m, \delta\tau) + B E_b(t_m, \delta\tau) + C E_c(t_m, \delta\tau) \quad (5.1)$$

Onde A, B e C representam as porcentagens referentes a cada componente (a,b,c) do processo. Os componentes b e c foram calculados utilizando distribuições de ângulos de reorientação gaussianas seguindo o procedimento descrito no capítulo 2. As larguras quadráticas médias das funções gaussianas estão mostradas na figura. As porcentagens utilizadas nas simulações foram 34% para o componente A para a reorientação de 180° e o correspondente *twist* (componente A), 34% para a reorientação de pequenos ângulos (componente B) e 66% para os dos segmentos rígidos na escala de tempo de ms.

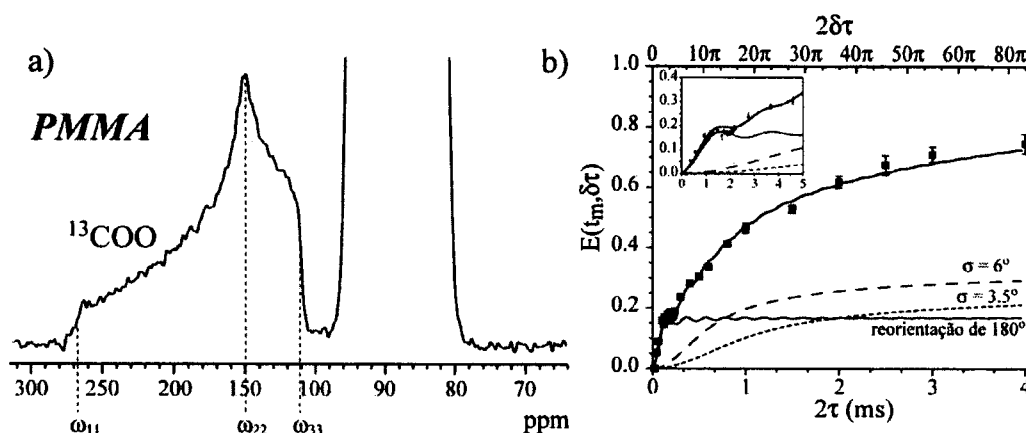


Figura 5.13 - a) Espectros de pó do polímero PMMA. O grupo carbonil pode ser facilmente distinguido dos demais e seu espectro de pó pode ser observado sem qualquer superposição. b) Curva $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para o grupo carbonil no PMMA.

Utilizando os experimentos PUREX a fração de grupos laterais que participam da relaxação β pode ser estimada precisamente. No caso do PMMA apresentado aqui, pode ser concluído que 36% dos grupos laterais realizam a reorientação de 180° à temperatura ambiente. Este valor é mais preciso que o medido por *Exchange 2D*¹⁷. Um estudo mais detalhado sobre a relaxação β do PMMA e de outros polímeros acrilatos, incluindo o efeito da temperatura e tamanho do grupo lateral., pode ser encontrado na tese de doutoramento de Fabio Becker-Guedes e na referência ¹⁸.

O exemplo do PMMA mostra que a análise da curva $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ pode ser eficientemente aplicada na elucidação de detalhes de processos dinâmicos lentos envolvendo movimentos locais. Estes resultados foram confirmados utilizando a técnica CODEX e serão apresentados na seção 5.3.2.3.

5.2.4 - PUREX 1D para movimentos no regime intermediário.

Na figura 5.14a, estão mostradas as curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m em função da temperatura obtidas para o DMS. Nesta figura é possível observar o decaimento dos valores de E_∞ com o tempo de correlação nos casos em que $\tau_c < 1$ ms, tal como descrito na seção 3.6.1. As simulações apresentadas foram realizadas utilizando a equação 3.18 e, como pode ser observado, o ajuste da curva experimental pela curva teórica provê diretamente os tempos de correlação para o movimento molecular no regime intermediário. Esta mesma informação pode ser obtida também através das curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ , como indicado na figura 5.14b. Um detalhe interessante demonstrado nas curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ e já discutido no capítulo 3, diz respeito ao fato que o principal efeito aqui é o decréscimo de E_∞ com a temperatura. De fato, a taxa de crescimento inicial da curva, que fornece a informação sobre a amplitude do movimento, não se altera com a temperatura, indicando que a amplitude do movimento molecular pode ser obtida à partir de simulações realizadas no regime de movimento lento, escaladas por um fator para levar em conta o decréscimo de E_∞ . Isto é particularmente importante no caso de movimentos envolvendo distribuições de ângulos de reorientação, onde a simulação envolve um grande número de sítios, o que implica na diagonalização, inversão e multiplicação sucessiva de matrizes complexas, não-simétricas, não-Hermitianas e de ordem no mínimo de 180×180 para cada orientação do segmento molecular, o que aumenta demasiadamente o tempo de cálculo. No caso de movimentos no regime lento, a simulação pode ser realizada utilizando-se exclusivamente argumentos geométricos, tal como descrito no capítulo 2.

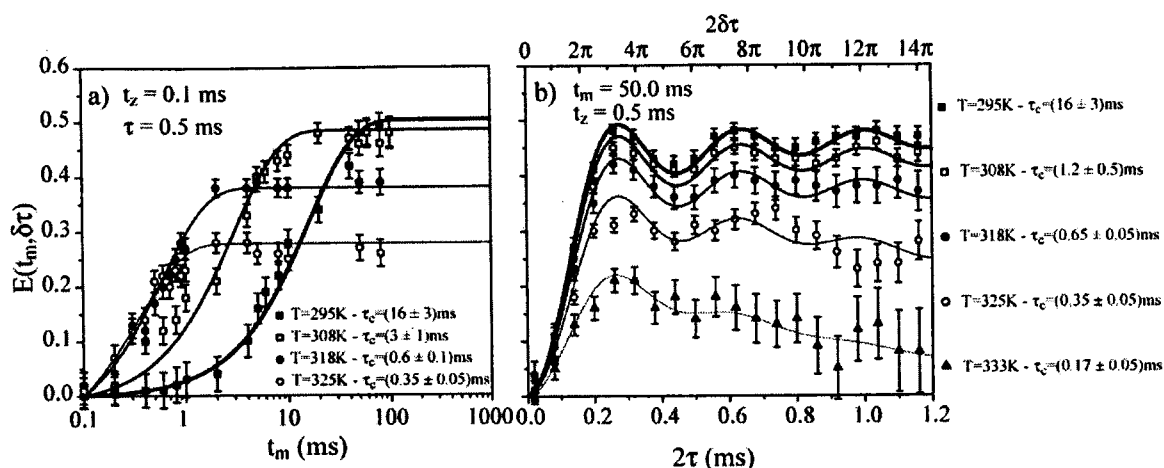


Figura 5.14 - Curvas experimentais, $E(t_m, \delta\tau)$ para uma amostra policristalina de DMS. a) $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m . b) $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ . As temperaturas e os tempos de correlação extraídos do ajuste teórico-experimental estão mostrados na figura.

5.2.5 - PUREX 1D como função da temperatura.

Na figura 5.15a está mostrada a dependência de $E(t_m, \delta\tau)$ versus temperatura para o DMS e a simulação correspondente utilizando a expressão 3.27. Através desta curva é possível determinar os parâmetros de Arrhenius para processos de reorientação molecular. Os valores encontrados estão em perfeita concordância com os valores obtidos por Frave et al.¹⁰ utilizando o gráfico de Arrhenius tradicional, onde $E_a = 85$ kJ/mol e $\tau_0 = 1,25 \times 10^{-17}$ s. Na figura 5.15b esses parâmetros foram determinados utilizando o método gráfico proposto no capítulo 3, expressão 3.31.

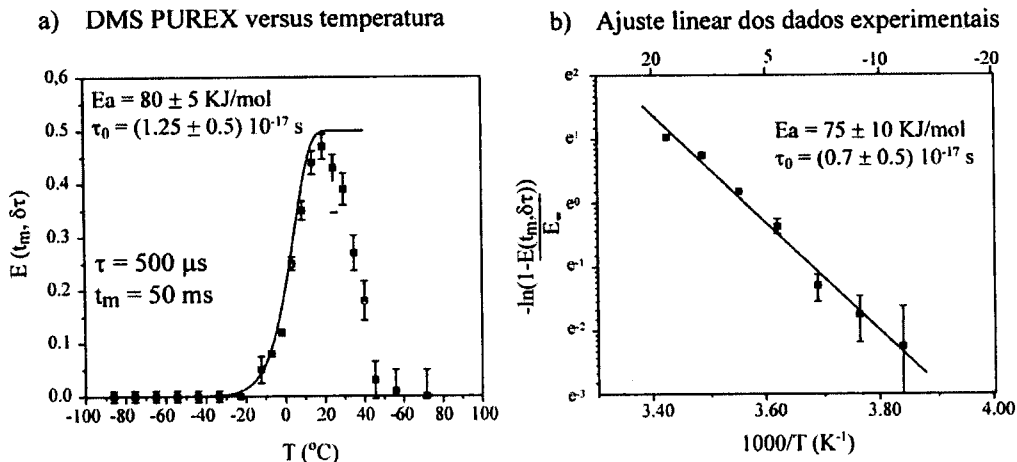


Figura 5.15 - a) Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T para o DMS. b) Gráfico utilizado na determinação da energia de ativação.

Este método permite que a energia de ativação possa ser medida sem a necessidade de medir os tempos de correlação para cada temperatura. No entanto, a parte de altas

temperaturas não pode ser prevista utilizando a expressão 3.27, uma vez que a mesma foi derivada considerando somente movimentos no regime lento. Para simular a curva completa o procedimento descrito na seção 3.7.2 foi utilizado. Na figura 5.16 está mostrada a simulação baseada neste procedimento. A concordância entre os dados experimentais e a curva simulada é excelente.

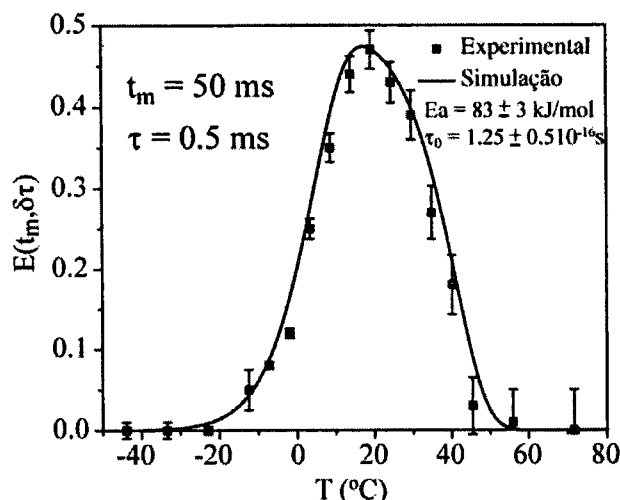


Figura 5.16 - Curva de $E(t_m, \delta\tau)$ versus T para o DMS com simulação baseada na expressão 3.18.

5.3 - A Técnica *Centerband-Only Detection of Exchange* (CODEX).

5.3.1 - Parâmetros Experimentais.

As técnicas CODEX, discutidas no capítulo 4, foram implementadas e testadas utilizando um espectrômetro BRUKER DSX300 com frequência de ^{13}C de 75 MHz, localizado no *Dept. of Polymer Science and Engineering* – University of Massachusetts. Utilizou-se uma sonda BRUKER de dupla ressonância equipada com mecanismo de rotação em torno do ângulo mágico e rotores de 7 mm. O controle da velocidade e a sincronização dos pulsos de RF foi feita utilizando um controlador Bruker, que permite uma estabilidade na velocidade de rotação superior a 1 Hz. Parâmetros específicos como duração dos pulsos de RF, amplitude do campo de desacoplamento e temporização da seqüência serão apresentados individualmente em cada experimento.

5.3.2 - Demonstração experimental e aplicações da técnica CODEX.

Como intensamente discutido no capítulo 4, a principal vantagem do experimento CODEX em relação às demais técnicas de RMN de *Exchange* é a possibilidade de se estudar movimentos lentos em sólidos com a mais alta resolução e sensibilidade possíveis

decorrentes da utilização da rotação da amostra em torno do ângulo mágico. A principal consequência deste fato é a possibilidade de estudar o movimento local de cada grupo químico. Nesta seção serão apresentados alguns experimentos realizados que demonstram que a técnica CODEX pode ser aplicada em sistemas com relativa complexidade química, possibilitando a análise de movimentos lentos locais em sólidos orgânicos.

5.3.2.1 - Identificação de movimentos moleculares lentos utilizando CODEX.

A aplicação mais trivial da técnica CODEX é na identificação de grupos químicos executando movimentos lentos. Isto está demonstrado na figura 5.17 para três amostras diferentes.

O espectro CODEX obtido com $t_m = 200\text{ms}$ e $t_z = 1\text{ ms}$, S , o correspondente espectro de referência, S_0 , e a diferença entre eles, o espectro *pure-exchange* CODEX estão mostrados para a amostra de ácido metil malônico na figura 5.17a. Como pode ser observada, a intensidade do espectro *pure-exchange* CODEX é nula, indicando a ausência de movimentos lentos neste material. Por outro lado, os movimentos moleculares de grande amplitude dos grupos laterais responsáveis pela relaxação β do PMMA são facilmente detectados nos espectros da figura 5.17b. Nesta figura, os espectros *pure-exchange* CODEX adquiridos para o PMMA com diferentes tempos de mistura são apresentados juntamente com o espectro de referência, S_0 . Como pode ser observado, os sinais referentes aos grupos químicos a cadeia lateral, COO e OCH₃, crescem rapidamente com o tempo de mistura indicando a presença de reorientações moleculares na escala de tempo de ms. Mesmo as reorientações da cadeia principal podem ser detectadas nesta figura através do sinal do carbono quaternário, -C-, o qual também possui uma dependência com o tempo de mistura. Finalmente, na figura 5.7c está apresentado o resultado da aplicação da técnica CODEX na mistura de iPb1 e DMS descrita na seção 5.2.2.3. Para $t_m = 2\text{ ms}$ quase nenhum sinal é observado no espectro, enquanto que para $t_m = 20\text{ ms}$ um sinal bem definido do DMS e a supressão dos sinais referentes ao iPb1 são observados. Isto mostra que a técnica CODEX pode ser utilizada eficientemente para distinguir grupos que apresentam mobilidade lenta.

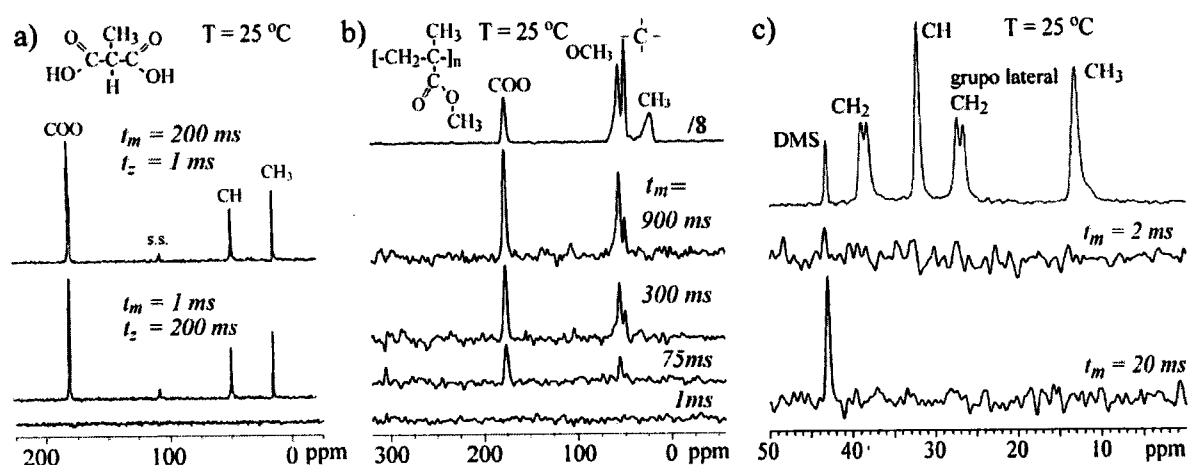


Figura 5.17 - a) Espectros CODEX do ácido malônico com abundância natural de ^{13}C adquirido com frequência de rotação, $\nu_r = 5,5$ kHz. Superior: Espectro CODEX, S, adquirido com $t_m = 200$ ms e $t_z = 1$ ms. Intermediário: Espectro de referência, S_0 , com $t_m = 1$ ms e $t_z = 200$ ms. Inferior: Espectro *pure-exchange* CODEX. Para o carbono do grupo COO, $\delta N t_r = 7,6 \pi$. "s.s" indicam as bandas laterais. b) Série de espectros *pure-exchange* CODEX do PMMA com abundância natural de ^{13}C , $\nu_r = 6,5$ kHz e $N t_r = 615 \mu\text{s}$, como função de t_m . Para o carbono COO, $\delta = 2\pi(91 \text{ ppm}) = 2\pi(6,9 \text{ kHz})$ de modo que, $\delta N t_r = 8\pi$. Para o grupo OCH₃, $\delta N t_r = 3,8\pi$. Reorientações de grande amplitude dos grupos laterais e de pequena amplitude da cadeia principal são observados. Superior: Espectro CODEX de referência com escala reduzida 8 vezes. c) Espectros CODEX de uma mistura de DMS e iPB1 adquirido com $\nu_r = 6$ kHz; $N t_r = 666 \mu\text{s}$. Superior: Espectro de referência. Intermediário e inferior: Espectros *pure-exchange* CODEX com $t_m = 2$ ms e 20 ms, respectivamente. Pulsos de 90° de $3,9 \mu\text{s}$, campo de desacoplamento de ^1H de $\gamma B_1/2\pi = 70$ kHz, tempo de repetição de 1,5 s. Tempo de contato de 1,5 ms. Tempo de medida por espectro de PMMA, 2,5 h.

5.3.2.2 - Determinação do tempo de correlação, fração móvel e número de sítios acessíveis ao movimento molecular.

No capítulo 4 foi mostrado que a análise da curva de $E(t_m, N t_r)$ versus t_m provê informação sobre os tempos de correlação, fração de segmentos móveis e número de sítios acessíveis ao movimento molecular. Na figura 5.18 estão apresentadas as curvas da intensidade $E(t_m, N t_r)$ versus t_m para quatro amostras distintas: ácido metil malônico, DMS, iPP e PMMA.

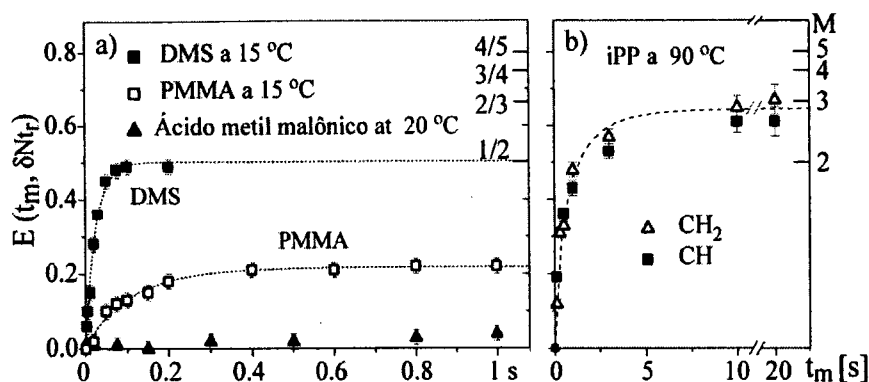


Figura 5.18 - Intensidade normalizada CODEX, $E(t_m, \delta N_{tr})$, como função de t_m para a) grupos COO no ácido metil malônico ($T = 25^\circ\text{C}$, $\delta N_{tr} = 7,6\pi$), COO no PMMA ($T = 15^\circ\text{C}$, $\delta N_{tr} = 8\pi$), e grupos CH₃ no DMS ($T = 15^\circ\text{C}$, $\delta N_{tr} = 12,4\pi$) e b) grupos CH e CH₃ no iPP ($T = 90^\circ\text{C}$, $\delta N_{tr} = 3,6\pi$ e $8,5\pi$, respectivamente). Pulsos de 90° de $3,9\ \mu\text{s}$, campo de desacoplamento de ^1H de $\gamma B_1/2\pi = 70\ \text{kHz}$, tempo de repetição de 1,5 s. e tempo de contato de 1,5 ms foram utilizados.

Para a linha do grupo carboxil (COO) do ácido metil malônico, somente uma pequena porcentagem de intensidade (5%), provavelmente associada a difusão de spin de ^{13}C , é observada na escala de tempo de 1s. Para o DMS, os dados CODEX da figura 5.18a confirmam que a reorientação no DMS ocorre realmente entre dois sítios, $M = 2$ ($E_\infty = 0,5 \pm 0,04$) e com tempo de correlação de 25 ms a 15°C . No caso da amostra de iPP, o valor de equilíbrio $E_\infty = 0,6 \pm 0,05$ (CH) e $E_\infty = 0,7 \pm 0,05$ (CH₂) a 90°C confirmam que durante a relaxação α as cadeias realizam reorientações entre $M = 3$ sítios distinguíveis por RMN, tal como discutido na seção 5.1 e na referência 8. A curva pode ser ajustada apropriadamente por uma função KWW com $\beta = 0,7 \pm 0,1$ e $\tau_0 = (690 \pm 10)\ \text{ms}$, indicando a presença de uma distribuição de tempos de correlação. Para o PMMA o valor de E_∞ é de apenas $0,23 \pm 0,02$. Portanto, não se pode concluir que se trata de uma reorientação entre dois sítios somente analisando E_∞ , pois a fração móvel não é, a princípio, conhecida. Isto demonstra que f_m e M não podem ser determinados independentemente à partir de E_∞ , mostrando a necessidade da utilização do experimento CODEX de quatro períodos discutido no capítulo 4. Estes resultados serão apresentados na seção 5.3.2.6 adiante. A curva de ajuste para o PMMA é também uma curva KWW com $\beta = 0,90 \pm 0,1$ e $\tau_0 = 100 \pm 20\ \text{ms}$.

5.3.2.3 - Determinação da amplitude do movimento molecular utilizando CODEX.

A utilidade da técnica CODEX na determinação da amplitude dos movimentos moleculares lentos foi demonstrada utilizando amostras de DMS, iPP e PMMA.

Na figura 5.19 está mostrado o gráfico da intensidade normalizada $E(t_m, \delta N t_r)$ versus $\delta N t_r$ para o cristal molecular DMS. Simulações de $E(t_m, \delta N t_r)$ para vários ângulos de reorientação β_r também são apresentadas. Uma vez que reorientações por ângulos β_r e $180^\circ - \beta_r$ são idênticas, na figura os dois ângulos são apresentados através da notação $\beta_r/(180^\circ - \beta_r)$. Para pequenos ângulos de reorientação, as curvas simuladas são bem distintas, demonstrando assim a alta precisão da técnica CODEX na determinação de ângulos de reorientação menores que 50° . Por outro lado, para ângulos de reorientação entre 70° e 120° as curvas são virtualmente idênticas. A ótima concordância entre os dados experimentais e as simulações confirmam a reorientação molecular por grandes ângulos (110° na curva mostrada na figura 5.19) que ocorre entre os dois sítios no DMS, tal como discutido anteriormente.

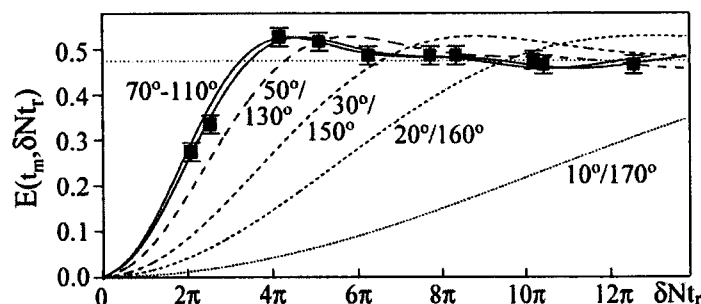


Figura 5.19 - Intensidade *pure-exchange* CODEX normalizada $E(t_m, \delta N t_r)$ como função de $\delta N t_r / 2\pi$ para o DMS a 15°C , $t_m = 75$ ms, e $\nu_r = 5,5$ KHz. Também estão mostradas as simulações para reorientações do eixo S-CH₃ por 10° ou 170° , 20° ou 160° , 30° ou 150° , 50° ou 130° , 70° ou 110° (curvas no limite de orientações de grandes amplitudes são virtualmente indistinguíveis). Os demais parâmetros experimentais foram os mesmos indicados na figura 5.18.

b) Estudos da dinâmica da cadeia principal nos polímeros iPP e PMMA utilizando CODEX.

