


Guia de Introdução ao AVANCE NEO

● Manual do utilizador

Version 001



Copyright © por Bruker Corporation

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em um sistema de recuperação ou transmitida, em qualquer forma ou por qualquer meio sem o consentimento prévio do editor. Os nomes dos produtos utilizados são marcas comerciais ou marcas registradas de seus respectivos proprietários.

© agosto 21, 2018 Bruker Corporation

Número do documento: 10000061277

P/N: H171804PT

Índice

1	Introdução	5
1.1	Fontes de perigos	5
1.2	Versão do software e sintaxe de comandos	5
2	Segurança	7
2.1	Segurança magnética	7
2.1.1	Segurança criogénica	7
2.2	Segurança elétrica	8
2.3	Segurança química	8
2.4	Certificação CE	8
3	Fundamento teórico introdutório e terminologia	9
3.1	Análise de clorofórmio por NMR	11
3.2	Compostos de referência, Hertz, ppm	13
3.3	NMR de prótons - Desvio químico	14
3.4	Espectro de prótons de benzeno	15
3.5	Espectro de prótons de benzilacetato	16
3.6	Espectro de prótons de etilbenzeno com acoplamento spin/spin	18
3.7	Desacoplamento	20
3.8	FID e espectro	22
4	Descrição do sistema	23
4.1	Descrição geral da arquitetura AVANCE	24
4.1.1	Consola do operador e ligações	24
4.2	Consola	24
4.3	Ligação entre o computador anfitrião e o AQS	26
4.4	Íman, Sistema de homogeneização, HPPR e Sonda	26
4.5	O íman e Dewar do íman	27
4.5.1	Coluna à temperatura ambiente	28
4.5.2	Reservatório de hélio	28
4.5.3	Reservatório de azoto	29
4.6	Introdução ao sistema de bloqueio	29
4.7	Sondas	30
4.8	Sonda de banda larga	32
4.9	iProbe	33
4.10	Trocar uma sonda	34
5	Procedimentos básicos	35
5.1	A janela TopSpin	35
5.1.1	Criar um novo conjunto de dados	36
5.1.2	Preparação da amostra	37
5.2	Introduzir a amostra com rotor no íman	38
5.3	Bloquear a amostra	39
5.4	Afinação e correspondência da sonda	40
5.4.1	Sondas equipadas com ATM através do procedimento de afinação automatizada	40

5.4.2	Sondas equipadas com ATM através do procedimento de afinação manual.....	41
5.5	Rotação da amostra.....	43
5.6	Homogeneização	44
5.6.1	Homogeneização de rotina no TopShim.....	44
5.7	Definir os parâmetros dependentes da sonda/solvente.....	44
5.8	Ajustar o ganho do recetor.....	44
5.9	Iniciar a aquisição	45
5.10	Processar os dados	45
6	Preparação para a aquisição, parâmetros relacionados com a frequência	47
6.1	Frequência	47
6.2	Explicação numérica de frequências transmitidas, básicas e deslocadas	48
7	A amostra de NMR.....	51
7.1	Seleção do solvente.....	51
7.2	Tubo de amostra	52
7.3	Manuseamento de amostras	53
8	Espectro de protões	55
8.1	Configuração da experiência	56
8.2	Aquisição	59
8.3	Processar.....	59
8.4	Integração	61
8.5	Traçar o espectro de protões 1D	63
8.6	Otimizar a largura de varrimento	64
9	Espectro de ¹³C com desacoplamento de protões	67
9.1	Configuração da experiência	68
9.2	Aquisição	70
9.3	Processar.....	70
9.4	Seleção de picos.....	72
9.5	Traçar o espectro de carbono 1D	73
10	Contacto	75
	Lista de figuras	77
	Lista de tabelas.....	79
	Glossário	81
	Índice remissivo	83

1 Introdução

Este manual tem por objetivo descrever os componentes básicos de um espectrómetro da Bruker, as respetivas funcionalidades e o modo como são geridos pelo software TopSpin para a aquisição de dados de ressonância magnética nuclear (NMR, Nuclear Magnetic Resonance). Com o auxílio deste manual, um utilizador relativamente pouco experiente deverá poder realizar uma série de experiências NMR 1-D de Alta Resolução (HR). O antranilato de mentilo foi selecionado como um exemplo. Tanto a observação de prótons como a observação de carbono com desacoplamento de prótons serão descritas. Para auxiliar o utilizador, serão utilizados conjuntos de parâmetros padrão fornecidos com todos os pacotes de software TopSpin. É minimizado o tempo despendido no espectrómetro propriamente dito, particularmente nos casos em que é fornecida formação a números relativamente grandes de estudantes. Neste cenário, o processamento pode ser facilmente realizado num PC distinto utilizando os tutoriais fornecidos com a documentação do espectrómetro.

No âmbito das instruções fornecidas neste manual, é assumido que o utilizador tem:

- Um conhecimento básico do pacote de software TopSpin.
- Uma sonda ou sondas com capacidade para observação de prótons e observação de carbono com desacoplamento de prótons.
- Um conhecimento básico acerca da utilização dos separadores de fluxo e botões na janela TopSpin.

Embora este manual tenha sido concebido no sentido de fornecer uma descrição passo a passo, os novos utilizadores terão sempre algumas questões que tornam necessária a assistência ocasional de um utilizador mais experiente. O objetivo deste manual é, quando exequível, permitir aos utilizadores trabalhar independentemente e adquirir um entendimento básico da utilização do sistema. Esperamos que o tempo necessário para formar novos utilizadores seja reduzido significativamente através da utilização deste manual.

1.1 Fontes de perigos

O capítulo de segurança abordará esta questão em maior pormenor, mas é conveniente salientar nesta secção os perigos potenciais relativamente à utilização de um espectrómetro de NMR nesta fase introdutória. Apesar de ser um sistema sofisticado, existem surpreendentemente poucos casos em que os utilizadores inexperientes podem danificar o equipamento, sendo mencionados apenas os mais importantes. Durante a utilização normal, as causas mais prováveis de danos são:

- Remover uma amostra do íman com a coluna ainda tamponada.
- Introduzir uma amostra no íman sem a presença da almofada de ar de suporte.
- Transmitir energia de RF através de cabos desligados ou sondas não correspondentes.

Os novos utilizadores devem familiarizar-se com estes perigos potenciais antes de começar. Os gestores do sistema devem assegurar que os novos utilizadores compreendem as questões indicadas acima.

1.2 Versão do software e sintaxe de comandos

Este manual foi escrito para o TopSpin versão 4.0. Ao longo do manual, serão descritos procedimentos para introduzir diversos comandos.

2 Segurança

Em termos de segurança, a presença de um íman relativamente forte é o que distingue os espectrómetros de NMR da maioria do outro equipamento do laboratório. Não existe característica mais importante do que esta a ter presente quando estruturar um laboratório de NMR ou administrar formação ao pessoal que irá trabalhar no laboratório ou nas suas proximidades. Desde que os procedimentos corretos sejam seguidos, trabalhar próximo de ímanes supercondutores é completamente seguro e não tem efeitos secundários médicos nocivos conhecidos. Todavia, a negligência pode resultar em acidentes graves.

O íman representa um perigo potencial devido a:

- A grande força atrativa que exerce em objetos ferromagnéticos.
- O elevado conteúdo de azoto e hélio líquidos.

2.1 Segurança magnética

Um campo magnético rodeia o íman em todas as direções. Este campo (conhecido como campo de dispersão) é invisível e, por conseguinte, os supervisores deverão ter colocado sinais de advertência nos locais adequados. Os objetos feitos de materiais ferromagnéticos, por exemplo, o ferro, o aço, entre outros, serão atraídos ao íman. Se um objeto ferromagnético se aproximar demasiado, pode subitamente ser atraído para o íman com uma força surpreendente. Isto pode danificar o íman ou causar ferimentos pessoais em qualquer pessoa que esteja no trajeto do objeto até ao íman!

É importante que as pessoas que trabalham nas proximidades do íman compreendam inteiramente os potenciais perigos. É de extrema importância que as pessoas com pacemakers cardíacos ou implantes metálicos nunca se aproximem do íman.

Uma vez que a intensidade do campo de dispersão diminui significativamente ao aumentar a distância ao íman, é importante falar com o seu supervisor acerca da segurança no local de trabalho na proximidade de ímanes.

2.1.1 Segurança criogénica

O íman contém quantidades relativamente grandes de hélio e azoto líquidos. Estes líquidos, que designamos por criogénios, servem para manter o núcleo do íman a uma temperatura muito baixa.

Devido às temperaturas muito baixas envolvidas, durante o manuseamento de criogénios devem usar-se sempre **luvas, camisolas ou batas de laboratório com mangas compridas e óculos de proteção**. O contacto direto com estes líquidos pode causar queimaduras pelo frio. O gestor do sistema deve verificar e assegurar regularmente que os gases de evaporação podem sair livremente do íman, ou seja, as válvulas de escape não podem estar bloqueadas. Não tente reabastecer o íman com hélio ou azoto sem ter recebido formação sobre o procedimento correto.

O hélio e o azoto são gases não tóxicos. No entanto, devido a um possível **arrefecimento do íman**, devido ao qual a sala pode subitamente encher-se de gases evaporados, é necessário providenciar sempre ventilação adequada.

2.2 Segurança elétrica

O hardware do espectrômetro apresenta os mesmos perigos que qualquer equipamento pneumático ou eletrônico comum e deve ser tratado em conformidade. Não retire quaisquer painéis de proteção das diversas unidades. Foram implementados para proteger o utilizador e devem ser abertos apenas por pessoal de assistência qualificado. O painel principal na parte posterior da consola foi concebido para ser removido utilizando dois parafusos de extração rápida, mas mais uma vez esta operação só deve ser realizada por pessoal formado para o efeito. Tenha em atenção que, a não ser que sejam desligadas, as ventoinhas de arrefecimento no painel posterior continuarão a trabalhar mesmo depois de o painel ser removido.

2.3 Segurança química

Os utilizadores devem estar totalmente cientes de quaisquer perigos associados às amostras com as quais estão a trabalhar. Os compostos orgânicos podem ser extremamente inflamáveis, corrosivos, carcinogénicos, etc.

2.4 Certificação CE

Todas as principais unidades do hardware contidas nas consolas AVANCE, bem como as unidades periféricas, tais como a unidade HPPR, os sistemas de homogeneização e a sonda cumprem a Declaração de Conformidade CE. Isto inclui o nível de qualquer radiação eletromagnética de dispersão que pode ser emitida, bem como os perigos elétricos habituais. Tenha em atenção que para diminuir as fugas de radiação eletromagnética, as portas da consola devem estar fechadas e o painel posterior deve estar montado.



Nota: Estão disponíveis informações de segurança adicionais para os sistemas AVANCE no manual *Considerações Gerais de Segurança de Sistemas AVANCE* (N/P Z31836) disponível no DVD BASH.

3 Fundamento teórico introdutório e terminologia

A NMR é uma técnica utilizada para analisar a estrutura de muitas moléculas químicas, sobretudo compostos orgânicos. Um composto típico pode ser constituído por átomos de carbono, hidrogénio e oxigénio.

Na sua forma mais simples, uma experiência de NMR é constituída por três passos:

1. Colocar a amostra num campo magnético estático.
2. Excitar os núcleos na amostra com um impulso de radiofrequência.
3. Medir a frequência dos sinais emitidos pela amostra.

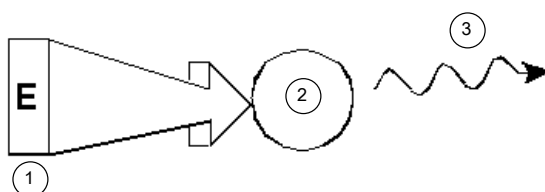


Figura 3.1: Excitação e resposta

1.	Impulso de excitação	2.	Átomo
3.	Sinal emitido		

A partir das frequências emitidas, os analistas podem deduzir informações acerca da ligação e disposição dos átomos na amostra. Os núcleos ativos de NMR na amostra apresentam ressonância de acordo com diversas frequências denominadas **frequências de ressonância**. São as frequências emitidas pelos núcleos quando estes são excitados pelo impulso de radiofrequência utilizado. O valor da frequência de ressonância depende de dois fatores:

1) Tipo de núcleo:

Cada isótopo apresenta uma combinação específica de prótons e neutrões no núcleo. A estrutura do núcleo determina, em grande parte, o valor da frequência de ressonância. Assim, cada isótopo apresenta uma **frequência de ressonância básica**. Os núcleos de ^{13}C apresentam uma frequência de ressonância básica diferente da obtida para o ^1H , etc. Repare na variação ampla nas frequências de ressonância básicas entre os diferentes isótopos na tabela seguinte:

Núcleo	Ativo em NMR	Frequência de ressonância básica (aprox.) [MHz]	Abundância natural [%]
^1H	sim	500	99.98
^2H	sim	77	0.015
^3H	sim	533	Residual (aprox. 10^{-18})
^{12}C	não	---	98.89
^{13}C	sim	126	1.11
^{35}Cl	sim	49	75.77
^{37}Cl	sim	41	24.23

Tabela 3.1: Tabela de dados para vários isótopos (frequências referentes a um íman de 11,7 T)

2) Ambiente atômico local:

O ambiente atômico local em que um isótopo está situado produz um efeito que se sobrepõe à frequência de ressonância básica. O valor preciso da frequência de ressonância de um núcleo de ^1H num composto específico depende dos átomos a que este está ligado e que rodeiam o núcleo. O núcleo está rodeado por elétrons, os quais podem ser entendidos como cargas elétricas móveis com campos magnéticos associados. Estes elétrons funcionam como uma fonte de blindagem magnética para o núcleo. O grau de blindagem depende do ambiente atômico local preciso. A dimensão das variações típicas do campo local (que resultam numa variação da frequência) dependem do isótopo e da intensidade do campo magnético em que a amostra é colocada. A tabela seguinte apresenta a variação típica da frequência para dois dos núcleos mais amplamente utilizados em NMR, ^1H e ^{13}C . Podemos facilmente constatar que o ambiente atômico local tem um efeito relativamente pequeno na frequência de ressonância básica.

Núcleo	Varição típica da frequência de ressonância básica devido ao ambiente atômico local.
^1H	6 kHz
^{13}C	30 kHz

Tabela 3.2: Variações da frequência (referentes a um íman de 11,7 T)

Os sinais de NMR são tipicamente traçados graficamente como espectros e analisados relativamente a duas características, **frequência** e **intensidade**. Na NMR convencional, a frequência é traçada no eixo horizontal, aumentando para a esquerda.

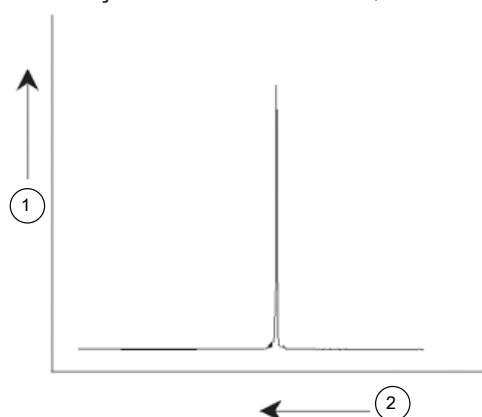


Figura 3.2: Espectro de NMR

1.	Intensidade
2.	Frequência

Conforme foi mencionado acima, a frequência fornece informações qualitativas relativamente ao ambiente atômico local. A **intensidade integrada** de um sinal é uma **medida da intensidade do sinal** e é determinada pela integral da área sob o pico do sinal. A integral é diretamente proporcional ao número de núcleos que contribuem para um sinal numa frequência específica (se todos os núcleos forem igualmente excitados) e, desta forma, fornece informações quantitativas acerca da estrutura química.

Para excitar um determinado núcleo numa experiência de NMR, a frequência do impulso de excitação deve corresponder estreitamente à frequência de ressonância do núcleo. Esta frequência é designada por **frequência portadora**. Assim, se as experiências forem realizadas com um íman de 11,7 T, o núcleo de ^1H requer uma frequência portadora de aproximadamente 500 MHz, enquanto que o núcleo de ^{13}C requer uma frequência portadora próxima de 126 MHz. A frequência portadora é especificada pelo parâmetro SFO1. O núcleo excitado por esta frequência portadora designa-se o **núcleo de observação**.

Tenha em atenção que existem experiências em que é excitado mais do que um núcleo, por exemplo, durante a transferência de polarização ou desacoplamento. Nestes casos, existe mais do que uma frequência portadora mas continua a existir apenas uma frequência de observação.

Nem todos os **isótopos** reagem a impulsos de radiofrequência, ou seja, nem todos são **ativos em NMR**. Estão presentes três isótopos do elemento hidrogénio na natureza: ^1H (hidrogénio), ^2H (deutério) e ^3H (trítio, radioativo!). A abundância natural destes isótopos é de 99,98%, 0,015% e 0,005%, respetivamente. Todos os três são ativos em NMR, embora apresentem uma frequência de ressonância muito diferente, conforme é indicado na tabela 3.1. Para analisar uma amostra de hidrogénio, o isótopo ^1H é excitado, visto que é, de longe, o mais abundante. Entre os isótopos de carbono encontrados na natureza, apenas um é ativo em NMR. O isótopo mais comum, ^{12}C (abundância natural de 98,89%), é inativo. Por este motivo, a análise de NMR de compostos orgânicos relativamente ao carbono dependem dos sinais emitidos pelo isótopo ^{13}C , o qual tem uma abundância natural de apenas 1,11%. Por razões óbvias, a análise de NMR para o carbono é mais difícil do que, por exemplo, para ^1H (existem outros fatores que afetam a sensibilidade, os quais são abordados nas secções seguintes deste capítulo).

Tendo em conta a breve introdução à NMR descrita acima, é um bom exercício ponderar a forma como a técnica pode ser utilizada para analisar a composição do clorofórmio (CHCl_3).

3.1 Análise de clorofórmio por NMR

Podem ser realizadas três experiências distintas, conforme indicado na figura abaixo, correspondentes aos três possíveis núcleos de observação: ^1H , ^{13}C e ^{35}Cl .

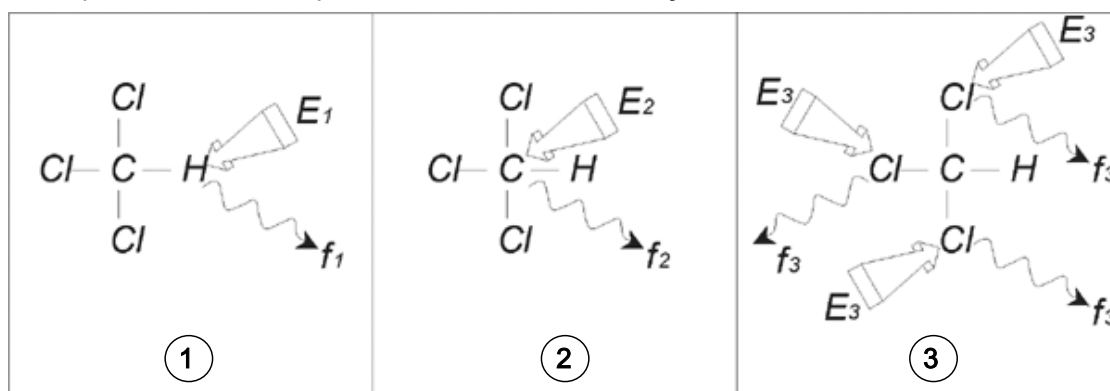


Figura 3.3: Análise de CHCl_3 por NMR

1	Excitação E_1
2	Excitação E_2
3	Excitação E_3

Três impulsos de excitação (E_1 , E_2 , E_3) são incididos sobre a amostra nas frequências portadoras adequadas. E_1 corresponde à frequência de ressonância do ^1H , E_2 para a frequência do ^{13}C e E_3 para a frequência do ^{35}Cl . Assumindo que os três isótopos foram excitados com êxito, a amostra emite sinais em três frequências f_1 , f_2 e f_3 , as quais são registadas em três espectros distintos. Se os sinais emitidos forem apresentados num único gráfico, o utilizador pode antecipar um espectro semelhante ao ilustrado na figura abaixo (tenha em atenção que as frequências indicadas correspondem a um íman de 11,7 T e que todos os sinais foram traçados como singletos, ou seja, picos únicos).

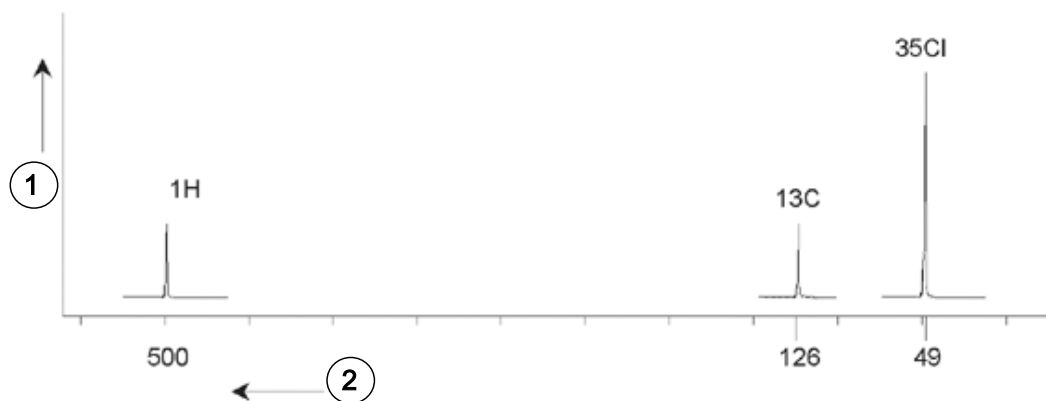


Figura 3.4: Sinais de NMR emitidos por CHCl_3

1	Intensidade
2	Frequência (MHz)

Este espectro artificial apresenta três picos correspondentes aos três isótopos. Tendo em conta os números relativos dos três isótopos, poderia esperar-se que a intensidade dos picos de cloro, de hidrogênio e de carbono apresentassem a razão 3:1:1. No entanto, a abundância natural dos três isótopos também deve ser contabilizada, resultando na razão 227:100:1. O utilizador irá observar que as razões de intensidade de picos determinadas experimentalmente não são concordantes com estes valores. Isto explica-se por cada isótopo ter uma sensibilidade inerente à técnica de NMR. O ^1H é 63 vezes mais sensível à NMR do que o ^{13}C . Por conseguinte, mesmo que uma amostra contenha o mesmo número de núcleos de ^1H e de ^{13}C , a intensidade dos sinais de ^1H é 63 vezes superior à dos sinais de ^{13}C .

Ao obter um gráfico semelhante ao ilustrado na figura acima, qualquer informação detalhada é perdida e não é possível obter uma determinação precisa de uma frequência. O espectro dir-se-ia de resolução muito fraca (a resolução horizontal de um espectro é uma medida da qualidade de diferenciação entre dois sinais de frequência semelhante).

A grande amplitude da escala vertical é outro fator problemático. Devido à variação na sensibilidade inerente à NMR, em conjunto com as variações na abundância natural, o traçado de sinais de isótopos num único gráfico é frequentemente não exequível. De facto, a resolução vertical do espectro será muito fraca (a resolução vertical, ou seja, a razão sinal-ruído de um espectro, é uma medida da sensibilidade).

Se a nossa análise do clorofórmio parece estar a ser complicada até ao momento, isto sucede porque tentamos comparar os sinais de três núcleos de observação diferentes num único espectro (neste caso, são ignoradas todas as restrições do hardware ou eletrónicas). Por este motivo, na prática, as experiências de NMR são realizadas com um único núcleo de observação. Apesar de ser possível excitar mais do que um isótopo em simultâneo, ao utilizar mais do que uma frequência portadora (p. ex., experiências de desacoplamento) apenas são observados os sinais de um único isótopo. Desta forma, a análise do espectro é muito simplificada.

Foi mencionado anteriormente que as variações na frequência de ressonância básica devido ao ambiente atómico local têm tendência a ser relativamente pequenas. Por conseguinte, não serão observados grandes intervalos espectrais. Adicionalmente, a abundância natural e a sensibilidade inerente serão sempre constantes para um isótopo. Consequentemente, a intensidade relativa de, p. ex., dois sinais emitidos por isótopos ^1H num único espectro depende exclusivamente do número de átomos que contribuem para o sinal. Isto simplifica grandemente a análise de espectros relativamente a informações quantitativas. Antes de avançar para uma descrição mais pormenorizada da NMR, o leitor deve familiarizar-se com o conceito de medição de sinais em *ppm* (partes por milhão) relativamente a um sinal de referência.

3.2 Compostos de referência, Hertz, ppm

Conforme mencionado, os sinais de NMR são analisados relativamente a duas características: intensidade e frequência. As frequências absolutas são medidas em Hertz (Hz - ciclos por segundo) ou Megahertz (MHz). A notificação de sinais medidos é simplificada se todas as medições da frequência forem realizadas em relação a uma referência. Para a NMR de ^1H , a referência recomendada é um químico denominado tetrametilsilano (TMS). Quando um espectro de ^1H ou de ^{13}C é adquirido, a presença de TMS produz um único pico, facilmente identificável. Este pico é referenciado como zero e as frequências de todos os outros picos são fornecidas em termos da sua frequência em comparação com a frequência de TMS. Assim, pode afirmar-se que um sinal está 2,5 kHz *acima* do pico de TMS. Esta indicação é preferível à descrição da frequência absoluta do sinal, a qual pode apresentar-se como 500,1325 MHz, por exemplo.

A referência de sinais em relação ao pico de TMS reduz claramente o número de algarismos necessários para descrever a frequência do sinal. No entanto, isto pode ser ainda mais simplificado ao utilizar a unidade ppm em vez de Hertz. A unidade ppm representa as frequências como uma fração da frequência de ressonância absoluta, a qual depende da intensidade do íman. A vantagem da unidade ppm consiste na independência entre as medições de frequência e a intensidade do íman. Isto simplifica grandemente a comparação dos espectros adquiridos em espectrômetros diferentes.

Os fatores de conversão que devem ser utilizados ao passar de Hertz para ppm e vice-versa são indicados no diagrama abaixo.

