

SUPRESSÃO DAS ANOMALIAS DE FASE E BATIMENTOS LATERAIS EM ESPECTROS DE RMN ^{13}C OBTIDOS COM A SEQUÊNCIA DE PRECESSÃO LIVRE NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Poliana Macedo dos Santos

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP / Embrapa Instrumentação Agropecuária, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CP 741, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

André Alves de Souza

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Luiz Alberto Colnago*

Embrapa Instrumentação Agropecuária, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CP 741, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 30/3/09; aceito em 23/11/09; publicado na web em 9/3/10

SUPPRESSION OF PHASE ANOMALIES AND SIDEBANDS ON ^{13}C NMR SPECTRA OBTAINED WITH THE STEADY-STATE FREE PRECESSION SEQUENCE. The Steady-State Free Precession (SSFP) sequence has been widely used in low-field and low-resolution imaging NMR experiments to increase the signal-to-noise ratio (s/n) of the signals. Here, we analyzed the Scrambled Steady State - SSS and Unscrambled Steady State - USS sequences to suppress phase anomalies and sidebands of the ^{13}C NMR spectrum acquired in the SSFP regime. The results showed that the application of the USS sequence allowed a uniform distribution of the time interval between pulses (T_p), in the established time range, allowing a greater suppression of phase anomalies and sidebands, when compared with the SSS sequence.

Keywords: ^{13}C NMR; Steady State Free Precession; phase anomalies and sidebands.

INTRODUÇÃO

A sequência de Precessão Livre no Estado Estacionário (*Steady-State Free Precession – SSFP*) tem sido muito empregada na ressonância magnética nuclear (RMN) de baixo campo e de imagem para análises rápidas com aumento na razão sinal-ruído (s/r).¹⁻⁸ Esta sequência apresenta como principal vantagem a utilização de intervalos de tempo entre os pulsos (T_p) menores que os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Este decréscimo de T_p possibilita realizar a promedição de milhares de espectros por unidades de T_1 , proporcionando um ganho significativo na razão s/r, quando comparada com as demais sequências utilizadas na RMN.²

Na sequência SSFP, cada pulso aplicado é responsável por dois processos simultâneos: a excitação da magnetização longitudinal, gerando um FID logo após o pulso, e a refocalização da magnetização transversal residual, sob a forma de um eco. Ao efetuar a transformada de Fourier do sinal, observa-se que o espectro apresenta anomalias de fase, amplitude e batimentos laterais, devido à presença do eco no sinal no domínio do tempo,^{9,10} que inviabilizam o seu uso em análises de RMN de rotina em alta resolução.

Para suprimir estas anomalias, Ernst e Anderson⁹ propuseram a utilização de um T_p maior que $3T_2$. Nesta condição ($T_p > 3T_2$), a componente eco formada apresenta apenas 5% da intensidade total. Freeman e Hill¹⁰ propuseram um método para supressão das anomalias de fase e batimentos laterais, que se baseava na eliminação da componente eco ao promediar sinais adquiridos com diferentes valores de T_p . Esta sequência foi denominada de *Scrambled Steady State - SSS*, sendo as variações de T_p realizadas aleatoriamente, após a aplicação de 64 pulsos, necessários para o completo estabelecimento do regime de estado estacionário. Rudakov e colaboradores¹¹ sugeriram uma sequência na qual a supressão da componente eco ocorria ao efetuar variações de 180° nas fases dos pulsos, após a aplicação de dois pulsos consecutivos. Schwenk^{12,13} desenvolveu a sequência denominada *Quadrige Fourier Transform – QFT*, a qual suprimia as

anomalias de fase ao se promediar quatro espectros adquiridos com diferentes frequências de irradiação.

No entanto, essas propostas não foram adotadas pelos usuários de RMN. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar as metodologias existentes para a eliminação das anomalias de fase e batimentos laterais dos espectros de RMN obtidos com a sequência SSFP, bem como propor uma sequência mais eficiente para esse fim, denominada *Unscrambled Steady State – USS*. Nesta sequência, a variação de T_p é realizada em passos constantes, o que possibilita uma supressão mais eficiente e reproduzível das anomalias, quando comparada com as propostas na literatura.

PARTE EXPERIMENTAL

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos em um espectrômetro Varian Inova com ímã de 9,4 T, cujas frequências de ressonância são de 400 MHz para o núcleo de ^1H e 100,5 MHz para o núcleo de ^{13}C .