Os gráficos de $E(t_m, \delta N t_r)$ como função de $\delta N t_r$ para os grupos CH e CH₂ do iPP e para a cadeia principal do PMMA, estão mostrados na Figura 5.20a. As curvas revelam imediatamente que os segmentos CH e CH₂ nas regiões cristalinas do iPP realizam

reorientações de grande amplitude a $T = 90^\circ\text{C}$. Os dados foram simulados usando o modelo de *helical jumps* entre três sítios, com ângulo de reorientação de 120° , conforme descrito na referência⁸. Um detalhe interessante mostrado na figura é que nos gráficos de $E(t_m, \delta N_{t_r})$ versus δN_{t_r} , as curvas para os grupos CH e CH₂ são idênticas. Isto não seria observado nos gráficos de $E(t_m, \delta N_{t_r})$ versus o tempo de evolução, N_{t_r} , pois os dois grupos possuem fatores de anisotropia de deslocamento químico diferentes. Isto revela uma vantagem dos gráficos $E(t_m, \delta N_{t_r})$ versus δN_{t_r} , pois diferentes grupos químicos produzem curvas, que só dependem dos ângulos de reorientação. Portanto, se a amplitude do movimento molecular for diferente em grupos químicos distintos, isto será identificado diretamente nas curvas de $E(t_m, \delta N_{t_r})$ versus δN_{t_r} . Na técnica PUREX 1D, as linhas dos diferentes grupos químicos geralmente não podem ser distinguidas e, portanto, as curvas como função de τ e $\delta\tau$ em geral trazem a mesma informação.

Para o PMMA, a curva $E(t_m, N_{t_r})$ versus δN_{t_r} para o grupo COO está mostrada na figura 5.20b. Novamente, a curva pode simulada considerando a reorientação de 180° , acompanhada pelo *twist* e uma rotação de pequeno ângulo em torno da cadeia principal. A contribuição de cada componente e as distribuições de ângulo utilizadas são as mesmas utilizadas na simulação dos resultados PUREX 1D, Figura 5.13b. Portanto, a concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas PUREX 1D e CODEX é bastante satisfatória. Devido à alta resolução da técnica CODEX, é possível utilizá-la para obter informações sobre a dinâmica da cadeia principal diretamente, utilizando os sinais do carbono quaternário e do grupo CH₂. Isto está mostrado na figura 5.20a. O crescimento lento de $E(t_m, \delta N_{t_r})$ com δN_{t_r} para o grupo CH₂ confirma a presença de movimentos de pequena amplitude nos segmentos da cadeia principal. A distribuição de ângulos de rotação em torno da cadeia principal extraída das medidas realizadas na linha do grupo CH₂ está mostrada na figura.

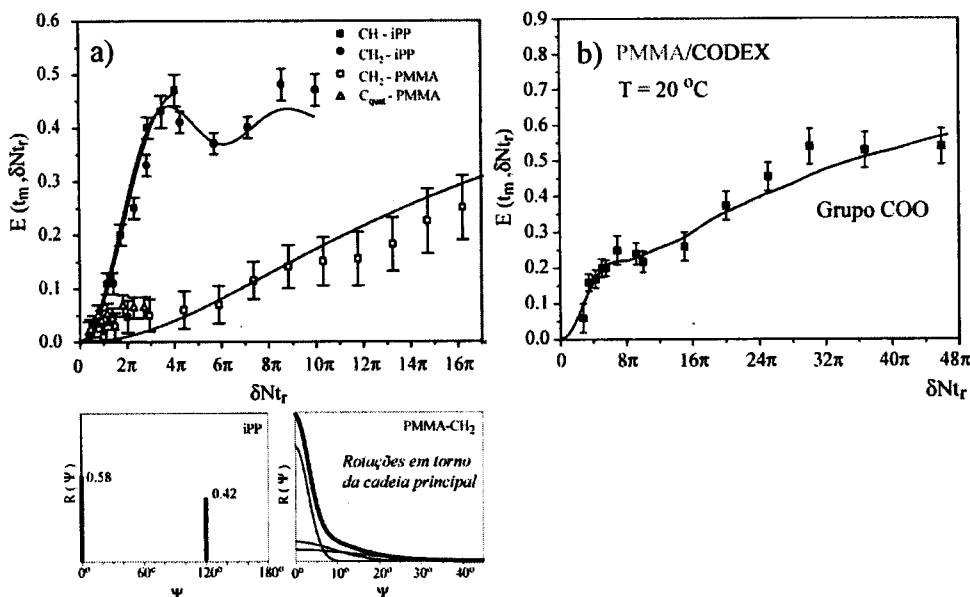


Figura 5.20 - Intensidade $E(t_m, \delta N_{tr})$ como função de δN_{tr} . a) Símbolos cheios: grupos CH e CH₂ para a região cristalina no iPP, medidos a 90°C , $t_m = 1\text{s}$, $\nu_r = 4,5\text{ kHz}$. Símbolos vazios: PMMA a 20°C , $t_m = 500\text{ ms}$, $\nu_r = 5,5\text{ kHz}$. Grupos CH₂: quadrados; Carbonos quaternários: círculos. As simulações apresentadas foram feitas com base na distribuições de ângulos de reorientação mostradas na parte inferior da figura. b) Sinal do grupo COO no PMMA e correspondente simulação baseada na equação 5.1. Os demais parâmetros experimentais foram os mesmos indicados na figura 5.18.

5.3.2.4 - Determinação dos valores principais do deslocamento químico utilizando a técnica CODEX com ciclo de fases modificado (CSA-CODEX).

Através da seqüência de pulsos CODEX com a ciclagem de fases ligeiramente modificada, discutida no capítulo 4, é possível estimar o parâmetro de anisotropia, δ . Na figura 5.21 estão mostradas as curvas S_{seno}/S_0 versus N_{tr} utilizadas na determinação ou confirmação dos parâmetros de anisotropia de deslocamento químico para cinco resíduos alifáticos no DMS, iPP e PMMA. O ajuste das curvas apresentadas utilizando valores específicos de δ e η provê uma estimativa desses parâmetros. A concordância com os valores da literatura¹⁹ é satisfatória, principalmente para $\delta > 15\text{ ppm}$, tal como discutido no capítulo anterior.

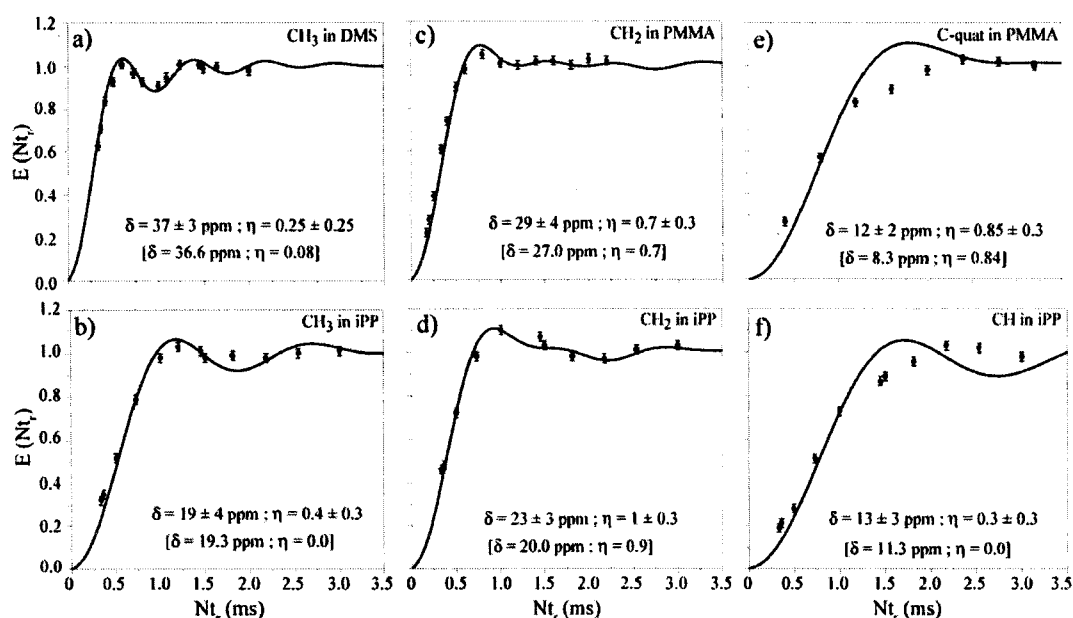


Figura 5.21 - Determinação da anisotropia de deslocamento químico no a) DMS, b) grupo CH₃ do iPP, c) grupo CH₃ no PMMA, d) CH₂ do iPP, e) carbono quaternário do PMMA e f) grupo CH do iPP. Os valores de δ e η estão indicados na figura juntamente com os valores da literatura, indicados entre colchetes. Os demais parâmetros experimentais foram os mesmos indicados na figura 5.18.

5.3.2.5 - CODEX como filtro dinâmico.

A técnica CODEX pode ainda ser utilizada como um filtro para segmentos apresentando mobilidade na escala de tempo de ms. Um exemplo trivial pode ser observado na figura 5.17c, onde somente o sinal do DMS aparece no espectro *pure-exchange* CODEX, sendo o sinal dos segmentos rígidos totalmente suprimido.

Na figura 5.22, a seleção dos segmentos com mobilidade lenta na parte amorfa do iPB1 12 °C acima de sua T_g está demonstrada. Enquanto o espectro de referência (superior) é dominado pelos sinais estreitos da parte cristalina do polímero, a intensidade integrada do espectro *pure-exchange* CODEX é dominada por sinais largos, que podem ser atribuídos a segmentos localizados em regiões conformacionalmente desordenadas na porção amorfa do polímero. No espectro de referência este sinal representa somente um sinal de fundo.

Um outro aspecto interessante da figura é que sinais estreitos são também observados no espectro *pure-exchange* CODEX. Estes sinais não são artefatos de subtração, o que pode ser confirmado pela mudança na razão de intensidades entre eles: enquanto o pico central CH é aproximadamente três vezes mais intenso que os picos dos grupos metileno, CH₃, no espectro de referência, eles possuem aproximadamente a mesma

intensidade no espectro *pure-exchange* CODEX. Isto pode ser explicado pela menor anisotropia de deslocamento químico do grupo CH, que resulta em uma menor eficiência na geração de sinal no espectro *pure-exchange* CODEX, isto é, $\delta_{\text{CH}}Nt_r < \delta_{\text{CH}_3}Nt_r$. Os picos estreitos podem provavelmente ser atribuídos a segmentos localizados no lado cristalino da interface amorfo-cristalino. Estes segmentos possuem conformação similar à dos segmentos cristalinos, mas ainda experimentam alguma dinâmica da região amorfa do polímero. Utilizando CODEX os movimentos na interface podem, portanto, ser estudados seletivamente. De fato, esta será uma outra extensão imediata deste trabalho.

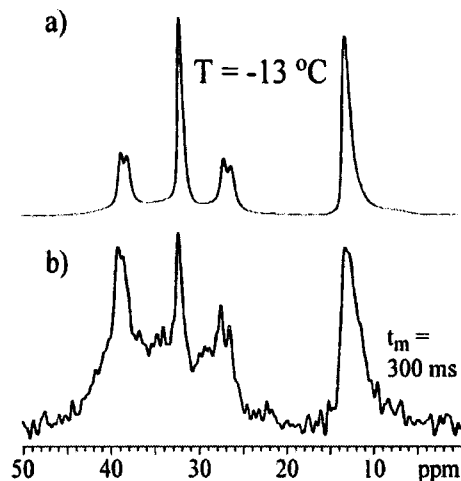


Figura 5.22 - CODEX para a amostra de iPB1, forma I. a) espectro de referência b) Espectro *pure-exchange* CODEX. A temperatura e tempos de mistura utilizado estão indicados na figura. Os demais parâmetros experimentais foram os mesmos indicados na legenda da figura 5.18.

5.3.2.6 - CODEX de quatro períodos (4t-CODEX) aplicado ao PMMA.

Na seções 5.2.3.3 e 5.3.2.3b foi estimado que 34% dos segmentos COO do PMMA realizam reorientações moleculares de 180° na escala de tempo de 500 ms. Nesta estimativa, foi assumido que este processo envolvia reorientações entre dois sítios ($M = 2$). Para suportar essa afirmação e demonstrar a técnica 4-t CODEX, este experimento foi realizado nesta amostra. Os resultados obtidos estão mostrados na figura 5.23.

Na figura 5.23a está mostrado um espectro de referência sem efeitos do movimento, $t_{ma} = 1$ ms, $t_{mc} = 1$ ms, mas com tempo total de armazenamento da magnetização em z igual a 1s, isto é, $t_{ma} + t_{mb} + t_{mc} + t_{md} = 1$ s. Os tempos de evolução utilizados foram $t_1 + t_2 + t_3 + t_4 = 545$ μ s, de modo que $\delta N_{12t_r} = \delta(t_1 + t_2) = \delta N_{34t_r} = \delta(t_3 + t_4) = 15\pi$ para o grupo COO. Estes tempos de evolução

permitem que a maior parte do sinal detectado seja proveniente das reorientações de 180° , já que para $\delta N t_r = 15\pi$ a contribuição dos movimentos de pequenos ângulo é pequena, conforme pode ser observado na Figura 5.20c. Quatro espectros foram adquiridos, com (t_{ma}, t_{mc}) de (1 ms, 1 ms), (500 ms, 1 ms), com (500 ms, 1 ms) e com (500 ms, 500 ms). A diferença entre os dois primeiros dá origem ao espectro dos segmentos móveis, sem efeito de *exchange* durante t_{mc} , $ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 1\text{ms})$, o qual está mostrado na figura 5.23b. A diferença entre o terceiro e o quarto espectros, o qual está mostrado na figura 5.23c, representa o espectro CODEX dos segmentos móveis com $t_m = 500$ ms, $ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 500\text{ms})$. A razão $ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 1\text{ms})/ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 500\text{ms})$ é igual a $0,5 \pm 0,2$, o que está de pleno acordo com o valor 0,5 esperado para reorientação entre dois sítios. Portanto, estes resultados confirmam que o grupo lateral do PMMA realiza rotações de 180° entre dois sítios.

Para demonstrar que o decaimento da amplitude devido ao movimento é muito mais pronunciada para os segmentos móveis selecionados num experimento 4t-CODEX, na figura 5.23d estão comparados os decaimentos da amplitude nos experimentos CODEX convencional, $D_{4t}(t_m, \delta N t_r)$, e 4t-CODEX, $ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 1\text{ms})/ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 500\text{ms})$, com o mesmo $\delta N t_r$. Com $t_m = 500$ ms $D_{4t}(t_m, \delta N t_r)$ é essencialmente igual a 0,75, enquanto que $ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 1\text{ms})/ED_{4t}(t_{ma}, t_{mc} = 500\text{ms})$ é igual a 0,48.

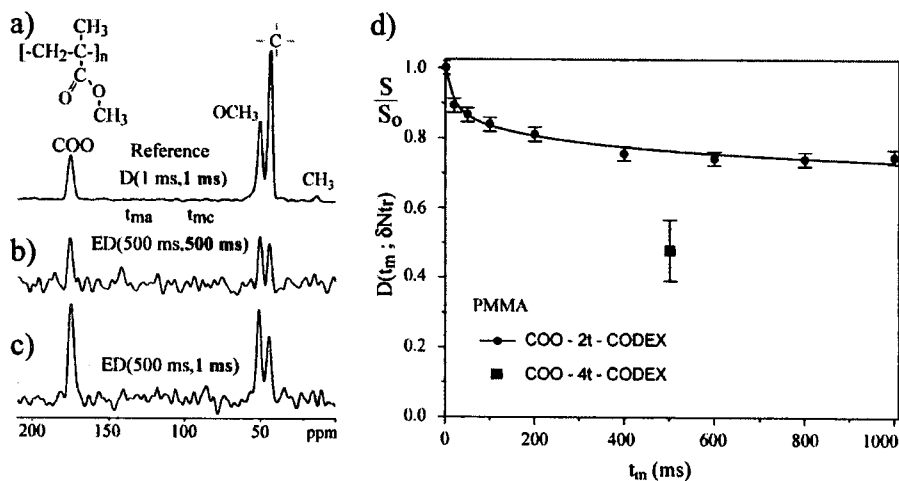


Figura 5.23 - a) Medidas do número de sítios acessíveis ao movimento dos grupos COO no polímero PMMA a 20°C e $\nu_r = 5.5$ kHz, utilizando a técnica 4-t CODEX. a) Espectro de referência: o sinal do Grupo CH_3 é suprimido devido ao efeito da relaxação durante os períodos z. b) Espectro seletivo dos segmentos móveis com $t_{mc} = 1$ ms. c) Espectro seletivo dos segmentos móveis com $t_{mc} = 500$ ms $\delta t_1 = \delta t_2 = 15\pi$; $t_{mb} = 1$ ms. Tempo total de medida: 16 horas. Os demais parâmetros experimentais foram os mesmos indicados na figura 5.18.

5.4 - Conclusão.

Neste capítulo, foram mostradas algumas aplicações as técnica PUREX e CODEX, apresentadas nos capítulo 3 e 4.

A remoção dos segmentos rígidos nas técnica PUREX foi demonstrada em um conjunto de amostras especialmente escolhido. Nestes experimentos, características intrínsecas da técnica foram demonstradas, tais como a modulação espectral e a remoção da diagonal no experimento PUREX 2D. Os experimentos no iPB1 mostraram a diferença entre a modulação intrínseca no experimento PUREX e a simples multiplicação do espectro *Exchange* 2D pela função de modulação. A sensibilidade da técnica é inferior à técnica *Exchange* 2D, porém a eliminação dos artefatos e da diagonal espectral compensa em parte essa perda, tal como demonstrado para o iPB1. Quanto às possíveis aplicações, os exemplos apresentados mostraram que a técnica pode ser aplicada com sucesso na elucidação de detalhes dos processos dinâmicos lentos em materiais orgânicos, permitindo a obtenção da escala de tempo, geometria e amplitude de movimentos com tempos de correlação entre 0,1 ms e 1 s.

A técnica CODEX foi utilizada no estudo de sistemas orgânicos, onde demonstrou-se que a mesma pode ser eficientemente utilizada na identificação de grupos com mobilidade lenta, determinação de seus tempos de correlação e também na estimativa da amplitude do movimento molecular. O exemplo do PMMA demonstra a sensibilidade da técnica a reorientações por pequenos ângulos, além da possibilidade de se utilizar a técnica no estudo detalhado de movimentos locais em polímeros. A utilização da técnica CODEX como filtro dinâmico foi demonstrada na amostra de iPB1, onde foi possível observar seletivamente movimentos lentos na região amorfa e na interface amorfo-cristalino do polímero 12 °C acima de sua transição vítrea. Finalmente, a técnica CODEX de quatro períodos foi demonstrada em uma amostra de PMMA onde foi possível confirmar que as reorientações de 180° do grupo lateral envolve reorientações entre dois sítios.

5.5 - Referências.

- [1] Kaufmann, S.; Wefing, S.; Schaefer, D.; Spiess, W. *J. Chem. Phys.* **1990**, *1*, 197-214.
- [2] Beckham, H. W.; Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Conformation Disorder and its Dynamics within the Crystalline Phase of the Form II Polymorph of Isotactic Poly(1-*

- butene*); First ed.; Urban, M. W. and Provder, T., Ed.; American Chemical Society: Washington, 1995; Vol. 598, pp 243-253.
- [3] Zemke, K.; Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Acta Polym.* **1994**, *45*, 148-159.
- [4] Schaefer, D.; Spiess, H. W.; Suter, U. W.; Fleming, W. W. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3431-3439.
- [5] Boyd, R. H. *Polymer* **1985**, *26*, 323-347.
- [6] McCrum, N. G.; Read, B. E.; Williams, G. *Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids*; 2nd ed.; Dover: New York, 1991; Vol. 1.
- [7] Boyd, R. H. *Polymer* **1985**, *26*, 1123 - 1133.
- [8] Hagemeyer, A.; Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 85-129.
- [9] Baur, M.; Kessler, H. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 877-882.
- [10] Favre, D. E.; Schaefer, D. J.; Auerbach, S. M.; Chmelka, B. F. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 5852-5855.
- [11] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; 1st ed.; Academic Press: London, 1994; Vol. 1.
- [12] Flory, P. J. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*; Wiley-Interscience: New York, 1969.
- [13] Schmidt-Rohr, K.; Bonagamba, T. J.; deAzevedo, E. R.; Dunbar, M. G.; Becker-Guedes, F.; Harris, D. J.; Kaji, H. *Dynamics and Packing of Amorphous Polymers Studied by Multidimensional Solid-State NMR*; Califórnia, USA, 2000.
- [14] Wefing, S.; Kaufmann, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1234-1244.
- [15] Schaefer, D.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 7944-7953.
- [16] Lethersich, W. *Brit. J. Appl. Phys.* **1950**, *1*, 294-301.
- [17] Schmidt-Rohr, K.; Kulik, A. S.; Beckham, H. W.; Ohlemacher, A.; Pwelzik, U.; Spiess, H. W. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4733 - 4745.
- [18] Bonagamba, T. J.; Becker-Guedes, F.; deAzevedo, E. R.; Schmidt-Rohr, K. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **2001**, *39*, 2444-2453.
- [19] Veeman, W. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1984**, *16*, 193-235.

Capítulo 6 - Resultados Experimentais II: Estudo de movimentos lentos em nanocompostos orgânico-inorgânicos e em hidrogéis protéicos por RMN de Exchange

Nos capítulos anteriores novas técnicas de RMN de *exchange* foram apresentadas, as quais permitem o estudo de sistemas química e morfologicamente mais complexos que os até então estudados pelas técnicas convencionais. Deste modo, neste capítulo serão apresentados alguns estudos dos movimentos lentos em alguns desses sistemas. Inicialmente, será apresentado um estudo da dinâmica lenta das cadeias poliméricas em nanocompostos siloxano/(polietileno glicol), denominados ormolitas. Nestes sistemas, a análise da forma de linha, a técnica *Exchange* 2D e a técnica PUREX 1D, foram aplicadas em conjunto de modo a obter informações sobre a heterogeneidade do movimento lento provocado pela presença das estruturas inorgânicas. Em uma segunda parte será apresentada a aplicação da técnica ^{15}N -CODEX com detecção em ^{13}C na análise dos movimentos lentos em um hidrogel protéico. Estes estudos permitiram confirmar o modelo estrutural deste material, além de obter importantes informações sobre as características do movimento molecular lento nestes sistemas.

6.1 - Estudo da dinâmica das cadeias poliméricas em torno da transição vítrea em nanocompostos siloxano/(polietileno glicol) por RMN de Exchange em ^{13}C .

Nanocompostos siloxano/(polietileno glicol), denominados ormolitas, são híbridos orgânico-inorgânicos, onde a parte orgânica é constituída pelo polímero poli(etileno glicol) (PEG) e a parte inorgânica por estruturas de siloxano. Uma das principais utilidades deste composto é que eles apresentam alta condutividade iônica quando dopados com Li. Esta condutividade é atribuída ao movimento do íon Li^+ , o qual é assistido pelos movimentos das cadeias poliméricas do PEG. Por esta razão, é importante aplicar técnicas de RMN de *Exchange* em estado sólido para investigar a dinâmica dos segmentos moleculares do PEG nas ormolitas.

Existe uma classes de híbridos (Tipo II) onde as cadeias de poli(etileno glicol) (PEG) são ligadas covalentemente em ambas extremidades às nanoestruturas de sílica. A condutividade iônica à temperatura ambiente deste tipo de híbrido é da ordem de $\sim 10^{-6}$

S/cm e, devido à presença da ligação covalente entre as fases orgânica e inorgânica, estes híbridos possuem melhor estabilidade química e mecânica que eletrólitos poliméricos sem sílica. Outro tipo de ormolitas são nanocompostos Siloxano/PEG que apresentam somente ligações físicas (pontes de hidrogênio) entre as fases inorgânica e orgânica (Tipo I). Estes materiais possuem melhor condutividade à temperatura ambiente ($\sim 10^{-4}$ S/cm), mas muito menor estabilidade química.

6.1.1 - Materiais e Métodos.

6.1.1.1 - Descrição das amostras.

