



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MARCUS VINICIUS CANGUSSU CARDOSO**

**ÁGUA E CARBOIDRATOS: ASPECTOS MACROSCÓPICOS E  
MOLECULARES DE SUAS INTERAÇÕES**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. EDVALDO SABADINI  
Co-ORIENTADOR: Prof. Dr. MUNIR SALOMÃO SKAF**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR MARCUS VINICIUS CANGUSSU CARDOSO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. EDVALDO  
SABADINI.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

C178a Cardoso, Marcus Vinicius Cangussu (1981-).  
Água e carboidratos: aspectos macroscópicos e  
moleculares de suas interações / Marcus Vinicius  
Cangussu Cardoso. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Edvaldo Sabadini.  
Coorientador: Munir Salomão Skaf.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1. Água. 2. Carboidratos. 3. Relaxação nuclear  
magnética. 4. Interações intermoleculares. 5. Troca de  
prótons. I. Sabadini, Edvaldo. II. Skaf, Munir Salomão.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Water and carbohydrates: macroscopic and molecular aspects of their interactions

**Palavras-chave em inglês:**

Water  
Carbohydrates  
Nuclear magnetic relaxation  
Intermolecular interactions  
Protons exchange

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Edvaldo Sabadini [Orientador]  
Luiz Alberto Colnago  
Eduardo Ribeiro de Azevedo  
Alviclér Magalhães  
Pedro Luiz Onófrío Volpe

**Data de defesa:** 27/04/2012

**Programa de pós-graduação:** Química



*“Felix qui potuit rerum cognoscere causas”*

*Virgílio*

*“All men by nature desire to know.”*

...

*“Since we are seeking this knowledge, we must inquire of what kind are the causes and the principles, the knowledge of which is wisdom.”*

*Aristóteles-A Metafísica*

À minha mãe,  
Lúcia M<sup>a</sup> Cangussu



## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química e à UNICAMP pela possibilidade de trabalho.

À CAPES pelos 5 primeiros meses de bolsa.

À FAPESP (projeto 2008/00908-4) pelo financiamento de 43 meses de um total de 48. Ao assessor pela indicação de renovação (mais 12 meses) sem a qual não teria sido possível a realização do estágio Sanduíche e seus consequentes aprendizados.

Ao Edvaldo pela oportunidade de trabalho, pelos ensinamentos e confiança.

*I'm deeply grateful to Brian Hills for the warm reception at NMR Laboratory-IFR and for the rich taught in time domain NMR relaxation spectroscopy. I'm equally thankful to Ben Pigotti, Kevin Wright, and Josh Warmier for help in relaxation experiments and for good conversation and enjoyable moments.* Ao Brian Hills pela calorosa recepção durante estágio sanduíche, e pelos vários ensinamentos de relaxometria por RMN no domínio do tempo. Aos colegas Ben Pigotti, Kevin Wright, e Josh Warmier, pelos esclarecimento de dúvidas durante a execução dos experimentos e pelos bons momentos de convivência no IFR.

A todos amigos de laboratório com as discussões enriquecedoras e momentos de descontração. Especialmente à amiga Larissa pela convivência e pela parceria bem sucedida. Aos amigos Kléber e Rogério, pelos bons momentos. Ao Serginho pela conversa motivadora!!!

Aos funcionários do IQ como um todo que tiveram um importante papel para a execução dos trabalhos experimentais e em especial à Cláudia Martelli do Laboratório de Infravermelho; aos funcionários do laboratório de RMN Anderson, Paula e Sônia; do Laboratório de Ensino, Divino e Míriam; e os técnicos do laboratório B145 Marina e Piva.

Aos meus familiares, irmãos (André, Léo e Víctor), que sempre estiveram próximos em vibrações e pensamento e que muito contribuíram com bons conselhos e mensagens de incentivo.

À Valéria que sempre esteve ao lado incentivando e amparado em todos os momentos.

Aos meus pais e avós,

em especial à minha mãe pela força, exemplo, e sobretudo pelo seu amor.

# SÚMULA CURRICULAR

## 1. Formação Acadêmica

- ✓ Mestrado em Agroquímica (Área de concentração: Físico-química)- Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- ✓ Graduação (Licenciatura e Bacharelado) em Química. Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- ✓ Auxiliar Técnico em Química-FEMC. 1999.
- ✓ Aprendizagem Industrial- Eletro-Eletrônica. SENAI-MG, 1999.

## 2. Estágio no Exterior (Sanduíche)

- ✓ Estudo de sistemas aquosos de Carboidratos usando Relaxação Magnética Nuclear no domínio do tempo e Espectroscopia de Correlação Cruzada. Supervisor: Brian Hills. Local: *Institute of Food Research/Norwich-Reino Unido*. Período de Abril – Agosto de 2011

## 3. Atividades Profissionais

- ✓ Estágio Docente (PED-B)-Instituto de Química-UNICAMP, por dois semestres (agosto-dezembro “FQ 954S” / 2009; março-agosto “FQ 732” / 2010).
- ✓ Professor Substituto de Química-Universidade Federal de Viçosa (março/2006 a fevereiro/2008)
- ✓ Professor de Física e Química do Ensino Médio na Escola Estadual Effie Rolfs-Viçosa (agosto-dezembro de 2004).

## 4. Participações Recentes em Eventos Científicos

- ✓ Cardoso, Marcus V C ; Carvalho, L. V. C. ; Sabadini, Edvaldo .  $^1\text{H}$  Spin-spin Relaxation of Water as a Probe to Self- Aggregation of *n*-alkyl-pyranosides. In: 2º ENCONTRO SOBRE ESTRUTURAS AUTO-ORGANIZADAS EM SOLUÇÕES E INTERFACES, 2010, São Pedro - SP. AUTOORG 2010.
- ✓ Cardoso, Marcus V. C.; Sabadini, E. Gelation of Kappa-carrageenan in Light and Heavy Water. In: 23rd Conference of the European Colloid and Interface Society, 2009, Antalya. ECIS 2009, 2009. p. P.IV.017.

## 5. PUBLICAÇÕES

1. Cardoso, M.V.C.; Carvalho, L.V.C.; Sabadini, E. The Solubility of Carbohydrates in Light and Heavy Water. *Carbohydr. Res.* **2012**, 353, 57-61.
2. Cardoso, M.V.C.; Sabadini, E. The Gelling of  $\kappa$ -carrageenan in Light and Heavy Water. *Carbohydr. Res.* **2010**, 345(16), 2368-2373.
3. da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C. ; Minim, L. A. ; Coimbra, J. S. R. PEO-[M(CN)<sub>5</sub>NO]<sup>x-</sup> (M = Fe, Mn, or Cr) Interaction as a Driving Force in the Partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate Anion in ATPS: Strong Effect of the Central Atom. *J. Phy. Chem. B*, **2008**, 112, 11669-11678.
4. da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C. ; Minim, L. A. ; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO Enthalpic Interaction as a Driving Force for Partitioning of the [Fe(CN)<sub>5</sub>NO]<sup>2-</sup> Anions in Aqueous Two-Phase Systems Formed by Poly(ethylene oxide) and Sulfate Salts. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 23540-23546.

## RESUMO

### ÁGUA E CARBOIDRATOS: ASPECTOS MACROSCÓPICOS E MOLECULARES DE SUAS INTERAÇÕES

Soluções aquosas de mono, di, oligo, e polissacarídeos foram estudadas nos níveis macroscópico e molecular, empregando-se enfoques termodinâmicos e espectroscópicos. A influência da intensidade da ligação de hidrogênio sobre a solubilidade dos carboidratos (lineares e cíclicos) mostrou-se fortemente dependente de suas solubilidades. Quanto menos solúvel o carboidrato, maior é o efeito da substituição isotópica do solvente ( $H_2O$  por  $D_2O$ ). Este efeito sugere que carboidratos menos solúveis (e maiores) perturbam mais fortemente a estruturação das moléculas de água. Devido ao efeito cooperativo da transição *coil-helix* da  $\kappa$ -carragena, o efeito isotópico sobre a gelificação é bastante intensificado. Segundo uma perspectiva mais molecular, as taxas de troca protônicas,  $k_b$ , entre os prótons da água e os grupos OH dos carboidratos dependem da natureza do açúcar, sendo os maiores valores observados para a forma linear, seguida pela forma piranosídea e por último pela forma furanosídea. Já as transferências de magnetização entre as populações de prótons da água e dos grupos CH-carboidratos são moduladas pelos movimentos moleculares e intermediadas pelas trocas protônicas com os grupos OH. Propõe-se que os prótons das moléculas de água interagem preferencialmente com os prótons OH e negligenciavelmente com os prótons CH. Estudos de relaxação  $^1H$  mostraram-se ricos para o estudo de processos moleculares de agregação micelar dos *n*-alquil-glicosídeos sendo possível demonstrar experimentalmente que a agregação leva à indisponibilização das hidroxilas ao interagirem com as moléculas de água.



## ABSTRACT

### WATER AND CARBOHYDRATES:

#### MACROSCOPIC AND MOLECULAR ASPECTS OF THEIR INTERACTIONS

Aqueous solutions of mono, di, oligo, and polysaccharides were studied on the macroscopic and molecular standpoints through thermodynamic and spectroscopic approaches. The effect of hydrogen-bonding strength on the solubility of a series of (linear and cyclic) saccharides showed to be strongly dependent of the solubility of the carbohydrate. As lower is the solubility of the carbohydrate, greater will be the deuterium isotopic effect of the solvent ( $\text{H}_2\text{O}$  for  $\text{D}_2\text{O}$ ) on the carbohydrate solubilities. These results suggest that low soluble carbohydrates (and larger ones) perturb more strongly the water structure. Owing to the cooperativity of the coil-helix transition, the deuterium isotope effect on the gelling of  $\kappa$ -carrageenan is intensified leading to stronger gels and double-helices more stable in  $\text{D}_2\text{O}$ . Looking deeper onto a molecular perspective and based on spin-spin nuclear magnetic relaxation, the proton exchange rates,  $k_b$ , between water and OH-carbohydrate, are dependent of the nature of the saccharide. The  $k_b$  values are higher for linear than for pyranoside form, and the slowest value is found for fructofuranoside form. The transferring of magnetization between proton pools of water and CH-carbohydrates are modulated by molecular motions and intermediated by proton exchanging process between water and OH-carbohydrate protons.  $^1\text{H}$  NMR relaxation experiments of exchangeable protons provide to be rich in probing the micellar aggregation of *n*-alkyl-glucosides. It was possible to demonstrate experimentally that the aggregation of the surfactant molecules provoke a drastic reduction on the interactions between water and OH-saccharide head groups.



## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxi
SÍMBOLOS DE LETRAS GREGAS .....	xxiii
LISTA DE TABELAS .....	xxv
LISTA DE FIGURAS .....	xxix
Capítulo 1 .....	1
Aspectos Gerais dos Sistemas Formados por Água e Carboidratos .....	1
<b>1.1 Por que água e carboidratos?</b> .....	1
<b>1.2 A Estrutura da água</b> .....	2
<b>1.3 Interações carboidrato-H<sub>2</sub>O e motivação desta tese</b> .....	5
<b>1.4 Apresentação da tese</b> .....	7
<b>1.5 Referências</b> .....	9
Capítulo 2 .....	11
Efeito Isotópico do Deutério sobre a Solubilidade de Carboidratos.....	11
2.1. <i>Introdução</i> .....	13
2.2. <i>Materiais e Métodos</i> .....	15
2.2.1. <i>Materiais</i> .....	15
2.2.2. <i>Medidas de solubilidade</i> .....	15
2.3. <i>Resultados e Discussão</i> .....	16
2.3.1. <i>Solubilidade e tamanho molecular</i> .....	16
2.3.2. <i>Entalpia de solução</i> .....	23
2.4. <i>Conclusões</i> .....	26
2.5. <i>Referências</i> .....	26
Capítulo 3 .....	31
Efeito Isotópico do Deutério na Transição <i>helix-coil</i> da κ-carragena .....	31
3.1. <i>Introdução</i> .....	33

3.2. <i>Materiais e Métodos</i> .....	36
3.2.1. <i>Materiais</i> .....	36
3.2.2. <i>Preparo de soluções e medidas reológicas</i> .....	36
3.2.3. <i>Medidas de rotação óptica</i> .....	37
3.2.4. <i>Medidas calorimétricas</i> .....	37
3.3. <i>Resultados e Discussão</i> .....	38
3.3.1. <i>Efeito isotópico sobre o comportamento reológico</i> .....	38
3.3.2. <i>Conteúdo quiral dos géis em ambos os solventes</i> .....	43
3.3.3. <i>Varreduras calorimétricas diferenciais</i> .....	46
3.4. <i>Conclusões</i> .....	50
3.5. <i>Referências</i> .....	51
Capítulo 4 .....	55
INTRODUÇÃO AOS PRINCÍPIOS BÁSICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	55
.....	55
<i>Apresentação do fenômeno e da espectroscopia RMN</i> .....	57
4.1. <i>A origem do sinal e a descrição do fenômeno de RMN</i> .....	58
4.2. <i>Fenômeno de ressonância do ponto de vista clássico</i> .....	60
4.3. <i>O Espectro de RMN</i> .....	63
4.4. <i>Relaxação como fonte de informações dinâmicas</i> .....	66
4.4.1. <i>Relaxação Longitudinal</i> .....	67
4.4.2. <i>Relaxação transversal</i> .....	69
4.5. <i>Troca Química</i> .....	71
4.6. <i>Referências Bibliográficas</i> .....	75
Capítulo 5 .....	77
<b>Dinâmica interacional de soluções aquosas de carboidratos estudadas por relaxometria 1D no domínio do tempo</b> .....	<b>77</b>

5.1. Introdução .....	79
5.2. Relaxometria 1D: curvas de dispersão $T_2 - 1$ vs $\tau - 1$ .....	82
5.3. Materiais e Métodos .....	86
5.3.1. Materiais .....	86
5.3.2. Medidas de relaxação-curvas de dispersão $T_2 - 1$ vs $1/\tau$ .....	87
5.4. Resultados e Discussão .....	88
5.4.1. Troca química estudada por curvas de dispersão $T_2 - 1$ vs $1/\tau$ 88	
5.4.2. Comportamento dinâmico dos sacarídeos em solução.....	101
5.4.3. Relação entre hidratação e trocas químicas.....	103
5.4.4. Considerações sobre a dinâmica das moléculas de água nas soluções de carboidratos estudadas .....	107
5.5. Conclusões.....	113
5.6. Referências .....	114
Capítulo 6 .....	119
<b>Soluções aquosas de carboidratos simples estudadas por relaxometria 2D</b> .....	119
.....	119
6.1. Introdução .....	121
6.1.1. Relaxometria de correlação cruzada $T_1 - T_2$ .....	122
6.1.2. Relaxometria de correlação cruzada $T_2 - \text{store} - T_2$ ....	125
6.2. Materiais e Métodos .....	127
6.2.1. Materiais .....	127
6.2.2. Medidas de Relaxação de correlação cruzada $T_1 - T_2$ e $T_2 -$ $T_2$ 128	
6.3. Resultados e Discussão .....	129
6.3.1. Relaxometria de correlação cruzada $T_1 - T_2$ .....	129

6.3.3. <i>Resultados de relaxometria de correlação cruzada <b>T2</b> – store – <b>T2</b></i>	144
6.4. <i>Conclusões</i> .....	154
6.5. <i>Referências</i> .....	155
Capítulo 7 .....	157
Estudo de Sistemas Aquosos micro heterogêneos de Carboidratos por Relaxometria 2D .....	157
7.1. <i>Introdução</i> .....	159
7.2. <i>Materiais e Métodos</i> .....	161
7.2.1. <i>Materiais</i> .....	161
7.2.2. <i>Medidas de Relaxação por RMN</i> .....	162
7.3. <i>Resultados e Discussão</i> .....	163
7.3.1. <i>A Influência da intensidade de <b>B0</b></i> .....	183
7.3.2. <i>Efeito da substituição isotópica H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O nos espectros 2D</i>	184
7.4. <i>Conclusões</i> .....	189
7.5. <i>Referências</i> .....	190
Capítulo 8 .....	193
Consequência da agregação micelar de <i>n</i> -alquil-(glico e malto) sídeos sobre as interações intermoleculares com as moléculas de água .....	193
8.1. <i>Introdução</i> .....	195
8.1.1. <i>Embasamento fundamental de relaxação nuclear para estudo crítico de agregação</i> .....	198
8.2. <i>Materiais e Métodos</i> .....	201
8.2.1. <i>Materiais</i> .....	201
8.2.2. <i>Medidas dos tempos de relaxação transversal</i> .....	201
8.3. <i>Resultados e Discussão</i> .....	203
8.3.1. <i>Efeito da cadeia alquílica nas trocas químicas</i> .....	207

8.3.2. Efeito da agregação micelar sobre os processos de troca protônica .....	210
8.3.3. Agregação dos <i>n</i> -alquil-sacarídeos em D <sub>2</sub> O estudadas por relaxação transversal <sup>1</sup> H .....	215
8.4. Conclusões .....	218
8.5. Referências .....	219
Considerações Finais e Perspectivas .....	223
APÊNDICES .....	227
APÊNDICE A - As Equações de Bloch .....	227
APÊNDICE B – Equações de troca química .....	229
APÊNDICE C –Modelo de Carver & Richards modificado .....	231
APÊNDICE D –Relaxometria de correlação cruzada .....	233
<b>T1 – T2</b> .....	233
<b>T2 – store – T2</b> .....	234
Referências- Apêndices .....	235



## LISTA DE ABREVIATURAS

$a$	sítios genérico (prótons do sítio água) no modelo de dois sítios sujeitos à troca química.
$A$	Área do pico de RMN num instante $t$ qualquer.
$A_0$	Área do pico de RMN num instante $t = 0$ s.
$aq$	tempo de aquisição dos ecos de spin.
$b$	sítios genérico (prótons do sítio OH-carboidrato) no modelo de dois sítios sujeitos à troca química.
$B_0$	vetor campo magnético estático apontando segundo eixo $z$ .
$B_1$	Intensidade do campo magnético oscilante perpendicular ao eixo $z$ .
$B_{ef}$	Campo magnético efetivo.
$cmc$	concentração micelar crítica
$CPMG$	Sequência de pulsos e anacronismo dos pesquisadores Carr-Purcel-Meiboom-Gil.
DSC	Calorimetria diferencial de varredura (do inglês <i>differential scanning calorimetry</i> )
$f$	fração de grupos OH disponíveis para realizar trocas protônicas com as moléculas de água.
$g_N$	fator $g$ nuclear.
$G'$	Módulo elástico ou módulo de armazenamento.
$G''$	Módulo viscoso ou módulo de perda.
$G_N$	Módulo Elástico de rede ou módulo no platô.
$h, \hbar$	constante de Plank e constante de Plank dividida por $2\pi$ , respectivamente.

$i$	número complexo $i = \sqrt{-1}$ .
$\mathbf{i}$	vetor unitário do eixo $x$ .
$\mathbf{j}$	vetor unitário do eixo $y$ .
$\mathbf{k}$	vetor unitário do eixo $z$ .
$k$	fluxo de trocas protônicas no modelo de dois sítios.
$k_b$	taxa de transferência de prótons do sítio carboidrato para o sítio $\text{H}_2\text{O}$ .
$k_B$	Constante de Boltzmann.
$k_{CR}$	Taxa de relaxação cruzada na espectroscopia de correlação cruzada 2D.
$K_b$	constante associada às trocas químicas e ao deslocamento químico entre os sítios $a$ e $b$ .
$l$	letra para denotar movimentos moleculares lentos.
LH	Ligação de hidrogênio
$M$	Massa molar.
$M_2$	segundo momento da interação dipolar.
$M_a, M_b$	magnetizações dos spins nos sítios $a$ e $b$ , respectivamente.
$M_e$	Massa molar entre os pontos de junção numa rede de um gel.
$M_z$	magnetização nuclear ao longo do eixo $z$ .
$n_1$ e $n_2$	número de ecos de spin adquiridos na primeira e segunda sequências CPMG, respectivamente, em $T_2 - store - T_2$ .
$N_{agg}$	número de agregação de moléculas de surfactante numa micela.
$n_{cp}$	número de ecos de spin da sequência CPMG durante aquisição do sinal de RMN.
$N_{OH}$	número de grupos OH por molécula de sacarídeo.

$P_a$ e $P_b$	frações molares de prótons trocáveis nos sítios H <sub>2</sub> O e OH-carboidrato, respectivamente.
$r$	letra para denotar movimentos moleculares rápidos.
$R$	Distância entre os spins-1/2.
$RD$	Tempo de reciclagem na sequência de pulsos.
$R_H$	número de hidratação (moléculas de água por molécula de sacarídeo) em diluição infinita.
$R_{H_2O}$	razão entre o número de moléculas de água por molécula de carboidrato.
$R_{OH}$	razão entre o número de moléculas de água e o número de grupos OH do carboidrato.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.
$R_S$	Razão do número de moléculas de água por molécula de sacarídeo no limite de solubilidade.
$T_1$	tempo de relaxação longitudinal ou spin-rede.
$T_2$	tempo de relaxação transversal ou spin-spin.
$T_2^{2D}$	Tempo de relaxação transversal obtido por relaxometria 2D.
$T_2^{1D}$	Tempo de relaxação transversal obtido por relaxometria 1D.
$x_S$	Fração molar do sacarídeo.

## SÍMBOLOS DE LETRAS GREGAS

$\alpha$	ângulo entre momento de dipolo nuclear e $B_0$ .
$\gamma$	razão giromagnética nuclear.
$\Delta A_\zeta$	variação de energia livre de Helmholtz de uma dupla-hélice isolada em relação ao estado enovelado

$\Delta f_{\zeta}$	variação de energia livre de Helmholtz de uma dupla hélice numa zona de junção em relação ao estado enovelado.
$\delta$	deslocamento químico entre os sítios $a$ e $b$ .
$\delta\omega$	diferença de frequência de precessão, em Hz, entre os sítios $a$ e $b$ .
$\zeta$	Comprimento genérico de uma dupla hélice.
$\eta_{\zeta}$	Probabilidade de formação de uma hélice de comprimento $\zeta$ .
$\theta$	ângulo entre o campo magnético efetivo $B_{ef}$ e $\mathbf{B}_0$ .
$\lambda$	Taxa de relaxação efetiva no modelo de dois sítios do modelo de Caver-Richards.
$\lambda'$	Taxa de relaxação efetiva no modelo de dois sítios.
$\lambda_{\zeta}$	Constante de associação de duplas hélices em zonas de junção.
$\mu$	sub múltiplo micro para designar $10^{-6}$ .
$\boldsymbol{\mu}$	momento de dipolo magnético de spin nuclear.
$\mu_0$	permeabilidade magnética no vácuo.
$\nu$	frequência expressa em Hz.
$\nu_0$	denominação genérica para frequência de Larmor em Hz.
$\rho_c$	Densidade de cadeias em solução e é proporcional à concentração molar.
$\tau$	intervalo entre os pulos de 90 e 180° na sequência CPMG.
$\tau_a; \tau_b$	tempo de vida nos sítios $a$ e $b$ , respectivamente.
$\tau_{ab}$	tempo de vida nos sítios $a$ e $b$ , ponderados pelas suas respectivas populações.
$\tau_c$	tempo de correlação característico dos movimentos brownianos roto-difusionais.

$\tau_{LH}$	Tempo de vida característico de uma ligação de hidrogênio no seio da água líquida.
$\omega$	frequência expressa em $rad\ s^{-1}$ .
$\omega_0$	denominação genérica para frequência de Larmor em $rad\ s^{-1}$ .
$\omega_1$	frequência do pulso de radio frequência.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Valores de solubilidade dos carboidratos em H <sub>2</sub> O e D <sub>2</sub> O a 298K expressos em percentagem mássica (massa do carboidrato/massa total de solução). As estruturas moleculares são apresentadas esquematicamente e não se referem às conformações em solução. Os valores referência em H <sub>2</sub> O são indicados entre parêntesis.	17
<b>Tabela 2.2:</b> Número médio de moléculas de água (H <sub>2</sub> O ou D <sub>2</sub> O) ao redor de cada molécula de carboidrato no limite de solubilidade ( $R_S$ ). Os valores dos números de hidratação, $R_H$ , dos carboidratos em solução aquosa em diluição infinita obtidos da literatura também são apresentados.	23
<b>Tabela 2.3:</b> Entalpia de solução dos carboidratos em H <sub>2</sub> O ( $\Delta_{sol}H_{H,298}$ ) e D <sub>2</sub> O ( $\Delta_{sol}H_{D,298}$ ) determinadas a 298 K a partir da equação de van't Hoff. Os máximos desvios relativos das entalpias de solução são menores que 10%. Os valores das entalpias de solução para os carboidratos em H <sub>2</sub> O obtidos da literatura e também as entalpias de transferência ( $\Delta_{sol}H_{D_2O,298K} - \Delta_{sol}H_{H_2O,298K}$ ) também são apresentados. Todos os valores são apresentados em $kJ\ mol^{-1}$ .	25
<b>Tabela 3.1:</b> Entalpia molar (unidade dissacarídea) e temperatura máxima dos picos (micro-DSC) e das derivadas das curvas (rotação óptica) associadas às transições sol-gel e gel-sol. Os valores de	47

calorimetria correspondem à média de três medidas independentes. A concentração de unidade dissacarídea foi de  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sem adição de KCl.

**Tabela 5.1** - Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo de dois sítios modificado (vide Eqs. (5.1 e C1-C9)) para soluções de carboidratos nos seus respectivos limites de solubilidade a 300K . Os parâmetros foram obtidos a partir do ajuste das curvas de dispersão apresentadas na Fig. 5.3 assumindo o tempo de relaxação intrínseco da água  $T_{2a} = 2,0s$ , em todas as soluções. 92

**Tabela 5.2.** Número médio de moléculas de água por molécula de carboidrato no limite de solubilidade a 300K. 94

**Tabela 5.3.** Parâmetros de composição e do ajuste teórico obtido a partir das curvas da Fig. 5.6 (a e b). 98

**Tabela 5.4.** Parâmetros obtidos do ajuste teórico das curvas Figura 5.4, tomando-se  $T_{2a} = 2,0 s$ , e os valores da razão de moléculas de água por grupo OH dos carboidratos,  $R_{H_2O/OH}$ . 99

**Tabela 5.5.** Parâmetros obtidos do ajuste teórico das curvas Figura 5.4, tomando-se  $T_{2a} = 2,0 s$ , e os valores da razão de moléculas de água por grupo OH dos carboidratos,  $R_{H_2O/OH}$ . 100

**Tabela 5.6.** Parâmetros de composição e do ajuste teórico obtido a partir das curvas da Fig. 5.9. 112

**Tabela 6.1.** Tempos de relaxação transversal dos prótons trocáveis ( $H_2O + OH$ -carboidratos) e não trocáveis (CH) para as soluções aquosas de carboidratos com suas respectivas intensidades obtidas a partir dos espectros temporais mostrados na Fig. 6.2. A fração de prótons não trocáveis,  $f_{CH}$ , também é apresentada para comparação com os as áreas dos picos. 131

**Tabela 6.2.** Intensidade relativa dos picos e seus respectivos valores dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  obtidos dos espectros de correlação 135

cruzada apresentados na Figura 6.3.

**Tabela 6.3:** Valores comparativos dos tempos de relaxação transversal (ms) do espectro 1D e do valor obtido do espectro 2D. Em ambos os espectros o intervalo interpulsos foi  $\tau_{cp} = 200 \mu s$ . Nem todas as soluções apresentadas nesta tabela foram apresentadas previamente na forma gráfica.

138

**Tabela 6.4.** Intensidade relativa dos picos e seus respectivos valores dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  obtidos dos espectros de correlação cruzada apresentados na Figura 6.4.

141

**Tabela 7.1.** Valores de  $T_1$ ,  $T_2$ , e  $T_2^*$  obtidos dos espectros 2D  $T_1 - T_2$  para os sistemas formados por água/sephadex. O teor de água na mistura é expresso em percentagem mássica, e os valores de  $T_1$  e  $T_2$  em ms.

165

**Tabela 7.2.** Valores de  $T_1$  e  $T_2$  do sistema água/sephadex 25% obtidos do gráfico 2D da Figura 7.6. Os valores estão em ms e as áreas relativas não estão em escala de 100%.

170

**Tabela 7.3.** Valores de  $T_1$  e  $T_2$  expressos em ms para os géis água/sephadex em diferentes razões mássicas (%).

175

**Tabela 7.4.** Valores de  $T_1$  e  $T_2$  expressos em mili segundos para os géis água/sephadex em diferentes razões mássicas (%) à 100 MHz e a 2.24 MHz como indicado.

180

**Tabela 7.5.** Valores de  $T_2$  e as respectivas áreas relativas dos picos trocáveis e não trocáveis para os géis de sephadex com  $H_2O$  ou  $D_2O$  na mesma composição molar.

186

**Tabela 8.1:** Parâmetros das curvas de taxa de relaxação spin-spin  $^1H$  (trocáveis) em função da composição nos sistemas formados por *n*-alquil-(glico e malto)sídeos em  $H_2O$  e  $D_2O$ . Os desvios dos valores de dos ajustados também são apresentados.

206



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** (I) Estrutura tetraédrica da água e estrutura bifurcada de ligações de hidrogênio (II) a qual está relacionada com a alta mobilidade molecular no estado líquido. 3
- Figura 1.2.** Representação esquemática dos dois mecanismos de Grötthius para a transferência de prótons na água líquida. 4
- Figura 2.1:** Solubilidade dos carboidratos expressas em mols de carboidrato por 100 mols de solvente em H<sub>2</sub>O (símbolos vazados) e em D<sub>2</sub>O (símbolos cheios) em função da temperatura para os carboidratos: D-xilose (quadrado); D-glicose (círculo); sacarose (triângulo para cima); D-maltose (triângulo para baixo); rafinose (losango); e  $\alpha$ -CD (pentágono). 19
- Figura 2.2:** Efeito isotópico D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O sobre a solubilidade (dados Figura 2.1) dos açúcares em diferentes temperaturas para os carboidratos: D-xilose (quadrado); D-glicose (círculo); sacarose (triângulo para cima); D-maltose (triângulo para baixo); rafinose (losango); e  $\alpha$ -CD (pentágono). As linhas servem apenas de guia para os olhos. 20
- Figura 3.1:** Representação esquemática das mudanças conformacionais das cadeias de  $\kappa$ -carragena durante a transição de novelos aleatórios para duplas hélices com posterior agregação das cadeias no processo sol-gel (figura adaptada da Ref. 13). 34
- Figura 3.2:** Comparação entre os módulos elástico (símbolos vazados) e viscoso (símbolos preenchidos) para géis de  $\kappa$ -C em H<sub>2</sub>O (estrela vermelha) e em D<sub>2</sub>O (círculos azuis), a diferentes concentrações de  $\kappa$ -C (a-c) e de cátions K<sup>+</sup> (d-f). em (a), (b) e (c) as concentrações de unidades dissacarídeas de  $\kappa$ -C são, respectivamente, (15,9; 21,5; e 28,7) x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, contendo apenas o K<sup>+</sup> naturalmente presente na  $\kappa$ -C. Em (d), (e) e (f) as concentrações totais de íons K<sup>+</sup> são, respectivamente, (30; 50; e 90) m mol L<sup>-1</sup>, enquanto a concentração de unidades dissacarídeas de  $\kappa$ -C é fixada 40

em  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os valores são médias de quatro medidas independentes e todas as medias foram realizadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Figura 3.3:** Variação do ângulo de rotação óptica para as soluções de  $\kappa$ -C com concentração de unidade dissacarídea  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sem adição do KCl. Géis formados em  $\text{H}_2\text{O}$  (símbolos vermelhos) e em  $\text{D}_2\text{O}$  (símbolos azuis) em função da temperatura durante os processos de resfriamento (símbolos cheios) e aquecimento (símbolos vazados)

43

**Figura 3.4:** Varreduras micro-calorimétricas para o processo de transição sol-gel da  $\kappa$ -C em  $\text{H}_2\text{O}$  (linhas vermelhas) e em  $\text{D}_2\text{O}$  (linhas azuis), na concentração de unidade dissacarídea  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sem adição do KCl. As linhas correspondem à média de três corridas de medidas independentes.

47

**Figura 3.5:** Comparação esquemática dos géis formados em  $\text{D}_2\text{O}$  e em  $\text{H}_2\text{O}$ . Os elementos de reticulação são associados aos agregados de duplas hélices. As massas molares médias entre as junções ( $M_e$ ) são mostradas esquematicamente.

49

**Figure 4.1.** Representação esquemática do momento angular de spin,  $I$ , e de sua componente segundo o eixo  $z$ , formando entre si um ângulo  $\theta = \cos^{-1} \left( \frac{|I_z|}{|I|} \right) = 54,74^\circ$ . No esquema é representado um spin com  $I = \frac{1}{2}$  no estado  $M_I = +\frac{1}{2}$ , e o cone formado por  $I$  ao redor do eixo  $z$ .

59

**Figura 4.2:** Decaimento livre da indução (FID) da componente  $x$  da magnetização em função do tempo, para spins idênticos, e não interagentes com frequência  $\omega_0$ , e tempo de relaxação  $T_2$ .

64

**Figura 4.3:** Espectro de RMN obtido a partir da transformada de Fourier do sinal do FID mostrado esquematicamente na Figura 4.2, e através da operação matemática mostrada nas Equações. 4.10 e 4.11.

66

**Figura 4.4:** Gráfico esquemático do efeito de troca química sobre o espectro de RMN para um sistema de spins nos sítios  $A$  e  $B$ , nos

72

regimes lento, intermediário e rápido, de trocas químicas.

**Figura 5.1:** (a) Representação esquemática das trocas química em soluções aquosas de carboidratos. (b) Curva obtida teoricamente a partir do modelo de troca de dois sítios para soluções aquosas de carboidratos Eqs. (5.1 e C1-9). Os parâmetros teóricos são  $P_a = P_b = 1/2$ ;  $T_{2a} = 2,0\text{ s}$ ;  $T_{2b} = 0,100\text{ s}$ ;  $k_b = 1,5 \times 10^3\text{ s}^{-1}$ ;  $\delta\omega = 100,12\text{ MHz}$ .

85

**Figura 5.2.** Mecanismo esquemático de trocas protônicas em soluções de glicose de acordo com ref<sup>25</sup>. O “X” da figura pode representar um H (no caso de uma molécula de água) ou uma molécula de glicose.

89

**Figura 5.3:** Taxa de relaxação de <sup>1</sup>H trocáveis (H<sub>2</sub>O e grupos OH-carboidratos) em função de  $1/\tau$  na sequência CPMG. Todas as soluções foram medidas nos seus respectivos limites de solubilidade a 300 K, cujos valores das solubilidades e dos parâmetros do modelo são resumidos na Tabela 5.1. Os parâmetros  $k_b$ ,  $T_{2b}$  e  $\delta\omega$ , foram obtidos a partir dos valores gerados do modelo de dois sítios<sup>24</sup> e tomando-se o valor de  $T_{2a} = 2,0\text{ s}$ , com exceção da frutose  $T_{2b} = 7,0\text{ ms}$  e  $T_{2a} = 0,14\text{ s}$ . Os símbolos correspondem aos valores experimentais e as linhas aos valores obtidos pelo ajuste do modelo

90

**Figura 5.4:** Estruturas da da  $\beta$ -D-glicopiranosose entre as formas cadeira <sup>4</sup>C<sub>1</sub> e <sub>1</sub>C<sup>4</sup>.

96

**Figura 5.5:** Estruturas químicas em equilíbrio para a frutose em solução aquosa. Apesar da existência das cinco estruturas, a frutose apresenta-se majoritariamente na forma  $\beta$ -furanosídea, e é encontrada apenas em traços na forma de cadeia aberta.

96

**Figura 5.6.** Curvas de dispersão comparativas para soluções aquosas dos carboidratos: (a) sacarose e frutose nas mesmas frações de prótons trocáveis,  $P_b = 0,3017$ ; (b) sorbitol e frutose,  $P_b = 0,43$ , ambos os gráficos à temperatura de 300 K. Os parâmetros obtidos dos ajustes são representados pelas linhas sólida e tracejada, e apresentados na Tabela 5.3. Para ambos os ajustes foi tomado

97

$$T_{2a} = 2,0 \text{ s.}$$

**Figura 5.7.** Curvas de dispersão para soluções aquosas de maltose  $P_b = 0,1271$  e glicose  $P_b = 0,1412$ , à 300 K. Os parâmetros dos ajustes teóricos das curvas são resumidos na Tabela 5.4, e para ambos os ajustes foi tomado o valor  $T_{2a} = 2,0 \text{ s}$ . 99

**Figura 5.8 .** Curvas de dispersão para soluções aquosas de maltose  $P_b = 0,1271$  e sacarose  $P_b = 0,1376$ , à 300 K. Os parâmetros dos ajustes teóricos das curvas são resumidos na Tabela 5.5, e para ambos os ajustes o valor foi tomado  $T_{2a} = 2,0 \text{ s}$ . 100

**Figura 5.9.** Curvas de dispersão para soluções aquosas de glicose nas concentrações  $P_b = 0,1412$  (símbolos vazados) e  $0,2340$  (símbolos fechados), à 300 K. Os parâmetros dos ajustes teóricos das curvas são resumidos na Tabela 5.6. Os ajustes com  $T_{2a} = 2,0 \text{ s}$  são representados pela curvas em vermelho, enquanto as curvas pretas foram calculadas a partir dos respectivos valores mostrados na Tab. 5.6. 111

**Figura 6.1.** Representação esquemática da sequência de pulso para relaxometria de correlação cruzada  $T_1 - T_2$ . No domínio de tempo  $t_1$  ocorre relaxação longitudinal e para cada valor de  $t_1$  na sequência inversão de recuperação é obtido a curva de decaimentos dos ecos de spin na dimensão  $t_2$ . Durante esta última dimensão ocorre relaxação transversal e, se houver processos de transferência de magnetização entre as piscinas de prótons poderá ocorrer o surgimento de picos cruzados. 123

**Figura 6.2.** Espectros de RMN no domínio do tempo para soluções saturadas dos carboidratos obtidos através dos ecos de spin da sequência CPMG com intervalo interpulsos  $100 \mu\text{s}$  e à temperatura de 300K. 130

**Figura 6.3.** Espectros de relaxometria 2D  $T_1 - T_2$  das soluções aquosas saturadas dos carboidratos: (a) xilose; (b) glicose; (c) maltose; (d) sacarose; (e) sorbitol, e (f) frutose. Os intervalos  $\tau_{cp}$  na sequência CPMG foi de  $200 \mu\text{s}$  com tempo total de aquisição  $\leq 6,0 \text{ s}$ , enquanto na dimensão  $T_1$  faixa de tempo de aquisição da 133

sequência de recuperação de inversão foi de 0,1 a 9000 ms.

**Figura 6.4.** Espectros de relaxometria 2D  $T_1 - T_2$  das soluções aquosas de: (a) sacarose 20%; e frutose: (b) 63%; (c) 66%; (d) 80% m/m (solução saturada). Os intervalos interpulsos na sequência CPMG foi de 200  $\mu$ s com tempo máximo de aquisição de 6,0 s, enquanto na dimensão  $T_1$  a faixa de tempo de aquisição da sequência de inversão de recuperação foi de 0,1 a 9000 ms distribuídos logaritmicamente

140

**Figura 6.5.** Amplitude dos ecos de spin, dimensão z, em função das dimensões de tempo  $t_{21}$  e  $t_{22}$ . O intervalo interpulsos da sequência CPMG foi de 200 $\mu$ s, o tempo *store* entre as duas dimensões foi de 1 ms, e *relaxation delay* 5 s.

145

**Figura 6.6.** Espectros 2D  $T_2 - store - T_2$  para soluções saturadas de (a) glicose, e (b) xilose. Os parâmetros da sequência foram  $\tau_{cp} = 200 \mu$ s,  $\alpha = 1$ , *store time* 1 ms.

146

**Figura 6.7:** Espectros 2D  $T_2 - store - T_2$  de soluções de sacarose 43% m/m em dois intervalos *store*: (a) 1,0 ms; e (b) 100 ms.

148

**Figura 6.8.** Espectros  $T_2 - store - T_2$  para soluções saturadas de sorbitol em diferentes intervalos de tempo *store*: (a) 1,0 ms; (b) 10 ms; (c) 50 ms; (d) 100 ms. O valor de  $\tau_{cp} = 200 \mu$ s.

149

**Figura 6.9:** Espectros 2D  $T_2 - T_2$  para solução saturada de frutose 80,3% em diferentes *store time*: (a) 200  $\mu$ s; (b) 1,00 ms.

151

**Figura 6.10:** Espectros 2D  $T_2 - T_2$  para solução saturada de frutose 80,3% em diferentes *store time*: (a) 10,0 ms; (b) 20,0 ms; (c) 100 ms; (d) 200 ms.

152

**Figura 6.11.** Esquema das estruturas de interação entre as moléculas de água e os grupos OH da frutose. Os prótons trocáveis são marcados em vermelho e os não trocáveis em azul.

153

**Figura 7.1.** Estrutura molecular do sephadex e uma representação esquemática de uma esfera de sephadex mostrando os retículos

160

internos formados pelas cadeias reticuladas de dextrana.

**Figura 7.2.** Espectro 2D  $T_1 - T_2$  de sephadex sem adição de água. 163

**Figura 7.3.** Espectros de correlação cruzada 2D: (a)  $T_1 - T_2$  e (b)  $T_1 - T_2^*$  no sistema água/sephadex 10% m/m de água, adquirido a 100 MHz,  $\tau = 100 \mu s$ . 164

**Figura 7.4.** Espectro de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  para amostra água/sephadex 15% m/m.  $\tau = 100 \mu s$ . 165

**Figura 7.5.** Espectros de relaxometria do gel água/sephadex na razão 15 % m/m de água (a) Espectro de relaxometria 1D usando sequência CPMG,  $\tau = 100 \mu s$ ; (b) Espectro de correlação cruzada  $T_2 - store - T_2$  do gel e com store time = 1ms. 168

**Figura 7.6.** Espectro de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  do gel água/sephadex 25% m/m,  $\tau_{cp} = 100 \mu s$ . 169

**Figura 7.7.** Espectros de correlação cruzada  $T_2 - store - T_2$  para o gel água/sephadex 25% em diferentes intervalos *store*: (a) 0,50 ms; (b) 1,0 ms; (c) 5,0 ms; e (d) 10 ms.  $\tau = 100 \mu s$ . 172

**Figura 7.8.** Espectros de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  das amostras de água/sephadex em diferentes conteúdos de água: (a) 35 %; (b) 40%; (c) 50; (d) 60%. Intervalo interpulsos 90-180° igual a 100  $\mu s$ . 174

**Figura 7.9.** Espectros 2D  $T_2 - T_2$  do gel água/sephadex 35% em diferentes *store times*: (a) 0,5 ; (b) 3 ; (c) 10; e (d) 20 ms. Intervalo interpulsos CPMG 100  $\mu s$ . 177

**Figura 7.10.** Espectros de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  dos géis água/sephadex em diferentes composições frequência de 100 MHz: (a) 71%; (b) 76,4%; (c) Saturada (~78,9%); e (d) água/sephadex 78% 2,24 MHz. 179

**Figura 7.11.** Representação esquemática do gel água/sephadex após a saturação interna das esferas de sephadex com moléculas de água e 181

a formação de interstícios de água representados em azul.

**Figura 7.12.** Tempo de relaxação transversal dos prótons trocáveis (pico 1) espectros das Figuras 7.(3, 8 e 10), em função da concentração de água: (a)  $P_a = 1 - P_b$ ; (b) % m/m. 182

**Figura 7.13.** Espectros de correlação cruzada do gel D<sub>2</sub>O/sephadex 45% em massa de D<sub>2</sub>O; (a)  $T_1 - T_2$ ; e  $T_2 - store - T_2$  com diferentes *store times*: (b) 1,0 ms; (c) 10 ms; e (d) 200 ms. 185

**Figura 7.14.** Espectro de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  para fel D<sub>2</sub>O/sephadex após 9<sup>a</sup> etapa de troca protônica. 187

**Figura 7.15.** Espectro de correlação cruzada  $T_2 - T_2$  para gel D<sub>2</sub>O/sephadex após 9<sup>a</sup> etapa de troca protônica em diferentes intervalos *store*: (a) 1 ms; (b) 10 ms; (c) 50 ms ; (d) 150 ms. Para todos os espectros o intervalo entre os pulsos na sequência CPMG foi de 100  $\mu$ s. 188

**Figura 8.1.** Fórmulas estruturais (a) n-nonil- $\beta$ -glicopiranosídeo C<sub>9</sub>G<sub>1</sub>; (b) n-nonil- $\beta$ -maltopiranosídeo C<sub>9</sub>G<sub>2</sub>. 196

**Figura 8.2:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do n-nonil- $\beta$ -glicopiranosídeo expressa nas concentrações: (a)  $m mol kg^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis ( $P_b$ ) do C<sub>8</sub>G<sub>1</sub>. As linhas retas são ajustes lineares das duas regiões. 204

**Figura 8.3:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do n-octil- $\beta$ -glicomaltosídeo expressa nas concentrações: (a)  $m mol kg^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis do C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> ( $P_b$ ). 205

**Figura 8.4:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do n-nonil- $\beta$ -glicopiranosídeo expressa nas concentrações: (a)  $m mol kg^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis do C<sub>9</sub>G<sub>1</sub> ( $P_b$ ). 208

- Figura 8.5:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do *n*-nonil- $\beta$ -maltopiranosídeo expressa nas concentrações: (a)  $m \text{ mol kg}^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis do  $C_9G_2$  ( $P_b$ ). 209
- Figura 8.6.** Representação esquemática da molécula de *n*-alquil-glicosídeo em solução aquosa. 210
- Figura 8.7:** Figura esquemática do equilíbrio entre as formas monomérica livre e no agregado micelar. Os prótons trocáveis são destacados em vermelho na molécula de alquil-glicosídeo. A região amarela na micela representa a porção espacial formada preponderantemente pelas cabeças dos alquil-sacarídeos e há uma alta quantidade de moléculas de água. Já a região clara no interior representa a região hidrofóbica ocupada majoritariamente pelas cadeias hidrocarbônicas. 211
- Figura 8.8:** Relaxação spin-spin dos prótons em soluções binárias  $H_2O/D_2O$  em diferentes frações molares. 215
- Figura 8.9:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons residuais nas soluções dos *n*-decil-(glico e malto)piranosídeo: (○)  $C_{10}G_1$ ; (●)  $C_{10}G_1$ , em  $D_2O$  à 25 °C. 216

# Capítulo 1

---

## Aspectos Gerais dos Sistemas Formados por Água e Carboidratos

### *1.1 Por que água e carboidratos?*

A água é a substância mais importante em nosso planeta. A aparente simplicidade da molécula de água pode enganar em relação ao intrincado conjunto de propriedades dos sistemas aquosos.<sup>1</sup> A molécula de água é uma das menores e a segunda mais abundante (e mais antigas) do universo. A sua importância para a vida é tão reconhecida que a presença de água ou vestígios dela em outros planetas, pode indicar existência de vida presente ou no passado “remoto”. Outra classe especial de (bio)molécula são os carboidratos, os quais apresentam fórmula química geral do tipo  $C_x(H_2O)_y$ , e denominados com esse nome por terem sido pensados como hidratos de carbono. Não é uma coincidência que a água e os carboidratos constituam moléculas sobre as quais a vida na Terra está baseada. Os carboidratos, e mais ainda as moléculas de água, são bastante abundantes no universo sendo encontrados em nuvens

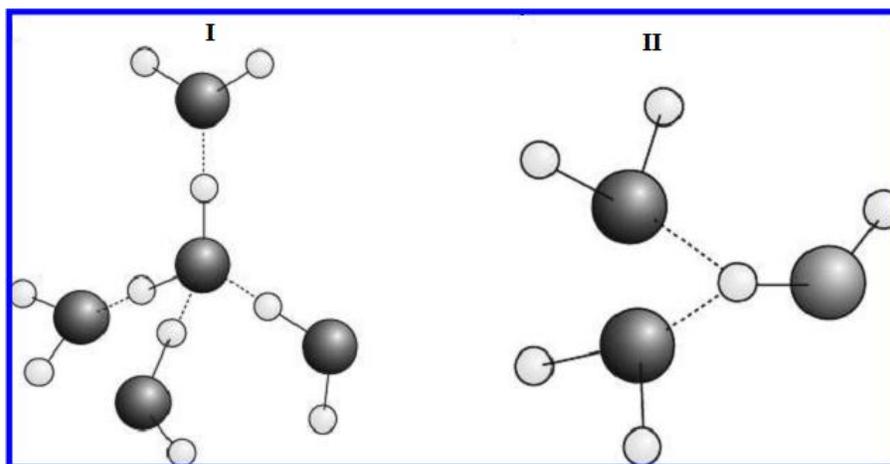
estelares espaciais. A existência de água e de outras moléculas como carboidratos e ácidos nucleicos, tem fomentado intensas pesquisas que buscam encontrar vestígios de vida (como a concebemos) fora do planeta Terra.<sup>2</sup> Os carboidratos desempenham funções vitais nos mais distintos processos biológicos, como no reconhecimento e comunicação celular, na mediação de interações proteicas, servem como fonte e armazenamento de energia, atuam na atividade antigênica do vírus HIV, dentre várias outras.<sup>3</sup> Além disso, eles são muito importantes nas indústrias química e de alimentos e, mais recentemente, vêm recebendo bastante atenção como fontes renováveis de energia.<sup>4</sup>

Diante da enorme importância dos sistemas H<sub>2</sub>O–carboidratos, a compreensão da dinâmica molecular interacional é estratégica para um melhor entendimento dos processos moleculares relacionados com os sistemas vivos. Adicionalmente, tais conhecimentos servirão de base para uma melhor manipulação de propriedades relacionadas a aplicações tecnológicas, agrícolas e energéticas. Neste último aspecto, os carboidratos tem sido o foco de pesquisas para uma crescente demanda energética seja como alimentos ou combustíveis.<sup>4</sup>

## ***1.2 A Estrutura da água***

Ao invés de um meio contínuo e isotrópico, a água líquida apresenta uma alta estruturação reticular, em que cada molécula participa de aproximadamente quatro ligações de hidrogênio, LH, (duas como doador e duas como receptor de hidrogênio).<sup>5</sup> Devido aos rápidos movimentos moleculares em temperatura ambiente, a estrutura molecular tetraédrica da água na forma gelo é rompida e, nestas condições, cada molécula de água participa de fato de uma média de 3.8

ligações de hidrogênio.<sup>6</sup> A Figura 1 mostra representações da estrutura da água tetraédrica no gelo e na fase líquida. Neste último estado, com pequenas imperfeições características da fase líquida.<sup>7</sup>

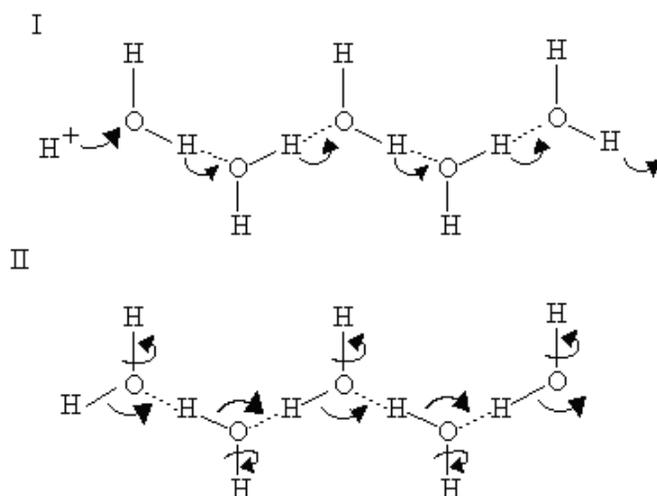


**Figura 1.1:** (I) Estrutura tetraédrica da água e estrutura bifurcada de ligações de hidrogênio (II) a qual está relacionada com a alta mobilidade molecular no estado líquido.

Tais ligações de hidrogênio estão em intermitente movimento de formação e quebra. Estudos de simulação por dinâmica molecular (DM) mostram que o tempo de vida médio das ligações de hidrogênio,  $\tau_{HB}$ , situa-se na faixa de 0,2 a 0,4 ps no seio da fase aquosa.<sup>8</sup> Contudo, na presença de confinamento como, por exemplo, microambientes hidrofóbicos ou ao redor de solutos hidrofóbicos, este tempo é consideravelmente reduzido. Esta redução corresponderia a um aumento de temperatura da ordem de 40 K, em relação à água em seu seio.<sup>9</sup> É importante salientar que o valor de  $\tau_{HB}$  é dependente do critério que define uma ligação de hidrogênio e do quanto influenciável são os movimentos de libração sobre a manutenção destas interações. Geralmente uma LH é definida segundo critérios energético e geométrico.<sup>10</sup>

A formação de rápidas ligações de hidrogênio e a existência de defeitos em sua estrutura líquida, juntamente com os rápidos movimentos de libração,

facilitam as rápidas transferências de prótons entre as moléculas. A Figura 2 representa esquematicamente o mecanismo de Grötthius, que é aceito como o principal modo de transferência de prótons em água líquida.<sup>11</sup> Acredita-se que efeitos quânticos como tunelamento contribuam para acelerar as taxas de transferências de prótons entre os oxigênios e que, por isso, os estados intermediários tenham baixos valores de energia.



**Figura 1.2.** Representação esquemática dos dois mecanismos de Grötthius para a transferência de prótons na água líquida.

No mecanismo (I) os prótons envolvidos em ligações de hidrogênio transferem-se para o átomo de oxigênio ligando-se quimicamente a um dos pares de elétrons livre e a ligação química que estava envolvida numa ligação de hidrogênio, transfere-se para o átomo de hidrogênio de outra molécula de água e assim sucessivamente. No processo em cadeia mostrado no mecanismo (II) há o envolvimento de movimentos rotacionais rápidos que ocorrem com a quebra e formação concomitantes de novas ligações de hidrogênio. Em ambos os casos o resultado final é a transferência de prótons em alta velocidade.

### ***1.3 Interações carboidrato-H<sub>2</sub>O e motivação desta tese***

A inserção de uma molécula de soluto perturba a estruturação das ligações de hidrogênio na água. No caso específico de uma molécula de carboidrato há uma alta capacidade em formar novas ligações de hidrogênio entre moléculas H<sub>2</sub>O e os grupos OH. Estas fortes interações perturbam a estruturação das ligações de hidrogênio da água,<sup>12</sup> que por sua vez, devido às fortes ligações de hidrogênio, imprime alterações conformacionais nos carboidratos<sup>13</sup>. Estudos de simulação por DM mostram que os tempos de vida das ligações de hidrogênio formadas pelas moléculas de água e os grupos OH da glicose são consideravelmente mais longas do que as formadas entre duas moléculas de água, situando-se na faixa de 7 a 22 ps.<sup>10</sup> Esta faixa temporal é obtida se parâmetros energéticos são usados como critério da formação da ligação de hidrogênio. Se, por outro lado, forem considerados critérios geométricos de LH, os valores encontrados são cerca de 10 vezes mais curtos. Adicionalmente, Astley et al.<sup>10</sup> encontram uma forte dependência da estereoquímica do grupo OH, bem como do caráter doador ou aceptor de hidrogênio, nos valores  $\tau_{LH}$ .

O aumento do tempo de vida das ligações de hidrogênio das moléculas de água com os grupos OH dos carboidratos não é a única consequência esperada. Estudos experimentais ou obtidos por simulação computacional sugerem que as moléculas de água assumem movimentos mais restritos e tempos de correlação mais longos, quando estão na camada de hidratação diretamente “ligadas” aos grupos hidroxila dos carboidratos. Estas perturbações levam a implicações também em nível macroscópico, caracterizadas por alterações em propriedades termodinâmicas da água. Por exemplo, propriedades parciais molares são consideravelmente sensíveis em

relação à estereoquímica dos carboidratos.<sup>14,15</sup> Para citar dois exemplos, o carboidrato arabinose apresenta capacidades caloríficas molares parciais de 279,5 e 294,4  $J K^{-1} mol^{-1}$  para os estereoisômeros D e L, respectivamente.<sup>15</sup> Os autores deste trabalho atribuem esta sutil, porém considerável diferença, à maior possibilidade de orientações do isômero D ao interagir com as moléculas de água, devido a um melhor ajuste do soluto na estrutura da água líquida. Outro exemplo da correlação entre a estrutura molecular e uma propriedade macroscópica é encontrada para a solubilidade, que no caso das três formas nativas das ciclodextrinas (CD) apresentam as seguintes solubilidades em  $H_2O$ : 0,121; 0,002; 0,168 ( $mol L^{-1}$ ) a 298 K, respectivamente para a  $\alpha$  (6 unidades),  $\beta$  (7 unidades), e  $\gamma$  (8 unidades de glicose).<sup>16</sup> Além disso, foi demonstrado<sup>16</sup> que as solubilidades das ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) CD, tornam-se cerca de 40% (em massa) menos solúveis quando as moléculas do solvente  $H_2O$  são substituídas por  $D_2O$ . Os autores atribuem as diferenças observadas ao fato de as moléculas de CD apresentarem cavidades hidrofóbicas, e como consequência, a maior energia coesiva da água pesada intensificaria o efeito hidrofóbico.<sup>16</sup>

Em face deste cenário, esta tese foi desenvolvida visando uma contribuição para um melhor entendimento das interações intermoleculares entre água e carboidratos, em nível macroscópico e molecular, e suas consequências nestas duas escalas. O estudo engloba resultados experimentais de propriedades simples como solubilidade, e outros mais complexos como relaxação magnética nuclear de correlação cruzada. Procurou-se estudar carboidratos com diferentes estruturas moleculares e diferentes tamanhos contendo, desde uma única unidade glicosídea, até polissacarídeos como a goma  $\kappa$ -carragena. Carboidratos ligados a moléculas alquílicas capazes de se auto-agregarem em água, géis de dextrana reticula, além do efeito isotópico ( $D_2O$ ) para sondar o

efeito da intensidade das ligações de hidrogênio em propriedades macroscópicas.