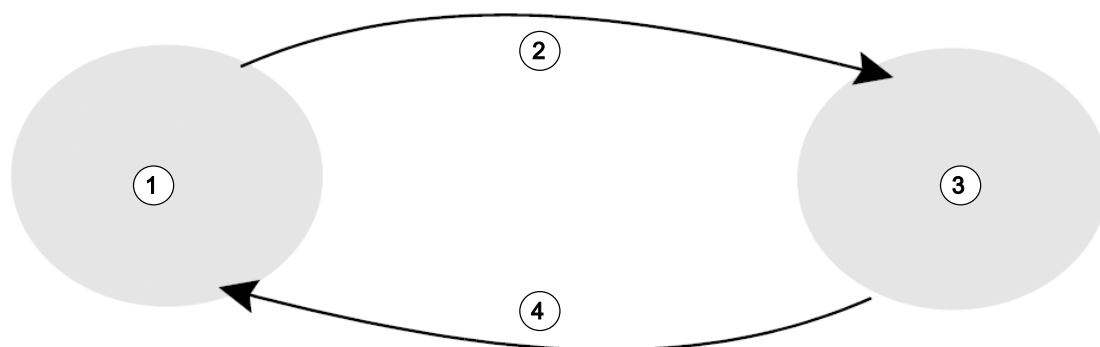


Figura 3.5: Conversão de Hertz e ppm

1	Hertz	3	ppm
2	Dividir pela frequência portadora (SFO1) em MHz	4	Multiplicar pela frequência portadora (SFO1) em MHz

As vantagens da utilização da unidade ppm são melhor ilustradas através de um exemplo prático.

Imagine que um sinal de ^1H foi observado a 2,5 kHz acima de TMS com uma frequência portadora (SFO1) de 500 MHz. A frequência de qualquer sinal de NMR emitido é diretamente proporcional à intensidade do íman. O mesmo sinal apareceria a 3,0 kHz acima de TMS num espectrômetro de 600 MHz e a 2,0 kHz acima de TMS num equipamento de 400 MHz. Uma única conversão pode não ser muito inconveniente, mas deve ser efetuada para cada pico em cada sistema. Considere agora o mesmo sinal, indicado na unidade ppm.

Frequência em Hertz dividida por SFO1 = Frequência em ppm

Exemplos:

$$2500 \text{ Hz} / 500 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

$$3000 \text{ Hz} / 600 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

$$2000 \text{ Hz} / 400 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

O sinal de ^1H pode agora ser descrito como estando localizado 5 ppm *acima* (ou seja, à esquerda) do pico de TMS, independentemente da frequência do espectrómetro.

Os utilizadores experientes utilizam sempre ppm e os espectros reproduzidos em publicações científicas apresentam a escala horizontal graduada em ppm, em vez de Hertz.

O leitor deverá ter em conta que o exemplo anterior inclui algumas simplificações. O valor da frequência portadora para ^1H num espectrómetro de 500 MHz não será exatamente 500 MHz. A frequência portadora a utilizar num cálculo de ppm deverá ser o valor preciso atribuído ao parâmetro SFO1. De igual modo, para os espectrómetros de 600 MHz e 400 MHz mencionados acima, a frequência portadora para ^1H não será exatamente 600 MHz e 400 MHz, respetivamente.

Tenha também em consideração que um valor de ppm positivo indica uma frequência superior à de TMS e define-se como estando à *esquerda* em relação a TMS.

3.3 NMR de prótons - Desvio químico

Uma vez que o ^1H é o isótopo observado mais frequentemente em experiências de NMR, este tópico será abordado em maior detalhe nesta secção. O núcleo de ^1H contém um único próton e os espectros em que o ^1H é o núcleo de observação são normalmente referidos como espectros de prótons.

Foi mencionado anteriormente que um próton num íman de 11,7 T apresenta uma frequência de ressonância básica de aproximadamente 500 MHz, mas a frequência de ressonância precisa depende do ambiente atómico local. Um próton numa molécula de clorofórmio apresenta uma frequência de ressonância ligeiramente diferente do que um próton numa molécula de benzeno (C_6H_6). Consequentemente, a frequência emitida funciona como um identificador que fornece informações qualitativas aos analistas acerca da vizinhança atómica local em que um próton está situado. Este é o fundamento da NMR.

A variação na frequência de ressonância precisa é referida como o *desvio químico*. A frequência de ressonância é desviada pelo efeito dos átomos vizinhos e pela intensidade da blindagem magnética dos eletrões locais, conforme mencionado anteriormente. A dimensão do desvio é normalmente medida em ppm em relação ao pico de TMS, o qual é estabelecido como uma referência a 0 ppm.

A maioria dos prótons, independentemente do composto orgânico a que estão ligados, apresentam desvios químicos no intervalo de 14 ppm em relação a TMS. A figura abaixo é uma ilustração dos desvios químicos típicos de prótons em compostos orgânicos.

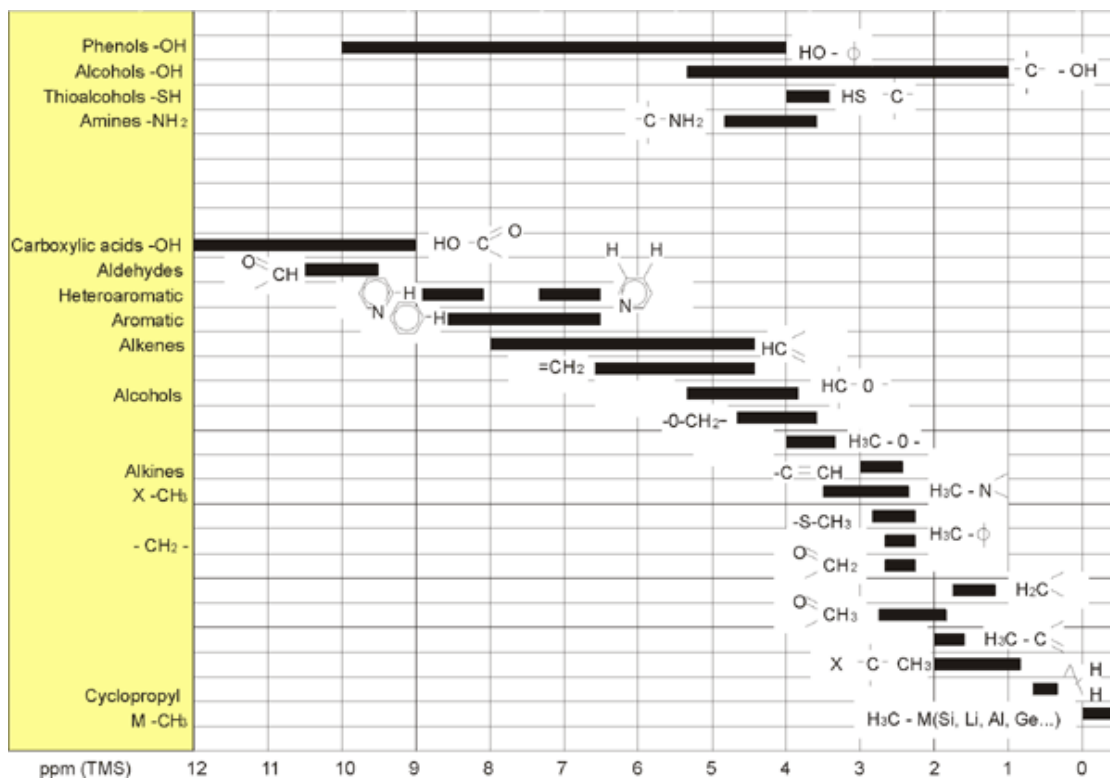


Figura 3.6: Desvios químicos de ^1H em compostos orgânicos

3.4 Espectro de prótons de benzeno

A estrutura do anel de benzeno é ilustrada na figura seguinte:

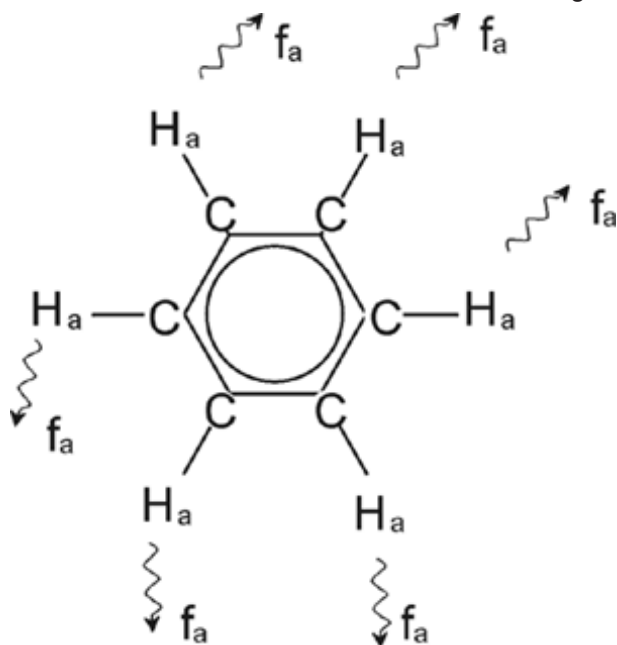


Figura 3.7: Anel de benzeno

Todos os seis prótons (identificados como H_a) podem parecer idênticos. Cada um deles apresenta uma ligação simples a um átomo de carbono. Por sua vez, cada átomo de carbono forma duas ligações aromáticas com os átomos de carbono mais próximos. Conseqüentemente, cada um dos seis prótons está num ambiente químico idêntico e designam-se *quimicamente equivalentes*, sendo também *magneticamente equivalentes*, neste caso. Todos os prótons apresentam exatamente a mesma frequência de ressonância f_1 , sem apresentar um padrão de acoplamento. Por este motivo, é possível prever um sinal individual para benzeno puro. A figura abaixo representa um espectro de benzeno em acetona- d_6 e indica que o sinal está localizado a 7,5 ppm.

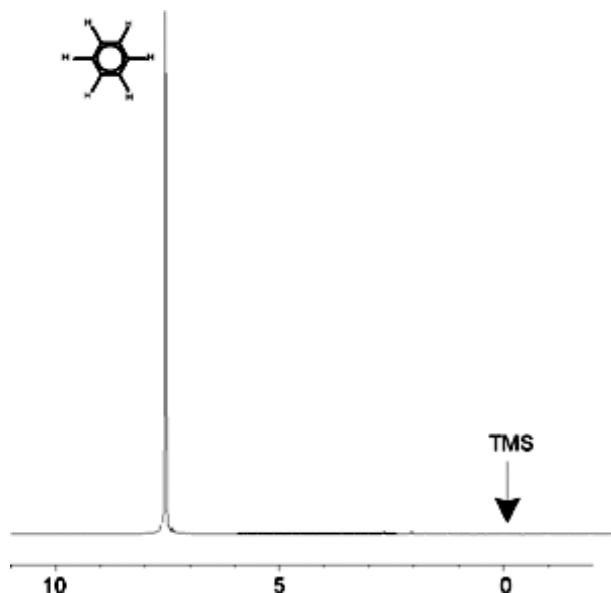


Figura 3.8: Espectro de benzeno

3.5 Espectro de prótons de benzilacetato

O benzilacetato ($C_6H_5 - CH_2 - O - CO - CH_3$) é uma molécula orgânica mais complexa, cuja estrutura está ilustrada na figura seguinte:

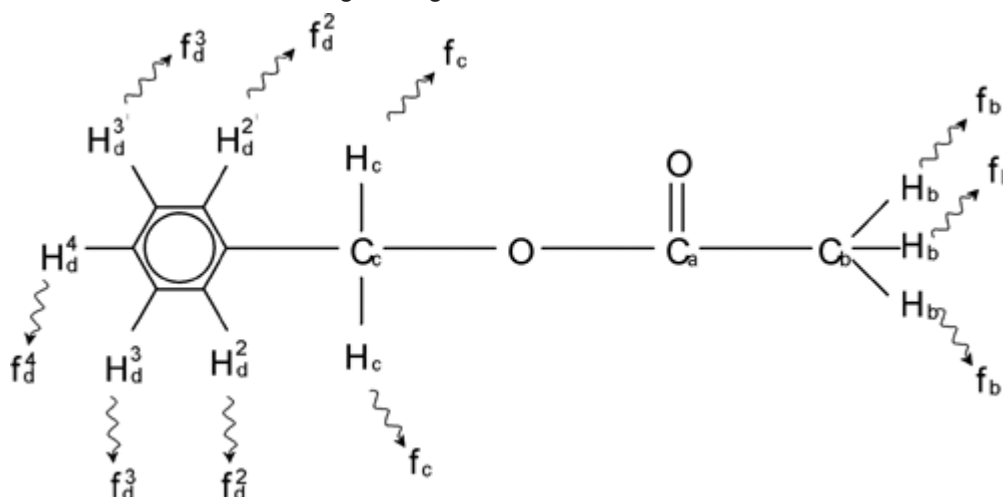


Figura 3.9: Benzilacetato

É agora possível distinguir três diferentes grupos de prótons, respetivamente identificados. Por exemplo, os três prótons identificados como H_b estão claramente num ambiente atômico diferente dos prótons identificados como H_c .

Os três prótons H_b estão ligados ao carbono C_b , o qual apresenta uma ligação simples a um átomo de carbono C_a . Os dois prótons H_c estão ligados ao carbono C_c , que por sua vez tem uma ligação simples ao anel de benzeno e a um átomo de oxigênio. O terceiro grupo de prótons é constituído pelos cinco prótons H_d do anel de benzeno propriamente dito. A figura abaixo representa um espectro de prótons de benzilacetato em acetona- d_6 . Neste espectro, prevemos três sinais correspondentes aos três grupos de prótons.

Repare que a posição dos sinais dos prótons do anel de benzeno foi ligeiramente desviada de 7,5 ppm (indicado na figura do espectro de benzeno) para aproximadamente 7,2 ppm (indicado na figura abaixo).

Os prótons do anel de benzeno já não são magneticamente equivalentes, até certo ponto não são quimicamente equivalentes, e foram identificados em conformidade. Na figura 3.10, o sinal obtido dos prótons H_d é claramente um multipletto, mas estes pormenores serão omitidos até à secção seguinte. Os três picos de prótons ilustrados nesta figura têm intensidades claramente diferentes.

A análise quantitativa do espectro é relativamente simples, uma vez que todos os sinais são emitidos pelo mesmo isótopo 1H , ou seja, a abundância natural e a sensibilidade inerente à técnica de NMR são idênticas para cada pico. Por conseguinte, a área sob os picos de benzeno, de CH_2 e de CH_3 deverão apresentar a razão 5:2:3 respetivamente, correspondendo ao número de prótons que contribuem para os sinais.

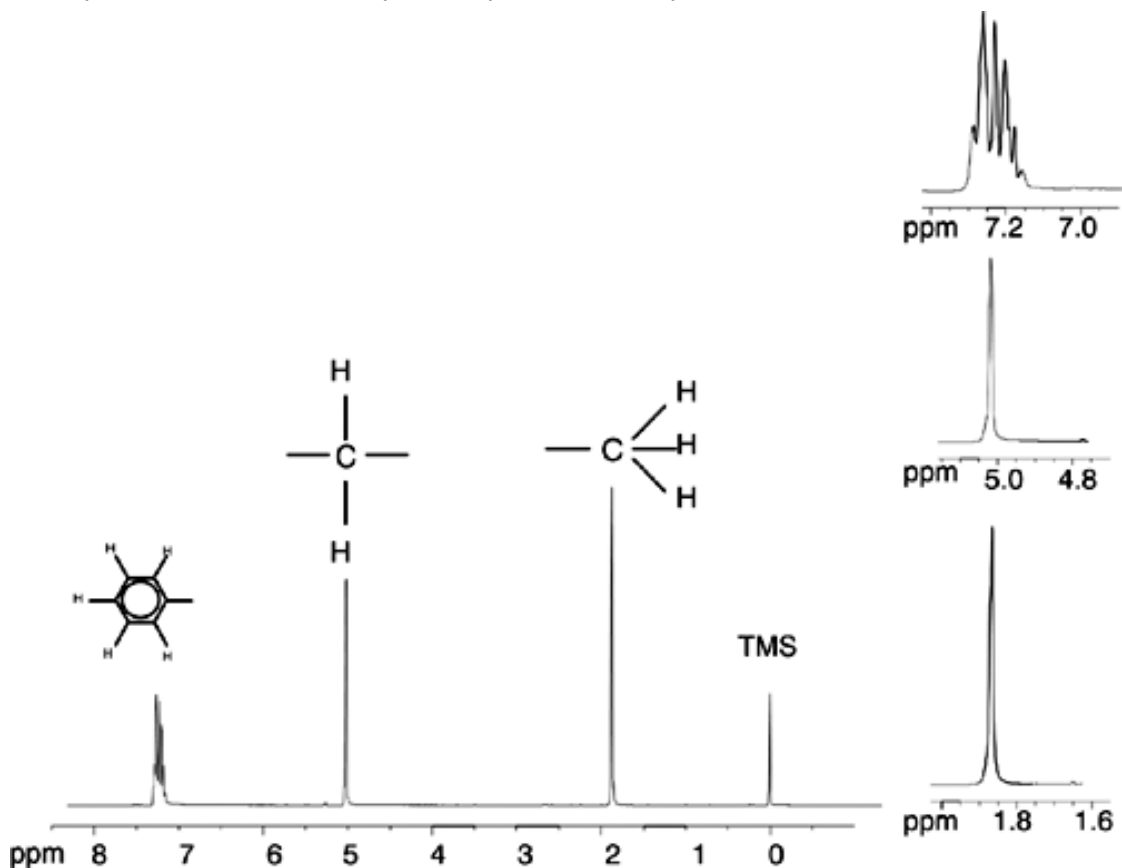


Figura 3.10: Espectro de prótons de benzilacetato

3.6 Espectro de prótons de etilbenzeno com acoplamento spin/spin

A descrição dos espectros de prótons em NMR até este momento tem sido muito simplificada devido ao facto de todos os sinais, com exceção dos sinais do anel de benzeno em benzilacetato, serem singletos. A estrutura do composto orgânico etilbenzeno e os espectros de prótons correspondentes estão ilustrados na figura Etilbenzeno e na figura Espectro de Etilbenzeno, respetivamente. Tal como antes, os prótons foram identificados como três grupos distintos correspondentes a três ambientes atômicos básicos.

A diferença mais óbvia entre os sinais neste espectro e os sinais do benzilacetato consiste na divisão em **multipletos**. O sinal emitido pelos prótons CH_3 é um **tripletto** e o sinal dos prótons CH_2 é um **quarteto**. Repare também que as posições dos sinais não coincidem. Os prótons CH_3 no benzilacetato emitem um sinal a 1,85 ppm, enquanto os prótons CH_3 correspondentes no etilbenzeno emitem o sinal de tripletto a 1,25 ppm. Isto não é surpreendente, visto que os dois grupos CH_3 estão em ambientes químicos diferentes.

A causa da divisão em multipletos é um efeito conhecido como acoplamento spin-spin. Uma descrição total deste efeito não está no âmbito deste manual e o leitor deverá consultar a bibliografia padrão sobre NMR para obter mais pormenores. Para a finalidade deste manual, deverá bastar uma descrição em linhas gerais do acoplamento spin-spin.

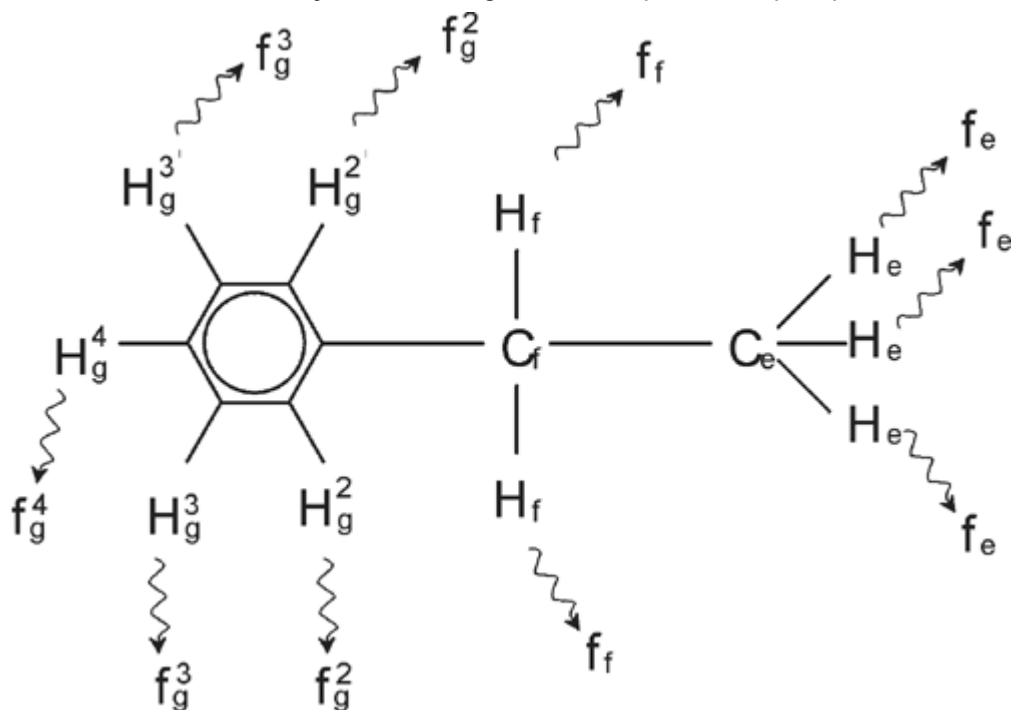


Figura 3.11: Etilbenzeno

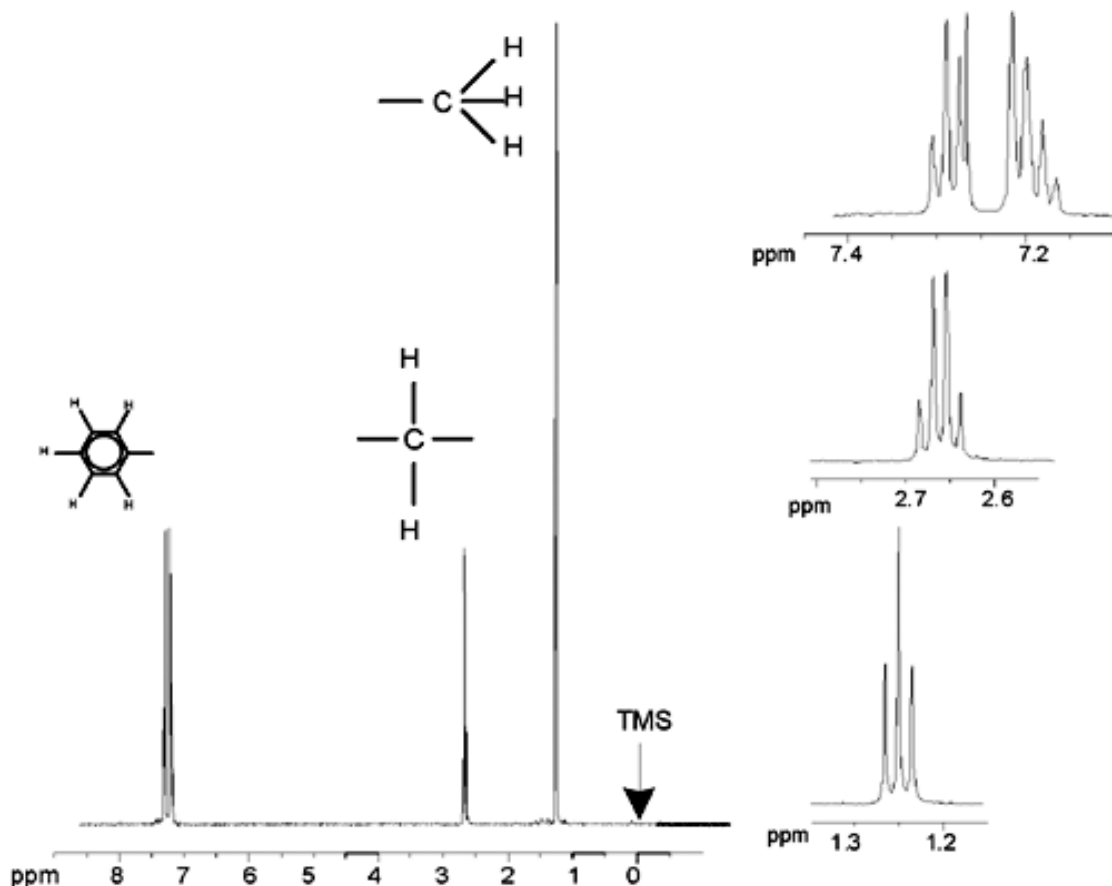


Figura 3.12: Espectro de etilbenzeno

A divisão dos sinais de NMR na figura Etilbenzeno resulta de uma interação magnética entre os prótons vizinhos. Os dois prótons H_f são magneticamente equivalentes e não interagem entre si. De forma semelhante, os três prótons H_e são magneticamente equivalentes e não se afetam mutuamente. No entanto, os dois prótons H_f e os três prótons H_e estão em ambientes locais diferentes e estão “acoplados” entre si através dos respectivos elétrons de ligação. O resultado final deste acoplamento é a interação entre os dois grupos de prótons, levando à divisão dos sinais de NMR.

Os dois prótons H_f podem combinar-se para existir em três estados magnéticos possíveis (isto é um resultado da orientação de spin, daí o termo acoplamento spin-spin). Como consequência do acoplamento, os sinais de NMR emitidos pelos prótons H_e apresentam três frequências de ressonância possíveis e é observado um tripleto.

De forma semelhante, o efeito dos prótons H_e resulta na divisão dos sinais de H_f. Os três prótons H_e podem combinar-se para existir em quatro estados magnéticos possíveis. Consequentemente, os prótons H_f apresentam quatro frequências de ressonância possíveis e o sinal é dividido num quarteto.

Os sinais dos prótons de benzeno foram também divididos em resultado da não equivalência magnética e do acoplamento spin-spin resultante. É pertinente observar que os prótons CH₂ e CH₃ do etilbenzeno interagem entre si, enquanto que os dois grupos de prótons comparáveis no benzilacetato não apresentam esta interação. Esta diferença deve-se ao número de ligações que separa os dois grupos. No etilbenzeno, os dois grupos de prótons estão ligados a átomos de carbono adjacentes e pode prever-se uma interação suficiente entre os grupos. No entanto, no benzilacetato, os dois átomos de carbono C_c e C_b estão ligados através de duas ligações adicionais entre oxigénio e outro átomo de carbono. Como resultado, os grupos de prótons estão demasiado distantes para apresentar acoplamento spin-spin significativo entre si.