As amostras utilizadas neste trabalho foram preparadas no Departamento de química da UNESP de Araraquara pelo Dr. Karim Dahmouche. Os métodos de síntese deste materiais podem ser encontrados na referências 1, para o Tipo I, e 2 e 3, para o Tipo II. A seguinte nomenclatura será usada para descrever os nanocompostos: $[X]_n-Z$, onde X representa a porcentagem em massa de polímero, n o grau de polimerização, aproximadamente o número médio de monômeros que formam a cadeia polimérica, e Z igual a I e II, indica, respectivamente, o tipo de ormolita, não-ligada e quimicamente ligada. Para entender o efeito do tamanho da cadeia e da morfologia dos nanocompostos na dinâmica do polímero, as seguintes amostras foram preparadas, $[50]_{14-I}$, $[66]_{11-II}$, $[50]_{45-I}$, and $[88]_{45-II}$. A porcentagem de polímero nas amostras ligadas depende do peso molecular do PEG utilizado. Já para as amostras não-ligadas a porcentagem de polímero foi mantida em 50% para minimizar o número de cadeias livres na ormolita. Dentro das possibilidades experimentais envolvidas na preparação, tentou-se manter constante a porcentagem de polímero e variar o tamanho da cadeia para cada tipo de híbrido. O objetivo deste procedimento foi a obtenção de amostras com quantidades similares de polímero e tamanho de cadeias bem diferentes, já que um dos objetivos é estudar o efeito do tamanho das cadeias poliméricas na dinâmica do polímero. Na Figura 6.1 está mostrado um

desenho esquemático das amostras estudadas. É interessante observar que a constituição química dos polímeros utilizados é ligeiramente diferente. Nas amostras do Tipo I, o polímero presente é o PEG não modificado $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$, o qual interage com o siloxano somente através de ligações físicas fracas. Já para as amostras do Tipo II, um PEG com grupos NH_2 no final da cadeia é utilizado de modo que, após a reação para a formação da ormolita, um composto do tipo Siloxano-NHCONH- $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ -NHCONH-Siloxano é formado.

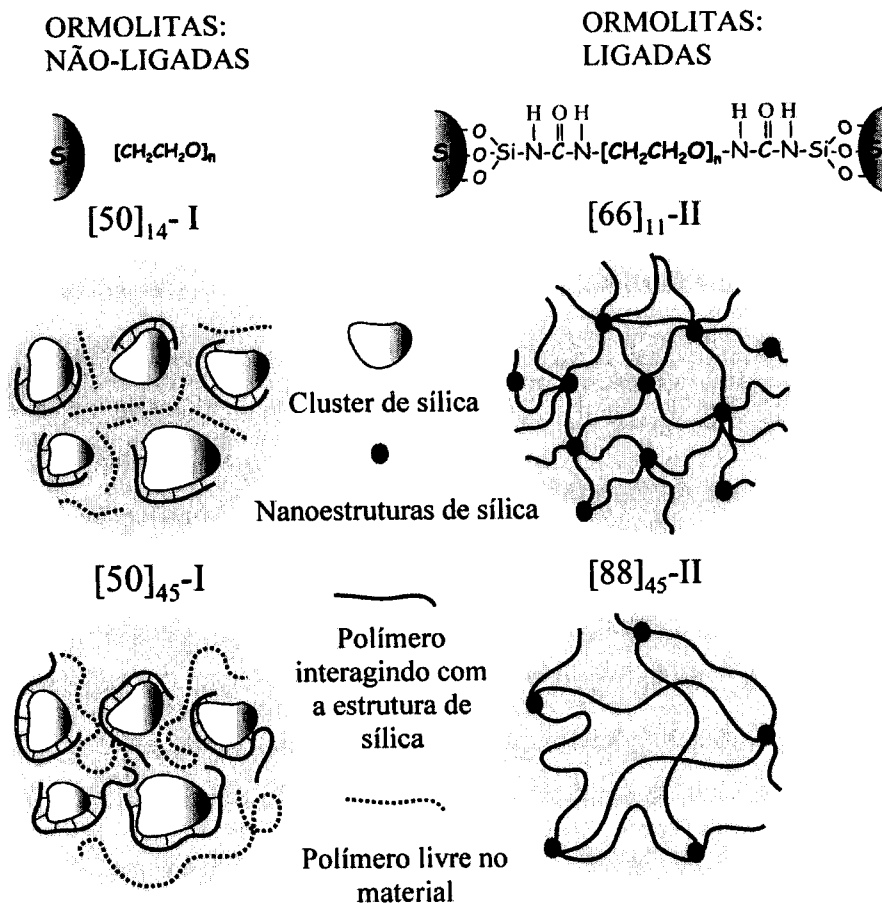


Figura 6.1 - Desenho esquemático da estrutura das ormolitas do tipo I e II com diferentes porcentagens de polímeros.

6.1.1.2 - Parâmetros Experimentais.

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro VARIAN INOVA com frequência de ^{13}C de 100 MHz localizado no Instituto de Física de São Carlos. Foi utilizada

uma sonda de dupla ressonância DOTY com bobina de 10 mm equipada com sistema de variação de temperatura. Pulsos de 90° com durações de 3,8 e 4,5 μs foram utilizados para ^{13}C e ^1H , respectivamente. A amplitude do campo de desacoplamento de ^1H utilizado foi de aproximadamente 65 kHz. Tempo de polarização cruzada de 1,5 ms, e tempos de repetição de 10 s e 30 s foram utilizados para as amostras ligadas e não-ligadas, respectivamente. Nos experimentos *Exchange* 2D, 64 e 128 incrementos em t_1 foram adquiridos utilizando um total de 32 aquisições por t_1 . Os tempos de mistura utilizados em todos os experimentos de *exchange* foram de 200 ms. A transformada de Fourier bidimensional foi realizada utilizando o método *States*. Os experimentos PUREX 1D foram realizados utilizando tempos de mistura de 0,1 a 1s e valores de τ entre 20 e 1500 μs .

6.1.2 - Análise da Forma e Largura de Linha de ^{13}C .

De forma complementar as técnicas de *Exchange*, a análise da evolução da forma de linha dos espectros de ^{13}C como função da temperatura provê informações sobre a dinâmica da cadeia polimérica na escala de tempo de μs a ms. A mudança na forma de linha com a temperatura acontece basicamente devida à promediação da anisotropia de deslocamento químico, CSA, pelo movimento molecular. No entanto, para se obter informações quantitativas sobre tais movimentos é necessário simular os espectros sob a ação dos mesmos. Esta simulação também pode ser feita utilizando o formalismo da matriz de *exchange* discutido no capítulo 2. Na ausência de movimento molecular e desprezando os efeitos da relaxação transversal, o sinal de RMN em função do tempo, $S(t)$, após a excitação por um pulso de 90° ou por uma seqüência de polarização cruzada, pode ser calculado utilizando a expressão $S(t) = M_0 e^{i\omega t}$ e tomando-se a média sobre todas as possíveis orientações dos segmentos moleculares. De maneira análoga, sob a ação do movimento o mesmo procedimento pode ser utilizado, mas deve-se acrescentar o termo de *exchange* entre os vários sítios acessíveis, já que as reorientações moleculares ocorrem simultaneamente com a evolução da magnetização durante a detecção. O sinal de RMN sob a ação de movimentos moleculares pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\tilde{S}(t) = \langle M_0 e^{(\tilde{\Gamma} + i\tilde{\omega})t} \rangle \quad (6.1)$$

onde M_0 representa a magnetização transversal gerada logo após a excitação e $\langle \rangle$ representa a média sobre todas as possíveis orientações dos segmentos. O resultado da

transformada de Fourier da expressão 6.1 é o espectro de pó resultante sob a ação do movimento molecular.

Na figura 6.2 está mostrado um conjunto de espectros de pó como função da temperatura e as respectivas simulações para as amostras [88]₄₅-II. À temperatura ambiente duas linhas isotrópicas são observadas, sendo que a menos intensa à direita pode ser atribuída aos núcleos de ¹³C de grupos químicos que se encontram próximos ao grupo ligante NHCONH, já que esta linha apresenta deslocamento químico isotrópico típico de núcleos de ¹³C diretamente ligados ou espacialmente próximos de núcleos de ¹⁴N. Já a linha mais intensa, em torno de 65 ppm, é típica do PEG e portanto pode ser atribuída a segmentos mais afastados e que não sentem a influência do grupo ligante. Em temperaturas muito baixas, no regime de rede rígida ($T < 75^\circ\text{C}$), um padrão de pó de ¹³C típico é observado ($\sigma_{xx} = 93$ ppm, $\sigma_{yy} = 82$ ppm, $\sigma_{zz} = 33$ ppm, para a linha principal). Com o aumento da temperatura, a taxa de movimento dos segmentos moleculares, $k = 1/(2\tau_c)$, fica comparável a anisotropia de deslocamento químico, $\Delta\sigma = |\sigma_{xx} - \sigma_{zz}| = 60$ ppm ≈ 6 kHz, produzindo uma distorção no espectro de pó. Acima desta temperatura, o movimento molecular fica ainda mais rápido, fazendo com que a interação de deslocamento químico seja parcialmente promediada e resultando em linhas alargadas. Finalmente, à temperatura ambiente, duas linhas isotrópicas são observadas.

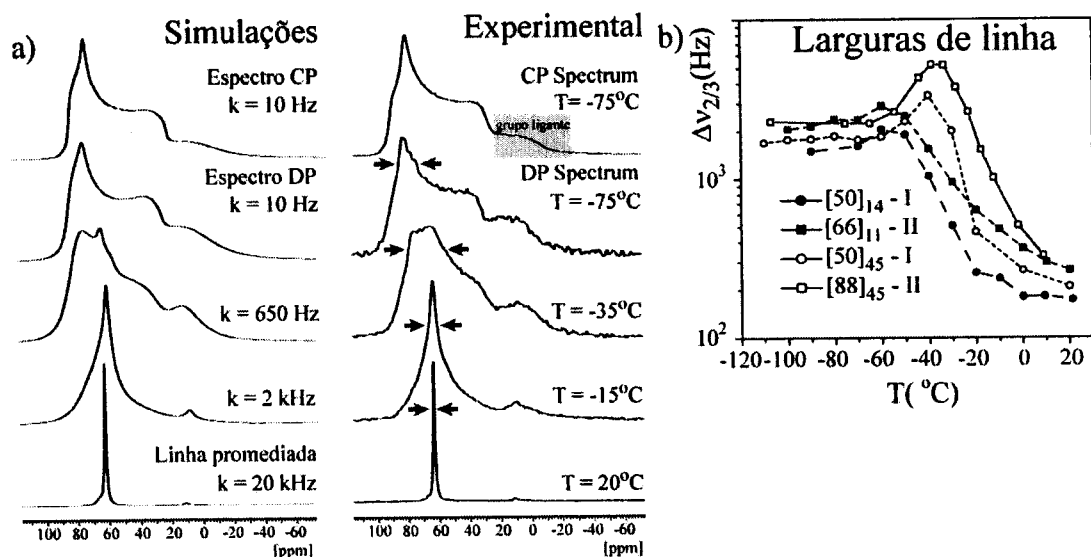


Figura 6.2 - Largura e forma de linha com função da temperatura. a) formas de linha experimentais e correspondentes simulações para a amostra [88]₄₅-II. b) Larguras de linha versus temperatura para todas as amostras.

Através da simulação dos espectros de ¹³C como função da temperatura utilizando a equação 6.1 e da comparação dos resultados com os espectros experimentais é possível

determinar o tempo de correlação médio do movimento molecular como função da temperatura, tal como indicado na figura. No entanto, para realizar tais simulações é necessário fazer uma estimativa prévia da geometria do movimento molecular em altas temperaturas.

Analisando o espectro obtido à temperatura ambiente, pode ser observado que as linhas são essencialmente isotrópicas o que indica que o movimento molecular promedia totalmente a interação de deslocamento químico, de modo que $\bar{\delta} = 0$. De acordo com as referências 4, 5 e 6, para $\eta = 0$, essa promediação total acontece para qualquer tipo de movimento isotrópico ou para reorientações discretas entre sítios onde as possíveis orientações de σ_{zz} estão dispostas regularmente em um cone com abertura igual a $54,7^\circ$ de acordo com a figura 6.3a. No caso de $\eta \neq 0$, movimentos isotrópicos continuam promediando totalmente o CSA, porém, para considerar tais movimentos, além de simular a rotação isotrópica de σ_{zz} , o que significa considerar pelo menos 180 orientações possíveis, deve-se considerar rotações em torno do eixo z do sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico, já que σ_{yy} e σ_{xx} não são equivalentes neste caso. Isto levaria a um tempo de cálculo demasiadamente longo. Como o interesse maior nesta análise diz respeito às taxas do movimento molecular, é vantajoso considerar um conjunto de reorientações discretas que produzem a promediação total do CSA no regime de movimentos rápidos no caso de $\eta \neq 0$. Este conjunto de orientações pode ser obtido considerando que para cada uma das orientações de σ_{zz} no cone da Figura 6.3a, σ_{yy} e σ_{xx} estejam distribuídos simetricamente em torno deste eixo, resultando nas orientações mostradas na Figura 6.3b. Isto resulta em um processo envolvendo apenas 9 sítios. Em todos os casos considerou-se a probabilidade de ocupação igual para todos os sítios.

Na discussão anterior ficou claro que não é possível determinar com precisão a geometria do movimento molecular somente através da análise da forma de linha, uma vez que diferentes geometrias podem levar a resultados idênticos. No entanto, esta análise provê uma boa estimativa das taxa de movimento em função da temperatura e, se utilizada em conjunto com técnicas de *exchange*, pode ser uma ferramenta valiosa na análise do movimento molecular.

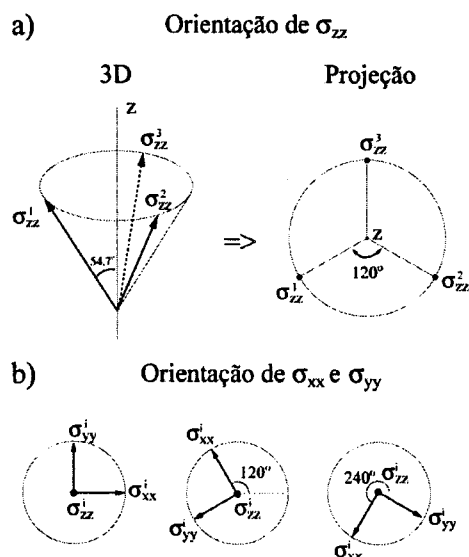


Figura 6.3 - Orientações dos sítios acessíveis ao movimento molecular utilizadas nas simulações das formas de linha como função da temperatura para as ormolitas. Os valores principais do CSA estão indicados no texto. a) orientações de σ_{zz} e b) orientações de σ_{xx} e σ_{yy} .

As simulações dos espectros para a amostra [88]_{45-II} em diferentes temperaturas utilizando a geometria discutida anteriormente e os espectros experimentais estão mostradas na Figura 6.2. Através da comparação dos espectros experimental e calculado a taxa média do movimento molecular, k e, conseqüentemente, o tempo de correlação correspondente são obtidos diretamente. Uma outra informação que pode ser obtida a partir de espectros do tipo mostrado na Figura 6.2 é a temperatura em torno da qual o movimento molecular atinge o regime de movimentos lentos, isto é, a faixa de temperatura em que o experimento de *exchange* deve ser realizado. Quando a taxa do movimento molecular varia de kHz para Hz a distorção no espectro desaparece, dando origem ao espectro de pó típico. Deste modo, observando o espectro de pó como função da temperatura é possível estimar a temperatura onde o movimento é lento o suficiente para ser detectável nos experimentos de *exchange*. De fato, uma maneira mais simples de determinar tais temperaturas é através da largura de linha do espectro à 2/3 da altura máxima, $\Delta\nu_{2/3}$. Como pode ser observado na Figura 6.2b para altas temperaturas, uma linha estreita é obtida e, à medida que a temperatura diminui, observa-se um alargamento da linha até que a mesma atinja um máximo, que ocorre quando o espectro de pó distorcido é observado. À partir desta temperatura observa-se um estreitamento da linha até que a largura de rede rígida seja atingida, indicando que o movimento molecular está ocorrendo na escala de tempo de ms. Portanto, a faixa de temperatura onde o movimento molecular poderá ser observado por RMN de *exchange* está localizada em temperaturas

imediatamente abaixo do máximo observado nas curvas de $\Delta\nu_{2/3}$ versus T. Na Figura 6.2b, estão mostradas essas curvas para todas as amostras estudadas neste trabalho. As temperaturas utilizadas nos experimentos de *exchange* para as amostras [50]₁₄-I, [66]₁₁-II, [50]₄₅-I e [88]₄₅-II foram - 65 °C, -90 °C, - 60 °C e - 55 °C, respectivamente.

6.1.3 - Escala de tempo do movimento molecular lento utilizando RMN de Exchange.

A escala de tempo do movimento das cadeias poliméricas foi determinado utilizando experimentos PUREX 1D.

Na figura 6.4 estão mostradas as intensidades $E(t_m\delta\tau)$ como função de t_m para todas as amostras nas temperaturas indicadas na seção anterior. Estes experimentos foram realizados com tempos de evolução tal que $\delta\tau \gg 1$. Deste modo, todos os segmentos moleculares movendo-se na escala de tempo de 10 μ s a 1 s contribuirão para a curva. A não-exponencialidade da curva confirma que o movimento molecular ocorre com uma distribuição de tempos de correlação. De fato, essas curvas foram ajustadas utilizando funções KWW e os fatores β indicam a presença de distribuições de tempos de correlação. Nestes materiais é conhecido que presença da sílica inibe o aparecimento de cristalinidade no PEG^{7,8}. Isto implica que, conforme a discussão feita nas seções anteriores, se a distribuição dos tempos de correlação fosse menor que uma década, E_∞ seria aproximadamente igual a 1. De fato, os valores de E_∞ inferiores a 0,35, observados na figura, sugerem uma distribuição de tempos de correlação maior que 3,0 décadas por unidade de tempo. A presença de distribuições de tempos de correlação pode ser relacionada à heterogeneidades do sistema. No entanto, não é possível afirmar sem ambigüidades que tais heterogeneidades são provenientes da interação das cadeias poliméricas com as estruturas de sílica. De fato, a presença de distribuições de tempos de correlação nos movimentos moleculares responsáveis pela transição vítrea de polímeros e outros sistemas vítreos é um fenômeno geral que acontece mesmo em homo-polímeros como por exemplo o polipropileno atático⁹. Desta forma, somente através dessa distribuição de tempos de correlação não é possível obter informações precisas sobre o efeito das nanoestruturas de sílica no movimento da cadeia polimérica. Isto torna fundamental a análise da amplitude do movimento molecular utilizando RMN de *Exchange*.

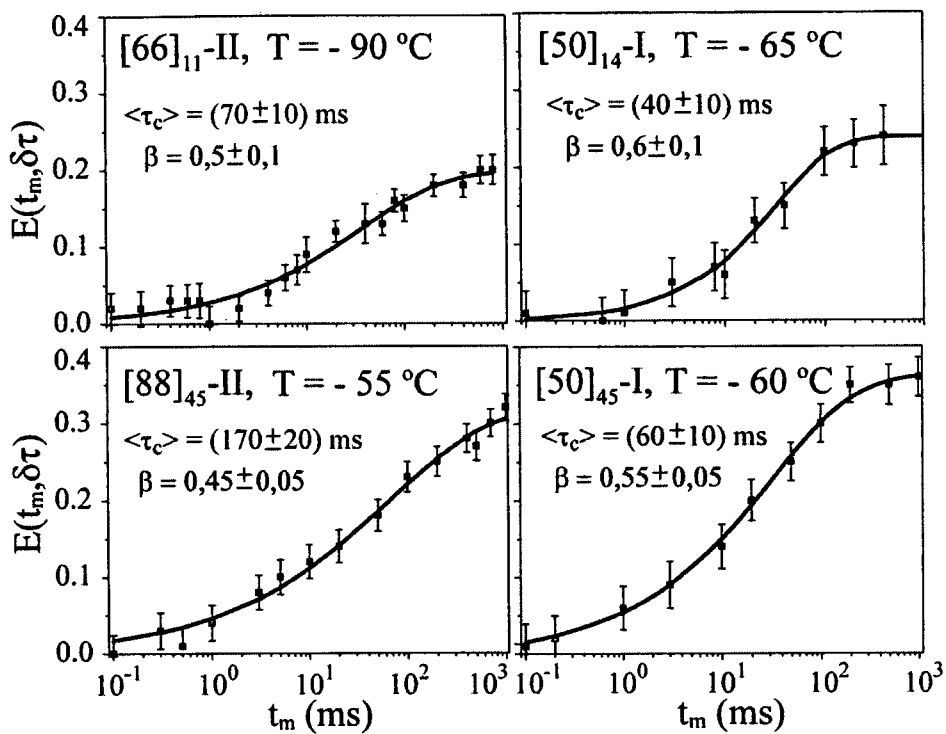


Figura 6.4 - Curvas de $E(t_m, \delta\tau)$ versus t_m para as amostras estudadas. Os tempos de correlação médios bem como os parâmetros β provenientes do ajuste por curvas KWW estão indicados na figura.

6.1.4 - Amplitude do movimento molecular lento utilizando RMN de Exchange.

A amplitude do movimento lento das cadeias poliméricas nas ormolitas foi estudada utilizando as técnicas de *Exchange* 2D e PUREX 1D.

Na figura 6.5 estão mostrados os espectros *Exchange* 2D para as ormolitas ligadas, [88]₄₅-II e [66]₁₁-II. O espectro da amostra [88]₄₅-II é constituído pela superposição de um padrão diagonal e outro fora da diagonal típico de movimentos isotrópicos. Um detalhe interessante é que na região espectral que corresponde aos núcleos de ¹³C próximos aos grupos ligantes (-10 a 25 ppm) o espectro é puramente diagonal. Isto é uma prova de que o movimento dos segmentos próximos à estrutura de sílica é altamente restringido pela ligação covalente, enquanto que muitos dos segmentos mais afastados da ligação se comportam como cadeias amorfas livres. Além disso, uma contribuição diagonal para o espectro é observada mesmo na região correspondente aos segmentos mais afastados do grupo ligante. Isto indica que muitos dos segmentos mais afastados da estrutura de sílica ainda sofrem alguma restrição em seu movimento. De fato, a presença de tal diagonal tanto pode indicar que alguns segmentos se movem mais lentamente que a escala de tempo do experimento de *exchange* quanto pode ser atribuída a segmentos executando reorientações

por pequenos ângulos, que dão origem a um padrão quase diagonal. Para obter uma informação mais precisa sobre a contribuição de movimentos de pequenos ângulos para o padrão de *exchange* observado, a curva da intensidade PUREX 1D (para a região de 70 a 90 ppm) versus τ foi obtida para esta amostra e está mostrada na Figura 6.5b. A curva tem claramente um caráter bimodal, sendo o crescimento rápido inicial associado a movimentos de grande amplitude e o crescimento lento, para maiores valores de τ , correspondente a movimentos de pequena amplitude. Para simular esses movimentos de pequena amplitude foram consideradas, por simplicidade, rotações em torno da ligação C-C do PEG, com ângulos de rotação distribuídos de acordo com uma função gaussiana com desvio padrão, σ , indicado na figura. As orientações dos eixos principais dos tensores foram obtidas das referências ^{10,11}. A simulação dos movimentos isotrópicos foi realizada utilizando o modelo de Difusão Reorientacional Isotrópica^{5,12,13} com distribuição de tempos de correlação e tempo de correlação médio obtidos das curvas de $E(t_m\delta\tau)$ versus t_m . As porcentagens de cada componente utilizadas nas simulações estão mostradas na figura, porém não devem ser tomadas como valores absolutos, pois em todas simulações não se levou em conta movimentos no regime intermediário, o que naturalmente provoca uma diminuição no valor de E_∞ , tal como discutido anteriormente.

Portanto, estes resultados indicam que o movimento lento das cadeias do PEG nas ormolitas ligadas é bastante heterogêneo. Enquanto os segmentos moleculares que não interagem, ou interagem fracamente, com as nanoestruturas de sílica executam movimentos isotrópicos, os grupos localizados nas proximidades dessas estruturas são rígidos na escala de tempo de ms. Esta hipótese é corroborada pelas medidas realizadas na amostra [66]_{11-II}, onde se observa um padrão quase diagonal em toda a região espectral. Similarmente, a curva de $E(t_m\delta\tau)$ versus τ para essa amostra pode ser descrita como quase todos os segmentos móveis executando movimentos de pequena amplitude. Isto mostra que em cadeias menores o movimento de praticamente todos os segmentos da cadeia polimérica é restringido pela presença da estrutura de sílica. Uma vez que para todas as amostras os espectros à temperatura ambiente são linhas isotrópicas, indicando a presença de movimentos de grande amplitude em todos os segmentos da cadeia polimérica, pode-se concluir que a transição de movimentos lentos para rápidos não envolve somente uma diminuição nos tempos de correlação, mas também um aumento na amplitude das reorientações moleculares e no número de segmentos que as executam. Isto ilustra uma

vantagem intrínseca de se analisar as heterogeneidades do movimento no regime lento, pois as mesmas são, de certa forma, evidenciadas.