## ***1.4 Apresentação da tese***

Esta tese inicia com os estudos de aspectos macroscópicos das interações intermoleculares água-carboidratos. No Capítulo 2 é mostrado como a estrutura química e o tamanho dos carboidratos afetam suas solubilidades e qual a relação entre estas propriedades e a intensidade das ligações de hidrogênio sondadas pelo efeito da substituição isotópica de H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O. O Capítulo 3 continua a tratar do efeito isotópico, no entanto, lançando mão de um polissacarídeo regular, a κ-carragena, que possui a capacidade de submeter-se a transições *coil-helix* e formar termogéis. Este sistema é particularmente interessante para sondar o efeito isotópico devido à cooperatividade das transições novelo-hélice, e as consequências sobre propriedades macroscópicas como módulo elástico e entalpia das transições *coil-helix*.

Os aspectos moleculares das interações água-carboidratos basearam-se exclusivamente nos estudos de relaxação nuclear magnética. Para tanto, é apresentado no Capítulo 4 uma introdução à técnica de RMN com seus princípios básicos, bem como as causas moleculares dos fatores que afetam os tempos de relaxação. Na sequência, é apresentado no Capítulo 5 o estudo de relaxação nuclear magnética dos processos dinâmicos de trocas protônicas entre as moléculas de água e uma série de carboidratos. Além dos aspectos de dinâmica dos movimentos moleculares, também são apresentados, pela primeira vez, resultados sobre as diferenças de capacidade de trocas protônicas

entre as formas glicopiranosídea e frutofuranosídea. Mais aspectos dinâmicos sobre estes sistemas são apresentados no Capítulo 6, porém, empregando-se um técnica de RMN em duas dimensões, a relaxometria de correlação cruzada no domínio do tempo. Os resultados dos Capítulos 5 e 6 fornecem evidências de que numa solução aquosa de sacarídeos, as moléculas de água interagem preferencialmente com os prótons OH e negligenciavelmente com os prótons CH. Os aspectos conceituais e dinâmicos do Capítulo 6 são estendidos para sistema micro estruturados de géis (sephadex<sup>®</sup>) formado pelo polissacarídeo reticulado dextrana. Foi possível mostrar que, mesmo em regime de saturação de água, não há evidências de moléculas de água com comportamento de *bulk*, devendo, portanto, estar envolvidas em fortes ligações de hidrogênio na camada de hidratação. Por fim, a discussão sobre os aspectos moleculares das interações água-carboidratos são encerrados com o sistema modelo formado por *n*-alquil-glicosídeos em soluções aquosas. Como este sistema forma agregados moleculares em condições termodinâmicas específicas, os modelos e conhecimentos dos processos de troca química estudados nos capítulos anteriores são empregados para o estudo das consequências do processo agregativo sobre as interações dos grupos OH dos sacarídeos com as moléculas de água. De forma inédita, foi possível mostrar experimentalmente, dentre outros aspectos, que os grupos OH destes *n*-alquil-glicosídeos tornam-se menos disponíveis para interagir com as moléculas de água quando estes passam de unímeros livres em solução para agregados micelares. Este resultado corrobora com resultados recentes de simulação por dinâmica molecular.

## 1.5 Referências

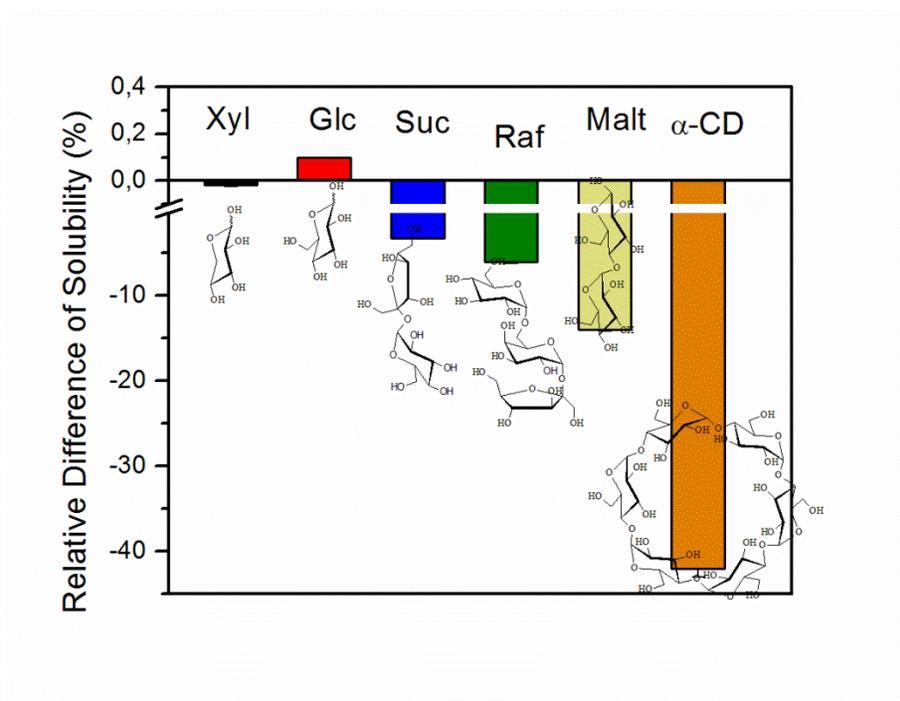
- (1) Eisenberg, D.; Kauzmann, W. *The Structure and Properties of Water*; Clarendon Press: Oxford, 1969.
- (2) Illangkoon, H. G. Carbohydrate. *Encyclopedia of Astrobiology* **2011**, 233-235.
- (3) Ball, P. Water as an active constituent in cell biology. *Chemical reviews* **2008**, *108*, 74-108.
- (4) Zhang, Y.-H. P. Renewable carbohydrates are a potential high-density hydrogen carrier. *International Journal of Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10334-10342.
- (5) Mason, P. E.; Brady, J. W. “Tetrahedrality” and the relationship between collective structure and radial distribution functions in liquid water. *The journal of physical chemistry. B* **2007**, *111*, 5669-79.
- (6) Marcus, Y. Effect of ions on the structure of water: structure making and breaking. *Chemical reviews* **2009**, *109*, 1346-70.
- (7) Sciortino, F.; Geiger, A.; Stanley, H. E. Effect of defects on molecular mobility in liquid water. *Nature* **1991**, *354*, 218-221.
- (8) Luzar, A. Resolving the hydrogen bond dynamics conundrum. *The Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 10663.
- (9) Han, S.; Kumar, P.; Stanley, H. Hydrogen-bond Dynamics of water in a quasi-two-dimensional hydrophobic nanopore slit. *Physical Review E* **2009**, *79*, 1-5.
- (10) Astley, T.; Birch, G. G.; Drew, M. G. B.; Rodger, P. M. Lifetime of a Hydrogen Bond in Aqueous Solutions of Carbohydrates. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 5080-5090.
- (11) Agmon, N. CHEMICAL PHYSICS The Grotthuss mechanism. *Chemical Physics Letters* **1995**, *50*, 456-462.
- (12) Dashnau, J. L.; Sharp, K. a; Vanderkooi, J. M. Carbohydrate Intramolecular Hydrogen Bonding Cooperativity and its Effect on Water Structure. *The journal of physical chemistry. B* **2005**, *109*, 24152-24159.
- (13) Kirschner, K. N.; Woods, R. J. Solvent interactions determine carbohydrate conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 10541-5.

- (14) Galema, S. A.; Hoiland, H. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 3. Density and ultrasound measurements. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 5321-5326.
- (15) Galema, S. A.; Engberts, J. B. F. N.; Hoiland, H.; Forland, G. M. Informative Thermodynamic Properties of the Effect of Stereochemistry on Carbohydrate Hydration. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 6885-6889.
- (16) Sabadini, E.; Cosgrove, T.; Egídio, F. D. C. Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O: a comparative study. *Carbohydrate research* **2006**, *341*, 270-4.

# Capítulo 2

---

## Efeito Isotópico do Deutério sobre a Solubilidade de Carboidratos





## 2.1. Introdução

Soluções aquosas de carboidratos constituem sistemas de grande importância em processos biológicos como reconhecimento molecular<sup>1,2</sup> e criopreservação,<sup>3</sup> servem como fontes de energias renováveis,<sup>4</sup> e como matérias primas para as indústrias química e de alimentos,<sup>5</sup> dentre outras. Do ponto de vista molecular, estes aspectos estão associados ao alto caráter hidrofílico das moléculas de carboidrato. Os sistemas H<sub>2</sub>O-carboidratos apresentam ligações de hidrogênio intensas e altamente localizadas e, por isso, a estrutura molecular dos carboidratos podem impor maiores ou menores restrições à hidratação, dependendo da estereoquímica e do tamanho das moléculas de carboidrato.<sup>6-12</sup> Um claro exemplo entre estrutura molecular e propriedade macroscópica é encontrada no caso das três formas nativas das ciclodextrinas, as quais apresentam as seguintes solubilidades: 0,121; 0,002 e 0,168 mol L<sup>-1</sup> a 298K, respectivamente para alfa (6 unidades), beta (7 unidades), e gama (8 unidades) de glicose.<sup>13</sup> Embora o processo solubilização dos carboidratos em água pode ser pensado como simples e bem conhecido, ele ainda está longe de ser completamente entendido. A inserção dos carboidratos na água perturba a estrutura das ligações de hidrogênio,<sup>14</sup> e estas, por seu turno, provocam alterações nas conformações dos carboidratos.<sup>15</sup> No caso do D<sub>2</sub>O, sua menor energia vibracional do nível quântico fundamental (*zero-point energy*) faz suas ligações de hidrogênio mais intensas e mais localizadas do que em H<sub>2</sub>O.<sup>16</sup> Como consequência, a quebra de ligações de hidrogênio em D<sub>2</sub>O requer (em excesso) mais altos valores de entalpia (0,96 kJ mol<sup>-1</sup>) e resulta em maiores aumentos de entropia (2,59 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) do que os correspondentes valores em H<sub>2</sub>O.<sup>17-19</sup> O efeito isotópico do D<sub>2</sub>O sobre proteínas, células e tecidos vegetais e animais tem sido amplamente estudados e alguns dos principais resultados são resumidas na revisão de Kushner e colaboradores.<sup>20</sup> Em resumo, a

substituição isotópica da água por D<sub>2</sub>O aumenta a estabilidade de proteínas e algumas vacinas como pólio, abaixa a atividade anti-congelante de glicoproteínas de peixes polares e inibe a mitose em muitos tecidos de vegetais e animais, etc.

Em relação à solubilidade, para solutos apolares pequenos como gases nobres e metano, as solubilidades são surpreendentemente mais altas em D<sub>2</sub>O do que em H<sub>2</sub>O.<sup>21,22</sup> Por outro lado, para moléculas apolares grandes é observada uma tendência oposta.<sup>23</sup> A solubilidade das ciclodextrinas (carboidratos) são cerca de 40% (m/m) mais baixa em água pesada, e este efeito é atribuído à intensificação do efeito hidrofóbico (associado às cavidades).<sup>13</sup> Para solutos hidrofílicos este cenário é um pouco menos previsível. Por exemplo, para aminoácidos como glicina e alanina, as solubilidades são maiores em D<sub>2</sub>O, enquanto prolina é mais solúvel em H<sub>2</sub>O.<sup>24</sup> Para o polissacarídeo κ-carragena, um soluto hidrofílico, a gelificação (transição *coil-helix* e posterior agregação das duplas hélices) ocorre em temperaturas mais baixas. Além disso, a substituição isotópica D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, faz com que as duplas hélices formadas sejam mais estáveis termicamente e mecanicamente gerando géis mais elásticos e resistentes<sup>25</sup> como será detalhado no próximo capítulo.

Neste capítulo é apresentado e discutido um estudo comparativo da propriedade macroscópica solubilidade, de uma série de mono, di, tri e oligossacarídeos cíclicos em água leve e pesada à diferentes temperaturas. O principal objetivo é o estabelecimento de correlações entre as estruturas moleculares dos carboidratos estudados com suas respectivas solubilidades nos dois solvente.

## 2.2. *Materiais e Métodos*

### 2.2.1. *Materiais*

Todos os carboidratos deste estudo foram comprados da Sigma-Aldrich: D-(+)-glicose (99,5%), D-(+)-xilose (99%), D-(+)-maltose (99%), sacarose (99,5%), D-(+)-rafinose (98%), e alfa-ciclodextrina,  $\alpha$ -CD, (99%). Previamente às medidas de solubilidade os açúcares foram secos em dessecador usando  $P_2O_5$  e a quantidade de água de hidratação foi removida e verificada por análises elementares (CHNO). A água utilizada em todo estudo foi deionizada de padrão MilliQ (18,2 M $\Omega$ ) e a água deuterada foi adquirida da Sigma-Aldrich com pureza atômica em Deutério superior a 99,9%.

### 2.2.2. *Medidas de solubilidade*

As soluções aquosas ( $H_2O$  ou  $D_2O$ ) dos carboidratos foram preparadas com excesso de soluto (%m/m aproximadamente 10% maior do que a solubilidade em  $H_2O$  na temperatura de referência) para obter soluções saturadas em equilíbrio com as respectivas fases sólidas. As amostras foram preparadas em tubos de vidros e lacradas em cada uma das seguintes temperaturas (25, 27, 29, 30, 32, e 35) °C e deixadas sob agitação constante ao longo de 10 dias. Foi observado que para tempos superiores a cinco ou 6 dias as concentrações de açúcar nas fases líquidas não mais apresentavam variação com o tempo. Nos experimentos contendo  $D_2O$  como solvente, foram tomados cuidados especiais (redução do tempo em que os tubos permaneciam abertos, as amostras foram envoltas em ambientes isolados para evitar o contato direto do frasco com os vapores de água do banho termostático) para evitar trocas químicas deutério/próton indesejáveis. Após o tempo de equilíbrio em banho as amostras foram filtradas com filtro (diâmetro de 0,22 $\mu$ m) e centrifugadas (centrífuga Eppendorf 5804R) a 5000 rpm por 30 minutos em cada

temperatura de interesse. Em seguida os sobrenadantes foram filtrados novamente usando filtros similares e os sobrenadantes foram adequadamente diluídos para as concentrações ótimas dentro da região da curva padrão e as quantificações feitas por meio de refratometria (Abbe NAR – 1T).

## **2.3. Resultados e Discussão**

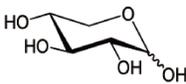
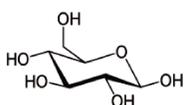
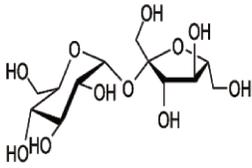
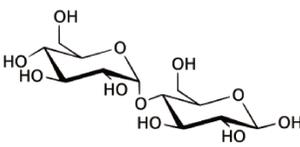
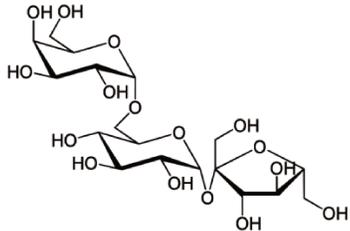
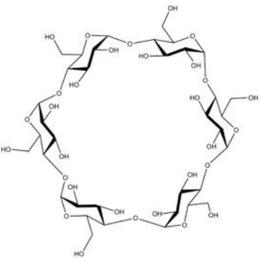
### *2.3.1. Solubilidade e tamanho molecular*

Os valores de solubilidade determinados juntamente com os respectivos valores de referência para os carboidratos em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O a 298 K são apresentados na Tabela 2.1. Também são apresentadas as estruturas moleculares.

A comparação dos valores de solubilidade medidos em H<sub>2</sub>O com aqueles encontrados na literatura estão em ótima concordância dentro dos erros experimentais indicando que a metodologia usada neste trabalho é adequada para o estudo das diferenças de solubilidade em água leve e pesada.

Para todos os açúcares os valores de solubilidade são sempre menores em D<sub>2</sub>O, porém as diferenças são mais significantes para moléculas maiores. O resultado para os isômeros D-maltose e D-sacarose indicam que diferenças na estrutura molecular implicam em diferenças de solubilidade e mais ainda, no efeito isotópico comparativo entre os dois solventes. As maior diferença de solubilidade observada, como já reportado na literatura, é observada para o  $\alpha$ -CD.

**Tabela 2.1:** Valores de solubilidade dos carboidratos em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O a 298K expressos em percentagem mássica (massa do carboidrato/massa total de solução). As estruturas moleculares são apresentadas esquematicamente e não se referem às conformações em solução. Os valores referência em H<sub>2</sub>O são indicados entre parêntesis.

Carboidrato	Estrutura molecular	Solubilidade (%m/m)		Diferença relativa (%)
		H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	
D-Xilose		54.6 ± 0.9 (55.04) <sup>26</sup>	50.9 ± 0.9	6.8
D-Glicose		50.0 ± 0.3 (50.5) <sup>27*</sup>	47.6 ± 0.2	4.8
D-Sacarose		65.6 ± 1 (66.8) <sup>28*</sup>	62.4 ± 0.8	4.9
D-Maltose		42.0 ± 0.4 (42.67) <sup>29</sup>	35.9 ± 0.4	14.5
Raffinose		16.7 ± 0.1 (16.86) <sup>30</sup>	14.5 ± 0.4	13.2
α-CD		13.2 ± 0.1 (11.36) <sup>31</sup>	7.3 ± 0.2 (7.05)	44.7

\*Calculados de dados da literatura

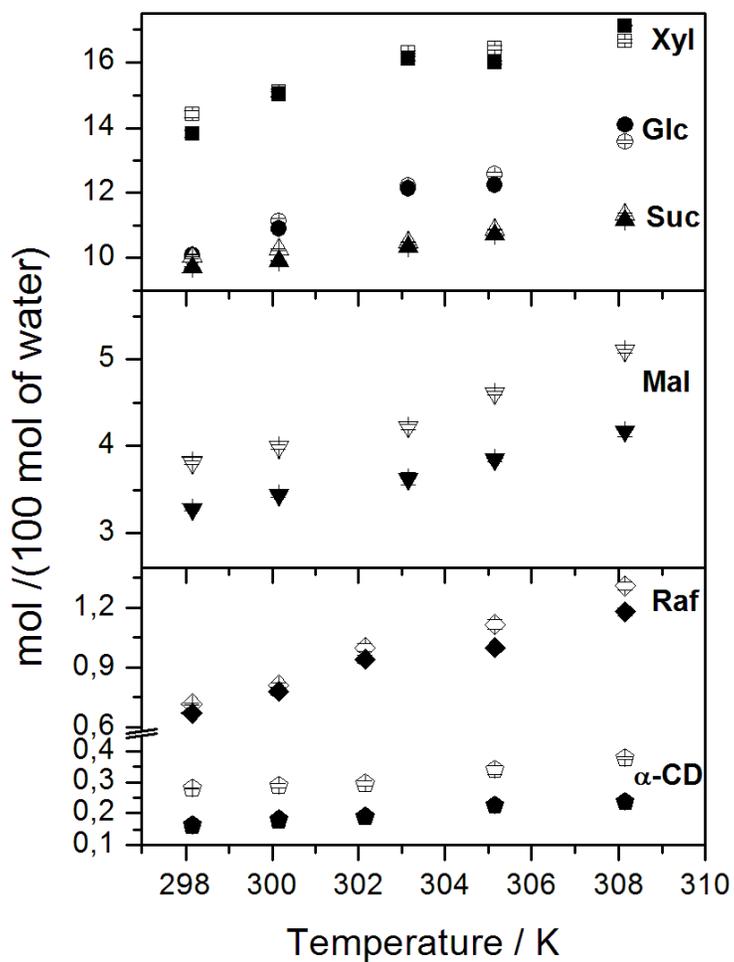
Os resultados da Tab. 2.1 sugerem que, para o grupo de açúcares altamente solúveis, a diferença relativa de solubilidade entre os dois solventes é menor.

Para o grupo dos açúcares pouco solúveis, por outro lado, estas diferenças são grandes e esta tendência também é observada para a D-maltose com solubilidade intermediária. Contudo, deve-se ressaltar que, devido às diferenças intrínsecas de massa molar e densidade entre  $H_2O$  e  $D_2O$ , as comparações de solubilidades nestes dois solventes não são bem descritas através de concentrações em percentagem mássica. Ao invés disso, a expressão da solubilidade em termos de mols de carboidrato por 100 mols de água indica diretamente os efeitos isotópicos sobre a solubilidade. O gráfico das solubilidades dos carboidratos (em base molar) nos dois solventes são apresentados na Figura 2.1 em diferentes temperaturas. Como esperado, as solubilidades aumentam com a temperatura para todos os carboidratos. As solubilidades são praticamente as mesmas em  $H_2O$  e  $D_2O$  para o grupo dos açúcares muito solúveis (xilose, glicose e sacarose), mas para os açúcares menos solúveis as solubilidades são mais baixas em  $D_2O$  (inclusive maltose com solubilidade intermediária).

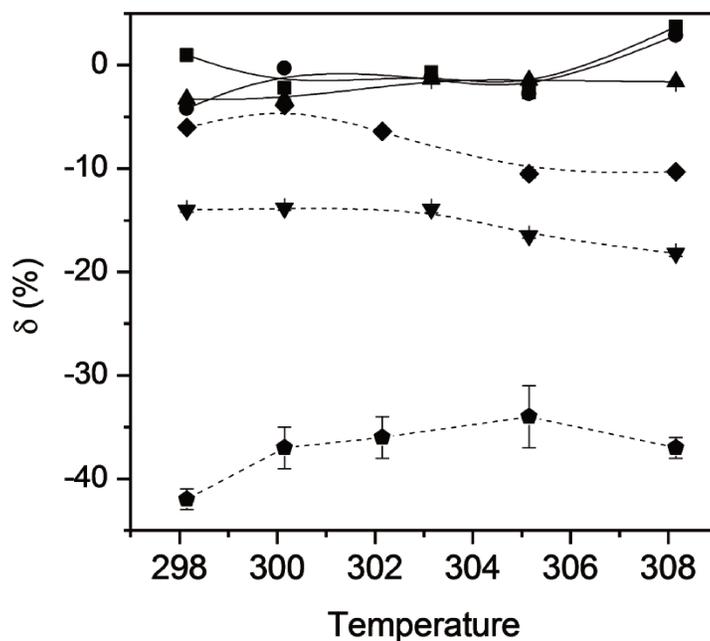
O efeito da substituição isotópica  $D_2O/H_2O$  pode ser melhor representada pelo parâmetro  $S_D$  expresso pela Equação (2.1)

$$S_D(\%) = \left\{ \frac{S_{D_2O}(T) - S_{H_2O}(T)}{S_{H_2O}(T)} \right\} \times 100 \quad (2.1)$$

Em que  $S_{H_2O}(T)$  e  $S_{D_2O}(T)$  são as solubilidades dos carboidratos em  $H_2O$  e  $D_2O$ , respectivamente, em função da temperatura e expressas em base molar. Os valores de  $S_D$  para os carboidratos é apresentado na Figura (2.2).

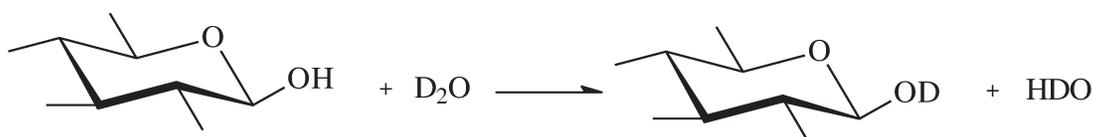


**Figura 2.1:** Solubilidade dos carboidratos expressas em mols de carboidrato por 100 mos de solvent em H<sub>2</sub>O (símbolos vazados) e em D<sub>2</sub>O (símbolos cheios) em função da temperatura para os carboidratos: D-xilose (quadrado); D-glicose (círculo); sacarose (triângulo para cima); D-maltose (triângulo para baixo); rafnose (losango); e  $\alpha$ -CD (pentágono).



**Figura 2.2:** Efeito isotópico  $D_2O/H_2O$  sobre a solubilidade (dados Figura 2.1) dos açúcares em diferentes temperaturas para os carboidratos: D-xilose (quadrado); D-glicose (círculo); sacarose (triângulo para cima); D-maltose (triângulo para baixo); rafinose (losango); e  $\alpha$ -CD (pentágono). As linhas servem apenas de guia para os olhos.

Os valores de  $S_D$  são próximos a zero para o grupo dos açúcares mais solúveis e tornam-se mais negativos à medida que a solubilidade dos açúcares diminui alcançando um valor de  $-40\%$  para a  $\alpha$ -CD. Curiosamente, para este carboidrato o efeito isotópico apresenta uma concavidade negativa na faixa de temperatura estudada. Embora a correlação entre a solubilidade em água ( $H_2O$  e  $D_2O$ ) e  $S_D(\%)$  seja clara, é necessário uma consideração sobre o efeito das trocas H/D nas soluções dos carboidratos em água deuterada. Quando um carboidrato é solubilizado em  $D_2O$ , os prótons dos grupos hidroxílicos podem ser trocados por átomos de deutério de acordo com o processo esquemático:



Em princípio, todos os grupos hidroxila do carboidrato podem trocar prótons por átomos de Deutério do D<sub>2</sub>O. Para se ter uma ideia do quão pronunciado é este efeito sobre o processo de solubilização pode-se considerar que a reação acima ocorre com a mesma eficiência da reação de formação do HDO ( $H_2O + D_2O \rightleftharpoons 2HDO$   $K = 3,82$ )<sup>32</sup> a 298K. Deste modo a formação do HDO é um processo favorável e é esperado que haverá moléculas de HDO na solução final. A energia coesiva da mistura HDO + D<sub>2</sub>O é menor do que D<sub>2</sub>O puro. Assim, as solubilidades poderiam ser ainda mais baixas se o solvente deuterado não tivesse prótons em sua composição. É esperado que a quantidade de HDO formado seja maior no caso dos carboidratos mais solúveis. Considerando que a reação de formação de HDO ocorra com um rendimento de 100%, o pior cenário ocorreria para a solução de sacarose que apresenta a maior solubilidade. Neste caso, considerando que todos os prótons trocáveis estão envolvidos nas reações de troca protônica, a solução final seria uma mistura estimada em 75% de moléculas de água na forma HDO e 25% na forma D<sub>2</sub>O. Esta consideração é um caso limite de uma constante de reação infinitamente grande, no entanto esta abordagem mostra que na pior situação não haveria a presença de H<sub>2</sub>O na mistura, ou se houver, estaria em traços. A determinação das solubilidades dos carboidratos deuterados seria um interessante objeto para estudos futuros.

A inserção de uma molécula de soluto na estrutura da água líquida provoca o rompimento da rede tetraédrica de ligações de hidrogênio, e neste processo há um custo energético entálpico-entrópico.<sup>33</sup> Deste modo, a formação de uma cavidade em D<sub>2</sub>O requereria uma maior energia livre devido à sua maior energia coesiva em relação à H<sub>2</sub>O. O marcante abaixamento de solubilidade da  $\alpha$ -CD devido à substituição isotópica H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O tem sido atribuída à intensificação do efeito hidrofóbico, uma vez que o interior destes carboidratos cíclicos são consideravelmente hidrofóbicos.<sup>13</sup> No entanto, em

vista dos resultados obtidos para os carboidratos sem nenhuma parte hidrofóbica, como maltose e rafinose, a explicação prévia baseada no efeito hidrofóbico não se aplica. Algumas análises podem ser feitas considerando o número de moléculas de água de hidratação por molécula de carboidrato no limite de solubilidade (definido aqui como  $R_S$ ). Na Tabela 2.2 são apresentados os valores de  $R_S$  à 298 K. Os valores de  $R_S$  para D-xilose e D-glicose são aproximadamente 7 e 10, respectivamente. Estes valores são próximos dos números de hidratação,  $R_H$ , (6,4 para D-xilose e 7,2 para D-glicose) obtidos em diluição infinita.<sup>34</sup> Para os carboidratos “pequenos” (mais solúveis) os valores apresentados na Tab. 2.2 para  $R_S$  e  $R_H$  são próximos. Este é um indicativo de que a presença das moléculas dos carboidratos induz apenas pequenas perturbações na rede de ligações de hidrogênio da água como verificado por Mason e colaboradores.<sup>38</sup> Para os carboidrato moderadamente ou pouco solúveis como D-maltose, rafinose, e principalmente  $\alpha$ -CD, como mostrado na Tabela 2.2, os valores de  $R_S$  são consideravelmente maiores do que  $R_H$ . Por exemplo, no caso da  $\alpha$ -CD,  $R_H$  é aproximadamente 58,<sup>37</sup> enquanto no equilíbrio de solubilidade existem cerca de 356 moléculas de água por molécula de  $\alpha$ -CD, e esta diferença é ainda maior quando o solvente é D<sub>2</sub>O. Estes resultados sugerem que as perturbações causadas pela inserção de moléculas grandes e pouco solúveis se estende além da primeira camada de hidratação. Como D<sub>2</sub>O possui uma maior energia coesiva, o ajuste das moléculas de rafinose e  $\alpha$ -CD em sua rede de ligações de hidrogênio é ainda mais difícil ( $R_S > 600$ ). Nós imaginamos que explicações em nível molecular destes efeitos podem ser extraídos de simulações de dinâmica molecular, porém, considerando efeitos quânticos para computar as diferenças entre H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O.

**Tabela 2.2:** Número médio de moléculas de água (H<sub>2</sub>O ou D<sub>2</sub>O) ao redor de cada molécula de carboidrato no limite de solubilidade ( $R_S$ ). Os valores dos números de hidratação,  $R_H$ , dos carboidratos em solução aquosa em diluição infinita obtidos da literatura também são apresentados.

<b>Carboidrato</b>	<b>Solvente</b>	<b><math>R_S</math> (Medido)</b>	<b><math>R_H</math> (Literatura)</b>
<b>D-Xilose</b>	H <sub>2</sub> O	6.93 ± 0.05	6,4 <sup>34</sup> ; 6,8 <sup>35</sup>
	D <sub>2</sub> O	7.23 ± 0.06	
<b>D-Glicose</b>	H <sub>2</sub> O	10.00 ± 0.03	7,2 <sup>34</sup> ; 8,4 <sup>6</sup> ; 8,8 <sup>35</sup>
	D <sub>2</sub> O	9.90 ± 0.02	
<b>D-Sacarose</b>	H <sub>2</sub> O	9.96 ± 0.05	13,3 <sup>35</sup> ; 13,9 <sup>6</sup>
	D <sub>2</sub> O	10.30 ± 0.05	
<b>D-Maltose</b>	H <sub>2</sub> O	26.2 ± 0.1	14,5 <sup>6</sup> ; 18,5 <sup>36</sup>
	D <sub>2</sub> O	30.5 ± 0.2	
<b>Rafinose</b>	H <sub>2</sub> O	139.7 ± 0.7	30,7 <sup>8</sup>
	D <sub>2</sub> O	149 ± 3	
<b>α-CD</b>	H <sub>2</sub> O	356 ± 2	57,5 <sup>37</sup>
	D <sub>2</sub> O	620 ± 14	

### 2.3.2. *Entalpia de solução*

A partir dos valores de solubilidade em diferentes temperaturas, as entalpias de solução,  $\Delta_{sol}H_T$ , nos dois solventes H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O e à temperatura  $T$ , foram determinadas a partir da equação de van't Hoff na forma

$$\Delta_{sol}H_T = RT^2 \left( \frac{\partial \ln x_S}{\partial T} \right)_P \quad (2.2)$$

sendo  $x_s$  a solubilidade do carboidrato expressa em fração molar, o subscrito  $P$  indica pressão constante e os demais termos têm seus significados típicos em termodinâmica. Os valores de  $\Delta_{sol}H_{298K}$  são mostrados na Tabela (2.3). Os valores encontrados para os carboidratos em  $H_2O$  estão em boa concordância com os valores da literatura mesmo quando comparados com valores determinados calorimetricamente. Já os valores em  $D_2O$  são apresentados pela primeira vez neste trabalho. A diferença ( $\Delta_{sol}H_{D_2O,298K} - \Delta_{sol}H_{H_2O,298K}$ ) apresentada na Tabela 2.3, representa a entalpia associada à transferência de um mol de carboidrato de  $H_2O$  para  $D_2O$ , à 298 K, no limite de solubilidade de cada carboidrato.

A energia associada à solubilização envolve a ruptura das interações intermoleculares entre as moléculas de carboidratos e as moléculas de água com elas próprias seguida pela formação de novas interações entre as moléculas dos dois componentes. A energia de rede do carboidrato na forma cristalina é grande e dominante em relação ao processo de solubilização. O resultado disso é que para todos os carboidratos as energias de solubilização determinadas calorimetricamente são positivas. Porém, o mesmo processo de solubilização realizado com os carboidratos sólidos em estado vítreo fornece entalpias de solução negativas.<sup>39</sup>

A energia de transferência (de  $H_2O$  para  $D_2O$ ) obtida para os açúcares muito solúveis ocorre com aumento de entalpia, enquanto uma tendência oposta é verificada para os carboidratos menos solúveis, maltose e rafinose. Curiosamente, para  $\alpha$ -CD o comportamento não é o mesmo dos açúcares pouco solúveis. Para os açúcares muito solúveis os valores positivos para transferência podem ser uma consequência de romper interações entre os grupos OD com as moléculas de água ( $D_2O$ ) e formar novas ligações de hidrogênio envolvendo átomos de hidrogênio no lugar dos átomos de deutério.

**Tabela 2.3:** Entalpia de solução dos carboidratos em H<sub>2</sub>O ( $\Delta_{sol}H_{H,298}$ ) e D<sub>2</sub>O ( $\Delta_{sol}H_{D,298}$ ) determinadas a 298 K a partir da equação de van't Hoff. Os máximos desvios relativos das entalpias de solução são menores que 10%. Os valores das entalpias de solução para os carboidratos em H<sub>2</sub>O obtidos da literatura e também as entalpias de transferência ( $\Delta_{sol}H_{D_2O,298K} - \Delta_{sol}H_{H_2O,298K}$ ) também são apresentados. Todos os valores são apresentados em  $kJ\ mol^{-1}$ .

Carboidrato	Entalpia de solução		$\Delta_{sol}H_{D_2O} - \Delta_{sol}H_{H_2O}$
	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	
D-Xylose	9.5 (8.92 ± 0.02) <sup>40</sup>	13.1	+ 3.7
D-Glucose	19.9 (19.5) <sup>31</sup>	21.5	+ 1.6
Sacarose	8.2 (5.95 ± 0.1) <sup>39</sup>	9.8	+ 1.6
Maltose	20.7 (15.6 ± 0.1) <sup>39</sup>	17.4	- 3.4
Rafinose	46.1 (52.2 ± 0.13) <sup>39</sup>	40.8	-5.3
α-CD	23.7 (25.6 ± 0.7) <sup>31</sup>	29.5	+ 5.8

Como as ligações de hidrogênio envolvendo átomos de deutério são mais intensas, a transferência do carboidrato requer um custo entálpico. A entalpia de transferência torna-se cada vez menor com o aumento do sacarídeo ficando negativa para os carboidratos pouco solúveis. Neste caso, não apenas as moléculas diretamente ligadas aos carboidratos que afetam o comportamento de solubilização, mas também as camadas adjacentes de moléculas do solvente.

O estudo comparativo das entalpias de diluição destes carboidratos nos dois solventes forneceria mais *insights* sobre os processos interacionais das moléculas de água com os carboidratos.

## 2.4. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permite concluir que as solubilidades dos carboidratos são menores em D<sub>2</sub>O em relação à H<sub>2</sub>O, porém estas diferenças tornam-se perceptíveis e são intensificadas para carboidratos menos solúveis. Os resultados para mono, di, tri e oligossacarídeos sugerem que o efeito isotópico sobre as solubilidades podem estar relacionadas à acomodação das moléculas do soluto na estrutura da água. Para as moléculas pequenas os encaixes são mais fáceis e mais precisos com baixas restrições espaciais e estruturais das moléculas de água. Para carboidratos maiores e menos solúveis as perturbações na estrutura da água se estendem além da camada de hidratação. Portanto, a maior energia coesiva do D<sub>2</sub>O resulta em menores solubilidades neste solvente.

## 2.5. Referências

- (1) Dunlop, D. C.; Bonomelli, C.; Mansab, F.; Vasiljevic, S.; Doores, K. J.; Wormald, M. R.; Palma, A. S.; Feizi, T.; Harvey, D. J.; Dwek, R. a; Crispin, M.; Scanlan, C. N. Polysaccharide mimicry of the epitope of the broadly neutralizing anti-HIV antibody, 2G12, induces enhanced antibody responses to self oligomannose glycans. *Glycobiology* **2010**, *20*, 812-23.
- (2) Du, J.; Yarema, K. J. Carbohydrate engineered cells for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews* **2010**, *62*, 671-82.
- (3) Castelo, T. S.; Bezerra, F. S. B.; Lima, G. L.; Alves, H. M.; Oliveira, I. R. S.; Santos, E. a a; Peixoto, G. C. X.; Silva, a R. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (Tayassu tajacu). *Cryobiology* **2010**, *61*, 275-9.

- (4) Zhang, Y.-H. P. Renewable carbohydrates are a potential high-density hydrogen carrier. *International Journal of Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10334-10342.
- (5) Lichtenthaler, F. W.; Peters, S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. *Comptes Rendus Chimie* **2004**, *7*, 65-90.
- (6) Galema, S. A.; Hoiland, H. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 3. Density and ultrasound measurements. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 5321-5326.
- (7) Galema, S. A.; Engberts, J. B. F. N.; Hoiland, H.; Forland, G. M. Informative Thermodynamic Properties of the Effect of Stereochemistry on Carbohydrate Hydration. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 6885-6889.
- (8) Uedaira, H.; Ikura, M.; Uedaira, H. Natural-Abundance Oxygen-17 Magnetic Relaxation in Aqueous Solutions of Carbohydrates. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 1-4.
- (9) Fabri, D.; Williams, M. a. K.; Halstead, T. K. Water T2 relaxation in Sugar Solutions. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 889-905.
- (10) Sabadini, E.; do Carmo Egídio, F.; Fujiwara, F. Y.; Cosgrove, T. Use of Water Spin-spin Relaxation Rate to Probe the Solvation of Cyclodextrins in Aqueous Solutions. *The journal of physical chemistry. B* **2008**, *112*, 3328-3332.
- (11) Furuki, T. Effect of molecular structure on thermodynamic properties of carbohydrates. A calorimetric study of aqueous di- and oligosaccharides at subzero temperatures. *Carbohydrate research* **2002**, *337*, 441-50.
- (12) Connors, K. a. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical reviews* **1997**, *97*, 1325-1358.
- (13) Sabadini, E.; Cosgrove, T.; Egídio, F. D. C. Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O: a comparative study. *Carbohydrate research* **2006**, *341*, 270-4.
- (14) Dashnau, J. L.; Sharp, K. a; Vanderkooi, J. M. Carbohydrate Intramolecular Hydrogen Bonding Cooperativity and its Effect on Water Structure. *The journal of physical chemistry. B* **2005**, *109*, 24152-24159.
- (15) Kirschner, K. N.; Woods, R. J. Solvent Interactions Determine Carbohydrate Conformation. **2001**, *98*, 10541-10545.
- (16) Soper, a.; Benmore, C. Quantum Differences between Heavy and Light Water. *Physical Review Letters* **2008**, *101*, 1-4.
- (17) Muller, N. Is there a region of highly structured water around a nonpolar solute molecule? *Journal of Solution Chemistry* **1988**, *17*, 661-672.

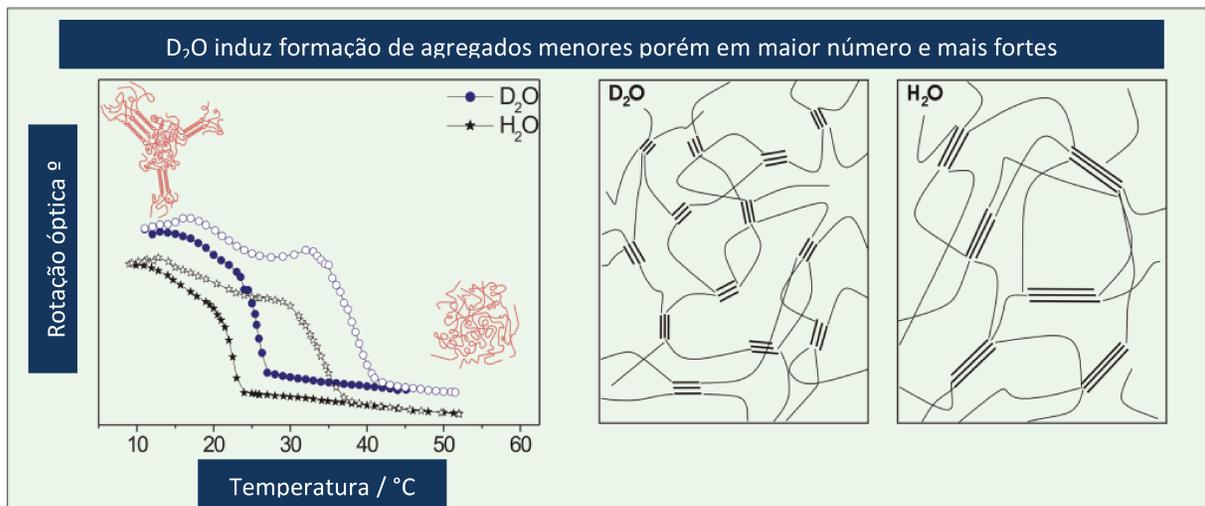
- (18) Muller, N. Search for a realistic view of hydrophobic effects. *Accounts of Chemical Research* **1990**, *23*, 23-28.
- (19) Muller, N. Model calculations of changes of thermodynamic variables for the transfer of nonpolar solutes from water to water-d<sub>2</sub>. *Journal of Solution Chemistry* **1991**, *20*, 669-680.
- (20) Kushner, D. J.; Baker, A.; Dunstall, T. G. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **1999**, *77*, 79-88.
- (21) Scharlin, P.; Battino, R. Solubility of 13 nonpolar gases in deuterium oxide at 15-45 °C and 101.325 kPa. Thermodynamics of transfer of nonpolar gases from H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O. *Journal of Solution Chemistry* **1992**, *21*, 67-91.
- (22) Ivanov, E. V.; Lebedeva, E. J.; Abrosimov, V. K.; Ivanova, N. G. Structural contribution to the effect of hydrophobic hydration of noble gases. *Journal of Structural Chemistry* **2005**, *46*, 253-263.
- (23) Goral, M.; Wisniewska-goclovska, B.; Skrzecz, A.; Hefter, G. T.; Young, C. L. IUPAC-NIST Solubility Data Series. 81. Hydrocarbons with Water and Seawater— Revised and Updated. Part 4. C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> Hydrocarbons with Water. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2005**, *34*, 709.
- (24) Jelińska-Kazimierczuk, M.; Szydłowski, J. Isotope effect on the solubility of amino acids in water. *Journal of Solution Chemistry* **1996**, *25*, 1175-1184.
- (25) Cardoso, M. V. C.; Sabadini, E. The gelling of κ-carrageenan in light and heavy water. *Carbohydrate research* **2010**, *345*, 2368-73.
- (26) Gabas, N.; Carillon, T.; Hiquily, N. Solubilities of D-xylose and D-mannose in water-ethanol mixtures at 25.degree.C. *Journal of Chemical & Engineering Data* **1988**, *33*, 128-130.
- (27) Alves, L. A.; Almeida e Silva, J. B.; Giulietti, M. Solubility of d -Glucose in Water and Ethanol/Water Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2007**, *52*, 2166-2170.
- (28) Young, F. E.; Jones, R. T. Sucrose Hydrates The Sucrose-Water Phase Diagram. *The Journal of Physical Chemistry* **1949**, *53*, 1334-1350.
- (29) Jónsdóttir, S. Ó.; Cooke, S. A.; Macedo, E. A. Modeling and measurements of solid–liquid and vapor–liquid equilibria of polyols and carbohydrates in aqueous solution. *Carbohydrate Research* **2002**, *337*, 1563-1571.
- (30) Hungerford, E. H.; Nees, A. R. Raffinose - Preparation and Properties. *Industrial & Engineering Chemistry* **1934**, *26*, 462-464.

- (31) Jozwiakowski, M. J.; Connors, K. A. Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydrate Research* **1985**, *143*, 51-59.
- (32) Simonson, J. . The enthalpy of the isotope-exchange reaction:  $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} = 2\text{HDO}$  at temperatures to 673 K and at pressures to 40 MPa. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **1990**, *22*, 739-749.
- (33) Graziano, G. On the temperature dependence of hydration thermodynamics for noble gases. *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1*, 1877-1886.
- (34) Boscaino, A.; Naidoo, K. J. The extent of conformational rigidity determines hydration in nonaromatic hexacyclic systems. *The journal of physical chemistry. B* **2011**, *115*, 2608-16.
- (35) Lee, S. L.; Debenedetti, P. G.; Errington, J. R. A computational study of hydration, solution structure, and dynamics in dilute carbohydrate solutions. *The Journal of chemical physics* **2005**, *122*, 204511.
- (36) Brady, J. W.; Schmidt, R. K. The role of hydrogen bonding in carbohydrates: molecular dynamics simulations of maltose in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 958-966.
- (37) Uedaira, H.; Ishimura, M.; Tsuda, S.; Uedaira, H. Hydration of Oligosaccharides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 3376-3379.
- (38) Mason, P. E.; Neilson, G. W.; Enderby, J. E.; Saboungi, M.; Brady, J. W. Structure of Aqueous Glucose Solutions as Determined by Neutron Diffraction with Isotopic Substitution Experiments and Molecular Dynamics Calculations. **2005**, 13104-13111.
- (39) Miller, D. P.; de Pablo, J. J. Calorimetric Solution Properties of Simple Saccharides and Their Significance for the Stabilization of Biological Structure and Function. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 8876-8883.
- (40) Zhang, D.; Montañés, F.; Srinivas, K.; Fornari, T.; Ibáñez, E.; King, J. W. Measurement and Correlation of the Solubility of Carbohydrates in Subcritical Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2010**, *49*, 6691-6698.



# Capítulo 3

## Efeito Isotópico do Deutério na Transição *helix-coil* da $\kappa$ -carragena





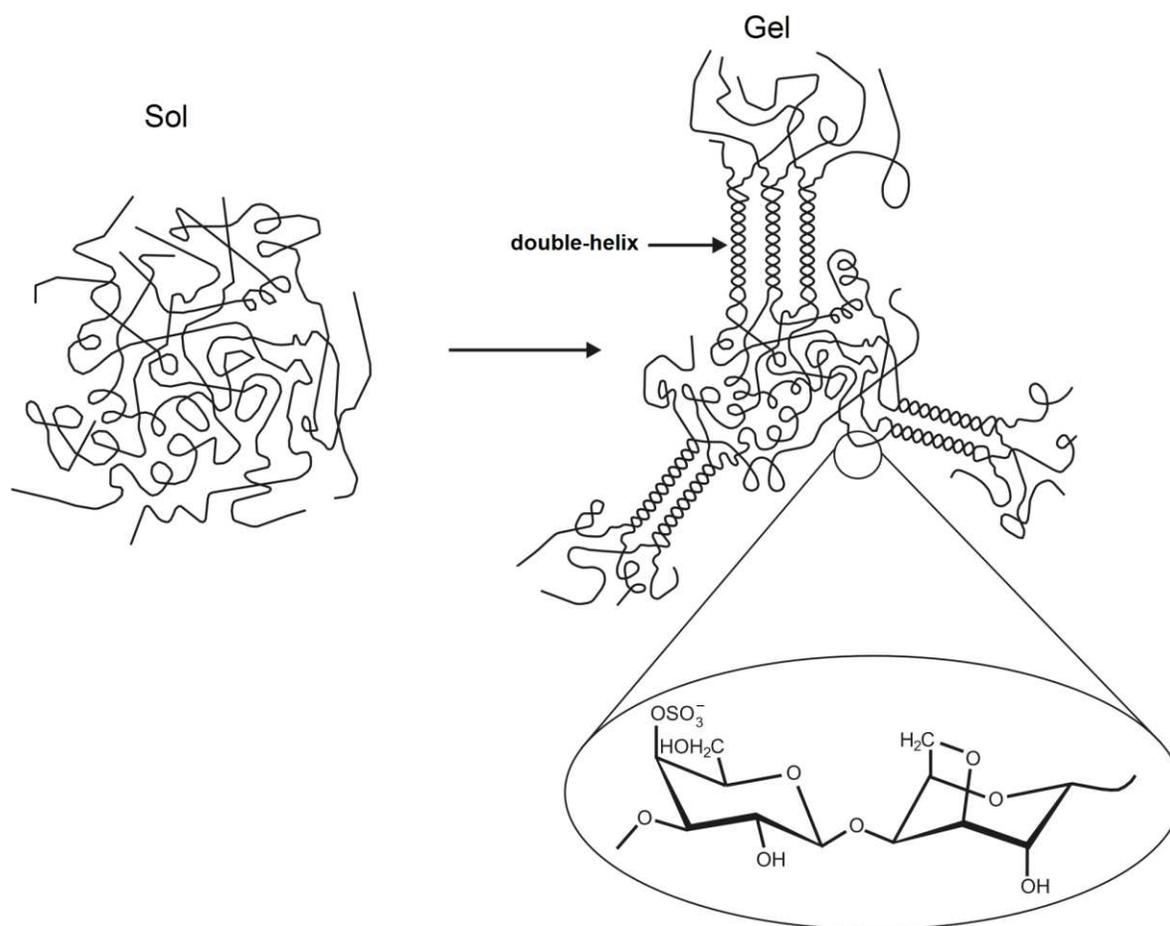
### 3.1. Introdução

Diferenças marcantes em propriedades macroscópicas emergem como consequência da substituição isotópica (H por D) da água. A mais baixa energia do nível quântico fundamental vibracional da molécula de D<sub>2</sub>O em relação à H<sub>2</sub>O, resulta em ligações de hidrogênio mais intensas e mais localizadas.<sup>1</sup> Tais diferenças influenciam uma ampla gama de fenômenos moleculares em solução desde solubilidade de gases,<sup>2,3</sup> formação de complexos supramoleculares,<sup>4,5</sup> *folding*<sup>6</sup> e *binding*<sup>7</sup> de proteínas, formação e propriedades de bicamadas lipídicas<sup>8</sup> e ainda na regulação do crescimento de organismos vivos.<sup>9</sup>

Como mostrado no Capítulo 2 desta tese, mesmo propriedades macroscópicas de solutos hidrofílicos são sensíveis à substituição isotópica (H por D). Neste estudo foi mostrado haver uma correlação entre a intensidade do efeito isotópico com o tamanho e a solubilidade do carboidrato em questão.<sup>10</sup> Quanto menos solúvel e quanto maior a molécula do carboidrato, mais intenso e perceptível se torna o efeito da substituição de H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O. Em outras soluções de carboidratos cíclicos o efeito isotópico sobre a solubilidade têm sido atribuído à intensificação do efeito hidrofóbico uma vez que o D<sub>2</sub>O apresenta uma maior densidade de energia coesiva.<sup>11</sup> Este efeito também afeta a agregação de *n*-alquil-β-D-glicosídeos induzindo um aumento do número de agregação, porém, não alterando a concentração micelar crítica.<sup>12</sup>

No sentido de obter uma compreensão mais ampla do efeito isotópico nas propriedades de carboidratos em solução, estudou-se neste capítulo a influência do efeito isotópico num carboidrato polimérico, a κ-carragena (daqui em diante designada por κ-C). A κ-C é um polissacarídeo formado pela unidade repetitiva 3-β-D-galactopirranose-4-sulfato ligado a 4-3,6-anidro-α-

galactopirranose. Sob certas condições termodinâmicas, as cadeias moleculares da  $\kappa$ -C sofrem uma transição *coil-helix* formando duplas hélices seguida da posterior agregação delas e levando à formação de um gel. Na Figura 3.1 é mostrada uma representação esquemática das mudanças conformacionais das cadeias da  $\kappa$ -C durante a transição sol-gel (baseado na ref.<sup>13</sup>) bem como a fórmula molecular de sua unidade repetitiva.



**Figura 3.1:** Representação esquemática das mudanças conformacionais das cadeias de  $\kappa$ -carrageenan durante a transição deovelos aleatórios para duplas hélices com posterior agregação das cadeias no processo sol-gel (figura adaptada da Ref. 13 ).

O elemento físico dos pontos de junção no gel de  $\kappa$ -C está associado à formação de duplas hélices e a subsequente junção delas (duas ou mais) em

estruturas maiores chamadas de *super* hélices ou zonas de junção.<sup>14,15</sup> A gelificação neste caso pode ser pensada como um processo dirigido parcialmente pela micro-cristalização, que durante a evolução do gel, grandes restrições estéricas e conformacionais reduzem a propagação e a agregação de maiores domínios. Na literatura muitos estudos envolvendo as transições sol-gel da  $\kappa$ -C têm sido realizados avaliando-se o efeito da concentração, da presença de eletrólitos específicos e da força iônica.<sup>14,16-18</sup> Contudo, poucos estudos foram realizados no sentido de se obter um melhor entendimento do papel exercido pelas moléculas dos solvente na gelificação da  $\kappa$ -C. Rochas e Rinaudo<sup>14</sup> mostraram que em dimetilsulfóxido e em formamida as cadeias de  $\kappa$ -C formam apenas hélices simples. Já Ramakrishnan e Prud'homme<sup>19</sup> verificaram que em glicerol e em sorbitol há a formação de duplas-hélices, entretanto, sem a posterior agregação delas. Estes últimos autores concluíram que a formação das zonas de junção são extremamente dependentes da permissividade elétrica do solvente e, portanto, o processo de agregação é dirigido principalmente por interações coulômbicas.

Neste capítulo são apresentados os resultados de um estudo comparativo da transição sol-gel da  $\kappa$ -C em H<sub>2</sub>O e em D<sub>2</sub>O, no qual pequenas diferenças na densidade de energia coesiva entre estes solventes levam a grandes diferenças no estado final dos géis. Em água pesada, os módulos elásticos ( $G'$ ), determinados por medidas reológicas, são significativamente maiores do que aqueles em H<sub>2</sub>O. A interpretação molecular deste processo é corroborada por medidas de rotação óptica e por calorimetria diferencial de alta sensibilidade (micro-DSC).

## 3.2. *Materiais e Métodos*

### 3.2.1. *Materiais*

A goma carragena contendo predominantemente a forma kappa e majoritariamente os cátions  $K^+$  como contra íons, foi adquirida da Sigma-Aldrich e utilizada sem maiores purificações. Os teores dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  foram determinados usando um fotômetro de chama (Digimed DM 62), e suas respectivas concentrações foram 0,26 e 7,7% (m/m) já presentes na  $\kappa$ -C.  $D_2O$  (Aldrich com 99,9% em pureza atômica) usado sem mais tratamentos e  $H_2O$  (de padrão MilliQ,  $18,2 M\Omega cm^{-1}$ ) foram utilizados como solventes em todos os estudos. KCl (Merker) foi utilizado como fonte de íons  $K^+$  nas soluções de  $\kappa$ -C em diferentes forças iônicas.

### 3.2.2. *Preparo de soluções e medidas reológicas*

Os géis de  $\kappa$ -C foram preparados nas concentrações % (m/m): 0,554; 0,750 e 1,000 em  $H_2O$ ; e 0,500; 0,678 e 0,904 em  $D_2O$ . Estas concentrações correspondem respectivamente à 15,9; 21,5 e 28,7  $\times 10^{-6} mol L^{-1}$  (em termos de unidade dissacarídea). O efeito específico do cátion potássio foi estudado em três diferentes concentrações totais de  $K^+$  (30, 50 e 90 mM) mantendo-se fixas as concentrações de  $\kappa$ -C em 0,554% e 0,500% (m/m) em  $H_2O$  e  $D_2O$ , respectivamente. As diferenças nas concentrações mássicas (cerca de 10,04% mais concentradas em  $H_2O$ ) surge como maneira de gerar soluções finais com concentrações na mesma razão molar e é devido às diferenças de empacotamento molecular entre  $H_2O$  e  $D_2O$ . O teor de  $K^+$  pré-existente nas amostras de  $\kappa$ -C foi de aproximadamente 10 mM e este foi computado para obtenção da concentração final de íons potássio.

As soluções foram aquecidas na faixa de temperatura de 60 – 70 °C e mantida nesta faixa por até 2h para destruir todas as conformações helicoidais das cadeias de  $\kappa$ -C. Os géis foram preparados a partir do resfriamento, de forma lenta até 20 °C, das amostras previamente aquecidas e mantidas à temperatura de 20 °C por um tempo total de 24 h previamente às medidas. Para obtenção dos reogramas foi utilizado o reômetro (Rheo-Stress 1, Thermo-Haake), empregando-se tensões de 0,8 e 1,9 Pa para os géis em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O, respectivamente, a fim de garantir que as medidas fossem realizadas no regime de viscoelasticidade linear. Em todas as medidas foi utilizada uma geometria placa-placa de titânio, com 35 mm de diâmetro com um *gap* de 1,000 mm. As amostras foram preparadas e as medidas foram realizadas todas em 4 réplicas independentes e os valores dos módulos apresentados são as médias.

### 3.2.3. *Medidas de rotação óptica*

Os ângulos de rotação óptica dos sistemas em água leve e pesada foram medidos num polarímetro Perkin-Elmer usando lâmpada com comprimento de onda de 365 nm e cela com caminho óptico de 100mm. As medidas foram realizadas na faixa de temperatura entre 10 e 60 °C e a taxa de variação da temperatura foi de 0,5 °C min<sup>-1</sup>.

### 3.2.4. *Medidas calorimétricas*

As curvas de varredura calorimétrica para os géis de  $\kappa$ -carrageenan foram realizadas no calorímetro diferencial de varredura de alta sensibilidade (VP-DSC, Microcal Inc.). O volume da cela calorimétrica (~0,5047 mL) foi preenchido com as soluções de  $\kappa$ -C e a cela de referência foi preenchida com

o respectivo solvente ( $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{D}_2\text{O}$ ) sempre a uma temperatura igual ou superior a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  para evitar o processo de gelificação durante o preenchimento. As amostras foram submetidas a três ciclos de aquecimento/resfriamento ( $5 - 60\text{ }^\circ\text{C}$ ) a uma taxa de  $10\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ . Para cada amostra o primeiro ciclo foi descartado por ainda poder conter uma pequena fração de conteúdo helicoidal.