3.7 Desacoplamento

O efeito do acoplamento spin-spin pode ser removido através de uma técnica chamada "desacoplamento". O efeito do desacoplamento oculta a presença de um grupo de prótons específicos, p. ex., os prótons H_e na figura Etilbenzeno. É adquirido um espectro como se os prótons H_e estivessem ausentes! Este efeito é obtido ao transmitir uma sequência de impulsos de desacoplamento na frequência de ressonância para H_e , f_e , alterando permanentemente a orientação de spin destes prótons. Para o espectro ilustrado na figura Espectro de Etilbenzeno, a frequência de desacoplamento seria 1,25 ppm acima do pico de TMS.

Os impulsos de desacoplamento tendem a ter maior duração e menor energia que os impulsos de excitação. A figura Experiência de Desacoplamento abaixo representa uma experiência de desacoplamento, enquanto que a figura Espectro de Etilbenzeno com Homodesacoplamento apresenta o espectro desacoplado. O quarteto CH_2 passou a ser um **singleto**. Os técnicos de espectroscopia referem-se ao colapso do quarteto num singleto. Adicionalmente, a área sob o singleto deverá ser igual à do quarteto original (compare as alturas relativas dos picos do grupo CH_2 e do anel de benzeno nas duas figuras). O sinal do grupo CH_3 a 1,25 ppm está ausente do espectro com desacoplamento, uma vez que os impulsos de desacoplamento removem efetivamente os efeitos da presença dos prótons CH_3 .

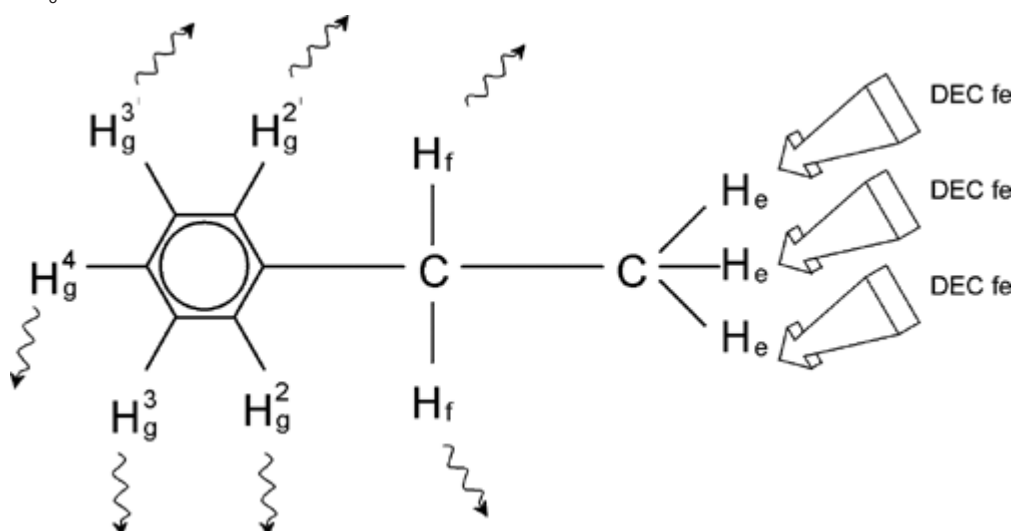


Figura 3.13: Experiência de desacoplamento

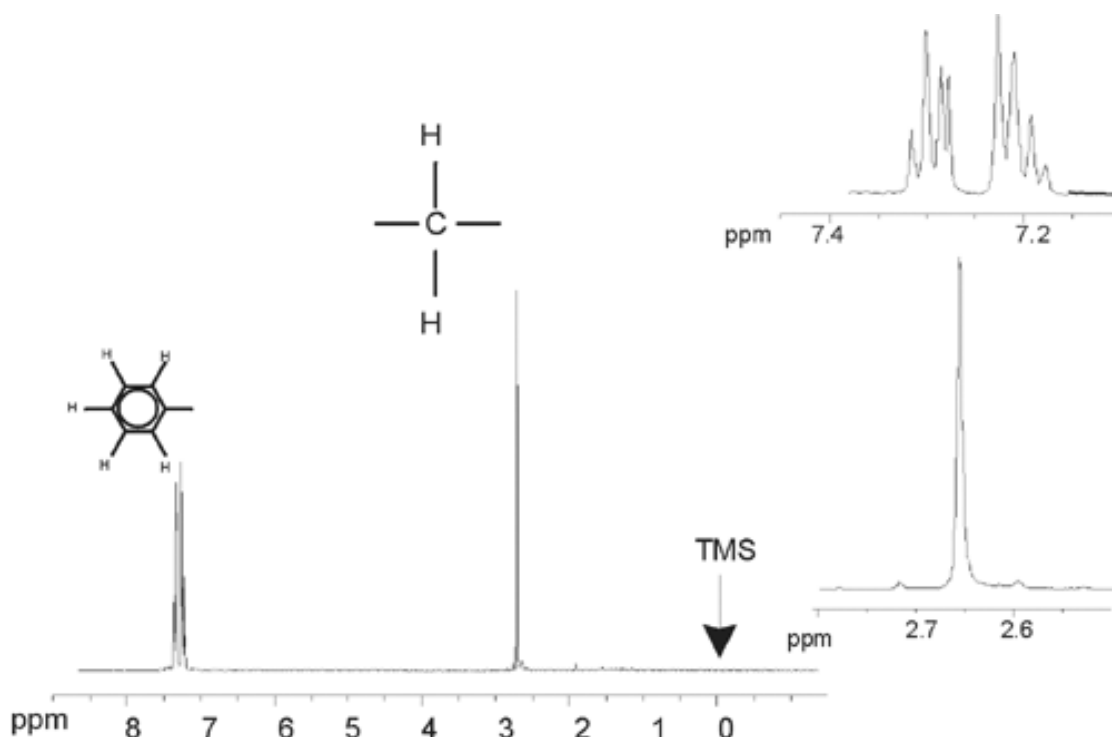


Figura 3.14: Espectro de etilbenzeno com homodesacoplamento

A experiência descrita acima é um exemplo de homodesacoplamento, na medida em que o mesmo isótopo ¹H é observado e desacoplado. O heterodesacoplamento é aplicável quando o isótopo observado é diferente do isótopo desacoplado. No capítulo [Espectro de ¹³C com desacoplamento de prótons \[▶ 67\]](#) deste manual, o utilizador realizará uma experiência de heterodesacoplamento na qual o ¹³C é observado e o ¹H é desacoplado. Os espectrômetros AVANCE têm a capacidade de realizar tipos muito complexos de experiências, dependendo do número de canais instalados. É possível utilizar um espectrômetro de quatro canais para observar um núcleo e desacoplar três outros núcleos. Ao dispor de até oito canais independentes, a gama possível de experiências é impressionante. O utilizador deverá ter em atenção que o fator limitador atual não é a geração de excitação de RF e impulsos de desacoplamento, mas a transmissão destes impulsos para a amostra através das sondas e, em certa medida, os pré-amplificadores. O encaminhamento do sinal da experiência a realizar é configurado através do menu "edasp". São fornecidos mais pormenores no manual "Parâmetros e comandos de aquisição" (N/P H9775SA3).

3.8 FID e espectro

Os sinais emitidos pelos átomos excitados na amostra são recebidos pelo espectrómetro e convertidos numa transformada de Fourier pelo software do computador da estação de dados. O processo de recepção dos sinais de NMR denomina-se aquisição. Os dados dizem-se adquiridos. Deve ser salientada uma distinção entre os dois termos; "FID" (domínio de tempo) e o "espectro" associado (domínio de frequência).

Quando uma aquisição é realizada, os dados não processados são adquiridos e o sinal recebido denomina-se Decaimento de Indução Livre (FID, Free Induction Decay). Um FID típico é ilustrado na figura abaixo.

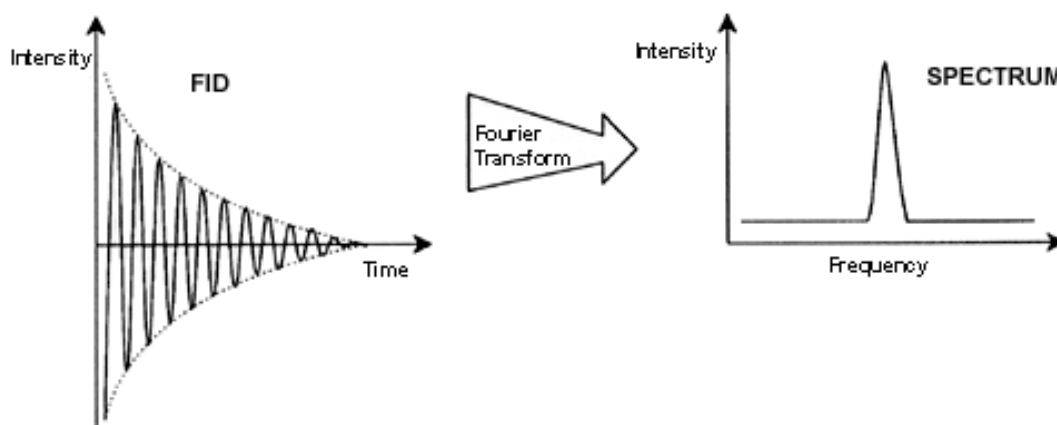


Figura 3.15: Transformada de Fourier

Antes de ser possível analisar efetivamente um FID, este deve ser transformado no domínio de frequência. Este processo é realizado através de uma transformada de Fourier. Uma **transformada de Fourier** é uma operação matemática que converte o FID num espectro de frequência. Uma **FID** é um sinal cuja intensidade varia ao longo do tempo, enquanto que um espectro indica a variação da intensidade em função da frequência. A transformada de Fourier é a mais importante de várias operações de processamento tipicamente realizadas nos dados não processados.

4 Descrição do sistema

O espectrómetro é constituído pelas seguintes subunidades:

- **Consola do operador**, incluindo o computador anfitrião, o monitor e o teclado.
- **Consola** com o hardware eletrónico.
- **Sistema de íman**, incluindo o sistema de homogeneização e a sonda.



Figura 4.1: Consola e íman de ascensão AVANCE NEO

4.1 Descrição geral da arquitetura AVANCE

A imagem abaixo apresenta uma descrição geral e simplificada da arquitetura de um sistema AVANCE NEO. Utilize o BASH (guia de assistência avançada da Bruker) para obter mais informações acerca do sistema e hardware AVANCE.

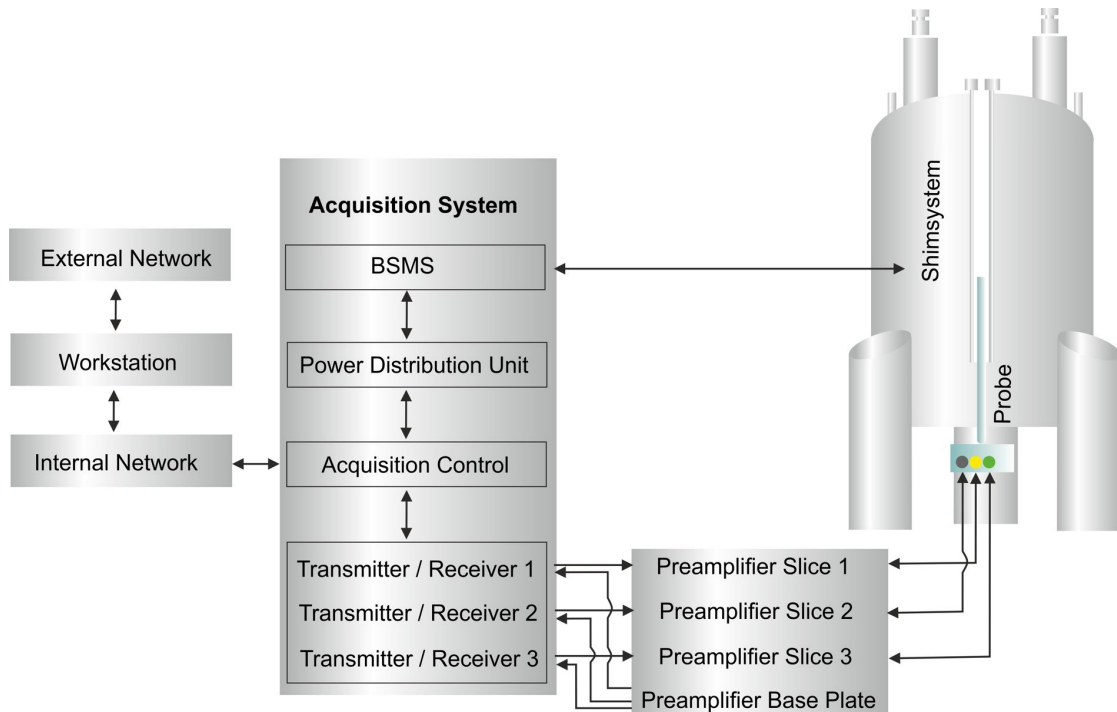


Figura 4.2: Descrição geral da arquitetura AVANCE NEO

4.1.1 Consola do operador e ligações

Todos os aspetos da operação do espectrómetro são controlados a partir da consola do operador. O planeamento e a implementação das experiências, assim como a análise dos dados, são controlados através de comandos introduzidos pelo operador na consola. Os subcomponentes da consola do operador são:

computador anfitrião: Um computador pessoal (PC). O computador anfitrião executa o programa TopSpin e gere toda a análise e armazenamento de dados. Todas as operações relevantes para a aquisição de dados são controladas por um segundo sistema de computação designado AQS localizado no interior da consola.

Ligação Ethernet do computador anfitrião ao AQS: É utilizada para transferir dados e instruções entre o computador anfitrião e o AQS.

4.2 Consola

Esta unidade pode ser uma consola NanoBay, OneBay ou TwoBay dependendo do sistema e incorpora a maioria do hardware eletrónico associado a um espectrómetro digital moderno. As unidades principais são o **AQS**, o **BSMS** (Sistema de Íman Inteligente da Bruker), bem como vários amplificadores e amplificadores de gradiente (no caso de microimagem ou difusão).

AQS: As várias unidades no AQS geram os impulsos de radiofrequência utilizados para excitar a amostra e receber, amplificar e digitalizar os sinais de NMR emitidos pela amostra. Para cada canal de RF, existe um transceptor (**TRX 1200**) que interpreta o programa de impulsos, transforma-o em sinais de RF e inclui um recetor, digitalizador e filtração digital dos dados. Isto significa que uma consola AVANCE é um sistema genuíno de receção múltipla que, por design, tem tantos recetores como os canais de excitação de impulsos. Os gradientes de campo pulsado são gerados mediante uma unidade adicional designada **GTU** (Unidade de Gradiente e Temporização). Esta unidade também gera disparadores em tempo real utilizados para sincronizar outras unidades e recebe entradas do disparador (por exemplo, o disparador do rotor do MAS). A placa REF (referência) proporciona um sinal de relógio comum para todos os canais. Assim, todas as frequências na cadeia de RF são derivadas de um oscilador de quartzo de alta precisão para garantir sincronidade geral e baixos níveis de ruído. O AQS também incorpora a **EPU**. Trata-se de um computador poderoso que administra o espectrómetro AVANCE, envia as informações do programa de impulsos para as unidades TRX e GTU, fornece o controlo de aquisição e comunica com estações de trabalho de processamento de dados externas. A última fase da filtração digital é efetuada na EPU, assim como a acumulação dos dados do FID. As informações são então transferidas via Ethernet para o computador anfitrião externo para processamento e armazenamento. É importante salientar que a EPU tem controlo total sobre a operação do espectrómetro durante uma experiência. Isto visa assegurar uma operação sem interrupções e garantir a integridade da aquisição.

BSMS: Este sistema é controlado através do software (utilizando o comando "bsmsdisp") e é utilizado para operar o sistema de bloqueio e de homogeneização, assim como controlar a elevação e rotação da amostra. A unidade **BSVT** também está incorporada no BSMS. Tem por função variar a temperatura da amostra de forma controlada ou manter a temperatura num valor constante. Além disso, podem ser colocados até três **GAB/3** no bastidor do BSMS. Fornecem gradientes de campo pulsado para sondas de alta resolução e são controlados pela **GTU**.

Amplificadores, também designados **Transmissores**. Para excitar a amostra de NMR são necessários sinais de amplitude relativamente grande e daí a necessidade de amplificar os sinais de RF a partir de unidades TRX. Os amplificadores podem ser internos (incorporados no bastidor de AQS) ou externos (unidades autónomas distintas). Os cabos que ligam as saídas dos amplificadores diretamente ao **HPPR** (High Performance Preamplifier, ou Pré-amplificador de Alto Desempenho) transportam o sinal de RF para a amostra. Embora exista uma gama vasta de amplificadores disponíveis (incluindo amplificadores sólidos), as duas principais categorias são:

Os **amplificadores seletivos**, por exemplo, amplificadores de ^1H , ^{19}F , ^{13}C ou ^{31}P foram concebidos especificamente para amplificar as frequências mais altas associadas aos ^1H , ^{19}F , ^{13}C ou ^{31}P .

Os **amplificadores de banda larga** (também designados amplificadores X) foram concebidos para amplificar uma gama vasta de frequências. São utilizados para a excitação dos chamados núcleos X (ou seja, tipicamente tudo, exceto ^{19}F e ^1H).

Tenha em atenção que os novos amplificadores de banda larga também cobrem ^{19}F até 600 MHz, o que simplifica a utilização de sondas SMART e sondas BBFO, em que a bobina X de banda larga pode ser ajustada para ^{19}F .

PDU: Uma unidade de distribuição de alimentação na parte traseira da consola é utilizada para alimentar o espectrómetro de maneira controlada. É possível ligar/desligar o AVANCE através de uma instrução de software do TopSpin. A PDU certifica-se de que todas as unidades são ligadas/desligadas na ordem correta e de que as unidades de alta potência são ligadas com atrasos de tempo adequados para limitar a corrente de irrupção do sistema.

4.3 Ligação entre o computador anfitrião e o AQS

Embora esta ligação esteja permanentemente em utilização e seja efetivamente invisível para o utilizador durante uma sessão típica do TopSpin, a ligação é quebrada sempre que o computador anfitrião ou a consola forem desligados e deve ser restabelecida ao voltar a ligar estes equipamentos. Isto é efetuado automaticamente.

4.4 Íman, Sistema de homogeneização, HPPR e Sonda

O **íman** gera o campo magnético necessário para induzir transições de NMR. Para manter um sistema supercondutor, o núcleo do íman é arrefecido a temperaturas muito baixas com recurso a azoto e hélio líquidos (para obter mais pormenores, consulte a secção [O íman e Dewar do íman \[> 27\]](#)).

O **sistema de homogeneização** à temperatura ambiente, montado na extremidade inferior do íman, é um conjunto de bobinas eletrocondutoras (chamadas homogeneizadores) utilizadas para maximizar a homogeneidade do campo através da compensação de qualquer não homogeneidade. As correntes nestes homogeneizadores à temperatura ambiente (uma vez que não são arrefecidos por imersão em hélio líquido) são controlados pelo BSMS e podem ser ajustados através do ecrã do BSMS para otimizar o sinal de NMR. Isto tem um grande efeito na resolução e sensibilidade do sinal. Esta ação de ajustamento das correntes nos homogeneizadores à temperatura ambiente designa-se **homogeneização** do íman.

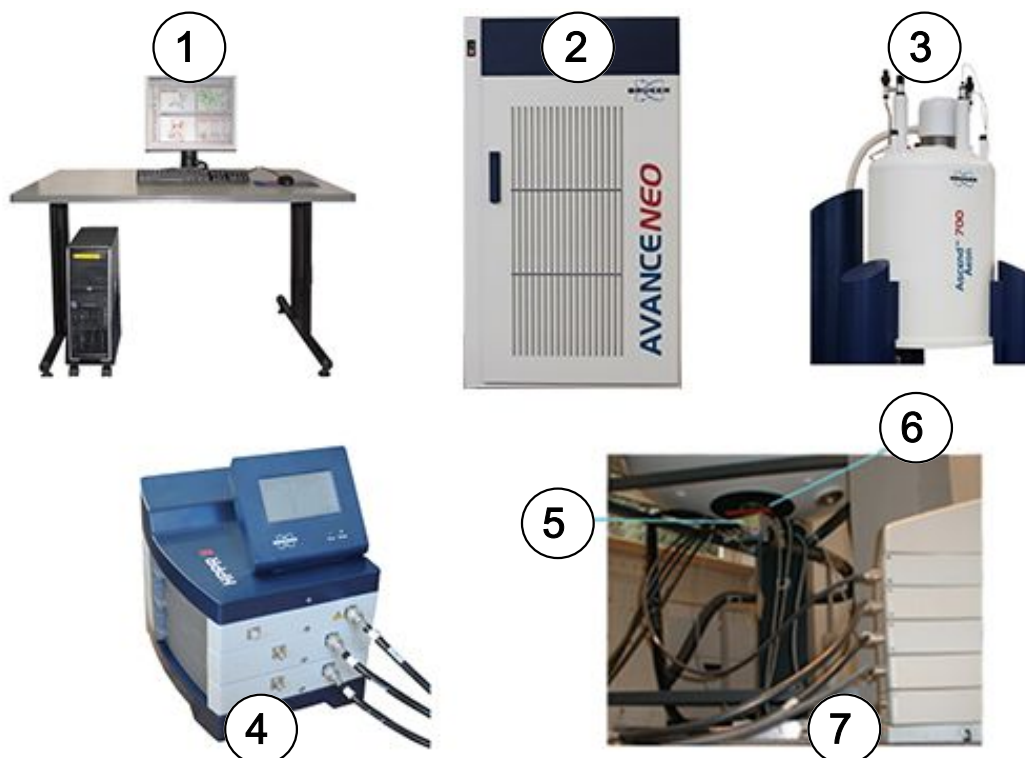


Figura 4.3: Fotografia do Íman, Sistema de homogeneização, Sonda e HPPR

1	Consola do operador	5	Sonda
2	Consola	6	Sistema de homogeneização
3	Íman	7	Sonda e sistema de homogeneização
4	Módulo HPPR/2 Cobertura 2 com ligações à sonda		

Embora o **HPPR/2** (Pré-Amplificador de Alto Desempenho) transporte o sinal transmitido *para* a amostra, a sua função principal é a amplificação de sinais relativamente fracos emitidos *pela* amostra. Está localizado na base do íman para amplificar o sinal de NMR o mais cedo possível, minimizando as perdas ao longo do cabo. Após a amplificação do sinal pelo HPPR/2, as perdas subsequentes ao longo do cabo são menos importantes. O HPPR/2 também transmite e recebe sinais de bloqueio de deutério (ou flúor) e é utilizado na rotina de oscilação. É possível configurar até 8 (**HPPR/2**) módulos individuais (excluindo o módulo de cobertura, o qual está sempre presente). A configuração de três módulos individuais **Proton**, **X-BB** e **2H**, em conjunto com um módulo de cobertura, é muito frequente.

A sonda é inserida no sistema de homogeneização na base do íman e é constituída essencialmente por várias bobinas utilizadas para transmitir os impulsos de excitação para a amostra, assim como receber o sinal emitido. A sonda também transmite e recebe o sinal de bloqueio.

4.5 O íman e Dewar do íman

Está disponível uma gama de ímanes com diferentes intensidades. A **intensidade do íman** é classificada de acordo com a frequência dos sinais de NMR emitidos pelos átomos de hidrogénio. Quanto mais forte for o campo magnético, maior será esta frequência de hidrogénio. Por exemplo, com um íman de 500 MHz (11,7 T), isto significa que quando uma amostra química é colocada no íman para análise, os átomos ^1H na amostra emitem sinais com uma frequência muito próxima de 500 MHz. Os ímanes da Bruker estão disponíveis na gama entre 300 e 1000 MHz.

Os **ímanes supercondutores** são **eletroímanes** e, como tal, utilizam uma corrente elétrica para produzir um campo magnético. O **núcleo do íman** é constituído por uma bobina de grandes dimensões de fio eletrocondutor na forma de solenoide. No centro da bobina, existe um campo magnético estático muito intenso. A amostra para análise é colocada no interior deste campo magnético.

A temperaturas muito baixas, alguns materiais apresentam a fascinante propriedade de supercondutividade. Um fio supercondutor transporta eletricidade sem a necessidade de um impulso de alimentação (ou seja, uma bateria ou alimentação de rede). Depois de iniciar uma corrente num circuito supercondutor, esta continua para sempre. Os ímanes da Bruker consistem num circuito supercondutor deste tipo. A única manutenção necessária para o íman consiste em assegurar que a bobina é mantida imersa em hélio líquido.

O íman é constituído por várias secções. O invólucro externo do íman é evacuado e as superfícies internas são prateadas (o mesmo princípio utilizado num termo). Em seguida, uma camada de banho de azoto que reduz a temperatura para 77,35K (-195,8°C) e, por fim, um reservatório de hélio no qual a bobina supercondutora está imersa. Este recipiente está isolado termicamente do banho de azoto por uma segunda secção de vácuo (ver a figura abaixo).

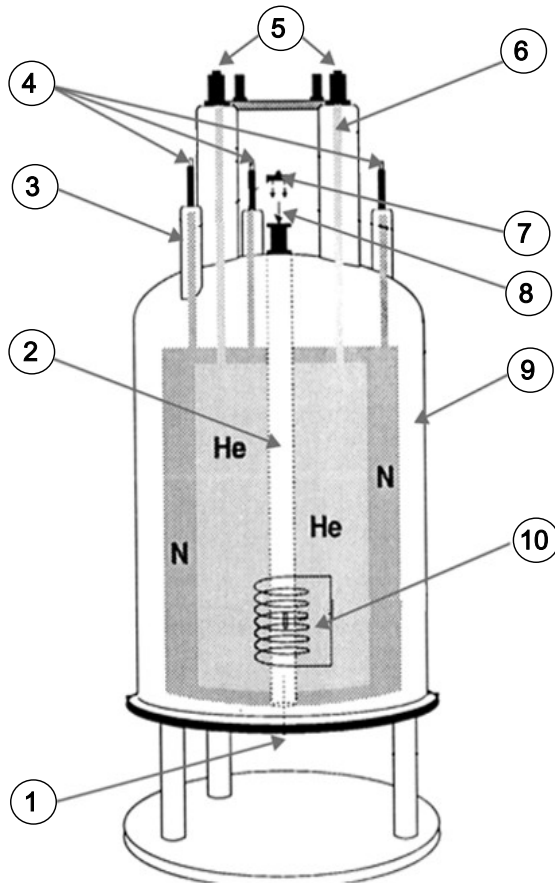


Figura 4.4: Íman supercondutor

1	Introduzir sonda aqui	6	Torre de hélio
2	Coluna	7	Tampão metálico
3	Torre de azoto	8	Introduzir amostra aqui
4	Portas de azoto	9	Câmara de vácuo
5	Portas de hélio	10	Íman

4.5.1 Coluna à temperatura ambiente

Os reservatórios de hélio e de nitrogénio rodeiam uma coluna central conhecida como a coluna do íman. Normalmente, a parte superior da coluna está fechada por um tampão metálico. Os ímanes estão disponíveis com uma coluna padrão (54 mm) ou coluna larga (89 mm). As amostras para análise são introduzidas no íman através da parte superior da coluna. As sondas, as quais suportam a amostra e transportam sinais de e para a amostra, são introduzidas através da parte inferior.