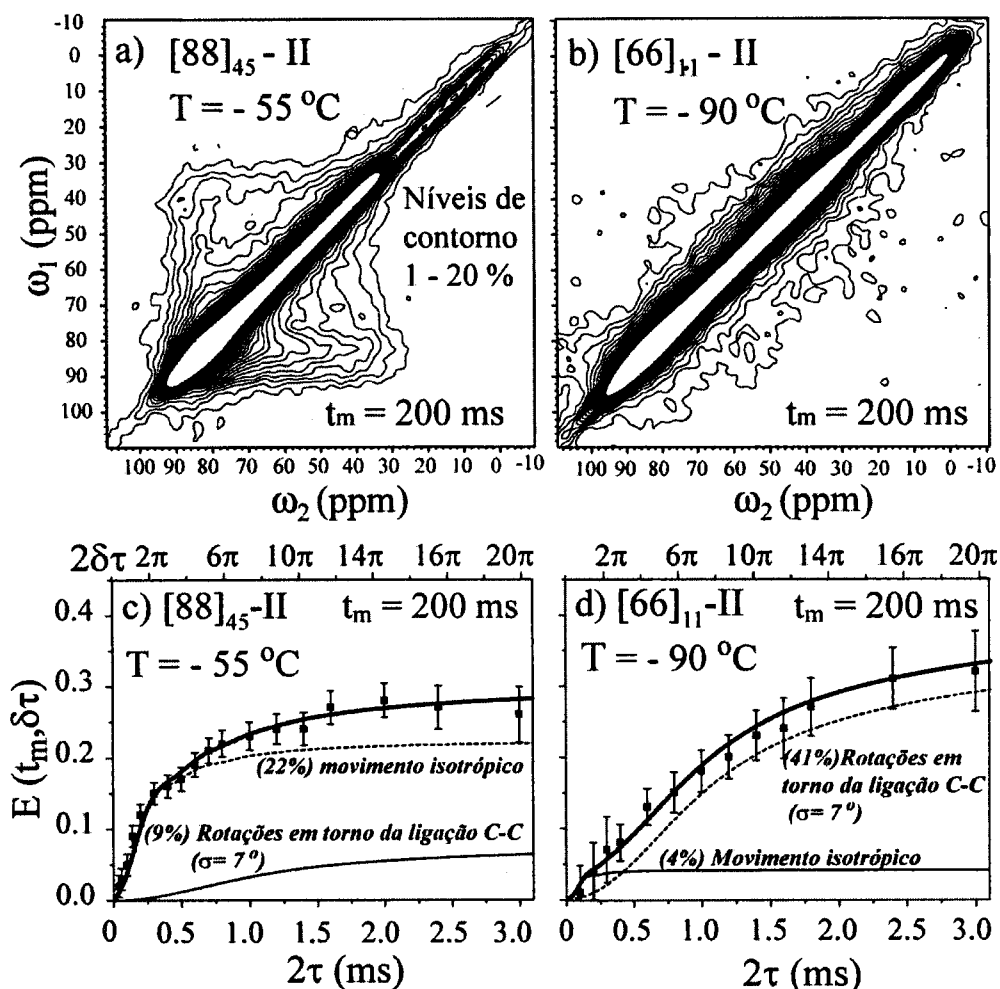


Figura 6.5 - Amplitude do movimento estudada por RMN de exchange em amostras de ormolitas ligadas. a) 2D exchange para a amostra $[80]_{11}$ -II. B) 2D exchange para a amostra $[80]_{45}$ -II. $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para a amostra $[80]_{11}$ -II. $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para a amostra $[80]_{45}$ -II.

Na figura 6.6 estão mostrados os resultados obtidos para os híbridos $[50]_{45}$ -I e $[50]_{14}$ -I. Para a amostra $[50]_{45}$ -I o espectro *Exchange* 2D mostra que uma grande parte dos segmentos moleculares do polímero executam movimento isotrópico. De fato, quando comparado com o espectro *Exchange* 2D da amostra $[88]_{45}$ -I, nota-se que neste caso um número maior de segmentos moleculares participam do movimento isotrópico, o que é observado através do da presença de um maior número de linhas de contorno. Assim como no caso das amostras ligadas, uma diagonal também pode ser observada, o que novamente pode ser atribuído a segmentos movendo-se fora da escala de tempos de segundos ou segmentos efetuando movimentos de pequena amplitude. Isto também é confirmado pelo gráfico de $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ nesta amostra. No caso da amostra $[50]_{14}$ -I, um resultado

semelhante foi obtido, porém com uma menor porcentagem de segmentos executando movimentos de grande amplitude. Isto está de acordo com o modelo estrutural desses materiais, pois espera-se que o movimento das cadeias que fazem pontes de hidrogênio com a sílica seja mais restrito o que pode ser atribuído como a parte imóvel observada nestes experimentos. Por outro lado, existirão cadeias que não interagem com a estrutura de sílica e estas podem mover-se livremente.

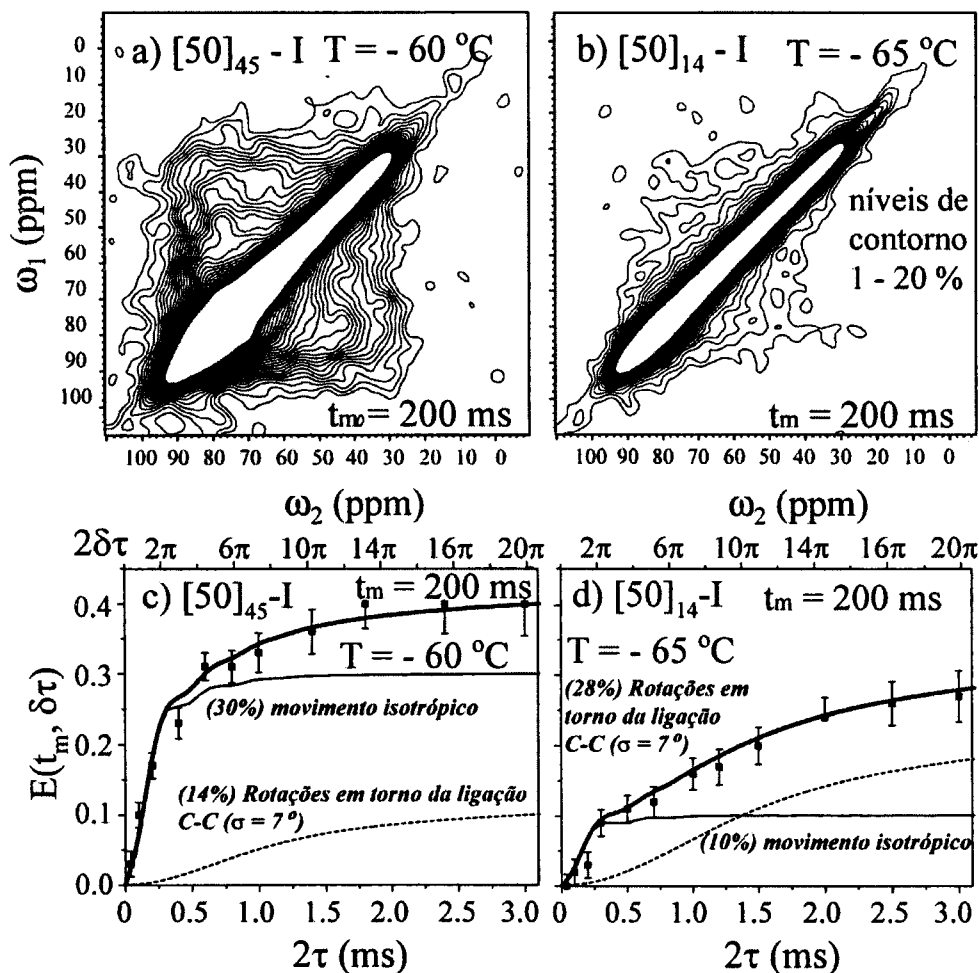


Figura 6.6 - Amplitude do movimento estudada por RMN de exchange em amostras de ormolitas não ligadas. a) 2D exchange para a amostra $[50]_{14}$ -I. B) 2D exchange para a amostra $[50]_{45}$ -I. $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para a amostra $[50]_{14}$ -I. $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ para a amostra $[50]_{45}$ -I.

Portanto, embora os dois tipos de ormolitas sejam estruturalmente muito distintas, verifica-se uma grande semelhança em termos das heterogeneidades dinâmicas. De fato, a observação de que nas amostras não-ligadas o movimento da cadeia é menos afetado pela presença da sílica está plenamente de acordo com o fato de tais amostras possuírem melhor condutividade iônica, pois a mobilidade do portador é assistida pelos movimentos da cadeia polimérica. De fato, um estudo mais detalhado sobre os movimentos moleculares

lentos em amostras contendo Li deverão ser realizados brevemente. Além disso, a utilização de técnica de MAS *exchange*, tais como CODEX e 4t-CODEX também será bastante útil no que diz respeito a obtenção de maiores detalhes sobre os movimentos moleculares lentos, neste materiais.

6.2 - Estrutura dinâmica de um hidrogel protéico: Um estudo por RMN de Estado Sólido.

Hidrogéis termoreversíveis são materiais importantes por causa de suas aplicações em engenharia de tecidos¹⁴⁻¹⁶. Hidrogéis protéicos artificiais são particularmente interessantes pois eles podem combinar propriedades de materiais e funcionalidade biológica¹⁷. Com o objetivo de melhorar o controle das propriedades macroscópicas de hidrogéis termoreversíveis, um entendimento detalhado de sua estrutura molecular e dinâmica se faz necessário.

Uma característica comum de géis é a coexistência de segmentos rígidos, que se associam para formar pontos de junção entre cadeias e segmentos flexíveis que permitem a expansão e previnem a precipitação no solvente dos segmentos rígidos que compõe a rede do hidrogel^{18,19}. Estas características sugeriram o modelo básico de formação de géis protéicos projetados geneticamente com múltiplos domínios. O tipo de proteína estudada aqui, designada ACA, contém dois domínios terminais formados por unidades repetidas seguindo um motivo estrutural zíper de leucina, figura 6.7, que envolvem um domínio central constituído pelo polieletrólito, [(AG)₃PEG]₁₀. Onde A = alanina, G = glicina, P = prolina e E ou Glu = ácido glutamínico ou glutamato. Esses géis são reversíveis sob condições adequadas de temperatura e pH. O zíper de Leucina tem uma periodicidade de sete aminoácidos denominados *abcdefg*, tal como mostrado na figura, 6.7. Aminoácidos hidrofóbicos, tais como, serina (Ser ou S), valina (Val ou V), leucina (Leu ou L) e alanina (Ala ou A), ocupam as posições *a* e *d*, com a posição *d* sendo preponderantemente leucina. Aminoácidos carregados, tal como glutamato (Glu ou E), ocupam as posições *e* e *g*. Na formação das hélices, os resíduos hidrofóbicos ficam localizadas de um mesmo lado da hélice, de modo que a interação hidrofóbica promove a associação das hélices formando cadeias enoveladas ou aglomerados helicoidais.

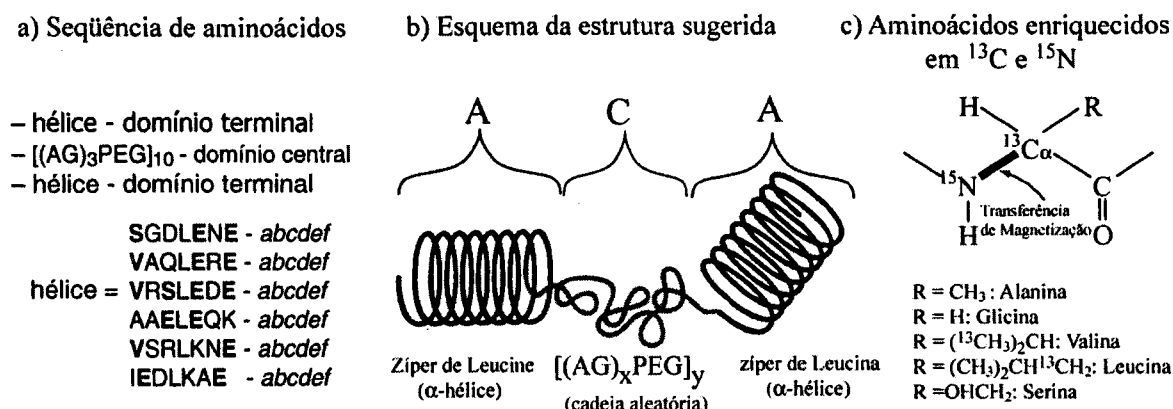


Figura 6.7 - Proteína ACA utilizada neste estudo. a) Seqüência de aminoácidos. Os aminoácidos em **negrito** foram utilizados como sonda para o estudo do movimento molecular nos experimentos CODEX. b) Esquema da estrutura da proteínas. Os zíperes de leucina (α-hélices) flanqueiam o domínio central [(AG)₃PEG]₁₀. c) Estrutura geral dos aminoácidos indicando os sítios enriquecidos em ¹³C e ¹⁵N.

As propriedades físicas macroscópicas deste tipo de hidrogel protéico foram caracterizadas pela técnica denominada 'Diffusing wave spectroscopy' (DWS)¹⁷. Nesta técnica, a função de auto-correlação da luz espalhada em aglomerados de poliestireno sulfonado, distribuídos no interior do gel, é medida e então obtém-se o deslocamento quadrático médio $\langle r(t)^2 \rangle$ dessas partículas. Resultados característicos de géis viscoelásticos foram encontrados para pH's entre 8,0 e 9,5. Baseado nesses experimentos e em experimentos de espectroscopia de fluorescência, foi proposto que a formação do gel a partir da proteína ACA ocorre como um resultado do balanço entre a oligomerização dos domínios helicoidais e da expansão do domínio central¹⁷. Em pH's baixos, resíduos ácidos como o glutamato (Glu) são protonados, estabilizando os três domínios. Sem a tendência para expandir, as cadeias polipeptídicas se agregam e precipitam na solução. Para pH's quase neutros, os resíduos de glutamato tornam-se desprotonados e carregados negativamente, fazendo com que o domínio central, que é rico em glutamato, se expanda enquanto que as estruturas helicoidais são mantidas, formando então o gel. Para pH's muito altos, os zíperes de leucina são desestabilizados pela alta concentração de cargas formando um líquido viscoso.

O experimentos de DWS e de fluorescência usam moléculas-sonda para se obter informação sobre a dinâmica do hidrogel protéico. Estas sondas moleculares podem perturbar a rede natural do gel, além de não proverem informação direta sobre a dinâmica das cadeias polipeptídicas, pois o que se obtém é a dinâmica dentro na matriz do gel. RMN em estado sólido é uma metodologia poderosa que pode examinar diretamente as

cadeias polipeptídicas que formam a rede do gel. Rotação da amostra em torno do ângulo mágico pode ser aplicada tanto para segmentos rígidos como para parcialmente móveis para obter informações sobre a estrutura e dinâmica molecular. É conveniente salientar que mesmo que se utilize enriquecimento da amostra em ^{13}C , como é quase sempre necessário em RMN de proteínas em estado sólido, esta 'sonda' de RMN faz parte da cadeia polipeptídica, fazendo com que a informação sobre a dinâmica molecular dessa cadeias seja direta. Deste modo, serão apresentadas aqui evidências que suportam o modelo de formação do gel, além de um estudo mais detalhado sobre os movimentos moleculares lentos que acontecem nas regiões de hélice do hidrogel.

6.2.1 - Materiais e Métodos.

6.2.1.1 - Preparação das amostras para estudos de RMN.

As amostras estudadas neste trabalho foram preparadas no grupo do Prof. Tomas Russel no *Dept. of Polymer Science and Engineering* pelo Dr. Scott B. Kennedy. A descrição dos métodos utilizados para a preparação das proteínas podem ser encontradas com detalhes na referência²⁰. Uma vez que esses materiais estudados possuem um número enorme de aminoácidos e portanto inúmeros sítios de ^{13}C , é impossível se obter um espectro de alta resolução em ^{13}C para essas proteínas sem o enriquecimento seletivo de ^{13}C de alguns sítios. Deste modo, na preparação da amostra foi utilizado um método de enriquecimento desenvolvido recentemente²¹ onde somente alguns sítios específicos de carbono são marcados com ^{13}C . Neste esquema de enriquecimento, denominado TEASE (do inglês *Ten amino Acid Selective and Extensive*), somente os aminoácidos Glicina(Gly), Alanina(Ala), Valina(Val), Leucina(Leu), Serina(Ser), Tirosina(Tyr), Triptofano(Trp), Fenilamina(Phe), Histidina(His) e Cisteína(Cis) são enriquecidos. Além disso, geralmente, somente os carbonos α e β , ver Figura 6.7c, são marcados quando o método é utilizado. Uma vez que na proteína estudada somente os cinco primeiros aminoácidos estão presentes, a utilização do método TEASE leva ao enriquecimentos em ^{13}C dos seguintes sítios de carbono na proteína ACA: Ala(C_α), Gly(C_α), Val(C_α , C_β), Leu(C_α , C_β , C_γ) e Ser(C_α). Além deste enriquecimento seletivo em ^{13}C , todos os aminoácidos utilizados na preparação da proteína são marcados com ^{15}N , uma vez que em RMN de ^{13}C em proteínas

é necessário evitar a presença de núcleos de ^{14}N , os quais provocam desdobramentos das linhas de ^{13}C .

As amostras enriquecidas seletiva e extensivamente em ^{13}C e uniformemente em ^{15}N foram recebidas para os estudos de RMN na forma de um pó seco. Após a acomodação deste pó no rotor de 4 mm, foi feita a hidratação com água destilada com pH aproximadamente neutro. A hidratação variou de 30% a 50% em massa. O rotor contendo a amostra foi sujeito a diversos ciclos de aquecimento e resfriamento para induzir a formação do gel. Os géis utilizados foram mais concentrados que os utilizados nos experimentos de DWS, pois uma maior diluição implicaria no aparecimento de movimentos de grande amplitude, interferindo com a polarização cruzada e reduzindo significativamente a sensibilidade dos experimentos.

6.2.1.2 - Parâmetros Experimentais.

Os experimentos de RMN foram realizados num campo magnético de 7.0 Tesla usando um espectrômetro BRUKER DSX300 com frequência de ^{13}C de 75 MHz, localizado no *Dept. of Polymer Science and Engineering* da Universidade de Massachusetts. Utilizou-se uma sonda BRUKER de dupla ressonância equipada com mecanismo de rotação em torno do ângulo mágico e rotores de 4 mm. O controle da velocidade e a sincronização dos pulsos de RF foi feita utilizando um controlador Bruker, que permite uma estabilidade na velocidade de rotação superior a 1 Hz. Parâmetros específicos como duração dos pulsos de RF, amplitude do campo de desacoplamento e temporização da seqüência serão apresentados individualmente em cada experimento. Pulsos de 90° de 4 μs e 5 μs foram utilizados para ^{13}C e ^{15}N , respectivamente. Campo de desacoplamento de ^1H de $\gamma B_1/2\pi = 90$ kHz e tempo de contato para polarização cruzada de 1,5 ms foram utilizados.

Os experimentos de correlação ^{13}C - ^{15}N utilizados na identificação das linhas no espectro de ^{13}C foram realizados utilizando uma seqüência de pulsos publicada anteriormente que transfere polarização entre ^{15}N e ^{13}C através de um esquema REDOR²¹⁻²³. Experimentos 2D de correlação ^{13}C - ^{13}C foram realizados utilizando a seqüência de pulsos padrão de difusão de spins entre núcleos de ^{13}C ²⁴. Em todos esses experimentos o procedimento States foi utilizado para se obter espectros com quadratura de fase em t_1 . Para o espectro ^{13}C - ^{15}N bidimensional, 224 aquisições foram utilizadas para cada ponto em

t_1 e 36 incrementos de 363,6 μ s foram coletados. A velocidade de rotação utilizada foi de 5,5 Hz. O máximo tempo de evolução para ^{15}N foi de 13 ms, correspondendo a uma resolução de 24 Hz. Nos espectros de correlação ^{13}C - ^{13}C foram utilizados 32 aquisições por t_1 e 180 incrementos de 60,6 μ s.

6.2.2 - Identificação das linhas no espectro de ^{13}C .

Antes de determinar os comportamentos dinâmicos dos vários domínios da proteína, é necessário identificar as linhas do espectro de ^{13}C . Como já mencionado, o método de enriquecimento TEASE proporciona o enriquecimento em ^{13}C dos seguintes sítios da proteína ACA: Ala(C_α), Gly(C_α), Val(C_α , C_β), Leu(C_α , C_β , C_γ) e Ser(C_α). Para identificar as linhas do espectro de ^{13}C mostrado na figura 6.8c, foram utilizados experimentos de correlação ^{13}C - ^{13}C e ^{15}N - ^{13}C . O espectros de correlação ^{13}C - ^{13}C 2D, Figura 6.8a, mostram dois picos cruzados na região alifática, os quais podem ser atribuídos, baseados em seus deslocamentos químicos, à correlação entre os carbonos C_α e C_β dos resíduos Va e Leu, respectivamente. A identificação dos picos dos resíduos Ser e Ala é menos óbvia devido à ausência de conectividades no espectro ^{13}C - ^{13}C 2D. Esta dificuldade foi superada utilizando o experimento de correlação bidimensional ^{15}N - ^{13}C , mostrado na figura 6.8b. O deslocamento químico isotrópico dos ^{15}N da Serina é aproximadamente 116 ppm, enquanto que da Ala é 112 ppm²⁵. Assim, o pico em 61 ppm foi atribuído à Ser(C_α) e o sinal em 54 ppm à Ala(C_α). O pico da Gly(C_α) foi facilmente identificado devido ao seu deslocamento químico particular em torno de 44 ppm. Múltiplos picos de Gly são observados no espectro de correlação ^{15}N - ^{13}C 2D, o que não é surpreendente, já que resíduos de glicina estão presentes em todos os três domínios da proteínas com diferentes conformações.

Além da identificação dos sinais de ^{13}C dos grupos enriquecidos no protocolo TEASE, é necessário assinalar os picos referentes aos resíduos glutamato e arginina (Arg), pois no esquema TEASE alguns desses resíduos podem ser marcados acidentalmente e devido à alta abundância dos mesmos na proteína (32 Glu e 11 Arg) podem dar contribuições significativas para o sinal observado. O pico em 58,5 ppm foi atribuído ao carbono Gly(C_α) devido ao pico cruzado observado no espectro ^{13}C - ^{13}C 2D. Este pico cruzado foi conferido à conectividade entre o grupo carbonil da leucina e o carbono alfa do glutamato (Leu(CO) – Glu(C_α)), já que existem oito pares Leu-Glu na proteína. O pico

correspondente no espectro ^{15}N - ^{13}C possui um deslocamento químico de ^{15}N de 119 ppm, que é consistente com o valor 120 ppm típico de resíduos Glu em proteínas. O pico em 56 ppm foi atribuído à Arg devido ao seu deslocamento químico característico e ao número de resíduos presentes. A identificação de todos os picos observados no espectro CP MAS está mostrada na figura 6.8c. Dois picos de Ala($\text{C}\alpha$) correspondentes a uma fração rígida (sólida, $\text{A}\alpha^{(s)}$) e móvel (líquida, $\text{A}\alpha^{(l)}$) da proteína estão mostrados e serão justificados a seguir.

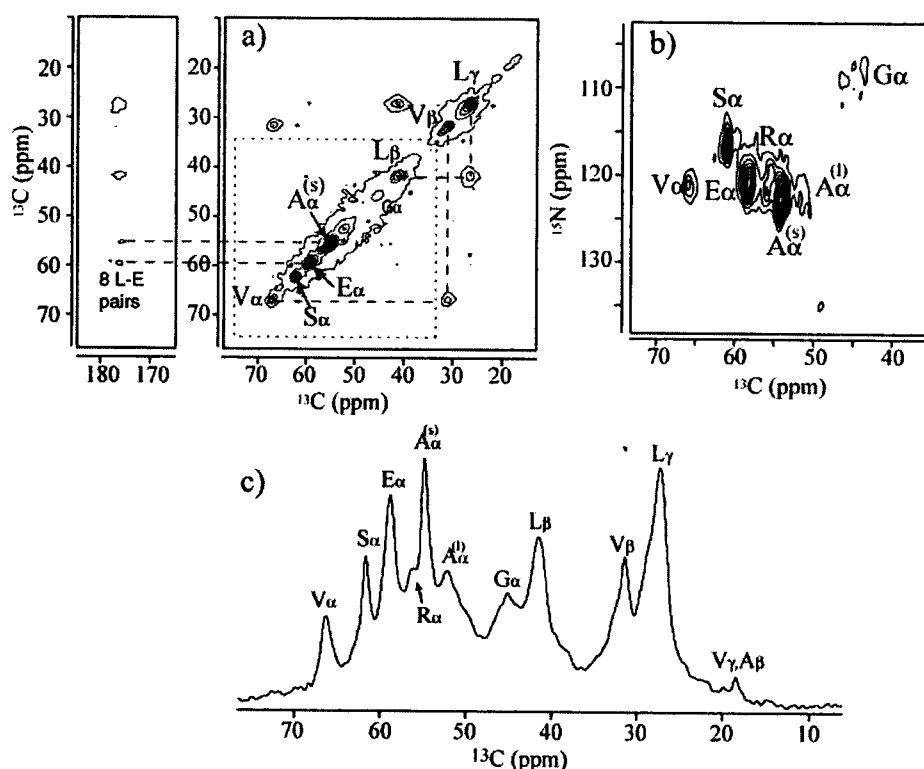


Figura 6.8 - Identificação do espectro de ^{13}C do hidrogel ACA enriquecido pelo método TEASE. a) Espectros de correlação ^{13}C - ^{13}C 2D. b) Espectros de correlação ^{15}N - ^{13}C 2D. c) Espectro de polarização cruzada com a identificação dos picos. Os sub-índices α , β e γ se referem a $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ e $\text{C}\gamma$.