### 3.3. Resultados e Discussão

O comprimento da ligação D–O é cerca de 3% mais curto do que o H–O<sup>1</sup> e, por isso, a transição sol-gel da  $\kappa$ -carragena é adequada para sondar as diferenças entre  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$  uma vez que longos segmentos submetem-se a transição *coil-helix* e precisam se ajustar à estrutura da água. A diferença relativa na intensidade das interações soluto-solvente pode ser ainda mais significativa no caso de uma solução de  $\kappa$ -C, uma vez que a transição *coil-helix* é um processo cooperativo e transições conformacionais de segmentos fazem com que segmentos adjacentes fiquem mais susceptíveis às mudanças conformacionais.<sup>6,20</sup> Além disso, as transições de cadeias enoveladas para duplas hélices são induzidas pela presença de eletrólitos específicos como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  e  $\text{Rb}^+$ .<sup>16,21</sup>

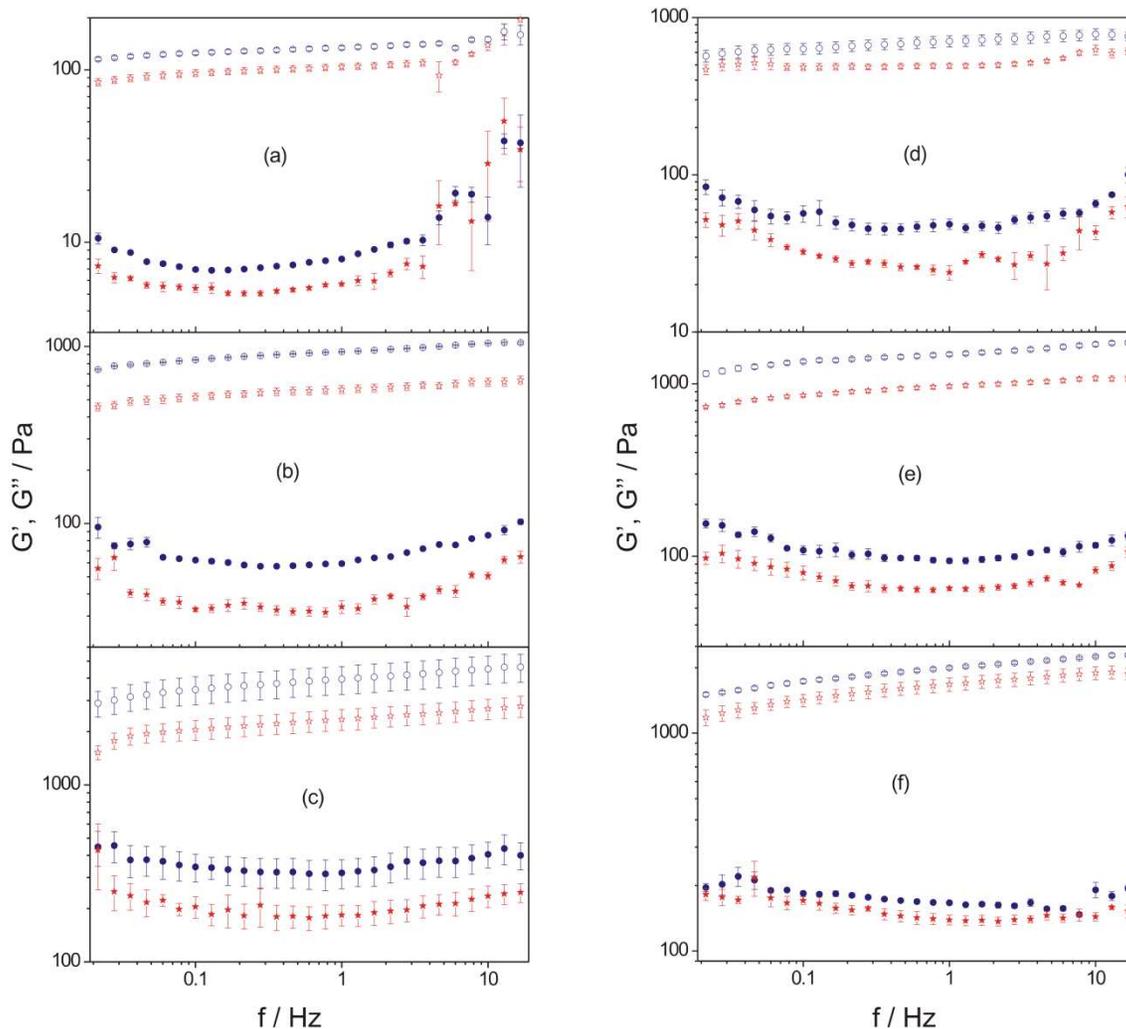
#### 3.3.1. Efeito isotópico sobre o comportamento reológico

A Figura 3.2 apresenta a comparação entre os módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) como uma função da frequência de varredura para os géis em diferentes concentrações de  $\kappa$ -C (Fig. 2a-c) e de  $\text{K}^+$  (Fig. 2d-f), a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  em  $\text{H}_2\text{O}$  (símbolos vermelhos) e  $\text{D}_2\text{O}$  (símbolos azuis). Os valores dos módulos

elásticos são praticamente independentes da frequência de cisalhamento. Para os géis em D<sub>2</sub>O, os valores de  $G'$  são superiores em relação aos respectivos valores em H<sub>2</sub>O, independentemente da concentração de unidades dissacarídeas de  $\kappa$ -C e de íons K<sup>+</sup>. Este fato mostra, de forma clara, que a substituição isotópica do solvente (H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O), provoca mudanças marcantes nos géis da goma  $\kappa$ -carragena.

Do ponto de vista reológico, os mais altos valores de  $G'$  podem ser atribuídos: (i) ao maior grau de reticulações, (ii) ou à maior rigidez dos pontos de junção e/ou a existência de cadeias mais rígidas.

O elemento de reticulação nos géis de  $\kappa$ -C é devido à formação de duplas hélices e a posterior agregação formando zonas de junção. Como esperado, os valores de  $G'$  aumentam com o aumento da concentração de unidades dissacarídeas de  $\kappa$ -C e de íons K<sup>+</sup>. Estes dois fatores podem atuar concomitantemente, pois o aumento da concentração de cadeias aumenta a probabilidade de formação de reticulações, e o aumento de íons K<sup>+</sup> favorece a agregação das duplas hélices.



**Figura 3.2:** Comparação entre os módulos elástico (símbolos vazados) e viscoso (símbolos preenchidos) para géis de  $\kappa$ -C em  $\text{H}_2\text{O}$  (estrela vermelha) e em  $\text{D}_2\text{O}$  (círculos azuis), a diferentes concentrações de  $\kappa$ -C (a-c) e de cátions  $\text{K}^+$  (d-f). em (a), (b) e (c) as concentrações de unidades dissacarídeas de  $\kappa$ -C são, respectivamente,  $(15,9; 21,5; \text{ e } 28,7) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , contendo apenas o  $\text{K}^+$  naturalmente presente na  $\kappa$ -C. Em (d), (e) e (f) as concentrações totais de íons  $\text{K}^+$  são, respectivamente,  $(30; 50; \text{ e } 90) \text{ m mol L}^{-1}$ , enquanto a concentração de unidades dissacarídeas de  $\kappa$ -C permanece fixada em  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os valores são médias de quatro medidas independentes sendo todas as medias realizadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A aplicação da simples teoria de elasticidade pode ser considerada para explicar as diferenças de comportamento dos géis. A teoria prediz que o módulo da rede,  $G_N$ , de géis poliméricos relaciona-se com a massa molar ( $M_e$ ) dos segmentos de cadeia entre os pontos de junção da seguinte forma

$$G_N = \rho_c k_B T \left( \frac{M}{M_e} \right) \quad (3.1)$$

em que  $M$  é a massa molar do polímero,  $\rho_c$  é a densidade de cadeias em solução e é proporcional à concentração, e  $k_B T$  é a energia térmica.<sup>22</sup> Assumindo que  $G' = G_N$ , a seguinte correlação pode ser obtida para os géis<sup>22</sup>:

$$\frac{(M_e)_{D_2O}}{(M_e)_{H_2O}} = \frac{G_{N,H_2O}}{G_{N,D_2O}} \quad (3.2)$$

De acordo com Equação (3.2), quando comparado nas mesmas concentrações molares, a massa molar das cadeias de  $\kappa$ -C entre as regiões de junção no gel formado em  $D_2O$  parece ser sempre menor do que em  $H_2O$ . Assim, há duas possibilidades para explicar os valores mais baixos para  $M_e$  em  $D_2O$ . Ou o comprimento das duplas hélices ou a densidade dos pontos de reticulação, ou ambos são maiores em água deuterada.

Os mecanismos moleculares da transição *coil-helix* e agregação das duplas hélices pode ser extraída da proposta de Tanaka<sup>23</sup> para formação de géis cujos mecanismos envolvem transição de novelos para hélices. De acordo com este modelo, a formação da hélices pode ser maior do que a agregação, ou num cenário mais complexo, as velocidades de ambos os processos são comparáveis. Assim, haverá uma competição entre a formação e a agregação das hélices e o processo global pode ser descrito por dois parâmetros. O primeiro está associado à probabilidade de formação de uma hélice ( $\eta_\zeta$ ) de

comprimento  $\zeta$  (Equação 3.3), e o outro está associado à agregação das hélices com uma constante ( $\lambda_\zeta$ ) (Equação 3.4).

$$\eta_\zeta \equiv \exp\left(-\frac{\Delta A_\zeta}{k_B T}\right) \quad (3.3)$$

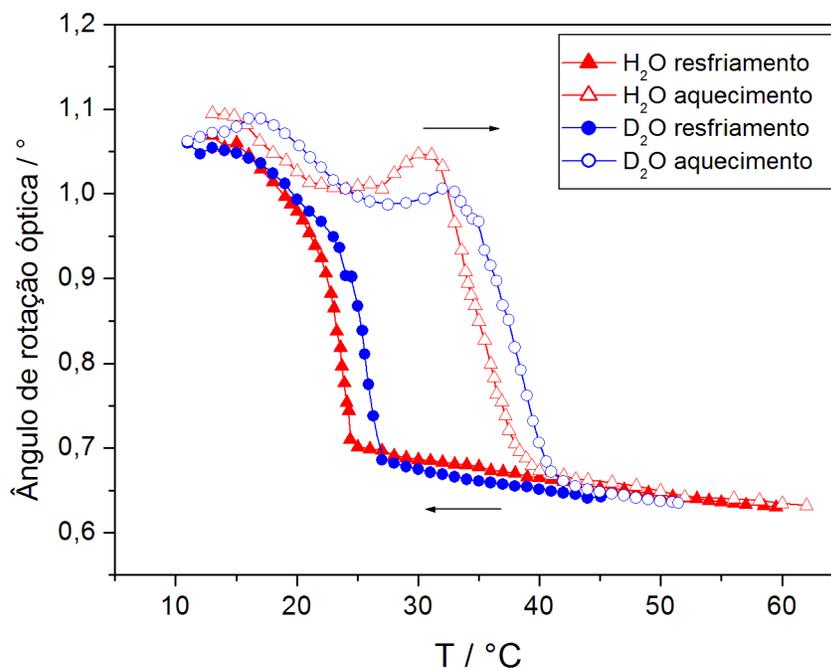
$$\lambda_\zeta \equiv \exp\left(-\frac{\Delta f_\zeta}{k_B T}\right) \quad (3.4)$$

Em que  $\Delta A_\zeta$  e  $\Delta f_\zeta$  são as energias livres das hélices livres e nos agregados com um comprimento  $\zeta$ , respectivamente, em relação aos novelos aleatórios em solução. Além da formação de reticulações através de múltiplas associações de duplas hélices, a associação de hélices simples também pode ocorrer. Tanaka reforça que para muitos biopolímeros a separação entre os dois processos é praticamente impossível de ser feita.

No caso da  $\kappa$ -C, os pontos de reticulação na estrutura do gel são formados pela agregação de duplas-hélices como mostrado na Figura 3.1.<sup>13-17</sup> No caso da  $\kappa$ -C, muito provavelmente ambos os processos ocorrem concomitantemente, uma vez que é necessário um perfeito acoplamentos de duas cadeias para formação de uma dupla hélice. Como já é bem reportado, na presença de cátions específicos como  $K^+$ ,  $Cs^+$  e  $Rb^+$ , a agregação das duplas hélices é fortemente favorecida. O teor elevado de  $K^+$  já presente no gel sem a adição de mais potássio indica que a formação dos pontos de reticulação são formados pela associação de duplas hélices de acordo com o esquema Fig. 3.1. Mesmo com a adição de concentrações relativamente altas de  $K^+$  (Figura 3.2d-f) o efeito da substituição isotópica sobre os módulos elástico persistem e isto indica se tratar de um fenômeno geral induzido pela substituição isotópico de H por D.

### 3.3.2. Conteúdo quiral dos géis em ambos os solventes

O conteúdo quiral associado aos centros assimétricos pode, em princípio, ser sondado por medidas de rotação óptica, uma vez que o ângulo de rotação óptica da luz polarizada é sensível à conformação dos segmentos da  $\kappa$ -C. Além dos centros quirais dos carbonos assimétricos, ainda há a contribuição do eixo quiral da dupla hélice que eleva o ângulo de rotação óptica na presença de duplas hélices. A Figura 3.3 mostra os ângulos de rotação óptica para soluções de  $\kappa$ -C em função da temperatura para os géis nos dois solventes. Estes experimentos foram realizados a uma concentração total de unidade dissacarídea de  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e sem a adição de KCl (o que corresponde a uma concentração de cátions  $K^+ \cong 10 \text{ m mol L}^{-1}$ ).



**Figura 3.3:** Variação do ângulo de rotação óptica para as soluções de  $\kappa$ -C com concentração de unidade dissacarídea  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sem adição do KCl. Géis formados em H<sub>2</sub>O (símbolos vermelhos) e em D<sub>2</sub>O (símbolos azuis) em função da temperatura durante os processos de resfriamento (símbolos cheios) e aquecimento (símbolos vazados).

Os resultados do gráfico revelam em detalhes as mudanças conformacionais das cadeias de  $\kappa$ -carragena em ambos os solventes. Inicialmente a solução de  $\kappa$ -C é resfriada a partir de uma temperatura inicial  $\sim 60$  °C em que as cadeias do polissacarídeo apresentam-se no estado de novelos aleatórios. Nesta temperatura o ângulo de rotação óptica em ambos os solventes é praticamente o mesmo. Na medida em que as amostras são resfriadas (a uma taxa de  $0,5$  °C  $\text{min}^{-1}$ ), os ângulos de rotação óptica são progressivamente e ligeiramente elevados até as temperaturas de  $24,3$  e  $27$  °C, respectivamente, para  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$ . Estas são as temperaturas críticas, a partir das quais inicia-se o processo de transição de novelos aleatórios para duplas hélices e, daí em diante, os ângulos de rotação óptica aumentam drasticamente com a diminuição de temperatura. A mais alta temperatura observada para a transição *coil-helix* em  $\text{D}_2\text{O}$  (cerca de  $3$  °C mais alta do que em  $\text{H}_2\text{O}$ ) indica, em princípio, que a conformação helicoidal da  $\kappa$ -C inicia sua formação em energias térmicas mais elevadas e, por isso, ela seria mais estável termodinamicamente. Baseando-se em medidas de difração de raios-X, Millane e colaboradores<sup>24</sup> identificaram a presença de uma ligação de hidrogênio entre os grupos OH-2 e OH-6 do resíduo  $\beta$ -D-galactose que contribui fortemente para a estabilização da forma em dupla hélice da  $\kappa$ -C. A intensidade da ligação de hidrogênio em  $\text{D}_2\text{O}$  é maior e, como os prótons hidroxílicos estão em constante processo de trocas químicas,<sup>25-27</sup> é esperado que a maior parte dos grupos OH da  $\kappa$ -C estejam na forma deuterada. Assim, em  $\text{D}_2\text{O}$  há uma estabilização adicional da  $\kappa$ -C na forma helicoidal em relação à esta conformação no solvente  $\text{H}_2\text{O}$  levando à maior estabilização térmica dos géis.

Após a etapa de resfriamento até uma temperatura mínima de aproximadamente  $10$  °C, os géis foram aquecidos (na mesma taxa do

resfriamento) até o término do ciclo térmico. Neste processo pode ser observada uma grande e característica histerese térmica em ambos os solventes, a qual é simplesmente uma consequência da estabilidade adicional que as duplas hélices adquirem após a formação dos agregados de duplas hélices e formação da estrutura do gel. Mais uma vez, há uma temperatura mais elevada em cerca de 3 °C para a transição gel-sol no solvente D<sub>2</sub>O.

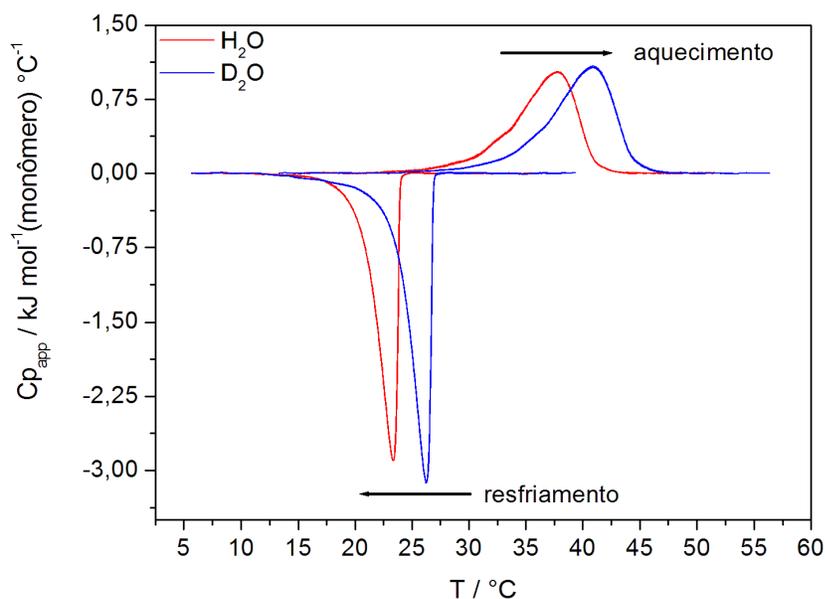
As curvas de aquecimento possuem dois “ombros”, provavelmente relacionados com o aumento da energia térmica que promove reorientações dos segmentos os quais estavam aprisionados (impedidos) de assumirem conformações helicoidais devido aos processos agregativos de outras partes das cadeias. Pode-se especular que os dois ombros estão associados à transições *coil-helix* com duas diferentes barreiras de energia. O ombro observado em temperatura mais elevada precede a degradação das zonas de junção e promove um ganho de conteúdo quiral devido ao aumento de mais segmentos em conformação helicoidal. Após este ombro, a energia térmica é suficientemente elevada para promover a desestabilização da conformação helicoidal levando à uma súbita queda do ângulo de rotação óptico até atingir os valores do início do ciclo térmico.

Os valores de  $G'$  foram obtidos a 20 °C (Figura 3.2) e nesta temperatura os ângulos de rotação óptica (curva de resfriamento símbolos abertos na Figura 3.3) são praticamente os mesmos em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O, o que significa que as diferenças de conteúdo helicoidal entre os dois solventes são insignificantes. Assim, a hipótese de os géis de  $\kappa$ -C serem mais fortes (maiores valores de  $G'$ ) devido ao maior conteúdo helicoidal não se aplica. As diferenças nos módulos de armazenamento entre os géis pode ser associado á diferenças na densidade de agregados de duplas hélices o que parece ser maior em D<sub>2</sub>O. Oakenfull e Scott<sup>28</sup> encontraram que géis de gelatina formados em D<sub>2</sub>O apresentam maior

densidade de reticulações mesmo quando o conteúdo helicoidal é o mesmo dos géis em H<sub>2</sub>O. Baseando-se em argumentos termodinâmicos estes autores concluíram que o comprimento dos segmentos de proteína na forma helicoidal em D<sub>2</sub>O são mais curtos do que em H<sub>2</sub>O. Contudo, em água pesada, este efeito é compensado pelo maior número de pontos de reticulação e, conseqüentemente, maiores módulos elásticos. As conclusões dos autores são consistentes com os nossos resultados obtidos para κ-C e assim, podemos especular que os maiores valores de  $G'$  para os géis em D<sub>2</sub>O estão associados à maior densidade de zonas de junção.

### 3.3.3. *Varreduras calorimétricas diferenciais*

As medidas de rotação óptica fornecem a fração relativa de conteúdo helicoidal, porém, não pode fornecer o conteúdo de agregados de duplas hélices. As diferenças de 3 °C observada para ambos os processos (sol-gel/gel-sol) podem estar associadas à maior estabilidade da κ-C na forma de duplas hélices em água deuterada e também à maior energia necessária para romper os agregados. As entalpias para transição sol-gel em ambos os solventes (na concentração de unidade dissacarídea  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $[K^+] \cong 10 \text{ m mol L}^{-1}$ ) foram determinadas por calorimetria de alta sensibilidade e os resultados são apresentados no gráfico da Figura 3.4 e na Tabela 3.1.



**Figura 3.4:** Varreduras micro-calorimétricas para o processo de transição sol-gel da  $\kappa$ -C em  $\text{H}_2\text{O}$  (linhas vermelhas) e em  $\text{D}_2\text{O}$  (linhas azuis), na concentração de unidade dissacarídea  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sem adição de KCl. As linhas correspondem à média de três corridas de medidas independentes.

**Tabela 3.1:** Entalpia molar (unidade dissacarídea) e temperatura máxima dos picos (micro-DSC) em comparação com as temperaturas de transição obtidas por rotação óptica, associadas às transições sol-gel e gel-sol. Os valores de calorimetria correspondem à média de três medidas independentes. Em ambas as técnicas experimentais, a concentração de unidade dissacarídea foi de  $15,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  sem adição de KCl.

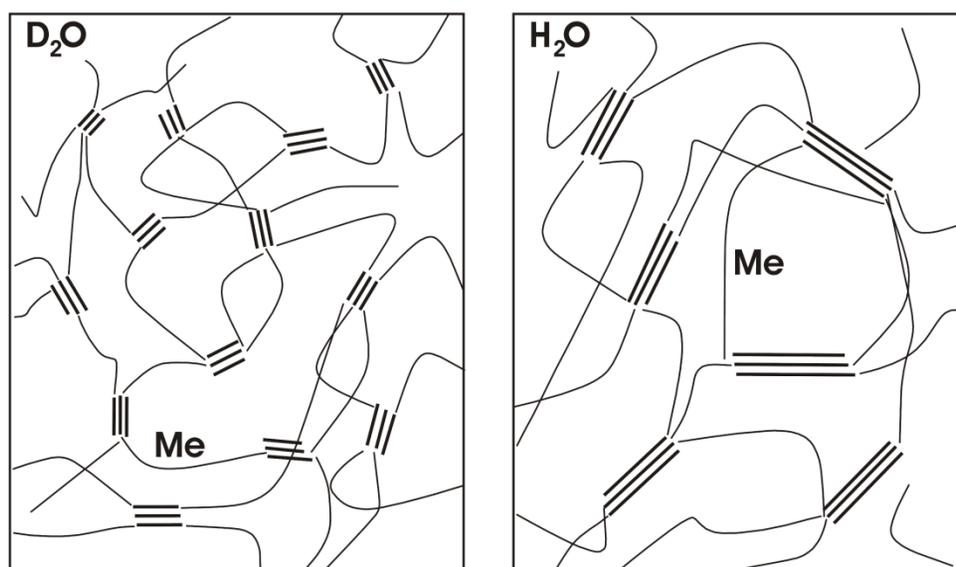
	$\Delta H / (kJ mol^{-1})$		Temperatura da transição / °C			
			Micro-DSC		Rotação óptica	
Solvente	Sol-gel	Gel-sol	Sol-gel	Gel-sol	Gel-sol	Sol-gel
$\text{H}_2\text{O}$	$-6.76 \pm 0.04$	$6.86 \pm 0.9$	$23.34 \pm 0.01$	$37.74 \pm 0.05$	24	37
$\text{D}_2\text{O}$	$-7.89 \pm 0.09$	$7.6 \pm 0.5$	$26.29 \pm 0.01$	$40.89 \pm 0.01$	26	39

Como mostrado na Fig. 3.4, as diferenças de cerca de 3 °C e as características histereses térmicas também aparecem nas varreduras calorimétricas. O eixo das ordenadas da Figura 3.4 corresponde à capacidade calorífica aparente e foram obtidas a partir da subtração dos valores dos respectivos solventes puros. Portanto, seus valores são o resultado dos processos que ocorrem apenas com as moléculas do soluto em H<sub>2</sub>O ou em D<sub>2</sub>O. A reversibilidade térmica e energética do ciclo térmico é bastante evidente com ligeiras diferenças (< 3%) entre as energias envolvidas nos dois sentidos (aquecimento/resfriamento). Em ambos os solventes ocorre uma súbita liberação de energia durante o resfriamento a partir de uma temperatura específica. Este fluxo energético corresponde à transição conformacional de novelos aleatórios em duplas hélices e a posterior agregação em zonas de junção. A temperatura em que este processo ocorre é mostrada na Tab. 3.1 e é identificada como a transição sol-gel. Há uma ligeira diferença entre os valores de temperatura obtidos por micro-DSC e por rotação óptica. A precisão dos valores obtidos por calorimetria são bem mais elevadas do que por polarimetria, particularmente para a transição sol-gel. Como são observados apenas um pico (exotérmico) durante o resfriamento, pode-se, mais uma vez inferir que os processos de formação de dupla hélice e agregação em zonas de junção, ocorrem com tempos característicos muito similares não sendo possível separá-los.

As diferenças de  $\Delta H$ , cerca de  $\cong 1,13 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o processo (sol-gel), podem ser usados para sondar as diferenças advindas da substituição isotópica que são mais energéticas em D<sub>2</sub>O. Essa diferença de entalpia está associada, principalmente, à mudança conformacional das cadeias de novelos para duplas hélices e à agregação em zonas de junção. Os valores mais energéticos em D<sub>2</sub>O sugerem que durante a formação de duplas hélices são liberadas maiores

quantidades de energia. Já para romper as zonas de junção e duplas hélices gasta-se em média,  $1,13 \text{ kJ mol}^{-1}$  a mais em  $\text{D}_2\text{O}$  comparativamente ao mesmo processo em  $\text{H}_2\text{O}$ . Este resultado reforça as sugestões prévias de que o estado helicoidal em  $\text{D}_2\text{O}$  é mais estável energeticamente do que em  $\text{H}_2\text{O}$  em cerca de 15%.

Os resultados obtidos usando as três técnicas concordam entre si e eles permitem propor um mecanismo para a gelificação da  $\kappa\text{-C}$  em água leve e pesada como mostrado no esquema da Figura 3.5.



**Figura 3.5:** Comparação esquemática dos géis formados em  $\text{D}_2\text{O}$  e em  $\text{H}_2\text{O}$ . Os elementos de reticulação são associados aos agregados de duplas hélices. As massas molares médias entre as junções ( $M_e$ ) são mostradas esquematicamente.

As mais intensas ligações de hidrogênio formadas em  $\text{D}_2\text{O}$  induzem uma maior formação de duplas hélices e de pontos de agregação. A velocidade de gelificação é nitidamente mais rápida em  $\text{D}_2\text{O}$  do que em  $\text{H}_2\text{O}$  (curvas cinéticas não mostradas). A proposta de gelificação que fazemos é a de que em  $\text{D}_2\text{O}$  há uma maior formação de sítios de reticulação porém, com comprimentos menores de maneira tal que o conteúdo quiral nos dois géis são

idênticos. Assim, as diferenças observadas nos géis são devidas à maior quantidade de junções e também de junções mais fortes.

### 3.4. Conclusões

Os géis de  $\kappa$ -C em D<sub>2</sub>O apresentam mais altos valores dos módulos elásticos ( $G'$ ) independentemente da concentração do polissacarídeo e da concentração de íons específicos ( $K^+$ ) que induzem agregação. A partir de medidas de rotação óptica foi demonstrado que na temperatura de estudo dos géis o conteúdo quiral (duplas hélices) são praticamente os mesmos em água leve e pesada. No entanto, foi encontrada uma diferença característica nas transições sol-gel e gel-sol, sempre mais elevadas em cerca de 3 °C quando o solvente era D<sub>2</sub>O. Além disso, as energias envolvidas nas transições entre as formas enovelada e helicoidal são mais energéticas em D<sub>2</sub>O. Isto é, a formação de duplas hélices libera mais energia em água pesada e também requerem mais energias para se romperem (> 15%) do que os mesmos processos em H<sub>2</sub>O. As diferenças observadas nos géis puderam ser atribuídas ao maior número de pontos de junção nos géis formados em D<sub>2</sub>O e também às ligações entre os agregados mais fortes neste solvente.

Por fim, conclui-se que a substituição isotópica induz significativas diferenças macroscópicas na solução do polissacarídeo  $\kappa$ -C. As pequenas diferenças na intensidade das ligação de hidrogênio entre H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O são amplificados pela cooperatividade da transição *coil-helix* e foram aqui mostradas pela primeira vez.

### 3.5. Referências

- (1) Soper, a.; Benmore, C. Quantum Differences between Heavy and Light Water. *Physical Review Letters* **2008**, *101*, 1-4.
- (2) Scharlin, P.; Battino, R. Solubility of 13 nonpolar gases in deuterium oxide at 15-45°C and 101.325 kPa. Thermodynamics of transfer of nonpolar gases from H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O. *Journal of Solution Chemistry* **1992**, *21*, 67-91.
- (3) Ivanov, E. V.; Lebedeva, E. J.; Abrosimov, V. K.; Ivanova, N. G. Structural contribution to the effect of hydrophobic hydration of noble gases. *Journal of Structural Chemistry* **2005**, *46*, 253-263.
- (4) Lo Nostro, P.; Lopes, J. R.; Ninham, B. W.; Baglioni, P. Effect of Cations and Anions on the Formation of Polypseudorotaxanes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 2166-2174.
- (5) Dreiss, C. A.; Cosgrove, T.; Newby, F. N.; Sabadini, E. Formation of a supramolecular gel between alpha-cyclodextrin and free and adsorbed PEO on the surface of colloidal silica: effect of temperature, solvent, and particle size. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, *20*, 9124-9.
- (6) Dougan, L.; Koti, A. S. R.; Genchev, G.; Lu, H.; Fernandez, J. M. A single-molecule perspective on the role of solvent hydrogen bonds in protein folding and chemical reactions. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2008**, *9*, 2836-47.
- (7) Makhatadze, G. I.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. Solvent isotope effect and protein stability. *Nature Structural Biology* **1995**, *2*, 852-855.
- (8) Cinelli, S.; Onori, G.; Santucci, a Solvent isotope effects on the phase-transition properties of lipid bilayers. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2001**, *20*, 297-302.
- (9) Nomura, T.; Akazawa, T. Enzymic Mechanism of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds: IV. De Novo Synthesis of Sucrose 6-Phosphate Synthetase in Scutellum. *PLANT PHYSIOLOGY* **1973**, *51*, 979-981.
- (10) Cardoso, M. V. C.; Carvalho, L. V. C.; Sabadini, E. Solubility of Carbohydrates in Heavy Water. *Carbohydrate Research* **2012**.
- (11) Sabadini, E.; Cosgrove, T.; Egídio, F. D. C. Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O: a comparative study. *Carbohydrate research* **2006**, *341*, 270-4.

- (12) Ericsson, C. A.; Söderman, O.; Garamus, V. M.; Bergström, M.; Ulvenlund, S. Effects of Temperature, Salt, and Deuterium Oxide on the Self-Aggregation of Alkylglycosides in Dilute Solution. 1. n-Nonyl- $\beta$ -D-glucoside. *Langmuir* **2004**, *20*, 1401-1408.
- (13) Ramakrishnan, S.; Prud'homme, R. K. Effect of solvent quality and ions on the rheology and gelation of  $\kappa$ -carrageenan. *Journal of Rheology* **2000**, *44*, 885.
- (14) Rochas, C.; Rinaudo, M. Calorimetric determination of the conformational transition of kappa carrageenan. *Carbohydrate Research* **1982**, *105*, 227-236.
- (15) Viebke, C.; Piculell, L.; Nilsson, S. On the Mechanism of Gelation of Helix-Forming Biopolymers. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4160-4166.
- (16) MORRIS, E. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology* **1980**, *138*, 349-362.
- (17) Morris, E. R.; Rees, D. A.; Norton, I. T.; Goodall, D. M. Calorimetric and chiroptical evidence of aggregate-driven helix formation in carrageenan systems. *Carbohydrate Research* **1980**, *80*, 317-323.
- (18) Núñez-Santiago, M. D. C.; Tecante, A. Rheological and calorimetric study of the sol-gel transition of  $\kappa$ -carrageenan. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *69*, 763-773.
- (19) Ramakrishnan, S.; Prud'homme, R. . Behavior of  $\kappa$ -carrageenan in glycerol and sorbitol solutions. *Carbohydrate Polymers* **2000**, *43*, 327-332.
- (20) Flory, J.; Weaver, E. S. Helix-Coil Transitions in Dilute Aqueous Collagen Solutions. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 4518-4525.
- (21) Chronakis, I. S.; Piculell, L.; Borgström, J. Rheology of kappa-carrageenan in mixtures of sodium and cesium iodide: two types of gels. *Carbohydrate Polymers* **1996**, *31*, 215-225.
- (22) Goodwin, J. W.; Hughes, R. W. *Rheology for Chemists: An Introduction*; Royal Society of Chemistry, 2000; p. 300.
- (23) Tanaka, F. Thermoreversible Gelation Driven by Coil-to-Helix Transition of Polymers. *Macromolecules* **2003**, *36*, 5392-5405.
- (24) Millane, R. P.; Chandrasekaran, R.; Arnott, S.; Dea, I. C. M. The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research* **1988**, *182*, 1-17.
- (25) Fabri, D.; Williams, M. a. K.; Halstead, T. K. Water T2 relaxation in Sugar Solutions. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 889-905.

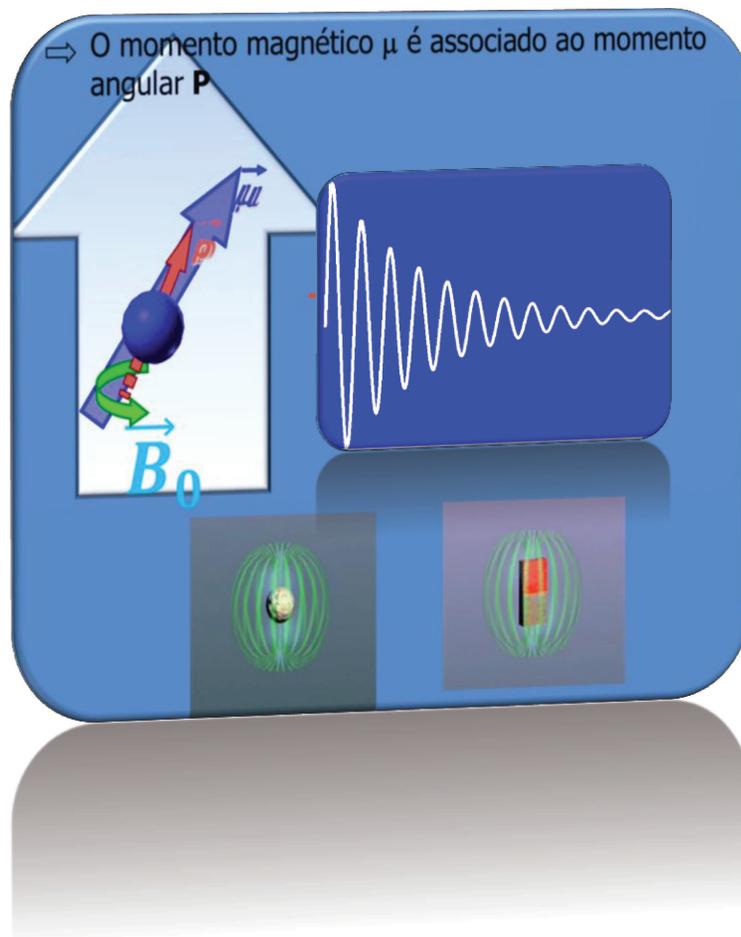
- (26) Sabadini, E.; do Carmo Egídio, F.; Fujiwara, F. Y.; Cosgrove, T. Use of Water Spin-spin Relaxation Rate to Probe the Solvation of Cyclodextrins in Aqueous Solutions. *The journal of physical chemistry. B* **2008**, *112*, 3328-3332.
- (27) Hills, B. P.; Cano, C.; Belton, P. S. Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. *Macromolecules* **1991**, *24*, 2944-2950.
- (28) Oakenfull, D.; Scott, A. Gelatin gels in deuterium oxide. *Food Hydrocolloids* **2003**, *17*, 207-210.



# Capítulo 4

---

## INTRODUÇÃO AOS PRINCÍPIOS BÁSICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR





## *Apresentação do fenômeno e da espectroscopia RMN*

O fenômeno de ressonância magnética nuclear (RMN) foi inicialmente observado e reportado em 1946, independentemente pelos grupos formados por Purcell e colaboradores<sup>1</sup> e por Felix Bloch e colaboradores,<sup>2</sup> trabalhando nas extremos leste e oeste dos Estados Unidos. Porém, foi Bloch<sup>4</sup> o primeiro a descrever o fenômeno de RMN através de um enfoque semi-clássico propondo as famosas equações que levam seu nome.

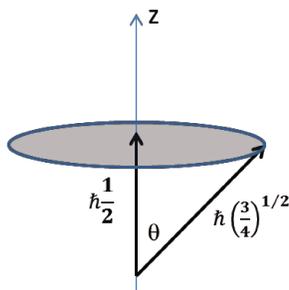
Desde então um vasto desenvolvimento teórico e experimental vem sendo alcançado. Ainda em 1961, outra importante contribuição foi dada por Anatole Abragam em seu tratado *Principles of Nuclear Magnetism*.<sup>3</sup> Desde então esta obra têm servido de base para trabalhos em RMN de cunho teórico e experimental. A espectroscopia de RMN, assim como outras espectroscopias, baseiam-se na interação da radiação eletromagnética com a matéria, neste caso, os spins nucleares. No caso da RMN, a frequência da radiação situa-se na região de rádio-frequências (r.f.)  $\nu$  (em Hz) ou  $\omega$  ( $\text{rad s}^{-1}$ ). Uma vez que a energia da radiação,  $h\nu$  ou  $h\omega$ , coincide com a diferença de energia entre os níveis fundamental e excitado dos spins nucleares, as transições entre os níveis energéticos ocorrem com absorção de fótons na região de r.f. A volta dos spins ao estado fundamental ocorre preponderantemente por processos de relaxação não radioativos,<sup>3</sup> os quais são descritos pelos tempos de relaxação longitudinal (ou spin-rede) e transversal (ou spin-spin). Estes tempos de relaxação caracterizam a cinética de volta dos spins ao estado fundamental e estão relacionados às interações dipolares e quadrupolares, as quais são moduladas pelos movimentos moleculares de rotação e translação. Assim, através do estudo dos tempos de relaxação que, neste trabalho focaram-se

basicamente na relaxação transversal, é possível estudar processos dinâmico-estruturais dos sistemas formados por água-carboidratos.

Para tanto, uma breve introdução dos princípios básicos da ressonância magnética nuclear e de seus desdobramentos como relaxometria no domínio do tempo, são apresentados nas próximas seções.

#### *4.1. A origem do sinal e a descrição do fenômeno de RMN*

A propriedade fundamental em RMN é o spin nuclear, ao qual está associado o momento angular de spin nuclear,  $I\hbar$ . Ao contrário do sugerido pelo nome, o *spin* não é devido ao *giro*, mas trata-se de uma propriedade fundamental da natureza que tem sua origem em efeitos quanto-relativísticos<sup>5</sup> das partículas elementares, quarks, que constituem os prótons e nêutrons do núcleo, e dos léptons no caso dos elétrons. O módulo do momento angular de spin nuclear é dado por  $|I| = [I(I + 1)]^{1/2}\hbar$ , enquanto que sua componente segundo o eixo *Z* é definida por um segundo número quântico,  $I_z = M_I\hbar$ , sendo  $M_I$  o número quântico magnético de spin nuclear. Os números quânticos  $I$  e  $M_I$  são quantizados e podem assumir os seguintes valores;  $M_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$ , sendo que  $I$  pode ter valores inteiros e meio-inteiros, por exemplo,  $1/2$  para os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $3/2$  para  $^2\text{H}$ ,  $5/2$  para  $^{27}\text{Al}$ , somente para citar alguns. A Figura 4.1 apresenta um esquema do vetor  $\mathbf{I}$  e sua componente segundo eixo *z*.



**Figure 4.1.** Representação esquemática do momento angular de spin,  $I$ , e de sua componente segundo o eixo  $z$ , formando entre si um ângulo  $\theta = \cos^{-1} \left( \frac{I_z}{|I|} \right) = 54,74^\circ$ . No esquema é representado um spin com  $I = \frac{1}{2}$  no estado  $M_I = +\frac{1}{2}$ , e o cone formado por  $I$  ao redor do eixo  $z$ .

Associado ao momento angular de spin,  $I\hbar$ , existe um momento de dipolo magnético  $\mu$ , dado pela equação:

$$\mu = g_N \frac{e}{2m_N} \mathbf{I} \quad (4.1')$$

$$\mu = \gamma \mathbf{I} \quad (4.1)$$

em que,  $\mu$  é o vetor momento de dipolo magnético de spin nuclear e é colinear ao vetor  $\mathbf{I}$ ,  $e$  é a carga elementar,  $g_N$  é o fator  $g$  nuclear,  $m_N$  é a massa nuclear, e  $\gamma$  é a razão giromagnética.

Na presença de um campo magnético externo homogêneo e estático,  $\mathbf{B}_0$ , convencionalmente definido como apontando na direção 'z', a degenerescência dos estados quânticos é rompida e a energia do sistema se divide em  $(2I + 1)$  níveis cujas energias serão determinadas pelo valor de  $M_I$ ,  $E = -\mu \cdot \mathbf{B}_0 = -\gamma I_z \cdot B_0 = -\gamma M_I \hbar B_0$

Este fenômeno é chamado de efeito Zeeman nuclear, e as transições entre os seus níveis constituem os fenômenos estudados em RMN.

Na presença do campo  $B_0$  a diferença de energia entre os estados quânticos de spin  $\frac{1}{2}$  e  $-\frac{1}{2}$  é dado por,  $\Delta E = \gamma \hbar B_0$ , e as transições 'permitidas' pelas regras

de seleção são:  $\Delta M_I = \pm 1$ . Neste caso a frequência da radiação de r.f. envolvida nas transições é dada por

$$h\nu = \gamma\hbar B_0 \quad (4.2)$$

$$\omega_0 = \frac{\nu_0}{2\pi} = \gamma B_0 \quad (4.2')$$

$\nu_0$  e  $\omega_0$  são a frequência da radiação em Hz e em  $\text{rad s}^{-1}$ , respectivamente.

Do ponto de vista clássico, a interação do campo  $\mathbf{B}_0$  com os momentos de dipolo  $\boldsymbol{\mu}$  gera um torque,  $\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0$ , o qual faz os momentos de dipolo magnéticos precessionarem o eixo  $z$  com uma velocidade angular que é igual à taxa de variação do momento angular de spin com o tempo,  $\hbar(d\mathbf{I}/dt)$ . Assim, usando Eq. (4.1) obtêm-se,

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma(\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0) \quad (4.3)$$

A frequência de precessão dos momentos de dipolo magnético descreve um cone de precessão formado pelo seu giro ao redor do eixo  $z$  como mostrado esquematicamente na Figura 4.1. Esta frequência de precessão,  $\omega_0 = -\gamma B_0$ , é chamada de *frequência de Larmor*, e o sentido de giro é aquele descrito pelas regras do produto cruzado, ou regra da mão direita. No caso do núcleo  $^1\text{H}$ , que possui  $\gamma > 1$ , o sentido é o anti-horário.

## 4.2. *Fenômeno de ressonância do ponto de vista clássico*

Na presença de um campo magnético de intensidade  $B_1$ , oscilante com frequência  $\omega_1$ , e orientado perpendicularmente ao eixo  $z$ , o campo magnético ‘sentido’ pelos spins será o campo resultante deste juntamente com o campo

estático  $B_0$ . O tratamento deste processo é mais bem compreendido no ‘sistema de coordenadas girante’ em que o sistema de referência rotaciona o eixo  $z$  com uma frequência,  $-\omega$ , em relação ao sistema de referência do laboratório. Daqui por diante, ao invés de considerar os spins isolados, será considerada a magnetização do *bulk*, ou magnetização resultante,  $\mathbf{M}_0$ , que corresponde ao vetor momento de dipolo magnético macroscópico que é a soma vetorial das contribuições de todos os spins alinhados paralelamente e anti-paralelamente ao campo  $\mathbf{B}_0$ . Neste sistema girante o movimento dos momentos de dipolo é dado pela equação

$$\frac{\partial \mathbf{M}}{\partial t} = \gamma \mathbf{M} \times \left( \mathbf{B}_0 + \frac{\boldsymbol{\omega}}{\gamma} \right) \quad (4.4)$$

Esta equação tem a mesma forma da Eq. (4.3), porém o campo  $\mathbf{B}_0$  é substituído pelo campo efetivo,  $\mathbf{B}_e = \mathbf{B}_0 + (\boldsymbol{\omega}/\gamma)$ , sendo, portanto, a soma do campo estático com um campo fictício  $(\boldsymbol{\omega}/\gamma)$ . Escolhendo-se um campo rotante,  $\boldsymbol{\omega} = -\gamma \mathbf{B}_0$ , girando com a mesma velocidade angular que os momentos de dipolo, resulta-se para este sistema que  $\partial \mathbf{M}/\partial t = 0$ , e a magnetização torna-se um vetor fixo no sistema de referência girante.

Supondo a aplicação de um campo,  $B_1$ , perpendicular ao eixo  $z$  e girando ao redor dele com uma velocidade angular  $\omega$ , o campo magnético resultante ou, efetivo, é dado pela equação,

$$\mathbf{B}_{ef} = \left( B_0 + \frac{\omega}{\gamma} \right) \mathbf{k} + H_1 \mathbf{i} \quad (5)$$

Em que  $\mathbf{k}$  e  $\mathbf{i}$  são os vetores unitários dos eixos  $z$  e  $x$ , respectivamente. Define-se a frequência  $\omega_1 \equiv -\gamma B_1$ , em que a magnitude  $B_1$  no sistema girante é definida como positiva e  $\omega_1$  tem sinal de  $-\gamma$ . A magnitude do campo efetivo é

$$B_e = \left[ \left( B_0 + \frac{\omega}{\gamma} \right)^2 + B_1^2 \right]^{\frac{1}{2}} = -\frac{a}{\gamma} \quad (4.6)$$

Onde  $a = -[(\omega_0 - \omega)^2 + \omega_1^2]^{\frac{1}{2}} \frac{\gamma}{|\gamma|}$ .

O ângulo  $\theta$  formado entre  $\mathbf{B}_{ef}$  e o campo aplicado  $\mathbf{B}_0$ , o qual pode variar de 0 a  $\pi$ , é dado por:

$$\tan \theta = \frac{B_1}{B_0 + \left(\frac{\omega}{\gamma}\right)} = \frac{\omega_1}{\omega_0 - \omega} ,$$

$$\sin \theta = \frac{\omega_1}{a} , \quad \cos \theta = \frac{\omega_0 - \omega}{a} ,$$

No sistema de referência girante  $S'$ , o movimento dos momentos magnéticos  $\mathbf{M}$  corresponde à precessão de Larmor ao redor do campo efetivo,  $\mathbf{H}_e$ , com uma frequência angular igual a  $a = -\gamma H_e$ .

Num instante ( $t = 0$ ) o momento magnético está alinhado a  $\mathbf{B}_0$ , no tempo  $t$  após a aplicação do campo perpendicular o ângulo  $\theta$  será

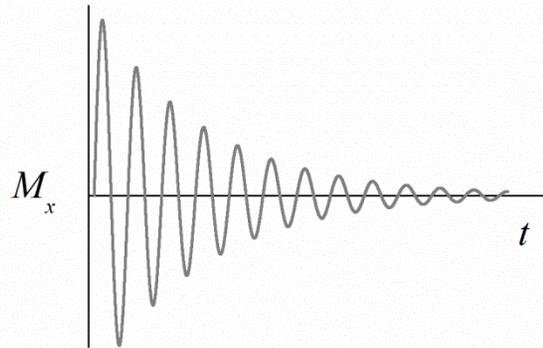
$$\cos \alpha = \cos^2 \theta + \sin^2 \theta \cos at \quad (4.7)$$

É importante salientar que geralmente o campo estático apresenta magnitude muito maior do que o campo transversal oscilante,  $|\mathbf{B}_0| \gg |\mathbf{B}_1|$ , e em condições fora da ressonância,  $B_1$  é desprezível. O deslocamento da magnetização em relação ao eixo  $z$  só será apreciável se  $|\omega - \omega_0|$  for da mesma ordem que  $|\omega_1|$ . Esta é justamente a condição de ressonância e, uma vez satisfeita, os momentos de dipolo serão deslocados consideravelmente do eixo  $z$ .

### 4.3. O Espectro de RMN

Uma vez aplicado o pulso de rádio frequência tal que  $\omega_1 \cong \omega_0$ , a magnetização,  $M_0$ , é deslocada e focalizada no plano  $x$ - $y$ , girando ao redor de  $z$  com a frequência de Larmor,  $\omega_0$ , e dando origem às componentes da magnetização nos eixos  $x$  e  $y$ ,  $M_x$  e  $M_y$ , respectivamente. Este movimento oscilatório da magnetização, de acordo com a lei de indução Faraday-Lenz, irá induzir uma corrente e uma diferença de potencial elétrico (DDP) numa bobina adequadamente posicionada no plano  $x$ - $y$ . Por conseguinte, este sinal elétrico apresentará a mesma frequência  $\nu_0 = \omega_0/2\pi$  (geralmente na ordem de  $10^6 - 10^8$  Hz). Para spins idênticos, não interagentes, num campo magnético homogêneo, o sinal elétrico apresenta apenas uma frequência característica. Numa amostra real, os spins não são completamente isolados e, além disso, devido a processos dinâmicos como movimentos moleculares de difusão rotacional, translações e reorientações moleculares, há a indução de campos transversais  $B_x(t)$  e  $B_y(t)$  que oscilam com o tempo característico dos movimentos moleculares,  $\tau_c$ . Como consequência, a magnetização transversal e, por conseguinte, o sinal elétrico na bobina receptora, executa um movimento oscilatório amortecido fazendo com que a intensidade do sinal *relaxe* a zero após um tempo característico chamado de tempo de relaxação transversal,  $T_2$ . Além dos campos magnéticos oscilantes gerados pelos movimentos moleculares brownianos, há outra fonte de perda de coerência (relaxação transversal) dos spins ocasionada pela não homogeneidade de campo sentido pela amostra. Este último fator pode ser anulado, ou reduzido drasticamente através da sequência de pulsos CPMG. Já a perda de coerência provocada pelos movimentos aleatórios das moléculas não pode ser recuperada devido à aleatoriedade dos movimentos moleculares e, portanto,

trata-se de um processo irreversível. O gráfico da Figura 4.2 mostra esquematicamente um sinal típico de RMN para um conjunto de spins idênticos num campo homogêneo. Este sinal é chamado de decaimento livre da indução do inglês *free induction decay* (FID). Além da frequência característica das oscilações,  $\omega_0 = \nu_0/2\pi$ , a intensidade do sinal decai exponencialmente com uma constante de tempo característica,  $R_2 \equiv 1/T_2^*$ , a taxa de relaxação transversal, de acordo com a Equação (4.8). A taxa de relaxação transversal efetiva,  $\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \text{não homogeneidade de campo}$ .



**Figura 4.2:** Decaimento livre da indução (FID) da componente  $x$  da magnetização em função do tempo, para spins idênticos, com frequência  $\omega_0$ , e tempo de relaxação  $T_2$ .

$$M_x(t) = M_z(0) \sin(\omega_0 t) e^{-t/T_2} \quad (4.8)$$

Em que  $M_z(0)$  é a magnetização em  $t = 0$  s. Na verdade, não é possível medir experimentalmente a magnetização no instante  $t = 0$  s, mas somente após um intervalo de tempo da ordem de  $\mu\text{s}$  após a aplicação do pulso transversal.

Vale salientar que, além da componente  $x$  da magnetização, a componente no eixo  $y$  também é descrita similarmente à  $x$ ,  $M_y(t) = M_z(0) \cos(\omega_0 t) e^{-t/T_2}$ , e ambas compõem o sinal para a posterior obtenção do espectro de RMN. A componente em  $y$  é descrita por,

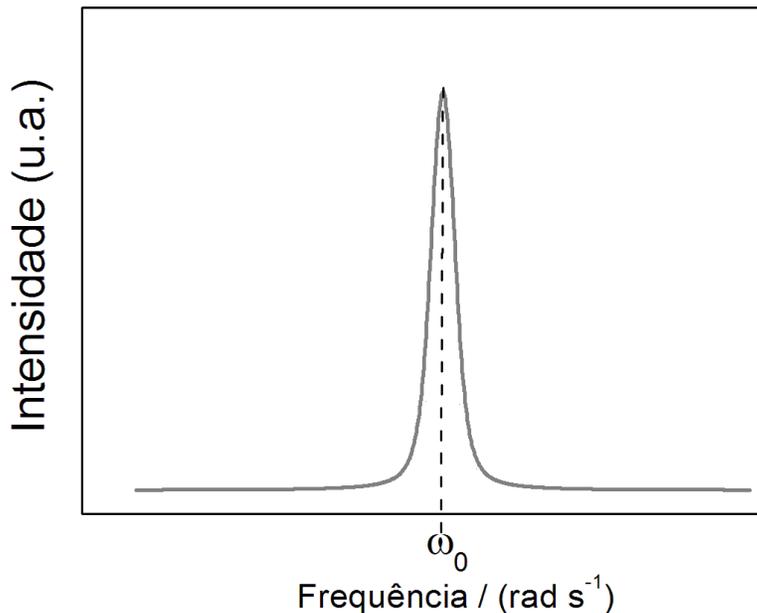
$$M_y(t) = M_z(0) \cos(\omega_0 t) e^{-t/T_2} \quad (4.9)$$

Esta última equação apresenta uma diferença de fase,  $\phi = \pi/2$ , em relação a  $M_x(t)$ . O sinal elétrico analógico que segue a função descrita pelas Equações (4.8 e 4.9) é digitalizado e, através da transformada de Fourier deste sinal, o espectro  $S(\omega)$ , é obtido como uma Lorenziana de acordo com a equação (4.10). Na verdade, a etapa de digitalização do sinal de RMN constitui-se uma etapa complexa e em alguns casos, uma enorme quantidade informação, pontos digitais, é requerida, armazenada e processada por microprocessadores. Uma excelente descrição do fenômeno de RMN incluindo partes experimental e teórica, é apresentada nos cinco primeiros capítulos por Levitt.<sup>5</sup>

$$S(\omega) = \int_0^{\infty} S(t) e^{-i\omega t} dt \quad (4.10)$$

em que  $S(t)$  é a função que descreve o sinal de RMN, ou o FID, e que contém ambas as partes, real e imaginária, do sinal analógico formado por  $M_x$  e  $M_y$ . O resultado da transformação de Fourier mostrada na Eq. (4.10) é uma Lorenziana, Equação (4.11) e sua forma funcional é apresentada na Fig. 4.3,

$$S(\omega) = \frac{1/T_2}{\left(1/T_2\right)^2 + (\omega - \omega_0)^2} \quad (4.11)$$



**Figura 4.3:** Espectro de RMN obtido a partir da transformada de Fourier do sinal do FID mostrado esquematicamente na Figura 4.2, e através da operação matemática mostrada nas Equações. 4.10 e 4.11.

A intensidade de  $M_0$  no plano  $x$ - $y$ , do ponto de vista clássico, só se torna um valor mensurável ou significativo quando a frequência da radiação,  $\omega_1$ , situa-se nas redondezas de  $|\omega - \omega_0|$ . Ou, do ponto de vista quântico, a absorção de fótons só ocorre quando a energia da rádio-frequência satisfaz a Eq. (4.2), e nesta condição, há um pico de absorção no espectro de RMN (Fig. 4.3). A largura da banda a meia altura, relaciona-se com o tempo de relaxação transversal através da equação  $\Delta\nu_{1/2} = 1/(\pi T_2)$ .<sup>5</sup>

#### 4.4. *Relaxação como fonte de informações dinâmicas*

Os processos de relaxação estão relacionados à existência de campos magnéticos dependentes do tempo,  $\mathbf{B}(t)$ , que surgem devido a dipolos e quadrupolos magnéticos e também spins eletrônicos. Reorientações

moleculares e difusão translacional provocam rápidas mudanças nas posições relativas dos centros interagentes com respeito aos núcleos observados. Devido à aleatoriedade dos movimentos moleculares, o campo  $\mathbf{B}(t)$ , e a correspondente perturbação do Hamiltoniano  $\mathcal{H}_p(t)$ , são zerados com o tempo. O primeiro tratamento teórico para descrição da relaxação nuclear magnética mediada pelos movimentos moleculares foi desenvolvida por Bloembergen e colaboradores<sup>6</sup> através da teoria por eles formulada e chamada teoria BPP devido a (Bloembergen, Purcell e Pound).

#### 4.4.1. *Relaxação Longitudinal*

Componentes transversais dos campos,  $B_x(t)$  e  $B_y(t)$ , que apresentam componentes da transformada de Fourier na mesma frequência de Larmor dos spins,  $\omega_0$ , podem induzir transições entre os estados  $\alpha$  ( $M_I = +\frac{1}{2}$ ) e  $\beta$  ( $M_I = -\frac{1}{2}$ ), da mesma forma que os pulsos de rádio frequências  $B_1$ , porém em magnitude muito inferior. Após um pulso de  $90^\circ$ , a ‘recuperação’ da magnetização ao longo do eixo  $z$ , é regida pela seguinte equação de decaimento

$$M_z = M_0 (1 - e^{t/T_1}) \quad (4.12)$$

Sendo a constante  $T_1$  a taxa de relaxação longitudinal ou spin-rede. Tais transições ( $\beta \rightarrow \alpha$ ) envolvem a transferência de energia entre os spins no estado excitado  $\beta$ , para a rede de spins, no estado fundamental, e *vice-versa*. Nos primórdios do RMN, este processo de transferência de energia foi inicialmente assumido como sendo para a rede de spins que formavam os retículos dos sólidos cristalinos e, por isso, a relaxação da magnetização ao

longo de  $z$  também é chamada de relaxação *spin-rede*. Campos magnéticos oscilantes, cujos valores podem ser  $\pm B_x$ , e que apresentam variações completamente aleatórias no tempo, pode ser simplifcadamente descrito por uma função do tipo

$$g(\tau) = B_x^2 e^{-\tau/\tau_c} \quad (4.13)$$

Em que  $g(\tau)$  é a função de autocorrelação dos campos oscilantes,  $B_x(t)$ , no tempo  $t = 0$  e após um intervalo de tempo  $t = 0 + \tau$ . A máxima magnitude de  $B_x(t)$  é dependente da natureza das interações dipolares.