A amostra estudada foi acetato de etila, dissolvida em clorofórmio deuterado e analisada pelas sequências SSFP, SSS e USS, propostas nesse trabalho. Para a aquisição dos sinais com a sequência SSFP, aplicou-se um trem de pulsos de 60° de mesma fase, separados por um $T_p = 300$ ms, que corresponde à utilização de um tempo de aquisição (at) de 299,7 ms e tempo de reciclo (T_r) de 0,3 ms ($T_p = at + T_r$).

Para as sequências SSS e USS, aplicou-se um trem de pulsos de 60° de mesma fase, com at de 299,7 ms e valores de T_r variando entre 0,3 e 1,3 ms ($\Delta T_p = \Delta T_r = 1$ ms), cuja escolha foi realizada dentro do intervalo de tempo equivalente à variação de 0 a 180° na fase da componente eco, que é determinada pela frequência de *offset* (ν_r) utilizada. O valor escolhido, 500 Hz, faz com que os spins nucleares perfaçam, no sistema de referencial girante, uma rotação completa em torno do campo magnético efetivo em 2 ms; logo, para se obter a inversão de fase da componente eco de 180° , a variação de T_p deve ser da ordem de 1 ms ($1/2\nu_r$), tal como aplicado.

Ainda, para uma eficiente supressão da componente eco, e consequentemente das anomalias de fase e batimentos laterais, a frequência de *offset* (ν_r) tem que ser diferente da frequência de ressonância (ν_0)

*e-mail: colnago@cnpdia.embrapa.br

dos sinais a serem analisados, ou seja, ela não pode ser igual a zero para nenhum dos sinais. Caso algum sinal esteja em ressonância, o seu eco não será suprimido, uma vez que o mesmo manterá sua coerência de fase para todos os valores de T_r utilizados.¹⁰ O valor de *offset* utilizado ($\nu_r = 500$ Hz) foi determinado após a avaliação da supressão do sinal do eco ao se aplicarem valores entre 100 e 2000 Hz, e foi subtraído do sinal do tetrametilsilano (TMS), escolhido como referência. A representação esquemática destas sequências pode ser visualizada na Figura 1.

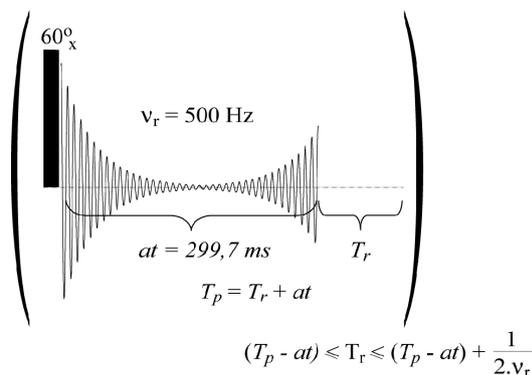


Figura 1. Representação esquemática das sequências SSS e USS. Estas sequências consistem na aplicação de um trem de pulsos de mesma fase, duração e intensidade, espaçados por um tempo $T_p < T_2$. Neste trabalho, aplicou-se um trem de pulsos de 60° de mesma fase (x), e um tempo de aquisição (at) fixo de 299,7 ms. A variação do parâmetro T_p é realizada via variação de T_r num intervalo de tempo que depende da frequência de *offset* empregada, devendo ser igual a meio período de precessão dos spins nucleares estudados (equivalente à variação máxima de 180° na fase da componente eco), após a aplicação de 64 pulsos necessários para o estabelecimento do estado estacionário. Durante todo o experimento, efetuou-se o desacoplamento de 1H

A diferença entre as sequências SSS e USS é que na primeira as variações de T_r são aleatórias e na segunda essas variações são linearmente espaçadas, ambos entre 0,3 e 1,3 ms. Para esses experimentos foram utilizados 40 valores de T_r , cujas variações foram efetuadas após a aplicação de 64 pulsos.

Os espectros obtidos com estas sequências foram comparados com os obtidos com a sequência convencional, que consiste na aplicação de pulsos de 30° , espaçados por um $T_p = 1,380$ s ($at = 0,9$ s e $T_r = 0,48$ s).¹⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 tem-se o sinal de RMN ^{13}C no domínio do tempo, adquirido com a sequência SSFP, para a amostra de acetato de etila. Nela, pode-se ver claramente que o sinal é composto pelas componentes FID e eco. A Figura 3 mostra a transformada de Fourier deste sinal, na qual se observa a presença das anomalias de fase, amplitude e batimentos laterais, devido à presença do eco no sinal no domínio do tempo.¹⁰ Já o espectro obtido com a sequência convencional (Figura 4) apresenta somente anomalias de amplitude, devido à utilização de um $T_2 \approx T_p < 5T_1$.