6.2.3 - Movimentos Rápidos nos domínios centrais do hidrogel ACA.

No modelo de formação do gel à partir da proteína ACA foi postulado que o domínio central é flexível e constituído por cadeias aleatórias, enquanto que os domínios terminais servem como agentes de intercrossamento. Se este modelo é correto, movimentos de grande amplitudes devem ocorrer no domínio central e, portanto, devem refletir no espectro de ^{13}C . Uma redução da eficiência na polarização cruzada (CP) indica que

movimentos de grande amplitude com tempos de correlação menores que 10^{-5} s, o inverso do acoplamento dipolar ^1H - ^{13}C . Isto advém do fato que, nesta situação, a interação dipolar é promediada, impedindo que haja transferência de polarização entre os núcleos de ^{13}C e ^1H . Além disso, linhas estreitas e intensas no espectro de polarização direta (DP) indicam que os segmentos executam movimentos rápidos de grande amplitude. Portanto, segmentos rígidos aparecem como picos intensos no espectro CP, enquanto que segmentos altamente móveis dão origem a linhas estreitas nos espectros DP.

Na figura 6.9a e b, estão mostrados os espectros CP e DP obtidos para o hidrogel ACA 50% hidratado. O espectro DP, figura 6.9a, é dominado por dois sinais, Ala(C α) em 52 ppm e Gly(C α) em 44 ppm. As larguras de linha observadas para esses resíduos, 55 Hz, são substancialmente menores que as observadas no espectro CP, 160 Hz. Isto sugere a presença de alta mobilidade das cadeias polipeptídicas a que esses resíduos pertencem. Estes sinais podem então ser identificados como sendo provenientes de grupos localizados no domínio central do hidrogel, o qual contém alta porcentagem de resíduos Ala(71%) e Gly (81%). A presença de movimentos rápidos de grande amplitude nestes resíduos pode ser confirmado observando o espectro CP, que apresenta uma drástica redução nas intensidades das linhas correspondentes. Em contraste, a intensidade da maioria dos outros picos aumenta no espectro CP. O pico em 55 ppm pode ser identificado como proveniente de resíduos Ala fora do domínio central. A presença de dois sinais de Ala com diferentes larguras de linha e deslocamentos químicos isotrópicos é uma indicação de que não existem somente diferenças dinâmicas, mas também conformacionais entre os domínios centrais e terminais. O deslocamento químico médio do carbono α da alanina é de 51 ppm em cadeias aleatórias²⁵, sendo deslocado 3 ppm para valores maiores no caso de α -hélices²⁶. Assim, o sinal em 55 ppm sugere fortemente que os resíduos da Ala na parte rígida da proteína estão em conformação de α -hélice.

Outra evidência clara que os domínios terminais da proteína estão em conformação helicoidal é obtida pelo pico da Val(C α) em 66 ppm. Comparado com o deslocamento químico típico de Val(C α) em cadeias aleatórias, 61 ppm, este pico está significativamente deslocado, indicando que os resíduos de Val tem conformação helicoidal. Uma vez que todos os resíduos de Val encontram-se nos domínios terminais, isto indica que a conformação deste domínios é helicoidal. Consistentemente, o deslocamento químico isotrópico dos resíduos de Ser, que também estão excluídos dos domínios centrais, é 62

ppm, que é claramente maior que o valor de cadeia aleatória, 58 ppm²⁷. Portanto, os resultados de RMN confirmam que o zíper de leucina forma estruturas helicoidais no estado de gel.

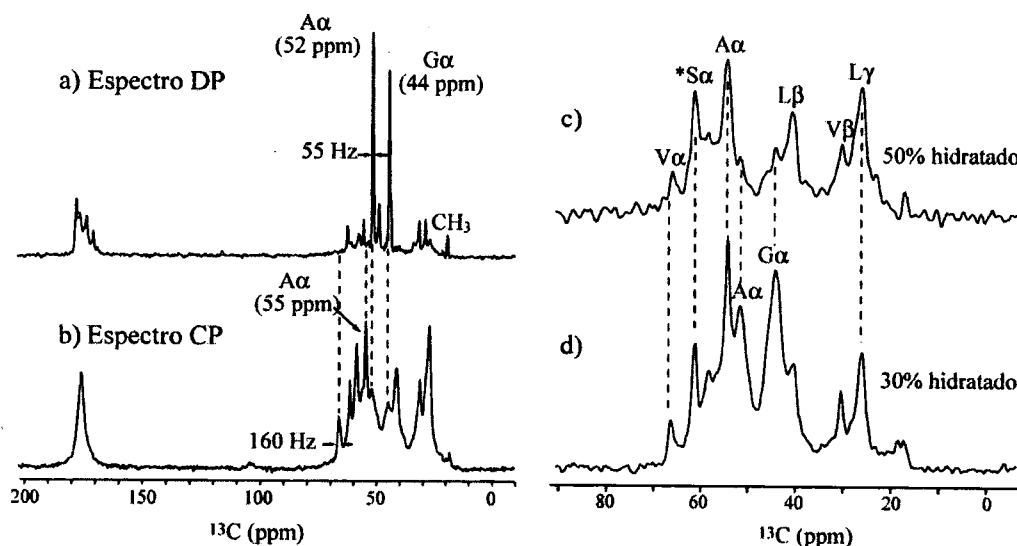


Figura 6.9 - Espectros de ^{13}C para o hidrogel ACA utilizado no estudo da dinâmica na escala de tempo de μs . a) Espectros de polarização direta. b) Espectro de polarização cruzada. c) Espectro CP para ACA 50% hidratado. d) Espectro DP para o ACA 30% hidratado.

A coexistência de domínios móveis e domínios rígidos no hidrogel ACA pode ser ainda confirmada pela dependência do espectro CP de ^{13}C com o grau de hidratação. A eficiência da polarização cruzada do hidrogel 50% hidratado é substancialmente menor que no caso de 30% de hidratação, conforme pode ser observado na figura 6.9c e d. Isto é consistente com o fato de que no caso de amostras mais hidratadas uma fração maior da proteína fica suficientemente móvel para diminuir a eficiência da polarização cruzada. É interessante notar que a redução de intensidade com o grau de hidratação não é uniforme no espectro. Usando o pico Ser($\text{C}\alpha$) ($\text{S}\alpha$) como referência, obtém-se que o pico em 52 ppm da Ala($\text{A}\alpha$) e em 45 ppm da Gly($\text{G}\alpha$) decresceram para $(35 \pm 2)\%$, enquanto que o pico da Ala($\text{A}\alpha$) em 55 ppm diminuiu para 66%. A diferente dependência com a hidratação dos dois picos da Ala suporta a identificação do pico em 52 ppm como pertencente ao domínio móvel. Em comparação, os picos atribuídos a Val($\text{V}\alpha$) e Leu($\text{L}\beta$ e $\text{L}\gamma$) praticamente não se alteram relativamente a linha da Ser. Isto significa que o zíper de leucina, que contém a maioria dos resíduos de Val e Leu, são rígidos na escala de tempo de microsegundos. Outro detalhe importante é que o pico $\text{C}\gamma$ da Leu não reduz de intensidade com a hidratação, o que sugere que estes resíduos estão bem empacotados e ordenados, o que dá suporte à tese de que os domínios helicoidais formam agregados intermoleculares no gel.

Em resumo, os espectros de ^{13}C fornecem evidências claras de que os domínios terminais da proteína formam estruturas helicoidais rígidas, provavelmente com agregação intermolecular, enquanto que os domínios centrais são altamente móveis e formam cadeias aleatórias.

6.2.4 - Movimentos lentos nos zíperes de leucina.

No capítulo 4 foi extensivamente discutido que, devido à sua alta resolução espectral, o experimento CODEX pode ser utilizado no estudo de movimentos lentos em sistemas quimicamente complexos, tais como proteínas. Além disso, foi mostrado que utilizando uma variação do experimento, que envolve a codificação do movimento molecular através da evolução em ^{15}N com a subsequente transferência de polarização para ^{13}C , a técnica CODEX pode ser aplicada eficientemente em proteínas enriquecidas em ^{13}C e ^{15}N , evitando o problema da difusão de spins. Nesta seção, esta técnica será aplicada no estudo dos movimentos lentos nos domínios terminais do hidrogel ACA, que embora sejam rígidos da escala de tempo de μs executam rotações com taxas da ordem de alguns Hz, como será demonstrado adiante.

Na figura 6.10 estão apresentados os espectros obtidos com a técnica ^{15}N -CODEX com detecção em ^{13}C (^{15}N -CODEX- ^{13}C) para tempos de mistura de 50 e 500 ms, e tempo de evolução em ^{15}N de $Nt_r = 727 \mu\text{s}$. O espectro de referência (S_0) para os dois tempos de mistura são aproximadamente idênticos devido ao longo tempo de relaxação transversal do ^{15}N (7 s). No espectro com o efeito de *exchange*, S, observa-se claramente o decaimento de intensidade, indicando a mudança na orientação dos eixos principais do tensor de ^{15}N durante t_m . Isto indica a presença de movimento na escala de tempo de ms no hidrogel ACA. Devido à polarização cruzada ^1H - ^{15}N , somente a fração mais rígida da proteína foi detectada no espectro, enquanto os sinais dos segmentos altamente móveis foram suprimidos. É interessante notar que somente os carbonos $^{13}\text{C}_\alpha$ e ^{13}COO são observados, já que os mesmos estão diretamente ligados aos ^{15}N do grupo amida e são selecionados pela sequência de pulsos TEDOR, vide seção 4.3.2.

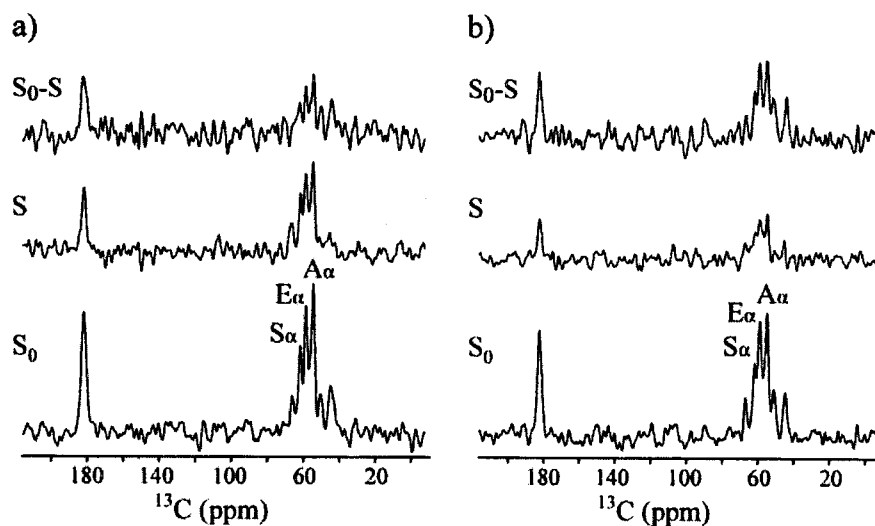


Figura 6.10 - Espectros obtidos com a técnica ^{15}N -CODEX- ^{13}C do hidrogel ACA. a) Espectro de referência, S_0 , com efeito do *exchange*, S , e diferença, $S_0 - S$, para $t_m = 50$ ms. b) mesmo que em a) mas com $t_m = 500$ ms. Os espectros S e S_0 foram adquiridos com 8192 aquisições e temperatura de 20 °C com velocidades de rotação de 5,5 kHz. $N_{tr} = 727$ μs .

O gráfico das intensidades normalizadas $D(t_m, \delta N_{tr}) = S/S_0$ como função de t_m para os $C\alpha$ dos resíduos: Ala (55 ppm), Glu, e Ser está mostrado na figura 6.11. A escolha destes sinais em particular se deve ao fato dos picos referentes aos resíduos de Ala e Ser serem provenientes exclusivamente das regiões helicoidais, enquanto que o sinal do Glu também procedem principalmente desses domínios, mas também existe uma pequena fração proveniente das regiões centrais do hidrogel. Os tempos de correlação extraídos dessas curvas é similar em todos esses resíduos, sendo (80 ± 10) ms para a Ala, (80 ± 10) ms para o Glu e (90 ± 20) ms para a Ser. Os valores de equilíbrio dessas curvas também são similares, sendo iguais a 0.4 ± 0.1 . As curvas são exponenciais o que indica que o movimento ocorre com taxas semelhantes ao longo de toda amostra. Isto não representa uma grande surpresa, já que os domínios mais rígidos estão embebidos em uma matriz de alta mobilidade no caso do hidrogel. Estes tempos de correlação estão de acordo com a escala tempo do movimentos atribuídos como responsáveis pelo regime viscoelástico dos géis ACA à temperatura ambiente e pH aproximadamente neutro, obtidos nos experimentos DWS¹⁷. Os experimentos de DWS mostraram que as moléculas-sonda movem-se com tempos de correlação entre 10^{-3} e 10^{-1} s neste hidrogel.

Para obter maiores informações sobre a natureza do movimento nos zíperes de leucina as curvas $D(t_m, \delta N_{tr})$ versus t_m foram medidas também à 35° C. Nesta temperatura os tempos de correlação obtidos são mais curtos, indicando que se tratam de movimentos

termicamente ativados. O valor de $D(t_m, \delta N t_r) < 1$ obtido para $t_m = 1$ ms, está provavelmente associado com o fato que nestes experimentos o tempo de mistura no experimento de referência, t_z , utilizado foi de 0,2 ms. Neste período curto, a magnetização transversal de ^{15}N pode não ter defasado totalmente durante t_z , o que implicaria no aumento da intensidade no espectro de referência, S_0 .

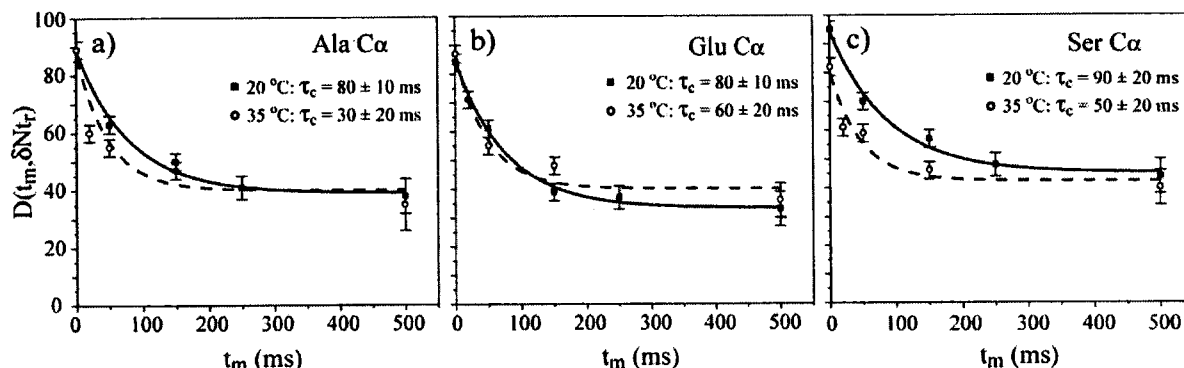


Figura 6.11 - Dependência de $D(t_m, \delta N t_r)$ com o tempo de mistura para os resíduos de Ala, Glu e Ser. a) Ala Cα (55 ppm). b) Glu Cα. c) Ser Cα.

6.2.5 - Amplitude e mecanismo dos movimentos lentos.

A uniformidade dos tempos de correlação obtidos para os resíduos de Ala, Glu e Ser sugerem que cada domínio helicoidal das cadeias polipeptídicas movem-se como um corpo rígido. Para obter informação sobre a amplitude e geometria desses movimentos lentos, a dependência das curvas $E(t_m, \delta N t_r)$ como função de $\delta N t_r$ foram analisadas. Na Figura 6.12a estão mostrados os espectros CODEX para $N = 2$ e 6 , adquiridos com um tempo de mistura de 250 ms. À partir destes espectros, as curvas $E(t_m, \delta N t_r)$ versus $\delta N t_r$ foram obtidas para os resíduos de Ala, Glu e Ser, figura 6.12c-e. A partir dessas curvas a amplitude do movimento molecular no zíper de leucina pode ser obtida.

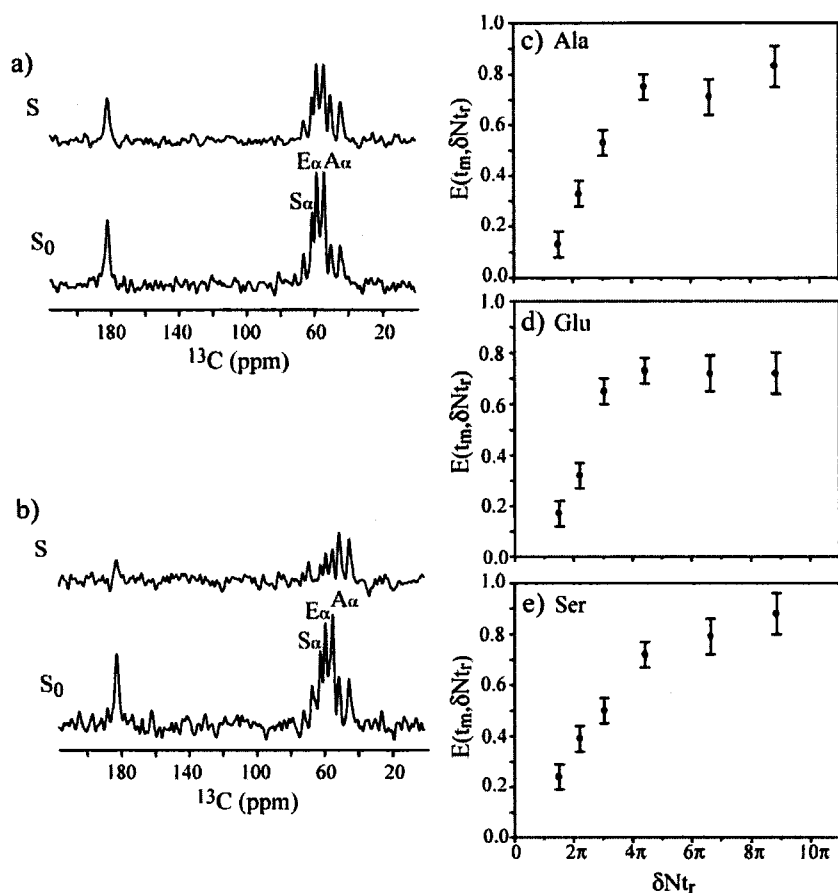


Figura 6.12 - Intensidades ^{15}N -CODEX- ^{13}C como função do tempo de evolução N_t . a) Espectro de referência, S_0 , e com efeito do movimento, S , para $N_t = 363.6 \mu\text{s}$. b) Mesmo que em a) com $N_t = 1.09 \text{ ms}$. c) d) e) A intensidade de *pure-exchange* normalizada $E(t_m, \delta N_{tr})$ como função de δN_{tr} para Ala C_{α} (55 ppm), Glu C_{α} e Ser C_{α} , respectivamente.

6.2.5.1- Amplitude do movimento.

Como discutido na seção 4.2.5, a amplitude do movimento molecular lento pode ser obtida utilizando-se o experimento CODEX. Para obter este importante parâmetro no caso do hidrogel ACA, as curvas da amplitude $\varepsilon(\delta N_t, \beta_R)$ como função de δN_t foram simuladas para vários ângulos β_R . Uma vez que o tensor de deslocamento químico do ^{15}N é quase axial ($\sigma_{xx} = 60 \text{ ppm}$, $\sigma_{yy} = 80 \text{ ppm}$, $\sigma_{zz} = 220 \text{ ppm}$, $\delta = 100 \text{ ppm}$ e $\eta = 0,15$), a influência dos ângulos α_t e γ_t é pequena nas simulações e foi desprezada. A orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento químico de ^{15}N foi obtida de estudos com peptídeos modelo: o eixo σ_{zz} encontra-se no plano do peptídeo formando um ângulo de aproximadamente 20° com a ligação N-H, e os eixos σ_{xx} formam um ângulo de 20° com o plano do peptídeo. Na figura 6.13 estão mostradas as simulações das curvas $\varepsilon(\delta N_t, \beta_R)$

versus δNt_r , para vários ângulos β_R . As curvas foram escaladas por um fator 0,77 para levar em conta que mesmo para $\delta Nt_r \gg 1$, a curva tende para um valor menor que 1. Este aspecto será descrito a seguir. Como pode ser observado, as curvas para β_R entre 40 e 60°, linhas pontilhadas, reproduzem relativamente bem o crescimento inicial da curva. Isto indica que os ângulos de reorientação médios são de aproximadamente 50°.

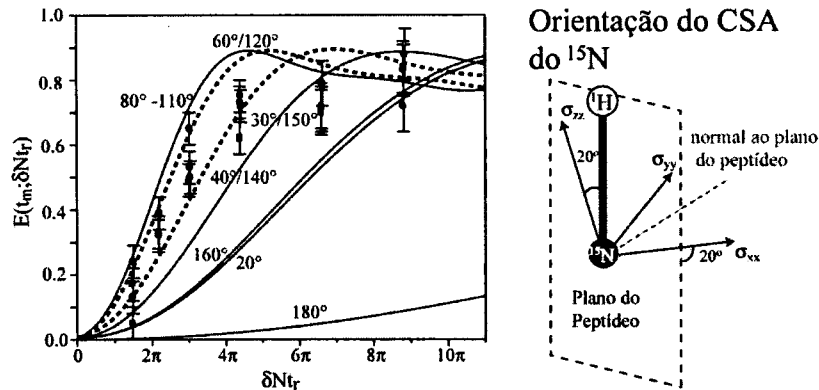


Figura 6.13 - Curvas simuladas $\varepsilon(\delta Nt_r, \beta_R)$ versus δNt_r para vários ângulos de reorientação, β_R superpostas com os dados experimentais. As curvas simuladas foram escaladas em 77% para refletir o *exchange* incompleto dos dados experimentais. Um fator de anisotropia $\delta = 100$ ppm foi utilizado na simulação. A orientação dos eixos principais do tensor de deslocamento do ^{15}N também está mostrada.

6.2.5.2 - Considerações sobre a geometria do movimento.

Na seção anterior a amplitude média do movimento molecular nos zíperes de leucina do hidrogel ACA foi obtida diretamente da curva $\varepsilon(\delta Nt_r, \beta_R)$ versus δNt_r sem a necessidade de conhecer com detalhes a geometria do movimento. Isso é possível porque a amplitude do movimento define basicamente a taxa de crescimento inicial da curva $\varepsilon(\delta Nt_r, \beta_R)$ versus δNt_r , enquanto que a forma da mesma está associada com a geometria do movimento molecular.

Como já discutido anteriormente, os resultados dos estudos da dinâmica molecular por espectroscopia de fluorescência sugerem que no hidrogel ACA os zíperes de leucina executam constates associação e dissociação. As taxas com que estes processos ocorrem foi estudada e os resultados mostraram a existência de dois processos de relaxação com tempos de correlação em torno de 100 e 500 ms¹⁷. Os tempos de correlação obtidos utilizando a técnica CODEX estão em acordo tempo de correlação mais curto dos estudos de fluorescência. Isto sugere que o mecanismo dos dois processos observados pelas duas

técnicas são similares. Com a hipótese de que a associação e dissociação das hélices é o processo responsável pelos movimentos lentos observados nos experimentos CODEX, alguns modelos para a geometria destes movimentos moleculares podem ser considerados. Como pode ser observado na figura 6.13, a forma da $E(t_m, \delta N t_r)$ versus $\delta N t_r$, não pode ser reproduzida considerando apenas reorientações discretas. Torna-se necessário então, considerar algum modelo de difusão rotacional para esse processo.