A transformada de Fourier da função de *autocorrelação* resultará na distribuição de frequências com que os campos oscilam e é chamada de função de densidade espectral  $\tilde{J}(\omega) = B_x^2 \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$  ou simplesmente,

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (4.14)$$

A contribuição das oscilações de campo na probabilidade de transição,  $W_{\alpha\beta}$ , atinge um valor máximo quando  $\tau_c^{-1}$  situa-se nas vizinhanças de  $\omega_0$ . Nesta situação, a taxa de relaxação longitudinal atinge um máximo.

Para moléculas contendo dois spins idênticos, por exemplo, para molécula de água, no regime de rápidos movimentos moleculares,  $\tau_c^{-1} \gg \omega_0$  (*extreme narrowing limit*), a taxa de relaxação longitudinal pode ser descrita pela Equação (4.15), de acordo com Cowan<sup>7</sup>. É importante salientar que a Equação (4.15) é válida para movimentos moleculares rápidos e isotrópicos.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{10}{3} M_2 \tau_c \quad (4.15)$$

em que  $M_2 = \frac{9}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma^4}{R^6}$ , é o segundo momento da interação dipolar que contribui para a relaxação,  $\mu_0$  é a permeabilidade magnética no vácuo,  $\tau_c$  é o tempo de correlação dos movimentos roto-difusionais das moléculas,  $R$  é a distância entre os spins-1/2 dos prótons e  $\gamma$  é a razão giromagnética.

No caso de moléculas polinucleares como, por exemplo, uma molécula de glicose, sujeitos à difusão rotacional, a taxa de relaxação longitudinal pode ser descrita por

$$\frac{1}{T_1} = M_2 \tau_c \left( \frac{2/3}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{8/3}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (4.16)$$

Sendo  $\tau_c$  o tempo de correlação da difusão rotacional e  $\omega$  a frequência de precessão dos spins no campo  $B_0$ .

#### 4.4.2. *Relaxação transversal*

A relaxação transversal não envolve a volta dos spins ao estado fundamental restaurando o valor de  $M_z$ , Eq. (4.12), ela envolve, por outro lado, a perda de coerência do movimento de precessão dos spins ao redor do campo externo  $\mathbf{B}_0$ . Devido aos processos interacionais que dão origem a campos oscilantes ao longo de  $z$ , os campos locais ‘sentidos’ pelos spins flutuam em torno de um valor médio com uma frequência característica que depende dos movimentos moleculares. Como consequência, os spins precessionam  $\mathbf{B}_0$  com frequências de Larmor ligeiramente diferentes uns dos outros levando à perda de coerência após um tempo característico,  $T_2$ , e zerando a magnetização  $M_{x,y}$ . No limite de rápidos e isotrópicos movimentos moleculares, a contribuição dos

movimentos roto-difusionais para a relaxação transversal de spins em moléculas como a água pode ser descrita pela Equação (4.17),<sup>7</sup>

$$\frac{1}{T_2} = \frac{10}{3} M_2 \tau_c \quad (4.17)$$

Para moléculas polinucleares a relaxação transversal é descrita analogamente à Eq (4.16)

$$\frac{1}{T_2} = \frac{10}{3} M_2 \tau_c \left( 1 + \frac{5/3}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2/3}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (4.18)$$

porém, há uma importante diferença entre os modelos para relaxação longitudinal Eq. (4.16) e transversal Eq. (4.18), que é a contribuição de  $J(\omega = 0)$ , representado pelo termo “1” entre parênteses na Eq. (4.18). Esta característica leva a uma das principais diferenças da influência da dinâmica dos movimentos moleculares sobre  $1/T_1$  e  $1/T_2$ . A taxa de relaxação longitudinal atinge um valor máximo quando  $\tau_c^{-1} = \omega_0$ . Para as regiões  $1 > \omega_0 \tau_c^{-1}$  ou  $\omega_0 \tau_c^{-1} > 1$ , o valor de  $T_1$  volta a aumentar. Diferentemente de  $T_1$ , os valores de  $T_2$  diminuem continuamente devido à contribuição de  $J(\omega = 0)$ , até o limite de um retículo rígido em que a taxa de relaxação spin-spin atinge um valor assintoticamente mínimo sendo descrito pela equação

$$\frac{1}{T_2} \sim M_2^{1/2} \quad (4.19)$$

Neste regime de movimentos moleculares, a função de autocorreção não decai mais exponencialmente com o tempo, mas sim por um comportamento Gaussiano cujo valor da constante de decaimento é independente de  $\tau_c$ . Isto é

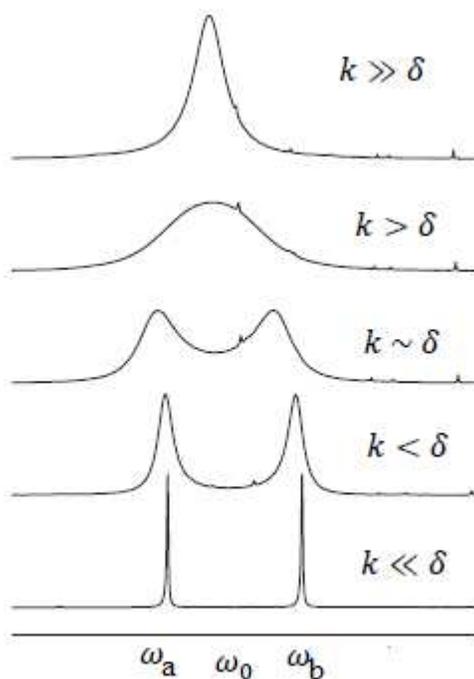
devido ao fato de que no modelo de retículo rígido a função de autocorrelação permanece praticamente constante na escala de tempo de relaxação.<sup>7</sup>

É importante salientar que as equações (4.17 e 18) descrevem a relaxação causada pelas interações dipolares moduladas pelos movimentos de difusão rotacional no limite de rápidos movimentos moleculares, ou  $\omega_0\tau_c \ll 1$ , e movimentos sem anisotropia ou orientações preferenciais. Na medida em que os movimentos moleculares tornam-se mais restritos,  $\omega_0\tau_c \approx 1$  ou  $\omega_0\tau_c \gg 1$ , as equações (4.17 e 18) não serão mais válidas, pois aproximam-se do regime do retículo rígido.

#### 4.5. Troca Química

As frequências de ressonância são bastante sensíveis ao ambiente químico, ou magnético, no qual os spins se encontram. Assim, a localização dos spins nos sítios  $a$ ,  $b$ , ..., resultará no aparecimento das correspondentes frequências de ressonância,  $\omega_a$ ,  $\omega_b$ , ..., etc. A possibilidade de os spins mudarem de ambiente é chamada de *troca química* e o modelo mais simples que descreve o fenômeno de troca química em RMN é o modelo de *dois sítios*. Neste modelo os spins que ocupam os sítios  $a$  e  $b$  de um sistema podem transferir magnetização de um sítio para o outro através de diversos processos dinâmicos como difusão molecular, rotações de grupos funcionais, interações dipolares seculares e ainda através de reações de transferência como trocas protônicas.<sup>8</sup> Se as taxas de troca,  $k$ , dos spins entre os sítios  $a$  e  $b$ , forem suficientemente lentas, tal que  $\delta = \frac{|\omega_a - \omega_b|}{2} \gg k$ , o espectro de RMN será formado por dois picos característicos centrados nas suas respectivas frequências ressonantes,  $\omega_a$  e  $\omega_b$ , igualmente espaçados do pico central

$\omega_0 = (\omega_a + \omega_b)/2$ , como se os sítios fossem isolados. A Figura 4.4 mostra um exemplo típico do espectro de RMN de um sistema de spin  $\frac{1}{2}$  possuindo dois sítios designados por  $a$  e  $b$ . Neste caso, os tempos de vida dos spins nos sítios  $a$  e  $b$ ,  $\tau_{ab} = 1/k$ , são suficientemente longos na escala de tempo envolvida em RMN,  $k \ll \delta$ , de modo que a troca química não afeta de forma significativa as frequências características dos sítios, tampouco as larguras das bandas.



**Figura 4.4:** Gráfico esquemático do efeito de troca química sobre o espectro de RMN para um sistema de spins nos sítios  $a$  e  $b$ , nos regimes lento, intermediário e rápido, de trocas químicas.

Do ponto de vista molecular, quando o tempo de vida nos sítios é suficientemente longo, a permuta dos spins entre os sítios, não contribuem para a perda coerência dos spins precessionando  $B_0$ , pois o tempo requerido entre as trocas é da mesma ordem ou maior do que o tempo de relaxação transversal.

No extremo de rápidas trocas,  $k \gg \delta$ , o tempo de vida nos sítios,  $1/k$ , é suficientemente curto na escala de tempo do RMN. Como consequência, os sítios  $a$  e  $b$  contribuem igualmente para a formação de um pico centrado em  $\omega_0 = (\omega_a + \omega_b)/2$  (vide Figura 4.4). Durante a escala de tempo da relaxação causada pelas interações dipolares, os spins efetuam vários *jumps* ou trocas de ambientes, contribuindo deste modo para acelerar os valores de  $T_2$  de forma irreversível.

Em escalas intermediárias de tempo, a taxa de troca torna-se da mesma ordem de magnitude da diferença de frequência entre os sítios,  $\delta \approx k$ , e nesta região importantes características surgem. Iniciando no regime de trocas lentas, à medida que o tempo de vida nos sítios diminui, os processos de troca química passam a contribuir mais significativamente para a relaxação transversal. Neste regime, o número de permutas entre os sítios  $a$  e  $b$  aumenta e a contribuição das trocas químicas para a perda de coerência dos spins no plano  $x$ - $y$  se torna bastante apreciável. A primeira consequência deste efeito é o aumento da largura à meia altura dos picos. A cada troca entre os sítios  $a$  e  $b$ , a perda de coerência entre os spins aumenta proporcionalmente ao tempo de residência dos spins em cada sítio,  $\sim \Delta\omega\tau_{ex}$ .<sup>9</sup> Assim, com o decorrer do tempo, a perda de coerência na presença de trocas químicas é consideravelmente acelerada em relação à relaxação unicamente causada pelas interações dipolares. No regime de rápidas trocas a largura dos picos espectrais tem um acréscimo devido às trocas químicas que depende das taxas de troca química e pode ser matematicamente expresso como  $1/(\pi T_2) + \left(\frac{1}{2k}\right) (\Delta\omega)^2$ .<sup>9</sup>

O modelo de dois sítios pode ser escrito matematicamente através das Equações de Bloch para cada um dos sítios,  $a$  e  $b$ . Para cada sítio as Equações

de Bloch (Equação A.3) se aplica. Usando a definição  $M = M_x + iM_y$ , a magnetização em cada sítio será regida por,

$$\frac{dM}{dt} + i(\omega_0 - \omega_1)M + \frac{1}{T_2}M = i\gamma B_1 M_z \quad (4.20)$$

Neste modelo de troca química, os sítios  $a$  e  $b$  são igualmente povoados e com respectivas frequências de Larmor,  $\omega_a$  e  $\omega_b$ . As permutas químicas irão transferir magnetização de  $a$  para  $b$ , e vice-versa. Assumindo simplificadaamente populações idênticas, e uma taxa de troca  $k$ , no estado estacionário as equações de Bloch tornam-se,

$$\left. \begin{aligned} \frac{dM_a}{dt} + i(\omega_a - \omega_1)M_a + \frac{1}{T_{2,a}}M_a - kM_b + kM_a &= i\gamma B_1 M_{z,a} \\ \frac{dM_b}{dt} + i(\omega_b - \omega_1)M_b + \frac{1}{T_{2,b}}M_b - kM_a + kM_b &= i\gamma B_1 M_{z,b} \end{aligned} \right\} \quad (4.21)$$

No estado estacionário as taxas de transferência do sítio  $a$  para o  $b$  e vice-versa, são iguais.

O fenômeno de troca química usando modelo de dois sítios é apresentado de forma detalhada por Bain<sup>10</sup> e é resumidamente apresentado na forma matricial no Apêndice B. No Capítulo 5 será apresentada uma generalização para aplicação de trocas químicas em soluções aquosas de carboidratos ou outros sistemas cujas populações não são idênticas e cujos tempos de relaxação intrínsecos são diferentes em cada sítio.

## 4.6. Referências Bibliográficas

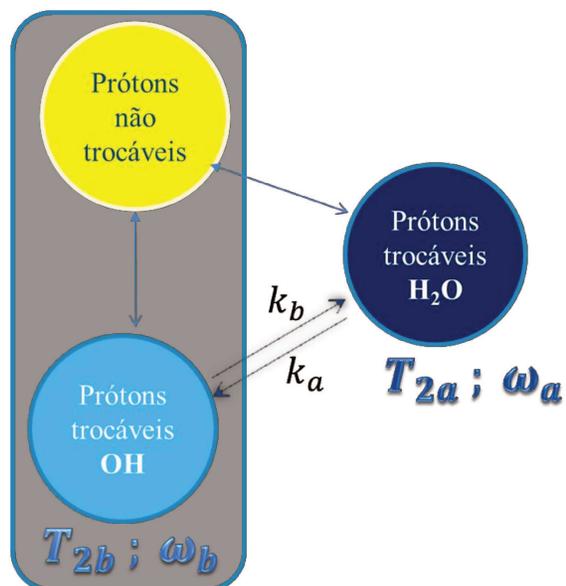
- (1) Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* **1946**, *69*, 37-38.
- (2) Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. Nuclear induction. *Physical review* **1946**, *69*, 127-127.
- (3) Abragam, A. *Principles of Nuclear Magnetism*; Oxford University Press: New York, 1961; p. 599.
- (4) Bloch, F. Nuclear induction. *Physical Review* **1946**, *70*, 460-474.
- (5) Levitt, M. H. *Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2008; Vol. 34A, p. 714.
- (6) Bloembergen, N.; Purcell, E.; Pound, R. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review* **1948**, *73*, 679-712.
- (7) Cowan, B. *Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation*; Cambridge University Press: Cambridge, 1997; p. 434.
- (8) Kowalewski, J.; Maler, L. *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*; Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
- (9) Delpuech, J.-J. Dynamics of solutions and fluid mixtures by NMR. In *Journal of Molecular Structure*; J.-J. Delpuech, Ed.; Wiley: Chichester, 1995; Vol. 405, pp. 1-17.
- (10) Bain, A. D. Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2003**, *43*, 63-103.



# Capítulo 5

---

## Dinâmica interacional de soluções aquosas de carboidratos estudadas por relaxometria 1D no domínio do tempo





## 5.1. *Introdução*

Desde as primeiras propostas sobre a capacidade de os carboidratos, especialmente a glicose,<sup>1</sup> de se inserirem na estrutura da água que as interações água-carboidratos vem sendo estudadas com um enfoque molecular. Devido às dificuldades e limitações experimentais, grande parte dos estudos sobre os aspectos dinâmicos das interações água-carboidratos focaram em simulações teóricas por dinâmica molecular, já os trabalhos experimentais focam, em sua grande maioria, em propriedades macroscópicas ou termodinâmicas, como citado na Seção 2 do Capítulo 1.

Dentre as técnicas experimentais, a ressonância magnética nuclear (RMN) e, em específico os estudos de relaxometria no domínio do tempo, constituem uma poderosa ferramenta para o estudo dinâmico de sistemas aquosos de carboidratos,<sup>2</sup> pois vários processos moleculares nestes sistemas ocorrem na escala de tempo estudados por RMN. Além disso, ela é particularmente mais interessante do que outras técnicas como espectroscopia RAMAN e Infravermelho (IV) ou mesmo relaxação dielétrica. Além de ser sensível aos processos interacionais, as medidas baseadas em relaxação nuclear magnética também podem fornecer informações sobre processos dinâmicos de troca química, inacessíveis às demais técnicas.

Estes processos de troca química constituem mudanças de ambiente químico ou “magnético” nos quais os spins nucleares se localizam. No caso específico dos sistemas água-carboidratos, os processos de troca química envolvem as reações de transferência de prótons entre as moléculas de água e os grupos OH dos carboidratos. Tais interações já foram consideravelmente estudadas por RMN, principalmente através de relaxometria.<sup>2-8</sup> Ao contrário da espectroscopia de RMN baseada nas frequências de ressonância ou em

deslocamentos químicos,  $\delta$  (*ppm*), a relaxometria no domínio do tempo é foca apenas nas medidas de decaimento da intensidade dos ecos de spin ou na volta dos spins ao estado fundamental após a aplicação de pulsos.

Os estudos de relaxometria podem ser empreendidos em espectrômetros de RMN de bancada e com magnetos de baixa intensidade, operando em baixas frequências, tipicamente inferiores a 25 MHz, e sem a necessidade de manutenção com nitrogênio e hélio líquidos. Estas medidas são geralmente baseadas no simples decaimento livre da indução (do inglês *Free Induction Decay-FID*), usando sequência Carr-Purcel-Meiboom-Gill (CPMG), e nas sequências de recuperação e saturação/Recuperação e Inversão. Em muitas aplicações os dados de decaimento (ou recuperação) da magnetização são processados com a transformada inversa de Laplace gerando uma distribuição contínua de tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ). Uma extensa lista de exemplos sobre relaxometria 1D no domínio do tempo bem como seus princípios teóricos e aplicações podem ser encontradas na literatura.<sup>2</sup>

As vantagens desta técnica em relação à RMN de alta resolução operando em frequências de centenas de MHz reside no baixo custo, maior simplicidade de operação e manutenção,<sup>9</sup> também situa na possibilidade de estudo de amostras heterogêneas como suspensões coloidais óleo/água<sup>10</sup>, frutas e vegetais,<sup>11-13</sup> alimentos processados,<sup>14-16</sup> e materiais micro porosos como rochas<sup>17</sup> e cimento<sup>18</sup>. Apesar destes aspectos positivos, nem sempre é fácil atribuir os picos de  $T_1$  e/ou  $T_2$  aos grupos ou populações de prótons apropriadamente. Como será apresentado adiante (Capítulo 6), as populações de prótons em alguns sistemas podem apresentar um valor de  $T_1$  e valores distintos de  $T_2$ , ou vice-versa.

Através da dependência da taxa de relaxação spin-spin,  $T_2^{-1}$ , com respeito ao intervalo inter-pulsos  $90-180^\circ$ ,  $\tau$  na sequência CPMG,  $T_2^{-1}$  vs  $\tau^{-1}$ , é possível determinar processos de troca que ocorrem na faixa de  $10^2$  a  $10^4$   $s^{-1}$ . Os modelos teóricos que descrevem as curvas de dispersão de  $T_2^{-1}$  vs  $\tau^{-1}$  foram inicialmente propostos nos anos 60 a partir do simples modelo de *dois sítios*.<sup>19,20</sup> Estes modelos são baseados nas equações de Bloch<sup>21</sup> modificadas para a inclusão dos processos de troca química.<sup>22</sup> O modelo teórico que melhor consegue descrever o comportamento de relaxação dos prótons trocáveis em solução aquosas de carboidratos, incluindo polissacarídeos e até glicoproteínas, foi formulado por Carver & Richards<sup>23</sup> e posteriormente modificado por Hills.<sup>24</sup> A partir deste modelo adaptado<sup>24</sup> foi possível determinar em maiores detalhes as interações entre moléculas de água com mono, di e polissacarídeos.<sup>24-26</sup> Na próxima seção serão apresentados os princípios teóricos básicos do modelo que descreve os processos de trocas protônicas entre as moléculas de H<sub>2</sub>O e os grupos OH dos carboidratos.

Apesar do elevado potencial da relaxometria 1D no estudo de processos dinâmicos, ela apresenta limitações quando empregada na caracterização de populações de prótons, principalmente em matrizes heterogêneas em que grupos apresentando os mesmos valores de  $T_2$ , porém com distintos valores de  $T_1$ , ou vice-versa, não podem ser apropriadamente atribuídos.

A relaxometria de correlação cruzada no domínio do tempo ou simplesmente relaxometria bi-dimensional (2D), surge como uma alternativa para a caracterização dinâmica de sistemas dos mais simples até matrizes complexas como alimentos e tecidos celulares. Dentre outras vantagens, a relaxometria 2D no domínio do tempo permite que picos que apresentem um mesmo valor de  $T_2$  mas diferem em  $T_1$ , ou inversamente, o mesmo valor de  $T_1$  e diferem os valores do  $T_2$ , possam ser resolvidos em duas dimensões e fornecer picos

separados em soluções de polissacarídeos, proteínas, e até mesmo soluções de mono e dissacarídeos.

Neste capítulo os aspectos dinâmico das interações água-carboidratos serão explorados por relaxometria 1D de soluções aquosas de carboidratos em regimes concentrados próximo ao limite de solubilidade. Para tal, uma breve introdução dos princípios básicos da relaxometria 1D apresentados.

## **5.2. Relaxometria 1D: curvas de dispersão**

### **$T_2^{-1}$ vs $\tau^{-1}$**

O principal enfoque da relaxometria neste capítulo é a potencialidade de sondar os processos de troca entre os prótons da água e os prótons hidroxílicos de uma série de carboidratos em seus respectivos limites de solubilidade. Como já verificado, a estrutura e o tamanho dos carboidratos afetam suas interações com as moléculas de água. Neste sentido, as diferenças observadas nos processos de troca química podem ser diretamente relacionadas com as diferenças dinâmico-estruturais dos sistemas H<sub>2</sub>O-carboidratos.

O tratamento inicial dos processos de troca química sobre o tempo de relaxação transversal baseia-se no modelo de dois sítios, em que um spin nuclear pode, por meio de processos dinâmicos, se localizar intermitentemente em dois ambientes,  $a$  e  $b$ , com frequências características  $\omega_a$  e  $\omega_b$ . Através das equações de Bloch modificadas para a inclusão dos termos que descrevem os processos de troca (vide Equação 21 Capítulo 4), Allerhand e Gutwoski<sup>19</sup> verificaram que as intensidades dos ecos de spin decaem de forma aproximadamente monoexponencial mesmo sendo constituída por mais de uma população de spin-1/2. Além disso, a constante de decaimento,  $1/T_2$ ,

depende implicitamente dos parâmetros: intervalo de tempo entre os pulsos de 90-180°, na sequência CPMG,  $\tau$ ; do deslocamento químico ou diferença entre as frequências de ressonância dos sítios  $\delta\omega = \omega_a - \omega_b$ ; do tempo de meia vida nos sítios,  $1/\tau_{a,b}$ ; e dos valores de  $T_{2a,b}$  intrínsecos dos sítios,  $a$  e  $b$ , respectivamente. Assim, através de simples medidas das intensidades dos ecos de spin em diferentes intervalos interpulsos é possível determinar propriedades dinâmicas do sistema como taxa de troca protônica, deslocamento químico e os tempos de relaxação intrínsecos dos sítios. Esta característica é particularmente valiosa uma vez que as taxas de troca química em soluções de carboidratos situam-se na faixa de centenas a milhares de Hz, e como consequência, os picos dos prótons de um espectro no domínio de frequência, tanto da água quanto dos grupos OH dos carboidratos, formam um único pico intermediário entre as duas frequências ponderadas pelas respectivas populações. Uma possível maneira de contornar este problema seria a realização de medidas em baixas temperaturas explorando, deste modo, condições de lentas trocas químicas e regiões de baixas solubilidades, as quais encontram-se bastante distantes das condições ambiente.

No modelo proposto por Allerhand e Gutwoski<sup>19,20</sup> duas suposições são assumidas: (i) os tempos de relaxação intrínseco dos dois sítios ( $T_{2,a,b}$ ) são idênticos; (ii) as populações presentes nos dois sítios são idênticas. Apesar da boa capacidade do modelo em prever trocas químicas provocada pela isomerização molecular,<sup>19,20</sup> o modelo não se aplica a fenômenos mais gerais como, por exemplo, troca química de prótons em soluções aquosas de açúcares. Nesse sentido Carver & Richards<sup>23</sup> propuseram um modelo mais geral sem a necessidade de sítios com taxas de relaxação idênticas e nem sítios igualmente povoados. Posteriormente o modelo foi aprimorado por Hills<sup>24</sup> e é

resumidamente apresentado como se segue. A taxa de relaxação transversal efetiva dos prótons trocáveis pode ser descrita pela Equação 5.1

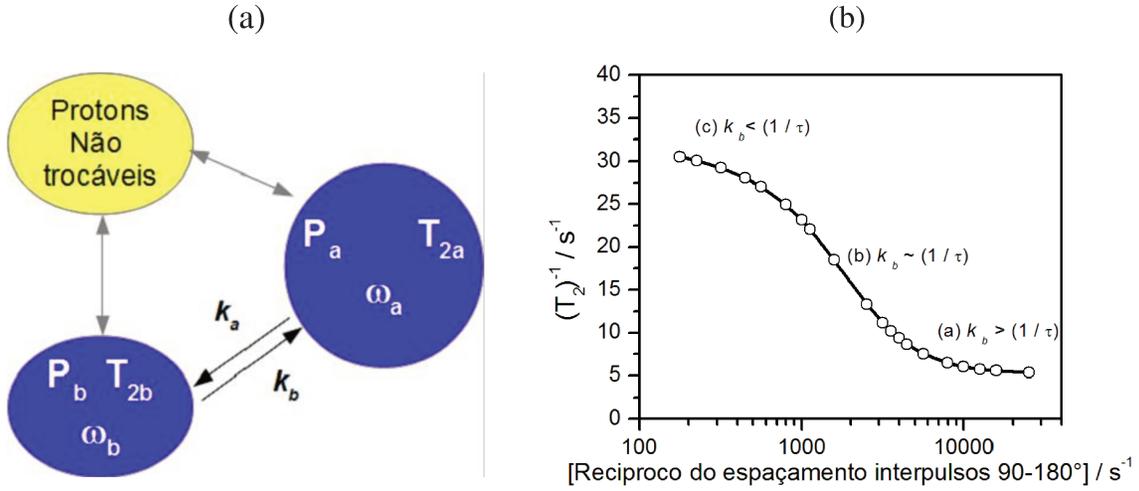
$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2\tau} \ln \lambda \quad (5.1)$$

A forma funcional do decaimento dos ecos de spin permanece exponencial desde que a magnitude do termo de  $\ln \lambda$  não seja dominante na Equação (1). Este requisito é plenamente satisfeito nas condições de rápidas trocas,  $\frac{1}{2\tau_{ab}} \gg \delta\omega$ , em que  $\tau_{ab}$  é o tempo de vida médio dos prótons nos sítios,  $1/\tau_{ab} = P_a/\tau_a = P_b/\tau_b$ . A forma matemática da dependência de  $\ln \lambda$  é apresentada no Apêndice C. A partir da Eq. (5.1) nota-se diretamente a dependência da taxa de relaxação spin-spin com respeito ao intervalo entre os pulsos de 90-180° da sequência CPMG. Apesar da complexidade algébrica das Equações (C1-9) (Vide APÊNDICE C), o termo  $\ln \lambda$  depende dos parâmetros tempo de vida nos sítios  $a$  e  $b$ ,  $1/\tau_a$  e  $1/\tau_b$ , respectivamente, do deslocamento químico ou diferença de frequências entre os sítios  $\delta\omega = \omega_a - \omega_b$ , das frações prótons nos sítios,  $P_a$  e  $P_b$ , e dos tempos de relaxação intrínsecos  $T_{2a}$  e  $T_{2b}$ , além do intervalo de pulsos,  $\tau$ . O termo “ $\ln \lambda$ ” representa fisicamente a taxa de relaxação efetiva incluindo as interações dipolares e os processos de troca química. Para sistemas de dois sítios, estas equações estão sujeitas às condições de equilíbrio estacionário C.11 e C.12:

$$\{P_a + P_b = 1\} \quad \text{e} \quad \{P_a/\tau_a = P_b/\tau_b\}$$

O gráfico da Figura 5.1 apresenta o comportamento do modelo apresentado nas Eq. (5.1) para um sistema hipotético constituído de spins-1/2 sujeitos á trocas químicas entre dois sítios. Este modelo descreve com alta fidelidade os

dados experimentais do sistema formado por H<sub>2</sub>O-glicose (ver resultados e discussão Seção 5.4).



**Figura 5.1:** (a) Representação esquemática transferências de magnetização em soluções aquosas de carboidratos. (b) Curva obtida teoricamente a partir do modelo de troca de dois sítios para soluções aquosas de carboidratos Eqs. (5.1 e C1-9). Os parâmetros teóricos são  $P_a = P_b = 1/2$ ;  $T_{2a} = 2,0$  s;  $T_{2b} = 0,100$  s;  $k_b = 1,5 \times 10^3$  s<sup>-1</sup>;  $\delta\omega = 1,0$ , e  $\omega_0 = 100,12$  MHz.

A curva de dispersão (Fig. 5.1) apresenta três regiões distintas de escalas de tempo. No limite de rápidas trocas químicas e rápidas taxas de pulsos, i.e.,  $\frac{1}{\tau} > \frac{1}{\tau_{a,b}} \gg \delta\omega$ , a taxa de relaxação spin-spin pode ser descrita pela equação aproximada

$$\frac{1}{T_2} = \frac{P_a}{T_{2a}} + \frac{P_b}{(T_{2b} + k_b^{-1})} \quad (5.2)$$

Sendo a taxa de relaxação transversal observada simplesmente a média dos valores de  $T_2$  de cada sítio ponderada pelas respectivas populações.

Já nas regiões de intervalos interpulsos longos,  $\frac{1}{\tau} < \frac{1}{\tau_{a,b}}$ , ou lentas trocas químicas, o tempo de relaxação é descrito pela equação aproximada de Swfit-Connick<sup>27</sup>

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2a}} + \frac{P_b k_b}{P_a} \left\{ \frac{\left(\frac{1}{T_{2b}}\right)^2 + \left(\frac{k_b}{T_{2b}}\right) + (\delta\omega)^2}{\left(\frac{1}{T_{2b}} + k_b\right)^2 + (\delta\omega)^2} \right\} \quad (5.3)$$

Assim, para uma solução aquosa de glicose, a partir do conhecimento da composição dos sítios ( $P_a$  e  $P_b$ ) e do ajuste teórico aos pontos experimentais na região de curtos tempos entre os pulsos na sequência CPMG, pode-se determinar diretamente o tempo de relaxação intrínseco dos sítios no carboidrato,  $T_{2b}$  Eq. (5.2), e o valor do deslocamento químico entre os sítios  $a$  e  $b$ ,  $\delta\omega$ , Eq. (5.3). Então, a taxa de troca  $k_b$  pode ser determinada pelo melhor ajuste da curva teórica (Equação 5.1) aos dados experimentais. Na realidade, o procedimento de ajuste da Equação (5.1) para a determinação dos parâmetros não é uma tarefa simples e será mais bem detalhada nos métodos experimentais Seção 5.4. Uma limitação deste modelo é que a partir apenas da composição do sistema e do tempo de relaxação intrínseco da água não é possível determinar univocamente os valores de  $\delta\omega$  e  $k_b$ .

## 5.3. *Materiais e Métodos*

### 5.3.1. *Materiais*

As soluções aquosas dos carboidratos foram preparados a partir dos açúcares com seus respectivos fornecedores e purezas: D-xilose (Sigma  $\geq 99\%$ ); D-

glicose (AnalarR<sup>®</sup> ≥ 98 %); D-frutose (Sigma ≥ 99%); Sacarose (Sigma ≥ 99%), D-matose.H<sub>2</sub>O (Aldrich ≥ 98); D-sorbitol (Aldrich ≥ 99%). As soluções aquosas nas concentrações mostradas nas Tabelas 5.1, 5.3, e 5.4, foram preparadas usando água deionizada (18.2 MΩ) e deixadas em temperatura entre 27-29 °C por pelo menos 72h para atingir o equilíbrio de solubilidade. Não foi necessário o ajuste do pH, haja visto que para todas as soluções dos diferentes sacarídeos os valores de pH ficaram na faixa 5,6 ≤ pH ≤ 6,2, estando, portanto, na região de trocas neutras.

### 5.3.2. *Medidas de relaxação-curvas de dispersão $T_2^{-1}$ vs $1/\tau$*

Todos os experimentos de RMN deste capítulo foram realizados no Equipamento DRX (Resonance Instruments) operando a 100,12 MHz e temperatura de 300K. Os valores típicos da duração dos pulsos de 90° situou-se entre 1,5 – 2,5 μs, e os valores do intervalo entre os pulsos de 90-180° foi variado de 10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup> μs. Para cada experimento foram acumulados pelo menos quatro scans com tempo de espera (*relaxation delay* RD) RD > 8T<sub>2</sub>, e um tempo total de aquisição (*aq*) aq ≥ 3T<sub>2</sub> para obter linhas base com mínimo *offset*.

As curvas de dispersão  $T_2^{-1}$  vs  $1/\tau$  foram obtidas a partir das medidas de T<sub>2</sub> dos prótons trocáveis (H<sub>2</sub>O + OH-carboidratos) em diferentes valores de intervalo interpulsos da sequência CPMG. Nestes estudos os valores de τ<sub>cp</sub> foram variados desde 100 a 10.000 μs. Para o tratamento quantitativo dos dados foram empregados os modelos descritos pelas Eqs (5.1, e C1-11). A determinação dos valores das taxas de trocas de prótons, k<sub>b</sub>, foram feitas a

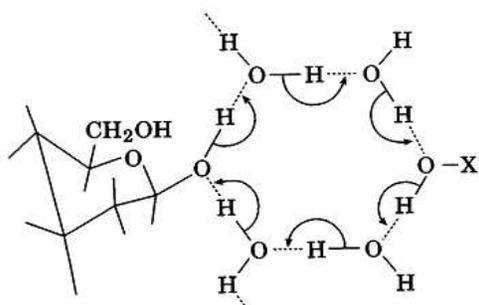
partir dos ajustes das curvas e dos parâmetros previamente determinados como descrito a seguir. A partir do valor do tempo de relaxação da água pura,  $T_{2a}$ , e do conhecimento da composição,  $P_a$  e  $P_b$ , a Equação (5.2) se aplica no limite de rápidas taxas de aplicação de pulso,  $\frac{1}{\tau} \gg k_b$ , e assim os valores dos tempos de relaxação grupos OH,  $T_{2b}$ , são obtidos. De posse dos valores das frações de sítios  $a$  e  $b$ , e dos tempos de relaxação intrínsecos, a Eq. (5.3) pode ser usada no limite de longos intervalos interpulso, determinando-se o valor de  $\delta\omega$ . Por fim, a curva teórica (5.1) é gerada a partir das Equações (C1-11) de modo a fornecer os menores valores de desvios padrão e obtendo para determinação de  $k_b$ . Este procedimento foi feito para cada solução de açúcar no limite de solubilidade e também em outras concentrações, para os açúcares glicose, sacarose e frutose. É necessário salientar que os parâmetros  $\delta\omega$  e  $k_b$  são interdependentes, porém, os dois podem ser visualmente ajustados para que a curva teórica descreva da melhor forma os valores experimentais, o que foi conseguido sem maiores dificuldades com exceção para a frutose saturada, sobre a qual será discutido as explicações deste comportamento.

## **5.4. Resultados e Discussão**

### **5.4.1. Troca química estudada por curvas de dispersão $T_2^{-1}$ vs $1/\tau$**

As soluções saturadas dos açúcares foram estudadas no limite de solubilidade através da relaxometria 1D usando o modelo modificado de Carver & Richards.

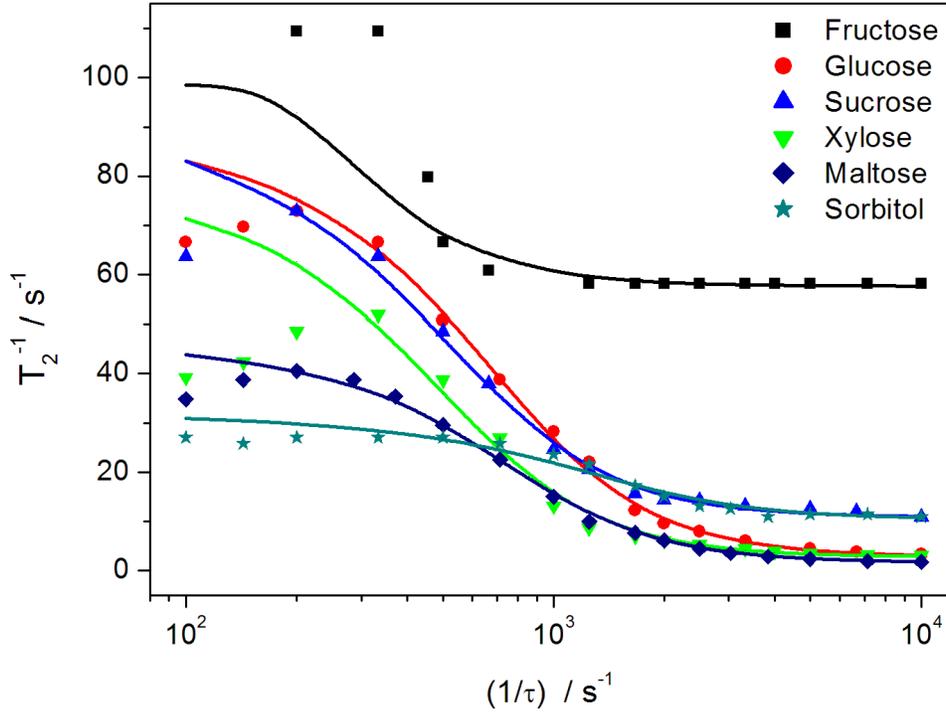
Estudos da influência do pH nas curvas de dispersão de soluções aquosas de glicose mostraram que o fluxo de prótons,  $k = P_b k_b = k_a P_a$ , não depende do pH na faixa entre 4 – 8. Para todas as soluções de açúcares os valores de pH situaram entre 5,8 e 6,2, estando, portanto, fora da região de trocas ácido-base catalisadas.<sup>28</sup> Assim, é aceito que o principal mecanismo de troca protônica nestes sistemas constitui-se um processo cíclico não iônico e que requer duas moléculas de água para cada grupo OH.<sup>25</sup> A Figura 5.2 mostra esquematicamente o mecanismo de troca entre moléculas de água e os grupos OH de moléculas poli-hidroxiladas (polióis ou carboidratos). Neste mecanismo, as trocas protônicas são ‘facilitadas’ pela organização tetraédrica das moléculas de água e pela capacidade de os açúcares se inserirem nesta estrutura da água sem grandes perturbações.<sup>1,29</sup>



**Figura 5.2.** Mecanismo esquemático de trocas protônicas em soluções de glicose de acordo com ref<sup>25</sup>. O “X” da figura pode representar um H (no caso de uma molécula de água) ou uma molécula de glicose.

As curvas de dispersão de  $T_2$  para os açúcares no limite de solubilidade são apresentadas na Figura 5.3 e os respectivos valores dos parâmetros obtidos do modelo são apresentados na Tabela 5.1. Em rápidas taxas de aplicação de pulsos, elevados valores de  $1/\tau$ , as taxas de relaxação dos prótons trocáveis das soluções situam-se nos seus respectivos valores mínimos como se os

processos de troca química não influíssem sobre as taxas de relaxação transversal.



**Figura 5.3:** Taxa de relaxação de  $^1\text{H}$  trocáveis ( $\text{H}_2\text{O}$  e grupos OH-carboidratos) em função de  $1/\tau$  na sequência CPMG. Todas as soluções foram medidas nos seus respectivos limites de solubilidade a 300 K, cujos valores das solubilidades e dos parâmetros do modelo são resumidos na Tabela 5.1. Os parâmetros  $k_b$ ,  $T_{2b}$  e  $\delta\omega$ , foram obtidos a partir dos valores gerados do modelo de dois sítios<sup>24</sup> e tomando-se o valor de  $T_{2a} = 2,0\text{s}$ , com exceção da frutose  $T_{2b} = 7,0\text{ms}$  e  $T_{2a} = 0,14\text{s}$ . Os símbolos correspondem aos valores experimentais e as linhas aos valores obtidos pelo ajuste do modelo.

Nesta condição em que,  $\frac{1}{\tau} \gg \frac{1}{k_b} \gg 1/T_2$ , a Equação (5.2) pode ser escrita como Eq. (5.4)

$$1/T_2 = P_a/T_{2a} + P_b/T_{2b} \quad (5.4)$$

Sendo os valores de  $T_2$  dos prótons trocáveis a simples média entre os sítios  $a$  e  $b$  ponderados pelas suas respectivas populações. Percebe-se para todos os sacarídeos que, com a diminuição de  $1/\tau$  ocorre um contínuo aumento dos valores de  $T_2$ , até um valor máximo, a partir dos quais os valores experimentais permanecem constantes ou simplesmente diminuem ligeiramente.

É importante ressaltar que, em longos intervalos inter-pulsos os efeitos de troca química são tão intensos sobre os valores de  $T_2$  que para valores de  $1/\tau < 200$  os valores observados de  $T_2$  são sempre menores do que os previstos pelo modelo (linhas nos gráficos). Nestas regiões, os longos intervalos inter-pulsos fazem com que poucos ecos de spin sejam adquiridos durante o decaimento do sinal. Por exemplo, para taxas de aplicação dos pulsos,  $\tau^{-1} \leq 200 \text{ s}^{-1}$ , o intervalo entre os pulsos é de  $5 \text{ ms}$ , implicando num intervalo de tempo entre o primeiro e o segundo ecos de spin em torno de  $10 \text{ ms}$ . Levando-se em conta o tempo entre os pulsos de  $90^\circ$  e  $180^\circ$ , o tempo para aquisição do primeiro eco de spin é de no mínimo  $10 \text{ ms}$ , e para obtenção do segundo e terceiros são necessários  $20$  e  $30 \text{ ms}$ , respectivamente. Isso implica que, para taxas de relaxação superiores a  $30 \text{ s}^{-1}$  e  $\tau_{cp} \gtrsim 5 \text{ ms}$ , serão adquiridos um número relativamente pequeno, cerca de  $4$  ou  $5$ , ecos de spin da sequência CPMG. Além deste, outro fator molecular também contribui para a discrepância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo. Na escala de tempo superior a  $5 \text{ ms}$ , os efeitos de difusão molecular translacional fazem com que os spins visitem regiões espaciais com campos magnéticos diferentes e devido ao caráter browniano destes movimentos, os pulsos de  $180^\circ$  longamente espaçados não mais recuperam a coerência dos spins no plano  $x$ - $y$ . Allerhand e Gutowski<sup>20</sup> discutem estas regiões de longos

intervalos de  $\tau$  como não possíveis de serem acessadas pelos modelos teóricos e eles apresentam soluções numéricas para as equações acopladas. Portanto, tais regiões são proibitivas de serem estudadas tanto teoricamente quanto experimentalmente.

**Tabela 5.1** - Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo de dois sítios modificado (vide Eqs. (5.1 e C1-C9)) para soluções de carboidratos nos seus respectivos limites de solubilidade a 300K . Os parâmetros foram obtidos a partir do ajuste das curvas de dispersão apresentadas na Fig. 5.3 assumindo o tempo de relaxação intrínseco da água  $T_{2a} = 2,0s$ , em todas as soluções com exceção da solução saturada de frutose  $T_{2a} = 1,13 s$ .

Açúcar	$N_{OH}$	C / (%m/m)	$P_b$	$\delta(ppm)$	$k_b$ / $s^{-1}$	$P_b k_b$ / $s^{-1}$	$T_{2b}$ / $10^{-3}s$
D-xilose	4	57,37	0,2459	0,95	550	135	105
D-glicose	5	55,12	0,2340	1,20	780	183	100
D-frutose	5	80,30	0,5047	1,0	100	50,5	6,0*
D-sorbitol	6	71,43	0,4259	0,68	1200	515	41
D-maltose	8	40,24	0,1271	1,18	880	112	110
sacarose	8	67,24	0,3017	0,93	565	170	28

Para as soluções saturadas de frutose e sacarose, os valores de  $1/T_{2b}$  são respectivamente, 167 e 35,7  $s^{-1}$ , enquanto seus respectivos valores de  $k_b$  são 100 e 565  $s^{-1}$ . Para o caso específico da frutose no limite de solubilidade, o sistema não se encontra em regimes de rápidas trocas químicas, uma vez que  $1/k_b < 1/T_2$ . Ademais, para os spins com frequência de Larmor igual a 100 MHz a diferença de frequência entre os sítios  $a$  e  $b$  com um deslocamento químico  $\delta = 1 ppm$  é de  $\delta\omega = |\omega_a - \omega_b| = 100 Hz$ , que é justamente igual

ao valor de  $k_b$  para a solução saturada de frutose. Nesta condição, o regime denominado de *exchange narrowing*,  $|\omega_a - \omega_b| \ll k_b$ , limite de rápidas trocas protônicas, não é mais válido e as equações acopladas de Bloch usadas na derivação do modelo<sup>24</sup> de dois sítios não é mais válida.<sup>30</sup>

Esta limitação explica o fato de não ter sido possível o ajuste adequado dos dados experimentais ao modelo teórico para a solução saturada de frutose. Porém, com exceção da frutose, as condições de rápidas trocas e o regime de *exchange narrowing* são válidas nas regiões de  $\frac{1}{\tau_{cp}} > 400$  e os valores dos parâmetros  $\delta\omega$ ,  $T_{2b}$ , e  $k_b$ , são obtidos com confiança bastante satisfatória, erros do ajuste  $< 5\%$ .

A partir dos valores de  $T_{2b}$  apresentados na Tab. 5.1 e tendo-se em mente que eles são diretamente relacionados aos tempos de correlação roto-difusionais, vide Equação (4.18) Capítulo 4, pode-se ordenar os tempos de correlação roto-difusionais,  $\tau_c$ , dos sacarídeos como:

$$\textit{frutose} \gg \textit{sacarose} > \textit{sorbitol} > \textit{glicose} > \textit{xilose} > \textit{maltose}$$

É importante ressaltar que esta ordem de tempos de correlação não é devida ao tamanho das moléculas, mas sim aos efeitos de percolação que surgem em concentrações mais altas, geralmente superiores a 45% m/m<sup>31,32</sup>. Estes efeitos aparecem em concentrações mais altas e levam ao intenso aumento dos tempos de correlação das moléculas de açúcares devido às fortes ligações de hidrogênio entre duas moléculas de sacarídeos diretamente ou intermediadas por moléculas de água formando pontes via ligações de hidrogênio entre duas moléculas de carboidrato.

A partir das curvas de dispersão mostrados na Fig. 5.3 e dos parâmetros da Tab. 5.1, é possível perceber que existem diferenças significativas nas taxas de

troca química,  $k_b$ , e nos fluxos de troca protônica,  $k = P_b k_b$ . Considerando esta última propriedade como a capacidade ou facilidade de uma molécula de carboidrato em realizar trocas protônicas com as moléculas de água, a molécula D-sorbitol, um açúcar linear, em sua solução saturada é a que apresenta o maior valor de  $k$ . Para os açúcares cíclicos a glicose apresenta maior capacidade de troca protônica enquanto a frutose também em solução saturada apresenta a menor taxa de troca de prótons. É importante ter em mente que nestas concentrações limites de solubilidade a razão de moléculas de água por moléculas de cada sacarídeo,  $R_{H_2O}$ , varia bastante de carboidrato para carboidrato como apresentado na Tabela 5.2. De acordo com a proposta de Hills,<sup>26</sup> o valor de  $k$  depende da composição e seu valor máximo para soluções de glicose ocorre em  $P_b \approx 1/5$ .

**Tabela 5.2.** Número médio de moléculas de água por molécula de carboidrato no limite de solubilidade a 300K.

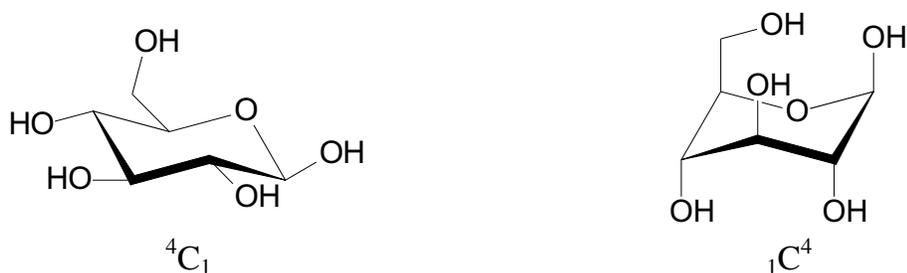
Açúcar	$R_{H_2O}$	$R_{H_2O/OH}$
D-xylose	6,19	1,55
D-glucose	8,14	1,63
D-fructose	2,45	0,49
D-sorbitol	4,05	0,675
D-maltose.H <sub>2</sub> O	27,3	3,41
sacarose	9,20	1,15

Em concentrações mais elevadas a eficiência do processo cíclico de troca diminui pela ausência de moléculas de água na estrutura tetraédrica de ligações de hidrogênio, diminuindo a probabilidade de que uma troca ocorra

entre o grupo OH do sacarídeo e uma molécula de água. Assim, com exceção da maltose que apresenta, em média, uma razão de 3,4 moléculas de água para cada grupo OH, as trocas químicas são mais baixas do que a condição ideal  $P_b \approx 0,2$ . Além disso, com os baixos valores de  $R_{H_2O/OH}$  não é mais esperado que a organização da água seja exatamente a mesma tetraédrica do seio da água, e isto poderia desfavorecer as rápidas trocas protônicas. No caso específico da frutose, mas que também poderia ser estendido aos demais sacarídeos, a partir de certas concentrações ocorre o fenômeno de percolação em que moléculas de frutose se agregam formando clusters via ligações de hidrogênio com outras moléculas de frutose ou tendo moléculas de água servindo de pontes entre duas moléculas de frutose.<sup>32</sup> No estudo de dinâmica molecular feito por Sonoda e Skaf<sup>32</sup> a máxima concentração de frutose foi de 57% (m/m) correspondendo a uma razão  $R_{H_2O} = 7,54$ . Mesmo assim, foi encontrado por estes autores que nesta concentração uma fração significativa de moléculas de frutose realizava ligações de hidrogênio entre elas. Neste cenário, os valores bem mais baixos de  $T_{2b}$  para os grupos OH da frutose em relação aos demais sacarídeos apresentados na Tab. 5.1, servem de indicativo de que no limite de solubilidade as moléculas de frutose encontram-se mais associadas entre si do que os demais sacarídeos. Este evento também seria uma possível causa para os valores mais baixos de taxas de troca química.

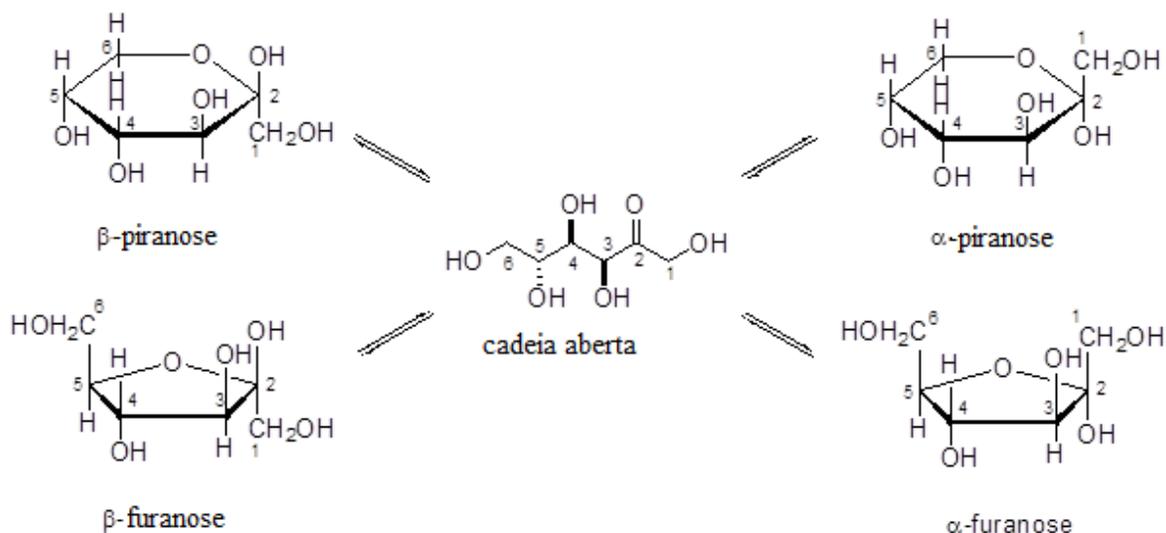
É importante salientar que vários processos dinâmicos agem simultaneamente durante as trocas químicas. Primeiramente, as moléculas de cada açúcar encontram-se em equilíbrio entre diferentes formas. Por exemplo, a glicose em solução se distribui entre as formas  $\alpha$  (36%) e  $\beta$  (64%), além de a conformação da cadeia alternar entre as conformações  ${}^4C_1$  e  ${}^1C_4$ . A Figura 5.4 mostra as estruturas em cadeira para  $\beta$ -glicopirranose. Devido à existência dos

três grupos OH em orientação axial, a conformação  ${}^1C^4$  é energeticamente instável e existe apenas em traços em solução.<sup>33</sup>



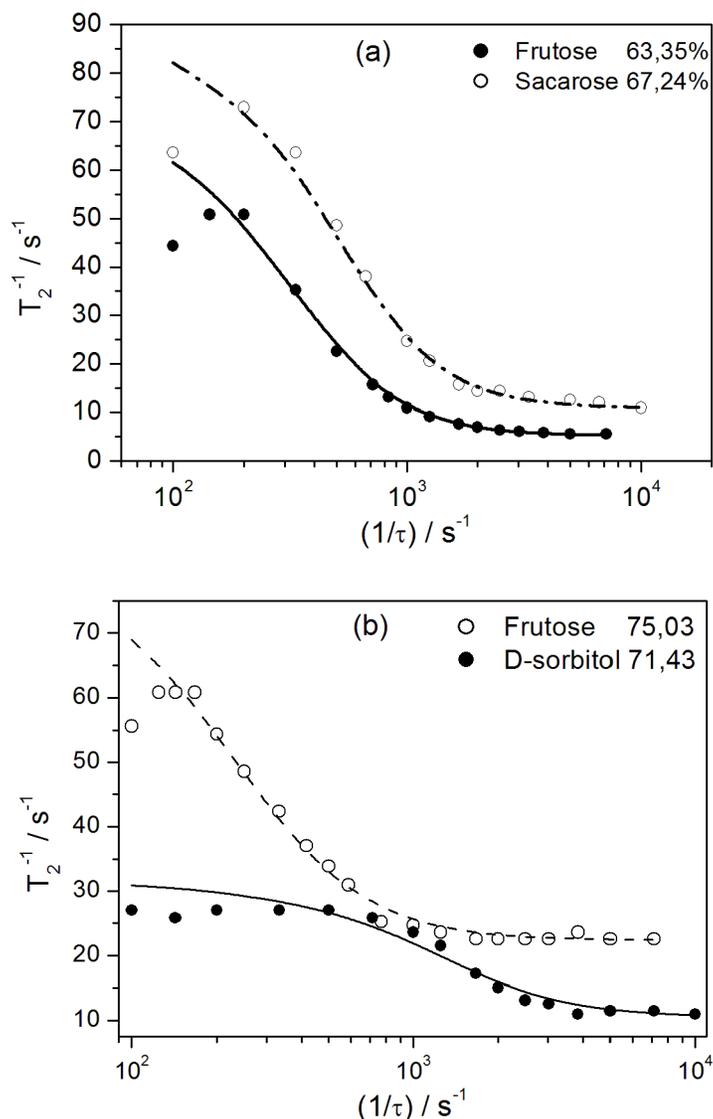
**Figura 5.4:** Estruturas da da  $\beta$ -D-glicopiranosose entre as formas cadeia  ${}^4C_1$  e  ${}^1C^4$ .

Já a frutose mostrada na Figura 5.5, encontra-se em equilíbrio em várias formas e tem como conformer majoritário a forma  $\beta$ -furanosídea. Portanto, o resultado das curvas de dispersão é uma média dos processos de troca química entre as várias estruturas e os vários grupos OH presentes no carboidrato, embora alguns grupos possam estar mais disponíveis e mais susceptíveis em realizar trocas protônicas.



**Figura 5.5:** Estruturas químicas em equilíbrio para a frutose em solução aquosa. Apesar da existência das cinco estruturas, a frutose apresenta-se majoritariamente na forma  $\beta$ -furanosídea, e é encontrada apenas em traços na forma de cadeia aberta.

As curvas de dispersão mostradas nas Figuras 5.6 fazem comparações nas mesmas concentrações de grupos OH da sacarose e frutose (a), e D-sorbitol e frutose (b), respectivamente. Os parâmetros dos ajustes das curvas de dispersão ao modelo teórico são resumidos na Tabela 5.3.



**Figura 5.6.** Curvas de dispersão comparativas para soluções aquosas dos carboidratos: (a) sacarose e frutose nas mesmas frações de prótons trocáveis,  $P_b = 0,3017$ ; (b) sorbitol e frutose,  $P_b = 0,43$ , ambos os gráficos à temperatura de 300 K. Os parâmetros obtidos dos ajustes são representados pelas linhas sólida e tracejada, e apresentados na Tabela 5.3. Para ambos os ajustes foi tomado  $T_{2a} = 2,0$  s.