Na Figura 5 tem-se o espectro de RMN ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência de supressão SSS. Nesta figura, observa-se uma supressão significativa das anomalias de fase e batimentos laterais, quando comparada com o espectro obtido com a sequência SSFP (Figura 3). No entanto, observou-se que a utilização de números aleatórios para efetuar as variações de T_r nem sempre leva a resultados satisfatórios e reproduzíveis, uma vez que a aplicação destes valores implica em uma dispersão não uniforme de T_r na faixa de tempo

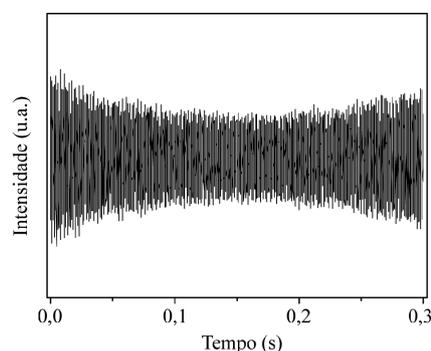


Figura 2. Sinal de RMN ^{13}C no domínio do tempo de acetato de etila, obtido com a sequência SSFP, através da aplicação de pulsos de 60° de mesma fase, tempo de aquisição (at) de 299,7 ms e T_r igual a 0,3 ms

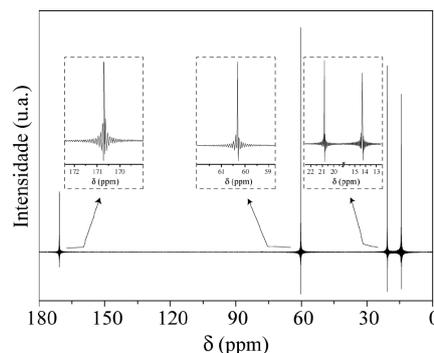


Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência SSFP através da aplicação de um trem de pulsos de 60° , tempo de aquisição (at) de 299,7 ms e T_r igual a 0,3 ms. Na figura, os sinais foram ampliados para mostrar as severas anomalias de fase e batimentos laterais causados pela presença da componente eco no sinal no domínio do tempo (Figura 2)

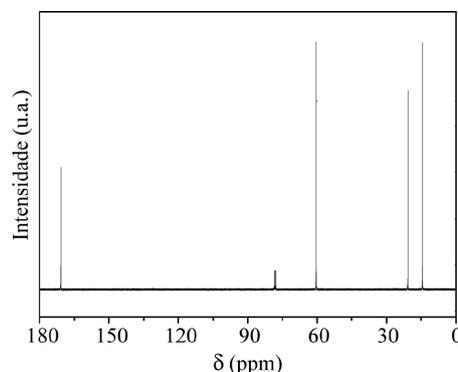


Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência convencional, em que se aplicam pulsos de 30° espaçados por um $T_p = 1,380$ s ($at = 0,9$ s e $T_r = 0,48$ s). Como pode ser observado, esta sequência não gera anomalias de fase e batimentos laterais nos sinais

estabelecida. Este efeito pode ser minimizado com o aumento do número de variações; porém, isso leva a um aumento no tempo total de análise, fazendo com que esta sequência não apresente grande vantagem sobre a sequência convencional.

A partir destes resultados, desenvolveu-se uma sequência também baseada na obtenção de espectros com diferentes valores de T_r , denominada USS. A diferença é que nesta sequência os passos são constantes e não mais aleatórios, permitindo uma distribuição uniforme destes valores na faixa de tempo estabelecida e, conseqüentemente, uma supressão eficiente e reproduzível das anomalias de fase e batimentos laterais. Na Figura 6, tem-se o espectro de RMN ^{13}C