O modelo de Difusão Rotacional Uniaxial só será consistente com a associação e dissociação das hélices se a orientação do eixo de uma determinada hélice for conservada após uma dissociação e subsequente nova associação. Em outras palavras, é necessário que haja ordem local no hidrogel. Entretanto, nenhuma ordem local foi observada até então neste material, o que permite que este modelo seja descartado. Por outro lado, os modelos de Difusão Reorientacional Isotrópica são consistentes com o processo de associação e dissociação das hélices, pois não implicam na conservação da orientação das mesmas. Além disso, o hidrogel ACA contém domínios centrais altamente flexíveis, fazendo com que movimentos isotrópicos lentos dos domínios terminais sejam possíveis.

Na figura 6.14a estão ilustradas as distribuições de ângulos de reorientação obtidos à partir do modelo de Difusão Reorientacional Isotrópica para diferentes razões t_m/τ_c ^{5,12,13}. As curvas de $E(t_m, \delta N t_r)$ versus $\delta N t_r$ obtidas à partir dessas distribuições, utilizando os procedimentos discutidos na seção 4.2.6, estão mostradas na figura 6.14b. Uma vez que a curva experimental foi adquirida com $t_m = 250$ ms e o valor de τ_c obtido na seção 6.2.3 foi de 80 ms, na figura 6.14c a simulação para $t_m/\tau_c = 3,1$ é comparada com a curva experimental. Como pode ser observado, a curva teórica desvia consideravelmente da curva experimental, indicando que o modelo de Difusão Reorientacional Isotrópica simples não descreve adequadamente o movimento dos zíperes de leucina. No entanto, se for considerado que aproximadamente parte 20% dos segmentos conservam suas orientações originais, a concordância dos dois modelos com os resultados experimentais é muito boa, conforme pode ser observado na figura 6.15d. A fração não móvel observado pode ser consequência tanto de hélices que nunca se dissociam, quanto daquelas que se dissociam e retornam para a posição original. Como já discutido na seção 4.2.6 para $t_m/\tau_c = 3,1$ as curvas $E(t_m, \delta N t_r)$ versus $\delta N t_r$ obtidas para este modelo são idênticas às obtidas se for considerado um modelo de reorientações aleatórias. Neste caso, um dado segmento molecular pode mudar de uma orientação para qualquer outra aleatoriamente⁵, conforme

ilustrado na figura 4.5 do capítulo 4. De fato, essa ambigüidade poderia ser superada medindo as curvas com diferentes tempos de mistura, tal como também discutido na seção 4.2.6. No entanto, devido à baixa sensibilidade do experimento e pouco tempo de máquina não foi possível realizar tais medidas. Portanto, pode-se ser postulado que movimentos isotrópicos de ~85% dos zíperes de leucina são responsáveis pelo processo de associação e dissociação das hélices, que por sua vez sustenta o modelo de formação do hidrogel ACA proposto por Petka et. al. 17.

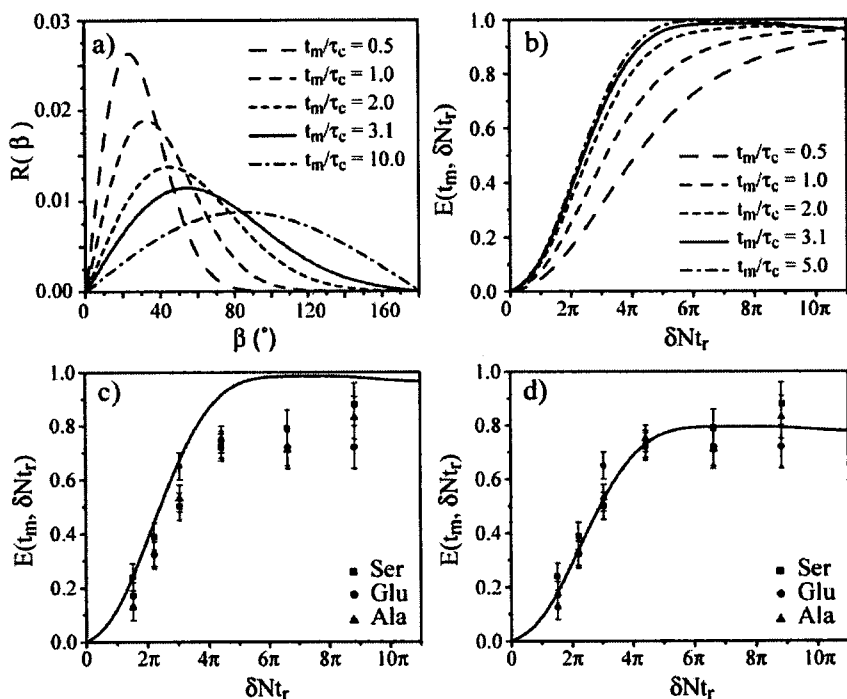


Figura 6.14 - a) Distribuições de ângulos de reorientação para o modelo de Difusão Rotacional Isotrópica como função de t_m/τ_c . b) Curvas simuladas $E(t_m, \delta N_{tr})$ versus δN_{tr} para o modelo de Difusão Rotacional Isotrópica como função de t_m/τ_c . c) Comparação entre os dados experimentais e a curva para Difusão Rotacional Isotrópica usando $t_m/\tau_c = 3,1$ e todos os segmentos se reorientando. d) Comparação entre os dados experimentais e a curva para Difusão Rotacional Isotrópica e reorientações aleatórias, usando $t_m/\tau_c = 3,1$ e 80% dos segmentos participando da reorientação molecular.

6.3 - Conclusão.

Duas importantes aplicações de técnicas de RMN de *Exchange* em ^{13}C no estudo da dinâmica molecular lenta de sólidos orgânicos foram apresentadas neste capítulo.

Os estudos do movimentos lentos das cadeias poliméricas em nanocompostos siloxano/(polietileno glicol) permitiu a caracterização da interação dos segmentos moleculares do polímero com a parte inorgânica do material. Ficou demonstrado que a presença das estruturas de sílica limita substancialmente o movimento dos segmentos

próximos as mesma, mas não afeta segmentos mais afastados dessas estruturas. Como resultado, observou-se a presença de segmentos moleculares que executam reorientações lentas de grande amplitude e ao mesmo tempo segmentos rígidos na escala de tempo de ms, ou executando movimentos de pequena amplitude. Tais heterogeneidades dinâmicas foram observadas tanto em amostras de ormolitas ligadas como não-ligadas. As heterogeneidades dinâmicas nas amostras não-ligadas, em particular os movimentos de pequenos ângulos, podem ser associadas com a interação de parte das cadeias poliméricas com os *clusters* de sílica. Isto foi confirmado nas medidas realizadas em ormolitas contendo polímeros de diferentes pesos moleculares, onde foi observado que os movimentos moleculares lentos são muito mais restritos em amostras com polímeros de menor peso molecular.

O estudo realizado sobre o processo de formação do hidrogel protéico ACA demonstrou que, utilizando a técnica ^{15}N -CODEX com detecção em ^{13}C , é possível obter importantes informações sobre a dinâmica lenta em proteínas relativamente complexas. O modelo estrutural e de formação destes géis, proposto por Petka et. al., foi confirmado utilizando RMN. O gel é composto por domínios centrais altamente flexíveis, que formam cadeias aleatórias e ligam porções mais rígidas que formam α -hélices. A associação e dissociação das hélices, tido como responsável pela estabilização do gel, foi observada através dos experimentos CODEX, onde verificou-se que os zíperes de leucina se movem como corpos rígidos na escala de tempo de ms. A amplitude média desses movimentos foi estimada em aproximadamente 50° .

6.4 - Referências.

- [1] Dahmouche, K.; Atik, M.; Mello, N. C.; Bonagamba, T. J.; Panepucci, H.; Aegerter, M. A.; Judeinstein, P. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1996**, *435*, 363-368.
- [2] Dahmouche, K.; Souza, P. H.; Bonagamba, T. J.; Panepucci, H.; Judeinstein, P.; Pulcinelli, S. H.; Santilli, C. V. *J. Sol.-Gel Sci. Technol.* **1998**, *13*, 909 - 913.
- [3] Brik, M. E.; Titman, J. J.; Bayle, J. P.; Judeinstein, P. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1996**, *34*, 2533-2542.
- [4] Reichert, D.; Schneider, H. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1995**, *190*, 63-71.
- [5] Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; 1st ed.; Academic Press: London, 1994; Vol. 1.

- [6] Spiess, H. W. *Rotation of Molecules and Nuclear Spin Relaxation*; 1st ed.; Diehl, P., Fluck, E. and Kosfeld, R., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1978; Vol. 15, pp 59-214.
- [7] Dahmouche, K.; Santilli, C. V.; Pulcinelli, S. H.; Craievich, A. F. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4937-4942.
- [8] Dahmouche, K.; Santilli, C. V.; Da Silva, M.; Ribeiro, C. A.; Pulcinelli, S. H.; Craievich, A. F. *J. Non.Cryst. Solids* **1999**, *247*, 108-113.
- [9] Schaefer, D.; Spiess, H. W.; Suter, U. W.; Fleming, W. W. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3431-3439.
- [10] Harris, D. J.; Bonagamba, T. J.; Hong, M.; Schmidt-Rohr, K. *J. Phys. Chem. B* (submitted) **2000**.
- [11] Harris, D. J.; Bonagamba, T. J.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6718-6724.
- [12] Wefing, S.; Kaufmann, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1234-1244.
- [13] Wefing, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1219-1233.
- [14] Hubbell, J. A. *Biotechnology* **1995**, *13*, 565.
- [15] Langer, R. *Science* **1990**, *249*, 1527.
- [16] Bell, C. L. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1203.
- [17] Petka, W. A.; Harden, J. L.; McGraffh, K. P.; Wirtz, D.; Tirrell, D. A. *Science* **1998**, *281*, 389.
- [18] Morris, E. R.; Rees, D. A.; Robinson, C. *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 349.
- [19] Nijenhuis, K. T. *Colloid Polym. Sci.* **1981**, *259*, 522.
- [20] Kennedy, S. B.; deAzevedo, E. R.; Petka, W. A.; Russell, T. P.; Hong, M. *Macromolecules* **2001**, *aceito*.
- [21] Hong, M. *J. Magn. Reson.* **1999**, *139*, 389.
- [22] Hong, M.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 7113.
- [23] Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57-83.
- [24] Szeverenyi, N. M.; Bax, A.; Maciel, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2579-2582.
- [25] Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; John Wiley: New York, 1986.
- [26] Spera, S.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490.
- [27] Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 331.
- [28] deAzevedo, E. R.; Kennedy, S. B.; Hong, M. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *321*, 43-48

Conclusões e perspectivas

Neste trabalho novas metodologias de RMN de *Exchange* em estado sólido foram apresentadas, sendo discutidos os principais aspectos referentes ao desenvolvimento, implementação e aplicação das mesmas.

Pode-se dizer que esta tese possui três contribuições principais. A primeira, se refere ao conhecimento adquirido no entendimento, implementação e interpretação de resultados obtidos através de técnicas modernas de RMN. Neste sentido, é importante salientar que a interpretação de resultados obtidos com as metodologias discutidas não envolvem um tratamento trivial, sendo necessário utilizar simulações de espectros que envolvem as características dos experimentos e modelos específicos sobre a dinâmica molecular nos materiais estudados. Isto torna imprescindível a elaboração de programas computacionais dedicados a essas simulações. Todos os programas necessários à interpretação dos resultados obtidos com as técnicas apresentadas foram desenvolvidos neste trabalho, possibilitando que no futuro as técnicas de *Exchange* possam ser eficientemente aplicadas no Grupo de RMN do IFSC. Além disso, todas as técnicas discutidas foram implementadas, testadas e otimizadas, estando à disposição de outros usuários interessados em utilizá-las.

A segunda contribuição diz respeito ao desenvolvimento de novas metodologias. As técnicas de *Pure-Exchange Solid State NMR (PUREX)*, apresentadas no capítulo 3, permitem que vários sistemas possam agora ser estudados por RMN de *Exchange*. Essas técnicas, que executam a supressão dos segmentos rígidos na escala de tempo de 1 ms a 1 s, podem ser eficientemente utilizadas para obtenção de tempos e funções de correlação, amplitude e geometria de reorientações moleculares lentas, mesmo quando a maioria dos segmentos são rígidos na escala de tempo de ms. Isto representa um salto importante em relação as técnicas convencionais de RMN de *Exchange*. Uma contribuição ainda maior foi obtida com o desenvolvimento da técnica (*Centerband-Only Detection of Exchange*) CODEX e suas variações. Esta metodologia permite que efeitos de movimentos lentos possam, pela primeira vez, ser observados em espectros de alta resolução em sólidos. Isto, obviamente, abre um leque enorme de possibilidades para a aplicação desta metodologia em vários sistemas orgânicos e inorgânicos complexos. A possibilidade de se observar movimentos de grupos específicos é particularmente importante no estudo de movimentos

locais, responsáveis por muitas propriedades de materiais orgânicos, tais como polímeros e proteínas.

Finalmente, as aplicações das técnicas em compostos modelo e ao estudo da dinâmica lenta de nanocompositos e proteínas demonstram que as elas podem ser muito úteis no entendimento e confirmação das propriedades dinâmicas deste tipo de material, além de permitir que processos dinâmicos já caracterizados possam ser estudados com um maior grau de detalhamento.

Com respeito às perspectivas futuras as possibilidades são muito interessantes. Alguns aspectos das técnicas ainda podem ser explorados mais profundamente. Por exemplo, a teoria necessária para a aplicação da técnica PUREX e CODEX para o estudo de movimentos no regime intermediário e também na determinação precisa de distribuições de tempos de correlação ainda não está totalmente desenvolvida. De fato, estudos sobre esse tópico já vêm sendo realizados na colaboração do Prof. Klaus Schmidt-Rohr da *Iowa State University*, Iowa, EUA, e brevemente devem ser apresentados. Um outro aspecto importante se refere ao aumento da sensibilidade da técnica CODEX à reorientações por grandes ângulos. Este tópico também está sendo motivo de estudos em nosso grupo, sendo os mesmos realizados em colaboração com o Dr. Detlef Reichert da *Martin-Luther Universität*, Halle, Alemanha. No que se refere a aplicações, as técnicas CODEX e PUREX foram utilizadas com sucesso na caracterização do movimentos responsáveis pela relaxação β de vários polímeros derivados do poli(metil-metacrilato), sendo um tópico importante de outra tese de doutoramento de Fábio Becker Guedes, desenvolvida no grupo de RMN do IFSC. Quanto a aplicações futuras, várias já estão planejadas ou em andamento no Laboratório de Espectroscopia de Alta Resolução do IFSC. Entre elas pode-se citar:

- Estudos de movimentos lentos em torno da transição vítrea em nanocompositos siloxano/(polietileno glicol) utilizando CODEX e outras técnicas de MAS Exchange. Este trabalho está sendo realizado em conjunto com Dr. Detlef Reichert, *Martin-Luther Universität*, Halle, Alemanha, Dr. Karin Dahmouche, Departamento de Química, UNESP, Araraquara, e Dr. Patrick Judenstein, *Laboratoire de Chimie Structurale Organique*, Université Paris-Sud, Orsay, França. Será também tópico de uma dissertação de mestrado a ser desenvolvida no LEAR pela aluna Isabela de Souza Rodrigues.

- Estudos de movimentos lentos em torno da transição vítrea e relação com a conformação de polímeros intercalados em argilas organicamente modificadas. Este trabalho será tópico do trabalho de mestrado do aluno André Luiz Bonfim Bathista e Silva, que será iniciado no próximo ano.
- Dinâmica e conformação e morfologia de blendas poliméricas de interesse industrial. Este trabalho será realizado em colaboração com os prof. Elias Hage do Departamento de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, e com o Dr. Gerson Mantovani, que estará iniciando um programa de pós-doutoramento no LEAR.
- Dinâmica e Estrutura de polímeros opticamente ativos. Este trabalho, ainda por ser iniciado, deverá ser realizado em colaboração com o grupo de polímeros do IFSC com os professores Roberto Mendonça Faria e José Alberto Giacometti.
- Líquidos super-resfriados e a transição vítrea. Este trabalho deverá ser iniciado brevemente.

Além desses trabalhos já planejados, as técnicas apresentadas deverão ser sistematicamente utilizadas no LEAR, de acordo com a necessidade e aplicabilidade de cada caso.

Apêndice I – Métodos Básicos de Simulação Utilizados nos Experimentos PUREX e CODEX

A interpretação quantitativa dos resultados obtidos nos experimentos propostos nesta tese é geralmente realizada através de simulações dos espectros experimentais. Deste modo, é fundamental importância conhecer os métodos envolvidos nas simulações dos espectros. Por esta razão, este apêndice trata exclusivamente deste aspecto, onde deseja-se mostrar as principais características dos métodos computacionais envolvidos nas simulações usadas para a interpretação dos dados experimentais obtidos a partir da utilização das técnicas experimentais PUREX 1D, PUREX 2D e CODEX. De forma geral, estas simulações são realizadas utilizando aspectos geométricos, isto é, as frequências de RMN são calculadas, antes e depois do tempo de mistura, utilizando-se as respectivas orientações do sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico e, conseqüentemente, os fatores de modulação resultantes de cada técnica e os respectivos espectros e curvas simuladas. Este tratamento geométrico é válido assumindo que o movimento molecular ocorre na escala de tempo dos tempos de mistura das técnicas mencionadas e também que os pulsos de radiofrequência seja curtos o suficiente para que sua banda de excitação cubra toda a faixa espectral, o que é geralmente cumprido para a interação de deslocamento químico. Serão apresentados inicialmente alguns aspectos gerais envolvidos na simulação e logo em seguida os métodos utilizados para simular os espectros PUREX 2D e as curvas $E(t_m, \delta\tau)$ versus τ e $E(t_m, Nt_r)$ versus Nt_r , para os experimentos PUREX 1D e CODEX, respectivamente.

I.1 - Cálculo das Frequências de RMN em Experimentos de *Exchange* Estáticos.

Como já discutido no capítulo 1, a frequência observada em um experimento de RMN é definida essencialmente pela orientação do campo magnético externo, \vec{B}_0 , relativamente ao sistema de eixos principais da interação (SEP) durante a detecção do sinal. Um vetor unitário ao longo do campo magnético externo, $\vec{b}_0 = \vec{B}_0 / |\vec{B}_0|$, pode ser representado no SEP do tensor de deslocamento químico, $\tilde{\sigma}$, através da seguinte expressão:

$$\vec{b}_0 = \begin{pmatrix} \text{sen } \theta \cos \phi \\ \text{sen } \theta \text{sen } \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (\text{I.1}),$$

onde θ e ϕ são as coordenadas polares do vetor \vec{b}_0 no sistema de eixos principais do tensor de deslocamento químico, $\tilde{\sigma}^{SEP}$. Conhecendo-se o tensor de deslocamento químico no seu respectivo SEP, a frequência de RMN pode ser calculada como:

$$\Omega(\theta, \phi) = \omega_0 \vec{b}_0' \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \vec{b}_0 = \omega_0 \begin{pmatrix} \text{sen } \theta \cos \phi & \text{sen } \theta \text{sen } \phi & \cos \theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \text{sen } \theta \cos \phi \\ \text{sen } \theta \text{sen } \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (\text{I.2})$$

No caso dos experimentos de *Exchange*, a situação é ligeiramente mais complicada, pois dois sistemas de eixos principais, associados aos tensores de deslocamento químico antes e depois de t_m , estão envolvidos. Como todo o cálculo deve ser realizado em um mesmo sistema de coordenadas, é necessário expressar os tensores de deslocamento químico antes e depois de t_m , em um dos dois SEPs. Tomando o SEP do tensor de deslocamento químico antes de t_m como base, os tensores de deslocamento químico antes, $\tilde{\sigma}^A$, e depois, $\tilde{\sigma}^D$, de t_m podem ser representados neste sistema de coordenadas como:

$$\tilde{\sigma}^A = \tilde{\sigma}^{SEP} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx}^{SEP} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy}^{SEP} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz}^{SEP} \end{pmatrix}$$

$$\tilde{\sigma}^D = \tilde{T}(\alpha, \beta, \gamma) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha, \beta, \gamma) = \begin{pmatrix} \sigma_{xx}^D & \sigma_{xy}^D & \sigma_{xz}^D \\ \sigma_{yx}^D & \sigma_{yy}^D & \sigma_{yz}^D \\ \sigma_{zx}^D & \sigma_{zy}^D & \sigma_{zz}^D \end{pmatrix} \quad (\text{I.3}),$$

onde

$$\tilde{T}(\alpha, \beta, \gamma) = \begin{pmatrix} \cos \alpha \cos \beta \cos \gamma - \text{sen } \alpha \text{sen } \gamma & \text{sen } \alpha \cos \beta \cos \gamma + \cos \alpha \text{sen } \gamma & -\text{sen } \beta \cos \gamma \\ -\cos \alpha \cos \beta \text{sen } \gamma - \text{sen } \alpha \cos \gamma & -\text{sen } \alpha \cos \beta \text{sen } \gamma + \cos \alpha \cos \gamma & \text{sen } \beta \text{sen } \gamma \\ \cos \alpha \text{sen } \beta & \text{sen } \alpha \text{sen } \beta & -\cos \beta \end{pmatrix}$$

A matriz \tilde{T} representa um rotação de Euler do sistema de eixos principais do tensor que ocorre devido a reorientação do segmento molecular. Deste modo, os ângulos α , β e γ representam três ângulos de Euler que estão diretamente relacionados com os ângulos de

reorientação do movimento molecular, que caracterizam a geometria do movimento. Uma vez que os tensores foram adequadamente representados, as frequências antes e depois de t_m são calculadas de acordo com a expressão I.2, resultando em:

$$\begin{aligned}\Omega_1(\theta, \phi) &= \omega_0 \vec{b}_0^t \cdot \tilde{\sigma}^A \cdot \vec{b}_0 \\ \Omega_2(\theta, \phi) &= \omega_0 \vec{b}_0^t \cdot \tilde{\sigma}^D \cdot \vec{b}_0\end{aligned}\quad (\text{I.4})$$

Deste modo, as frequências de RMN antes e depois de t_m podem ser calculadas para cada orientação (θ, ϕ) , assumindo uma dada geometria do movimento molecular.

Embora o procedimento discutido acima seja a base geral do cálculo das frequências, nem sempre a orientação relativa entre os sistemas de eixos principais antes e depois de t_m , ângulos (α, β, γ) , é facilmente relacionada com os ângulos de reorientação envolvidos no movimento. No entanto, a orientação do SEP do tensor de deslocamento químico é geralmente expressa em relação a um sistema de coordenadas relacionado com a orientação molecular, sistema molecular, SM, o que torna possível relacionar diretamente a orientação relativa dos dois SEPs, antes e depois de t_m e os ângulos envolvidos na reorientação molecular. De fato, o cálculo das frequências de RMN podem ser diretamente efetuado neste sistema único de coordenadas. Considerando que as orientações dos SEPs antes e depois de t_m relativas ao sistema molecular sejam dadas, respectivamente, pelos ângulos $(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A)$ e $(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D)$, os correspondentes tensores de deslocamento químicos podem ser representados por:

$$\begin{aligned}\tilde{\sigma}_{SM}^A &= \tilde{T}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \\ \tilde{\sigma}_{SM}^D &= \tilde{T}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D)\end{aligned}\quad (\text{I.5})$$

onde a matriz \tilde{T} representa uma rotação dos SEPs antes e depois de t_m para o sistema molecular. Considerando agora que os ângulos θ e ϕ representam as coordenadas polares do vetor campo magnético no sistema molecular as frequências de RMN são calculadas como:

$$\begin{aligned}\Omega_1(\theta, \phi) &= \omega_0 \vec{b}_0^t \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^A \cdot \vec{b}_0 \\ \Omega_2(\theta, \phi) &= \omega_0 \vec{b}_0^t \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^D \cdot \vec{b}_0\end{aligned}\quad (\text{I.6})$$

I.2 - Cálculo das Frequências RMN em Experimentos de *Exchange* sob Rotação da Amostra em Torno do ângulo Mágico (MAS).