**Tabela 5.3.** Parâmetros de composição e do ajuste teórico obtido a partir das curvas da Fig. 5.6 (a e b).

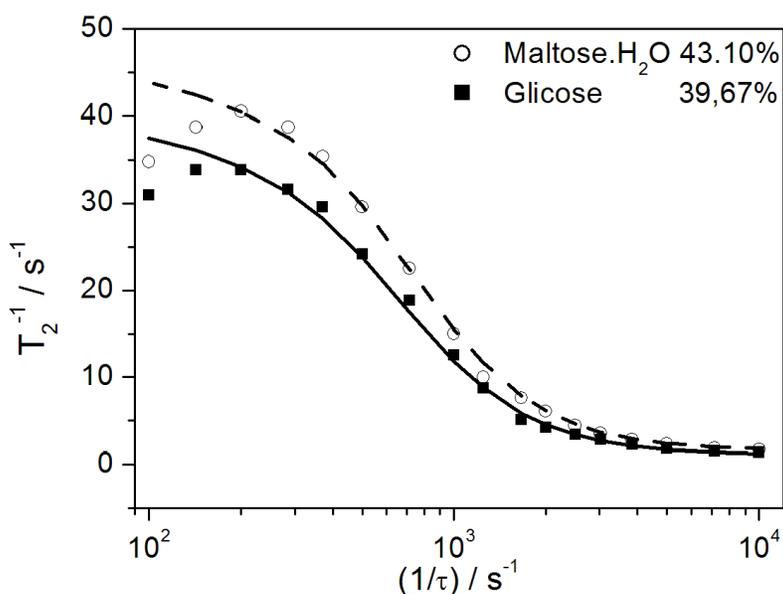
Açúcar	$R_{H_2O/OH}$	$P_b$	$\delta\omega(\text{ppm})$	$k_b/s^{-1}$	$P_b k_b/s^{-1}$	$T_{2b}/10^{-3}s$
D-frutose	1,16	0,3017	0,68	360	109	60
Sacarose	1,15	0,3017	0,92	565	170	28
D-frutose	0,66	0,4290	0,51	235	101	18
D-sorbitol	0,67	0,4259	0,68	1200	515	41,5

A comparação dos parâmetros do processo de troca protônica nas soluções de frutose e solução saturada de sacarose à mesma fração de sítios trocáveis, mostra que a frutose comporta-se de forma consideravelmente distinta (trocas mais lentas) em relação à sacarose. O mesmo pode ser dito a respeito da comparação entre as soluções de frutose e D-sorbitol nas mesmas concentrações de grupos OH (no limite de solubilidade do D-sorbitol).

Em ambas as comparações o fluxo de trocas protônicas,  $k$ , é sempre menor para frutose em relação aos demais açúcares. Assim, é possível inferir que as taxas efetivas de trocas protônicas nas soluções de frutose são mais lentas, e conseqüentemente, os tempos de vida,  $\tau = 1/k$ , dos prótons no sítio frutose são mais longos do que nos demais açúcares deste estudo. A principal diferença entre a frutose e a sacarose é a presença do grupo glucopiranosil ligado ao grupo frutofuranosil, enquanto a frutose é formada apenas pela unidade frutofuranosídea. As diferenças observadas também poderiam advir da influência do tamanho uma vez que a sacarose é um di e a frutose um monossacarídeo.

No entanto, como pode ser percebido na Figura 5.7 e Tabela 5.4, glicose e maltose em concentrações próximas apresentam praticamente as mesmas

curvas de dispersão apresentando os mesmos parâmetros de troca protônica,  $\delta\omega$  e  $k_b$ , e diferindo apenas o valor de  $T_{2b}$ . O valor de  $T_{2b}$  da maltose sendo aproximadamente o dobro do da glicose, indica que as moléculas de maltose são em média, duas vezes mais lentas do que as moléculas de glicose. Assim, o tamanho do açúcar não determina a taxa de trocas protônicas mas sim a natureza do sacarídeo.

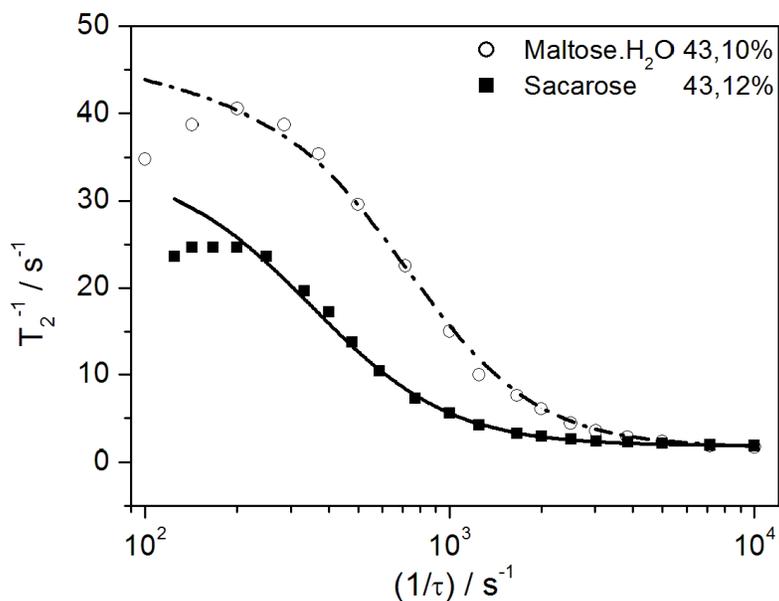


**Figura 5.7.** Curvas de dispersão para soluções aquosas de maltose  $P_b = 0,1271$  e glicose  $P_b = 0,1412$ , à 300 K. Os parâmetros dos ajustes teóricos das curvas são resumidos na Tabela 5.4, e para ambos os ajustes foi tomado o valor  $T_{2a} = 2,0$  s.

**Tabela 5.4.** Parâmetros obtidos do ajuste teórico das curvas Figura 5.4, tomando-se  $T_{2a} = 2,0$  s, e os valores da razão de moléculas de água por grupo OH dos carboidratos,  $R_{H_2O/OH}$ .

Sacarídeo	$R_{H_2O/OH}$	$P_b$	$\delta\omega/(\text{ppm})$	$k_b/s^{-1}$	$P_b k_b/s^{-1}$	$T_{2b}/10^{-3}s$
Glicose	3,04	0,1412	0,99	830	118	190
Maltose	3,41	0,1271	1,18	880	112	110

Por outro lado, a comparação entre maltose e sacarose em concentrações próximas, como é apresentado nas Figura 5.8 e Tabela 5.5, mostram que, de fato, o grupo frutofuranosídeo apresenta comportamento de trocas químicas bastante distinto do grupo glicopiranosídeo.



**Figura 5.8** . Curvas de dispersão para soluções aquosas de maltose  $P_b = 0,1271$  e sacarose  $P_b = 0,1376$ , à 300 K. Os parâmetros dos ajustes teóricos das curvas são resumidos na Tabela 5.5, e para ambos os ajustes o valor foi tomado  $T_{2a} = 2,0$  s.

**Tabela 5.5**. Parâmetros obtidos do ajuste teórico das curvas Figura 5.4, tomando-se  $T_{2a} = 2,0$  s, e os valores da razão de moléculas de água por grupo OH dos carboidratos,  $R_{H_2O/OH}$ .

Sacarídeo	$R_{H_2O/OH}$	$P_b$	$\delta\omega/(\text{ppm})$	$k_b/s^{-1}$	$P_b k_b/s^{-1}$	$T_{2b}/10^{-3}s$
Maltose	3,41	0,1271	1,18	880	112	110
Sacarose	3,13	0,1376	0,725	470	65	100

Nesta última comparação o único parâmetro idêntico para ambos os açúcares são os valores muito próximos de  $T_{2b}$  indicando que os movimentos

moleculares da maltose e sacarose em solução, nas mesmas concentrações, são próximos. Este resultado está em concordância com o fato de ambos os dissacarídeos apresentarem volumes molares parciais muito próximos em solução aquosa.<sup>34</sup>

Assim, pode-se certamente atribuir a diferença observada entre frutose e sacarose (Fig. 5.6-a Tab. 5.4), e entre maltose e sacarose (Fig. 5.8 e Tab. 5.5) às diferenças entre os grupos furanosídeo e piranosídeo, em realizar trocas protônicas e não ao tamanho.

#### 5.4.2. *Comportamento dinâmico dos sacarídeos em solução*

A partir das Tabelas 5.3 e 5.4, é possível fazer comparações acerca dos processos dinâmicos de troca e dos movimentos moleculares. Antes da discussão sobre as possíveis causas de as trocas protônicas em soluções formadas por unidade frutofuranosídeas serem consideravelmente mais lentas do que às glicopiranosídeas, será feita uma breve discussão sobre a dinâmica molecular.

Estudos experimentais<sup>31</sup> mostram que em soluções com concentração a partir de 40 ou 45% m/m as moléculas de frutose começam a se agregarem e este processo é responsável por um aumento mais acentuado da viscosidade em função da concentração. Estudos de simulação de DM<sup>32,35</sup> também mostram que a partir de concentrações em torno de 45% m/m ocorre um processo agregativo das moléculas de frutose responsável pela intensa redução dos movimentos moleculares. Tendo este efeito em mente, é possível atribuir o menor valor de  $T_{2b}$  para a solução saturada de frutose mostrado na Tab. 5.1 ao efeito de percolação e formação de agregados moleculares. No entanto,

quando se compara soluções de frutose e sacarose nas mesmas concentrações em termos de prótons trocáveis ( $P_b$ ), Tabelas 5.3-5.5, nota-se que a frutose apresenta dinâmica roto-difusional mais rápida que a sacarose mesmo em concentrações muito próximas, e mais lentas do que o D-sorbitol, respectivamente. A partir destes dados é possível dizer que mesmo nestas soluções concentradas as moléculas destes carboidratos ainda possuem movimentos de difusão rotacional característicos de soluções moleculares líquidas. A comparação entre frutose e sacarose Fig. 5.6-(a) e Tab. 5.3, permite inferir que, em média, o tempo de correlação da sacarose à concentração  $P_b = 0,3017$  e ( $T_{2b} = 28 \text{ ms}$ ), é o dobro do da frutose ( $T_{2b} = 60 \text{ ms}$ ) na mesma concentração expressa em  $P_b$ . Esta inferência é feita havendo visto que o sistema encontra-se no regime de rápidos movimentos moleculares denominado de *extreme narrowing limit*, tal que as moléculas podem apresentar movimentos translacionais e roto-difusivos livres. Portanto, os tempos característicos dos movimentos são diretamente dependentes do tamanho, resultando assim nas diferenças nos tempos de relaxação.

Num regime mais concentrado, a comparação da mobilidade da frutose com o D-sorbitol, Figura 5.6-b e Tab. 5.3, pode-se observar que nas mesmas concentrações, mesmo valor de  $P_b$  e concentrações mássicas próximas, a frutose apresenta valores de  $T_{2b}$  pelo menos duas vezes menores do que o valor apresentado para D-sorbitol. À mesma concentração expressa em  $P_b$  corresponde a uma concentração expressa em fração molar de 0,247 e 0,300, respectivamente, para D-sorbitol e frutose. A diferença de concentração é de aproximadamente 17% em fração molar. Nesta região o aumento da concentração leva a um aumento não linear da viscosidade e, pelo menos em parte, ela seria responsável pelas diferenças entre frutose e D-sorbitol. Como verificado para vários mono e di-sacarídeos, a partir de concentrações em

torno de 40%, o aumento da concentração leva a um aumento maior da viscosidade do que seria esperado para um comportamento linear.<sup>31</sup> Porém, outra explicação mais satisfatória para os valores mais altos de  $T_{2b}$  seria a maior flexibilidade das cadeias lineares do D-sorbitol em comparação com a cadeia cíclica de cinco membros da frutose.

Em regime mais diluído, porém ainda em concentrações moderadamente altas, a comparação das curvas de dispersão entre glicose e maltose, e entre maltose e sacarose confirmam que, independentemente dos efeitos agregativos, o tamanho dos carboidratos afeta os valores de  $T_{2b}$ . Na Figura 5.7 e Tab. 5.4, observa-se que as taxas de troca e  $\delta\omega$  para glicose e maltose são praticamente os mesmos, mas apresentam os valores de  $T_{2b,Glc} \gtrsim 2T_{2b,Malt}$ . Porém, a comparação semelhante entre maltose e sacarose Figura 5.8 e Tab. 5.5, mostra que os valores de  $T_{2b}$  são praticamente os mesmos, como era esperando por ambos serem dissacarídeos com volumes molares parciais próximos<sup>34</sup>. A principal diferença entre maltose e sacarose é basicamente nos parâmetros de troca,  $k_b$  e  $\delta\omega$ , devido às diferenças de capacidades em realizar trocas protônicas já apontadas entre os grupos glicopiranosil e frutofuranosil.

#### 5.4.3. *Relação entre hidratação e trocas químicas*

De acordo com a proposta de Hills<sup>26</sup>, um modelo satisfatório de hidratação seria considerar que cada grupo OH dos carboidratos se liga a duas moléculas de água, as quais apresentam movimentos rotacionais e translacionais mais restritos em relação às moléculas do seio da fase. Assim, as moléculas de água diretamente ligadas aos carboidratos, 10 no caso da glicose e frutose, e 16 no caso da maltose e sacarose, apresentam tempos de correlação mais longos do que as moléculas do *bulk*. O aumento da concentração das soluções de

sacarídeos de modo a gerar valores menores  $R_{H_2O/OH} < 2$ , desfavoreceria o processo cíclico de trocas químicas com a conseqüente diminuição do fluxo de prótons  $k$ .<sup>24</sup>

De acordo com os dados das Tabelas 5.1 a 5.3, as soluções concentradas de sacarose, glicose, frutose e D-sorbitol apresentam, em média, menos de duas moléculas de água por grupo OH destes carboidratos. A situação mais crítica é verificada para as soluções saturadas de frutose  $R_{H_2O/OH} = 0,5$  e sorbitol  $R_{H_2O/OH} = 0,6$ . Existem ainda características intrínsecas de cada carboidrato que leva a um maior ou menor fluxo de prótons. Por exemplo, como apresentado na Tab. 5.3, frutose e sacarose na mesma concentração expressa em  $P_b$  e possuindo o mesmo valor de  $R_{H_2O/OH} = 0,67$ , apresentam valores de  $k$  bastante distintos. Nesta condição o fluxo de trocas protônicas,  $k$ , na solução de sorbitol,  $515 \text{ s}^{-1}$ , é pelo menos cinco vezes maior do que para frutose,  $101 \text{ s}^{-1}$ . Portanto, as taxas de troca não se relacionam diretamente com a dinâmica dos movimentos moleculares e nem apenas com a concentração,  $P_b$ , dos carboidratos. De alguma forma, a estereoquímica dos carboidratos e/ou a forma de cadeia sacarídea (linear, piranosídea ou furanosídea) também é um fator, no mínimo importante, na determinação das taxas de troca protônica.

Comparando as propriedades macroscópicas como volume molar parcial em diluição infinita, e número de hidratação entre frutose e glicose e entre maltose e sacarose,<sup>34</sup> não é possível atribuir as diferenças observadas nos processos de troca química às diferenças entre as propriedades macroscópicas. Sacarose e maltose, por exemplo, apresentam números de hidratação obtidos por medidas ultrassônicas<sup>34</sup> de 13,9 e 14,5, respectivamente, e para frutose e glicose, estes valores são, 8,8 e 8,4, respectivamente. Ainda que os números de hidratação estivessem diretamente relacionados ao fluxo de prótons, não seria esperado

que tais diferenças aparecessem nos regimes concentrados em que o número médio de moléculas de água por mono ou dissacarídeo em questão são menores.

Outro parâmetro que poderia afetar seria o número de grupos OH em posições equatoriais. Têm sido proposto que os grupos OH em posições equatoriais de açúcares na forma piranosídea adequam-se mais facilmente na estrutura tetraédrica da água do que em conformação axial. Assim, açúcares com proporções mais elevadas de grupos OH em posição equatorial são, pelo menos em princípio, mais extensivamente hidratados<sup>5</sup> e, por isso, os processos cíclicos de troca química seriam favorecidos. A comparação entre glicose e frutose mostra que frutose apresenta 3 dos 5 grupos em orientação axial enquanto glicose apresenta aproximadamente 4,5 grupos em orientação equatorial.<sup>34</sup> Comparando a razão de grupos OH da sacarose e maltose, percebe-se que 7,2 dos 8 grupos OH na maltose encontram-se em orientação equatorial enquanto que na sacarose há cerca de 5 de 8 grupos OH. Assim, parece haver uma relação semi-quantitativa entre a fração de grupos hidroxila orientados equatorialmente e as capacidades de troca química.

Talvez um fator que influa mais fortemente sobre as taxas de troca protônica seja a suscetibilidade que cada grupo OH apresenta em realizar trocas. Como demonstrado na literatura, estas trocas protônicas são ácido-base catalisadas. Além disso, espera-se que quanto maior a basicidade dos oxigênios dos grupos OH ou maior acidez destes prótons, maior seria a capacidade de um próton ser transferido do carboidrato para água ou vice-versa. A presença do oxigênio etílico ligado ao carbono "C1" nos açúcares cíclicos leva a uma maior desblindagem do próton anomérico e conseqüentemente o deslocamento químico torna-se maior em comparação com os demais prótons hidroxílicos. Harvey e Simons<sup>36</sup> verificaram que os açúcares na forma piranosídea

apresentam deslocamentos químicos dos prótons hidroxílicos anoméricos cerca de 1 ppm mais altos do que o grupo hidroxil anomérico da frutose. Este resultado evidencia que, de fato, os grupos OH não comportam da mesma forma, e pode-se especular que a transferência de prótons no processo cíclico seja mais fácil de ocorrer quanto maior for o deslocamento químico. A contribuição dos prótons hidroxílicos do carbono anomérico para os processos de troca seria maior para os glicopiranosídeos do que para os frutofuranosídeos, uma vez que os primeiros apresentam grupos OH anoméricos com valores mais altos de  $\delta\omega$ . Esta explicação é bastante consistente com os dados apresentados nos gráficos comparativos, Figuras 5.6 – 5.8. Baseando-se em medidas de dispersão  $T_2$  vs.  $\tau$  e de  $T_{1\rho}$  vs.  $\omega_1$  (kHz), Hills<sup>25</sup> demonstrou que as curvas de dispersão podem ser descritas por pelo menos duas populações de prótons hidroxílicos sendo uma população com taxa intrínseca de troca mais rápida e outra mais lenta. Este autor sugeriu, baseando-se nos seus resultados, que as componentes com trocas mais rápidas poderiam ser atribuídas aos grupos OH anoméricos. Portanto, as diferenças observadas entre os grupos glicopiranosil e frutofuranosil podem ser explicadas pelas diferenças de deslocamento químico dos prótons anoméricos e também pela razão dos grupos OH em orientação equatorial.

Em estudo de relaxometria feito por Fabri e colaboradores<sup>37</sup> de uma série de carboidratos, contudo, não mostram uma diminuição das taxas de troca,  $k_b$  quando os grupos OH anoméricos são metilados. Os valores encontrados a partir de ajustes ao modelo de Carver & Richards são consideravelmente mais altos do que os apresentados para glicose e xilose, sacarose e maltose desta tese. Por outro lado, os valores de  $k_b$  apresentados por eles para D-glucitol (D-sorbitol), são extremamente mais baixos do que os encontrados nesta tese. Estes autores não apresentam os dados confiáveis de vários parâmetros como

$\delta\omega$ ,  $T_{2b}$ , e  $k_b$ ; e o modelo de Carver & Richards usado por eles apresenta um erro nas equações. Os valores destes parâmetros em diferentes concentrações não segue nenhuma lógica e, portanto, não se pode tomar como certo que a metilação dos grupos OH anoméricos aumentaria (nem que diminuiria) as taxas de troca protônicas. Para exemplificar, os valores de  $T_{2b}$  reportados por estes autores<sup>37</sup> para o D-sorbitol (glucitol) são de 300 ms enquanto para os dissacarídeos sacarose e maltose estes valores são de 300 e 100 ms respectivamente, todos na concentração de 10% m/m e temperatura de 298 K. Deixo aqui uma indicação de que um experimento com os açúcares estudados nesta tese com os grupos OH metilados apresentariam taxas de troca,  $k_b$ , e fluxos de prótons,  $k$ , mais baixos do que os respectivos açúcares nas mesmas condições de concentração e temperatura. De fato, como será mostrado no Capítulo 8, estudos de relaxação dos *n*-alquilglicosídeos mostrou que a inclinação da curva de  $T_2^{-1}$  vs.  $P_b$ , cuja inclinação é proporcional à  $k_b$ , diminui de forma considerável as inclinações em relação aos açúcares glicose e maltose sem os grupos OH anoméricos metilados.

#### 5.4.4. *Considerações sobre a dinâmica das moléculas de água nas soluções de carboidratos estudadas*

A água ao redor de proteínas<sup>38</sup> e de carboidratos<sup>39</sup> assume movimentos moleculares mais restritos e anisotrópicos, resultando em tempos de correlação mais longos, e conseqüentemente, há um aumento das taxas de relaxação em relação às moléculas do *bulk*. Hills<sup>25</sup> propõe que as fortes ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos OH das moléculas de glicose induzem uma ligeira anisotropia nos movimentos de reorientação molecular das moléculas de água. Com este movimento

anisotrópico surge a necessidade de dois tempos de correlação característicos dos movimentos moleculares com escalas distintas de tempo. A água ligada (água de hidratação) mantém um alto grau de mobilidade rotacional e seu tempo de correlação dos movimentos reorientacionais são bastante curtos, na faixa de 20-30 ps e são independentes da concentração. Já os movimentos mais lentos de reorientação molecular são caracterizados por tempos de correlação que variam de aproximadamente 165 ps em soluções bem diluídas chegando até 5 ns à uma concentração de glicose de 58% m/m.<sup>25</sup> Em soluções diluídas tais que a fração de moléculas de hidratação são bem menores do que a fração de água em seu seio, as rápidas trocas entre estes ambientes garantem taxas de relaxação não muito altas para as moléculas de água. No entanto, em concentrações altas, a fração de moléculas ligadas com tempos de correlação elevados se torna dominante e a atribuição de tempos de relaxação intrínsecos  $T_{2a} = 2,0$  s para as moléculas de água não é mais correta. Por exemplo, para a solução saturada de frutose, o valor de  $T_{2a}$  foi melhor ajustado em 1,13 s e nesta Seção é feita uma avaliação dos retardamentos dos movimentos moleculares da H<sub>2</sub>O nas soluções mais concentradas de glicose. De acordo com a avaliação de Hills usando os núcleos <sup>2</sup>H e <sup>17</sup>O, o tempo de correlação dos movimentos moleculares lentos das moléculas de água (<sup>2</sup>H<sub>2</sub><sup>17</sup>O) é de 165 ps no limite de diluição infinita. Neste modelo é assumido um número de hidratação igual a 10, o qual se mostrou o mais satisfatório para o ajuste dos resultados deste autor. O valor encontrado por Hills para os movimentos lentos da água de hidratação são ligeiramente mais rápidos do que as moléculas de glicose,  $\tau_b = 210$  ps, numa concentração de 1,85 mol L<sup>-1</sup>.<sup>4</sup> Tendo em mente o abrupto aumento de viscosidade à medida que a concentração de glicose passa de 40% m/m e, por conseguinte, dos tempos de correlação, é preciso ter garantia de que as moléculas de água nestes sistemas

ainda se encontram no regime de rápidos movimentos moleculares,  $\omega_0\tau_b < 1$ . Hills determinou que até a uma concentração de  $P_b = 0,25$ , as moléculas de glicose e as moléculas de água de hidratação encontram-se no limite de rápidos movimentos moleculares (*extreme narrowing limit*). Devido à maior energia coesiva das moléculas de D<sub>2</sub>O em relação as de H<sub>2</sub>O, pode-se assumir seguramente que para as soluções de glicose e também, maltose, xilose, apresentadas neste estudo, estas soluções encontram-se no limite de rápidos movimentos moleculares. No entanto, para as demais soluções de sacarose, D-sorbitol e frutose, nos seus respectivos limites de solubilidade, os movimentos moleculares são mais restritos e os tempos de correlação são maiores. Além disso, neste regime de concentração,  $P_b > 0,25$  não há mais moléculas de água de *bulk* e, portanto, os tempos de relaxação,  $T_{2a}$  são mais baixos do que 2,0 s.

Para o cálculo do valor do tempo de relaxação intrínseco das moléculas de água,  $T_{2a}$ , foi primeiramente assumido que numa solução aquosa do sacarídeo a água de *bulk* e a água de hidratação encontram-se no regime de rápidas trocas. Assim, o tempo de relaxação efetivo da água pode ser descrito pela Eq. (5.5)

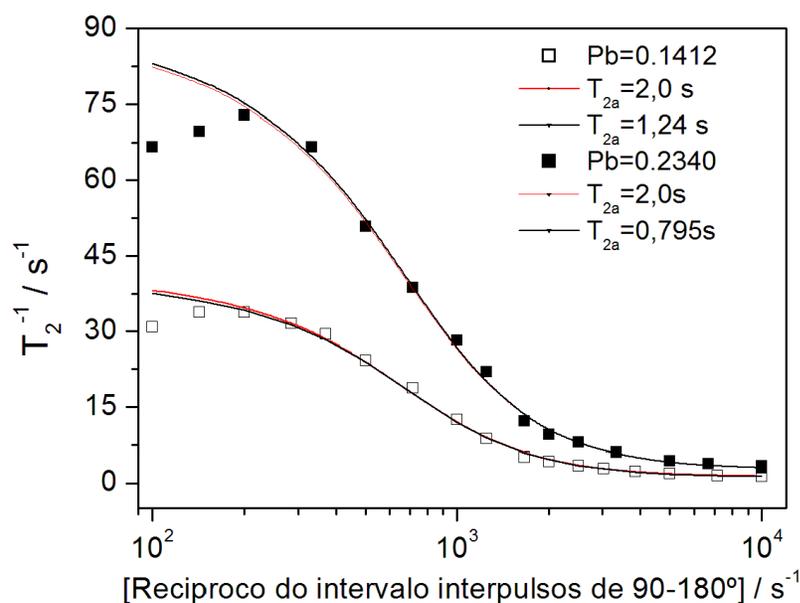
$$\frac{1}{T_{2a}} = \frac{P_{bw}}{T_{2a}^{bw}} + \frac{1 - P_b - P_{bw}}{T_{2a}^w} \quad (5.5)$$

em que  $P_{bw}$  é a fração de prótons trocáveis que se encontram ligados aos grupos OH dos sacarídeos por ligações de hidrogênio e  $T_{2a}^{bw}$  é o seu tempo de relaxação intrínseco, e  $T_{2a}^w$  é o tempo de relaxação intrínseco da água pura (*bulk*) assumido neste trabalho como sendo 2,0 s. Foi considerado para o cálculo de  $T_{2a}$  das soluções de glicose a anisotropia dos movimentos moleculares com tempos de correlação 19 e 165 ps,<sup>25</sup> para os movimentos

lentos e rápidos, respectivamente. O tempo de correlação efetivo foi calculando a partir da Equação (5.6)

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_c^r} + \frac{1}{\tau_c^l} \quad (5.6)$$

Em que os sobrescritos  $r$  e  $l$  referem-se aos movimentos rápidos e lentos, respectivamente. Por fim, assumindo estar no regime de rápidos movimentos moleculares foram calculados os tempos de relaxação efetivos das moléculas de água. No trabalho de Hills foi assumido um número de hidratação,  $h = 10$ , como sendo o mais conveniente. Porém, os estudos baseados em técnicas e experimentais e por DM sugerem valores mais próximos a 8,8 para glicose.<sup>34</sup> Para a solução saturada de glicose,  $P_b = 0,2340$ , todas as moléculas de água encontram-se ligadas aos carboidratos. Ainda de acordo com Hills, o tempo de correlação associado aos movimentos rápidos é independente da concentração. Já  $t_c^l$  associado aos movimentos reorientacionais lentos depende da concentração. Usando os valores encontrados por Hills<sup>25</sup> para  $D_2O$ , e assumindo-os como valores próximos aos valores para  $H_2O$ , o valor do tempo de correlação efetivo é aproximadamente 17,2 ps. O valor efetivo foi então determinado  $T_{2a} = 0,795$  s através da Eq. (4.17) do Capítulo 4, e tomando o valor do segundo momento,  $M_2 = 2,12 \times 10^{10} s^{-2}$  para as moléculas de água.<sup>40</sup> Para a solução de glicose,  $P_b = 0,1412$ , foi usada a Eq. (5.6) e obtido um valor de tempo de relaxação efetivo das moléculas de água  $T_{2a} = 1,24$  s. Este valor é simplesmente a média ponderada entre as moléculas da camada de hidratação e as livres. As curvas de dispersão para os novos valores de  $T_{2a}$  (curvas pretas) são mostradas na Figura 5.9 e os parâmetros resumidos na Tab 5.6 em comparação com os valores previamente apresentados com  $T_{2a} = 2,0$  s (curvas em vermelho).



**Figura 5.9.** Curvas de dispersão para soluções aquosas de glicose nas concentrações  $P_b = 0,1412$  (símbolos vazados) e  $0,2340$  (símbolos fechados), à 300 K. Os parâmetros dos ajustes teóricos das curvas são resumidos na Tabela 5.6. Os ajustes com  $T_{2a} = 2,0$  s são representados pela curvas em vermelho, enquanto as curvas pretas foram calculadas a partir dos respectivos valores mostrados na Tab. 5.6.

Como pode ser observado, praticamente não há variações nos parâmetros  $k_b$  e  $\delta\omega$  usando o valor de  $T_{2a}$  igual à água de *bulk* ou levando-se em conta os retardamentos provocados pelas moléculas de glicose. Ademais, também não há diferenças entre as linhas ajustadas (linhas vermelha e preta) e portanto, o processo de troca química não depende, pelo menos de forma significativa, da dinâmica dos movimentos moleculares da água. No entanto, ao incluir os retardamentos das moléculas de água, os valores determinados de  $T_{2b}$  são maiores do que os determinados assumindo  $T_{2a} = 2,0$  s

**Tabela 5.6.** Parâmetros de composição e do ajuste teórico obtido a partir das curvas da Fig. 5.9.

Açúcar	$P_b$	$\delta\omega(\text{ppm})$	$k_b/s^{-1}$	$\frac{P_b k_b}{s^{-1}}$	$\frac{T_{2b}}{10^{-3}s}$	$T_{2a}/s$
Glicose	0,1412	0,99	830	117	265	1,24
		0,99	840	119	180	2,00
Glicose	0,2340	1,19	780	183	135	0,795
		1,20	780	183	102	2,00

Os valores de  $T_{2a}$  apresentados na Tab. 5.6 incluem várias aproximações, mesmo assim eles mostram que os valores dos tempos de relaxação intrínsecos do prótons dos carboidratos,  $T_{2b}$ , para as soluções de açúcares, principalmente aquelas com maiores valores de  $P_b$ , são superestimados devido à não contabilidade dos retardamentos das moléculas de água. É esperado que estes efeitos sejam mais intensos para as soluções saturadas de frutose, sacarose e D-sorbitol. Devido aos baixos valores de  $R_{H_2O/OH}$ , é esperado que nestas soluções os retardamentos sejam tão intensos que os movimentos das moléculas de água sejam mais próximos das moléculas dos carboidratos, pois nestes regimes de concentração há uma grande fração de moléculas de água participando de ligações de hidrogênio com duas moléculas de sacarídeos. Como será mostrado no próximo capítulo, para soluções saturadas de frutose e sorbitol os tempos de relaxação longitudinais dos prótons trocáveis e não trocáveis são praticamente idênticos indicando que os movimentos moleculares das moléculas de água e dos prótons dos carboidratos apresentam movimentos moleculares em escalas próximas de tempo.

Embora seja possível a aplicação do mesmo procedimento de determinação de  $T_{2a}$  da solução de glicose para as demais soluções (maltose e xilose), estes cálculos não fornecerão informações relevantes uma vez que tais considerações não interferem nas taxas de troca química. Esta consideração seria relevante para as soluções de frutose e sacarose, porém não há parâmetros suficientes na literatura para estas estimativas.

## **5.5. Conclusões**

As soluções aquosas dos carboidratos deste estudo apresentam diferenças significativas nos tempos de relaxação nos seus respectivos limites de solubilidade. Esta diferença reflete o fato de os vários carboidratos apresentarem diferentes solubilidades implicando em dinâmicas dos movimentos moleculares distintas (tanto moléculas de água quanto dos carboidratos). Independentemente deste fato, os açúcares apresentam diferenças significativas na capacidade de realizar trocas protônicas com as moléculas de água. Nas mesmas condições de concentração e temperatura foi verificado que o grupo frutofuranosil apresenta fluxo de trocas protônicas consideravelmente mais lentas do que a unidade glicopiranosídea e da forma linear (D-sorbitol). Este comportamento relaciona-se qualitativamente com o fato de os deslocamentos químicos de unidades frutofuranosídeas são em média 1ppm menores do que os respectivos grupos de unidades glicopiranosídeas. Além disso, a capacidade de trocas protônicas também parece relacionar com a fração de grupos OH em orientação equatorial. Juntamente com a maior flexibilidade da cadeia linear do D-sorbitol, os

grupos orientados equatorialmente leva a uma maior taxa de troca de prótons do que as forma piranosídea e furanosídea.

## 5.6. Referências

- (1) Kabayama, M. A.; Patterson, D. THE THERMODYNAMICS OF MUTAROTATION OF SOME SUGARS: II. THEORETICAL CONSIDERATIONS. *Canadian Journal of Chemistry* **1958**, *36*, 563-573.
- (2) Hills, B. *MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN FOOD SCIENCE*; John Wiley & Sons, INC.: New York, 1998.
- (3) Tait, M. J.; Suggett, a.; Franks, F.; Ablett, S.; Quickenden, P. a. Hydration of monosaccharides: A study by dielectric and nuclear magnetic relaxation. *Journal of Solution Chemistry* **1972**, *1*, 131-151.
- (4) Suggett, a.; Ablett, S.; Lillford, P. J. Molecular motion and interactions in aqueous carbohydrate solutions. II. Nuclear-magnetic-relaxation studies. *Journal of Solution Chemistry* **1976**, *5*, 17-31.
- (5) Suggett, A. Molecular motion and interactions in aqueous carbohydrate solutions. III. A combined nuclear magnetic and dielectric-relaxation strategy. *Journal of Solution Chemistry* **1976**, *5*, 33-46.
- (6) Uedaira, H.; Ikura, M.; Uedaira, H. Natural-Abundance Oxygen-17 Magnetic Relaxation in Aqueous Solutions of Carbohydrates. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 1-4.
- (7) Uedaira, H.; Ishimura, M.; Tsuda, S.; Uedaira, H. Hydration of Oligosaccharides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 3376-3379.
- (8) Cheetham, N. W. H.; Lam, K. Hydration Studies of Carbohydrates. IV N.M.R. Studies of Carbohydrate Hydration. *Aust. J. Chem.* **1996**, *49*, 365-369.
- (9) Hills, B. P.; Wright, K. M.; Gillies, D. G. A Low-field , Low-cost Halbach Magnet Array for Open-access NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **2005**, *175*, 336-339.
- (10) Hills, B. P.; Tang, H. R.; Manoj, P.; Destruel, C. NMR diffusometry of oil-in-water emulsions. *Magnetic resonance imaging* **2001**, *19*, 449-51.
- (11) Hills, B.; Costa, A.; Marigheto, N.; Wright, K. Applied Magnetic Resonance T1-T2 N M R Correlation Studies of High-Pressure-Processed Starch and Potato Tissue. *Methods* **2005**, *27*, 13-27.

- (12) Marigheto, N.; Duarte, S.; Hills, B. P. Applied Magnetic Resonance NMR Relaxation Study of Avocado Quality. *Applied Magnetic Resonance* **2005**, *701*, 687-701.
- (13) Hernández-Sánchez, N.; Hills, B. P.; Barreiro, P.; Marigheto, N. An NMR study on internal browning in pears. *Postharvest Biology and Technology* **2007**, *44*, 260-270.
- (14) Furfaro, M. E.; Marigheto, N.; Moates, G. K.; Cross, K.; Parker, M. L.; Waldron, K. W.; Hills, B. P. Multidimensional NMR cross-correlation relaxation study of carrot phloem and xylem. Part I: Peak assignment. *Applied Magnetic Resonance* **2009**, *35*, 521-535.
- (15) Furfaro, M. E.; Marigheto, N.; Moates, G. K.; Cross, K.; Parker, M. L.; Waldron, K. W.; Hills, B. P. Multidimensional NMR cross-correlation relaxation study of carrot phloem and xylem. Part II: Thermal and high-pressure processing. *Applied Magnetic Resonance* **2009**, *35*, 537-547.
- (16) Sila, D. N.; Duvetter, T.; De Roeck, A.; Verlent, I.; Smout, C.; Moates, G. K.; Hills, B. P.; Waldron, K. K.; Hendrickx, M.; Van Loey, A. Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science & Technology* **2008**, *19*, 309-319.
- (17) Hürlimann, M. ; Venkataramanan, L. Quantitative Measurement of Two-Dimensional Distribution Functions of Diffusion and Relaxation in Grossly Inhomogeneous Fields. *Journal of Magnetic Resonance* **2002**, *157*, 31-42.
- (18) Monteilhet, L.; Korb, J.-P.; Mitchell, J.; McDonald, P. Observation of Exchange of Micropore Water in Cement Pastes by Two-dimensional T2-T2 Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry. *Physical Review E* **2006**, *74*, 061404-9.
- (19) Allerhand, A.; Gutowsky, H. S. Spin—Echo NMR Studies of Chemical Exchange. I. Some General Aspects. *The Journal of Chemical Physics* **1964**, *41*, 2115.
- (20) Allerhand, A.; Gutowsky, H. S. Spin-Echo Studies of Chemical Exchange. II. Closed Formulas for Two Sites. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, *42*, 1587.
- (21) Bloch, F. Nuclear induction. *Physical Review* **1946**, *70*, 460-474.
- (22) McConnell, H. M. Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *The Journal of Chemical Physics* **1958**, *28*, 430.
- (23) CARVER, J.; RICHARDS, R. A General Two-site Solution for the Chemical Exchange Produced Dependence of T2 upon the Carr-Purcell Pulse Separation. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1972**, *6*, 89-105.

- (24) Hills, B. P.; Wright, K. M.; Belton, P. S. Proton N.M.R. Studies of chemical and Diffusive Exchange in Carbohydrate Systems. *Molecular Physics* **1989**, *67*, 1309-1326.
- (25) Belton, P. S.; Ring, S. G.; Botham, R. L.; Hills, B. P. Multinuclear NMR Studies of Water in Solutions of Simple Carbohydrates. I. *Molecular Physics* **1991**, *72*, 1123-1134.
- (26) Hills, B. P. Multinuclear NMR Studies of Water in Solutions of Simple Carbohydrates. *Molecular Physics* **1991**, *72*, 1099-1121.
- (27) Swift, T. J.; Connick, R. E. NMR-Relaxation Mechanisms of O17 in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *The Journal of Chemical Physics* **1962**, *37*, 307.
- (28) Hills, B. P. Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Studies of Proton Exchange in Methanol-Water Mixtures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1990**, *86*, 481-487.
- (29) Eisenberg, D.; Kauzmann, W. *The Structure and Properties of Water*; Clarendon Press: Oxford, 1969.
- (30) Delpuech, J.-J. Dynamics of solutions and fluid mixtures by NMR. In *Journal of Molecular Structure*; J.-J. Delpuech, Ed.; Wiley: Chichester, 1995; Vol. 405, pp. 1-17.
- (31) Padua, G. W.; Schmidt, S. J. Proton Nuclear Magnetic Resonance Measurements on Various Sugar Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, *40*, 1524-1527.
- (32) Sonoda, M. T.; Skaf, M. S. Carbohydrate Clustering in Aqueous Solutions and the Dynamics of Confined Water. *The journal of physical chemistry. B* **2007**, *111*, 11948-11956.
- (33) Rao, V. S. R.; Qasba, P. K.; Balaji, P. V.; Chandrasekaran, R. *Conformation of Carbohydrates*; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, 1998.
- (34) Galema, S. A.; Hoeliland, H. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 3. Density and ultrasound measurements. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 5321-5326.
- (35) Pomata, M. H. H.; Sonoda, M. T.; Skaf, M. S.; Elola, M. D. Anomalous Dynamics of Hydration Water in Carbohydrate Solutions. *The journal of physical chemistry. B* **2009**, *113*, 12999-3006.

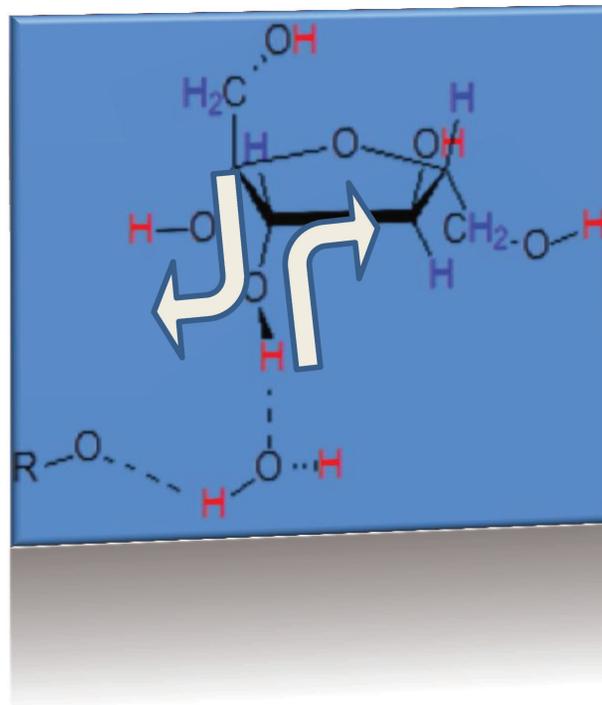
- (36) Harvey, J. M.; Symons, M. C. R. The Hydration of Monosaccharides-an NMR Study. *Journal of Solution Chemistry* **1978**, *7*, 571-586.
- (37) Fabri, D.; Williams, M. a. K.; Halstead, T. K. Water T2 relaxation in Sugar Solutions. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 889-905.
- (38) Modig, K.; Liepinsh, E.; Otting, G.; Halle, B. Dynamics of protein and peptide hydration. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 102-14.
- (39) Lee, S. L.; Debenedetti, P. G.; Errington, J. R. A computational study of hydration, solution structure, and dynamics in dilute carbohydrate solutions. *The Journal of chemical physics* **2005**, *122*, 204511.
- (40) Cowan, B. *Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation*; Cambridge University Press: Cambridge, 1997; p. 435.



# Capítulo 6

---

## Soluções aquosas de carboidratos simples estudadas por relaxometria 2D





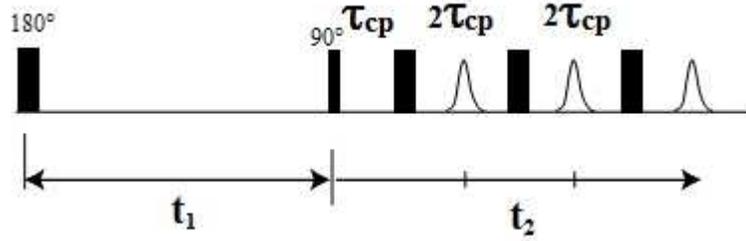
## 6.1. *Introdução*

Apesar do elevado potencial da relaxometria 1D no estudo de processos dinâmicos, ela apresenta limitações quando empregada na caracterização de populações de prótons, principalmente em matrizes heterogêneas em que grupos apresentando os mesmos valores de  $T_2$  porém com distintos valores de  $T_1$ , ou vice-versa, não podem ser apropriadamente caracterizados. A relaxometria de correlação cruzada ou simplesmente relaxometria bi-dimensional (2D), surge como uma alternativa para a caracterização dinâmica de sistemas dos mais simples (soluções de moléculas pequenas) até matrizes complexas como alimentos e tecidos celulares. Dentre outras vantagens, a relaxometria 2D permite que picos que apresentem um mesmo valor de  $T_2$  mas diferem em  $T_1$ , ou inversamente, o mesmo valor de  $T_1$  e diferem os valores do  $T_2$ , possam ser resolvidos em duas dimensões e fornecer picos separados em soluções de polissacarídeos, proteínas, e até mesmo soluções de mono e dissacarídeos.

Neste capítulo os aspectos dinâmico das interações água-carboidratos serão explorados por relaxometria de correlação cruzada 2D de soluções aquosas de carboidratos em regimes concentrados próximo ao limite de solubilidade. Para tal, uma breve introdução dos princípios básicos da relaxometria 2D são apresentados.

### 6.1.1. *Relaxometria de correlação cruzada* $T_1 - T_2$

Nos estudos de relaxometria de amostras contendo mais de uma população de prótons é comum o uso de uma sequência de recuperação de inversão antes da implementação da sequência CPMG, tal que o intervalo de tempo  $t_1$ , entre o pulso de  $180^\circ$  e o pulso de  $90^\circ$  é apropriadamente ajustado para satisfazer a condição  $t_1 = T_1 \ln 2$ . Este procedimento é usado, por exemplo, para suprimir o pico da água em soluções de açúcares selecionando-se adequadamente o valor de  $t_1$  para anular o sinal dos prótons da água.<sup>1</sup> Ao invés de usar um único pulso de  $90^\circ$  e medir o decaimento da sequência CPMG no domínio de tempo  $t_2$ , é possível a implementação da sequência de inversão de recuperação variando-se a dimensão  $t_1$  e adquirindo a intensidade dos ecos de spin imediatamente após o pulso de  $90^\circ$ . Posteriormente a esta etapa, os ecos de spin da sequência CPMG são adquiridos na dimensão  $t_2$ , e assim obtêm-se a relaxometria de correlação cruzada em duas dimensões  $T_1-T_2$ . A sequência de pulsos para a relaxação cruzada 2D pode ser resumida pela sequência de pulsos<sup>2</sup>  $[180^\circ_x - t_1 -]_i - 90^\circ_x - [\tau_{cp} - 180^\circ_y - \tau_{cp} - \text{eco} -]_j -$  e apresentada esquematicamente na Figura 6.1. “ $i$ ” e “ $j$ ” são variados para obter os sinais nas dimensões  $T_1$  e  $T_2$ . Após a aplicação do pulso de  $180^\circ$  um intervalo de tempo  $t_1$  é esperado até a aplicação do pulso de  $90^\circ$  e subsequente determinação da intensidade da magnetização no plano  $x$ - $y$ . Durante a dimensão  $t_1$  ocorre relaxação longitudinal. Após o pulso de  $90^\circ$  e aquisição da intensidade em  $t = t_1$ , inicia-se a dimensão  $t_2$  com uma sequência de pulsos CPMG obtendo-se os ecos de spin a cada intervalo de tempo  $2\tau_{cp}$ .



**Figura 6.1.** Representação esquemática da sequência de pulso para relaxometria de correlação cruzada  $T_1 - T_2$ . No domínio de tempo  $t_1$  ocorre relaxação longitudinal e para cada valor de  $t_1$  na sequência inversão de recuperação é obtido a curva de decaimento dos ecos de spin na dimensão  $t_2$ . Durante esta última dimensão ocorre relaxação transversal e, se houver processos de transferência de magnetização entre os reservatórios de prótons, poderá ocorrer o surgimento de picos cruzados.

Durante o período de tempo  $t_1$  o sistema é dominado pela relaxação longitudinal e durante o tempo  $t_2$  pela relaxação transversal e, se houver processos de transferência de magnetização, os tempos  $T_{1(a,b)}$  e  $T_{2(a,b)}$  serão afetados.

O sinal de RMN 2D,  $M(t_1, t_2)$ , é uma função das dimensões  $t_1$  e  $t_2$  e pode ser descrita matematicamente pela equação<sup>3</sup>

$$M(t_1, t_2) = \iint \left[ \left( 1 - 2e^{-\frac{t_1}{T_1}} \right) e^{-\frac{t_2}{T_2}} \mathcal{F}(T_1, T_2) + E(t_1, t_2) \right] dT_1 dT_2 \quad (6.1)$$

em que  $\mathcal{F}(T_1, T_2)$  é a distribuição de tempos de relaxação longitudinal e transversal, os quais são obtidos pela transformação inversa de Laplace em 2D dos dados experimentais de  $M(t_1, t_2)$ . O parâmetro  $E(t_1, t_2)$  corresponde ao ruído, que se mostra um fator crítico em vários experimentos de relaxação de correlação cruzada podendo levar ao aparecimento de picos em regiões proibidas do espectro 2D ou picos que não estão relacionados a nenhuma população de spins. Os tempos  $T_1$  e  $T_2$  e o espectro 2D  $T_1 - T_2$  são obtidos da

transformação inversa de Laplace por meio de um algoritmo que foi descrito por Song e colaboradores em 2002.<sup>3</sup>

De acordo com Hills e colaboradores,<sup>2</sup> os processos moleculares responsáveis pela relaxação cruzada 2D podem ser descritos como segue. Considerando dois reservatórios de prótons com tempos intrínsecos de relaxação longitudinal e transversal,  $T_{1,2(a)}$  e  $T_{1,2(b)}$ ,  $a$  e  $b$ , referentes às duas populações. Na ausência de relaxação cruzada, situação em que as duas populações de prótons comportam-se como se estivessem isoladas uma da outra, são esperados dois picos bem resolvidos ao longo da linha diagonal com seus respectivos tempos de relaxação  $T_{1,2(a)}$  e  $T_{1,2(b)}$ . Porém, se houver a possibilidade de relaxação cruzada poderá haver a formação de picos cruzados com tempos de relaxação que são a combinação dos tempos reais das populações. As relaxações cruzadas são causadas por troca química (transferência de prótons), ou no caso de relaxação longitudinal, por interações dipolares, ou por difusão de spins, com taxas de relaxação  $R_{1,2(a)}$  e  $R_{1,2(b)}$ . Os fluxos de magnetização entre as populações estão sujeitos à condição estacionária  $M_a^0 k_{a1} = M_b^0 k_{b1}$  e  $M_a^0 k_{a2} = M_b^0 k_{b2}$  para as populações  $a$  e  $b$  e para as relaxações longitudinal (1) e transversal (2). Assim, de acordo com Hills e colaboradores,<sup>2</sup> a equação para a evolução temporal das magnetizações e da relaxação cruzada  $T_1 - T_2$  são apresentadas resumidamente no Apêndice D. As taxas de relaxação efetivas  $s^+$  e  $s^-$  são dadas pela Equação (6.2)

$$s^{\pm} = -\frac{1}{2}(R_a + k_a + R_b + k_b) \pm \{(R_a + k_a + k_b)^2 - 4[(R_a + k_a)(R_b + k_b) - k_a k_b]\}^{\frac{1}{2}} \quad (6.2)$$

Devido à simetria entre as populações  $a$  e  $b$ , as soluções matemáticas para  $M_b$  são idênticas às de  $M_a$ . A partir das equações para  $M_a$  e  $M_b$ , é possível prever

o comportamento para três diferentes regimes. Para uma situação hipotética de populações igualmente distribuídas nos sítios  $a$  e  $b$ , e assumindo-se que ambas as populações apresentam os mesmos tempos de relaxação transversal, porém diferindo os valores de  $T_1$ , obtém-se:

- (i) no limite de rápidas trocas químicas as duas populações com tempos de relaxação  $T_{1a}$  e  $T_{1b}$ , apresentam-se com um pico com tempo de relaxação transversal médio
- (ii) no limite de lentas trocas químicas haverá dois picos de relaxação longitudinal  $T_{1a}$  e  $T_{1b}$ , como se as duas populações fossem isoladas
- (iii) Para regimes intermediários, no entanto, a ocorrência de relaxação cruzada levará ao aparecimento de picos cruzados que apresentam taxas de relaxação maiores do que os valores de  $T_{1a}^{-1}$  e  $T_{1b}^{-1}$ .<sup>2</sup>

### 6.1.2. *Relaxometria de correlação cruzada* *$T_2 - store - T_2$*

A relaxometria 2D,  $T_2 - store - T_2$ , é fundamentada nas mesmas equações de Bloch modificadas para inclusão dos termos de troca química e transferência de magnetização Eq. (D.1), com a diferença óbvia de envolver explicitamente apenas termos de relaxação transversal. No Apêndice D os princípios da relaxometria de correlação cruzada  $T_2 - store - T_2$  são descritos brevemente. Neste caso a condição de equilíbrio estacionário,  $M_a^0 k_{a2} = M_b^0 k_{b2}$ , entre as populações de spins também se aplica.

A sequência  $T_2 - store - T_2$  é dividida em três períodos (etapas) com dimensões de tempo  $t_{1a}$ ,  $t_{2a}$  e  $t_{3a}$ , correspondentes aos três elementos da sequência. Durante a primeira etapa na dimensão de tempo ( $t_{1a}$ ), é iniciada a primeira sequência CPMG estando ambas as populações sujeitas à

possibilidade transferência de magnetização seja por troca química ou interação dipolar secular. A intensidade ao final dos ecos de spin é calculada de acordo com a resolução da Eq. (D.1) obtendo o valor de  $M_{a,b}(t_{1a})$  como descrito por Korb e colaboradores<sup>4</sup>

$$\begin{aligned}
M_a(t_1) = & M_a^0 \\
& - 2 \frac{(S_2^- + R_{2a} + k_{a2})M_a^0 - k_{b1}M_b^0}{S_2^- - S_2^+} \exp(S_1^+ t_{1a}) \\
& - 2 \frac{(S_2^+ + R_{a2} + k_{a2})M_a^0 - k_{b1}M_b^0}{S_2^+ - S_2^-} \exp(S_1^- t_{1a}) \quad (6.3)
\end{aligned}$$

Equações equivalentes são encontradas para o reservatório de prótons  $b$ , e as taxas de relaxação efetivas são calculadas de acordo com a Eq. (6.4)

$$\begin{aligned}
S_i^{+/-} \\
= & - \frac{(R_{ai} + k_{ai} + R_{bi})}{2} \\
& \pm \frac{1}{2} \sqrt{(R_a^{1,2} + k_a + R_b^{1,2} + k_b)^2 - 4[(R_a^{1,2} + k_a)(R_b^{1,2} + k_b) - k_a k_b]} \quad (6.4)
\end{aligned}$$

Assim, são determinadas as magnetizações após o primeiro período de relaxação,  $M_{a,b}(t_{1a})$ . Durante o período  $t_2$  a magnetização transversal é “armazenada” (*stored*) no eixo  $\pm z$  através de um pulso de  $90^\circ$ , usando a metodologia de *phase cycling*. Nesta etapa apenas relaxação longitudinal pode ocorrer. A magnetização ao fim desta segunda etapa,  $M_{a,b}(t_1, t_2)$  serve de condição inicial para o terceiro período com relaxação transversal  $M_{a,b}(t_1, t_2, t_3)$ . Esta terceira etapa se inicia após outro pulso de  $-90^\circ$  trazendo de volta a magnetização para o plano  $x$ - $y$  e a subsequente obtenção dos ecos de spin da segunda sequência CPMG.<sup>5</sup> As intensidades dos picos ao longo da

diagonal ( $P^{++}$ ;  $P^{--}$ ) e os picos cruzados fora da diagonal ( $P^{+-}$ ;  $P^{-+}$ ), são dependentes dos produtos  $\exp(S_2^{+/-}t_1)\exp(S_2^{+/-}t_3)$ , enquanto que outros termos são eliminados através da metodologia de *phase cycling*.<sup>5</sup> A sequência de pulsos  $T_2 - store - T_2$  é resumidamente descrita pela equação:

$$90^\circ_x - \tau_{cp} - [180^\circ_y - \tau_{cp} - eco]_{n_1} - 90^\circ_{-x} - store\ time - 90^\circ_x - \tau_{cp} - [180^\circ_y - \tau_{cp} - eco]_{n_2} \quad (6.5)$$

sendo  $\tau$  o intervalo interpulsos,  $n_1$  e  $n_2$  são os números de ecos de spin adquiridos na primeira e segunda sequências CPMG, respectivamente.

## 6.2. *Materiais e Métodos*

### 6.2.1. *Materiais*

Os carboidratos com seus respectivos fornecedores e purezas: D-xilose (Sigma  $\geq 99\%$ ); D-glicose (AnalarR<sup>®</sup>  $\geq 98\%$ ); D-frutose (Sigma  $\geq 99\%$ ); Sacarose (Sigma  $\geq 99\%$ ), D-matose.H<sub>2</sub>O (Aldrich  $\geq 98$ ); D-sorbitol (Aldrich  $\geq 99\%$ ), foram utilizados sem purificações posteriores. As soluções aquosas foram preparadas usando água deionizada (18.2 M $\Omega$ ) e deixadas em temperatura entre 27-29 °C por pelo menos 72h para atingir o equilíbrio de solubilidade. As concentrações das soluções saturadas e em outras concentrações são apresentadas nas Tabelas 5.1, 5.3, e 5.4. Não foi necessário o ajuste dos pH's pois para todas as soluções dos diferentes sacarídeos os valores ficaram na faixa  $5,6 \leq \text{pH} \leq 6,2$ , estando, portanto, na região de trocas neutras.

### 6.2.2. *Medidas de Relaxação de correlação cruzada*

#### *$T_1 - T_2$ e $T_2 - T_2$*

Todos os experimentos de RMN deste capítulo foram realizados no Equipamento DRX (Resonance Instruments) operando a 100,12 MHz e temperatura de 300K.

As medidas de relaxometria 2D  $T_1 - T_2$  foram realizadas através de uma único pulso inicial empregando-se a sequência de pulsos de *recuperação de inversão-CPMG*, em que a etapa de inversão [ $180^\circ_x - t_1 -$ ] é inserida em frente da sequência CPMG. Foram corridos 64 *single shots* (iterações) da sequência contendo os domínios  $T_1$  como mostrada na Fig. 6.1 com diferentes valores de  $t_1$  distribuídos logaritmicamente na faixa de ( $10^2$  a  $10^{7,2}$ )  $\mu\text{s}$  de maneira tal que ao final, toda a magnetização longitudinal fora recuperada. Na dimensão  $t_2$  (Fig. 6.1) os parâmetros da sequência CPMG foram ajustados de maneira que o número de ecos e/ou o intervalo interpulos  $\tau$ , fossem variados para obter decaimentos da magnetização com linha base igual a zero. Os valores típicos de intervalo entre os pulsos ( $90-180^\circ$ ) usados para as soluções em altas concentrações e saturadas dos açúcares foram:  $\tau$  (100-300)  $\mu\text{s}$ . O tempo de espera,  $RD$ , entre cada iteração da sequência  $T_1 - T_2$  foi escolhido de modo a satisfazer a condição  $RD \geq 5T_1$ .