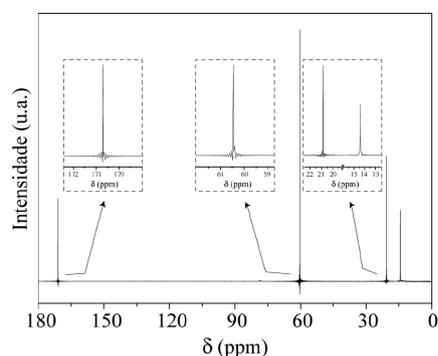


Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência SSS através da aplicação de um trem de pulsos de 60° de mesma fase (x), e um tempo de aquisição (at) fixo de 299,7 ms. Foram realizadas 40 variações aleatórias do parâmetro T_p (de 300 a 301 ms), através do parâmetro T_r , após a aplicação de 64 pulsos necessários para o estabelecimento do regime de estado estacionário. A faixa de variação de T_r (0,3 a 1,3 ms) foi definida pela frequência de offset utilizada (500 Hz). Nela, os sinais foram ampliados para evidenciar a supressão das anomalias de fase e batimentos laterais

de acetato de etila obtido com a sequência USS, no qual se observa que além da supressão das anomalias de fase e batimentos laterais, tem-se também uma melhora na relação entre as intensidades relativas dos sinais, similares às observadas no espectro obtido com a técnica convencional (Figura 4).

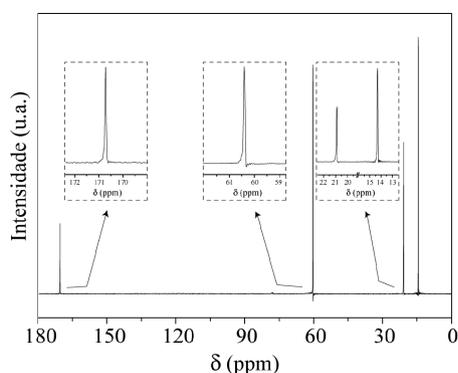


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C de acetato de etila obtido com a sequência USS através da aplicação de um trem de pulsos de 60° de mesma fase (x), e um tempo de aquisição (at) fixo de 299,7 ms. Foram realizadas 40 variações lineares do parâmetro T_p (de 300 a 301 ms), através do parâmetro T_r , após aplicação de 64 pulsos necessários para o estabelecimento do regime de estado estacionário. A faixa de variação de T_r (0,3 a 1,3 ms) foi definida pela frequência de offset utilizada (500 Hz). Os sinais individuais foram ampliados para evidenciar a excelente supressão das anomalias de fase e batimentos laterais obtida, quando comparado com a supressão obtida com a sequência SSS (Figura 5)

Esse método vem sendo aplicado a moléculas que apresentam um maior número de carbonos e os resultados obtidos confirmam a sua eficiência e reprodutibilidade na eliminação das anomalias de fase e batimentos laterais.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a utilização de variações constantes para T_r permite uma dispersão mais uniforme destes valores na faixa de tempo estabelecida e, consequentemente, os resultados obtidos apresentaram uma supressão mais significativa das anomalias de fase e batimentos laterais do espectro de RMN ^{13}C , além de uma maior reprodutibilidade dos resultados.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infraestrutura cedida. À FAPESP pelo auxílio concedido.

REFERÊNCIAS

1. Carr, H. Y.; *Phys. Rev.* **1958**, *112*, 1693.
2. Azeredo, R. B. V.; Colnago, L. A.; Engelsberg, M.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2401.
3. Colnago, L. A.; Engelsberg, M.; Souza, A. A.; Barbosa, L. L.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1271.
4. Venâncio, T.; Engelsberg, M.; Azeredo, R. B. V.; Colnago, L. A.; *J. Magn. Reson.* **2006**, *181*, 29.
5. Azeredo, R. B. V.; Engelsberg, M.; Colnago, L. A.; *Phys. Rev. E* **2001**, *64*, 6309.
6. Ramadan, S. S.; Heyn, C.; MacKenzie, L. T.; Chambers, A. F.; Rutt, B. K.; Foster, P. J.; *Magn. Reson. Mater. Phys.* **2008**, *21*, 251.
7. Klarhöfer, M.; Madörin, P.; Bilecen, D.; Scheffler, K.; *J. Magn. Reson. Imaging* **2008**, *27*, 1169.
8. Blume, U.; Lockie, T.; Stehning, C.; Sinclair, S.; Uribe, S.; Razavi, R.; Schaeffter, T. *J. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *29*, 480.
9. Ernst, R. R.; Anderson, W. A.; *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93.
10. Freeman, R.; Hill, H. D. W.; *J. Magn. Reson.* **1971**, *4*, 366.
11. Rudakov, T. N.; Beliakov, A. V.; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1998**, *31*, 1251.
12. Schwenk, A.; *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1985**, *17*, 69.
13. Schwenk, A.; *J. Magn. Reson.* **1971**, *5*, 376.
14. Braun, S.; Kalinowski, H. O.; Berger, S.; *150 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course*, 2nd ed, Wiley-VCH: New York, 1998.