4.5.2 Reservatório de hélio

Num íman padrão, o reservatório de hélio está suspenso em duas hastes que se prolongam muito acima do íman. O acesso ao reservatório de hélio pode ser realizado através de duas portas. Uma destas portas permite o reabastecimento de hélio líquido e também serve de ponto de entrada para um **sensor do nível de hélio**. A outra porta é utilizada apenas quando o íman está a ser carregado ou descarregado. As hastes de hélio podem apresentar várias válvulas que controlam a libertação de pequenas quantidades de hélio, o qual irá inevitavelmente evaporar.



Nota: O manuseamento das válvulas e o abastecimento do íman com hélio líquido deve ser realizado apenas por um indivíduo com formação para este efeito.

4.5.3 Reservatório de azoto

As três hastes mais curtas que se prolongam acima do íman fornecem acesso ao reservatório de azoto.

4.6 Introdução ao sistema de bloqueio

Esta secção foi incluída para fornecer um entendimento básico dos princípios do sistema de bloqueio ao utilizador. Os aspetos práticos, p. ex., como bloquear efetivamente a amostra, serão abordados na secção .

O objetivo do sistema de bloqueio é assegurar que a intensidade do campo magnético em redor da amostra não é alterada durante uma experiência ou que o campo não é modulado por perturbações externas. A análise de NMR envolve a medição da frequência precisa de sinais emitidos pela amostra. As frequências destes sinais são diretamente proporcionais à intensidade do campo magnético, ou seja, se a intensidade do campo variar, também varia a frequência emitida. Por conseguinte, o utilizador deve assegurar que a intensidade do campo magnético é sempre mantida precisamente no mesmo valor, um processo que se denomina "**bloquear**" a amostra. O **sistema de bloqueio** é essencialmente um espectrómetro distinto, concebido para observar deutério. É importante assinalar que os sinais emitidos pelo deutério são tipicamente muito diferentes das frequências de interesse. No entanto, se a frequência de deutério não for adequada, é possível utilizar um **bloqueio de flúor (19F)**. Uma vez que representa o bloqueio mais popular, apenas o bloqueio de deutério será descrito nesta secção, mas o leitor deve ter em conta que os fundamentos do bloqueio de deutério e de flúor são idênticos.

Nos sistemas AVANCE, o BSMS fornece o hardware necessário para implementar o bloqueio e um módulo de deutério distinto no HPPR transmite e recebe os sinais de bloqueio. Obviamente, é necessário introduzir uma determinada quantidade de deutério nas amostras para análise. Isto é facilmente efetuado ao dissolver a amostra num solvente deuterizado. Um *solvente deuterizado* consiste num solvente em que uma larga percentagem dos átomos de hidrogénio foi substituída por deutério. Os solventes deuterizados de utilização mais frequente são a acetona-d6, benzeno-d6, clorofórmio-d e DMSO-d6, embora estejam disponíveis muitos outros solventes. A amostra que será utilizada neste manual para ilustrar algumas técnicas de NMR básicas é antranilato de mentilo em DMSO-d6.

A frequência dos sinais emitidos pelo deutério para um íman de uma dimensão específica é conhecida com precisão. Assim, se a intensidade do campo magnético estiver correta, todos os núcleos de deutério na amostra deverão emitir esta frequência exata. Se a intensidade do íman variar, a frequência de deutério também varia. O sistema de bloqueio utiliza um recetor (localizado no bastidor do BSMS) para monitorizar a frequência de deutério e ajustar a intensidade do campo magnético em conformidade.

O recetor no sistema de bloqueio foi concebido de forma a não efetuar ajustes no campo quando a intensidade do campo está correta (ou seja, é detetada a frequência de deutério correta). No entanto, se a intensidade do campo variar (deriva), é alterada a corrente numa bobina especial (a bobina H0), localizada no interior do sistema de homogeneização do íman, com o objetivo de repor a intensidade do campo no valor correto. A frequência de deutério é medida vários milhares de vezes por segundo. Assim, desde que o sistema esteja bloqueado, o utilizador pode ter a certeza que o campo é mantido a uma intensidade constante durante a aquisição.

4.7 Sondas

A sonda foi concebida para conter a amostra, transmitir os sinais de radiofrequência que excitam a amostra e receber a resposta emitida. A transmissão e a receção são conseguidas utilizando bobinas de RF concebidas especificamente para o efeito.

A sonda é inserida na parte inferior do íman e no interior dos sistemas de homogeneização à temperatura ambiente. Os cabos coaxiais transportam os sinais de excitação dos amplificadores da consola para a sonda e o sinal de NMR da amostra ao recetor. Os cabos são encaminhados através de um conjunto de pré-amplificadores (a unidade HPPR) que está situado junto da base do íman ou, em sistemas NanoBay, incorporado na consola. Os **pré-amplificadores** são necessários para aumentar os sinais de NMR que, normalmente, são muito fracos.

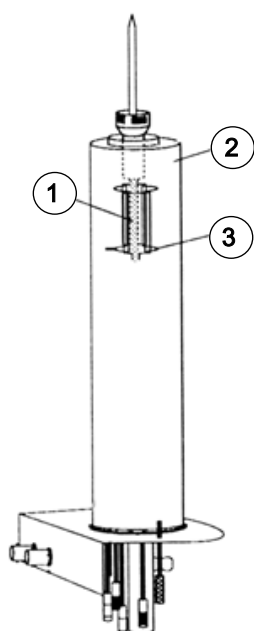


Figura 4.5: Amostra na sonda

1	Volume de amostra	3	Bobinas
2	Sonda		

As sondas estão disponíveis em diferentes tipos e tamanhos. O tamanho da sonda é indicado em função dos tamanhos dos tubos de amostra compatíveis, sendo os diâmetros de tubos de 5 mm e de 10 mm os mais populares. São utilizados diferentes tipos de sondas conforme o tipo de experiência. As **sondas seletivas** foram concebidas especialmente para observar núcleos específicos, p. ex., ^{13}C , enquanto as sondas multinucleares (X-BB ou banda larga) podem ser utilizadas para analisar uma vasta gama de núcleos. O número e a estrutura das bobinas internas são os fatores que distinguem fisicamente os vários tipos de sondas. Adicionalmente, o diâmetro externo e o comprimento da sonda é adequado às especificações dos vários ímanes (coluna larga ou coluna padrão; comprimento diferente da parte inferior ao centro do campo magnético para ímanes com intensidade de campo diferente).

Os sinais entram e saem das bobinas da sonda através dos conectores localizados na base da sonda e claramente identificados. É utilizado o mesmo cabo para transportar o sinal de e para a sonda. Cada sonda possui uma bobina interna (a **bobina de observação**). Esta bobina está localizada mais próxima do volume de amostra para maximizar a sensibilidade. O código de cores do BNC da bobina interna segue uma simples regra. É sempre da mesma cor que a faixa retangular localizada diretamente acima dos conectores BNC. A figura seguinte ilustra a rotulação de uma sonda multinuclear. Neste caso, a bobina de é a bobina interna.

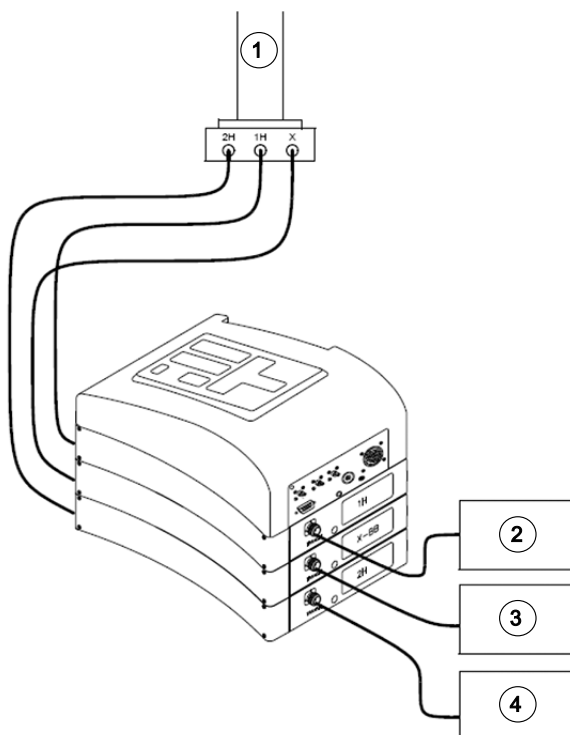


Figura 4.6: Cablagem típica da unidade HPPR

1	Sonda	3	Ligação ao amplificador X
2	Ligação ao amplificador de prótons	4	Ligação ao transmissor BSMS 2H

4.8 Sonda de banda larga

Um dos tipos de sonda, descrita nesta secção a título de exemplo, é a sonda BBO Smart de 5 mm. Conforme é sugerido pelo nome, esta sonda foi concebida para utilizadores que pretendem analisar amostras com vários núcleos. O intervalo de frequência X é tipicamente ^{15}N a ^{31}P , incluindo ^{19}F .

O BNC esquerdo está identificado como ^2H (ver figura abaixo) e é utilizado para transportar o sinal de bloqueio. As outras duas ligações destinam-se aos sinais de ^1H e de núcleo X e estão rotuladas em conformidade. Os cabos que saem dos BNC ^1H , X e ^2H são ligados aos pré-amplificadores.



Figura 4.7: Exemplo de uma sonda de banda larga

As sondas foram concebidas para permitir o controlo da temperatura da amostra de NMR. É utilizado um **aquecedor** em conjunto com uma **linha de transferência de ar/N₂** para controlar a temperatura da amostra. É utilizado um **termopar** como termómetro para monitorizar temperatura da amostra. Todos estes dispositivos estão ligados à base da sonda e podem ser acedidos facilmente. A unidade de temperatura variável (**VTU**, Variable Temperature Unit) localizada no interior da consola monitoriza constantemente a leitura do termopar e efetua ajustes na potência do aquecedor para manter a temperatura necessária.

Com exceção de algumas sondas de alta resolução, todas as sondas estão equipadas com bobinas de gradiente e o conector está localizado na parte lateral da base da sonda.

Por fim, a caixa negra na parte inferior da base da sonda contém o equipamento de afinação e correspondência. São utilizados para efetuar ajustes precisos na sonda para otimizar o desempenho. Quando um composto é analisado, é excitado por sinais de uma frequência definida (a frequência de ressonância). Diferentes núcleos são excitados por diferentes frequências e a afinação envolve ajustar o circuito no interior da sonda de forma a maximizar a sensibilidade para a frequência de interesse. A sonda é também ajustada quanto à correspondência para assegurar uma reflexão (ou seja, perda) mínima dos sinais de excitação e FID. Os processos de afinação e de correspondência são interativos, na medida em que não podem ser ajustados independentemente um do outro.

A sonda deve ser afinada e correspondida sempre que a amostra no íman é alterada. Cada bobina na sonda é afinada e correspondida separadamente utilizando o procedimento "atma" ou "atmm" descrito em [Afinação e correspondência da sonda](#) [40].

A substituição de uma sonda requer a reconexão da sonda aos pré-amplificadores.

4.9 iProbe

Outro tipo de sonda é a nova plataforma iProbe, uma SmartProbe™ de última geração para detecção de NMR. Esta nova arquitetura de sonda de NMR permite não só um aumento de sinal para ruído e um ajuste de RF mais rápido e preciso, como também fornece um design mais flexível que permite uma personalização mais fácil de sondas de NMR para aplicações dedicadas. As primeiras sondas introduzidas nesta plataforma incluem os SmartProbe iProbes líderes do setor, disponíveis agora de 400 a 600 MHz, oferecendo um aumento de até 10% na sensibilidade.



Figura 4.8: A Plataforma iProbe da Bruker

4.10 Trocar uma sonda

Se for necessário trocar a sonda, deve ser seguido o procedimento abaixo. As sondas são frágeis e dispendiosas, pelo que deve consultar o gestor do seu sistema antes de tentar trocar a sonda. O íman e, em particular, as correntes de Foucault, afetam significativamente o movimento mecânico da sonda. À medida que remover a sonda do íman, antecipe uma aceleração súbita quando a sonda atingir a extremidade inferior da coluna do íman. Deverá também antecipar alguma resistência ao colocar a sonda no íman.

Procedimento de substituição da sonda:

1. Certifique-se de que nenhuma aquisição está em execução, clicando no botão STOP (Parar) na barra de ferramentas superior da janela do TopSpin ou introduza "stop" na linha de comandos.
2. Desligue o **aquecimento** ou **arrefecimento** do sistema. Utilize o comando "edte" para desligar o aquecedor. Deixe a sonda atingir a temperatura ambiente. Não encerre o sistema propriamente dito!
3. Retire a ligação de ar/N₂ situada na base da sonda.
4. Depois de assegurar que a coluna do íman não está tamponada, ative o botão **LIFT** (Elevador) na janela do BSMS para retirar qualquer amostra presente no íman.
5. Desligue o Elevador.
6. Desligue todos os cabos BNC da base da sonda.
7. Desligue o termopar, o aquecedor e qualquer outra conexão de gradiente ou PICS.
8. Utilize a chave de fendas fornecida para desapertar os dois parafusos que fixam a sonda no íman.
9. Desloque a sonda diretamente para baixo e para fora do íman.
10. Introduza a nova sonda e fixe a mesma utilizando os dois parafusos.
11. Volte a ligar os cabos coaxiais, o termopar, o aquecedor, as linhas de arrefecimento e qualquer outra conexão necessária.
12. Volte a ligar o aquecedor.

Um filme que mostra este procedimento está disponível no site [da Bruker](#).

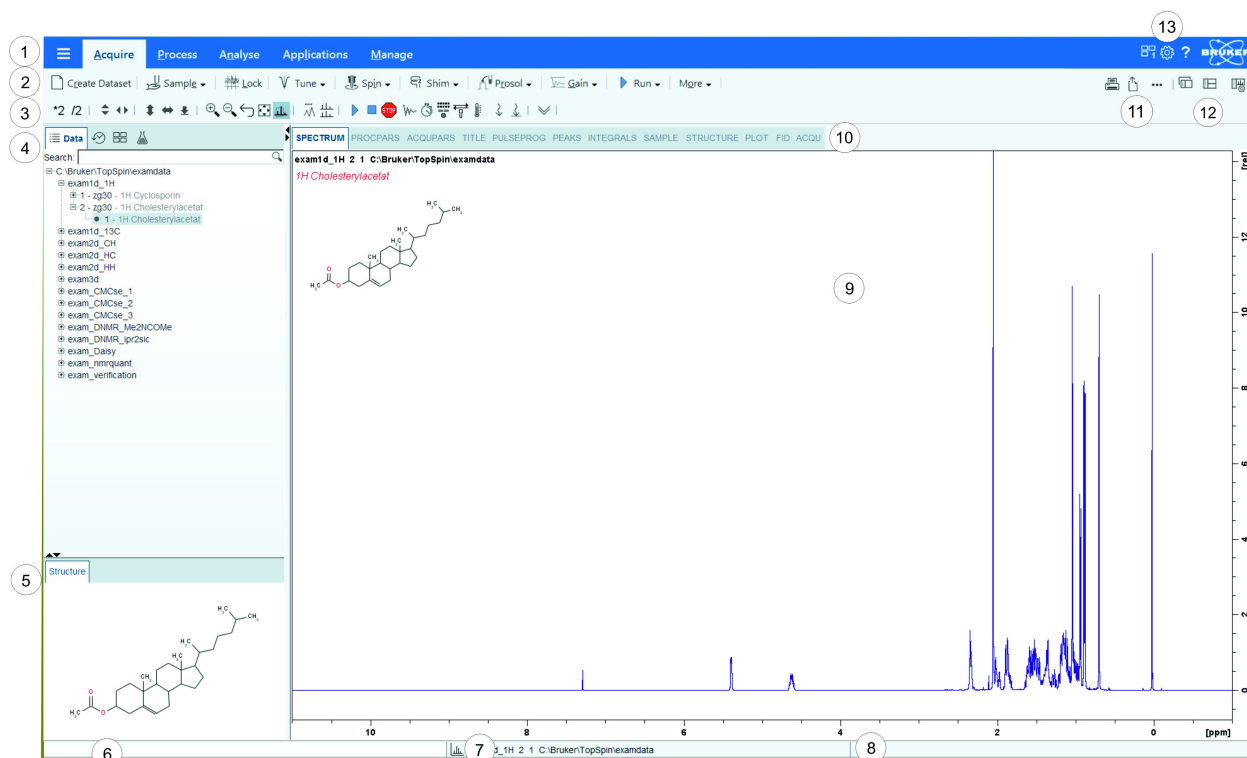
5 Procedimentos básicos

Este capítulo descreve as operações básicas utilizadas sempre que é adquirido um espectro. O software TopSpin tem uma interface de utilização fácil, baseada no fluxo de trabalho, que orienta o utilizador através de todos os passos necessários para obter um espectro. Todas as operações são controladas pelo software e podem ser selecionadas ao clicar com o rato nos separadores do fluxo de trabalho (ver 1. na figura Interface TopSpin) para apresentar uma fila de botões do fluxo de trabalho (ver 2. na figura Interface TopSpin).

Os leitores podem ignorar este capítulo se já estiverem familiarizados com estas operações.

5.1 A janela TopSpin

A figura abaixo ilustra a disposição da interface básica do TopSpin.

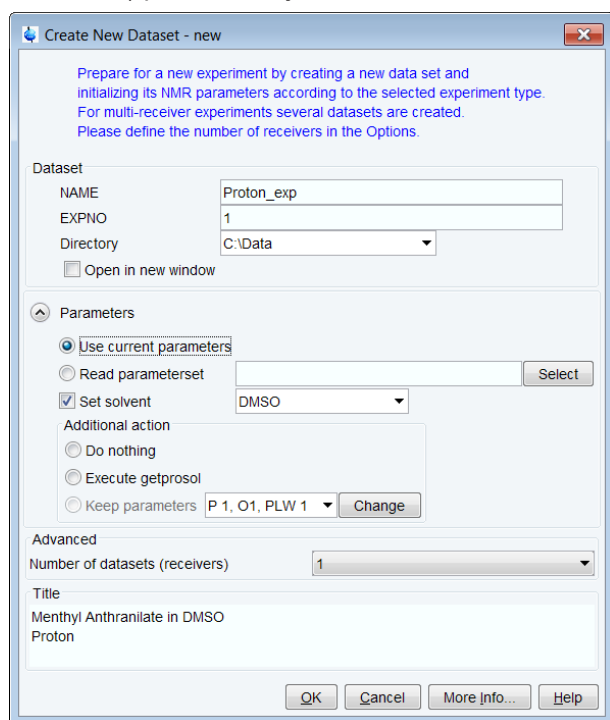


1	Barra de menu	8	Barra de apresentação do estado
2	Barra de botões do fluxo de trabalho	9	Janela do conjunto de dados
3	Barra de ferramentas	10	Separadores da janela do conjunto de dados
4	Janela de navegação e pesquisa	11	Imprimir, exportar e publicar
5	Janela de estrutura	12	Opções de visualização
6	Linha de comandos	13	Comutador de janela, preferências de configuração e ajuda
7	Barra do conjunto de dados atual		

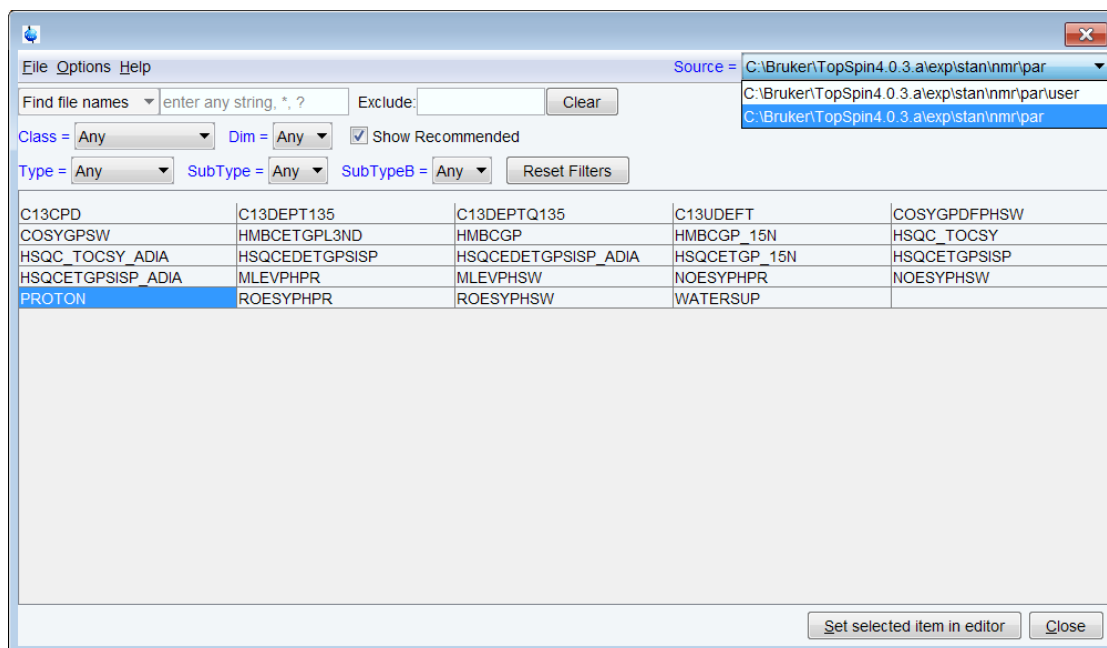
5.1.1 Criar um novo conjunto de dados

A utilização regular de um espectrómetro resulta rapidamente na acumulação de grandes quantidades de dados. Os utilizadores deverão armazenar os dados em ficheiros com nomes adequados, de forma a facilitar o acesso aos dados posteriormente. Isto é particularmente importante num ambiente de trabalho com vários utilizadores. Quando uma série de dados é adquirida, esta pode ser armazenada no que é chamado um **conjunto de dados**. Cada conjunto de dados deve apresentar uma descrição exclusiva (identificador) para que seja possível distinguir conjuntos de dados diferentes. Uma descrição completa para o conjunto de dados requer a utilização de três parâmetros: NAME (Nome), EXPNO (N.º exp.) e Directory (Diretório).

- Na barra de menu, clique em **Acquire** (Adquirir) | **Create Dataset** (Criar conjunto de dados) para abrir a janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados).



- Poderá agora criar o seu conjunto de dados. Para o campo NAME (Nome), pode introduzir uma sequência até 13 caracteres. Para EXPNO, introduza "1" ou qualquer número adequado. Selecione o caminho do diretório (por exemplo: C:\Data).
- No grupo Parameter (Parâmetro), clique em **Read parameterset** (Ler conjunto de parâmetros) e em **Select** (Selecionar) para abrir a janela rpar.



- Ative **Show Recommended** (Mostrar recomendado) para obter a lista das experiências de pequenas moléculas mais comuns.
- Certifique-se de que o diretório de origem é:
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par`
e não:
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par\user`
- Selecione a experiência (por exemplo, Protão) e clique em **Set selected item in editor** (Definir item selecionado no editor).
- Na janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados), marque **Set solvent** (Definir solvente) e, na lista suspensa, selecione o solvente da sua amostra, por ex. DMSO.
- Clique em **OK**.



Nota: O seu novo conjunto de dados passou a ser o conjunto de dados atual e os detalhes da descrição serão armazenados no disco rígido na pasta: DIR\NOME\EXPNO, em que cada EXPNO (N.º exp.) corresponde a um conjunto de dados completamente independente. Neste exemplo, os dados serão armazenados em **C:\Data\Proton_exp\1**. Este caminho também é apresentado na barra de título da janela de dados do TopSpin

5.1.2 Preparação da amostra

- Utilize tubos de amostra limpos e secos.
- Utilize tubos de amostra de qualidade média a elevada.
- Filtre sempre a solução da amostra.
- Utilize sempre o mesmo volume de amostra ou altura da solução.
- O volume de enchimento de tubos de 5 mm é de 0,6 ml ou 5 cm.
- O volume de enchimento de tubos de 10 mm é de 4 ml ou 5 cm.
- Utilize o medidor de profundidade da amostra para ajustar a profundidade da amostra.

Tipo de tubo da amostra	CryoProbes	Sondas RT	Sondas RT antigas
Tubo de amostra padrão de 5 mm com extremidade arredondada.	19 mm	20 mm	18 mm
Tubo Bruker Shigemi.	17 mm	20 mm	18 mm

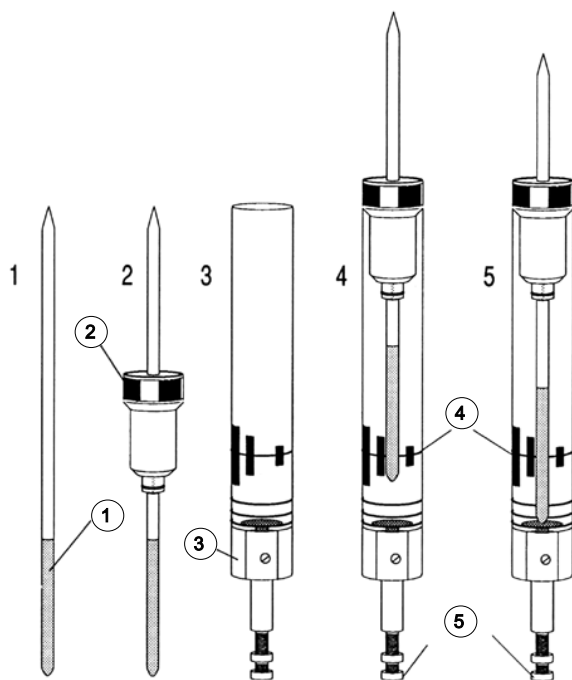


Figura 5.1: Introduzir a amostra no rotor

1	Amostra	4.	Linha central
2	Rotor	5.	Parafuso de ajuste da profundidade
3	Medidor de profundidade		

- O tubo da amostra deve ficar bem encaixado no interior do rotor.
- Limpe o tubo da amostra antes da introdução no íman.