As medidas de relaxometria de correlação cruzada  $T_2 - T_2$  foram realizadas usando a sequência de pulsos descrita na Eq. (6.5) e sempre após às medidas de  $T_1 - T_2$ , e empregando-se os mesmos tempos de reciclagem e os mesmos valores de  $\tau$ . Os valores típicos do intervalo em que a magnetização é “armazenada” no eixo-z, *sobre time*, situou-se na faixa de 0,500 – 1000 ms.

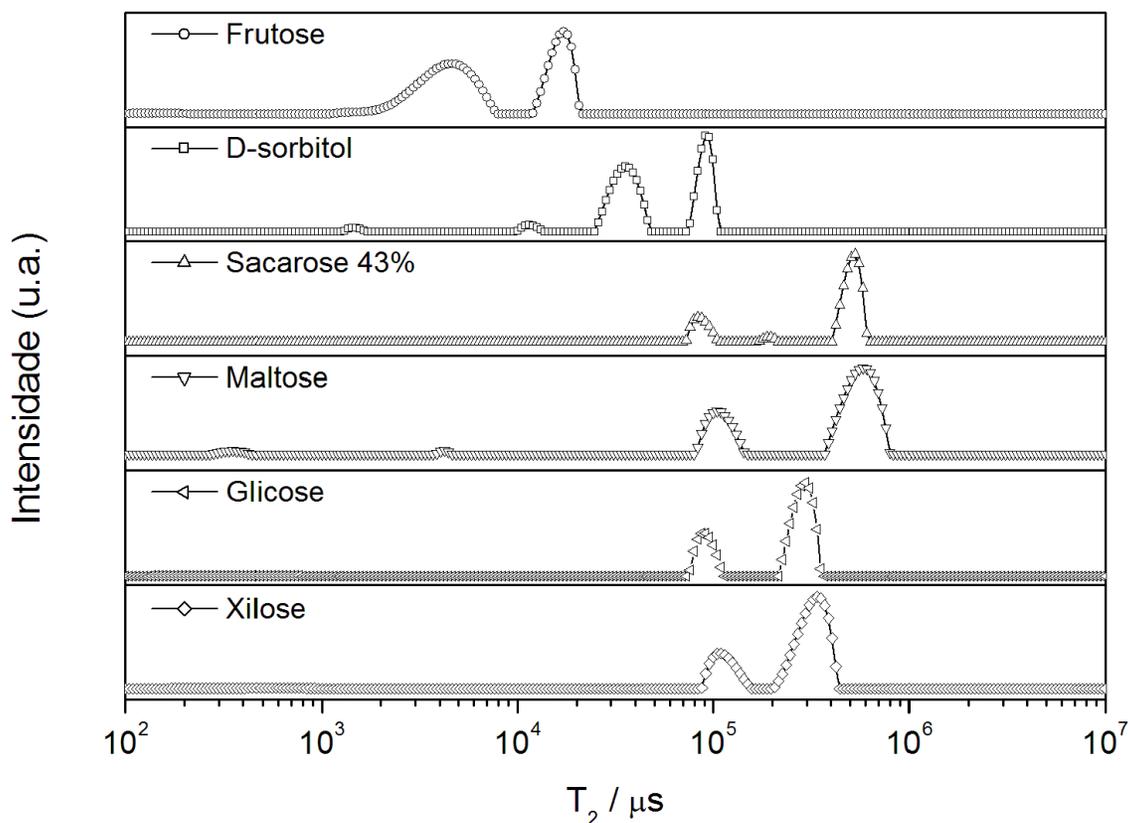
É importante salientar que os tempos  $\tau$  foram suficientemente curtos para que os efeitos de troca química não influíssem sobre os valores taxa de relaxação

transversal dos prótons trocáveis. No entanto, as trocas protônicas e as transferências de magnetização entre os spins das diferentes populações continuam ocorrendo normalmente. O processamento dos dados foram feitos com o *script* desenvolvido em plataforma MATLAB<sup>®</sup> por Kevin Wright pesquisador do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear situado no Institute of Food Research, empregando o algoritmo proposto inicialmente por Song e colaboradores.<sup>3</sup> Todos os experimentos de relaxometria no domínio do tempo deste capítulo e do Capítulo 5, foram realizadas durante estágio sanduíche entre abril e julho de 2011.

### 6.3. Resultados e Discussão

#### 6.3.1. Relaxometria de correlação cruzada $T_1 - T_2$

Os espectros de relaxometria bi-dimensionais foram estudados em regiões das curvas de dispersão de rápidas taxas de pulsos, i.e.  $\left(\frac{1}{\tau_{cp}} \gg k_b\right)$  e com intervalos intertupulsos na faixa  $100 < \tau_{cp} > 300 \mu s$ . Nesta faixa de aplicação de pulsos os efeitos das trocas protônicas sobre os valores de  $T_2$  são desprezíveis e os resultados obtidos nos espectros 2D são preponderantemente devidos à processos de transferência de magnetização por interações dipolares modulados por movimentos roto-difusionais. Previamente às medidas bidimensionais foram realizadas as medidas de  $T_2$  em 1D. A Figura 6.2 mostra os espectros de relaxação 1D para as soluções saturadas dos carboidratos, com exceção da sacarose que é apresentado na mesma concentração mássica da maltose cerca de 43% m/m.



**Figura 6.2.** Espectros de RMN no domínio do tempo para soluções saturadas dos carboidratos obtidos através dos ecos de spin da sequência CPMG ( $\tau = 100\mu\text{s}$ ) e à temperatura de 300K.

Com algumas exceções provocados por prováveis ruídos durante a transformação inversa de Laplace 1D (ver Equação (6.1) deste capítulo), todas as soluções apresentaram basicamente duas populações de prótons com tempos de relaxação característicos, os quais dependem do carboidrato. Atribui-se às populações com maior mobilidade molecular e, portanto, com valores mais altos de  $T_2$  aos prótons trocáveis ( $\text{H}_2\text{O} + \text{OH}$ -carboidratos), já as populações com tempos mais curtos de  $T_2$  são atribuídas aos prótons C-H não trocáveis. Esta atribuição também se baseou no fato de que os picos com  $T_2$  mais elevados dependiam dos intervalos interpulsos,  $\tau$ , (resultados não mostrados) enquanto o pico associado aos prótons CH não alteravam com

respeito a  $\tau$ . A Tabela 6.1 resume os tempos de relaxação das duas populações de prótons e suas respectivas frações relativas.

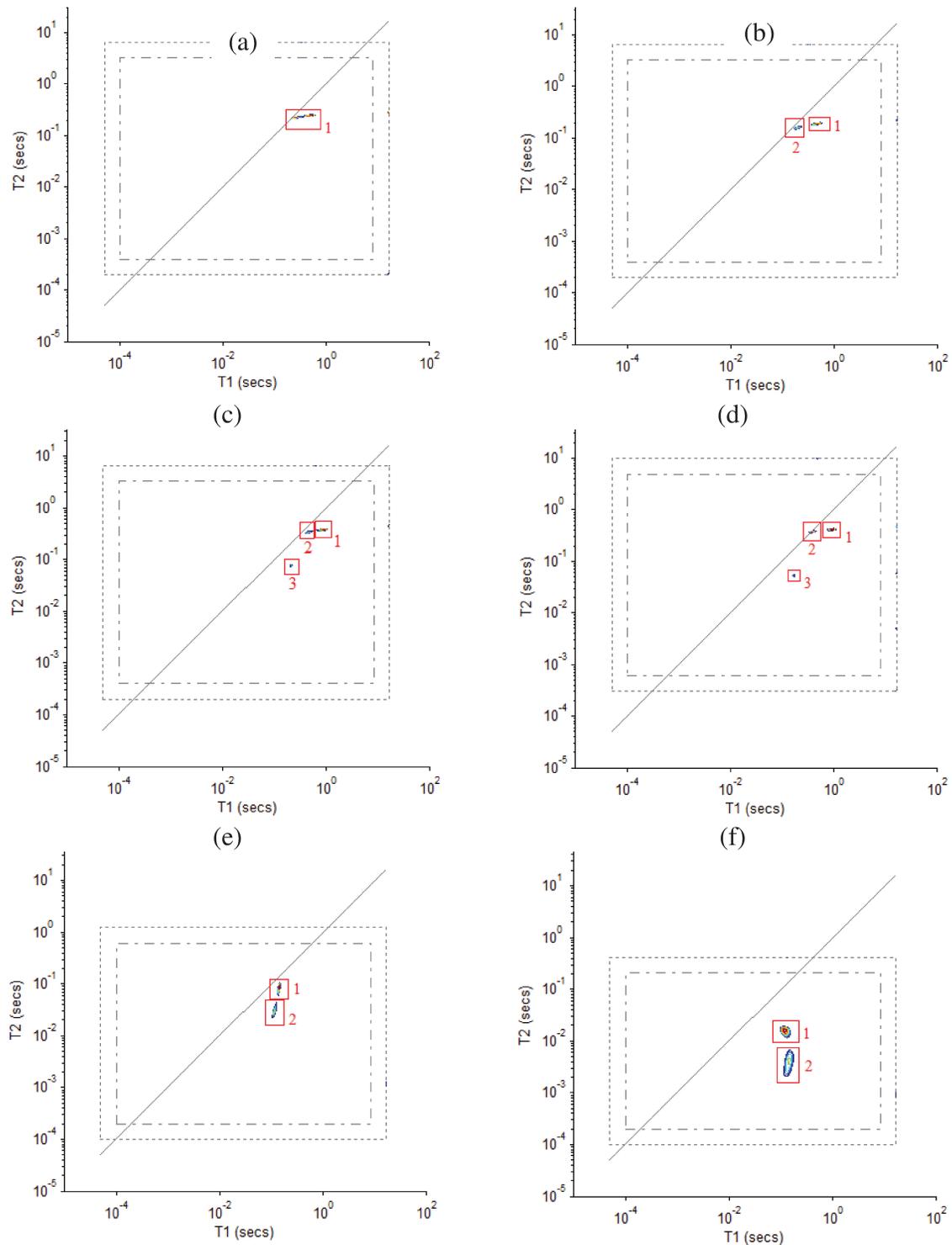
**Tabela 6.1.** Tempos de relaxação transversal dos prótons trocáveis ( $H_2O + OH$ -carboidratos) e não trocáveis (CH) para as soluções aquosas de carboidratos com suas respectivas intensidades obtidas a partir dos espectros temporais mostrados na Fig. 6.2. A fração de prótons não trocáveis,  $f_{CH}$ , obtidas a partir da composição das amostras também é apresentada para comparação com os as áreas dos picos.

Açúcar	Área relativa (%)			$T_2/10^{-3}s$	
	CH	Trocáveis	$f_{CH}$	CH	Trocáveis
D-xylose	20,3	79,7	23,5	109	338
D-glucose	22,0	78,0	24,7	87,3	295
D-fructose	38,1	61,9	41,4	5,82	19,7
D-sorbitol	36,4	63,6	36,2	35,4	91,4
Maltose	22,8	77,2	17,9	105	582
Sacarose 43%	18,7	81,3	19,5	83,5	531

Pode-se notar que as populações relativas dos picos para os prótons trocáveis e os não trocáveis CH estão em concordância com os valores esperados a partir da fração de prótons CH,  $f_{CH}$ , determinado pela composição das soluções. Outro ponto a ser salientado é que valores de  $T_2$  para os prótons CH são ligeiramente mais baixos, porém muito próximos dos valores de  $T_{2b}$  apresentados na Tab. 5.1 e 5.5 do Capítulo 5, obtidos a partir do ajuste do modelo de dois sítios. Apesar de alguns autores considerarem que os prótons OH e CH de carboidratos apresentam os mesmos tempos de relaxação, é esperado que os prótons OH apresentem mobilidades ligeiramente maiores pois estes grupos apresentam uma possibilidade a mais de movimentos de

reorientação molecular. Assim, estes valores concordam entre si e indicam que os resultados obtidos a partir do modelo de trocas químicas são confiáveis e que os sistemas encontram-se de fato no regime de rápidos movimentos moleculares. Tanto os grupos OH quanto CH e ainda as moléculas de água apresentam dinâmicas moleculares distintas. Por exemplo, é esperado que os prótons CH<sub>2</sub> e OH no carbono 6 da glicose apresentem tempos de correlação mais curtos do que os respectivos prótons CH e OH do carbono 2. A transformada inversa de Laplace assume que os tempos de relaxação formam uma distribuição com infinitos tempos de relaxação e com o parâmetro de regularização,  $\alpha = 1$ , usado em todas as operações de inversão de Laplace, não há resolução suficiente para uma possível separação entre os prótons OH dos carboidratos e da H<sub>2</sub>O, além disso, estas populações estão em regime de rápidas trocas químicas. Também não é possível separar os prótons não trocáveis das unidades que compõem os dissacarídeos, ou por falta de resolução ou porque estes picos apresentam distribuições de  $T_2$  idênticas ou muito próximas.

A Figura 6.3 apresenta os espectros 2D  $T_1 - T_2$  para as soluções saturadas dos sacarídeos e a Tabela 6.2 apresenta os valores de intensidade relativa dos picos com seus respectivos valores de  $T_1$  e  $T_2$ . Para a glicose no limite de solubilidade, e para os dissacarídeos maltose e sacarose à concentração de aproximadamente 43% em massa, aparecem dois picos próximos à linha diagonal ( $T_1 \approx T_2$ ). Estes sacarídeos apresentam picos cujos valores na dimensão  $T_2$  não variam consideravelmente entre as populações, enquanto que na dimensão  $T_1$  há uma clara separação. Uma tendência semelhante é observada para a xilose, porém, sem apresentar separação clara entre os dois picos.



**Figura 6.3.** Espectros de relaxometria 2D  $T_1 - T_2$  das soluções aquosas saturadas dos carboidratos: (a) xilose; (b) glicose; (c) maltose; (d) sacarose; (e) sorbitol, e (f) frutose.  $\tau = 200\mu\text{s}$  e  $RD \geq 6,0$  s, enquanto na dimensão  $T_1$  faixa de tempo de aquisição da sequência de recuperação de inversão foi de 0,1 a 9000 ms.

Nos casos da glicose, maltose e sacarose, pode-se atribuir os picos com valores mais altos na dimensão  $T_1$  aos prótons trocáveis e os mais lentos aos prótons CH não trocáveis. A não influência de trocas protônicas sobre a relaxação longitudinal deixa os processos de relaxação mais restritos para esta última população. Há uma diferença considerável nos valores de  $T_2$  obtidos pelo espectro 2D em comparação ao 1D. Em geral, nos espectros 2D os valores de  $T_2$  encontram-se em regiões intermediários entre os valores encontrados em 1D. Este fato é marcante para os sacarídeos com tempos de relaxação maiores como xilose, glicose, maltose e sacarose, e já para sorbitol e frutose, há uma boa concordância dos valores de  $T_2$  nos espectros 1D e 2D (ver Tabelas 5.1, 5.3 e 6.2). Uma possível explicação para este fato seria a alta mobilidade das moléculas de água que transferem magnetização entre as populações e alteram os tempos de relaxação nos espectros de correlação cruzada.

No limite de rápidas trocas de prótons e transferência de magnetização, só haveria um pico como mostrado através de simulações.<sup>6</sup> Já com valores lentos de transferência de magnetização seriam esperados dois picos com os mesmos tempos de relaxação do espectro 1D. E em valores intermediários os picos apareceriam em posições intermediárias às duas populações. A transferência de magnetização não se mostrou efetiva na dimensão  $T_1$ , que apresenta um grande dispersão dos tempos de relaxação ao longo desta dimensão. Apenas para citar, os valores mínimo e máximo de  $T_1$  para xilose Fig. 6.2-(a) variam entre 198 e 711 ms.

**Tabela 6.2.** Intensidade relativa dos picos e seus respectivos valores dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  obtidos dos espectros de correlação cruzada apresentados na Figura 6.3.

Sacarídeo	Pico	Área relativa	$T_1 / ms$	$T_2 / ms$
Xilose	1	98%	531	249
Glicose	1	66,4	488	189
	2	30,3	200	159
Maltose	1	61,5	924	379
	2	23,8	468	341
	3	11,9	218	76,5
Sacarose 43%	1	54,7	924	415
	2	34,7	395	374
	3	9,1	169	51,5
Sorbitol	1	39,2	142	87,2
	2	32	115	29,9
Frutose	1	35,4	120	15,8
	2	51,1	142	4,16

Embora os rápidos movimentos moleculares fazem com que haja uma transferência de magnetização eficiente entre as população de prótons trocáveis e não trocáveis na dimensão  $T_2$ , as moléculas de carboidrato e de água apresentam dinâmicas ou escalas de movimentos moleculares distintas. Como os valores de  $T_1$  são menos sensíveis a trocas químicas do que  $T_2$ , os picos que caracterizam os movimentos das moléculas de água e dos prótons não trocáveis permanecem separados. Essa tendência é válida para todos os

sacarídeos enquanto os movimentos das moléculas de água são descorrelacionados com escalas de tempo distintas das dos carboidratos.

Na medida em que os tempos de correlação das moléculas de água aumentam e no momento em que todas as moléculas de água presentes no sistema encontram-se ligadas às moléculas de carboidrato por ligações de hidrogênio, o tempo de correlação das moléculas de água é abruptamente reduzido. Nas soluções concentradas de sorbitol e frutose há, em média, menos de uma molécula de água para cada grupo OH (Tabelas 5.2 e 5.3 do Cap. 5). Nesta condição, há uma considerável população de moléculas de água participando de ligações de hidrogênio com duas moléculas de sacarídeos e, por isso, com longos tempos de correlação. Nestas soluções, os valores de  $T_1$  para os prótons trocáveis e não trocáveis são próximos (Figura 6.3 e Tab. 6.2) indicando dinâmicas dos movimentos moleculares mais próximas. Já os valores de  $T_2$  obtidos pelos espectros 2D são próximos dos valores obtidos em 1D e apresentam considerável diferença entre os valores de  $T_2$  para prótons trocáveis e não trocáveis. Para exemplificar, os valores de  $T_2$  da solução saturada de sorbitol 1D são 91 e 35 ms, respectivamente para os prótons trocáveis e não trocáveis. No espectro 2D (Fig. 6.3 e Tab. 6.2) os respectivos valores são 30 e 87 ms. A separação clara dos picos na dimensão  $T_2$  para as soluções de frutose é um indício de que as transferências de magnetização entre as populações trocáveis e não trocáveis não é eficiente devido aos lentos movimentos moleculares. Uma possível origem deste efeito seria que, para soluções altamente concentradas, tal que  $R_{H_2O/OH} < 1$ , as moléculas de água apresentam mobilidades mais próximas da dos grupos OH dos carboidratos, pois nestas concentrações as moléculas de água podem se ligar a duas moléculas de carboidrato. Obviamente, as trocas protônicas também influenciam este processo de transferência de magnetização por interações

dipolares. No caso específico da solução saturada de frutose, as taxas de trocas protônicas,  $k$ , são consideravelmente mais baixas em relação às outras soluções. Assim, na dimensão  $T_2$  há o aparecimento de duas dimensões como seria esperado em regimes de lentas trocas químicas. A taxa troca de prótons não é o único determinante pois, as trocas protônicas em sorbitol são cerca de 5 vezes mais altas do que para frutose nas mesmas frações  $P_b$  (como mostrado na Fig. 5.5-(b) e Tab. 5.3 do Capítulo 5) e mesmo assim há uma clara separação dos picos (Fig. 6.3(e)).

Os picos de  $T_2$  no espectros 2D com valores intermediários aos apresentados pelas populações trocáveis e não trocáveis podem ser explicados a partir dos espectros 1D considerando o modelo de dois sítios e assumindo o limite de rápidas trocas químicas (tanto trocas protônicas quanto transferência de magnetização por interações dipolares). Neste regime, o tempo de relaxação transversal para as duas populações de prótons mostradas nos espectros 1D da Figura 6.2 e Tab. 6.1 podem ser descritas pela Equação (6.6).

$$\frac{1}{T_2^{1D}} = \frac{f_{CH}}{T_{2,CH}} + \frac{1 - f_{CH}}{T_{2,OH}} \quad (6.6)$$

sendo  $(1 - f_{CH})$  e  $f_{CH}$  as frações das populações de prótons trocáveis e não trocáveis, respectivamente, e  $T_{2,OH}$  e  $T_{2,CH}$  são seus respectivos tempos de relaxação transversal. Na Tabela 6.3 são apresentados os valores de  $T_2^{2D}$  obtido através dos espectros 2D e os respectivos valores médios,  $T_2^{1D}$ , obtidos das duas populações dos espectros em 1D usando a Equação (6.6). Os valores de  $T_2$  nos espectros 2D  $T_1 - T_2$  podem ser razoavelmente descritos pelo processo de trocas químicas para as várias soluções mostradas na Tab. 6.3.

**Tabela 6.3:** Valores comparativos dos tempos de relaxação (ms) transversal do espectro 1D e do valor obtido do espectro 2D. Em ambos os espectros o intervalo interpulsos foi  $\tau_{cp} = 200 \mu s$ . Nem todas as soluções apresentadas nesta tabela foram apresentadas previamente na forma gráfica.

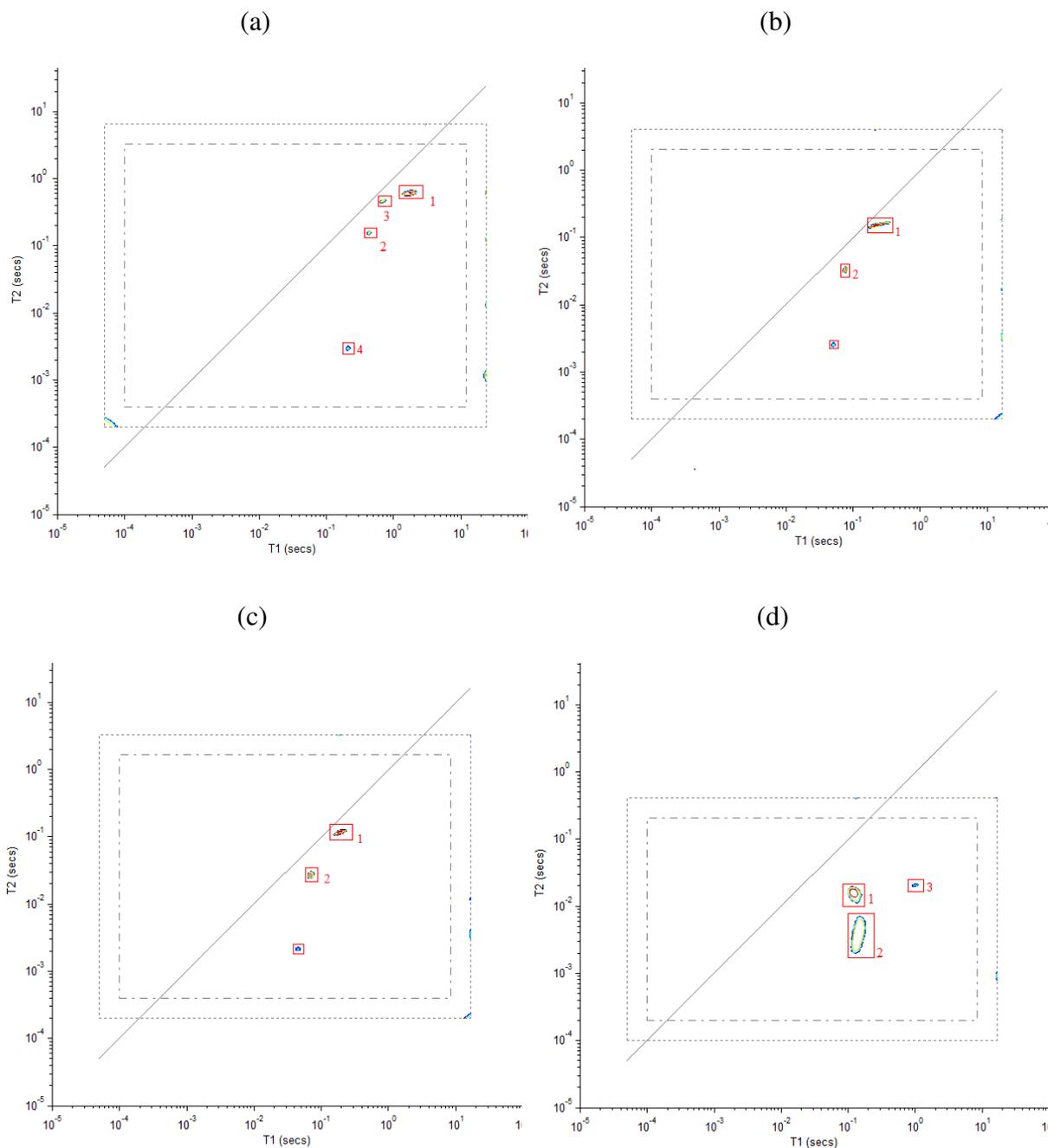
Sacarídeo	$P_b$	$f_{CH}$	$T_{2,CH}^{1D}$	$T_{2,OH}^{1D}$	$T_2^{1D}$	$T_2^{2D}$
Sacarose 43%	0,1383	0,1950	131	508	349	398
Maltose 40%	0,1271	0,1785	150	531	365	368
Glicose 39,7%	0,1412	0,1651	215	666	495	482
Xilose sat	0,2459	0,2680	120	309	217	249
Glicose sat	0,2349	0,2470	104	270	193	181

Esta concordância mostra que os prótons trocáveis e não trocáveis estão na região intermediárias/rápidas de trocas químicas. Vale à pena ressaltar, novamente, que a aproximação de rápidos movimentos moleculares, *extreme narrowing*, e rápidas trocas químicas, *exchange narrowing*, são válidos para as soluções saturadas de xilose e glicose. Nem todos os dados apresentados na Tab. 6.3 foram apresentados na forma gráfica. Os espectros 2D  $T_1 - T_2$  para as soluções de glicose e xilose saturadas, e sacarose e maltose são apresentadas na Figura 6.3. Resultados semelhantes a estes também foram obtidos para as soluções de glicose 39,7% porém o gráfico 2D não foi apresentado.

Até este ponto é possível concluir que os movimentos moleculares limitam os processos de transferência de magnetização no espectro 2D  $T_1 - T_2$  fazendo com que as soluções saturadas de sorbitol e frutose apresentem picos unívocos para as populações de prótons trocáveis e não trocáveis. Além da questão dinâmica relacionada á mobilidade, o fator taxa de troca também deve ser avaliado.

### 6.3.2. *O efeito da concentração sobre a relaxação nos espectros $T_1 - T_2$*

O efeito da concentração sobre o comportamento dos espectros de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  de soluções de sacarose 20% m/m e de frutose em diferentes concentrações é mostrado na Figura 6.4. Nestes espectros nota-se a presença de um terceiro pico que apresenta uma área relativa inferior a 0,5% do total e que pode ser atribuída a erros da transformação inversa de Laplace devido aos ruídos experimentais. Este pico sempre aparece para várias soluções sempre nas mesmas regiões. Estes picos apresentam intensidade muito baixa e foram desconsiderados no cálculo das intensidades relativas. As áreas relativas de cada pico bem como seus valores de  $T_1$  e  $T_2$  são apresentados na Tabela 6.4. Primeiramente, nota-se em todos os espectros da Figura 6.4, a presença de dois picos tanto para as soluções de frutose nos regimes de concentração intermediário e concentrado. O pico 3 nestes espectros foi atribuído aos ruídos experimentais. No caso da sacarose aparecem 4 picos sendo o quarto neste caso correspondente ao pico 3 nos espectros da frutose. A principal diferença entre a solução de concentração intermediária de sacarose Fig. 6.4-a e as soluções de frutose Fig. 6.4(b-d) é a presença do pico “3” que aqui é atribuído a um pico cruzado envolvido em processo de troca de magnetização entre os grupos OH dos prótons trocáveis (pico 1) com os prótons não trocáveis (pico 2). Para as soluções de frutose Fig. 6.4(b-d), diferentemente das soluções de unidades piranosídeas mostradas na Fig. 6.3, os picos atribuídos aos prótons trocáveis ( $H_2O + OH$ -carboidratos) encontram-se com valores de  $T_1$  e  $T_2$  univocamente definidos. Porém, ao atribuir os picos marcados como “2” aos prótons não trocáveis percebe-se que estes picos não apresentam área relativa correspondente à fração de prótons CH presente nas amostras.



**Figura 6.4.** Espectros de relaxometria 2D  $T_1 - T_2$  das soluções aquosas de: (a) sacarose 20%; e frutose: (b) 63%; (c) 66%; (d) 80% m/m (solução saturada).  $\tau = 200 \mu s$  e  $RD \geq 6,0 s$ , enquanto na dimensão  $T_1$  a faixa de tempo de aquisição da sequência de inversão de recuperação foi de 0,1 a 9000 ms distribuídos logaritmicamente.

**Tabela 6.4.** Intensidade relativa dos picos e seus respectivos valores dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  obtidos dos espectros de correlação cruzada apresentados na Figura 6.4.

Sacarídeo	$f_{CH}$	Pico	Área relativa %	$T_1 / ms$	$T_2 / ms$
Sacarose 20%	0,0807	1	89,3	1812	616
		2	4,36	428	159
		3	6,34	692	466
		4	< 0,5	155	3,84
Frutose 63%	0,2970	1	84,3	227	153
		2	15,7	75	33,2
		3	< 0,5	51,2	2,58
Frutose 66%	0,3160	1	81,5	184	116
		2	18,5	69,0	26,9
		3	< 0,5	45,1	2,14
Frutose 80% saturada	0,4140	1	40,9	120	15,8
		2	59,1	142	4,16
		3	< 0,5	1006	20,9

A distribuição espacial dos picos nos espectros 2D para a solução saturada de frutose é bastante semelhante à reportada pela primeira vez para uma solução saturada de sacarose por Marigheto e colaboradores.<sup>6</sup> Em ambos os casos os picos na dimensão  $T_2$  apresentam valores distintos para as populações trocáveis e não trocáveis, porém, os valores na dimensão  $T_1$  são bastante próximos entre estas populações. Na verdade, é possível perceber uma evolução (uma mudança) de tendência para a solução saturada de frutose. Para as concentrações de 63 e 66% , a razão entre as taxas de relaxação transversal

e longitudinal,  $T_2/T_1$ , são aproximadamente iguais a  $2/3$  para a população de prótons trocáveis. Para concentração de 80% esta razão é de  $2/15$ . Esta razão torna-se ainda menor quando comparado a população de prótons não trocáveis (CH). Neste caso as razões  $T_2/T_1$  são:  $2/5$ ,  $3/8$ , e  $1/34$ , respectivamente, para as concentrações de 63, 66, e 80% m/m. Além disso, os valores de  $T_1$  dos prótons não trocáveis que diminuía com o aumento da concentração até uma concentração 66% passa a ser maior à concentração de 80%. Esta mudança confirma que o tempo de correlação dos prótons CH nesta solução de frutose apresentam tempos de correlação superiores ao inverso da frequência de Larmor,  $\tau_c > \omega_0^{-1}$ . Estes estudos foram realizados no espectrômetro operando a 100,12 MHz e isso implica que os prótons da frutose em sua solução saturada apresentam, em média, tempos de correlação associados aos movimentos reorientacionais superiores 10 ns.

No caso das moléculas de água, esta condição limite de lentos movimentos moleculares ainda não foi atingida, uma vez que os valores de  $T_1$  ainda não atingiram um valor mínimo e continuam a diminuir com o aumento da concentração. Portanto, as moléculas de água neste regime apresenta tempos de correlação característicos inferiores a 10 ns. Em estudo de simulação por dinâmica molecular realizado por Pomata e colaboradores<sup>7</sup> as moléculas de água em soluções aquosas de frutose de concentração 67% m/m apresentam tempos de correlação reorientacionais da ordem 13 ns para moléculas ligadas aos clusters de frutose e cerca de 1,8 ns para moléculas de água não associadas aos clusters. Neste mesmo trabalho é reportado tempos da ordem de 13 ns para os movimentos reorientacionais das moléculas de frutose à concentração de 3M (~40% m/m). Levando-se em conta que as moléculas de água encontram-se em ambos os estados, associadas e não associadas aos clusters, é provável que o tempo médio das moléculas de água esteja compreendido entre 1,8 e 13

ns, o que está em concordância com os dados experimentais apresentados nesta tese. A partir dos dados de RMN da Tab. 6.4, pode-se dizer que para as soluções de frutose abaixo de 66% m/m as moléculas de água ainda não apresentam tempos de correlação superiores a 10 ns. Os dados de RMN não são altamente precisos pois não foram obtidos a partir do ajuste dos tempos de relaxação em função de função de densidade espectral  $J(\omega)$ . De qualquer forma, é possível afirmar que as moléculas de água ainda não atingiram tempos de correlação iguais a 10 ns. Outrossim, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com tempo total inferior a 15 ns, já as medidas de relaxação nuclear magnética ocorre na escala de mili segundos e é o resultado das interações dipolares e trocas protônicas moduladas pelos movimentos moleculares. Portanto, os resultados de RMN são uma média numérica e temporal dos processos moleculares que acontecem numa faixa de tempo pelo menos 6 ordens de grandezas mais longas.

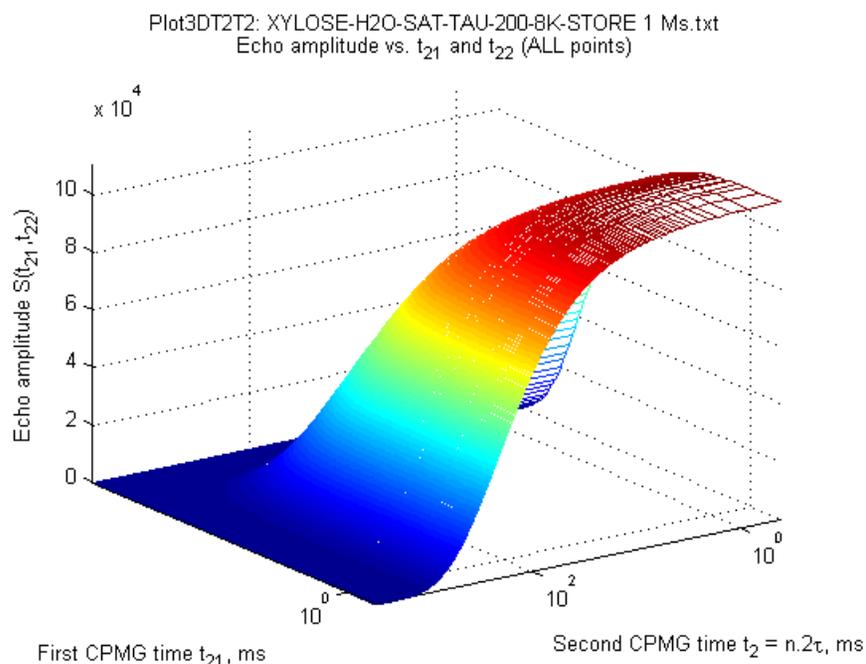
Como já discutido neste trabalho, as unidades furanosídeas, sejam na forma monossacarídea ou ligada à glicose na forma de sacarose, apresentam taxas de troca química consideravelmente inferiores, c.a. 2 vezes inferiores em média, do que as unidades piranosídeas nas mesmas concentrações. Assim, este fato reforça a explicação de que os valores de  $T_2$  no espectro 2D para frutose e sacarose apresentem valores distintos de  $T_2$  para os prótons trocáveis e não trocáveis. Uma vez que as trocas de prótons entre os grupos OH- e as moléculas de água são consideravelmente mais lentas, a eficiência de transferência de magnetização também é limitada (modulada) ao contrário do que acontece com xilose, glicose e maltose. No limite de solubilidade os efeitos combinados de baixa liberdade rotacional de ambas as moléculas de frutose e água, aliada às baixas taxas de trocas protônicas,  $k \cong 50 \text{ s}^{-1}$ , faz com que os prótons hidroxílicos da frutose apresentem valores de  $T_1$  e  $T_2$

distintos das moléculas de água. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a área associada aos prótons trocáveis ( $\text{H}_2\text{O} + \text{OH}$ -carboidratos) que deveria ser de 59% apresenta uma intensidade relativa correspondente a apenas 41% no espectro. É importante notar que dos 5 grupos OH da frutose, dois deles apresentam mobilidades moleculares consideravelmente elevadas e podem compor a população de prótons trocáveis juntamente com as moléculas de água, enquanto os demais apresentam dinâmicas mais próximas dos prótons CH.

A partir dos espectros 2D  $T_1 - T_2$  é possível dizer que, dinâmicas rotacionais e trocas químicas mais lentas, são fatores moduladores dos processos de transferência de magnetização entre as populações de prótons. Para os demais sacarídeos estes processos são mais eficientes mesmo em suas soluções saturadas pois nelas as trocas protônicas são consideravelmente mais rápidas do que para frutose. Na próxima seção são apresentados os resultados da espectroscopia de correlação-cruzada  $T_2 - T_2$  e como ele pode ser usada para os estudos de transferência de magnetização.

### 6.3.3. *Resultados de relaxometria de correlação cruzada* **$T_2 - \text{store} - T_2$**

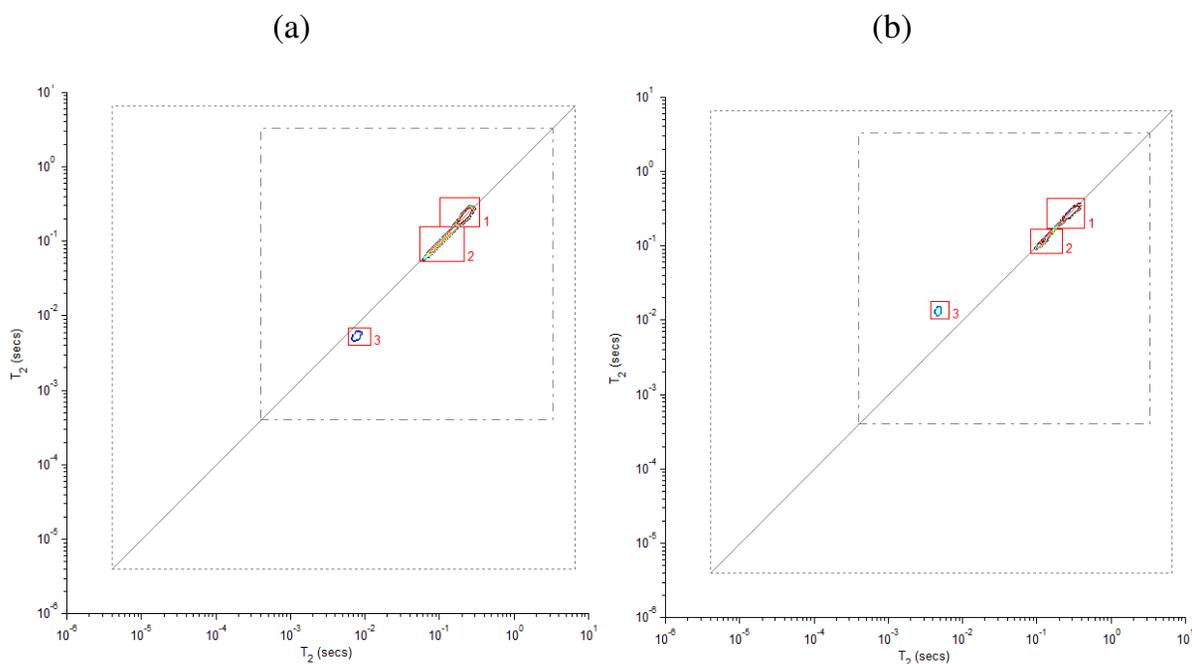
O gráfico da Figura 6.5 mostra o perfil de decaimento da magnetização das duas dimensões  $T_{2(1)}$  e  $T_{2(2)}$  para uma amostra de glicose saturada.



**Figura 6.5.** Amplitude dos ecos de spin, dimensão z, em função das dimensões de tempo  $t_{21}$  e  $t_{22}$ . O intervalo iterpulsos da sequência CPMG foi  $\tau = 200 \mu s$ , o tempo *store* entre as duas dimensões foi de 1 ms,  $RD = 5,0 s$ .

Os espectros 2D  $T_2 - store - T_2$  para todas as amostras foram obtidas a partir da transformada inversa de Laplace<sup>3</sup> com o algoritmo proposto por Song e colaboradores reportado na literatura e usando um script no programa MatLab.

Os gráficos mostrados na Figura 6.6 apresentam os espectros 2D  $T_2 - T_2$  para soluções saturadas de xilose e glicose nos seus respectivos limites de solubilidade. Os picos de  $T_2$  do espectro 1D aparecem ao longo da diagonal do espectro 2D  $T_2 - T_2$  exatamente como apresentado pelas soluções saturadas de xilose e glicose. Nos espectros 2D  $T_1 - T_2$  mostrados na Figura 6.3 (a-b) as populações de prótons trocáveis e não trocáveis apresentaram valores de  $T_2$  muito próximos como uma consequência das transferências de magnetização entre estas populações.



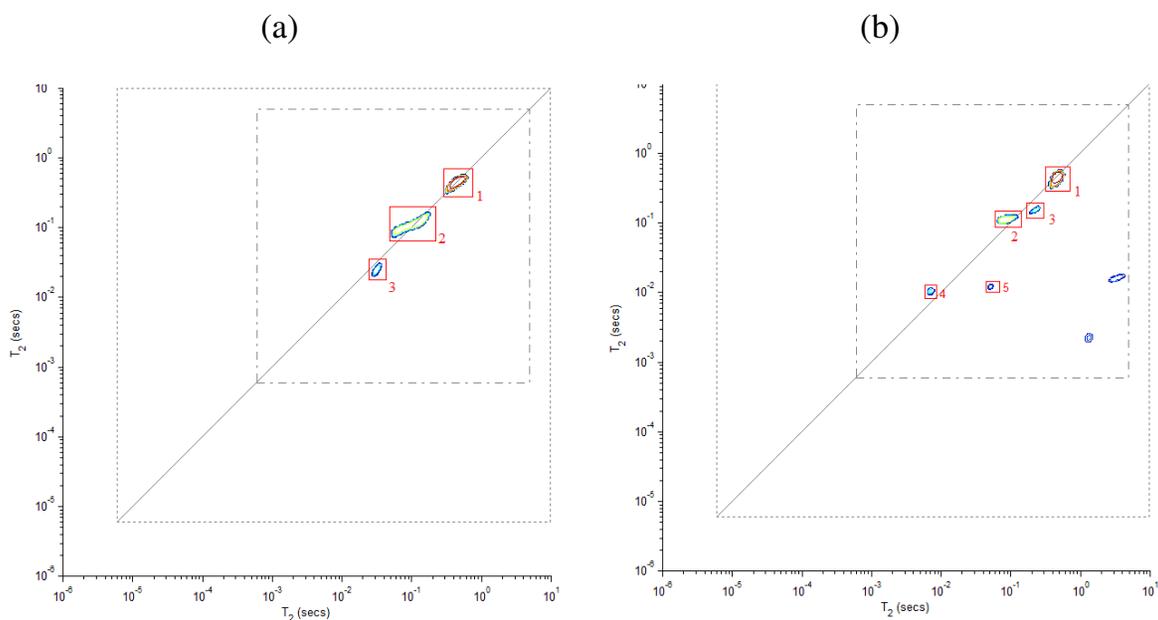
**Figura 6.6.** Espectros 2D  $T_2 - store - T_2$  para soluções saturadas de (a) glicose, e (b) xilose. Os parâmetros da sequência foram  $\tau_{cp} = 200 \mu s$ ,  $\alpha = 1$ , *store time* 1 ms.

Neste processo, as trocas protônicas entre as moléculas de água e os grupos OH exercem um papel chave para transferir magnetização entre estes dois sítios e também entre os prótons não trocáveis via interações dipolares. Ao invés de picos circulares e simétricos, os espectros 2D apresentam-se como se tivessem sido “esticados” ao longo da linha diagonal ( $T_{21} = T_{22}$ ). Este efeito pode ser atribuído aos processos de transferência de magnetização já observados e descritos na última Seção. Durante o intervalo de tempo *store*, a magnetização é armazenada ao longo do eixo  $\pm z$  e neste intervalo de tempo só ocorre relaxação longitudinal. Porém, durante este intervalo pode ocorrer trocas de magnetização entre as população com diferentes valores de  $T_2$  e levar ao aparecimento de picos fora da linha diagonal como descrito na Seção 6.1.2 deste capítulo. Para todas as amostras dos sacarídeos deste estudo não foi observado picos fora da linha diagonal característicos de troca de

magnetização entre as populações com *store* time igual a 1,0 ms entre as sequências CPMG.

No limite extremo de rápidas trocas químicas, as duas populações apresentariam como um único pico centrado entre as populações como já foi apresentado na Seção anterior. Nestas condições não há o aparecimento de picos cruzados fora da diagonal. A sobreposição e alongamento dos picos de  $T_2$  ao longo da diagonal é um indício de que o sistema encontra-se no regime intermediário/rápido de taxas de relaxação cruzada.<sup>5</sup> Mesmo aumentando-se o intervalo *store* entre as duas sequências CPMG, não foi possível perceber picos fora da diagonal característicos de relaxação cruzada para as amostras de xilose, glicose, e nem para soluções saturadas de maltose. A explicação mais provável deve ser as rápidas taxas de troca química e transferência de magnetização que possivelmente apresentam taxas de relaxação cruzada  $k \gg 1/T_1$ . Para solução de sacarose na concentração de 43% há o aparecimento de um pico intermediário muito pouco intenso quando o tempo *store* é de 100 ms como mostrado na Figura 6.7.

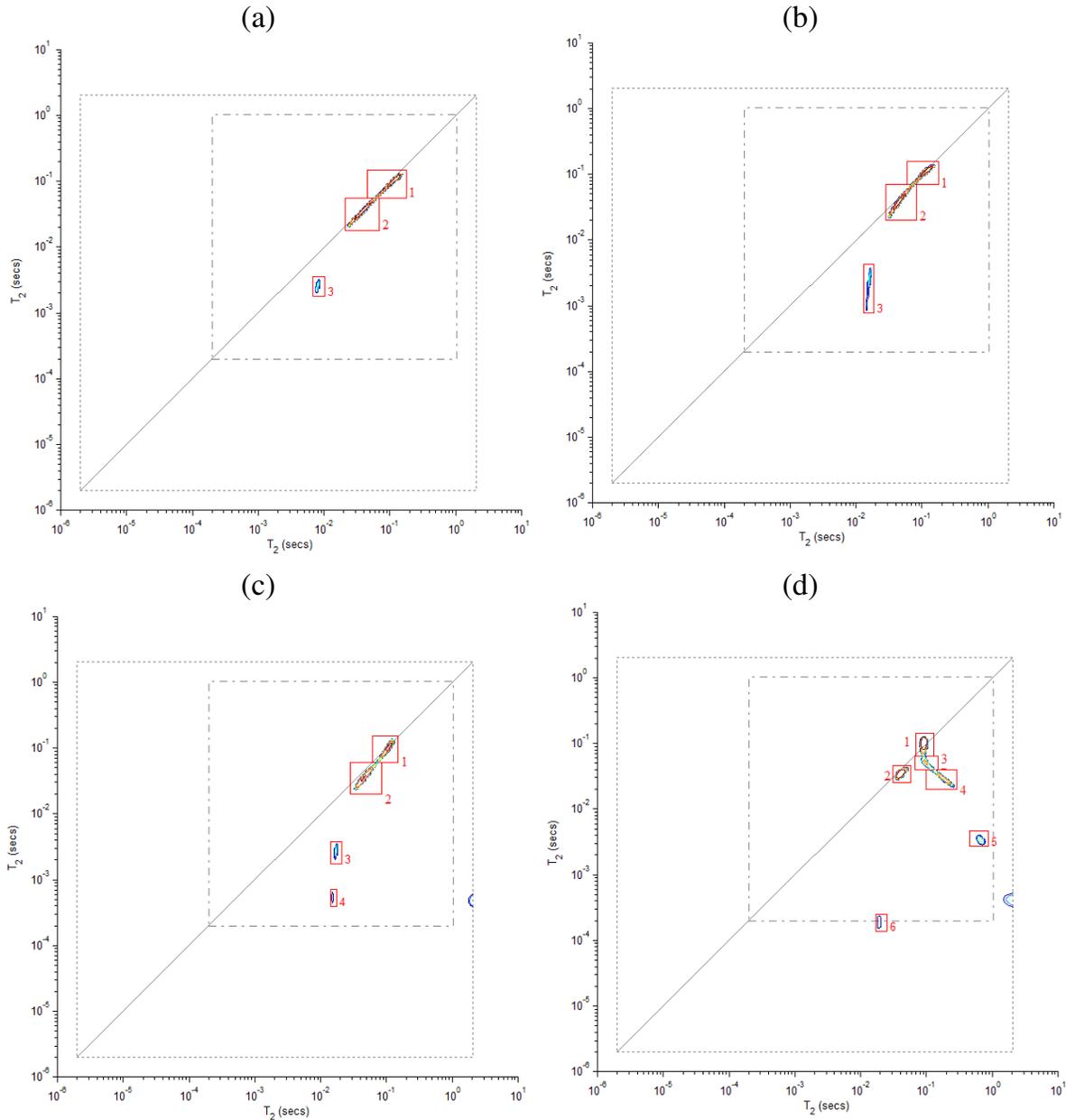
Para intervalos de tempo entre as duas sequências CPMG inferiores a 100 ms o aspecto dos espectros 2D da sacarose 43% é sempre como o apresentado na Fig. 6.7-a e somente com um intervalo *store* igual a 100 ms é que há o aparecimento de pico cruzado pequeno e pouco intenso. O fato de as transferências de magnetização e, portanto, os processos de relaxação cruzada dependerem tanto da mobilidade dos prótons quanto das taxas de troca protônica, indica que em condições de menor mobilidade molecular e trocas químicas mais lentas poderá haver as condições adequadas para o aparecimento de picos cruzados.



**Figura 6.7:** Espectros 2D  $T_2 - store - T_2$  de soluções de sacarose 43% m/m em dois intervalos *store*: (a) 1,0 ms; e (b) 100 ms, com  $\tau = 200 \mu s$  para ambos os espectros.

A Figura 6.8 mostra os espectros 2D  $T_2 - T_2$  para soluções saturadas de sorbitol em diferentes tempos *store time*. Em intervalos curtos e intermediários entre as duas sequências CPMG (*store time* entre 1 e 50 ms) os espectros aparecem com o padrão praticamente inalterados e com intensidade total progressivamente reduzida devido à diminuição da magnetização durante o intervalo *store* devido à relaxação longitudinal. Os dois picos denominados “1” e “2” na Figura 6.8 correspondem às populações trocáveis ( $H_2O + OH$ -carboidratos) e não trocáveis (CH), respectivamente. Os seus valores centrados em 106 (CH) e 35 (OH) ms concordam com os respectivos valores obtidos no espectro 1D de 90 e 34 ms nas mesmas condições de temperatura e  $\tau = 200 \mu s$ . Nos espectros da Fig. 6.8 e nos espectros  $T_2 - T_2$  anteriormente mostrados, os picos marcados como 3 e em outras regiões proibidas ou que

não podem ser atribuídos a nenhuma população de prótons, são atribuídos a erros da inversão de Laplace.



**Figura 6.8.** Espectros  $T_2 - store - T_2$  para soluções saturadas de sorbitol em diferentes intervalos de tempo *store*: (a) 1,0 ms; (b) 10 ms; (c) 50 ms; (d) 100 ms. O valor de  $\tau_{cp} = 200 \mu s$ .

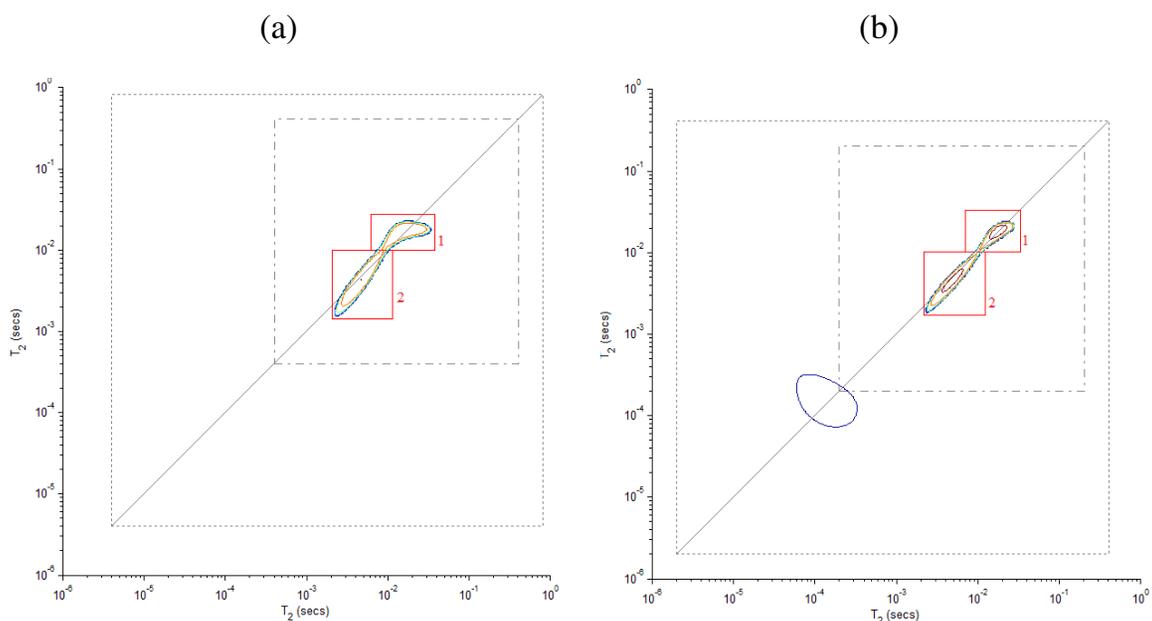
Como arguido por McDonald e colaboradores,<sup>5</sup> erros de 3% nos sinais de decaimento dos ecos podem levar a erros nos picos em torno de 15% tanto na localização do pico quanto em sua intensidade relativa. Erros da linha base são

ainda mais graves e podem levar ao aparecimento de picos em regiões proibidas e que não correspondem necessariamente a populações reais de spins. A região delimitada pelo quadrado pontilhado interno define a região de confiabilidade (os valores de  $T_2$  obtidos podem estar associados a populações reais), enquanto o quadrante externo é definido pelos valores dos intervalos interpulos 90-180° da sequência CPMG. Levando esta questão em conta, observa-se a presença de dois possíveis picos (3 e 4) cruzados no gráfico 2D da Figura 6.8-d. Estes picos são provavelmente devidos às transferências de magnetização entre as populações trocáveis e não trocáveis, porém estes processo ainda não são eficientes.

O aparecimento de picos cruzados ocorre nas condições em que as taxas de relaxação cruzada situam na mesma escala de tempo do período *store* e dos valores de taxa de relaxação spin-rede.<sup>5</sup> As trocas protônicas nas soluções de sorbitol são bastante rápidas, o fluxo de prótons  $k \sim 500 \text{ s}^{-1}$  (ver Tabela 5.1). Porém a transferência de magnetização e relaxação cruzada envolve interações dipolares entre os prótons trocáveis (essencialmente das moléculas de água) e os prótons CH. Assim, mesmo as trocas de prótons sendo bastante altas, a transferência de magnetização é limitada pela mobilidade dos prótons no sistema, e estes valores relacionam-se com os respectivos valores de  $T_1$ .

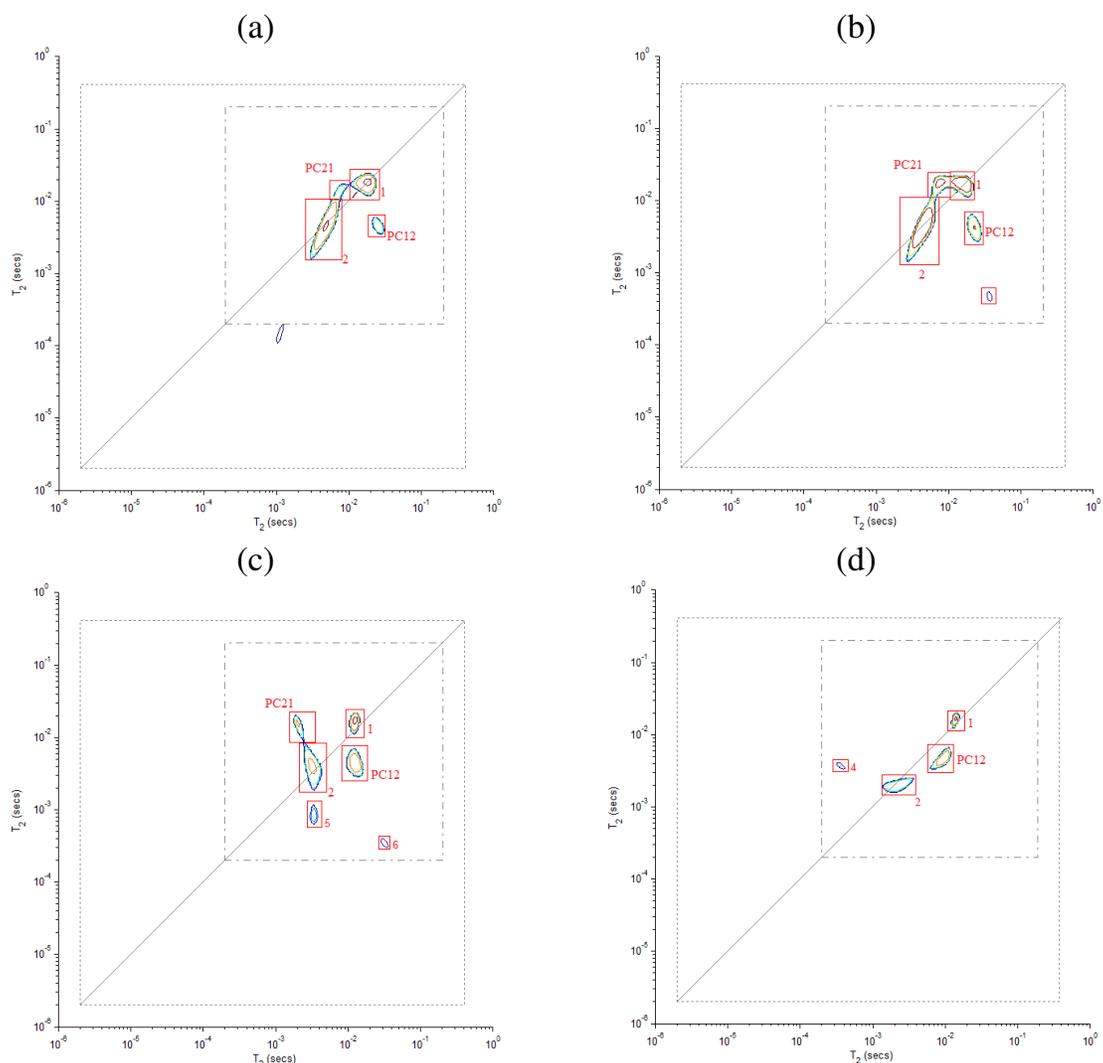
As soluções saturadas de frutose apresentam ambos, baixas taxas de fluxo de prótons e baixa mobilidade molecular. Nestas condições os processos de relaxação cruzada pode ser melhor apreciada através da Figura 6.9. Em curtos intervalos de tempo entre as duas sequências CPMG nas dimensões  $T_{2(1)}$  e  $T_{2(2)}$ , é observado apenas dois picos ao longo da diagonal com valores aproximados de 18 e 4,9 ms, muito próximos aos valores de  $T_2$  do espectro 1D (ver Tabela 6.1). A partir de intervalos *store* 10 ms como mostrado na Figura

6.10 começa a aparecer picos cruzados (PC) denominados como CP12 e CP21. Neste intervalo de tempo os picos ainda não apresentam-se totalmente resolvidos ou separados dos picos diagonais. Para *store times* progressivamente mais longos, os picos tornam-se mais bem resolvidos espacialmente e, aparentemente, em tempos compreendidos entre 20 e 100 ms o processo de relaxação cruzada parece ser otimizado.