No capítulo 3 foi mostrado que o experimento CODEX pode ser visto simplesmente como a versão do experimento PUREX 1D com rotação da amostra em torno do ângulo mágico. Foi também mostrado que a informação sobre a amplitude do movimento está contida, sobretudo, no fator de modulação $\langle \text{Re}\{ \exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)] \} \rangle$, onde:

$$\Phi_1 = -N \int_0^{t_r/2} \Omega_1(t) dt \quad ; \quad \Phi_2 = N \int_0^{t_r/2} \Omega_2(t) dt \quad (\text{I.7})$$

Deste modo, para calcular o fator de modulação como função de Nt_r e, conseqüentemente, simular a curva $E(t_m, Nt_r)$ versus Nt_r é necessário essencialmente calcular as frequências de RMN sob MAS, $\Omega_1(t)$ e $\Omega_2(t)$, e executar a integração temporal de 0 a $t_r/2$. Uma vez calculado o fator de modulação para uma dada orientação, a integração sobre todas as orientações dos segmentos moleculares, também denominada média do pó, deve ser executada. Finalmente, repetindo esse procedimento como função do número de períodos de rotação utilizados, a curva $E(t_m, Nt_r)$ versus Nt_r é obtida. Portanto, uma parte fundamental deste procedimento é a obtenção das frequências de RMN sob MAS antes e depois de t_m . Assim como discutido na seção anterior, é interessante que os tensores de deslocamento químico, $\tilde{\sigma}$, antes e depois de t_m sejam definidos em um sistema molecular, o que pode ser conseguido utilizando-se a expressão (I.5). No entanto, como discutido no capítulo 1, as frequências de RMN sob MAS são mais convenientemente calculadas em um sistema de coordenadas cujo eixo z coincide com o eixo de rotação da amostra, sistema do rotor, SR. Expressando os tensores de deslocamento químico, $\tilde{\sigma}_{SM}^A$ e $\tilde{\sigma}_{SM}^D$, e o vetor unitário \vec{b}_0 neste novo sistema de coordenadas tem-se:

$$\vec{b}_0^{SR} = \begin{pmatrix} \text{sen } \theta_m \cos(\omega_r t) \\ \text{sen } \theta_m \text{sen}(\omega_r t) \\ \cos \theta_m \end{pmatrix} = \sqrt{\frac{2}{3}} \begin{pmatrix} \cos(\omega_r t) \\ \text{sen}(\omega_r t) \\ \sqrt{1/2} \end{pmatrix} \quad (\text{I.8}),$$

$$\tilde{\sigma}_{SR}^A = \tilde{T}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^A \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$$

$$\tilde{\sigma}_{SR}^D = \tilde{T}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^D \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$$

onde $\theta_m = 54,74^\circ$ é o ângulo mágico e ω_r é a frequência de rotação da amostra e $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$ são os três ângulos de Euler que relacionam os sistemas de coordenadas molecular e do rotor.

As frequências de RMN sob MAS são então obtidas pela expressão 1.24 do capítulo 1, ou seja:

$$\begin{aligned}\Omega_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) &= \omega_0 (\vec{b}_0^{SR})^Y \cdot \tilde{\sigma}_{SR}^A \cdot (\vec{b}_0^{SR}) \\ \Omega_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) &= \omega_0 (\vec{b}_0^{SR})^Y \cdot \tilde{\sigma}_{SR}^D \cdot (\vec{b}_0^{SR})\end{aligned}\tag{I.9}$$

É interessante notar que a média sobre as diferentes orientações neste caso é obtida considerando-se todas as orientações do sistema molecular em relação ao sistema do rotor, isto é, integrando-se sobre as variáveis α_{SR} , β_{SR} e γ_{SR} com $0 < \alpha_{SR} < 180^\circ$, $0 < \beta_{SR} < 180^\circ$ e $0 < \gamma_{SR} < 360^\circ$.

I.3 – Algoritmos para a Simulação dos Experimentos PUREX.

Nos experimentos PUREX a simulação espectral envolve basicamente o cálculo das frequências de RMN antes e depois de t_m para uma dada orientação θ e ϕ do vetor \vec{b}_0 , o que proporciona a obtenção do fator de modulação PUREX, $Mf = 2 * \text{sen}^2\left[\frac{(\Omega_{1RAD} - \Omega_{2RAD})t}{2}\right]$. As frequências Ω_{1RAD} e Ω_{2RAD} são também dadas pela expressão I.9, expressas em radianos. Além disso, o fator de modulação também é pesado pelo fator $d(\cos\theta)$ para levar em conta o fator de integração do espectro de pó, tal como discutio na seção 1.1.2 do capítulo 1. O passo final é incrementar os ângulos θ e ϕ no domínio $[0, 180^\circ]$, onde se obtém o espectro PUREX 2D ou a curva PUREX 1D. As principais transformações de coordenadas envolvidas neste procedimento estão ilustradas na figura I.1.

I.3.1 - PUREX 2D

Um programa de simulação dos espectros PUREX 2D pode ser escrito baseado no seguinte algoritmo:

Passo 1: Leitura dos dados de entrada:

- Valores principais do tensor de deslocamento em ppm $\Rightarrow \sigma_{xx}^{SEP}, \sigma_{yy}^{SEP}, \sigma_{zz}^{SEP}$
- Orientação relativa entre o Sistema Molecular e o Sistema de Eixos Principais:
 1. Antes de $t_m \Rightarrow (\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A)$
 2. Depois de $t_m \Rightarrow (\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D)$
- Número de pontos do espectro 2D $\Rightarrow n_x, n_y$
- Limites da banda espectral 2D em ppm $\Rightarrow (\omega_{1max}, \omega_{2max}) ; (\omega_{1min}, \omega_{2min})$
- Frequência do núcleo em observação em MHz $\Rightarrow f_0 : \omega_0 = 2\pi f_0$
- Número de incrementos nos ângulos polares que representam a orientação do campo magnético externo com respeito ao sistema molecular $\Rightarrow n_\theta, n_\phi$
- Tempo de evolução τ a ser utilizado $\Rightarrow \tau$

Passo 2: Obtenção dos tensores de deslocamento químico no sistema molecular:

- Executar as operações matriciais:

$$\tilde{\sigma}_{SM}^A = \tilde{T}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A)$$

$$\tilde{\sigma}_{SM}^D = \tilde{T}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D)$$

Passo 3: Cálculo do Espectro PUREX 2D :

- Iniciar a matriz que conterà o espectro 2D: $S(\omega_{1p}, \omega_{2p}) = 0$
- Iniciar o Laço i, para incrementar o ângulo θ : $i_\theta = 1:n_\theta$
 1. Definir o ângulo θ em radianos: $\theta_i = \pi * (i - 1) / (n_\theta - 1) \Rightarrow 0 \leq \theta_i \leq \pi$
 2. Calcular o fator de peso para o espectro de pó $d(\cos\theta)$:

$$d \cos \theta_i = \cos \theta_i - \cos \theta_{i-1}$$
- Iniciar o Laço j, para incrementar o ângulo ϕ : $j_\phi = 1:n_\phi$
 1. Definir o ângulo ϕ em radianos: $\phi_j = \pi * (j - 1) / (n_\phi - 1) \Rightarrow 0 \leq \phi_j \leq \pi$
- Calcular as frequências antes e depois de t_m :

1. Montar o vetor \vec{b}_0 : $\vec{b}_0 = \begin{pmatrix} \text{sen } \theta_i \cos \phi_i \\ \text{sen } \theta_i \text{sen } \phi_i \\ \cos \theta_i \end{pmatrix}$

2. Calcular a frequência de RMN antes e depois de t_m em ppm:

$$\Omega_1(\theta_i, \phi_i) = \vec{b}_0^t \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^A \cdot \vec{b}_0$$

$$\Omega_2(\theta_i, \phi_i) = \vec{b}_0^t \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^D \cdot \vec{b}_0$$

• Calcular as intensidades espectrais:

1. Converter as frequências calculadas para rad/s: $\Omega_{1RAD} = \omega_0 \Omega_1(\theta, \phi)$
 $\Omega_{2RAD} = \omega_0 \Omega_2(\theta, \phi)$

2. Calcular o fator de modulação PUREX: $Mf = 2 * \text{sen}^2 \left[\left(\Omega_{1RAD} - \Omega_{2RAD} \right) \frac{\tau}{2} \right] \rightarrow$

3. Converter as frequências calculadas para pontos no espectro:

$$\omega_{1p} = (\Omega_1(\theta_i, \phi_i) - \omega_{1\min}) * \left(\frac{n_x}{\omega_{1\min} - \omega_{1\min}} \right)$$

$$\omega_{2p} = (\Omega_2(\theta_i, \phi_i) - \omega_{2\min}) * \left(\frac{n_x}{\omega_{2\min} - \omega_{2\min}} \right)$$

4. Limitar a frequência à banda espectral 2D:

$$\omega_{1p} = \max(\omega_{1p}, 0); \omega_{1p} = \min(\omega_{1p}, n_x / 2)$$

$$\omega_{2p} = \max(\omega_{2p}, 0); \omega_{2p} = \min(\omega_{2p}, n_y / 2)$$

5. Calcular a intensidade do espectro PUREX 2D e montar a matriz como o espectro.

$$S(\omega_{1p}, \omega_{2p}) = Mf * d \cos \theta_i$$

• Fim do Laço i:

• Fim do Laço j:

• Imprimir Espectro 2D : $S(\omega_{1p}, \omega_{2p})$

I.3.2 - PUREX 1D

Um programa de simulação dos espectros PUREX 1D pode ser escrito baseado no seguinte algoritmo:

Passo 1: Leitura dos dados de entrada:

- Valores principais do tensor de deslocamento em ppm $\Rightarrow \sigma_{xx}^{SEP}, \sigma_{yy}^{SEP}, \sigma_{zz}^{SEP}$
- Orientação relativa entre o Sistema Molecular e o Sistema de Eixos Principais:
 1. Antes de $t_m \Rightarrow (\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A)$
 2. Depois de $t_m \Rightarrow (\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D)$
- Frequência do núcleo em observação em MHz $\Rightarrow f_0 : \omega_0 = 2\pi f_0$
- Número de incrementos nos ângulos polares que representam a orientação do campo magnético externo com respeito ao sistema molecular $\Rightarrow n_\theta, n_\phi$
- Tempos de evolução máximo, τ_{max} , e mínimo, τ_{min} , e o número de passos a serem utilizado $\Rightarrow \tau_{max}, \tau_{min}, e n_\tau$.

Passo 2: Obtenção dos tensores de deslocamento químico no sistema molecular:

- Executar operações matriciais:

$$\begin{aligned} \tilde{\sigma}_{SM}^A &= \tilde{T}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \\ \tilde{\sigma}_{SM}^D &= \tilde{T}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D) \end{aligned}$$

Passo 3: Cálculo da Curva PUREX 1D :

- Iniciar o Laço k, para incrementar o valor de τ : $k = 1 : n_\tau$

$$\tau(k) = \tau_{min} + (k - 1) * (\tau_{max} - \tau_{min}) / n_\tau$$
- Iniciar os vetores que conterão as intensidades como função de τ : $S(k) = 0 \ S(0) = 0$
- Iniciar o Laço i, para incrementar ângulo θ : $i_\theta = 1 : n_\theta$
 1. Definir ângulo θ em radianos: $\theta_i = \pi * (i_\theta - 1) / (n_\theta - 1) \Rightarrow 0 \leq \theta_i \leq \pi$

2. Calcular fator de peso para o espectro de pó $d(\cos\theta)$: $d \cos \theta_i = \cos \theta_i - \cos \theta_{i-1}$

- Iniciar o Laço j, para incrementar ângulo ϕ : $j_\phi = 1:n_\phi$

1. Definir ângulo ϕ em radianos: $\phi_j = \pi * (j_\phi - 1)/(n_\phi - 1) \Rightarrow 0 \leq \phi_i \leq \pi$

- Calcular fas requências antes e depois de t_m :

6. Montar matriz \vec{b}_0 : $\vec{b}_0 = \begin{pmatrix} \text{sen } \theta_i \cos \phi_i \\ \text{sen } \theta_i \text{sen } \phi_i \\ \cos \theta_i \end{pmatrix}$

7. Calcular frequência de RMN antes e depois de t_m em ppm:

$$\Omega_1(\theta_i, \phi_i) = \vec{b}_0' \cdot \vec{\sigma}_{SM}^A \cdot \vec{b}_0$$

$$\Omega_2(\theta_i, \phi_i) = \vec{b}_0' \cdot \vec{\sigma}_{SM}^D \cdot \vec{b}_0$$

- Calcular as intensidades espectrais:

3. Converter as frequências calculadas para rad/s: $\Omega_{1RAD} = \omega_0 \Omega_1(\theta_i, \phi_j)$
 $\Omega_{2RAD} = \omega_0 \Omega_2(\theta_i, \phi_j)$

4. Calcular o fator de modulação PUREX para o $\tau(k)$ corrente:

$$Mf(k) = 2 * \text{sen}^2 \left[\left(\Omega_{1RAD} - \Omega_{2RAD} \right) \frac{\tau(k)}{2} \right]$$

8. Calcular a intensidade normalizada PUREX para o $\tau(k)$ corrente:

$$S(k) = Mf(k) * d \cos \theta_i + S(0); \quad S(0) = d \cos \theta_i + S(0)$$

$$E(k) = (S(k) - S(0)) / S(0)$$

- Fim do Laço i:

- Fim do Laço j:

- Fim do Laço k:

- Imprimir a intensidade normalizada e o vetor com os respectivos valores de τ : $E(k)$,

$\tau(k)$

I.4 – Algoritmos para a Simulação dos Experimentos CODEX.

Nos experimentos CODEX a simulação espectral envolve basicamente o cálculo das frequências de RMN antes e depois de t_m para uma dada orientação $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$ do sistema de eixos do rotor, o que proporciona a obtenção do fator de modulação CODEX, $Re\{exp[i(\Phi_1 + \Phi_2)]\}$. Após este passo, os ângulos $(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$ são incrementados no domínio $0 < \alpha_{SR} < 180^\circ$, $0 < \beta_{SR} < 180^\circ$, $0 < \gamma_{SR} < 360^\circ$ de modo a se obter o espectro de pó. Finalmente, este cálculo é repetido como função do número de períodos do rotor de modo a obter a curva $E(t_m, N_t)$ versus N_t . As principais transformações de coordenadas envolvidas neste procedimento estão ilustradas na figura I.1.

Um programa de simulação básico das curvas CODEX como função de N_t pode ser escrito baseado no seguinte algoritmo:

Passo 1: Leitura dos dados de entrada:

- Valores principais do tensor de deslocamento em ppm $\Rightarrow \sigma_{xx}^{SEP}, \sigma_{yy}^{SEP}, \sigma_{zz}^{SEP}$
- Orientação relativa entre o Sistema Molecular e o Sistema de Eixos Principais:
 1. Antes de $t_m \Rightarrow (\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A)$
 2. Depois de $t_m \Rightarrow (\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D)$
- Frequência do núcleo em observação em MHz $\Rightarrow f_0: \omega_0 = 2\pi f_0$
- Número de incrementos nos ângulos que relacionam os sistemas moleculares e do rotor $\Rightarrow n_{\alpha_{SR}}, n_{\beta_{SR}}, n_{\gamma_{SR}}$
- Número de passos no cálculo da integral temporal $\Rightarrow n_t$
- Frequência de rotação da amostra em Hz $\Rightarrow \omega_r$
 1. Período de rotação: $t_r = 2\pi / \omega_r$
- Máximo número de períodos de rotação desejado $\Rightarrow N$
 1. montar o vetor com os valores de N: $N(m) = (m - 1); m = 1, 2, 3, \dots, N$

2. montar o vetor com os valores de Nt_r :

$$Nt_r(m) = (m-1) * (N * t_r) / (N-1); m = 1, 2, 3 \dots N$$

Passo 2: Obtenção dos tensores de deslocamento químico no sistema molecular:

- Executar as operações matriciais:

$$\begin{aligned} \tilde{\sigma}_{SM}^A &= \tilde{T}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^A, \beta_{SM}^A, \gamma_{SM}^A) \\ \tilde{\sigma}_{SM}^D &= \tilde{T}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D) \cdot \tilde{\sigma}^{SEP} \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SM}^D, \beta_{SM}^D, \gamma_{SM}^D) \end{aligned}$$

Passo 3: Cálculo da Curva CODEX :

- Iniciar o Laço m, para incrementar o número de períodos de rotação:

$$N(m) = (m-1); m = 1, 2, 3 \dots N$$

- Iniciar os vetores que conterão as intensidades como função de τ : $S(m) = 0$ $S(0) = 0$
- Iniciar o Laço i, para incrementar ângulo α_{SR} : $i_{\alpha_{SR}} = 1 : n_{\alpha_{SR}}$

$$1. \text{ Definir o ângulo } \alpha_{SR} \text{ em radianos: } \alpha_{SR} = \pi * (i_{\alpha_{SR}} - 1) / (n_{\alpha_{SR}} - 1) \Rightarrow 0 \leq \alpha_{SR} \leq \pi$$

- Iniciar o Laço j, para incrementar ângulo β_{SR} : $j_{\beta_{SR}} = 1 : n_{\beta_{SR}}$

$$1. \text{ Definir o ângulo } \beta_{SR} \text{ em radianos: } \beta_{SR} = \pi * (j_{\beta_{SR}} - 1) / (n_{\beta_{SR}} - 1) \Rightarrow 0 \leq \beta_{SR} \leq \pi$$

- Iniciar o Laço k, para incrementar ângulo γ_{SR} : $k_{\gamma_{SR}} = 1 : n_{\gamma_{SR}}$

$$1. \text{ Definir o ângulo } \gamma_{SR} \text{ em radianos: } \gamma_{SR} = \pi * (k_{\gamma_{SR}} - 1) / (n_{\gamma_{SR}} - 1) \Rightarrow 0 \leq \gamma_{SR} \leq 2\pi$$

- Executar as operações matriciais:

$$\begin{aligned} \tilde{\sigma}_{SR}^A &= \tilde{T}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^A \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \\ \tilde{\sigma}_{SR}^D &= \tilde{T}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \cdot \tilde{\sigma}_{SM}^D \cdot \tilde{T}^{-1}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) \end{aligned}$$

- Iniciar o Laço l, para calcular a integral temporal: $l_t = 1 : n_t$

$$• \text{ Definir o instante de tempo } t : t = (l_t - 1) \frac{t_r}{2(n_t - 1)}$$

$$• \text{ Montar a matriz } \vec{b}_0 : \vec{b}_0^{SR} = \begin{pmatrix} \text{sen } \theta_m \cos(\omega_r t) \\ \text{sen } \theta_m \text{sen}(\omega_r t) \\ \cos \theta_m \end{pmatrix} = \sqrt{\frac{2}{3}} \begin{pmatrix} \cos(\omega_r t) \\ \text{sen}(\omega_r t) \\ \sqrt{1/2} \end{pmatrix}$$

- Calcular as fases acumuladas antes e depois de t_m :

1. Calcular a frequência de RMN sob MAS antes e depois de t_m em ppm:

$$\Omega_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t) = (\bar{b}_0^{SR})^Y \cdot \tilde{\sigma}_{SR}^A \cdot (\bar{b}_0^{SR})$$

$$\Omega_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t) = (\bar{b}_0^{SR})^Y \cdot \tilde{\sigma}_{SR}^D \cdot (\bar{b}_0^{SR})$$

2. Converter as frequências calculadas para rad/s:

$$\Omega_{1RAD}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t) = \omega_0 \Omega_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t)$$

$$\Omega_{2RAD}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t) = \omega_0 \Omega_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t)$$

3. Calcular as fases de $t = 0$ a $t = \pi/2$:

$$\phi_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) = \Omega_{1RAD}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t) + \phi_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$$

$$\phi_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) = \Omega_{2RAD}(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}, t) + \phi_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$$

- Fim do Laço l , para calcular a integral temporal
- Calcular as fases totais acumuladas em $N(m)$ períodos de rotação:

$$\Phi_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) = N(m) \phi_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$$

$$\Phi_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) = N(m) \phi_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR})$$

- Calcular o fator de modulação CODEX para o $N(m)$ corrente:

$$Mf(m) = \cos[(\Phi_1(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}) - \Phi_2(\alpha_{SR}, \beta_{SR}, \gamma_{SR}))]$$

- Calcular a intensidade normalizada CODEX para o $N(m)$ corrente:

$$S(m) = Mf(m) + S(m); \quad S(0) = 1 + S(0)$$

$$E(m) = (S(0) - S(m)) / S(0)$$

- Fim do Laço $i_{\alpha_{SR}}$:
- Fim do Laço $j_{\alpha_{SR}}$:
- Fim do Laço $k_{\alpha_{SR}}$:
- Fim do Laço m :
- Imprimir a intensidade normalizada e o vetor com os respectivos valores de N_t : $E(m)$, $Ntr(m)$

Os algoritmos mostrados anteriormente são os algoritmos básicos para obtenção das curvas PUREX 1D, CODEX e dos espectros PUREX 2D. Deste modo levam em conta

uma reorientação molecular simples envolvendo os ângulos de Euler ($\alpha_R, \beta_R, \gamma_R$). No entanto, em muitos casos o processo dinâmico envolve distribuições de ângulos de reorientação. Neste casos, este programa deve ser utilizado para calcular as curvas e/ou espectros para ângulos de reorientação individuais e outro programa deve ser utilizado para somar as curvas referentes as diversas contribuições utilizando a distribuição de ângulos de reorientação como fator de peso, conforme discutido nas seções 2.2.3 e 4.2.6. Os programas para simulação das curvas CODEX e do espectro PUREX 2D escritos em FORTRAN estão mostrados no apêndice II.