5.2 Introduzir a amostra com rotor no íman

A subida e descida da amostra é controlada por um fluxo de ar pressurizado. Antes de colocar uma amostra na parte superior da coluna, certifique-se de que o fluxo de ar está presente (pode ser ouvido facilmente) e retire qualquer amostra que possa estar a ser elevada para a parte superior da coluna.

- Na barra de menu, clique em **Acquire** (Adquirir).
- No botão **Sample** (Amostra), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Eject sample manually (ej)** (Ejetar amostra manualmente). A elevação da amostra é ligada.



Esperre até que o ar de elevação da amostra seja ligado e remova a amostra que pode estar no íman.

- Coloque a amostra com o rotor na parte superior da coluna do íman.
- No botão **Sample** (Amostra), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Insert sample manually (ij)** (Inserir amostra manualmente).

5.3 Bloquear a amostra

São utilizados solventes deuterizados para gerar o sinal detetado e monitorizado pelo sistema de bloqueio. A frequência e a intensidade deste sinal dependem do solvente utilizado. A principal característica do procedimento de bloqueio do TopSpin consiste na definição de parâmetros (p. ex., potência, ganho e frequência de bloqueio) segundo valores apropriados para o solvente. Com estes valores padrão definidos de acordo com as especificações esperadas para o solvente, o BSMS pode rapidamente localizar e "bloquear" o sinal do solvente ao percorrer uma gama de frequências ou valores de campo magnético. Os parâmetros dependentes do solvente são obtidos da tabela "edlock".

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Lock** (Bloquear).
- Na lista da tabela de Solventes, selecione **DMSO** e clique em **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H [v] [OK] [Cancel]

Figura 5.2: Tabela de solventes



Nota: Se o bloqueio for obtido, o sinal deve assumir a forma de uma linha horizontal com algum ruído ou ondulação associada (consulte a figura abaixo). A altura desta linha designa-se nível de bloqueio.

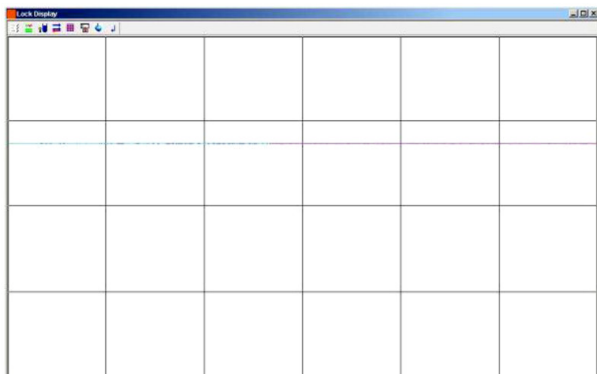


Figura 5.3: Visualização do bloqueio após o bloqueio da amostra

5.4 Afinação e correspondência da sonda

A sensibilidade de qualquer sonda varia com a frequência do sinal transmitido para a mesma e existe uma frequência para a qual a sonda é especialmente sensível. Adicionalmente, esta frequência pode ser ajustada dentro de um determinado intervalo utilizando os condensadores de afinação incorporados no circuito da sonda. A **afinação** envolve ajustar o circuito da sonda de forma a que a frequência à qual a sonda é mais sensível seja a frequência de transmissão relevante (SFO1, SFO2 etc.) Cada bobina na sonda é afinada (e correspondida) separadamente. Se a sonda tiver sido trocada ou se a frequência de transmissão for alterada significativamente, pode ser necessário repetir a afinação da sonda. No trabalho de rotina com solventes orgânicos e sondas seletivas, o valor das frequências transmitidas não deverá variar muito. Assim, após a afinação inicial da sonda, a ocorrência de pequenas variações na frequência não justifica a repetição da afinação. Tipicamente, seria necessário alterar a frequência transmitida em pelo menos 100 kHz para justificar a repetição da afinação. No entanto, no caso das sondas de banda larga, as frequências transmitidas variam muito de núcleo para núcleo e é necessário afinar a sonda sempre que o núcleo selecionado é alterado. Sempre que é efetuada a afinação da sonda, também deve ser realizada a correspondência. A **correspondência** envolve assegurar que a maior quantidade possível de energia que entra na base da sonda é transmitida até à bobina localizada na parte superior da sonda. Isto assegura que é refletida uma quantidade mínima de energia na base da sonda de volta para os amplificadores (e consequentemente desperdiçada).



Nota: A Bruker disponibiliza dois tipos diferentes de ajustes de afinação e de correspondência. Para além dos ajustes manuais nos condensadores de afinação e de correspondência, as sondas podem ser equipadas com um módulo de afinação automática (ATM, Automatic Tuning Module). Siga os passos abaixo relativamente a cada opção.

5.4.1 Sondas equipadas com ATM através do procedimento de afinação automatizada

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Tune** (Afinar).

O ecrã muda automaticamente para a janela de aquisição e apresenta a curva de oscilação. A afinação e correspondência são realizadas automaticamente. Se forem utilizadas várias frequências num conjunto de parâmetros (p. ex., C13CPD), a ATMA começa por ajustar a frequência mais baixa em primeiro lugar e avança sucessivamente para frequências mais altas automaticamente.

5.4.2 Sondas equipadas com ATM através do procedimento de afinação manual

- No botão **Tune** (Afinar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Tune/match ATM probe manually** (Afinar/corresponder sonda ATM manualmente).



Nota: A janela ATMM Probe Tuning/Matching (Afinação/Correspondência da sonda ATMM, figura abaixo) e uma janela com visualização da curva de oscilação serão apresentadas.

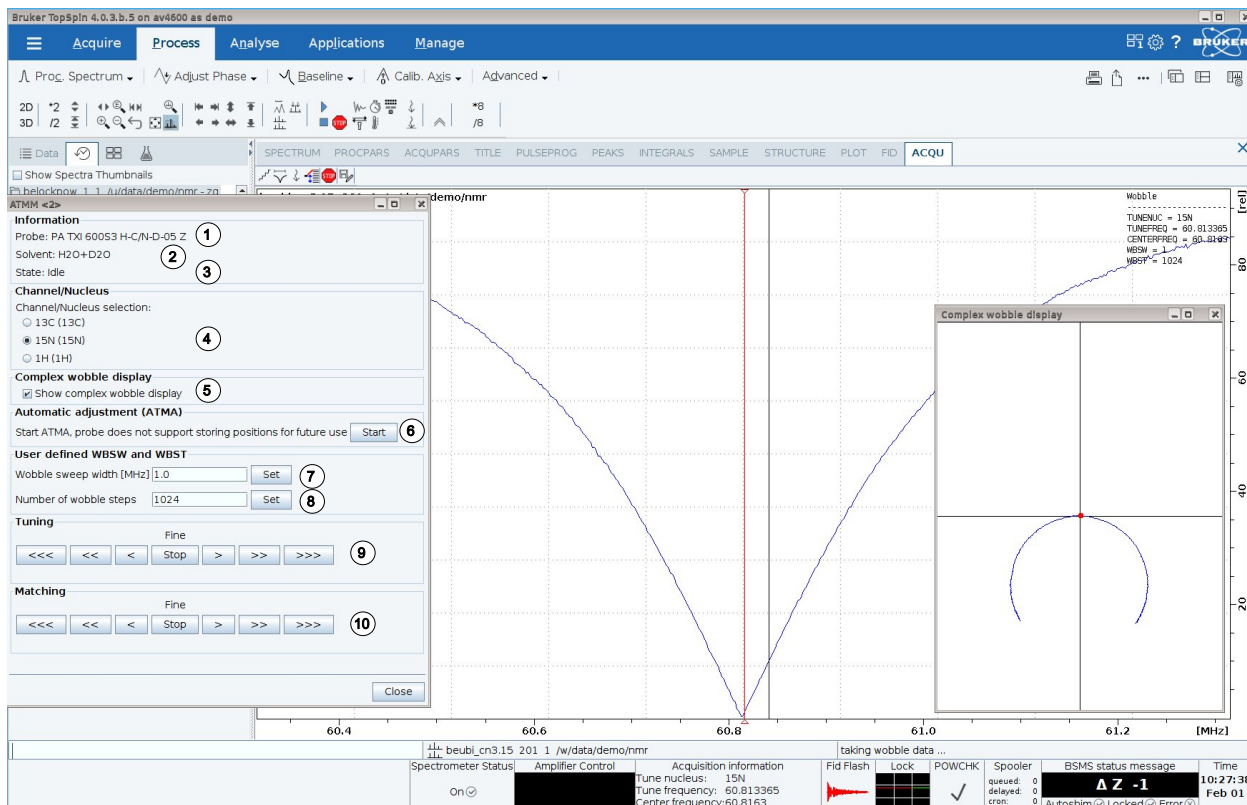


Figura 5.4: Janela de afinação/correspondência da sonda ATMM

1.	Tipo de sonda.
2.	Solvente utilizado.
3.	Estado atual.
4.	Seleção de canal/núcleo
5.	Marque para mostrar o ecrã de oscilação complexa.
6.	Clique para iniciar a ATMA, enquanto as posições ideais são armazenadas para utilização futura.
7.	Largura de varrimento de oscilação definida pelo utilizador.
8.	Número de etapas de oscilação definido pelo utilizador.
9.	Botões para mover e apresentar a curva de oscilação centralizada.
10.	Botões para ajustar a queda da curva de oscilação para a posição mais baixa.

- Na janela de controlo de ATMM, clique nos botões **Tuning** (Afinação) para mover e apresentar a curva de oscilação centralizada.
- Na janela de controlo de ATMM, clique nos botões **Matching** (Correspondência) para ajustar a queda da curva de oscilação para a posição mais baixa.

A visualização da oscilação complexa é muito conveniente. Se o círculo com o ponto vermelho for muito grande ou muito pequeno, ajuste primeiro a correspondência. Quando o círculo percorrer o centro do sistema de coordenadas, leve o ponto vermelho para o centro ajustando a afinação. Em essência, a curva informa em qual ordem a afinação e a correspondência devem ser ajustadas.

Nota: As definições de T/M serão guardadas mediante um clique no botão **Start** (Iniciar).



Uma vez que o ajuste da afinação e da correspondência interage entre si, é necessário efetuar uma repetição de todas as etapas para obter uma perfeita afinação e correspondência. Se forem utilizadas frequências múltiplas num conjunto de parâmetros, como C13CPD, utilize os botões de opção **Nucleus Selection** (Seleção de núcleo) na janela de controlo de ATMM para mudar para outro núcleo e repetir a afinação e a correspondência.

O procedimento de **oscilação** transmite um sinal fraco à sonda e compara a impedância da sonda e do cabo com uma referência de 50 Ohm no interior da unidade HPPR. A frequência transmitida é centrada em SFO1, SFO2, etc., mas "varre" um intervalo determinado pelo tamanho do parâmetro WBSW (ver abaixo). A curva resultante é a curva de resposta familiar de um circuito de ressonância e consiste simplesmente numa medida da amplitude do sinal refletido (eixo vertical) em função da frequência (eixo horizontal).

A **correspondência** envolve ajustar a sonda de modo a situar o ponto mínimo da curva de oscilação na base da visualização (ou seja, a tocar no eixo horizontal da frequência). Isto representa uma reflexão mínima do sinal transmitido.

A **afinação** envolve assegurar que isto ocorre na frequência de transmissão indicada no centro da escala horizontal do ecrã. Pode observar-se que os ajustes de afinação e de correspondência interagem entre si e devem ser ajustados em conjunto. Quando o ponto mínimo da curva de oscilação estiver centrada e na base do ecrã, foi obtida uma afinação e correspondência ideais da sonda.

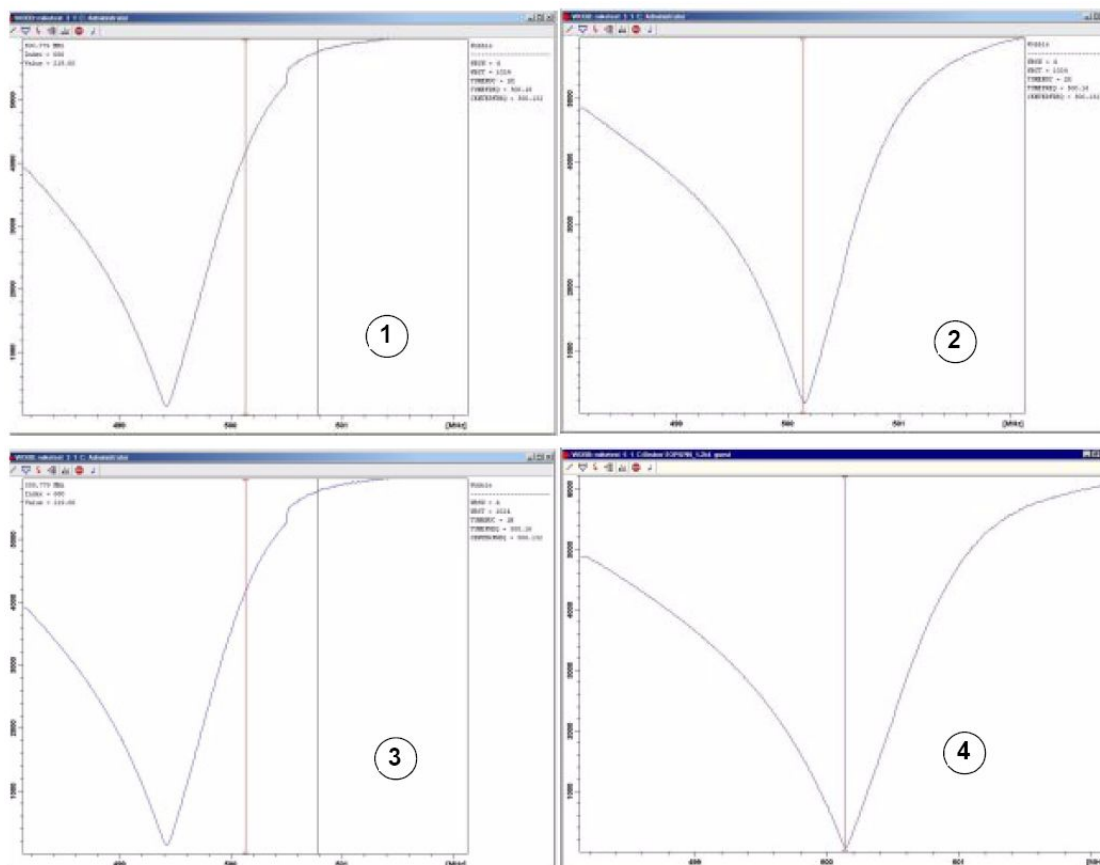


Figura 5.5: Exemplos de curvas de oscilação com afinação e correspondência diferentes

1.	Afinação e correspondência fracas.	3.	Boa correspondência, afinação fraca.
2.	Correspondência fraca, boa afinação.	4.	Boa correspondência e afinação.

Se pretender otimizar a sonda para vários núcleos (p. ex., para experiências de desacoplamento), é possível selecionar o núcleo seguinte na janela ATMM Probe Tuning/ Matching (Afinação/Correspondência da sonda ATMM).

5.5 Rotação da amostra

O ar pressurizado também tem como função permitir a rotação da amostra. A rotação da amostra permite compensar alguma não homogeneidade que pode existir no campo magnético no centro do íman.



Nota: As amostras analisadas em experiências como, por exemplo, 2-D, 3-D, SELECTIVE, NOEDIFF, T1 e todas as sondas invertidas não são normalmente rodadas.

As frequências de rotação sugeridas são:

- 20 Hz para uma sonda de 5 mm
- 12 Hz para uma sonda de 10 mm

- No botão **Spin** (Rodar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Turn sample rotation on (ro on) (Ligar rotação da amostra)**.

5.6 Homogeneização

A **homogeneização** é um processo que efetua pequenos ajustes no campo magnético até otimizar a homogeneidade do campo (uniformidade). O melhoramento da homogeneidade resulta numa melhor resolução espectral. É necessário repetir o processo de homogeneização sempre que uma sonda ou amostra é trocada. O gestor do sistema deverá ter armazenado valores de homogeneização adequados (nos chamados ficheiros de homogeneização) para cada sonda, reduzindo bastante o tempo de homogeneização necessário sempre que uma sonda é trocada.

5.6.1 Homogeneização de rotina no TopShim

O processo aqui descrito consiste na homogeneização de rotina que deve ser realizada no início de cada sessão de NMR e sempre que a amostra no íman é trocada. A homogeneização de rotina envolve a aplicação de ajustes precisos nos homogeneizadores Z, Z², Z³, Z⁴ e Z⁵. Alguns ímanes de campo mais intenso requerem homogeneizadores Z de ordem superior. O administrador do sistema programou o TopShim para obter a melhor homogeneidade em cada amostra de forma totalmente automática.

O método principal do TopShim é a homogeneização por gradiente. Um critério de qualidade para a forma da linha final assegura os melhores resultados para todas as situações.

O TopShim utiliza o método de homogeneização por gradiente ²H para todos os solventes deuterizados e o método de homogeneização por gradiente ¹H para outros solventes, em particular H₂O.

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Shim** (Homogeneização).

A homogeneização terá início pouco depois e deve demorar menos de um minuto.

5.7 Definir os parâmetros dependentes da sonda/solvente

Os parâmetros como, por exemplo, 90° ou a duração do impulso de desacoplamento com níveis de energia associados, podem ser armazenados para qualquer núcleo específico em qualquer canal disponível. Estes valores foram introduzidos pelo técnico de instalação ou pelo administrador do sistema e são carregados automaticamente através do botão Prosol.

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Prosol**.

5.8 Ajustar o ganho do recetor

O ganho do recetor é um parâmetro muito importante utilizado para fazer corresponder a amplitude do FID ao intervalo dinâmico do digitalizador. O ganho é definido automaticamente através do botão Gain (Ganho).

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Gain** (Ganho).

O ajuste do ganho do recetor terá início pouco depois e deve demorar menos de um minuto.

5.9 Iniciar a aquisição

O processo de recepção dos sinais de NMR denomina-se aquisição. Os dados dizem-se adquiridos. Quando uma aquisição é realizada, os dados não processados são adquiridos e o sinal recebido denomina-se Decaimento de Indução Livre (FID, Free Induction Decay). A dimensão do ponto digital do FID é designada o domínio de tempo (TD, Time Domain).

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Run** (Executar).

Por predefinição para a experiência selecionada, o espectrómetro executa várias análises fictícias antes de iniciar o número real de análises.

5.10 Processar os dados

Uma transformada de Fourier é utilizada para converter o FID num espectro de frequência. O número de pontos utilizados para formar o espectro resultante é determinado pelo parâmetro SI (tamanho). O FID é transformado num espectro constituído por pontos de dados SI na componente real e pontos de dados SI na componente imaginária. A definição normal para SI é $SI = TD/2$. Se tiver carregado o conjunto de parâmetros "PROTON", pode facilmente verificar que $TD = 64K$ e $SI = 32K$.

- Na barra de menu, clique em **Process** (Processar).
- No botão **Proc Spectrum** (Processar espectro), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, seleccione **Configure Standard Processing (proc1d)** (Configurar processamento padrão).

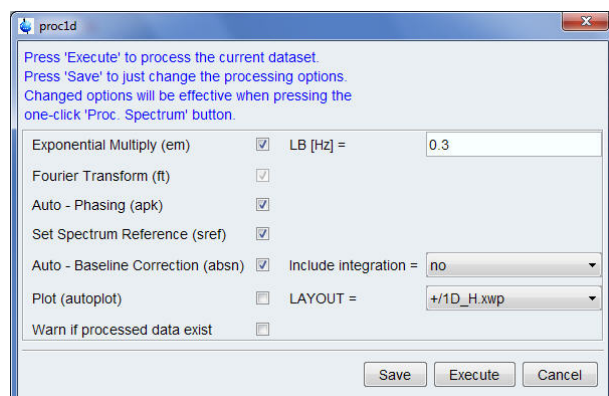


Figura 5.6: A janela proc1d

- Na janela proc1d, seleccione as opções:
 - Exponential Multiply (em)** (Multiplicação exponencial)
 - Auto – Phasing (apk)** (Faseamento automático)
 - Set Spectrum Reference (sref)** (Definir referência do espectro)
 - Auto – Baseline Correction (absn)** (Correção automática da linha base)
- Na janela proc1d, clique em **Execute** (Executar).
- Na janela proc1d, clique em **Save** (Guardar) para guardar as definições de processamento seleccionadas.

6 Preparação para a aquisição, parâmetros relacionados com a frequência

Este capítulo descreve dois dos parâmetros mais importantes para a observação de um espectro de NMR. Antes de atribuir valores a vários parâmetros, é importante que o utilizador compreenda o conceito de conjuntos de dados, visto que existem grupos de parâmetros intrinsecamente ligados aos mesmos.

6.1 Frequência

As frequências dos sinais transmitidos nos canais um, dois e três, etc., são fornecidas por SFO1, SFO2 e SFO3, etc., respetivamente. No entanto, estas frequências não podem ser definidas diretamente (repare que não podem ser destacadas com o rato).

As frequências transmitidas são controladas através da definição de valores de desvio para as frequências básicas BF1, BF2 e BF3, etc.

Para o canal observado:

- $SFO1 = BF + \text{desvio} (O1)$

A frequência transmitida é definida automaticamente pelo utilizador.

De igual modo, para os dois canais de desacoplamento seguintes:

- $SFO2 = BF2 + \text{desvio} (O2)$
- $SFO3 = BF3 + \text{desvio} (O3)$

Quando um núcleo específico é selecionado, a frequência básica adequada é definida automaticamente. Após a leitura de um conjunto de parâmetros padrão, a frequência básica será definida corretamente e apenas é necessário ajustar os valores de desvio.

Lembre-se que SFOX é o parâmetro mais relevante, na medida em que representa a frequência realmente transmitida à amostra. Tenha também em atenção que os desvios podem ser definidos como zero e, nesse caso, $SFOX = BFX$. É fornecida uma descrição mais pormenorizada na secção seguinte.

6.2 Explicação numérica de frequências transmitidas, básicas e deslocadas

Considere um espectrómetro de 600 MHz utilizado para observar hidrogénio. O espectrómetro é configurado com BF1 de 600,13 MHz (tipicamente, um espectrómetro de 500 MHz é configurado com BF1 de 500,13 MHz, um espectrómetro de 400 MHz com BF1 de 400,13, etc.).

Se O1 for definido como zero, então: $SFO1 = 600,13 + 0 = 600,13$ MHz

Consequentemente, o centro do espectro ficará situado a 600,13 MHz. Se SWH for definido como 20 kHz, o espectro pode ser semelhante à figura abaixo.

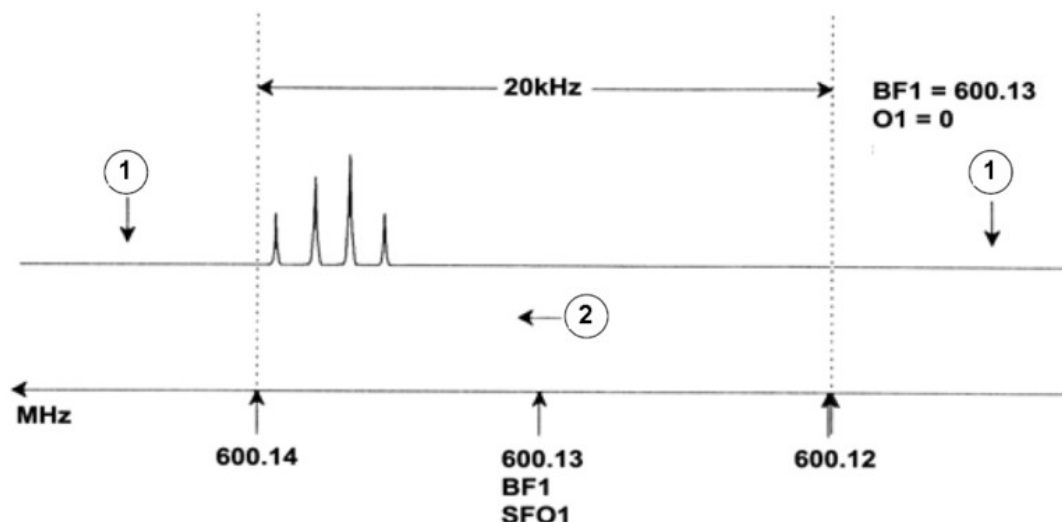


Figura 6.1: Espectro com $BF1 = 600,13$ MHz, $O1 = 0$ Hz

1.	Sinais eliminados por filtragem	2.	Frequência
----	---------------------------------	----	------------

No nosso espectro hipotético, é claro que os sinais de NMR surgem todos na direção da extremidade de frequência maior da largura espectral. Adicionalmente, é possível que alguns sinais apareçam acima de 600,14 MHz e, uma vez que estes sinais estão fora da janela espectral, são filtrados e não são observados. Para verificar a presença deste tipo de sinais, estão disponíveis duas opções:

- A largura espectral pode ser alargada para abranger qualquer sinal em falta. No entanto, esta opção apresenta desvantagens como, por exemplo, a resolução FID (quanto menor for o valor FIDRES, melhor a resolução).
- A opção preferível consiste em não alterar a largura espectral, mas atribuir um valor a O1 para deslocar o centro da janela.

No nosso exemplo, os sinais detetados surgem todos na região de 600,138 MHz e pretendemos centrar o espectro nesta frequência.

$$\Rightarrow SFO1 = 600,138 = BF1 + O1$$

$$\Rightarrow 600,138 = 600,13 + O1$$

$$\Rightarrow O1 = 0,008 \text{ MHz} = 8 \text{ kHz}$$

Assim, se a frequência deslocada O1 for definida como 8 kHz, a janela é deslocada conforme ilustrado na figura abaixo.