**Figura 6.9:** Espectros 2D  $T_2 - T_2$  para solução saturada de frutose 80,3% em diferentes *store time*: (a) 200  $\mu\text{s}$ ; (b) 1,00 ms. Valor fixo de  $\tau = 200 \mu\text{s}$ .

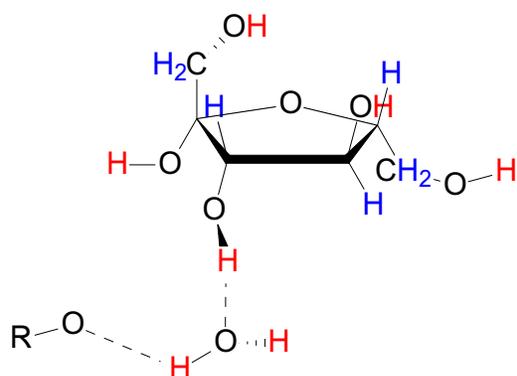
A escala de tempo que compreende o regime de taxas intermediárias de troca química é da ordem do inverso do período *store time* em que os picos cruzados ocorrem.<sup>8</sup> Assim, as trocas de magnetização responsáveis pela relaxação cruzada,  $k_{CR}$ , estão na faixa de  $\frac{1}{100 \text{ ms}} < k_{CR} < \frac{1}{10 \text{ ms}}$ , apresentando um aparente valor ótimo em  $k_{CR} \cong \frac{1}{20 \text{ ms}} \cong 50 \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 6.10:** Espectros 2D  $T_2 - T_2$  para solução saturada de frutose 80,3% em diferentes *store time*: (a) 10,0 ms; (b) 20,0 ms; (c) 100 ms; (d) 200 ms.

Na espectroscopia de correlação cruzada  $T_2 - T_2$  ocorre transferência de magnetização longitudinal durante o período *store* por trocas protônicas e interação dipolares. O valor da taxa de relaxação cruzada na faixa de  $50 \text{ s}^{-1}$  coincide com o valor do fluxo de trocas protônicas obtidos pelos ajustes das curvas de dispersão  $T_2 \text{ vs } 1/\tau_c$  discutidos no Capítulo 5 e resultados mostrados na Tab. 5.1.

Este resultado indica que os processos de troca de prótons é responsável pela transferência de magnetização, ou que ele seja pelo menos um mediador das interações dipolares entre os prótons trocáveis e os não trocáveis. Neste modelo interacional para que haja transferência de magnetização por interações dipolares entre os prótons da água e os prótons CH, é necessário que haja a troca de prótons entre os sítios *a* (H<sub>2</sub>O) e *b* (OH-carboidratos) como pode ser visto esquematicamente na Figura 6.11.



**Figura 6.11.** Esquema das estruturas de interação entre as moléculas de água e os grupos OH da frutose. Os prótons trocáveis são marcados em vermelho e os não trocáveis em azul.

Na solução saturada de frutose há em média uma molécula de água para dois grupos hidroxila, ou seja, para cada próton da água há um próton OH da frutose (Tab. 5.2). Neste regime é esperado que as moléculas de água formem ligações de hidrogênio majoritariamente com grupos OH da frutose. Assim, as interações dos prótons e dos oxigênios das moléculas de água ocorrem preferencialmente com os prótons e oxigênios dos grupos OH e, assume-se que uma parte pequena (negligenciável) das interações ocorra com os prótons CH. As ligações de hidrogênio entre moléculas de água e frutose tornam-se bem mais longas do que em soluções diluídas atingindo em média cerca de

860 ps,<sup>7</sup> cerca de 400 vezes mais longas do que as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água em seu seio, e 60 vezes o tempo em soluções diluídas de frutose. Apesar de a quebra e a formação de ligações de hidrogênio nas soluções concentradas de frutose ocorrer em escala de tempo sub ns, as trocas protônicas ocorrem em escala de mili segundos. A partir das curvas de dispersão 1D apresentados e discutidos no Capítulo 5, as taxas de relaxação cruzada situa-se na mesma faixa de trocas químicas, portanto, pode-se concluir que as trocas de magnetização e a relaxação cruzada nas soluções saturadas de frutose é intermediada pelas trocas protônicas.

Os resultados também mostram que para ocorrer relaxação cruzada efetiva os tempos de relaxação longitudinal e transversal devem estar compreendidos nas faixas de período *store time*. Mesmo as taxas de troca protônica nas soluções de sorbitol (Figura 5.15) há o aparecimento de picos distorcidos associados a relaxação cruzada entre as populações trocáveis e não trocáveis.

#### **6.4. Conclusões**

Os processos de transferência de magnetização entre as populações de prótons trocáveis (H<sub>2</sub>O + OH-carboidratos) e os prótons não trocáveis é controlada por dois fatores. O primeiro é obviamente a mobilidade das moléculas de água e dos carboidratos e a segunda é o fluxo de trocas protônicas entre as populações de prótons. Para o caso específico da frutose, os resultados levam à conclusão de que as transferências de magnetização são apenas detectadas através dos espectros bidimensionais quando as trocas protônicas modulam as taxas de relaxação cruzada para situarem no regime intermediário de trocas químicas. Este fato leva a proposição de que as interações intermoleculares

entre as moléculas de água e dos carboidratos (frutose) ocorre preferencialmente com os grupos OH e negligenciavelmente com os grupos CH.

Corroborando com estudos de simulação, foi possível determinar tempos de correlação de ordem superior a 10 ns para prótons CH da frutose e suas soluções concentradas. Estas mesmas análises sugerem tempos de correlação das moléculas de água inferiores a 10 ns.

## 6.5. Referências

- (1) CHO, S. I.; BELLON, V.; EADS, T. M.; STROSHINE, R. L.; KRUTZ, G. W. Sugar Content Measurement in Fruit Tissue Using Water Peak Suppression in High Resolution  $^1\text{H}$  Magnetic Resonance. *Journal of Food Science* **1991**, *56*, 1091-1094.
- (2) Hills, B.; Benamira, S.; Marigheto, N.; Wright, K.  $T_1$ - $T_2$  correlation analysis of complex foods. *Applied Magnetic Resonance* **2004**, *26*, 543-560.
- (3) Song, Y.-Q.; Venkataramanan, L.; Hürlimann, M. D.; Flaum, M.; Frulla, P.; Straley, C.  $T(1)$ - $T(2)$  Correlation Spectra Obtained Using a Fast Two-Dimensional Laplace Inversion. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2002**, *154*, 261-268.
- (4) McDonald, P.; Korb, J.-P.; Mitchell, J.; Monteilhet, L. Surface relaxation and chemical exchange in hydrating cement pastes: A two-dimensional NMR relaxation study. *Physical Review E* **2005**, *72*, 1-9.
- (5) Monteilhet, L.; Korb, J.-P.; Mitchell, J.; McDonald, P. Observation of Exchange of Micropore Water in Cement Pastes by Two-dimensional  $T_2$ - $T_2$  Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry. *Physical Review E* **2006**, *74*, 061404-9.
- (6) Marigheto, N.; Venturi, L.; Hibberd, D.; Wright, K. M.; Ferrante, G.; Hills, B. P. Methods for peak assignment in low-resolution multidimensional NMR cross-correlation relaxometry. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2007**, *187*, 327-42.
- (7) Pomata, M. H. H.; Sonoda, M. T.; Skaf, M. S.; Elola, M. D. Anomalous Dynamics of Hydration Water in Carbohydrate Solutions. *The journal of physical chemistry. B* **2009**, *113*, 12999-3006.

- (8) Venturi, L.; Woodward, N.; Hibberd, D.; Marigheto, N.; Gravelle, A. Multidimensional Cross-Correlation Relaxometry of Aqueous Protein Systems. *Applied Magnetic Resonance* **2008**, *33*, 213-234.

# Capítulo 7

---

## **Estudo de Sistemas Aquosos micro heterogêneos de Carboidratos por Relaxometria 2D**

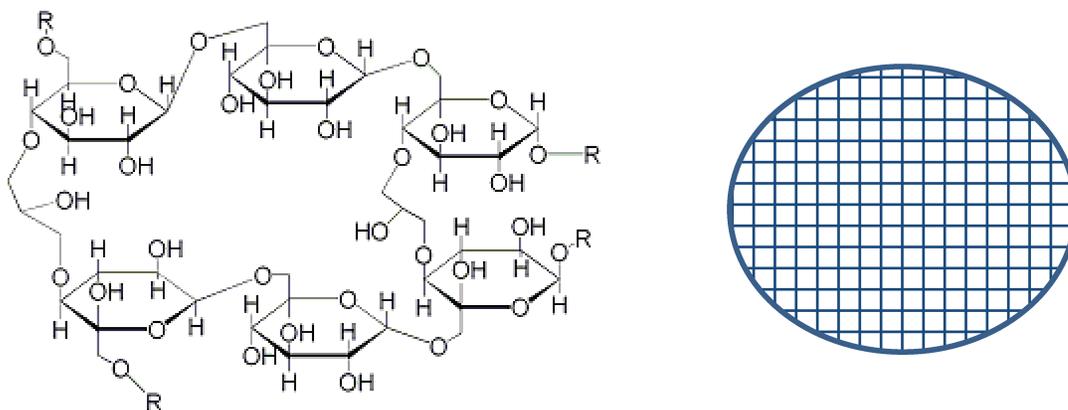


## 7.1. Introdução

Os estudos das soluções aquosas por relaxometria 2D  $T_2 - store - T_2$  só fornecem informações ricas nos sistemas que apresentem taxas de relaxação cruzada na mesma faixa do inverso dos intervalos de tempos entre as sequências CPMG. Nas soluções de mono e dissacarídeos o único sistema que forneceu resultados ricos foi a solução saturada de frutose que apresentou taxas de relaxação cruzada da ordem  $50 \text{ s}^{-1}$ . Para um estudo mais sistemático do efeito de trocas químicas sobre os espectros 2D seria conveniente empregar sistemas modelos que apresentassem baixa mobilidade molecular e taxas de relaxação cruzada que estejam compreendidas na faixa de  $10-100 \text{ s}^{-1}$ . Na literatura já se encontra disponível um grande número de aplicações das relaxometria de RMN em 2D ( $T_1 - T_2$  e  $T_2 - store - T_2$ ) para uma ampla faixa de sistemas como: frutas;<sup>1</sup> tecidos vegetais<sup>2,3</sup> e de animais; alimentos complexos e processados<sup>4,5</sup>; soluções aquosas de proteínas,<sup>6,7</sup> géis de polissacarídeos e de silicone;<sup>8</sup> rochas<sup>9</sup> e concretos.<sup>10,11</sup>

Apesar da existência de um grande número de estudos de relaxometria 2D no domínio do tempo (principalmente em alimentos), ainda existem questões-chaves a serem respondidas, como por exemplo a contribuição dos processos de troca química sobre a relaxação cruzada. Neste sentido, torna-se oportuno o estudo de sistemas modelo mais simples, com os quais se possam determinar os mecanismos de relaxação em sistemas heterogêneos. Os géis formados por esferas de sephadex<sup>®</sup> constituem uma excelente alternativa. As partículas de sephadex são formadas por cadeias do polissacarídeo dextrana (unidades de glicose unidas por ligações glicosídeas  $\alpha_1 \rightarrow 4$ ) reticuladas através de reação

com epícloridrina. As esferas de sephadex apresentam reticulações formando redes tridimensionais como mostrado esquematicamente na Figura 7.1.



**Figura 7.1.** Estrutura molecular da sephadex e uma representação esquemática de uma esfera de sephadex mostrando os retículos internos formados pelas cadeias reticuladas de dextrana.

O tamanho das esferas e de seus micro compartimentos pode variar na faixa de micrômetros. Por exemplo, as esferas de sephadex G25-50, apresentam tamanho das esferas de 20-50  $\mu\text{m}$ . Esta característica faz da sephadex® um sistema modelo muito utilizado em estudos de RMN,<sup>12,13</sup> termodinâmicos,<sup>14</sup> etc. A sephadex G25, por exemplo, apresenta tamanhos de poros que limitam a passagem de proteínas com massa molar média de  $\geq 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ <sup>15</sup> e pode ser usada para estudar os processos difusionais, bem como de transferência de magnetização entre as populações de prótons no sistema. Tais populações são basicamente: os prótons trocáveis das moléculas de água e dos grupos OH que estão no regime de rápidas trocas químicas; os prótons das moléculas de água que estão na camada de hidratação (no interior das cavidades ou nos interstícios das esferas; e os prótons não trocáveis CH. Na possibilidade de trocas de magnetização por troca química direta de prótons ou por interações dipolares seculares, aparecerão picos cruzados nos espectros 2D em faixas

específicas de tempo. Além disso é esperado que as populações de prótons mudem suas proporções e seus tempos de relaxação intrínsecos com a mudança da razão H<sub>2</sub>O/sephadex.

## **7.2. *Materiais e Métodos***

### **7.2.1. *Materiais***

As amostras de sephadex foram preparadas usando esferas de sephadex G25-50 (4-6 mL por grama) Sigma-Aldrich Lote 98H0482. Em todos os experimentos foi usada água deionizada ( $\geq 18.2 M\Omega$ ) e D<sub>2</sub>O 99% de pureza atômica Sigma-aldrich. As amostras em H<sub>2</sub>O foram preparadas na faixa entre 10 e 70 % m/m (massa de água por massa total) e as amostras em água pesada foram preparadas soluções 42% em massa e saturadas. Para o preparo das amostras foram utilizados pequenos frascos de vidro com capacidade entre 2 e 4 mL. A melhor sistemática para o preparo dos géis de sephadex envolveu a adição das esferas de sephadex a uma massa definida de água, por exemplo, 0,40 – 0,6 g a fim de obter misturas finais nas proporções desejadas. Os componentes foram misturados com um pequeno pistilo de teflon, a fim de obter misturas com a máxima homogeneidade. Tomou-se o cuidado de realizar este procedimento em até 10 minutos para evitar evaporação da água e em seguida os fracos foram devidamente fechados. A proporção de água na amostra saturada de sephadex foi determinada a partir a partir de uma mistura água sephadex em que a massa de água foi pelo menos 10 vezes maior do que a massa de sephadex. Em seguida a amostra foi agitada, centrifugada, e o sobrenadante foi descartado. A partir da quantidade de água absorvida e descartada foi determinada que a quantidade máxima de incorporação de água ~ 79% m/m.

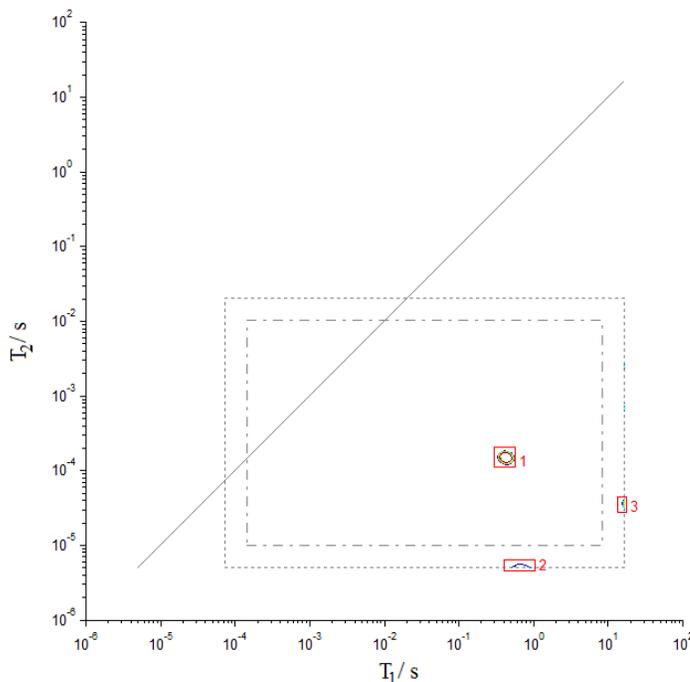
As medidas de RMN a 100 e 300 MHz foram realizadas em tubos de (5 mm  $\phi$ ) e devidamente modificados para serem inseridos nas sondas. Além disso, foram realizados processos de purificação isotópica no sentido de produzir misturas sephadex/D<sub>2</sub>O com o máximo possível de prótons trocáveis (OH) substituídos por átomos de deutério. As sucessivas dispersões e centrifugações foram repetidos por até 9 vezes até obter espectros de relaxometria 1D cujas áreas dos picos não mais mostrassem variações.

### 7.2.2. *Medidas de Relaxação por RMN*

Os experimentos 2D  $T_1 - T_2$  e  $T_2 - store - T_2$  foram adquiridos seguindo o mesmo protocolo utilizado na metodologia descrita no Capítulo 6 Seção 6.2.2. As únicas mudanças foram nos tempos de aquisição e nos valores interpulsos 90-180° da sequência CPMG ( $\tau_{cp} = 100 \mu s$ ), que foram alterados para tempos mais curtos, em função das relaxações mais rápidas. Para as amostras de água/sephadex com razão mássica inferior a 10% de água, foi utilizada a sequência designada de *ultrafast*  $T_1 - T_2^*$ . A diferença básica da sequência  $T_1 - T_2$  já reportada é o fato de ao invés da sequência CPMG na segunda dimensão, é utilizada uma sequência com decaimento livre da indução, sigla em inglês FID. Nesta sequência os ecos de spin são adquiridos em intervalos de tempos mais curtos do que os tradicionais  $2\tau \geq 200 \mu s$ . A principal vantagem da sequência ultrarrápida é poder determinar tempos de relaxação na dimensão  $T_2$  inferiores a 1 ms não possíveis utilizando a sequência CPMG.

### 7.3. Resultados e Discussão

As amostras de sephadex sem adição de água já apresentam uma pequena massa de moléculas de água de hidratação que deixa os movimentos moleculares menos restritos com isso torna-se possível a obtenção de um pico de  $T_2$  com máximo em  $157 \mu\text{s}$ . Para esta amostra específica foi utilizada a sequência de pulsos  $T_1 - T_2^*$  ultra-rápida pois, através da sequência  $T_1 - T_2$  não foi possível a detecção do sinal em função dos rápidos decaimentos. O espectro  $T_1 - T_2^*$  da amostra de sephadex sem adição de água é mostrada na Figura 7.2.

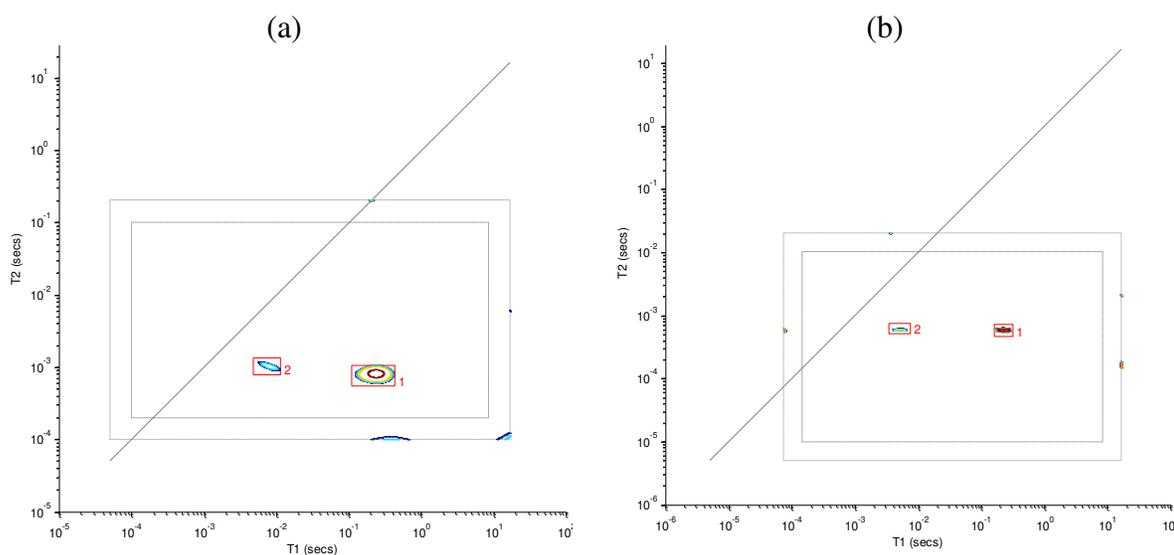


**Figura 7.2.** Espectro 2D  $T_1 - T_2^*$  de sephadex sem adição de água.

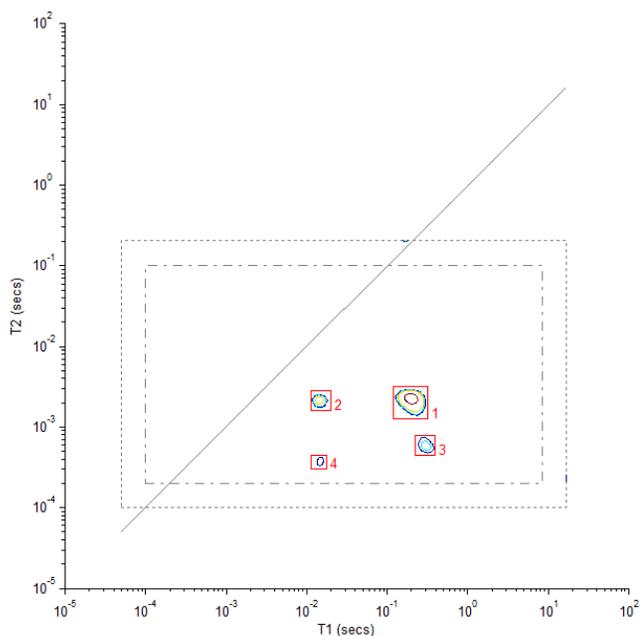
O pico designado como 1 apresenta mais de 95% de toda intensidade do espectro, sendo centrado nos tempos 422 e 0,15 ms, para  $T_1$  e  $T_2^*$ , respectivamente. Os demais picos apresentam valores fora da região de confiabilidade e não podem ser atribuídos a nenhuma população de prótons,

por isso, foram descartados da análise. É possível que o pico 2 possa ser dos prótons não trocáveis que apresentam valores de  $T_2^*$  abaixo de  $100 \mu\text{s}$  e que não pode ser determinada devido às rápidas taxas de relaxação. O alto valor da razão  $T_1/T_2 > 2500$ , sugere que os movimentos moleculares são muito restritos, característicos do estado sólido, cujos tempos de correlação característicos são superiores a  $1/\omega_0$  ( $\omega_0 = 100 \text{ MHz}$  a frequência de Larmor dos spins).

A adição de água leva à formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos OH, liberando cadeias de dextrana que antes formavam ligações de hidrogênio entre elas próprias. A consequência deste processo é a flexibilização das cadeias que passam a ter movimentos moleculares mais rápidos. A Figura 7.3 mostra os espectros  $T_1 - T_2$  e  $T_1 - T_2^*$  dos géis água/sephadex nas razões mássica de 10% e na Figura 7.4 é mostrada o mesmo espectro a 15%, ambos a 100 MHz. Os valores dos tempos de relaxação para os géis a 10 e 15% m/m são resumidos na Tabela 7.1.



**Figura 7.3.** Espectros de correlação cruzada 2D: (a)  $T_1 - T_2$  e (b)  $T_1 - T_2^*$  no sistema água/sephadex 10% m/m de água, adquirido a 100 MHz,  $\tau = 100 \mu\text{s}$ .



**Figura 7.4.** Espectro de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  para amostra água/sephadex 15% m/m.  $\tau = 100 \mu s$ .

**Tabela 7.1.** Valores de  $T_1$ ,  $T_2$ , e  $T_2^*$  obtidos dos espectros 2D  $T_1 - T_2$  para os sistemas formados por água/sephadex. O teor de água na mistura é expresso em percentagem mássica, e os valores de  $T_1$  e  $T_2$  em ms.

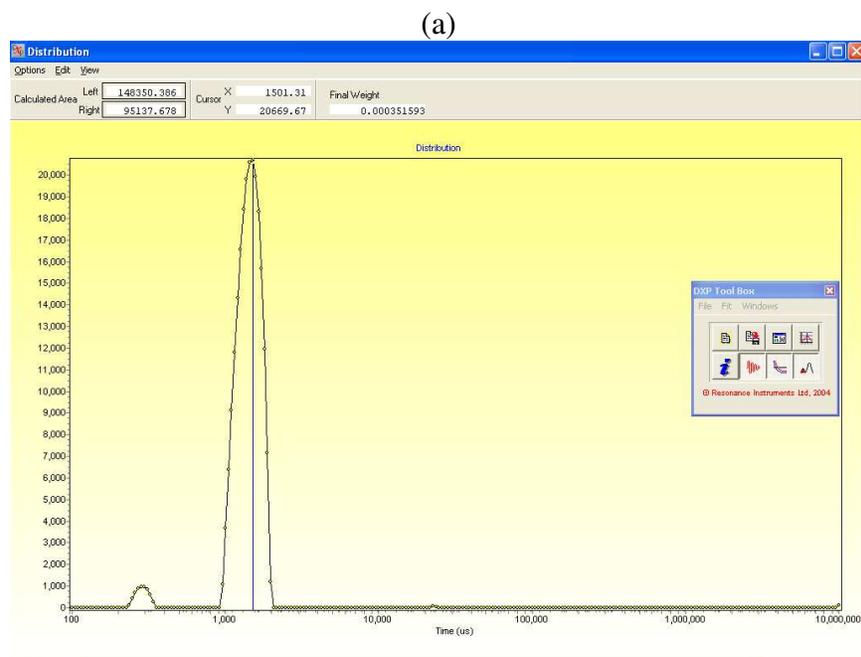
Água/sephadex %	Pico	Área	$T_1$	$T_2$	$T_1$	$T_2^*$
(sem adição H <sub>2</sub> O)	1	~100	X	X	422	0,15
10%	1	90,5	247	0,81	227	0,6
	2	9,1	17,7	0,83	5,08	0,6
15%	1	87	200	2,3	X	X
	2	8,8	14,3	2,13	X	X
	3	3,4	306	0,58	X	X
	4	0,5	14,9	0,38	X	X

Pode-se atribuir aos picos designados por 2 da Figura 7.3 às moléculas de água. A intensidade do pico 2 se compara muito bem com a composição mássica do sistema, além disso, os baixos valores das razões  $T_1/T_2$  e  $T_1/T_2^*$  também reforçam esta atribuição. No caso do pico 1, o alto valor de  $T_1 \geq 300 T_2$ , é uma consequência dos movimentos moleculares mais restritos apresentando tempos de correlação mais altos do que  $1/100\text{MHz}$ , característicos das cadeias reticuladas. Pode-se ainda notar um significativo abaixamento do valor de  $T_1$  para a amostra contendo 10% de água em relação à sephadex pura. A adição de moléculas de água libera grupos OH das cadeias que antes participavam de ligações de hidrogênio com grupos de outras cadeias e, por isso, ocorre um significativo aumento da mobilidade molecular. O espectro de  $T_2$  1D da amostra água/sephadex 15% aparecem dois picos centrados em  $\sim 0,4$  e  $\sim 2$  ms (espectro não mostrado). Através do espectro 2D, apresentado na Figura 7.4, é possível a identificação de quatro picos distintos, cada população do espectro de  $T_2$  1D se divide em dois distintos valores de  $T_1$ . Os picos (1 e 2) da Figura 7.4 compõem o pico centrado em  $\sim 2\text{ms}$  no espectro  $T_2 - 1D$ , e os picos (3 e 4) da Figura 7.4 correspondem ao pico centrado em  $\sim 0,5$  ms. Neste caso, a atribuição dos picos às suas respectivas populações de prótons não é uma tarefa trivial. O pico 1 da Fig. 7.4 pode, certamente, ser atribuído aos prótons não trocáveis porém, com movimentos moleculares consideravelmente mais rápidos do que na amostra 10%. Na Figura 7.4 os picos 3 e 4 assemelham-se aos picos 1 e 2, diferindo apenas nos valores mais curtos de  $T_2$ . O pico 4 apresenta baixo valor da razão  $T_1/T_2$  e pode ser atribuído às moléculas de água, neste caso, moléculas de hidratação pois os valores de  $T_2$  são bem mais baixos em comparação com o pico 2 (o qual pode ser atribuído às moléculas de água livres no interior das esferas de sephadex). Estes picos também podem estar associados à cadeias mais flexíveis devido à

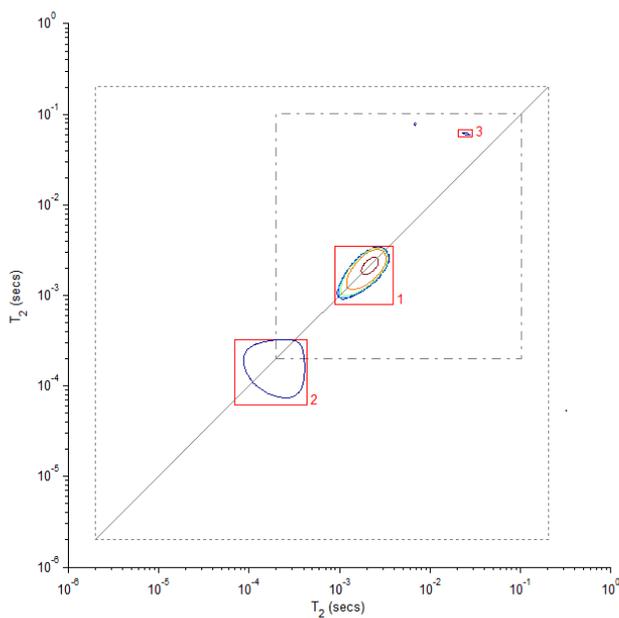
maior hidratação em relação a outras com menor grau de hidratação. É importante lembrar que a taxa de relaxação transversal diminui continuamente com a restrição dos movimentos moleculares, enquanto os valores de  $T_1$ , atingem um valor mínimo com movimentos moleculares correspondentes ao inverso da frequência de Larmor dos spins (ver Equações 16 e 18 Capítulo 4). Neste sentido, o pico 3 na Fig. 7.4 seria de uma pequena fração de prótons não trocáveis com tempos de correlação ainda mais baixos do que o pico 1. Ainda há a possibilidade de os picos 3 e 4 serem de populações de esferas que possuem proporções de moléculas de água inferiores às esferas responsáveis pelos picos 1 e 2. Estas atribuições são difíceis de serem feitas com total confiança. As esferas de Sephadex<sup>®</sup> G25-50 apresentam raio médio de 25  $\mu\text{m}$  e a densidade de cadeias no interior da esfera é de 40% de massa em relação ao volume da esfera. Assim, as distâncias entre as reticulações são curtas o suficiente para ocorrer trocas de ambiente das moléculas de água na escala de tempo dos tempos de relaxação. Entretanto, não é esperado trocas químicas baseadas na difusão translacional se houver apenas moléculas de água de hidratação.

Os espectros  $T_2$  (CPMG) em 1D e os espectros 2D  $T_2 - \text{store} - T_2$  da amostra de água/sephadex 15% em massa são mostrados na Figura 7.5. As duas populações com valores de  $T_2$  (2,2 e 0,2 ms para os picos 1 e 2, respectivamente) encontrados ao longo da linha diagonal, correspondem aos valores encontrados no espectro 1D. Para valores *store time* superiores a 1 ms não foram encontrados picos cruzados, mas foi observado o desaparecimento do pico marcado como 2 (gráficos não mostrados). Mesmo que existam processos de troca química, tais processos não se mostraram eficientes na

transferência de magnetização para nenhuma amostra com fração mássica de água igual ou inferior a 15%.



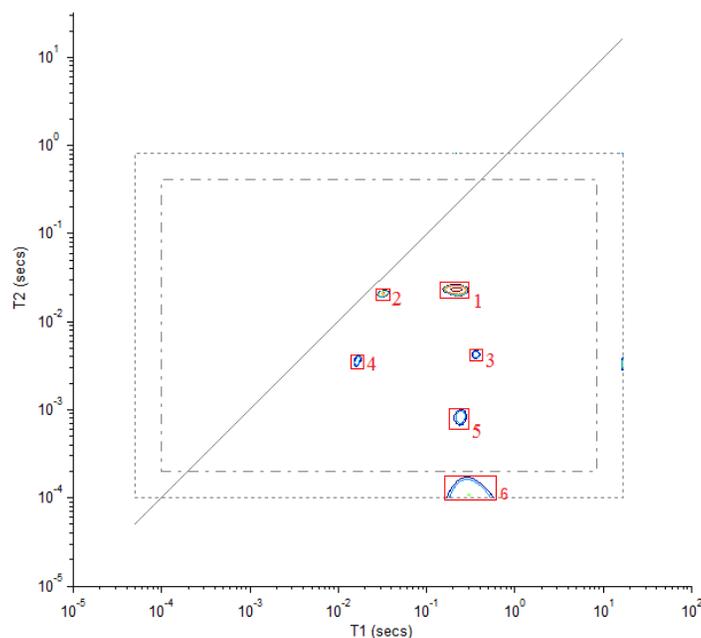
(b)



**Figura 7.5.** Espectros de relaxometria do gel água/sephadex na razão 15 % m/m de água (a) Espectro de relaxometria 1D usando sequência CPMG,  $\tau = 100\mu\text{s}$ ; (b) Espectro de correlação cruzada  $T_2 - \text{store} - T_2$  do gel e com store time = 1ms.

Um dos motivos pode ser os baixos valores de  $T_1$  da população de spins, que resulta na rápida perda da magnetização, a qual é mais rápida do que a taxa de relaxação cruzada. Além disso, as moléculas de água podem estar fortemente presas aos grupos OH-dextrana, formando camadas de hidratação sem liberdade translacional para transferir magnetização entre os diferentes ambientes.

A partir dos valores de  $T_1$  e  $T_2$  das amostras contendo até 15% em massa de água, não foi possível atribuir presença de moléculas de água livres comportando-se como água de *bulk*. Aparentemente, as moléculas de água constituem a camada de hidratação e, por isso, apresentam valores de  $T_1$  mais baixos do que os prótons não trocáveis. O gráfico da Figura 7.6 apresenta o espectro  $T_1 - T_2$  do gel de água/sephadex contendo 25% m/m de água com os respectivos parâmetros apresentados na Tabela 6.2



**Figura 7.6.** Espectro de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  do gel água/sephadex 25% m/m,  $\tau = 100 \mu s$ .

**Tabela 7.2.** Valores de  $T_1$  e  $T_2$  do sistema água/sephadex 25% obtidos do gráfico 2D da Figura 7.6. Os valores estão em *ms* e as áreas relativas não estão em escalada de 100%.

Pico	Área relativa	$T_1$	$T_2$
1	63,9	218	23,4
2	5	32,1	20,7
3	1,1	363	4,20
4	1,2	16,3	3,61
5	2,9	237	0,82
6	20,5	306	0,11

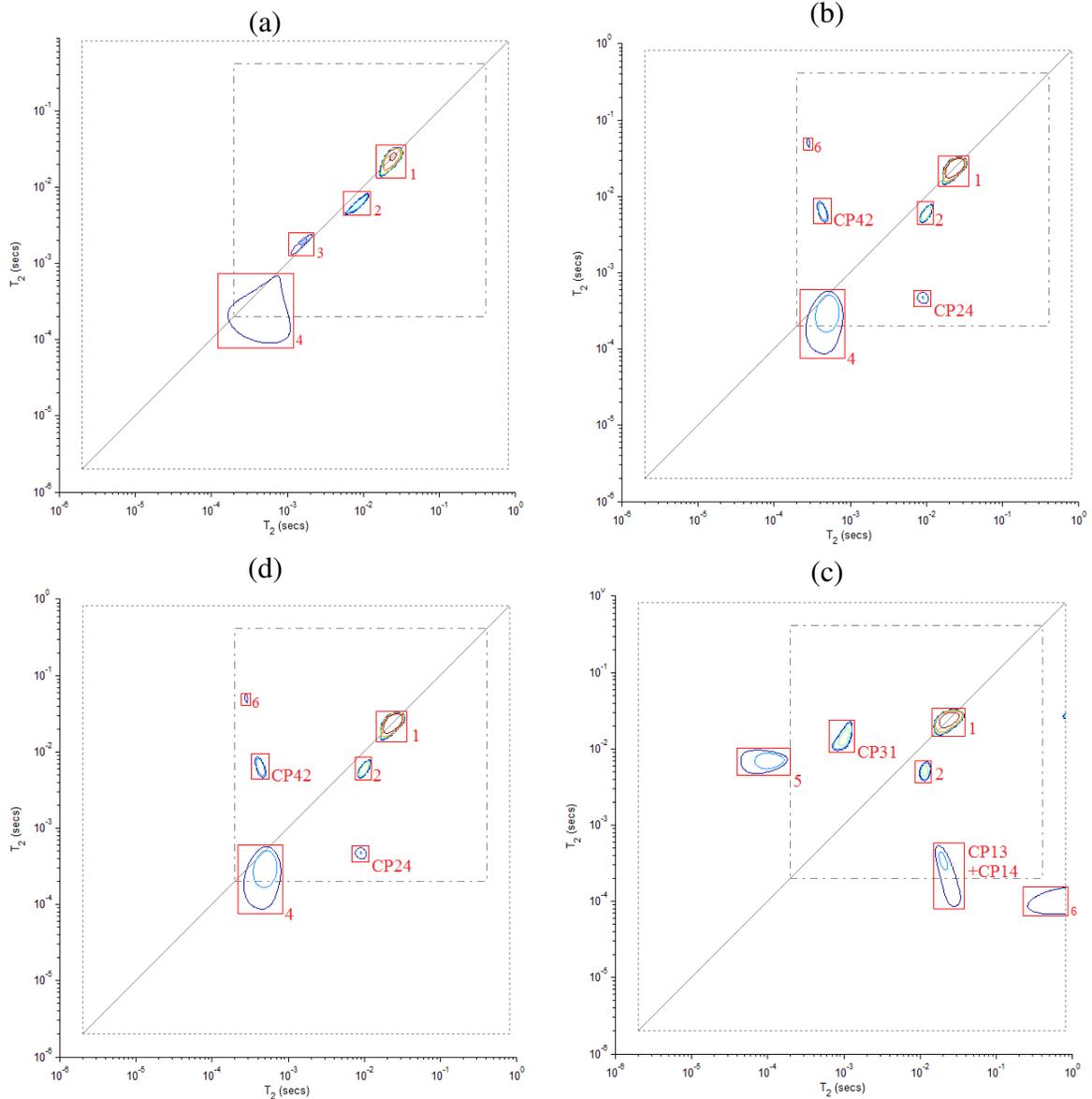
Há um considerável aumento da complexidade do espectro em comparação com as amostras com proporções mais baixas de água. A comparação da Fig. 7.6 (água/sephadex 25%) com as Figuras 7.3 e 7.4, mostra que os picos denominados (1 e 2), e (3 e 4), parecem ser aqueles previamente descritos para a amostra contendo 15% de água apresentado na Figura 7.4, porém, ligeiramente deslocados para valores de  $T_1$  e  $T_2$  mais longos. O aumento do conteúdo de água nos poros da sephadex aumenta a mobilidade dos prótons trocáveis e não trocáveis justificando o aumento dos valores de  $T_1$  e  $T_2$ .

Na amostra a 15% também aparecem dois picos com valores bastante curtos de  $T_2$  e valores longos  $T_1$ . Novamente, há duas possíveis explicações: (i) há de fato seis populações com dinâmicas dos movimentos moleculares distintas, ou; (ii) há uma distribuição de esferas de sephadex com diferentes conteúdos de água, resultando nos vários picos. Para qualquer destas possibilidades, a partir dos espectros  $T_1 - T_2$  ainda não foi observado indícios da presença de água livre em nenhuma das amostras com proporção de até 25% em água.

Existe a possibilidade de o pico 2 da amostra 25% (mostrado na Tabela 7.2) estar relacionado às moléculas de água com liberdade molecular mais alta do que aquelas formadas pelo pico 4.

A transferência de magnetização entre diferentes populações pode ser acompanhada pelo gráfico  $T_2 - store - T_2$  como discutido no Capítulo 6 para solução saturada de frutose. Na Figura 7.7 é mostrado o espectro  $T_2 - store - T_2$  para o gel água/sephadex 25% em diferentes intervalos *store time*. Em intervalo de tempo curto ( $store = 0,5 ms$  Fig. 7.7(a)) há o aparecimento de 4 picos ao longo da linha diagonal. Estes picos correspondem aos quatro valores de  $T_2$  observados no espectro  $T_1 - T_2$  Fig. 7.6. Os picos (1 e 2) e (3 e 4) no espectro da Fig. 7.6 correspondem, respectivamente, aos picos (1) e (2) do espectro da Fig. 7.7 (a).

Além de prótons trocáveis e não trocáveis, estes picos também estão associados às moléculas de água, pois como já descrito, apresentam baixas razões  $T_1/T_2$ . Já os picos 5 e 6 do espectro  $T_1 - T_2$  (Fig. 7.6) correspondem aos picos 3 e 4, respectivamente do espectro  $T_2 - store - T_2$  (Figura 7.7-a). Estes dois picos são provavelmente populações de prótons com baixa liberdade de movimentos e poderiam ser atribuídos a grupos onde ocorrem as reticulações entre as cadeias de dextrana, ou simplesmente a grupos que não foram devidamente hidratados e, por isso, não tiveram mobilidades alteradas pela adição de moléculas de água. Em tempos *store* iguais ou superiores a 1,0 ms, observa-se o aparecimento de picos cruzados fora da diagonal Figura 7.7(b-d) e o desaparecimento de picos diagonais com baixos valores de  $T_1$ . Este último fato é a uma consequência direta das perdas de magnetização de suas respectivas populações de prótons em tempos *store* elevados em relaxação aos valores de  $T_1$  e  $T_2$ .

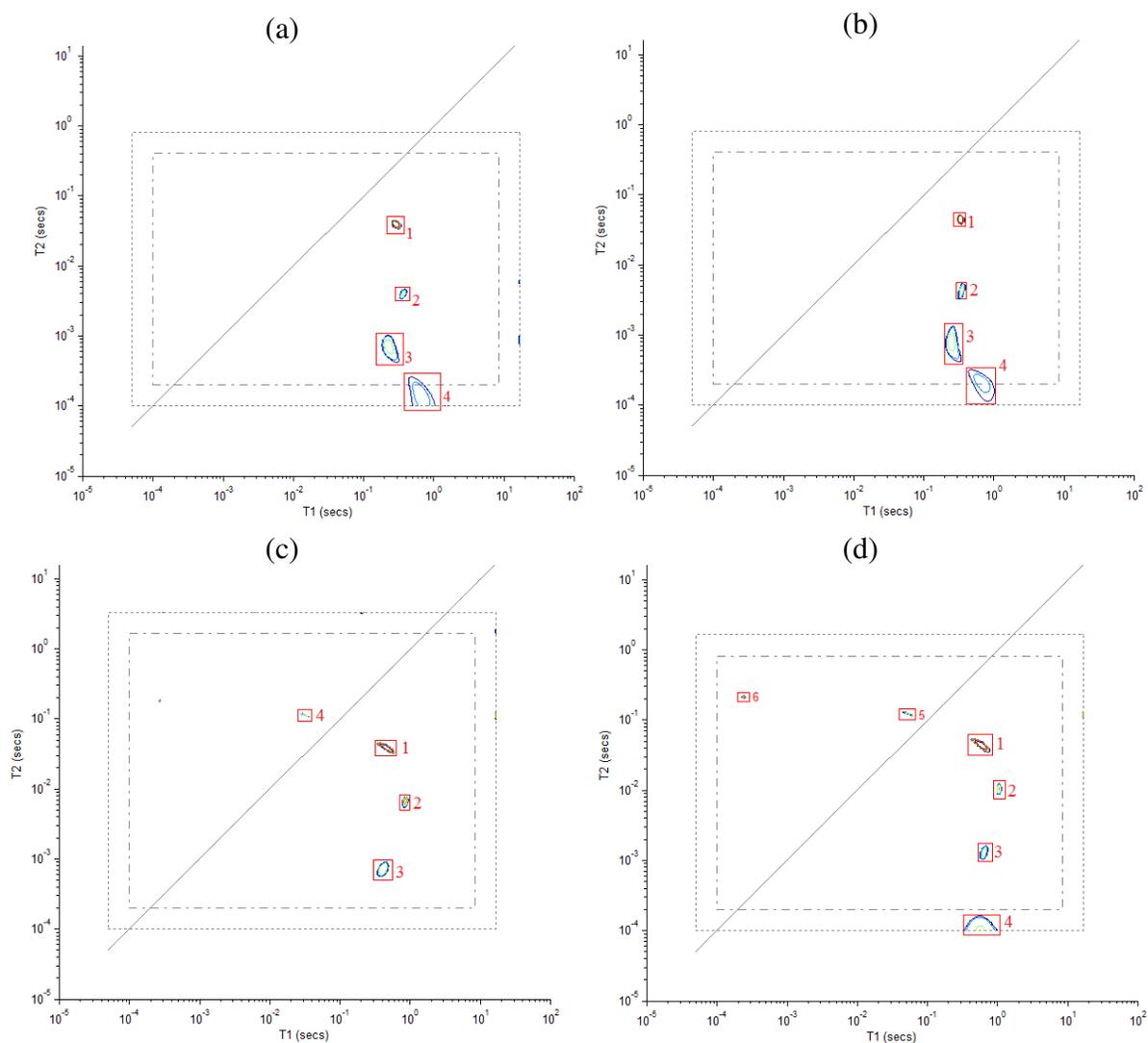


**Figura 7.7.** Espectros de correlação cruzada  $T_2 - store - T_2$  para o gel água/sephadex 25% em diferentes intervalos *store*: (a) 0,50 ms; (b) 1,0 ms; (c) 5,0 ms; e (d) 10 ms.  $\tau = 100 \mu s$ .

No intervalo de tempo,  $store = 1,0 ms$ , é observado picos cruzados entre os picos diagonais 2 e 4. Estes picos estão associados às transferências de magnetização causadas, provavelmente, por interações dipolares seculares, pois envolvem, possivelmente, prótons não trocáveis (pico 4 Figura 7.7) e prótons trocáveis com menor liberdade molecular (pico 2 Fig. 7.7). Como

demonstrado no Capítulos 6, as transferências de magnetização entre prótons não trocáveis (CH) e os prótons da água são intermediadas pelas trocas protônicas. Como estes picos cruzados não foram detectados para amostras com menor teor de água (10, e 15%), pode-se inferir que as moléculas de água exercem um papel determinante no mecanismo de transferência de magnetização e também na mobilidade das cadeias de dextrana. A taxa de relaxação cruzada efetiva corresponde ao inverso do intervalo *store time*, ca.  $1000\text{ s}^{-1}$ , e este processo depende das trocas protônicas. Não seria esperado que as moléculas de água de hidratação transferissem magnetização por interações dipolares para os prótons não trocáveis diretamente, pois o tempo de residência das moléculas na camada de hidratação é inferior a nanossegundos.<sup>6</sup> No entanto, tais trocas de magnetização são mediadas pelas trocas protônicas que ocorrem na faixa entre 50 e  $1000\text{ s}^{-1}$ . Em tempos *store* mais longos, 5 e 10 ms, também há o aparecimento de picos cruzados formados pelos picos diagonais 4 e 1, além de 4 e 2 (picos CP13 e CP 31 Fig. 7.7 (c-d)). Nestes tempos mais longos há trocas de magnetização de moléculas de água mais livres (pico 1) com prótons não trocáveis (pico 4) através dos prótons hidroxila das cadeias de dextrana.

Ainda não foi possível inferir sobre a existência de moléculas de água livres no interior ou no exterior das esferas de sephadex. Dentro das esferas, a alta concentração de cadeias pode impedir que hajam moléculas de água livres, mesmo assim, é esperado que o aumento progressivo do teor de água, haverá uma maior flexibilização das cadeias. Eventualmente, para amostras saturadas, haverá a presença de moléculas de água no exterior ou nos interstícios das esferas. A Figura 7.8 apresenta os espectros  $T_1 - T_2$  para géis H<sub>2</sub>O/sephadex nas concentrações entre 35-60%.



**Figura 7.8.** Espectros de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  das amostras de água/sephadex em diferentes conteúdos de água: (a) 35 %; (b) 40%; (c) 50; (d) 60%.  $\tau = 100 \mu\text{s}$ .

A principal diferença entre os géis água/sephadex a 35% (Fig. 7.8(a)) e a 25% Fig. 7.6 é a ausência dos picos (2 e 4) mais próximos da linha diagonal na composição de 25%. Os gráficos (b-d) da Fig. 7.8 e os dados da Tabela 7.3 apresentam a mesma tendência para os quatro picos com seus respectivos valores de  $T_1$  e  $T_2$ . Para as amostras de 50 e 60 % há o aparecimento de picos (5 e 6) em regiões de  $T_1 < T_2$  e que não apresentam sentido físico. Estes picos apresentam intensidades relativas de 1,2 e 2,6%, respectivamente, na

composição de 60% e podem ser devidos a erros da transformação inversa de Laplace, oriundos dos ruídos experimentais.

Com exceção dos picos nas regiões proibidas, os 4 picos aparecem em regiões próximas em toda a faixa de concentração (35-60%). É interessante notar que os valores de  $T_1$  são próximos para todos os picos, no entanto, observa-se que a razão  $T_1/T_2$  cresce na ordem dos picos:  $1 > 2 > 3 > 4$ . Esta ordem também indica o grau de mobilidade dos prótons de cada pico, sendo os prótons com menores mobilidades associados ao pico 4.

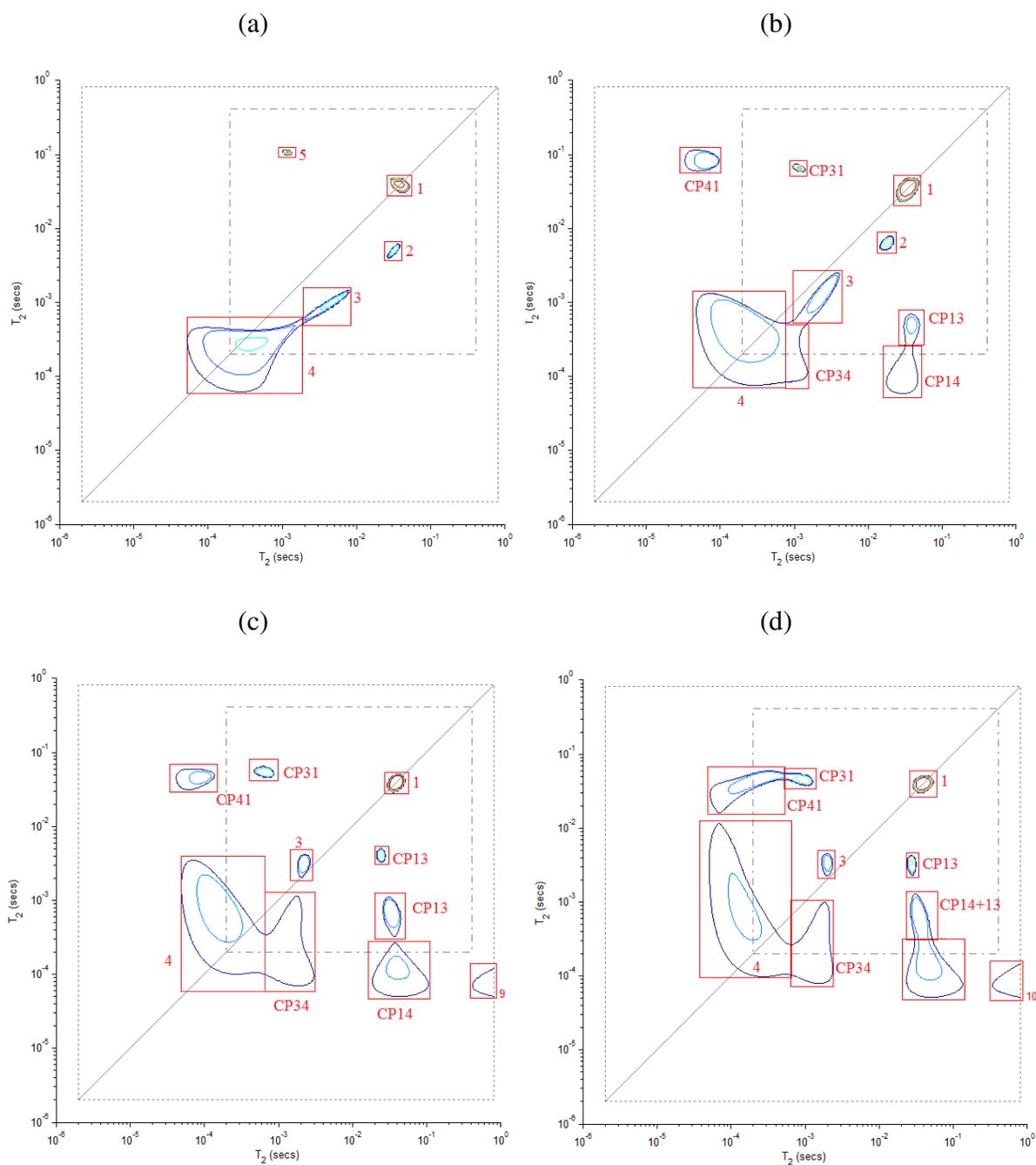
**Tabela 7.3.** Valores de  $T_1$  e  $T_2$  expressos em *ms* para os géis água/sephadex em diferentes razões mássicas (%).

Pico	Tempo de relaxação <i>ms</i>	Teor de água %			
		35	40	50	60
1	$T_1$	281	333	468	579
	$T_2$	40,2	45,4	38,2	44,6
2	$T_1$	363	347	849	1050
	$T_2$	4,07	4,46	6,72	10,4
3	$T_1$	227	247	412	630
	$T_2$	0,73	0,80	0,70	1,30
4	$T_1$	658	686	-	555
	$T_2$	0,15	0,21	-	0,11

Para os picos 1, 2 e 3 há uma tendência de aumento dos valores de  $T_1$  com o aumento do teor de água. No entanto, os valores de  $T_2$  para estes picos não aumentam na mesma proporção e nem seguem uma tendência clara. Assim, ainda não é possível a identificação de moléculas de água livres. Apenas o

pico 2 apresenta aumento de  $T_2$  com o aumento da proporção de água. No entanto, a razão  $T_1/T_2$  permanece praticamente constante. No limite de pulsos rápidos,  $\tau \rightarrow 0$  (neste caso  $\tau = 100 \mu s$ ) a contribuição da difusão por regiões com diferentes frequências (devidas aos gradientes de susceptibilidade magnética) para a defasagem dos spins pode ser negligenciada.<sup>13</sup> Neste caso, os valores de  $T_2$  observados são simplesmente a média entre os ambientes com diferentes taxas intrínsecas de relaxação.<sup>13</sup> Assim, os valores de  $T_2$  dos picos 1 são a média (de cada amostra) dos valores encontrados para os prótons da água e dos prótons hidroxil da sephadex nos vários ambientes. Estas trocas estão em regime de rápidas trocas e o sinal do FID é praticamente monoexponencial, com exceção de uma população com decaimento muito rápido.

Foram observados picos cruzados para as várias composições de água/sephadex dos gráficos da Fig. 7.8, e é possível inferir que há transferência de magnetização entre as moléculas de água e as populações de spins não trocáveis. As amostras de composição 35 e 40% apresentaram comportamentos semelhantes, e na Figura 7.9, são mostrados os espectros 2D  $T_2 - T_2$  em diferentes *store times* para o gel água/sephadex a 35%. Em curtos intervalos entre as sequências CPMG (*store* = 0,5 ms Fig. 7.9-a), há apenas um pico cruzado pouco intenso e bastante distorcido. Este pico marcado como “5” é, aparentemente, o resultado de relaxação cruzada entre os prótons trocáveis (pico 1) e os prótons não trocáveis mais lentos (pico 4). As taxas de relaxação cruzada tornam-se efetivas nas faixas compreendidas entre *store time* 10 e 100 s<sup>-1</sup>. Para tempos *store* mais longos que 200 ms, há uma diminuição significativa da intensidade dos picos diagonais e cruzados como consequência da relaxação longitudinal entre as duas sequências CPMG.