Apêndice II - Versão dos Programas para Simulação das Curvas CODEX e Espectros PUREX 2D na Linguagem FORTRAN

II.1 PUREX 2D - Versão do programa para simulação do espectro PUREX 2D na linguagem FORTRAN

```
PROGRAM PUREX
```

```
! Variable Declaration
```

```
Double Precision ppmpp,wmin,wmax,tau,freq1ppm
Double Precision sigmaPAS(3,3),tobe(3),toae(3),spectrum(500,500)
Double Precision spectrumPUREX(500,500),spectrumCOSINE(500,500)
Double Precision specprojection(500),specprojectionPUREX(500)
Double Precision specprojectionCOSINE(500)
integer nx,ny,indexmod
character(30) outfile(3)
character(1) expt
```

```
write(*,*)" PUREX program - Calculate 2D and 1D PUREX patterns"
write(*,*)" _____"
write(*,*)""
write(*,*)""
write(*,*)"executing..."
```

```
!=====
!                               INPUT PARAMETERS
!=====
```

```
call
inputdata(outfile,tobe,toae,sigmaPAS,nx,ny,wmin,wmax,ppmpp,tau,freq1ppm,expt)
```

```
!=====
!                               CALCULATIONS
!=====
```

```
! Reference spectrum
```

```
    indexmod=1
    call
ridge2D(sigmaPAS,tobe,toae,nx,ny,ppmpp,wmin,spectrum,tau,freq1ppm,indexmod)
```

```
! PUREX spectrum
```

```
    indexmod=2
    call
ridge2D(sigmaPAS,tobe,toae,nx,ny,ppmpp,wmin,spectrumPUREX,tau,freq1ppm,indexmod)
```

```

! Cosine modulated spectrum
      indexmod=3
      call
ridge2D(sigmaPAS,tobe,toae,nx,ny,ppmpp,wmin,spectrumCOSINE,tau,freq1ppm,indexmod
)

!=====
!                               PROJECTIONS OF 2D ESPECTRUM
!=====

! Reference spectrum
      indexmod=1
      call projection(spectrum,nx,ny,specprojection)

! PUREX spectrum
      indexmod=2
      call projection(spectrumPUREX,nx,ny,specprojectionPUREX)

! Cosine modulated spectrum
      indexmod=3
      call projection(spectrumCOSINE,nx,ny,specprojectionCOSINE)

!=====
!                               WRITE RESULTS
!=====
      call writeresults(spectrum,spectrumPUREX,nx,ny,outfile,ppmpp,wmin,
&                      specprojection,specprojectionCOSINE,expt)

stop
end

!*****
!                               SUBROUTINE ridge2D
!                               (calculate 2D exchange Patern)
!*****

! Variable Declaration

subroutine
ridge2D(sigmaPAS,tobe,toae,nx,ny,ppmpp,wmin,spectrum,tau,freq1ppm,indexmod)

Double Precision ppmpp,wmin,pi,dcostheta(2000),argtheta,argphi,omegabe,omegae
Double Precision omega1,omega2,omegarad1,omegarad2,freq1ppm,tau,modtau
Double Precision sigmaPAS(3,3),sigmaMFbe(3,3),sigmaMFae(3,3),b0(3)
Double Precision tobe(3),toae(3),sintheta(2000),costheta(2000),spectrum(500,500)
integer nx,ny,theta,phi,W1,W2,indexmod
pi=4.*atan(1.0)

```

```
! rotates sigmaPAS to the Molecular Frame before exchange
    call rotation(sigmaPAS,sigmaMFbe,tobe)

! rotates sigmaPAS to the Molecular Frame after exchange
    call rotation(sigmaPAS,sigmaMFae,toae)

! Write tensor orientation
    open(unit=1,file="tensor.txt",status="unknown")

        write(1,*) sigmaPAS(1,1),sigmaPAS(2,2),sigmaPAS(3,3)
    write(1,*) 'tensor 1'
    write(1,*) sigmaMFbe(1:3,1:3)
    write(1,*) 'tensor 2'
    write(1,*) sigmaMFae(1:3,1:3)
    close(1)

! Spectrum amplitude calculation

    spectrum=0.0 ! Initialize array Spectrum

    do theta=1,1801

        dcostheta(theta)=0.0 ! Initialize diferencial of cos(theta)

        argtheta=dfloat(theta-1)/10.0 ! Calculate argument theta
        costheta(theta)=dcosd(argtheta) ! Create lookup table for cossine
        sintheta(theta)=dsind(argtheta) ! Create lookup table for sine

        do phi=0,1800

            if(theta>1) then

                dcostheta(theta)=dabs(costheta(theta)-costheta(theta-1)) +
&                dcostheta(theta) ! diferencial of cos(argtheta)

            else

                dcostheta(theta)=0.0

            endif

            argphi=dfloat(phi)/10.0 ! Calculate argument phi
            cosphi=dcosd(argphi) ! Create lookup table for cossine
            sinphi=dsind(argphi) ! Create lookup table for sine

            b0(1)=cosphi*sintheta(theta) ! b0 components
            b0(2)=sinphi*sintheta(theta)
            b0(3)=costheta(theta)

        enddo

    enddo
```

```
! NMR frequencies - multiplication b0*sigma*b0

      omegabe=0.0
      omegaae=0.0
      do k=1,3
        do l=1,3

          omegabe=b0(k)*sigmaMFbe(k,l)*b0(l)+omegabe
          omegaae=b0(k)*sigmaMFae(k,l)*b0(l)+omegaae

        end do
      end do

! Change NMR frequencies from ppm to points

      omega1=(omegabe-wmin)*ppmpp
      omega2=(omegaae-wmin)*ppmpp

! Change NMR frequencies from ppm to radians per second

      omegarad1=2*pi*omegabe*freq1ppm
      omegarad2=2*pi*omegaae*freq1ppm

! PUREX modulation factor

      if(indexmod==3) then

        modtau=dcos((omegarad1-omegarad2)*tau)

      else if(indexmod==2) then

        modtau=1.0-dcos((omegarad1-omegarad2)*tau)

      else if(indexmod==1) then

        modtau=1.0

      endif

! Set spectral Limit

      W1=max(idnint(omega1),0)
      W1=min(W1,nx+2)
      W2=max(idnint(omega2),0)
      W2=min(W2,ny+2)

! Calculates spectrum

      spectrum(W1,W2)=modtau*dcostheta(theta)+spectrum(W1,W2)

    end do

  end do

return
end
```

```
!*****
!
!           SUBROUTINE writeresults
!           (write results to a file)
!*****

subroutine writeresults (spectrum,spectrumPUREX,nx,ny,outfile,ppmpp,wmin,
&           specprojection,specprojectionCOSINE,expt)

Double Precision spectrum(500,500),spectrumPUREX(500,500),specprojection(500),
Double Precision specprojectionCOSINE(500),wmin,ppmpp
integer nx,ny
character(30) outfile(3)
character(1) expt

! Write file in matrix form containing the 2D Spectrum.

      open(unit=1,file=outfile(2),status="unknown")

      if(expt=="e".or.expt=="E")then
          write(1,10) spectrum(1:nx,1:ny)
      else if(expt=="p".or.expt=="P")then
          write(1,10) spectrumPUREX(1:nx,1:ny)
      else
          write(*,*)"Experiment must be E (Exchange) or P (PUREX)"
      end if

      close(1)

! Write file containing the 2D Spectral projection.

      open(unit=2,file=outfile(3),status="unknown")

      do i=1,nx
          write(2,20)
dfloat(i)/ppmpp+wmin,specprojection(i),specprojectionCOSINE(i)
      end do
      close(2)

10      format(100E12.5)
```

```
20          format (3E12.5)
30          format (5E12.5)

return
end

!*****
!
!              SUBROUTINE rotation
!              (rotates sigmaPAS to the Molecular frame)
!*****

subroutine rotation(sbefore,safter,to)
! function: sbefore -> safter
!
!-----
! all angles in degrees !!!
!
! similarity transformation of matrix sbefore to safter
! using the rotation matrix of mehring p.292
! the inverse of a rotation matrix is its transposed
!
Double Precision sbefore(3,3),safter(3,3),to(3)
Double Precision r(3,3)
Double Precision ca,cb,cg,sa,sb,sg

! calculate rotation matrix

ca=dcosd(to(1))
cb=dcosd(to(2))
cg=dcosd(to(3))
sa=dsind(to(1))
sb=dsind(to(2))
sg=dsind(to(3))

r(1,1)=ca*cb*cg-sa*sg
r(2,1)=-ca*cb*sg-sa*cg
r(3,1)=ca*sb
r(1,2)=sa*cb*cg+ca*sg
r(2,2)=-sa*cb*sg+ca*cg
r(3,2)=sa*sb
r(1,3)=-sb*cg
r(2,3)=sb*sg
r(3,3)=cb

! initialize matrix safter

do i=1,3
do j=1,3
safter(i,j)=0.
enddo
enddo

! do the matrix multiplikation
do i=1,3
do j=1,3
do k=1,3
do l=1,3
```



```

      safter(i,j)=safter(i,j)+r(i,k)*sbefore(k,l)*r(j,l)
        enddo
      enddo
    enddo
  enddo
return
end

!*****
!                               SUBROUTINE projection
!                               (project 2D espectrum onto W1 direction)
!*****

subroutine projection(spectrum,nx,ny,specprojection)

Double Precision spectrum(500,500),specprojection(500)
integer nx,ny

specprojection=0.0

do i=1,nx
  do j=1,ny

      specprojection(i)=spectrum(i,j)+specprojection(i)

  end do
end do

return
end

!*****
!                               SUBROUTINE inputdata
!                               (get input data from parameter list)
!*****

subroutine inputdata(outfile,tobe,toae,sigmaPAS,nx,ny,wmin,wmax,ppmpp,tau,
&                    freqlppm,expt)

Double Precision ppmpp,wmin,wmax,freqlppm,tau,gwidth
Double Precision sigmaPAS(3,3),tobe(3),toae(3)
integer nx,ny
character(30) outfile(3)
character(1) expt

      open(unit=1,file="parameterlist.txt",status="old")

! file name for output

      read(1,*) outfile(1),outfile(2),outfile(3)

! Chemical Shift Tensors
```

```
! Initialize Chemical Shift Tensor

      do i=1,3
        do j=1,3
          sigmaPAS(i,j)=0.0
        enddo
      enddo

! Principal Values

      read(1,*) sigmaPAS(1,1),sigmaPAS(2,2),sigmaPAS(3,3)
      write(*,*) sigmaPAS(1,1),sigmaPAS(2,2),sigmaPAS(3,3)

! Relative orientation between Molecular frame and PAS

! Before Exchange

      read(1,*) tobe(1),tobe(2),tobe(3)

! After Exchange

      read(1,*) toae(1),toae(2),toae(3)

! Number of points

      read(1,*) nx,ny

! Limits of spectral range

      read(1,*) wmin,wmax

! ppm per point (ppmpp)

      ppmpp = nx/(wmax-wmin)

! Number of steps in the modulation period: ntau

      read(1,*) tau

! Nucleus frequency in ppm

      read(1,*) freqlppm

! Exchange (E) or PUREX (P) Experiment

      read(1,*) expt

return
end

c ##### END OF PROGRAM #####
```

II.2 CODEX - Versão do programa para simulação da curva CODEX na linguagem FORTRAN

```
c      //////////////////////////////////////
c      ///          CODEX - EXCHANGE under MAS          ///
c      ///          (ER de Azevedo)                    ///
c      ///          ///                                  ///
c      //////////////////////////////////////

c      This CSA filter is done by applying REDOR-like pules
c      under MAS, and increasing the number of rotor periods.

c      alpha and gamma ranges are (0-360)deg.
c      beta range is (0-180)deg.

c      !!!Main Program

          Program codex

!      GENERAL DECLARATIONS

c      nmaxa,b and c have to be the same.
          parameter (nmaxa=360,nmaxb=180,nmaxc=360)
          parameter (nmaxt=180)
          real summ(3,3),dif(3,3)
c      create lookup table for sin and cos to save calculation time.
c      Warning: results of non-integral degrees are not accurate enough!
          real sint(1440),cost(1440)
c      index of g2re(im) is time
          real g2re(nmaxt),g2im(nmaxt)
          common /parasys/ omigar,omigat2
          common /csdip/ cs11,cs22,cs33
          common /csangles/ ccbalpha,ccbbeta,ccbgamma
          common /changles/ chalpha,chbeta,chgama
          common /sincostb/sint,cost
          character(30) outfile(2)
          integer ntd,nalpha,nbeta,ngamma,idqyn
          pi=4.*atan(1.0)

          call inputdata(outfile,ntd,nalpha,nbeta,ngamma,idqyn)

c      .....
```

```

c          create lookup table
c          .....
c      do i=1,1440
c          sint(i)=sind(float(i))
c          cost(i)=cosd(float(i))
c      end do

c          .....
c          calculation
c          .....

c calculate sum and dif tensor value.

c          call getsigma(summ,dif)

c calculate time signal

c          call getg2(nalpha,nbeta,ngamma,ntd,idqyn,
c          &          summ,dif,g2re,g2im)

c          .....
c          output
c          .....

c          call writeresults(outfile,ntd,g2re,g2im,omigar)

c          stop
c          end

c -----

c ===== GETG2 group =====

c -----
c getg2 block: perform 3-D parameter integration
c               by doing 1-D parameter integration
c               repeatedly.

c          subroutine getg2(nalpha,nbeta,ngamma,ntd,idqyn,
c          &          summ,dif,g2re,g2im)

c nmaxa,b and c have to be the same.
c          parameter (nmaxa=360,nmaxb=180,nmaxc=360)
c          parameter (nmaxt=180)
c          real gretemp1(nmaxt,nmaxc),gimtemp1(nmaxt,nmaxc)
c          real gretemp3(nmaxt,nmaxb),gimtemp3(nmaxt,nmaxb)
c          real gretemp5(nmaxt,nmaxa),gimtemp5(nmaxt,nmaxa)
c          real gretemp2(nmaxt),gimtemp2(nmaxt)
c          real gretemp4(nmaxt),gimtemp4(nmaxt)

```

```

real g2re(nmaxt),g2im(nmaxt)
real glre(nmaxt),glim(nmaxt)
real summ(3,3),dif(3,3)
real sint(1440),cost(1440)
common /sincostb/sint,cost
common /parasys/ omigar,omigat2

pi=3.1415926536
do ialpha=1,nalpha          !begin ialpha !!
  do ibeta=1,nbeta          !begin ibeta !!
c---  igamma loop
      do igamma=1,ngamma
          gamma=2.*float(igamma)/float(ngamma)*180.
          alpha=2.*float(ialpha)/float(nalpha)*180.
          beta=float(ibeta)/float(nbeta)*180.
          call getg1(alpha,beta,gamma,ntd,idqyn,
&              summ,dif,glre,glim)

          do itime=1,ntd
              gretemp1(itime,igamma)=glre(itime)*2.*pi/ngamma
              gimtemp1(itime,igamma)=glim(itime)*2.*pi/ngamma
          end do
      end do
c---  end igamma loop

c--      do integration over gamma:
          call paraintg(gretemp1,ntd,ngamma,gretemp2)
          call paraintg(gimtemp1,ntd,ngamma,gimtemp2)
c          write(*,*) 'gretemp2=', (gretemp2(i),i=1,ntd)
          do itime=1,ntd
c***      gretemp3(itime,ibeta)=gretemp2(itime)*sint(ibeta)*pi/nbeta
c***      gimtemp3(itime,ibeta)=gimtemp2(itime)*sint(ibeta)*pi/nbeta
c          --          MH correction to sind(beta) --- MH
          gretemp3(itime,ibeta)=gretemp2(itime)*sind(beta)*pi/nbeta
          gimtemp3(itime,ibeta)=gimtemp2(itime)*sind(beta)*pi/nbeta
          end do
          enddo          !end ibeta loop!!

c--      do integration over beta:
          call paraintg(gretemp3,ntd,nbeta,gretemp4)
          call paraintg(gimtemp3,ntd,nbeta,gimtemp4)

          do itime=1,ntd
              gretemp5(itime,ialpha)=gretemp4(itime)*2*pi/nalpha
              gimtemp5(itime,ialpha)=gimtemp4(itime)*2*pi/nalpha
          end do
          enddo          !end ialpha loop!!

c--      do integration over alpha:

          call paraintg(gretemp5,ntd,nalpha,g2re) !MH correct nbeta->nalpha
          call paraintg(gimtemp5,ntd,nalpha,g2im) !MH correct nbeta->nalpha

          coeft2=omigat2/(float(ntd)*omigar)
          do itime=1,ntd
              g2re(itime)=g2re(itime)*exp(-float(itime)*coeft2)
              g2im(itime)=g2im(itime)*exp(-float(itime)*coeft2)
          end do
      end do
  end do
end do

```



```

c          Write(*,*)' phisum=',phisum
c          Write(*,*)' phidif=',phidif

      if (idqyn.eq.0)then
          dq=1.
      else
          dq=dqfactor(alpha,beta,gamma)
      endif

      phtime=180.
      gammapm=gamma+phtime
c--      gammapm: gamma prime=gamma+omigar*time
      phisumpm=2*(phi(summ,alpha,beta,gammapm)-phisum)
      phidifpm=2*(phi(dif,alpha,beta,gammapm)-phidif)

      Do itime=1,ntd
          tempsum=phisumpm*(itime-1)
          tempdif=phidifpm*(itime-1)
      temptot=tempsum-tempdif
c--      nphisum and nphidif: convert phi (in rad) to
c--      degree within (360,1080) range.
c--      0.159155: 1/(2*pi)
      phtemp=(temptot*0.159155-
&          int(temptot*0.159155))*360.
      nphi=nint( phtemp )+720

      glre(itime)=dq*1.0
      glim(itime)=dq*cost(nphi)
c          write(*,*)'glre=',glre(itime)
c          write(*,*)'glim=',glim(itime)
      end do

      return
      end

c -----
      function phi(sigma,alpha,beta,gamma)
      dimension sigma(3,3)
      real sint(1440),cost(1440)
      common/parasys/omigar,omigat2
      common/sincostb/sint,cost

      sigdiag1=sigma(1,1)+sigma(2,2)-2.*sigma(3,3)
      sigdiag2=sigma(2,2)-sigma(1,1)
      intalpha=nint(alpha)
      intbeta=nint(beta)
      intgamma=nint(gamma)

      sa =sint(intalpha)
      ca =cost(intalpha)
      sa2=sint(2*intalpha)
      ca2=cost(2*intalpha)
      sb =sint(intbeta)

```

```

        cb =cost (intbeta)
        sb2=sint (2*intbeta)
        cb2=cost (2*intbeta)
        cbsq=cb*cb

c  c1,c2 and s1,s2 are c1^nd,c2^nd etc in table 3.1 of reference
c  0.942809=2*sqrt (2)/3 ;

        c1=0.942809*( 0.25*sigdiag1*sb2-
&      0.25*sigdiag2      *sb2*ca2 +
&      sigma (1,2)/2.    *sb2*sa2 +
&      sigma (1,3)      *cb2*ca  +
&      sigma (2,3)      *cb2*sa)

        c2=0.333333*(-0.5*sigdiag1*sb**2-
&      0.5*sigdiag2      *(1+cbsq)*ca2+
&      sigma (1,2)      *(1+cbsq)*sa2-
&      sigma (1,3)      *sb2*ca-
&      sigma (2,3)      *sb2*sa)

        s1=0.942809*(.5*sigdiag2*sb*sa2
&      +sigma (1,2)      *sb*ca2
&      -sigma (1,3)      *cb*sa
&      +sigma (2,3)      *cb*ca)

        s2=0.666667*(.5*sigdiag2*cb*sa2+
&      sigma (1,2)      *cb*ca2
&      +sigma (1,3)      *sb*sa
&      -sigma (2,3)      *sb*ca)

        phi=(c1*sint (intgamma)+c2/2.*sint (2*intgamma)
&      -s1*cost (intgamma)-s2/2.*cost (2*intgamma))/omigar

        return
        end

c -----
c  dqfactor: double quantum factor
        function dqfactor(alpha,beta,gamma)

        real sint (1440),cost (1440)
        common/parasys/omigar,omigat2

        common/sincostb/sint,cost

        pi=4.0*atan(1.0)
c  delta : matrix for C-C homonuclear coupling??????
        delta=2.

c  DQ excitation period=n*tr => sin(omigar*t)=0.; cos(omigar*t)=1.
c  For dipolar coupling, eta=0 => S1=S2=0.

```



```
c 0.707107:sqrt(2)/2 ; 57.29578: 180/pi

      c1=-delta*0.707107*sint(2*nint(beta))
      stilde=-c1*sint(nint(gamma))

c      0.159155: 1/(2*pi). convert to degree within(0-360)
      dqtemp=(2.*stilde/omigar*0.159155
&      -int(2.*stilde/omigar*0.159155))*360.
      dqfactor=sint(nint(dqtemp)+720)**2
c      write(*,*)'dqfactor:',dqfactor
      return
      end
c -----
```

```
c ===== getsigma group =====
c for calculating double quantum sum and difference tensor
c of carbonyl CSA
c and C-H dipolar coupling.
```

```
c -----
      subroutine getsigma(summ,dif)

c -----
      dimension summ(3,3),dif(3,3)
      common /csdip/ cs11,cs22,cs33

      open(unit=1,file="tensor.txt",status="unknown")
      call csacbnyl (summ)

      write(1,*) cs11,cs22,cs33
      write(1,*)'tensor 1'
      write(1,*)summ(1:3,1:3)

      call dipch(dif)

      write(1,*)'tensor 2'
      write(1,*)dif(1:3,1:3)

      close(1)
      return
      end
```

```
c -----
c for carbonyl CS anisotropy. return ccbcbnyl: carbonyl
c CSA in cc bond system
```

```
      subroutine csacbnyl(ccbcbnyl)
      dimension pmcbnyl(3,3),ccbcbnyl(3,3)
      common /csdip/ cs11,cs22,cs33
```

```
common /csangles/ccbalpha,ccbbeta,ccbgamma

c pmcbnyl:principal matrix of carbonyl CSA

do i=1,3
  do j=1,3
    pmcbnyl(i,j)=0.
  end do
end do

pmcbnyl(1,1)=cs11      !-5.58
pmcbnyl(2,2)=cs22      !-0.56
pmcbnyl(3,3)=cs33      !6.135

c cbcbnyl: CSA matrix in CC bond system.

c          ccbalpha=-15.
c          ccbbeta=90.
write(*,*) 'a,b,c=',ccbalpha,ccbbeta,ccbgamma
call rotation(ccbalpha,ccbbeta,ccbgamma,pmcbnyl,ccbcbnyl)

return
end

c -----
c for CH dipolar coupling matrix, return "ccbdip":dipolar
c coupling tensor in cc bond system.

c chgamma: torsional angle. as input of this block.

subroutine dipch(ccbdip)
dimension ccbdip(3,3),pmdip(3,3)
common /csdip/ cs11,cs22,cs33
common /changles/ chalpa, chbeta, chgamma

do i=1,3
  do j=1,3
    pmdip(i,j)=0.
  end do
end do

pmdip(1,1)=cs11
pmdip(2,2)=cs22
pmdip(3,3)=cs33

Write(*,*) 'dipch:chgamma=', chgamma
c          chalpa=0.
c          chbeta=109.
call rotation(chalpa,chbeta,chgamma,pmdip,ccbdip)

return
end
```

```
c===== end getsigma group =====  
  
c  
c -----  
c  
c      subroutine rotation(alpha,beta,gamma,sbefore,safter)  
c function: sbefore -> safter  
c  
c-----  
c  
c all angles in degrees !!!  
c  
c similarity transformation of matrix sbefore to safter  
c using the rotation matrix of mehring p.292  
c the inverse of a rotation matrix is its transposed  
c  
c      real alpha,beta,gamma  
c      real sbefore(3,3),safter(3,3)  
c      real r(3,3)  
c      real ca,cb,cg,sa,sb,sg  
c calculate rotation matrix  
c      ca=cosd(alpha)  
c      cb=cosd(beta)  
c      cg=cosd(gamma)  
c      sa=sind(alpha)  
c      sb=sind(beta)  
c      sg=sind(gamma)  
c      r(1,1)=ca*cb*cg-sa*sg  
c      r(2,1)=-ca*cb*sg-sa*cg  
c      r(3,1)=ca*sb  
c      r(1,2)=sa*cb*cg+ca*sg  
c      r(2,2)=-sa*cb*sg+ca*cg  
c      r(3,2)=sa*sb  
c      r(1,3)=-sb*cg  
c      r(2,3)=sb*sg  
c      r(3,3)=cb  
c initialize matrix safter  
c      do i=1,3  
c          do j=1,3  
c              safter(i,j)=0.  
c          enddo  
c      enddo  
c do the matrix multiplikation  
c      do i=1,3  
c          do j=1,3  
c              do k=1,3  
c                  do l=1,3  
c                      safter(i,j)=safter(i,j)+r(i,k)*sbefore(k,l)*r(j,l)  
c                  enddo  
c              enddo  
c          enddo  
c      enddo  
c      return  
c      end
```

```

c -----
c 1-d integral: perform integral of array A (1,2,...na)
c return aintgrl as integral value.
c Using Cotes formular. NA should be multiple
c of 4 .
c assumption in this subroutine: A(0)=A(NA)
c -----
c subroutine intgrl(aintgrl,na,a)
c -----
dimension a(na)

aintgrl=0.
do i=1,na-1,2
    aintgrl=aintgrl+a(i)*32./90.

end do

do i=2,na-2,4
    aintgrl=aintgrl+a(i)*12./90.
end do

do i=4,na,4
    aintgrl=aintgrl+a(i)*14./90.
end do

return
end

c*****
c SUBROUTINE inputdata *
c (get input data from parameter list) *
!*****

subroutine inputdata(outfile,ntd,nalpha,nbeta,ngamma,idqyn)

real chalpa, chbeta, chgamma, ccbalpha, ccbbeta, ccbgamma
real sigma11, sigma22, sigma33, omigar, omigart2, freq1ppm
common /parasys/ omigar, omigat2
common /csdip/ cs11, cs22, cs33
common /csangles/ ccbalpha, ccbbeta, ccbgamma
common /changles/ chalpa, chbeta, chgamma
integer ntd, nalpha, nbeta, ngamma, idqyn
character(30) outfile(2)

open(unit=1, file="parameterlist.txt", status="old")

! file name for output

read(1,*) outfile(1),outfile(2)

```

```
! Number of points
      read(1,*) ntd

! spinning speed

      read(1,*) omigar

! Chemical Shift Tensors

! Principal Values
      read(1,*) sigma11,sigma22,sigma33

! Nucleus frequency in MHz
      read(1,*) freq1ppm
      sigmaiso=(sigma11+sigma22+sigma33)/3.
      cs11=(sigma11-sigmaiso)*freq1ppm*1e-3
      cs22=(sigma22-sigmaiso)*freq1ppm*1e-3
      cs33=(sigma33-sigmaiso)*freq1ppm*1e-3

! Relative orientation between Molecular frame and PAS

! Before Exchange
      read(1,*) ccbalpha,ccbbeta,ccbgamma

! After Exchange
      read(1,*) chalpha, chbeta, chgamma

! Parameter for T2 smoothing
      read(1,*) omigart2

! Resolution Parameters
      read(1,*) nalpha,nbeta,ngamma
      read(1,*) idgyn

! Save Input data in outfile(1)
```

```
        open(unit=1,file=outfile(1),status="unknown")

        return
        end
C*****
C                                     SUBROUTINE writeresults          *
C                                     (write results)                  *
C*****

        subroutine writeresults(outfile,ntd,g2re,g2im,omigar)

        parameter (nmaxt=180)
        real g2re(nmaxt),g2im(nmaxt),ntr,omigar
        character(30) outfile(2)
        integer ntd

        open(1,file=outfile(2),status='unknown')

        do itime=1,ntd

                ntr=(float(itime-1)/omigar)
                write(1,*)2.*ntr*1000,g2re(itime),g2im(itime)

        end do

        close(1)

        return
        end
C ##### END OF PROGRAM #####
```