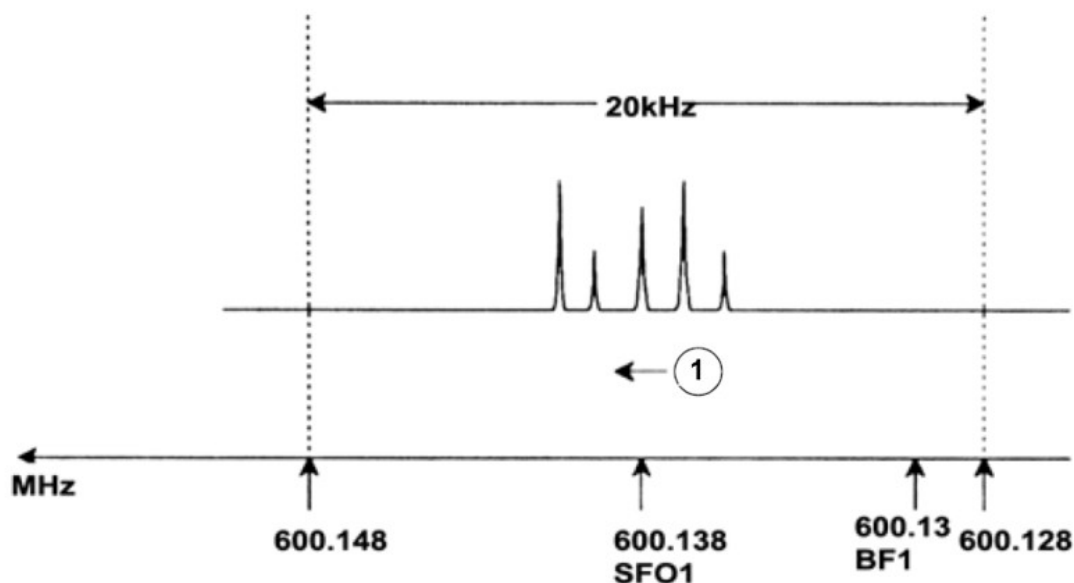


Figura 6.2: Espectro com BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz

1.	Frequência		
----	------------	--	--

Por fim, a figura acima mostra claramente que os sinais de NMR emitidos pelos prótons na nossa amostra hipotética apenas ocupam parte da largura espectral. Por conseguinte, a largura espectral pode ser reduzida sem ocorrer perda de dados relevantes. Uma vantagem da redução de SW (largura espectral) consiste no melhoramento da resolução espectral. Por outro lado, tem como desvantagem o aumento proporcional do tempo necessário para adquirir os dados.

Em [Fundamento teórico introdutório e terminologia \[9\]](#) foi mencionado que os desvios químicos dos prótons raramente excedem 14 ppm. Isto corresponde a 8,4 kHz num espectrômetro de 600 MHz. A figura abaixo ilustra o espectro hipotético redesenhado com o valor de SWH reduzido de 20 kHz para 8,4 kHz.

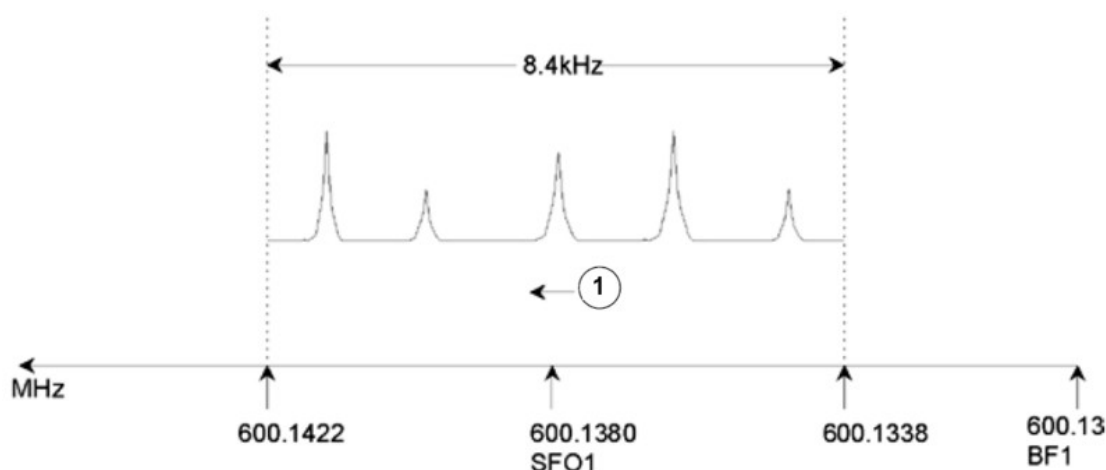


Figura 6.3: Espectro com BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz, SWH = 8,4 kHz

1.	Frequência		
----	------------	--	--

Tenha em consideração que o valor de SWH utilizado em qualquer experiência é determinado apenas pela amostra em análise e a resolução espectral necessária. O valor de 14 ppm para o espectro de hidrogénio assegura que a maioria dos sinais de prótons são detetados. No entanto, para um estudo pormenorizado de um sinal específico, são utilizados valores de SWH muito mais pequenos.

A figura abaixo ilustra os princípios gerais da interação entre SFO1, BF1 e O1 (ilustradas com uma nova amostra).

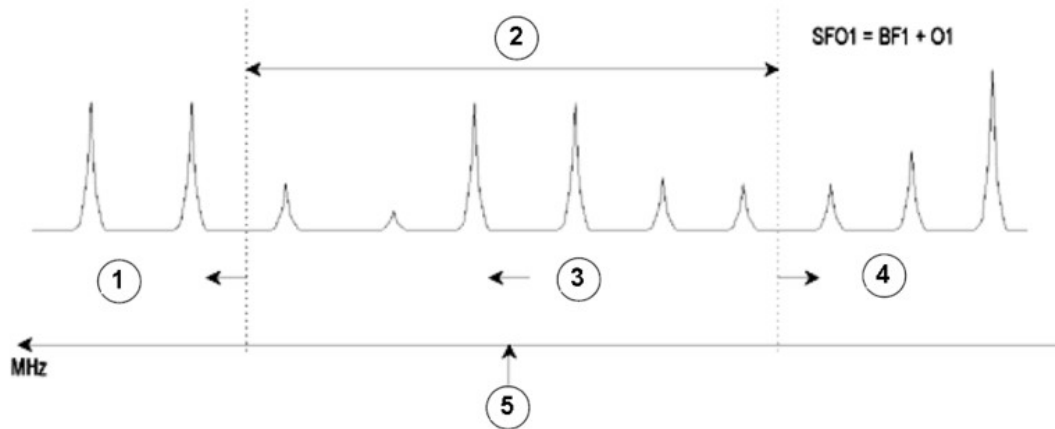


Figura 6.4: Interação entre SFO1, BF1 e O1

1.	A definição de O1 com um valor positivo desloca a janela para frequências maiores.
2.	SW determina a largura da janela.
3.	Frequência.
4.	A definição de O1 com um valor negativo desloca a janela para frequências menores.
5.	SFO1 está situada no centro do espectro.

7 A amostra de NMR

Quando um **sólido** é examinado através da técnica de NMR, os sinais tendem a ser amplos e não é possível discriminar a estrutura fina, a qual é de especial interesse para os cientistas. Conseqüentemente, as amostras sólidas são tipicamente dissolvidas num solvente adequado antes da aquisição. O mesmo é aplicável a **amostras líquidas**. Nos solventes orgânicos, pode ser adicionada uma pequena quantidade de um composto de referência. No entanto, a amostra deve ser tão pura quanto possível para obter os melhores resultados. Os sinais de **impurezas** complicam o espectro desnecessariamente e, no pior dos casos, podem ocultar sinais genuínos. Deve ter-se um cuidado para assegurar que a amostra está isenta de **impurezas magnéticas**, visto que podem distorcer o campo magnético e degradar a resolução do espectro. As impurezas sólidas podem ser removidas facilmente através da filtração. Para amostras em **solventes orgânicos**, a água dissolvida pode ser removida tanto quanto possível através de uma secagem exaustiva da amostra antes da dissolução.

7.1 Seleção do solvente

Depois de a amostra ter sido suficientemente purificada e secada, o passo seguinte consiste na escolha de um solvente adequado. Uma vez que o deutério é, de longe, o núcleo mais popular para o bloqueio, a amostra é tipicamente dissolvida num solvente deuterizado (um solvente deuterizado é um solvente em que uma larga proporção, tipicamente superior a 99%, dos átomos de hidrogénio foi substituída por deutério). Os **solventes deuterizados** de utilização mais frequente são o benzeno-d₆, acetona-d₆ e clorofórmio-d, embora estejam disponíveis muitos outros solventes. Os fatores a considerar durante a seleção de um solvente são:

1. **Solubilidade:** Obviamente, é desejável uma maior dissolução da amostra no solvente. Isto maximiza a quantidade de amostra no volume sensível, aumentando a sensibilidade da experiência. Uma solubilidade alta é particularmente importante se apenas estiverem disponíveis pequenas quantidades de amostra.
2. **Interferência de sinais do solvente com o espectro da amostra:** O solvente propriamente dito produz inevitavelmente sinais de NMR que obscurecem certas regiões do espectro. Estes "picos de solvente residual" não deverão ficar sobrepostos com os sinais da amostra.
3. **Dependência da temperatura:** Para experiências com temperaturas acima ou abaixo da temperatura ambiente, os pontos de fusão e de ebulição do solvente são também fatores importantes. Adicionalmente, a solubilidade da amostra deverá variar com temperatura.
4. **Viscosidade:** Quanto menor for a viscosidade do solvente, melhor será a resolução da experiência.
5. **Custo:** Obviamente, na NMR de rotina com medição de muitas amostras, o custo dos solventes é uma consideração importante. De uma forma geral, o custo aumenta com o número de átomos deuterizados.
6. **Teor de água:** Quase todos os solventes de NMR contêm resíduos de água. Adicionalmente, muitos solventes são higroscópicos (absorvem água da atmosfera), aumentando o teor de água ao longo do tempo de armazenamento. A presença de um pico de água (HDO) degrada a qualidade do espectro de NMR. O nível de água no solvente pode ser reduzido substancialmente por filtração através de um agente de secagem ou através do armazenamento do solvente com adição de crivos moleculares.

A seleção do solvente para uma amostra deve representar um compromisso entre as várias vantagens e desvantagens de cada solvente. Pesquise mais pormenores acerca de solventes específicos na Internet.

7.2 Tubo de amostra

Dependendo do tipo de sonda ou experiência, a amostra poderá ser rodada durante a respetiva análise. A **rotação** da amostra tem o efeito de cancelar não homogeneidades do campo na direção X e Y e, conseqüentemente, melhora a resolução espectral. Uma desvantagem da rotação consiste na possibilidade da ocorrência de **bandas laterais de rotação**. Tratam-se de sinais falsos (ou seja, picos) que resultam da modulação do campo magnético na frequência de rotação. Os picos surgem sempre ao lado de qualquer pico genuíno de grandes dimensões, com uma separação igual à frequência de rotação. A intensidade destas bandas laterais será proporcional à intensidade do pico genuíno. Assim, se a frequência de rotação for de 20 revoluções/segundo (= 20 Hz), poderão ser observadas bandas laterais de rotação 20 Hz acima e abaixo das frequências de ressonância de sinais genuínos.

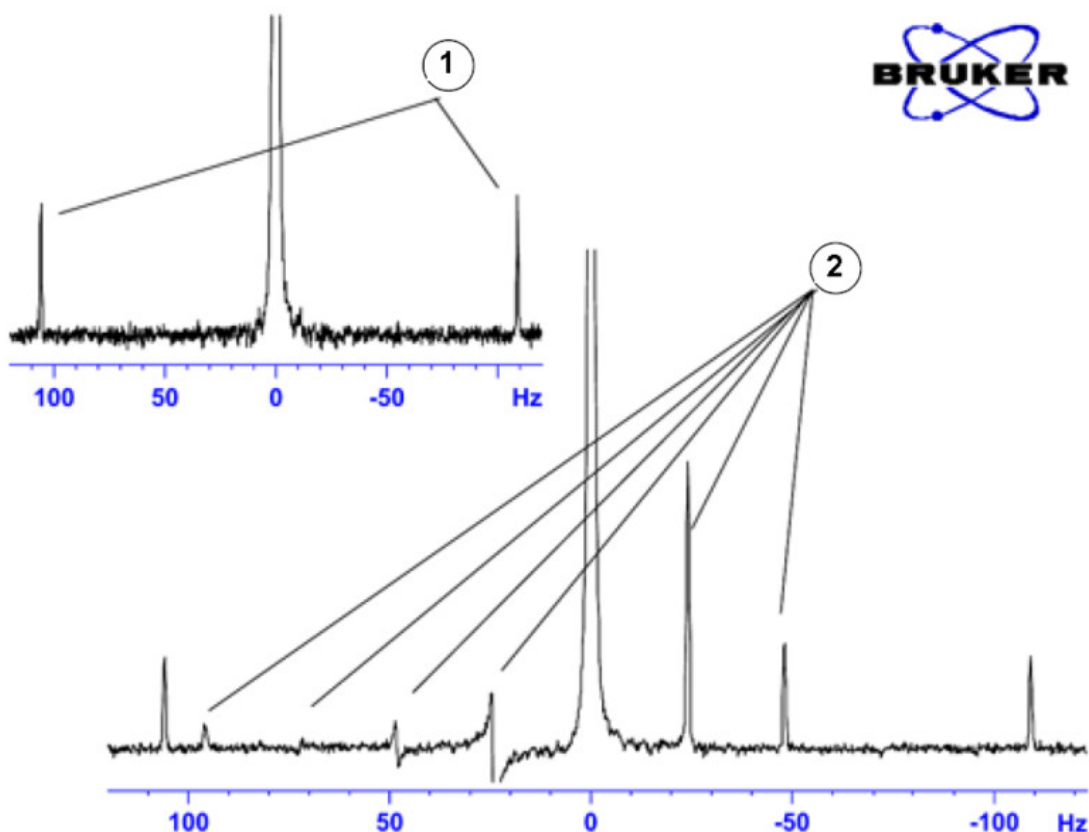


Figura 7.1: Espectro com visualização de bandas laterais de rotação

1.	Satélites ^{13}C	2.	Bandas laterais de rotação
----	---------------------------	----	----------------------------

Embora a presença de bandas laterais de rotação possa ser inevitável, a respetiva dimensão depende frequentemente da qualidade do tubo de amostra. Idealmente, o tubo de amostra deve apresentar uma simetria cilíndrica perfeita. A presença de bandas laterais muito grandes pode sugerir que a **simetria do tubo** não é adequada e pode justificar-se a utilização de tubos com especificações de maior qualidade (e, obviamente, de maior custo).

Os tubos de amostra devem ser sempre mantidos limpos e isentos de pó e riscos. Não escove os tubos com escovas para tubos de ensaio. Tenha em atenção que os tubos novos para NMR não devem ser assumidos como limpos. Os tubos podem ser limpos através da lavagem com acetona ou água destilada. Podem ser utilizados detergentes líquidos, desde que sejam enxaguados no prazo de alguns minutos para evitar a erosão do tubo. Os tubos também podem ser limpos por ultrassons numa solução adequada. Se todas as medidas anteriores não tiverem êxito, os tubos podem ser imersos em ÁGUA RÉGIA durante um

máximo de dois dias e, em seguida, enxaguados exaustivamente antes de secar. Os tubos de NMR podem ser secados num forno, mas não devem ser aquecidos acima de 100°C pois podem ficar distorcidos, impedindo a rotação necessária. Um bom método de secagem consiste na passagem de azoto filtrado através do tubo.

7.3 Manuseamento de amostras

A filtração das soluções de NMR diretamente para o tubo de amostra é uma prática recomendada para manter a solução isenta de pó e outros contaminantes.



Nota: O tubo de amostra deve ser sempre segurado pela parte superior!

Um procedimento típico de preparação de uma amostra pode ser o seguinte:

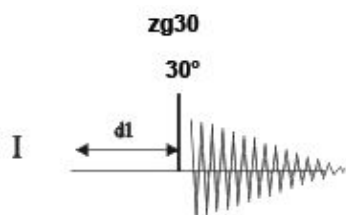
1. Para uma amostra sólida com um tubo de 5 mm, dissolva até 20 mg da amostra em cerca de 0,6 cm³ do solvente selecionado (para tubos de 10 mm, dissolva 80 mg em 2,5 cm³). Tipicamente para uma amostra líquida e quando são observados prótons, dissolva 20% de amostra em 80% de solvente deuterizado.
2. Adicione uma pequena quantidade (~0,1%) do composto de referência tetrametilsilano (TMS). Certifique-se de que o sinal de TMS é mais pequeno do que o sinal mais intenso da amostra ou do solvente (caso contrário, a razão sinal-ruído é desperdiçada devido ao baixo ganho do recetor).
3. Filtre a solução para o tubo de amostra através de uma pipeta de Pasteur com um pequeno tampão de Kimwipe.
4. Filtre 0,2 cm³ de solvente para o interior do tubo através do filtro. A solução resultante deve ter três a quatro centímetros de profundidade.
5. Feche o tubo com uma tampa, aplique parafilme para selar a parte superior e reduzir a evaporação e aplique uma etiqueta no tubo junto à parte superior. Certifique-se de que a tampa, o parafilme e a etiqueta são concêntricos; caso contrário, a rotação da amostra será afetada.



Nota: Podem surgir problemas ao utilizar fibra de vidro para a filtração da amostra, sobretudo quando se pretende medir T₁.

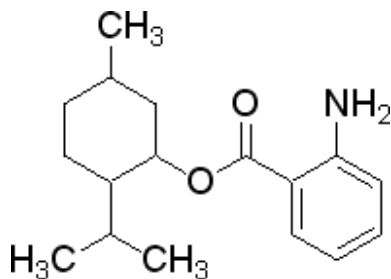
8 Espectro de prótons

Este capítulo descreve a aquisição e o processamento de um espectro de NMR unidimensional para ^1H , utilizando o conjunto de parâmetros padrão da Bruker **PROTON**. A sequência de impulsos **zg30** (consulte a figura abaixo) é constituída pelo atraso de reciclagem, o impulso de radiofrequência (RF) e o tempo de aquisição durante o qual o sinal é registado. O ângulo do impulso é indicado como 30° . Os dois parâmetros, **d1** e **p1**, correspondem à duração do atraso de reciclagem e à duração do impulso de RF a 90° , respetivamente.



Os intervalos de tempo ilustrados nos diagramas da sequência de impulsos não estão representados à escala. Por exemplo, d1 tem uma duração típica de alguns segundos enquanto que p1 tem tipicamente alguns microssegundos de duração.

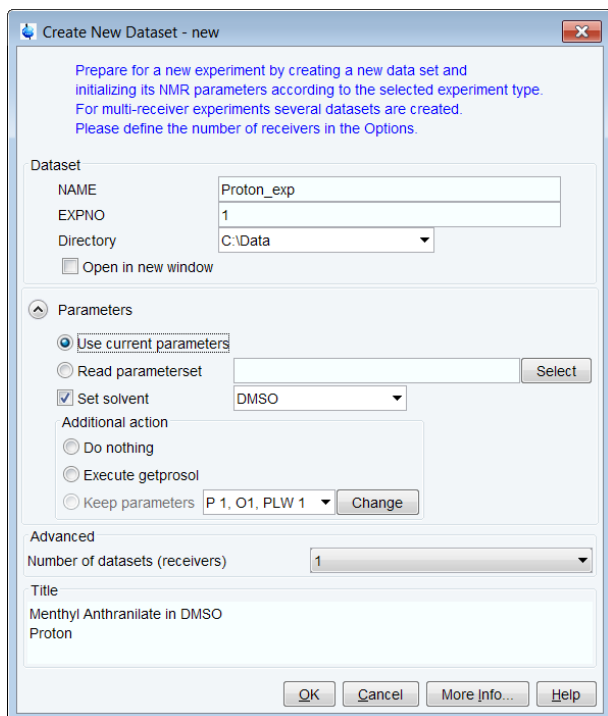
A amostra a utilizar é **30 mg de antranilato de mentilo em DMSO-d6**.



8.1 Configuração da experiência

Criar um novo conjunto de dados

- Na barra de menu, clique em **Acquire** (Adquirir) | **Create Dataset** (Criar conjunto de dados) para abrir a janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados).




- Na janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados), introduza ou selecione:
NAME (Nome) = **Proton_exp**
EXPNO (N.º exp.) = **1**
Directory (Diretório) = por exemplo, **C:\Data**

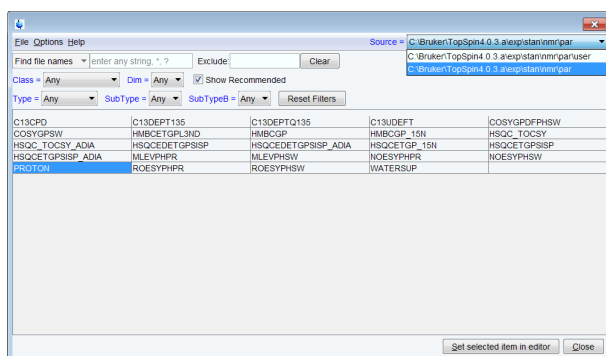
Os campos **Directory** (Diretório), **NAME** (Nome) e **EXPNO** (N.º exp.) definem onde o novo conjunto de dados da experiência será armazenado no computador:

Directory/NAME/EXPNO/ No exemplo: **C:\Data\proton_exp\1**



Directory (Diretório) pode ser selecionado na lista suspensa ou pode ser introduzida uma nova localização no campo de texto. **NAME** (Nome) é um subdiretório de **Directory** (Diretório) e **EXPNO** (N.º exp.) é um subdiretório de **NAME** (Nome). **EXPNO** deve ser um número inteiro positivo. Fornece uma maneira de armazenar vários conjuntos de dados relacionados sob o mesmo **NAME** (Nome).

- No grupo Parameters (Parâmetros)  **Parameters** clique em **Read parameterset** (Ler conjunto de parâmetros) e em **Select** (Selecionar) para abrir a janela rpar.



- Ative **Show Recommended** (Mostrar recomendado) para obter a lista das experiências de pequenas moléculas mais comuns.
- Certifique-se de que o diretório de origem é
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par`
e não
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par\utilizador`
- Na tabela, selecione **PROTON** como experiência e clique em **Set selected item in editor** (Definir item selecionado no editor).
- Na janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados), marque **Set solvent** (Definir solvente) e, na lista suspensa, selecione **DMSO**.
- No campo TITLE (TÍTULO), introduza um texto informando a experiência, a amostra, o solvente e qualquer outra informação útil. As informações do título podem ser utilizadas para procurar um conjunto de dados.
- Na janela New Dataset (Novo conjunto de dados), clique em **OK**.
- Na barra de menu, clique em **Acquire** (Adquirir).

Para adquirir um espectro, utilize os botões do fluxo de trabalho na barra do botão do fluxo de trabalho da esquerda para a direita (veja os passos abaixo). Como alternativa, os comandos apresentados entre parênteses das várias janelas pop-up também podem ser digitados na linha de comandos do TopSpin (por exemplo, **ej**, **ij**, **edte** etc.).

- No botão **Sample** (Amostra), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Eject sample manually (ej)** (Ejetar amostra manualmente).



Esperar até que o ar de elevação da amostra seja ligado e remova a amostra que pode estar no íman.

Carregar a amostra

- Coloque a amostra com o rotor na parte superior do íman.
- No botão **Sample** (Amostra), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Insert sample manually (ij)** (Inserir amostra manualmente).



Esperre até que a amostra seja baixada na sonda e o ar de elevação esteja desligado. Pode ser ouvido um clique.

Bloquear o solvente

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Lock** (Bloquear).
- Na janela da tabela de Solventes, selecione o solvente, por exemplo, **DMSO**. Clique em **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

Afinar e corresponder a sonda

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Tune** (Afinar).

Isto efetua uma **atma (afinação e correspondência automáticas)** e requer uma sonda equipada com um módulo de afinação automática. Para mais opções, clique na seta **suspensa** no botão **Tune** (Afinar).

Rodar a amostra (opcional)

- No botão **Spin** (Rodar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Turn sample rotation on (ro on) (Ligar rotação da amostra)**.



A rotação pode ser **DESLIGADA** para sondas como **BBI, TXI, TBI** e para sondas de amostras pequenas.

Homogeneizar a amostra

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Shim** (Homogeneização).

Isto executa o comando **topshim**. A homogeneização tem início pouco depois e deve demorar menos de um minuto. No botão **Shim** (Homogeneizar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.

Carregar os parâmetros de prosol

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Prosol**.

Isto carregará as larguras de impulso e os níveis de energia no conjunto de parâmetros.

8.2 Aquisição

Definir o ganho do recetor

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Gain** (Ganho).

ou

- No botão **Gain** (Ganho), clique na seta suspensa para ajustar o ganho do recetor manualmente.

Iniciar a aquisição de dados

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Run** (Executar).

ou

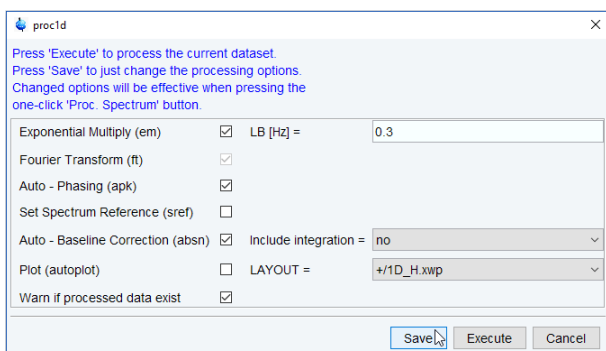
- No botão **Run** (Executar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.

8.3 Processar

- Quando a aquisição terminar, clique em **Process** (Processar) na barra de menu.
- No botão **Proc Spectrum** (Processar espectro), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Configure Standard Processing (proc1d)** (Configurar processamento padrão).
- Na janela **proc1d**, ative as seguintes opções:
 - Exponential Multiply (Multiplicação exponencial) (em)

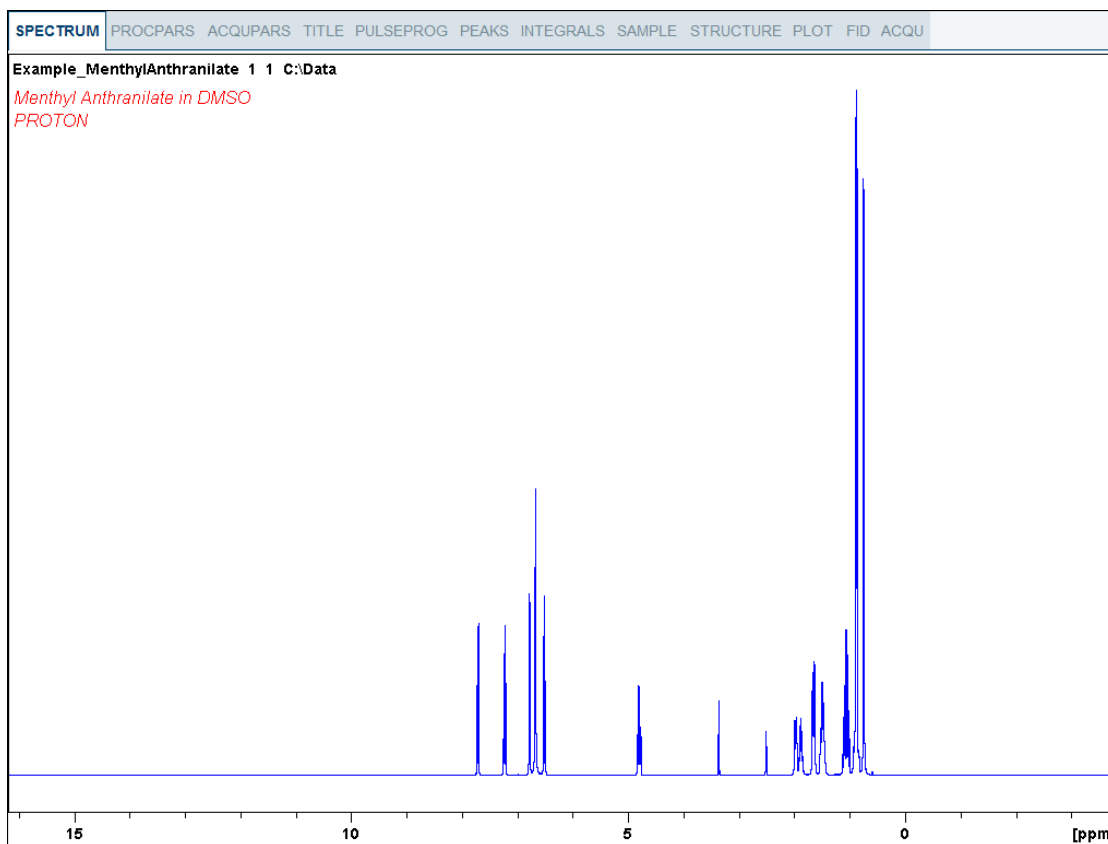
Espectro de prótons

- Auto – Phasing (Faseamento automático) (apk)
- Auto – Baseline Correction (Correção automática da linha base) (absn)



- Se o TMS for adicionado à amostra para referência, ative **Set Spectrum Reference (sref)** (Definir referência do espectro) (sref).
- Na janela proc1d, clique em **Execute** (Executar) e, em seguida, clique em **Guardar** para guardar as definições de processamento selecionadas.

Agora todos os conjuntos de dados futuros podem ser processados com as ações definidas clicando em **Proc Spectrum** (Processar espectro).

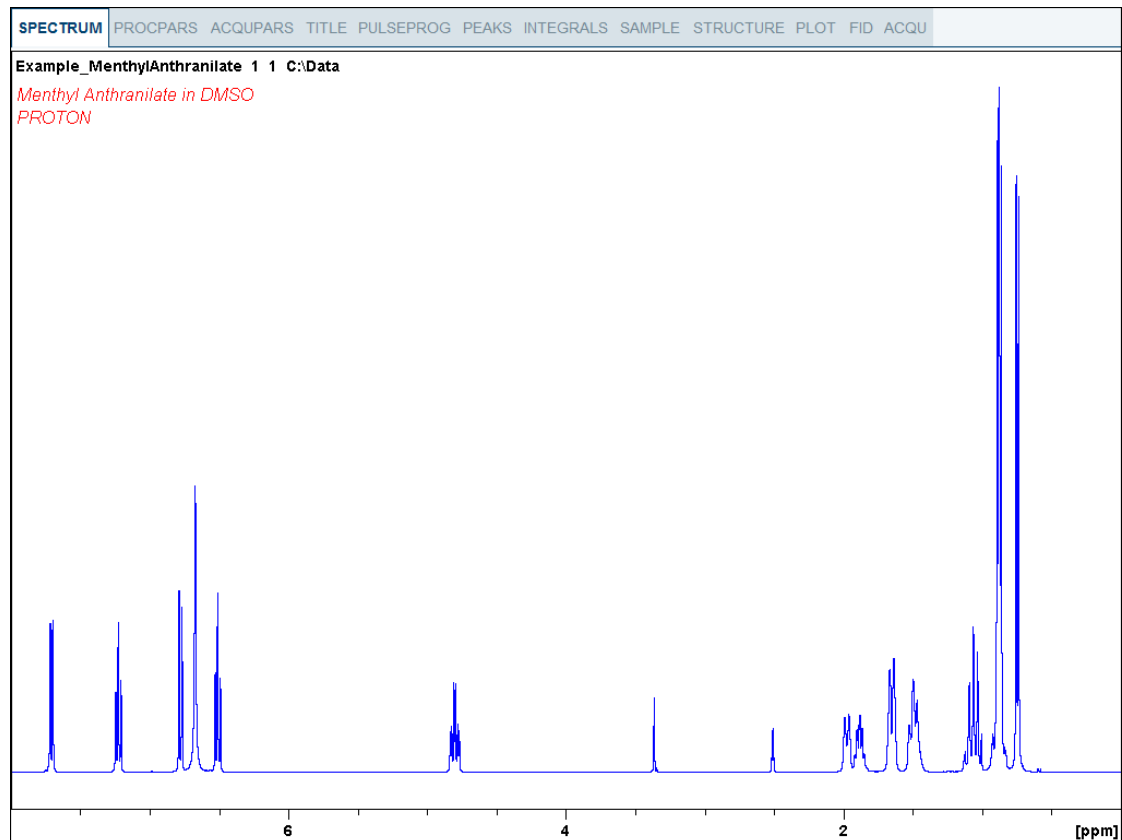


8.4 Integração

Para analisar quantitativamente o sinal de prótons observados, a intensidade integrada dos picos é comparada entre si. É frequente calcular a integral do espectro de prótons para determinar o número de prótons na molécula analisada.

Para obter resultados de integração quantitativa mais precisos, consulte o manual sobre o **NMR quantitativo**.

- Expanda o espectro para incluir todos os picos.



- No menu, clique em **Analyse | Integrate** (Analisar, Integrar).

Esta ação ativa o modo de integração manual. A barra de separadores de **conjuntos de dados** é substituída pela barra da **ferramenta de integração**.

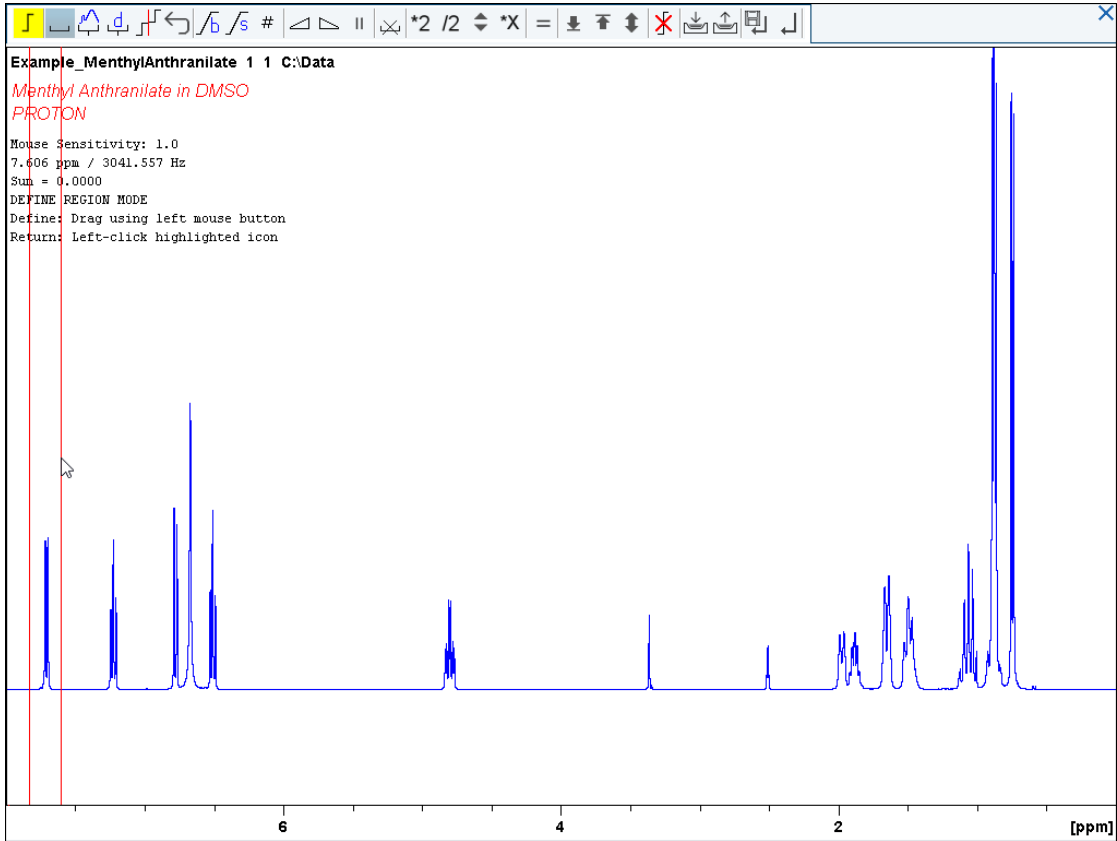
- Selecione o botão **Define new region using cursor** (Definir nova região utilizando o



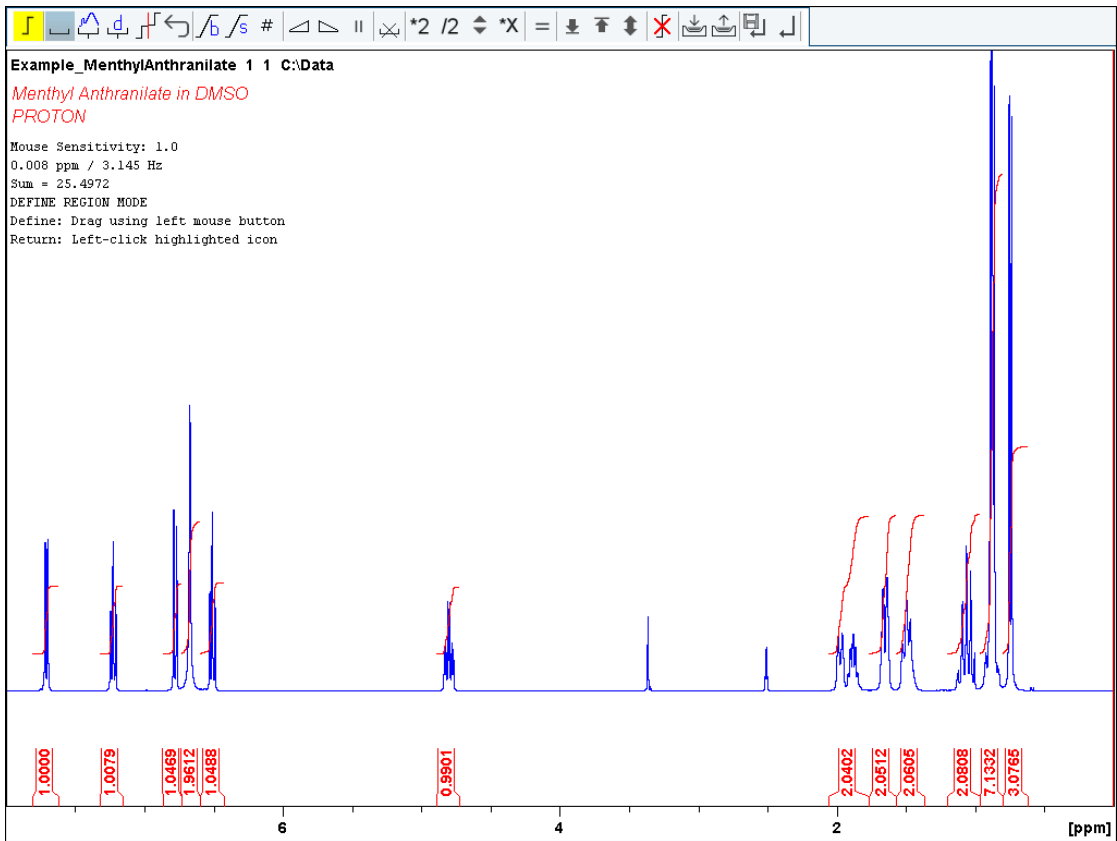
cursor).


- Defina a linha do cursor à esquerda do primeiro pico a ser integrado. Clique com o botão esquerdo do rato e arraste a linha do cursor para a direita do pico e, em seguida, solte o botão do rato.

Espectro de prótons





- Repita o último passo para todos os picos de interesse.





- Na barra da ferramenta de integração, clique em **Return, save region** (Regressar, guardar região) para guardar as regiões de integração. 


8.5 Traçar o espectro de protões 1D

- Expanda o espectro para incluir todos os picos.
- Na barra de ferramentas, clique em **Retain expansion and scale** (Reter expansão e escala). 


O espectro pode ser impresso como é apresentado no separador SPECTRUM (Espectro) mediante um clique em **Print active window** (Imprimir janela ativa) .

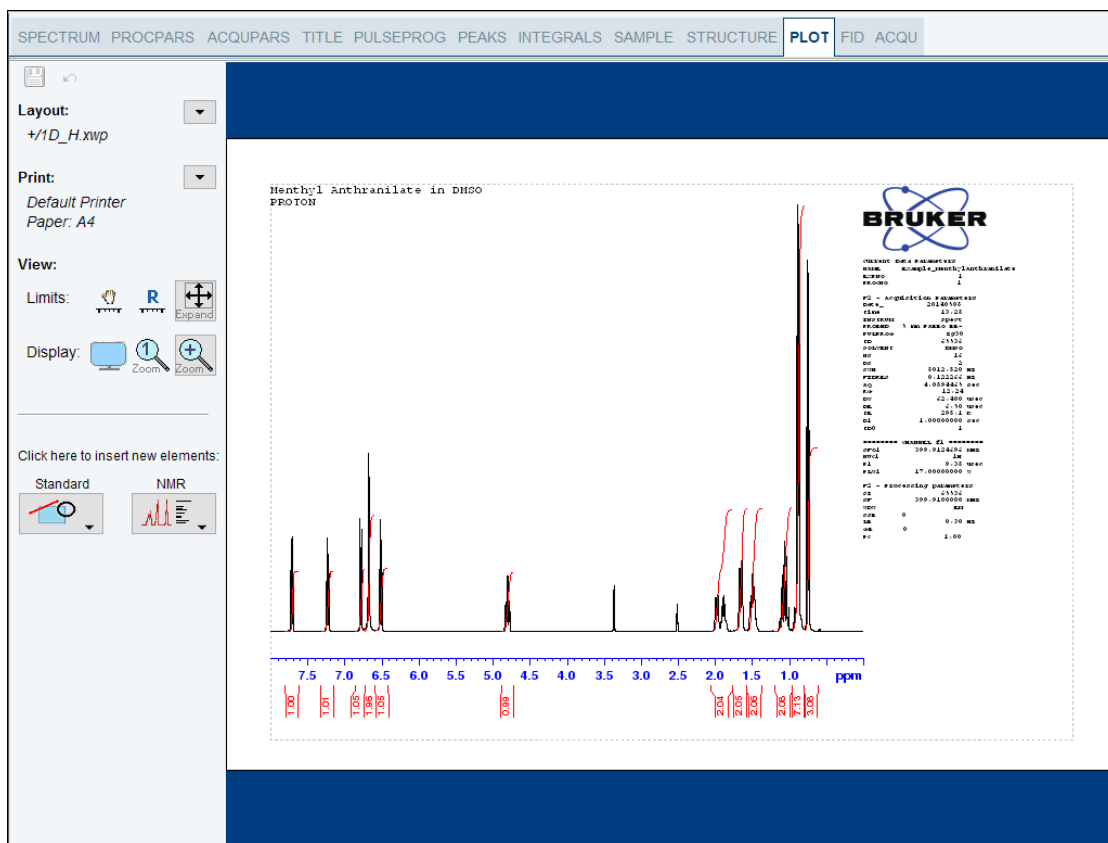
O espectro pode ser impresso com uma disposição predefinida mediante um clique em **Export active data or plot window as PDF** (Exportar janela ativa de dados ou gráfico como PDF) .

Existem opções adicionais disponíveis com o botão **Show more Publish Options** (Mostrar mais opções de publicação) na barra de menu  e **Switch to plot editor (plot)** (Mudar

para editor de gráfico) (gráfico) . Também pode mudar para o editor de gráfico interativo clicando no separador **Plot** (Gráfico) na barra de separadores da janela Dataset (Conjunto de dados) (veja a figura abaixo).



Para obter detalhes sobre como trabalhar com o editor de gráfico e modificar as disposições, consulte o manual **Data Publishing** (Publicação de dados) no menu de ajuda . Clique em **Help | Manuals | Automation and Data Publishing | Data Publishing** (Ajuda, Manuais, Automatização e publicação de dados, Publicação de dados).

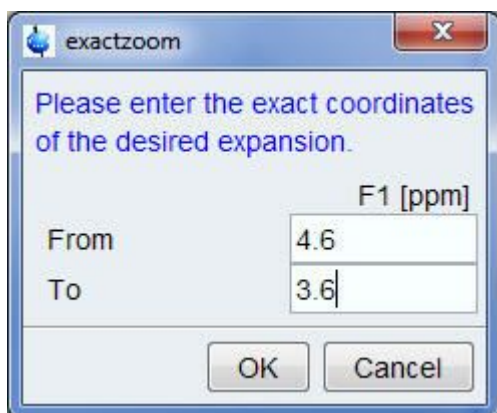


8.6 Otimizar a largura de varrimento

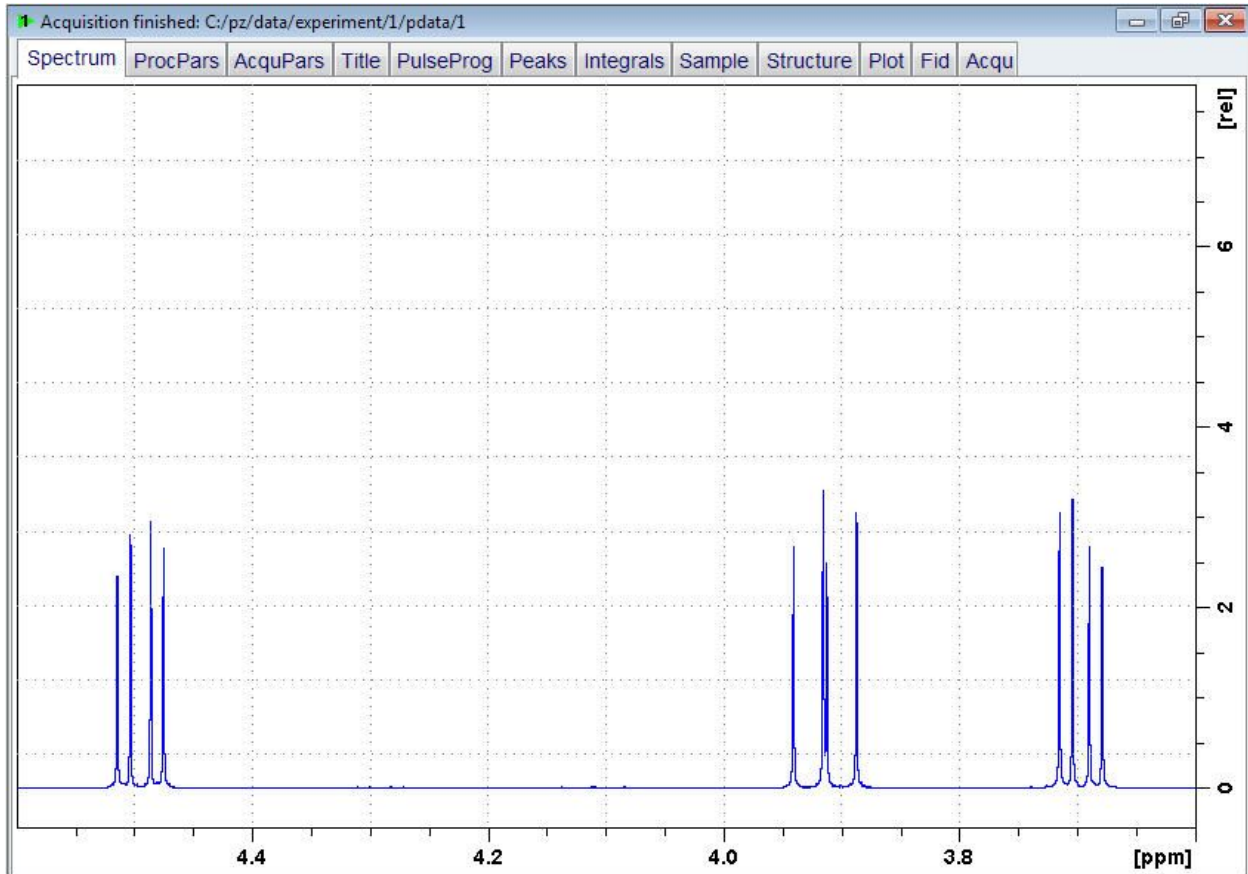
A otimização da largura de varrimento permite uma melhor resolução e separação dos picos no espectro de prótons.



- Na barra de ferramentas, clique em **Exact Zoom** (Ampliação exata).
- Introduza os seguintes valores para F1 [ppm]:
De = 4,6
A = -3,6



- Na janela Exact zoom (Ampliação exata), clique em **OK**.



- Na barra de ferramentas, clique em **Set sw to current region** (Definir largura espectral como a região atual) e **SFO1 to center of region** (SFO1 como o centro da região).



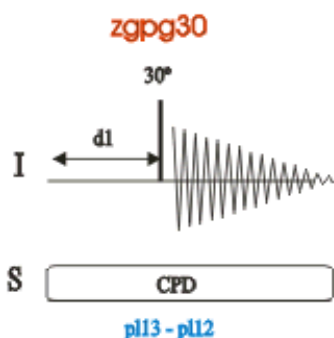
- Na janela New setting of SW (Nova definição de SW), clique em **Close** (Fechar).
- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Run** (Executar).
- Na barra de menu, clique em **Process** (Processar).
- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Proc Spectrum** (Processar espectro).



Nota: Isto executa os parâmetros de processamento guardados da janela proc1d.

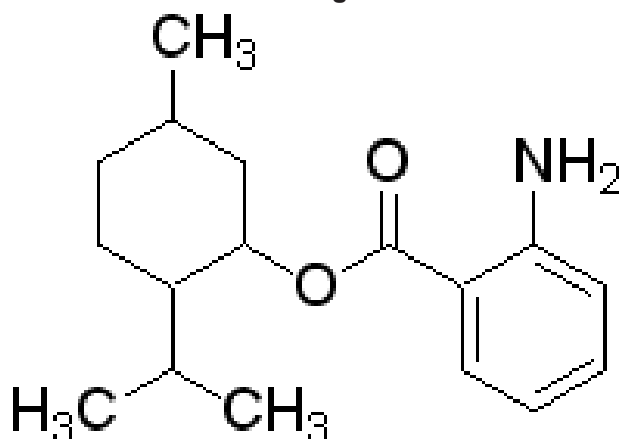
9 Espectro de ^{13}C com desacoplamento de prótons

Este capítulo descreve a aquisição e o processamento de um espectro de NMR unidimensional de ^{13}C . O conjunto de parâmetros padrão da Bruker, **C13CPD**, inclui a sequência de impulsos **zpgpg30**, ilustrada na figura abaixo. O canal de ^{13}C é constituído pelo atraso de reciclagem, um impulso de RF e o tempo de aquisição durante o qual o sinal é registado. O ângulo do impulso é indicado como 30° . Os dois parâmetros, **d1** e **p1**, correspondem à duração do atraso de reciclagem e à duração do impulso de RF a 90° , respetivamente. O canal de ^1H é constituído por dois impulsos de desacoplamento que podem ser faseados em termos de energia. O primeiro impulso, um impulso de desenvolvimento NOE durante o atraso de reciclagem, pode ter menos energia do que o segundo impulso durante a aquisição o que representa o verdadeiro impulso de desacoplamento. Esta estratégia pode ser útil para evitar o aquecimento por RF em amostras com sais ou com o uso de sondas que possam ter problemas com energias de desacoplamento superiores.




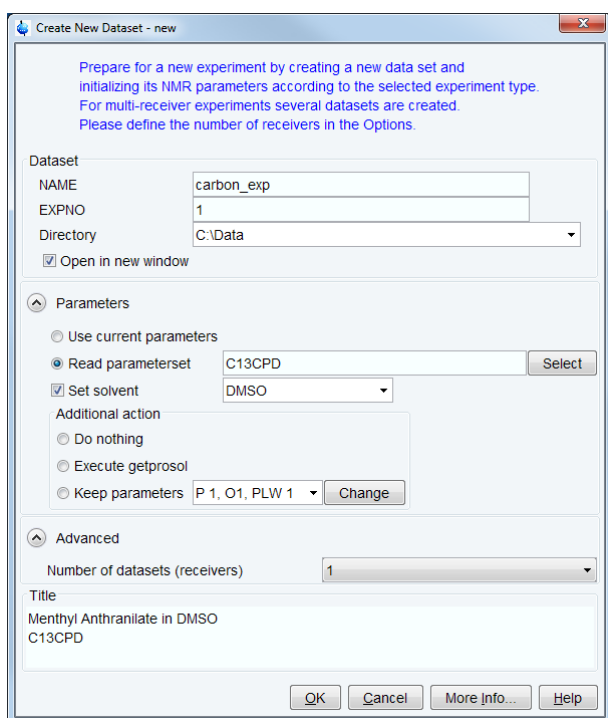
Os intervalos de tempo ilustrados nos diagramas da sequência de impulsos não estão representados à escala. Por exemplo, $d1$ tem uma duração típica de alguns segundos enquanto que $p1$ tem tipicamente alguns microssegundos de duração.

A amostra a utilizar é **30 mg de antranilato de mentilo em DMSO- d_6** .



9.1 Configuração da experiência

- Na barra de menu, clique em **Acquire** (Adquirir) | **Create Dataset** (Criar conjunto de dados) para abrir a janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados).
- Na janela New Dataset (Novo conjunto de dados), introduza ou selecione:
 NAME (Nome) = **carbon_exp**
 EXPNO (N.º exp.) = **1**
 Directory (Diretório) = por exemplo, **C:\Data**
- No grupo Parameters (Parâmetros)  **Parameters** clique em **Read parameterset** (Ler conjunto de parâmetros) e selecione a experiência **C13CPD**
- Na janela Create New Dataset (Criar novo conjunto de dados), marque **Set solvent** (Definir solvente) e, na lista suspensa, selecione **DMSO**.



- No campo TITLE (TÍTULO), introduza um texto informando a experiência, a amostra, o solvente e qualquer outra informação útil. As informações do título podem ser utilizadas para procurar um conjunto de dados.
- Na janela New Dataset (Novo conjunto de dados), clique em **OK**.
- Na janela Dataset (Conjunto de dados), selecione o separador **AcquPars**:
- Efetue a seguinte alteração:
 NS = **128**
- Na barra de menu, clique em **Acquire** (Adquirir).



Para adquirir um espectro, utilize os botões do fluxo de trabalho da esquerda para a direita.

Espectro de ^{13}C com desacoplamento de prótons

- No botão **Sample** (Amostra), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Eject sample manually (ej)** (Ejetar amostra manualmente). A elevação da amostra é ligada.



Esperre até que o ar de elevação da amostra seja ligado e remova quaisquer amostras que possam estar no íman.

- Coloque a amostra com o rotor na parte superior da coluna do íman.
- No botão **Sample** (Amostra), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Insert sample manually (ij)** (Inserir amostra manualmente).



Esperre até que a amostra seja baixada na sonda e o ar de elevação esteja desligado. Pode ser ouvido um clique.

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Lock** (Bloquear).
- Na lista da tabela de Solventes, selecione **DMSO** e clique em **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCI	(CD3)4NCI in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Tune** (Afinar).



Isto efetua uma **atma** (afinação e correspondência automáticas) e requer uma sonda equipada com um módulo de afinação e correspondência automáticas. A afinação tem sempre início com a frequência mais baixa, neste caso, o carbono, e depois muda para afinar as frequências mais altas, neste caso, o próton. No botão **Tune** (Afinar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.

- No botão **Spin** (Rodar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Turn sample rotation on (ro on)** (Ligar rotação da amostra).



A rotação pode ser desligada para sondas como **BBI**, **TXI**, **TBI** e para sondas de amostras pequenas.

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Shim** (Homogeneização).

Isto executa o comando **topshim**. No botão **Shim** (Homogeneizar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Prosol**.

Isto carregará as larguras de impulso e os níveis de energia no conjunto de parâmetros.

9.2 Aquisição

- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Gain** (Ganho).

ou

- No botão **Gain** (Ganho), clique na seta **suspensa** para ajustar o ganho do recetor manualmente.
- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Run** (Executar).

ou

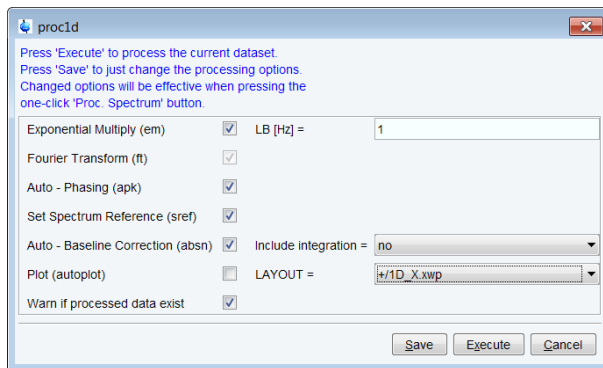
- No botão **Run** (Executar), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.

9.3 Processar

Quando a aquisição terminar:

- Na barra de menu, clique em **Process** (Processar).
- No botão **Proc Spectrum** (Processar espectro), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- Na lista, selecione **Configure Standard Processing (proc1d)** (Configurar processamento padrão).
- Na janela proc1d, selecione as opções:
 - Exponential Multiply (Multiplicação exponencial) (em)
 - Auto – Phasing (Faseamento automático) (apk)
 - Set Spectrum Reference (Definir referência do espectro) (sref)

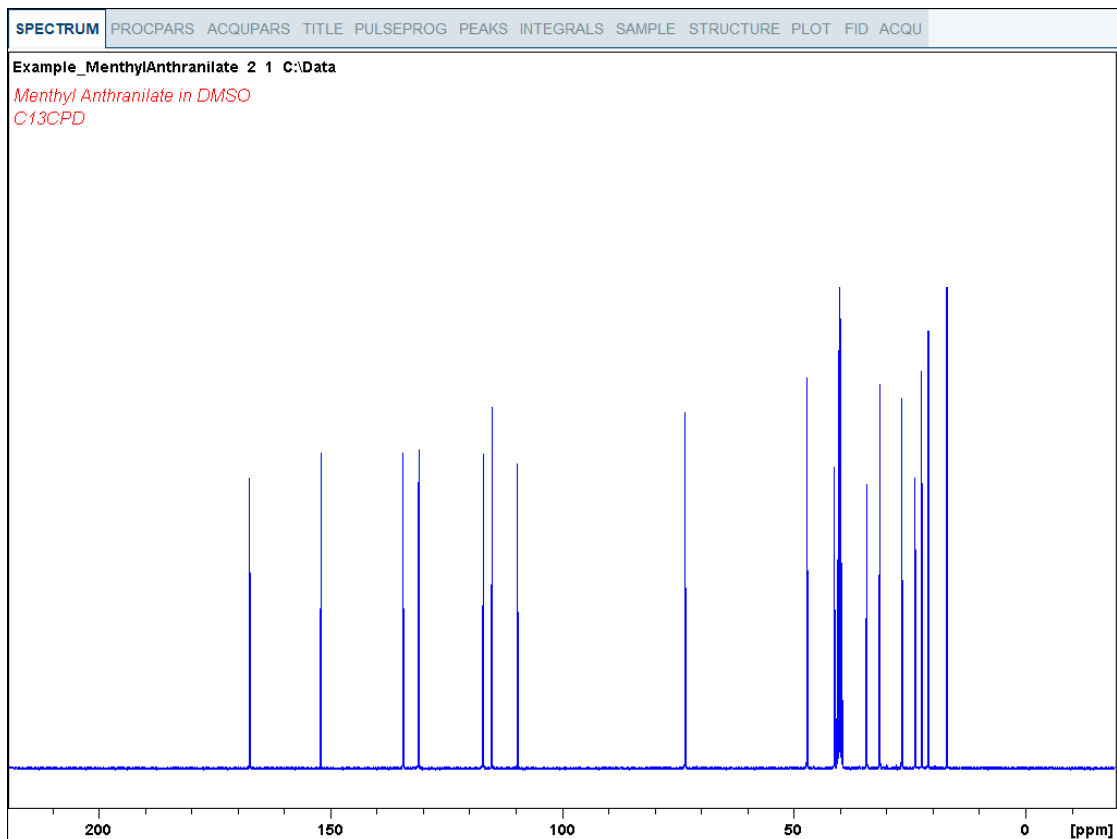
Auto – Baseline Correction (Correção automática da linha base) (absn)



- Na janela proc1d, clique em **Execute** (Executar).
- Na janela proc1d, clique em **Save** (Guardar) para guardar as definições de processamento selecionadas.

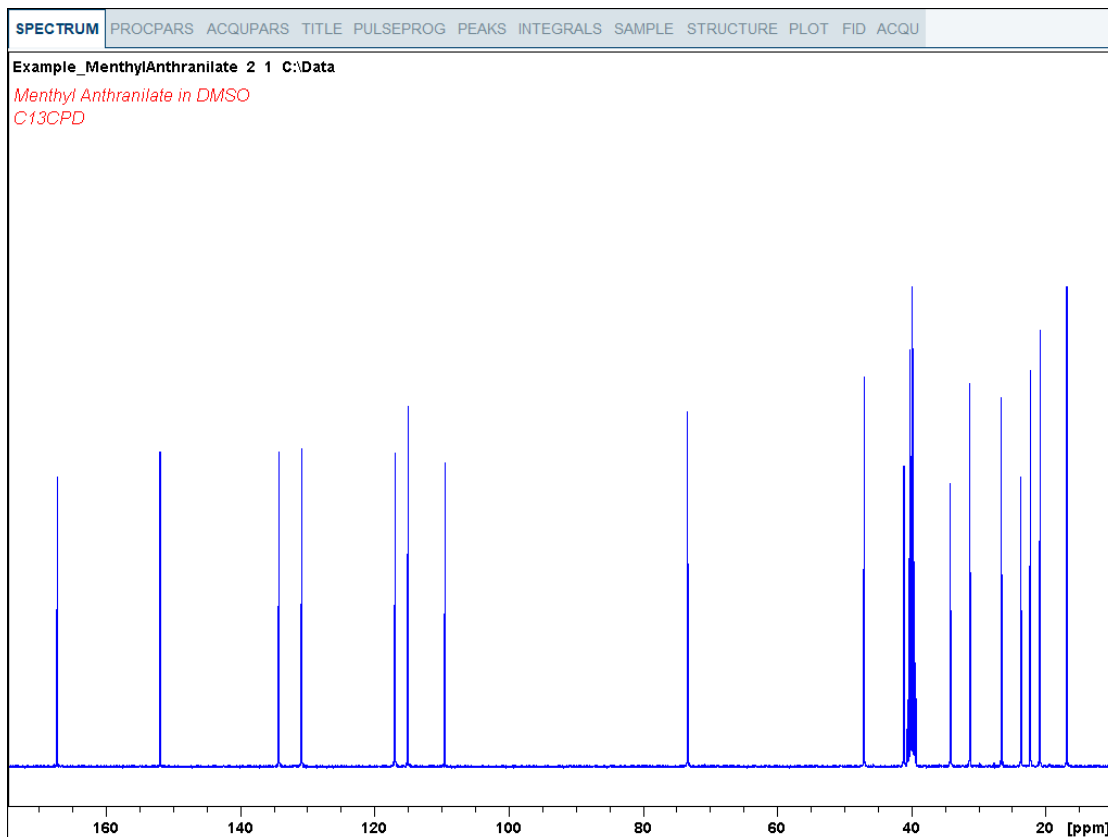


Agora todos os conjuntos de dados futuros podem ser processados com as ações definidas clicando em **Proc Spectrum** (Processar espectro).



9.4 Seleção de picos

- Expanda o espectro para incluir todos os picos.



- Na barra de menu, clique em **Analyse** (Analisar).
- Na barra de botões do fluxo de trabalho, clique em **Pick Peaks** (Selecionar picos).

ou

- No botão **Pick Peaks** (Selecionar picos), clique na seta **suspensa** para ver mais opções.

Esta ação ativa o modo de seleção de picos manual.

Os separadores do **conjunto de dados** são substituídos pela barra de ferramentas de **seleção de picos**.

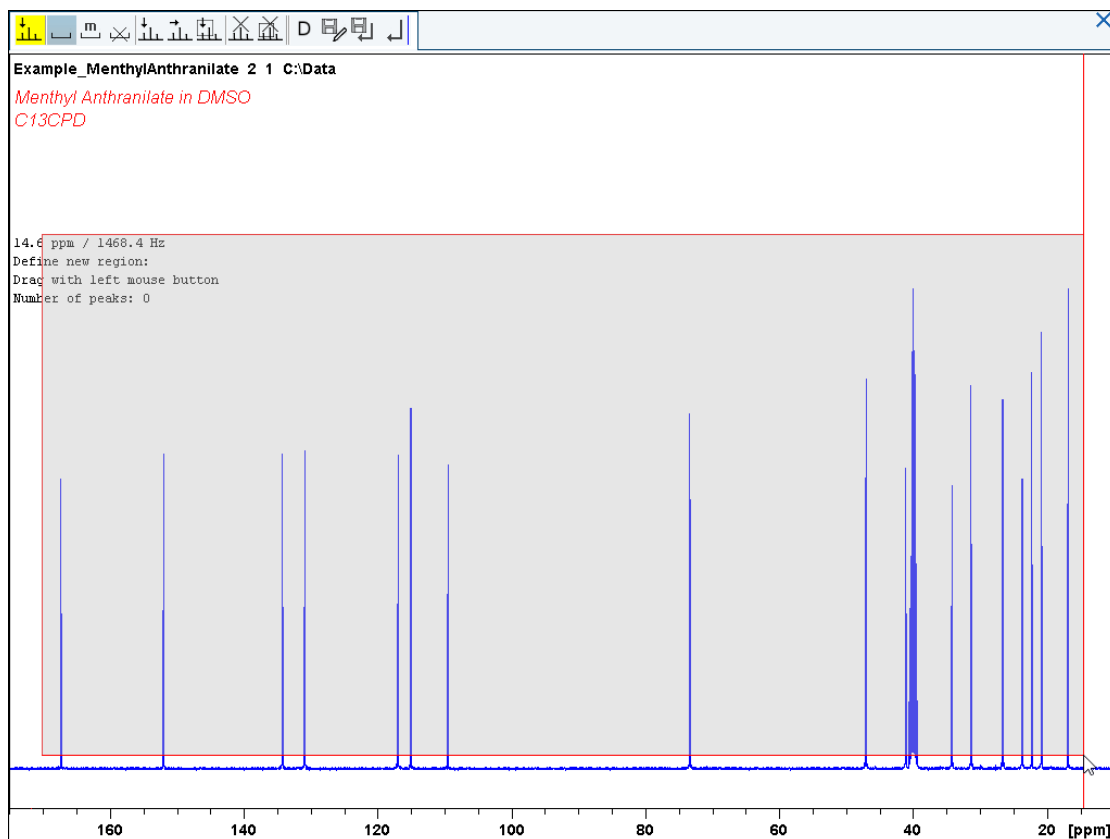



Por padrão, o botão **Define new peak picking range** (Definir novo intervalo de seleção de picos) é ativado.

- Clique à esquerda e arraste a linha do cursor da esquerda para a direita do espectro, desenhando uma caixa retangular.

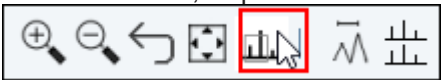




O botão **Modify existing peak picking range** (Modificar intervalo de seleção de picos existente) permite levantar a parte inferior e/ou baixar a parte superior da caixa de seleção de picos para excluir ruído ou solvente.

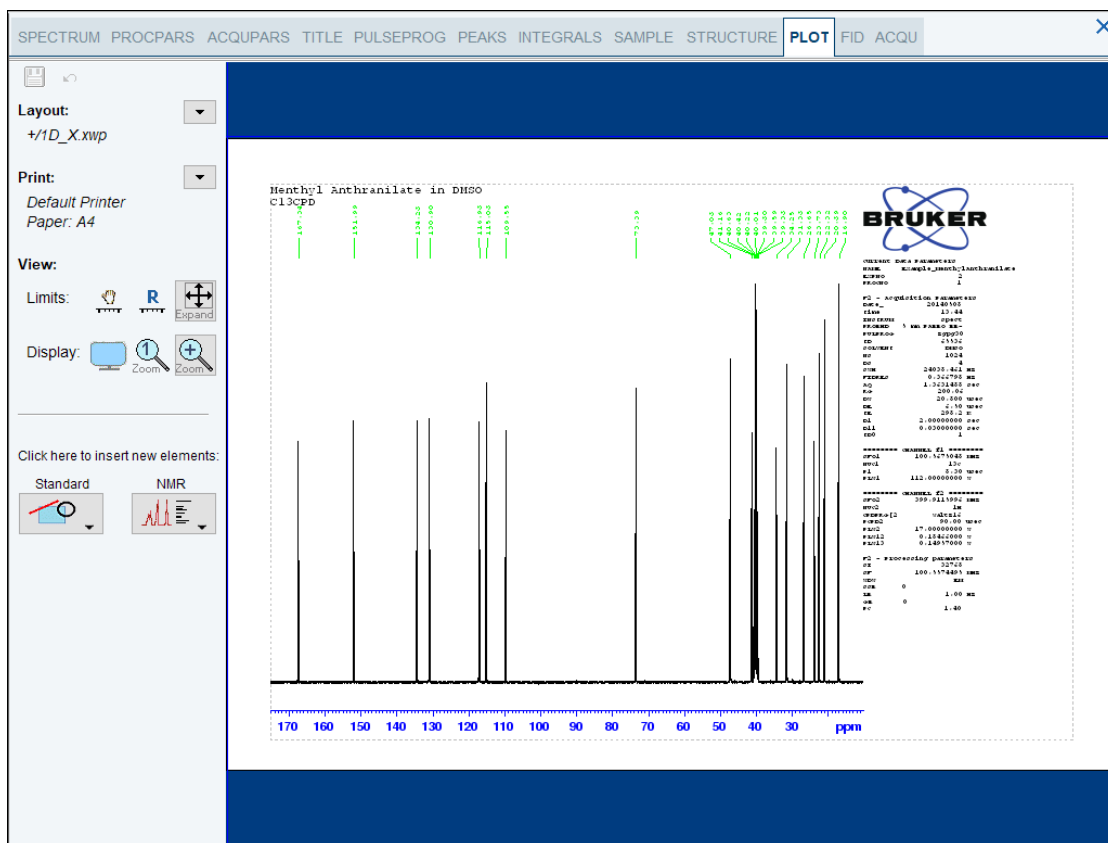


- Na barra de ferramentas de seleção de picos, clique em **Return, save region** (Regressar, guardar região) para armazenar os valores de pico. 
- Para apresentar as etiquetas de seleção de picos, clique com o botão direito do rato na janela do espectro e selecione **Spectra Display Preferences** (Preferências de apresentação dos espectros). Nos componentes do espectro, ative **Peak labels** (Etiquetas de picos) e **Peak annotations** (Anotações de picos). Clique em **Apply** (Aplicar) e **Close** (Fechar).

9.5 Traçar o espectro de carbono 1D

- Expanda o espectro para incluir todos os picos.
- Na barra de ferramentas, clique em **Retain expansion and scale** (Retenir expansão e escala). 
- Na barra de menu, clique em **Show more Publishing Options** (Mostrar mais opções de publicação). 
- Selecione **Switch to plot editor** (plot) (Mudar para editor de gráfico) (gráfico). 

Espectro de ^{13}C com desacoplamento de prótons



Se necessário, qualquer alteração pode ser introduzida com as ferramentas no lado esquerdo do ecrã.

- Na secção **Print** (Imprimir) à esquerda, clique na seta **suspensa** para ver mais opções.
- na lista, seleccione **Print** (Imprimir).

10 Contacto

Fabricante:

Bruker BioSpin NMR
Silberstreifen
D-76287 Rheinstetten
Alemanha
Telefone: +49 721-5161-6155
<http://www.bruker.com>
WEEE DE43181702

Linhas diretas de NMR

Contacte os nossos centros de assistência de NMR.

A Bruker BioSpin NMR fornece linhas diretas e centros de assistência dedicados, de modo a que os nossos especialistas possam responder tão rapidamente quanto possível aos seus pedidos de assistência, questões sobre aplicações, necessidades de software ou técnicas.

Selecione a linha direta ou o centro de assistência de NMR que pretende contactar a partir da nossa lista disponível em:

<http://www.bruker.com/service/information-communication/helpdesk/magnetic-resonance.html>

Lista de figuras

Figura 3.1:	Excitação e resposta	9
Figura 3.2:	Espectro de NMR	10
Figura 3.3:	Análise de CHCl ₃ por NMR.....	11
Figura 3.4:	Sinais de NMR emitidos por CHCl ₃	12
Figura 3.5:	Conversão de Hertz e ppm.....	13
Figura 3.6:	Desvios químicos de ¹ H em compostos orgânicos	15
Figura 3.7:	Anel de benzeno.....	15
Figura 3.8:	Espectro de benzeno.....	16
Figura 3.9:	Benzilacetato	16
Figura 3.10:	Espectro de prótons de benzilacetato	17
Figura 3.11:	Etilbenzeno	18
Figura 3.12:	Espectro de etilbenzeno	19
Figura 3.13:	Experiência de desacoplamento.....	20
Figura 3.14:	Espectro de etilbenzeno com homodesacoplamento.....	21
Figura 3.15:	Transformada de Fourier.....	22
Figura 4.1:	Consola e íman de ascensão AVANCE NEO.....	23
Figura 4.2:	Descrição geral da arquitetura AVANCE NEO	24
Figura 4.3:	Fotografia do Íman, Sistema de homogeneização, Sonda e HPPR.....	26
Figura 4.4:	Íman supercondutor.....	28
Figura 4.5:	Amostra na sonda.....	30
Figura 4.6:	Cablagem típica da unidade HPPR.....	31
Figura 4.7:	Exemplo de uma sonda de banda larga	32
Figura 4.8:	A Plataforma iProbe da Bruker	33
Figura 5.1:	Introduzir a amostra no rotor	38
Figura 5.2:	Tabela de solventes.....	39
Figura 5.3:	Visualização do bloqueio após o bloqueio da amostra.....	40
Figura 5.4:	Janela de afinação/correspondência da sonda ATMM.....	41
Figura 5.5:	Exemplos de curvas de oscilação com afinação e correspondência diferentes.....	43
Figura 5.6:	A janela proc1d.....	45
Figura 6.1:	Espectro com BF1 = 600,13 MHz, O1 = 0 Hz	48
Figura 6.2:	Espectro com BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz.....	49
Figura 6.3:	Espectro com BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz, SWH = 8,4 kHz.....	49
Figura 6.4:	Interação entre SFO1, BF1 e O1.....	50
Figura 7.1:	Espectro com visualização de bandas laterais de rotação.....	52

Lista de tabelas

Tabela 3.1: Tabela de dados para vários isótopos (frequências referentes a um íman de 11,7 T)	9
Tabela 3.2: Variações da frequência (referentes a um íman de 11,7 T)	10

Glossário

benzeno-d₆, clorofórmio-d e DMSO-d₆, embora estejam disponíveis muitos outros solventes.

AQS

Sistema de Aquisição

BSMS

O sistema de controlo de íman inteligente da Bruker (BSMS, Bruker Smart Magnet control System) permite o controlo por computador de várias funções associadas ao íman, ao campo magnético e à amostra.

BSVT

Sistema Inteligente de Temperatura Variável da Bruker

desvio químico

A variação na frequência de ressonância precisa.

EPU

Unidade de Processamento Integrada

GAB/3

Placa Amplificadora de Gradiente 3

GTU

Unidade de Gradiente e Temporização

HPPR

Pré-amplificador de alto desempenho

ppm

partes por milhão

solvente deuterizado

Um solvente deuterizado consiste num solvente em que uma larga percentagem dos átomos de hidrogénio foi substituída por deutério. Os solventes deuterizados de utilização mais frequente são a acetona-d₆,

Índice remissivo

A

Abundância natural	12
acoplamento spin-spin os efeitos de	20
Afinação	42
Amostras líquidas	51
Amplificadores	25
Banda larga	25
Seletivos	25
AQS	24
Arrefecimento do ímã	7
Ativo em NMR	11
AVANCE NEO	24
Azoto Azoto líquido	7

B

Banda larga bobina	31
Bandas laterais Intensidade das bandas laterais	52
Bandas laterais de rotação	52
BASH	24
BF	47
Blindagem magnética	10
Bloquear a amostra	29
Bloqueio de flúor	29
Bobina de observação I	31
Bobinas de RF	30
BSMS	24, 26

C

Campos de dispersão	7
CE Declaração de Conformidade	8
Computador anfitrião	24
Conjunto de dados	36
Consola	23
Consola do operador	23, 24
Correspondência	42

D

Declaração de Conformidade	8
Deriva	29
Desvio químico	14

E

edlock	39
Eletroímãs	27
Espectros de prótons	14
EXPNO	36

F

FID Definição	22
Frequência	10
Frequência de ressonância	32
Frequência portadora	10
Frequências absolutas	13
Frequências de ressonância	9

H

Hélio Hélio líquido	7
Hertz Conversão	13
Heterodesacoplamento	21
Homogeneidade do campo	44
Homogeneização	26, 44
HPPR	25, 27, 29
HPPR/2	27

I

Ímã	26
Descrição do sistema	27
Segurança	7
Ímãs supercondutores	27
Implantes metálicos	7
Impulsos de desacoplamento	20
Impurezas	51
Impurezas magnéticas	51
Intensidade	10
de um sinal	10
Intensidade do sinal medida da	10
Intensidade integrada	10
Isótopo Frequência de ressonância básica	9
Isótopos	11

L

Ligação Ethernet	24
Linha de transferência N2	32

M

Magneticamente equivalente	16
Multipletos	18

N

NAME	36
Núcleo de observação	10
Núcleo do íman	27

P

Pacemakers cardíacos	7
Parafilme	53
Parâmetro:SFO1	10
PDU	25
Pontos de dados SI	45
ppm	12
Pré-amplificador de Alto Desempenho	25
Pré-amplificadores	30

Q

QNP probe	32
Quarteto	18
Quimicamente equivalente	16

R

Resolução espectral	44
Resolução horizontal de um espectro	12
Rotação	52

S

Segurança	7
Campos magnéticos	7
Química	8
Segurança elétrica	8
Segurança química	8
Seletivas	
Sondas	30
Sensibilidade	12
sensor do nível de hélio	28
SFO1	47
Simetria do tubo	52
Singleto	20
Singletos	11
Sistema de bloqueio	
Finalidade	29
Recetor	29
Sistema de homogeneização	26
Sistema de íman	23
Sistema de Íman Inteligente da Bruker	24
Sólidos	51
Solvente	
Fatores de seleção	51
Solvente deuterizado	29
Solventes	
Dependência da temperatura	51
Solubilidade	51
Teor de água	51
Viscosidade	51
Solventes deuterizados	51

Solventes orgânicos	51
Sonda	30
Trocar uma sonda	34
Sondas	
Aquecedor	32
Bobina de banda larga	31
Bobina de observação	31
Seletivas	30

T

TD	45
Temperatura da amostra	32
Termopar	32
TopShim	44
Transformada de Fourier	45
Transmissores	25
Tripleto	18
Tubos de amostra	52

U

unidade de distribuição de alimentação	25
Unidade de temperatura variável	32

V

VTU	32
-----------	----





Bruker Corporation

info@bruker.com
www.bruker.com

Order No: H171804PT