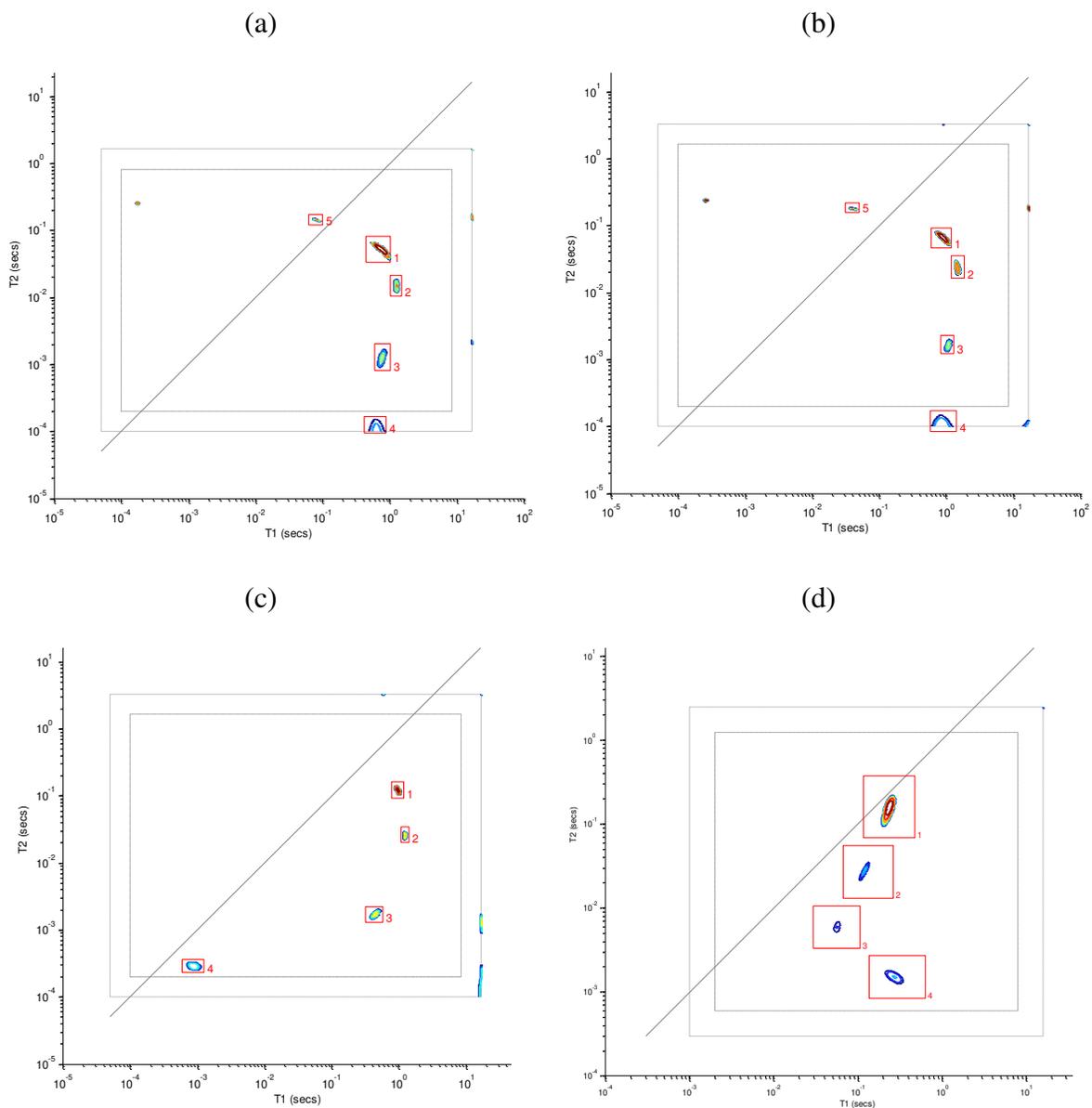


**Figura 7.9.** Espectros 2D  $T_2 - T_2$  do gel água/sephadex 35% em diferentes *store times*: (a) 0,5 ; (b) 3 ; (c) 10; e (d) 20 ms. CPMG  $\tau = 100 \mu\text{s}$ .

Com exceção dos prótons do pico 2, as outras duas populações de prótons não trocáveis (picos 3 e 4) apresentam relaxações cruzadas com as populações de prótons trocáveis (pico 1). No entanto, as transferências de magnetização que

ocorrem em tempos mais curtos são entre as populações de prótons trocáveis (maiores valores de  $T_2$ ) com os prótons não trocáveis mais rígidos (menores valores de  $T_2$ ). Porém estes picos cruzados são pouco intensos. Como os tempos característicos das moléculas de água na camada de hidratação em várias soluções de géis e de macromoléculas é da ordem de nano segundo ou mais curtos, não há uma transferência de magnetização efetiva dos prótons da água para os prótons CH das cadeias de dextrana. Este processo só se torna mais eficiente Em tempos *store* mais longos (Fig. (c) e (d)) há também relaxação cruzada entre os picos (3 e 1) e (3 e 4), pois nesta faixa de tempo ocorrem também as trocas de prótons em as moléculas de água e os grupos OH das cadeias de dextrana.

Estes indícios ainda não permitem uma atribuição mais acertada das populações de prótons associadas aos picos 2, 3 e 4. Na faixa de concentração até 60% em massa de água nos géis ainda não foi possível distinguir populações de prótons de água entre o interior e o exterior das esferas. Aparentemente, as moléculas de água apresentam um único tempo de relaxação intrínseco em toda amostra de sephadex e, se houver diferenças entre os ambientes, estas populações devem estar no regime de rápidas trocas químicas. A Figura 7.10 apresenta os espectros  $T_1 - T_2$  das amostras água/sephadex em composições tendendo ao limite, a partir do qual há a saturação da amostra e formação visual de água livre. Os seus respectivos valores de  $T_1$  e  $T_2$  são apresentados na Tabela 7.4. A partir dos espectros das Figuras 7.10(a-c) não é possível identificar diferenças nos picos trocáveis (pico 1), à medida em que a quantidade de água nos géis se aproximam do ponto de saturação (~78,9 % de água).



**Figura 7.10.** Espectros de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  dos géis água/sephadex em diferentes composições frequência de 100 MHz: (a) 71%; (b) 76,4%; (c) Saturada (~78,9%); e (d) água/sephadex 78% 2,24 MHz.  $\tau = 100 \mu s$ .

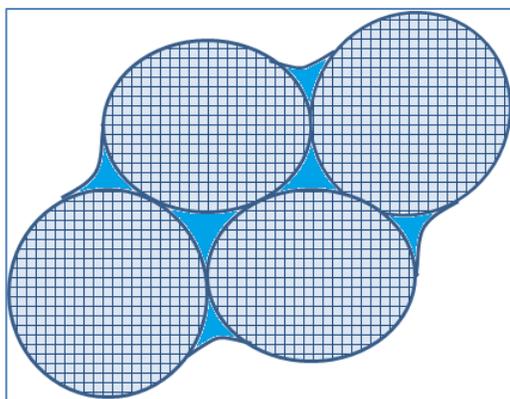
No entanto, a partir dos dados da Tab. 7.4 nota-se aumento em ambos  $T_1$  e  $T_2$ , enquanto para concentrações mais baixas de água nos géis (Fig 7.8) os valores dos tempos de relaxação transversais não variam significativamente com a composição.

**Tabela 7.4.** Valores de  $T_1$  e  $T_2$  expressos em mili segundos para os géis água/sephadex em diferentes razões mássicas (%) à 100 MHz e a 2,24 MHz como indicado.

Pico	Teor de água %	Tempo de relaxação/ ms			
		71	76	78,9 (Sat)	~sat (2MHz)
1	$T_1$	716	849	924	238
	$T_2$	54,3	69,1	125	163
2	$T_1$	1244	1414	1192	120
	$T_2$	14,8	23,5	26,1	28,4
3	$T_1$	747	1050	430	55,4
	$T_2$	1,26	1,67	1,73	5,93
4	$T_1$	630	849	0,86	271
	$T_2$	0,10	0,10	0,29	1,53

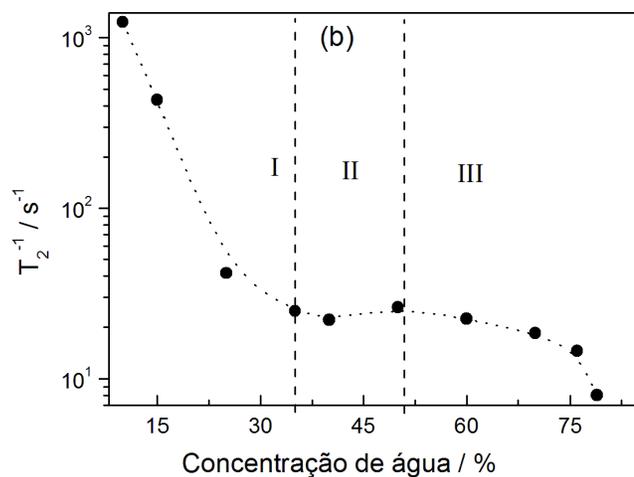
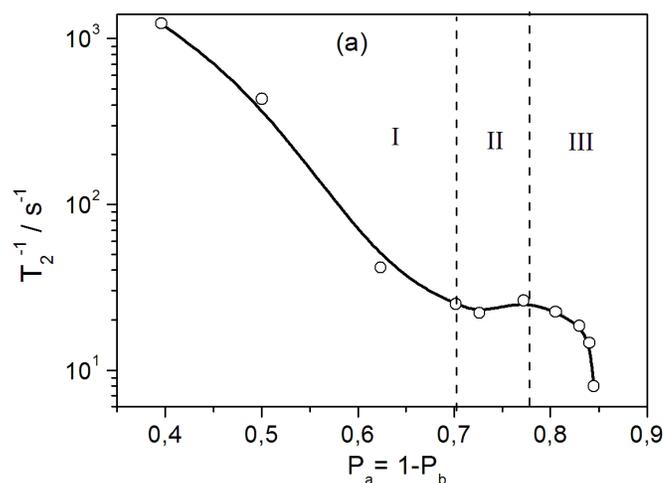
Pode-se dizer que este fato indica a presença de moléculas de água apenas no interior das esferas ou, na melhor das hipóteses, as moléculas de água localizam-se na camada de hidratação das esferas de sephadex, internamente e superficialmente, sem a presença de moléculas livres.

O fato de os valores de  $T_2$  aumentarem abruptamente a partir de uma razão de água superior a 76% m/m também sugere que a partir desta concentração as esferas apresentam saturação de moléculas de água internamente e superficialmente. A partir desta concentração inicia a formação de água livre, ou nos interstícios como proposto esquematicamente na Figura 7.11.



**Figura 7.11.** Representação esquemática do gel água/sephadex após a saturação interna das esferas de sephadex com moléculas de água e a formação de interstícios de água representados em azul. A dimensão dos interstícios é apenas ilustrativa e não têm nenhuma pretensão de representar a real dimensão.

Um pouco antes da condição em que se observa visualmente excesso de água, há uma contribuição das moléculas de água entre as esferas de sephadex (água contida nos interstícios) para o aumento dos valores de  $T_2$ . Este fato sugere que para os sistemas acima de 70% já inicia a formação dos interstícios os quais contribuem mais fortemente para o aumento de  $T_2$  dos prótons trocáveis. A partir dos valores de  $T_2$  em função da composição (expressas em concentração  $P_a$ , fração de prótons da água) mostradas nas Figuras 7.12 (a), e em fração mássica % m/m da água, 7.12 (b) é possível, distinguir três regiões com dinâmicas características. Nos gráficos (a) e (b) da Fig. 7.12 estas regiões são denominadas por I, II, e II, associadas a três faixas de concentrações de água. Na primeira região, I, o teor de água é baixo e as cadeias apresentam aumento progressivo da mobilidade. Este processo ocorre até uma concentração de ~ 40% m/m ou  $P_a \cong 0,7$ . A partir desta composição até  $P_a \cong 0,75$  e  $\cong 58\%$  m/m, região II, não há alteração dos valores de  $T_2$  com o aumento do teor de água nas esferas.



**Figura 7.12.** Tempo de relaxação transversal dos prótons trocáveis (pico 1) espectros das Figuras 7.(3, 8 e 10), em função da concentração de água: (a)  $P_a = 1 - P_b$ ; (b) % m/m.

Para maiores conteúdos de água, região III, há uma súbita diminuição da taxa de relaxação, à qual pode ser associada à presença de água no exterior das esferas ou nas regiões superficiais. Devido às diferenças de susceptibilidade magnética entre o interior e o exterior, há uma diferença de frequência, cerca de 40 Hz, entre as frequências dos spins no interior e exterior das esferas de sephadex. Porém, as defasagens dos spins advindas das diferenças de susceptibilidade não contribuem para o aumento da relaxação no limite de

rápidos pulsos da sequência CPMG.<sup>13</sup> Na região III os valores de  $1/T_2$  dos prótons trocáveis apresentam uma rápida diminuição mas não foi detectado picos diferentes para a população de prótons trocáveis. É muito provável que as moléculas de água do interior e exterior estejam em regime de rápidas trocas. Assim, os valores de  $T_2$  dos prótons trocáveis são devidos aos prótons da água (interior + exterior) juntamente com os prótons OH das cadeias de dextrana. O fato de não ter sido detectada a presença de moléculas de água livres ou com comportamento de bulk, é também um indicativo de que as distâncias entre as cadeias de dextrana no interior das esferas de sephadex é bastante pequena. De fato, apenas macromoléculas relativamente pequenas ( $\langle M_w \rangle < 10^4 \text{ Daltons}$ ) passam pela malha do interior das esferas de sephadex.<sup>15</sup> O fato de não haver indícios de moléculas de água com comportamento de bulk, poderá implicar em alterações nas interações água-biomoléculas durante purificações em colunas de sephadex G25.

### 7.3.1. A Influência da intensidade de $B_0$

Voltando à Figura 7.10 pode-se observar uma forte dependência dos valores de  $T_1$  dos prótons em relação à intensidade do campo estático  $B_0$ . Em baixo campo, com frequência centrada em 2,24 MHz, os valores de  $T_1$  são mais próximos dos valores de  $T_2$ . Estes resultados sugerem que os prótons não trocáveis, especialmente os prótons com valores intermediários de  $T_1$  e  $T_2$  devem apresentar tempos de correlação nas vizinhanças de  $\frac{1}{2\text{MHz}} \approx 0,5 \mu\text{s}$ , ou inferiores. Em frequências mais altas, tal que  $\omega_0 > \frac{1}{\tau_c}$ , os valores de  $T_1$  tornam-se cada vez maiores com o aumento de frequência, enquanto os

valores de  $T_2$  caem continuamente (ver Seção 4.5 do Capítulo 4). No caso dos prótons trocáveis, observam-se valores bastante próximos para os tempos de relaxação longitudinal e transversal,  $T_1/T_2 \cong 3/2$ , enquanto para os prótons não trocáveis  $T_1/T_2 \cong 10$ , ou maior que 100, no caso do pico com valores mais curtos de  $T_2$  (pico 4 Fig. 7.10-d).

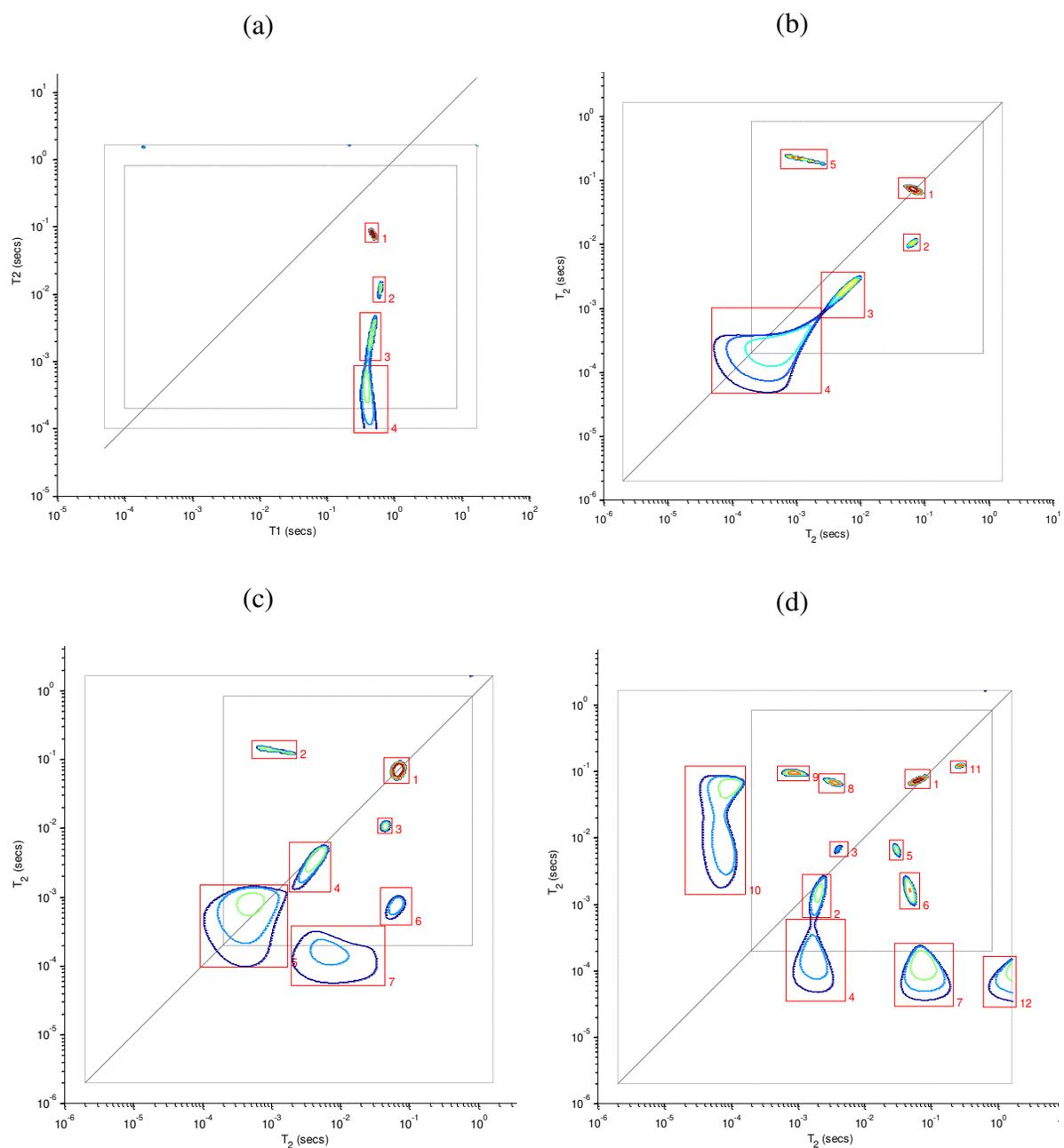
Além dos prótons trocáveis água (interior e região superficial) e dos grupos OH, os prótons não trocáveis também apresentam uma súbita diminuição dos valores de  $1/T_2$ , porém os valores mantêm-se consideravelmente mais altos do que o dos prótons trocáveis. A atribuição feita de prótons não trocáveis aos picos 2, 3 e 4 nas Figuras 7.9 e 7.10, foi baseada nos valores de  $T_1$  e  $T_2$  e principalmente nas razões destes tempos.

### 7.3.2. *Efeito da substituição isotópica $H_2O$ por $D_2O$ nos espectros 2D*

No sentido de obter evidências mais contundentes nas atribuições das populações de spins aos picos nos espectros 2D, foram realizados experimentos de relaxometria em amostras substituindo a água por água deuterada  $^2H_2O$  ( $D_2O$ ). A Figura 7.13 apresenta os espectros  $T_1 - T_2$  e  $T_2 - T_2$  do gel  $D_2O$ /sephadex à razão mássica 42% que corresponde à mesma concentração de moléculas de água do gel água/sephadex 40%.

O gel contendo  $D_2O$  apresenta tendências muito parecidas às do gel contendo  $H_2O$ , porém com significativa diferença entre as intensidades dos picos e nos valores de  $T_2$ . Na Tabela 7.5 são apresentados os valores de  $T_2$ , obtidos dos espectros 1D dos géis de sephadex em  $H_2O$  e  $D_2O$ . Nesta tabela são destacadas três populações de prótons: uma com valor de  $T_2$  mais baixo

(prótons CH mais rígidos); a segunda com picos intermediários (prótons CH mais flexíveis); e a terceira formada por prótons trocáveis.



**Figura 7.13.** Espectros de correlação cruzada do gel  $D_2O$ /sephadex 45% em massa de  $D_2O$ ; (a)  $T_1 - T_2$ ; e  $T_2 - store - T_2$  com diferentes *store times*: (b) 1 ms; (c) 10 ms; e (d) 200 ms.

No caso do gel em D<sub>2</sub>O, o pico trocável apresenta uma intensidade reduzida causada simplesmente pela substituição isotópica H/D que ocorrem entre as moléculas de água (D<sub>2</sub>O) e os prótons trocáveis (OH) das cadeias de dextrana.

**Tabela 7.5.** Valores de  $T_2$  e as respectivas áreas relativas dos picos trocáveis e não trocáveis para os géis de sephadex com H<sub>2</sub>O ou D<sub>2</sub>O na mesma composição molar.

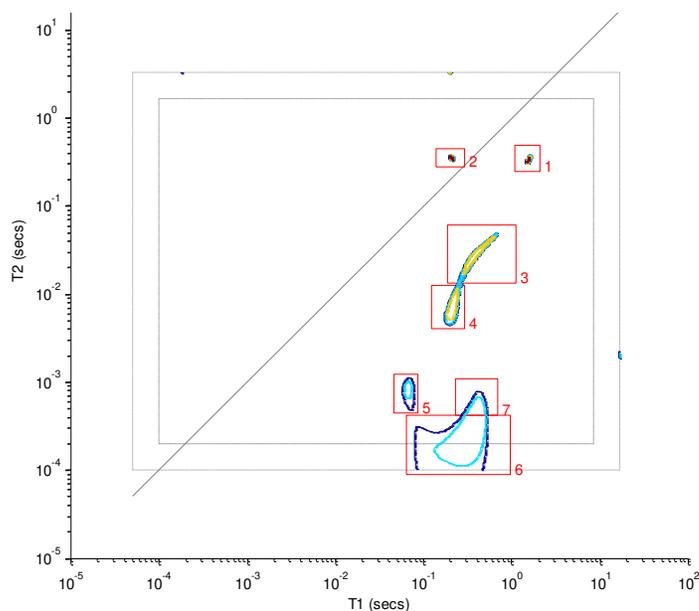
Grupos	H <sub>2</sub> O/sephadex 40%		D <sub>2</sub> O/sephadex 42%	
	$T_2$ (ms)	Área relativa	$T_2$ (ms)	Área relativa
CH-rígido	0,143	31,15	0,164	47,27
CH-mais flexíveis	0,636 e 1,80	14,64	0,873 e 2,82	22,81
	7,98	2,75	7,63	2,96
Trocáveis	48,6	51,47	95,6	26,94

O efeito de diluição dos prótons também leva a um deslocamento de  $T_1$  e  $T_2$  para valores mais longos como uma consequência (i) diminuição da probabilidade de ocorrer interações dipolares entre os spins-1/2; e por conseguinte, diminuição da transferência de magnetização entre as populações. Esse efeito de diluição isotópico é bastante intenso para os picos dos prótons trocáveis e menos importante, aparentemente negligenciável, para os prótons não trocáveis. Isto corrobora com as evidências de que o principal mecanismo de relaxação dos prótons não trocáveis são interações dipolares intramoleculares entre os prótons não trocáveis, enquanto as interações dipolares com os prótons da água contribuem fracamente.

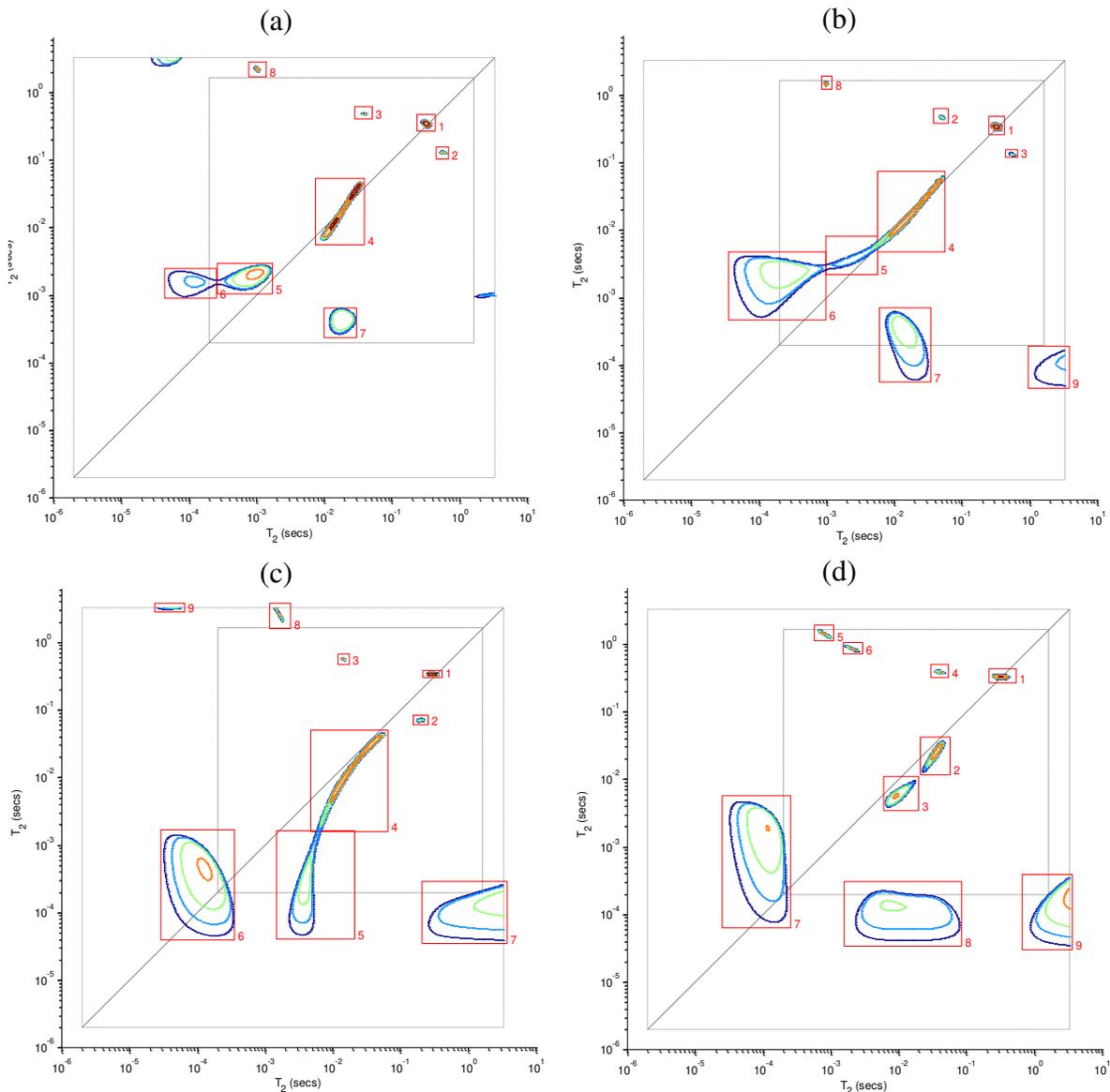
Mesmo com a considerável redução da proporção de prótons na água (ver Tabela 7.5 grupos trocáveis), ainda assim a quantidade de prótons é suficiente para provocar o aparecimento de picos cruzados (Fig. 7.13) entre os vários picos diagonais. Por exemplo, entre os picos 1 (trocáveis) e os demais picos de

prótons não trocáveis. Os picos cruzados também aparecem entre os picos não trocáveis. No entanto, observa-se um aumento do intervalo *estore* para que as trocas se tornem efetivas em relação ao gel formado por H<sub>2</sub>O.

As intensidades relativas dos picos não trocáveis aumentam com a substituição isotópica e, este resultado confirma que somente o pico com valores mais longos de  $T_1$  e  $T_2$  são oriundos dos prótons trocáveis. No sentido de eliminar ao mínimo possível a quantidade dos prótons trocáveis nos géis de sephadex foram realizadas sucessivas etapas de dissolução, centrifugação, e descarte do sobrenadante. Após três sucessivas etapas, os prótons trocáveis praticamente não são mais observados ou a suas intensidades não mais variavam. As amostras submetidas a nove ciclos foram estudadas em experimentos de correlação cruzada e são apresentadas nas Figuras 7.14 e 7.15.



**Figura 7.14.** Espectro de correlação cruzada  $T_1 - T_2$  para fel D<sub>2</sub>O/sephadex após 9ª etapa de troca protônica.



**Figura 7.15.** Espectro de correlação cruzada  $T_2 - T_2$  para gel  $D_2O$ /sephadex após 9ª etapa de troca protônica em diferentes intervalos *store*: (a) 1 ms; (b) 10 ms; (c) 50 ms ; (d) 150 ms. Para todos os espectros o intervalo entre os pulsos na sequência CPMG foi de 100  $\mu s$ .

A principal diferença entre os géis de sephadex saturado em  $D_2O$  e em  $H_2O$  é que, no primeiro a intensidade dos prótons trocáveis é extremamente inferior em relação aos demais picos correspondendo à apenas 6% de toda intensidade do

espectro 2D. O aspecto geral do espectro  $T_2 - T_2$  após a troca dos prótons por deutérios é parecida com os espectros dos géis contendo  $H_2O$ , porém apresentando intensidades do pico de prótons trocáveis bastante reduzida e valores de  $T_2$  mais longos, principalmente para os prótons trocáveis. Nota-se um número maior de picos na amostra com  $D_2O$  e vários deles em regiões fora da confiabilidade que podem ser atribuídos aos erros devido aos elevados ruídos. Para os picos diagonais há um dispersamento ao longo da linha diagonal, principalmente para as populações de prótons não trocáveis. Também pode ser observado picos cruzados formados pelos prótons não trocáveis principalmente entre pico 1 (trocáveis) com picos 2 e 3 (não trocáveis). É notável que mesmo contendo uma pequena quantidade de prótons, a transferência de magnetização entre as várias populações ocorre razoavelmente bem levando ao aparecimento de vários picos cruzados. De fato, a substituição isotópica H/D contribuiu positivamente para reforçar este efeito. Primeiramente por intensificar os picos das populações não trocáveis, relativamente aos prótons trocáveis. E ainda mais importante, por diminuir as taxas de relaxação transversal dos prótons trocáveis e as taxas de trocas protônicas de maneira tal, que  $1/T_2$  e  $K_{CR}$  encontrassem na vizinhanças de  $\frac{1}{store\ time}$ .

#### 7.4. Conclusões

Os géis formados por água/sephadex constituem um excelente sistema modelo para a avaliação dos processos dinâmico-moleculares que ocorrem em materiais micro heterogêneos. Em baixos teores de água as mobilidades das cadeias e das moléculas de água são bastante restritas e, não é observada a

transferência de magnetização e nem a presença de relaxação cruzada entre os prótons trocáveis e não trocáveis. Como o aumento do teor de água nos géis, observa-se um crescente aumento da mobilidade (diminuição das taxas de relaxação  $1/T_2$ ) como consequência da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH das cadeias de dextrana e as moléculas de água. O processo libera as cadeias de dextrana que antes eram unidas por ligações de hidrogênio. Para concentrações de água acima de 25% m/m é possível observar o aparecimento de picos cruzados entre as populações de prótons trocáveis e não trocáveis. Assim, pode-se concluir que para a ocorrência da relaxação cruzada nos sistemas reticulados de dextrana, é necessário que haja mobilidade das moléculas de água. Para concentrações superiores os processos de troca tornam-se mais efetivos e as transferências ocorrem em intervalos de tempo ainda mais curtos.

Foi possível identificar três distintas regiões de mobilidades das moléculas de água nos géis água/sephadex. Na primeira região, ocorre progressivo aumento da mobilidade molecular, porém sem ser observada a presença de moléculas de água livres no interior. O progressivo aumento do conteúdo de água leva a uma máxima quantidade de moléculas de água no interior (concentração cerca de 50-60%) a partir da qual começa a concentrar moléculas de água nas superfícies esferas e nas regiões intersticiais das esferas de sephadex, levando a um súbito aumento dos valores de  $T_2$ .

## 7.5. Referências

- (1) Hernández-Sánchez, N.; Hills, B. P.; Barreirio, P.; Marigheto, N. An NMR study on internal browning in pears. *Postharvest Biology and Technology* **2007**, *44*, 260-270.

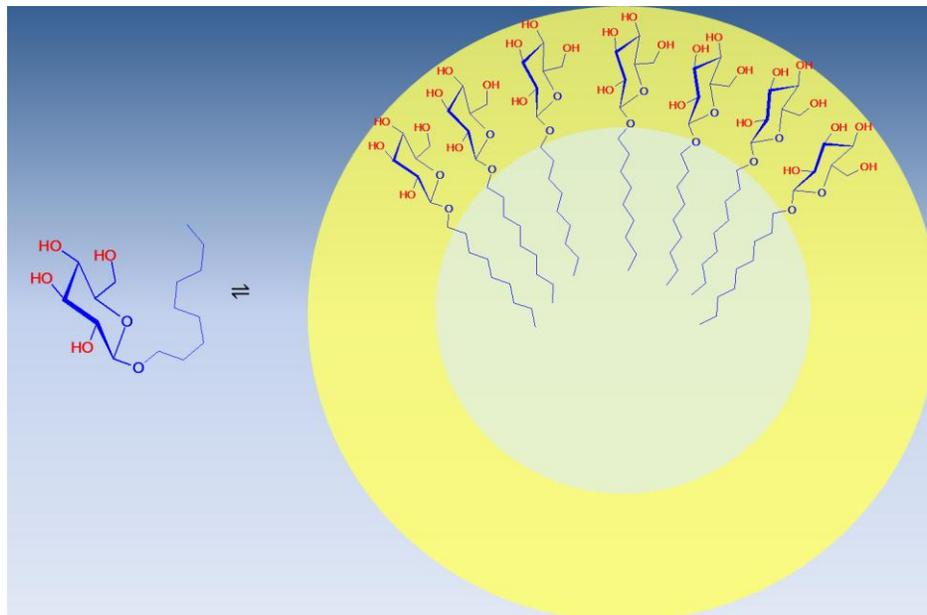
- (2) Furfaro, M. E.; Marigheto, N.; Moates, G. K.; Cross, K.; Parker, M. L.; Waldron, K. W.; Hills, B. P. Multidimensional NMR cross-correlation relaxation study of carrot phloem and xylem. Part II: Thermal and high-pressure processing. *Applied Magnetic Resonance* **2009**, *35*, 537-547.
- (3) Furfaro, M. E.; Marigheto, N.; Moates, G. K.; Cross, K.; Parker, M. L.; Waldron, K. W.; Hills, B. P. Multidimensional NMR cross-correlation relaxation study of carrot phloem and xylem. Part I: Peak assignment. *Applied Magnetic Resonance* **2009**, *35*, 521-535.
- (4) Hills, B.; Costa, A.; Marigheto, N.; Wright, K. Applied Magnetic Resonance T1-T2 N M R Correlation Studies of High-Pressure-Processed Starch and Potato Tissue. *Methods* **2005**, *27*, 13-27.
- (5) Marigheto, N.; Duarte, S.; Hills, B. P. Applied Magnetic Resonance NMR Relaxation Study of Avocado Quality. *Applied Magnetic Resonance* **2005**, *701*, 687-701.
- (6) Venturi, L.; Woodward, N.; Hibberd, D.; Marigheto, N.; Gravelle, A. Multidimensional Cross-Correlation Relaxometry of Aqueous Protein Systems. *Applied Magnetic Resonance* **2008**, *33*, 213-234.
- (7) Marigheto, N.; Venturi, L.; Hibberd, D.; Wright, K. M.; Ferrante, G.; Hills, B. P. Methods for peak assignment in low-resolution multidimensional NMR cross-correlation relaxometry. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2007**, *187*, 327-42.
- (8) Austin, D. T. R.; Hills, B. P. Two-dimensional NMR relaxation study of the pore structure in silicone hydrogel contact lenses. *Applied Magnetic Resonance* **2009**, *35*, 581-591.
- (9) Hürlimann, M. .; Venkataramanan, L. Quantitative Measurement of Two-Dimensional Distribution Functions of Diffusion and Relaxation in Grossly Inhomogeneous Fields. *Journal of Magnetic Resonance* **2002**, *157*, 31-42.
- (10) McDonald, P.; Korb, J.-P.; Mitchell, J.; Monteilhet, L. Surface relaxation and chemical exchange in hydrating cement pastes: A two-dimensional NMR relaxation study. *Physical Review E* **2005**, *72*, 1-9.
- (11) Monteilhet, L.; Korb, J.-P.; Mitchell, J.; McDonald, P. Observation of Exchange of Micropore Water in Cement Pastes by Two-dimensional T2-T2 Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry. *Physical Review E* **2006**, *74*, 061404-9.
- (12) Magin, R. L.; Akpa, B. S.; Neuberger, T.; Webb, A. G. Fractional Order Analysis of Sephadex Gel Structures: NMR Measurements Reflecting Anomalous Diffusion. *Communications in nonlinear science & numerical simulation* **2011**, *16*, 4581-4587.

- (13) Hills, B. P.; Wright, K. M.; Belton, P. S. N.M.R. studies of water proton relaxation in Sephadex bead suspensions. *Molecular Physics* **1989**, *67*, 193-208.
- (14) Hills, B. P.; Manning, C. E.; Ridge, Y. New theory of water activity in heterogeneous systems. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1996**, *92*, 979-983.
- (15) Watanabe, T.; Murase, N.; Staemmler, M.; Gersonde, K. Multiexponential proton relaxation processes of compartmentalized water in gels. *Magnetic Resonance in Medicine* **1992**, *27*, 118-134.

# Capítulo 8

---

Consequência da agregação micelar de *n*-alquil-(glico e malto) sídeos sobre as interações intermoleculares com as moléculas de água





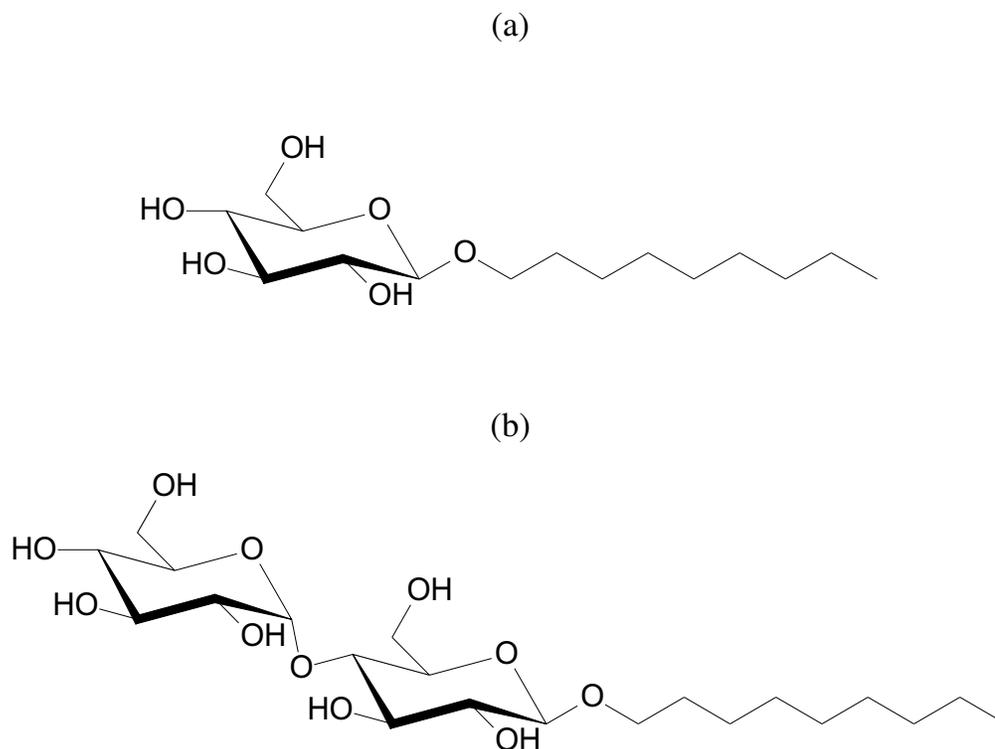
## 8.1. Introdução

Nas últimas décadas a busca por surfactantes biodegradáveis e obtidos por fontes renováveis têm sido bastante explorada. Surfactantes derivados de carboidratos e plantas oleaginosas são de especial interesse por combinarem estas duas características.<sup>1</sup> Uma importante classe destes surfactantes é formada pela família de *n*-alquil-glicosídeos e *n*-alquil-maltosídeos, designados por  $C_nG_1$  e  $C_nG_2$ , respectivamente. Estes compostos são formados por uma cadeia alquílica contendo *n* átomos de carbono e um grupo piranosídeo como, por exemplo, glicose ( $G_1$ ) ou maltose ( $G_2$ ) como mostrado esquematicamente na Figura 8.1 as estruturas do *n*-nonil- $\beta$ -glicopiranosídeo  $C_9G_1$  e *n*-nonil- $\beta$ -maltopiranosídeo  $C_9G_2$ .

Estes surfactantes também são amplamente usados por serem bio-compatíveis e mais amigáveis para extração e estabilização de proteínas,<sup>2</sup> proteção de biomoléculas e células contra degradação,<sup>3</sup> além de liberação controlada de fármacos e ação reguladora de anticorpos no corpo,<sup>4</sup> dentre outras.

Assim como surfactantes convencionais, os *n*-alquil-(glico e malto)sídeos também apresentam a capacidade de se auto-agregarem formando micelas e/ou agregados mesoscópicos.<sup>5,6</sup> A concentração na qual este súbito evento ocorre é chamada de concentração micelar crítica (*cmc*). Este processo de agregação ocorre levando o sistema a um estado de menor energia livre do que aquele contendo os unímeros (moléculas de surfactantes) livres em solução acima da *cmc*. A principal força motriz deste processo agregativo é o aumento de entropia advindo da liberação das moléculas de água que solvatavam as cadeias hidrocarbônicas. Os valores das concentrações micelares críticas (*cmc*) dos surfactantes e a influência da temperatura no comportamento em solução

dependem fortemente do tamanho da cadeia alquílica e, minoritariamente do grupo glicosídeo (glicose ou maltose).<sup>7</sup>



**Figura 8.1.** Fórmulas moleculares estruturais (a) *n*-nonyl- $\beta$ -glicopiranosídeo ( $C_9G_1$ ); (b) *n*-nonyl- $\beta$ -maltopiranosídeo ( $C_9G_2$ ).

É observado que os *n*-alquil-maltosídeos formam micelas mais esféricas, enquanto os *n*-alquil-glicosídeos formam micelas mais alongadas, principalmente os surfactantes de cadeias hidrocarbônicas contendo 9 ou mais átomos de carbono.<sup>8</sup>

Como as principais interações hidrofílicas entre as cabeças polares e o solvente (água) são via ligações de hidrogênio dos grupos glicosilados, seria esperado que alterações da intensidade das ligações de hidrogênio produzissem alterações no comportamento agregativo, principalmente sobre a *cmc*. Como visto nos Capítulos 2 e 3 desta tese, a substituição isotópica

Deutério/Hidrogênio provoca efeitos nas propriedades dos carboidratos em solução. Este efeito é amplificado com o aumento do carboidrato ou pela existência de efeito hidrofóbico que justamente rege os processos de formação de agregados micelares. Para os *n*-alquil-glicosídeos o valor da *cmc* não sofre alteração quando H<sub>2</sub>O é substituída por D<sub>2</sub>O. No entanto, há um aumento do número de agregação,  $N_{ag}$ , e conseqüentemente, um significativo aumento do tamanho micelas ao longo de um eixo.<sup>9,10</sup>

As principais técnicas empregadas para o estudo e caracterização dos sistemas formados por alquil-glicosídeos, envolvem espalhamento de radiação, como espalhamentos de raios-X (SAXS) e de nêutrons (SANS) em baixos ângulos. Já os experimentos de RMN são focados quase exclusivamente nos métodos baseados em difusão roto-translacional, usando sequências do tipo PFGES. A maioria dos trabalhos sobre alquil-glicosídeos, se baseiam nas estruturas moleculares e nos agregados micelares. Mesmo os experimentos de RMN focam-se nas moléculas do surfactante e/ou nas mudanças de propriedades advindas das súbitas alterações estruturais provocadas pelas agregações das moléculas em micelas. Apresentamos nesta Tese um aspecto original no estudo da auto-agregação, que se baseia nas interações dos grupos OH das cabeças polares com as moléculas de água. Este método se baseia em medidas de RMN dos tempos de relaxação do “reservatório” de prótons trocáveis (H<sub>2</sub>O + OH-glicosídeos), antes e após, a formação dos agregados micelares. Mesmo em concentrações muito baixas, mili molar, estas inferências são possíveis porque os processos de troca protônica dependem, dentre outros fatores, da disponibilidade dos grupos hidroxila para estabelecer trocas com as moléculas de água.<sup>11</sup>

### 8.1.1. Embasamento fundamental de relaxação nuclear para estudo crítico de agregação

Para um sistema formado de spins-1/2 no regime de rápidos movimentos moleculares (*extreme narrowing*) e rápidas trocas químicas (*exchange narrowing*) entre os sítios *a* e *b*, a taxa de relaxação spin-spin pode ser descrita pela Equação de Swift-Connick Equação 8.1.<sup>12</sup> Como já discutido na Seção 5.2, esta equação é particularmente útil quando o intervalo entre os pulsos 90-180° na sequência CPMG é mais longo do que o tempo de vida dos prótons nos sítios,  $\tau_{cp} > 1/k_b$  e, portanto, os tempos de relaxação observados são uma consequência dos efeitos roto-difusionais e de trocas químicas entre os sítios.

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2a}} + \frac{P_b k_b}{P_a} \left\{ \frac{\left(\frac{1}{T_{2b}}\right)^2 + \left(\frac{k_b}{T_{2b}}\right) + (\delta\omega)^2}{\left(\frac{1}{T_{2b}} + k_b\right)^2 + (\delta\omega)^2} \right\} \quad (8.1)$$

$T_{2a}$  e  $T_{2b}$  são os tempos de relaxação transversal intrínsecos dos spins nos sítios *a* (água livre) e *b* (prótons OH-carboidrato), e  $P_a$  e  $P_b$ , são suas respectivas populações;  $k_b = 1/\tau_b$  é o recíproco do tempo de vida no sítio *b*, e  $\delta\omega = |\omega_a - \omega_b|$  é a diferença de frequência entre os sítios *a* e *b*. No limite de rápidas trocas protônicas,  $(k_b; \delta\omega) \gg T_{2b}^{-1}$ , o tempo de relaxação transversal dos prótons trocáveis é simplesmente a média dos dois sítios ponderadas pelas respectivas populações<sup>13</sup> acrescida da contribuição advinda dos processos de troca química com taxa,  $k_b$ , e com diferença de frequência,  $\delta\omega$ , entre os sítios água livre e grupos OH-carboidrato. A Equação 8.2 foi modificada da Eq. (8.1) e envolve os fatores de troca química e de deslocamento químico

$$\frac{1}{T_2(\tau_{longo})} \approx \frac{1}{T_{2a}} + \frac{P_b k_b}{P_a} \left\{ \frac{T_{2b}^{-1}}{k_b} + \frac{(\delta\omega)^2}{k_b^2} - \frac{\delta\omega}{k_b^3} - \frac{(\delta\omega)^4}{k_b^4} \right\} \quad (8.2)$$

na medida em que os tempos de vida no sítio OH-carboidrato torna-se pequeno, ou a taxa de transferência de prótons se torna-se elevada,  $k_b = 1/\tau_b$ , os denominadores do terceiro e quarto termos dentro das chaves tornam-se muito pequenos. Deste modo, em baixos campos magnéticos e/ou baixos deslocamentos químicos, a Equação 8.2 pode ser reescrita da seguinte forma.

$$\frac{1}{T_2(longo \tau_{cp})} \approx \frac{1}{T_{2a,f}} + \frac{P_b}{P_f} \frac{1}{T_{2b}} + \frac{P_b(\delta\omega)^2}{P_f k_b} \quad (8.3)$$

Já no limite de rápidas taxas de pulsos,  $\tau \ll k_b^{-1}$ , temos

$$\frac{1}{T_2} = \frac{P_a}{T_{2a}} + \frac{P_b}{(T_{2b} + k_b^{-1})} \quad (8.4)$$

E no limite rápidos pulsos e de rápidas trocas químicas,  $k_b \gg T_{2b}^{-1}$ , a equação 8.2 se reduz a  $T_2^{-1} = P_a T_{2a}^{-1} + P_b k_b$ .

Em soluções aquosas muito diluídas,  $P_b \ll P_a$ , um gráfico do tempo de relaxação transversal dos prótons trocáveis em função da concentração de grupos OH ( $P_b$ ), fornecerá uma linha reta cujo coeficiente angular é proporcional à constante de troca  $k_b$  e ao deslocamento químico. Porém, processos moleculares podem diminuir a disponibilidade dos prótons como gelificação em soluções de polissacarídeos,<sup>13</sup> ou formação de ligações de hidrogênio intramoleculares como nas formas nativas das ( $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ ) ciclodextrinas.<sup>11</sup> Deste modo, a Equação 8.2 pode ser expressa como

$$\frac{1}{T_2(\text{longo } \tau_{cp})} = \frac{P_a}{T_{2a}} + (P_b)_{max} f k_b \left\{ \frac{T_{2b}^{-1}}{k_b} + \frac{(\delta\omega)^2}{k_b^2} - \frac{\delta\omega}{k_b^3} - \frac{(\delta\omega)^4}{k_b^4} \right\} \quad (8.5)$$

Em que  $f$  é a fração dos grupos OH que, de fato, estão disponíveis para realizar trocas protônicas e  $(P_b)_{max}$  é a fração molar máxima teórica de sítios disponíveis para realizar trocas protônicas. Através da Equação (8.5) é, portanto, possível estudar as implicações dos processos agregativos dos alquil-glicosídeos em relação à disponibilidade dos grupos OH em realizar trocas protônicas.

Nas Equações (8.2, 8.3 e 8.5) os termos envolvendo  $T_{2b}$ ,  $\delta\omega$  e  $k_b$ , são constantes para um dado sistema molecular e imerso num campo externo  $B_0$  fixo, por isso, os termos em chaves podem ser entendidos como uma constante e a Eq. 8.5 pode ser reescrita como a Equação 8.6.

$$\frac{1}{T_2(\text{longo } \tau_{cp})} = \frac{P_a}{T_{2a}} + f(P_b)_{max} K_b \quad (8.6)$$

Em que  $K_b$  é uma constante que depende do valor de  $T_{2b}^{-1}$ , das taxas de troca protônica e do deslocamento químico entre os sítios  $a$  e  $b$ ,  $\delta_b$ . No entanto, ao ocorrer um evento súbito como a agregação crítica de moléculas de  $n$ -alquil-glicosídeos em micelas, poderá acarretar alterações destes parâmetros e também da fração de sítios disponíveis para realizar trocas. Por exemplo, quando as cabeças glicosídeas se aproximam durante a formação das micelas a concentração local de grupos OH aumentará drasticamente em relação ao seio da fase, cuja concentração de surfactante está na faixa de sub até duas dezenas de *mili mol L*<sup>-1</sup>. As principais consequências seriam aumento de  $T_{2b}$  e, provavelmente alterações de  $k_b$  e/ou  $\delta\omega$ , podendo alterar os valor de  $K_b$ . Portanto, a partir de medidas de  $T_2$  dos prótons trocáveis em função da

concentração, pode-se obter informações moleculares das interações entre a cabeças dos surfactantes e as moléculas de água.

## 8.2. *Materiais e Métodos*

### 8.2.1. *Materiais*

Todos os *n*-alquil- $\beta$ -glicosídeos e maltosídeos ( $C_8G_1$ ;  $C_8G_2$ ;  $C_9G_1$ ;  $C_9G_2$ ;  $C_{10}G_1$ ; e  $C_{10}G_2$ ) pureza  $\geq 99\%$ , foram comprados da Anatrace (Maumee, Ohio-EUA) e usados sem posteriores purificações. As soluções para estudos de RMN foram preparadas a partir de soluções estoque de concentrações superiores a  $\sim 80 \text{ mmol kg}^{-1}$  a fim de minimizar os erros experimentais no preparo das soluções. O preparo das soluções estoque e posteriores soluções diluídas foram realizados em balança analítica com precisão ( $> 0,0001$  grama). A água usada em todos os experimentos foi deionizada ( $18,2 \text{ M}\Omega$ ,  $\text{pH} \sim 6$ ) e a água deuterada ( $D_2O$ ) foi adquirida da Sigma-Aldrich com pureza atômica superior a  $99,9\%$  em átomos de Deutério. Cuidados especiais foram tomados no preparo das soluções para evitar a absorção de água pelos alquil-glicosídeos que são higroscópicos e podem sofrer hidrólise em temperatura  $> 60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Também foram tomados cuidados especiais no preparo das amostras em  $D_2O$  para evitar trocas D/H indesejáveis.

### 8.2.2. *Medidas dos tempos de relaxação transversal*

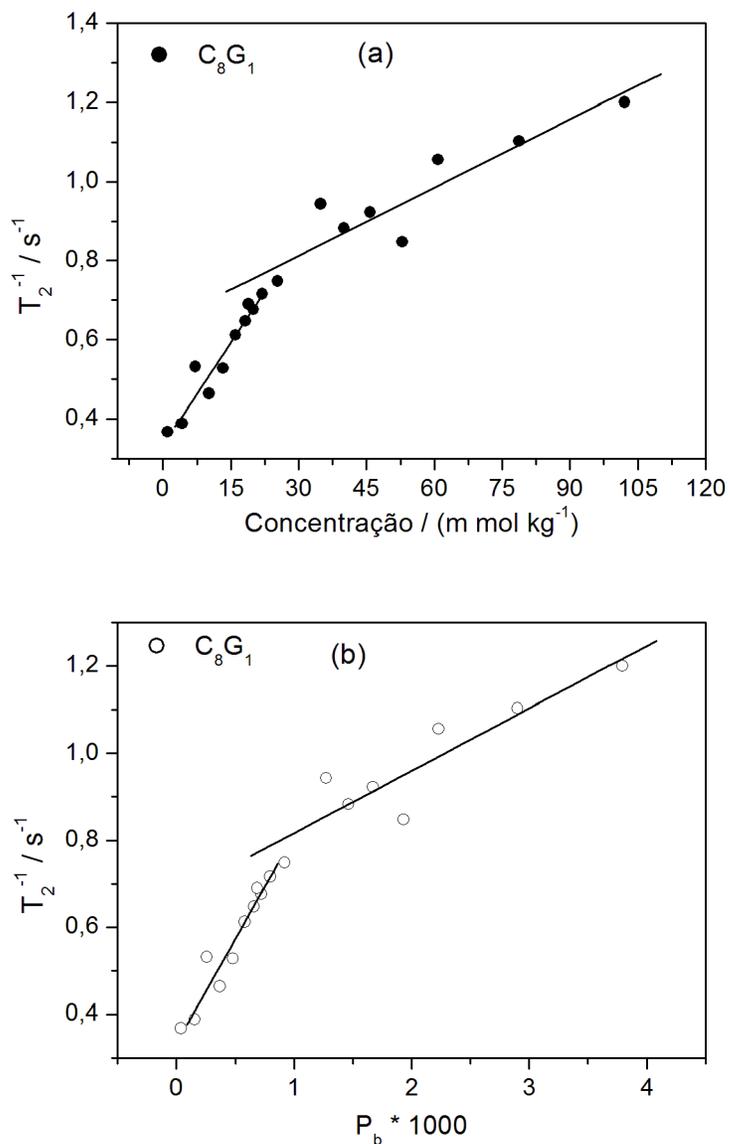
As medidas de relaxação spin-spin dos  $^1\text{H}$  foram realizadas no espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian INOVA operando à  $500 \text{ MHz}$ . Os tempos de relaxação foram obtidos através da integração da área dos picos

associados aos prótons trocáveis oriundos majoritariamente das moléculas de água ( $\delta \cong 4,76$  ppm) utilizando-se sequência de pulsos CPMG,  $RD - 90^\circ - \tau_{cp}[-180^\circ - \tau - eco -]_{n_{cp}} - FID$ . Neste procedimento o tempo RD (*relaxation Delay*) foi de  $10\text{ s} \gtrsim 4T_1$  para permitir a completa volta da magnetização longitudinal e a duração típica dos pulsos de  $90^\circ$  foi de  $9,5 - 10\ \mu\text{s}$ . Este procedimento foi repetido por pelo menos 4 vezes ( $NS=4$ ) e o sinal obtido foi a média de 4 espectros no sentido de obter boas relações sinal-ruído. O solvente deuterado utilizado para o procedimento spin/lock foi  $C_6D_6$  (Sigma-Aldrich) inserido no interior de um tubo capilar co-axial acoplado internamente nos tubos de RMN de 5mm. As áreas dos picos apresentaram decaimentos mono-exponenciais e os valores de  $T_2$  foram determinados pela constante de decaimento de acordo com a equação  $A = A_0 e^{-t/T_2}$ , através das atenuações obtidas em diferentes *delay-times*, “ $t$ ” sendo  $t = 2n_{cp}\tau$ , e  $n_{cp}$  pode ser qualquer número inteiro e positivo. Nesta equação,  $A_0$  e  $A$ , são as áreas obtidas em *delay-time* zero e nos 14 valores sucessivos de  $t$ , respectivamente. Os valores de  $t$  situaram na faixa entre 0,005 e 9,0 s a fim de obter linhas base com intensidade inferiores a 5% da intensidade inicial. As medidas de  $T_2$  foram realizadas usando intervalo interpulsos  $\tau = 4,0\text{ ms}$ , situando, portanto, em regiões de longos intervalos interpulsos onde os efeitos de troca química e defasagem de spins são bastante intensos. Previamente às medidas de  $T_2$ , esperou-se um tempo entre 10 – 15 minutos para que cada amostra no interior da sonda pudesse alcançar o equilíbrio termodinâmico a  $25^\circ\text{C}$  e esta temperatura foi mantida ao longo de toda aquisição. As medidas de  $T_2$  dos prótons ( $\delta \cong 4,78$  ppm) em soluções dos  $n$ -alquil-glicosídeo em  $D_2O$  foram realizadas usando-se o mesmo protocolo das medidas com o solvente  $H_2O$ , porém, sem a necessidade de filtro de atenuação do sinal. A única

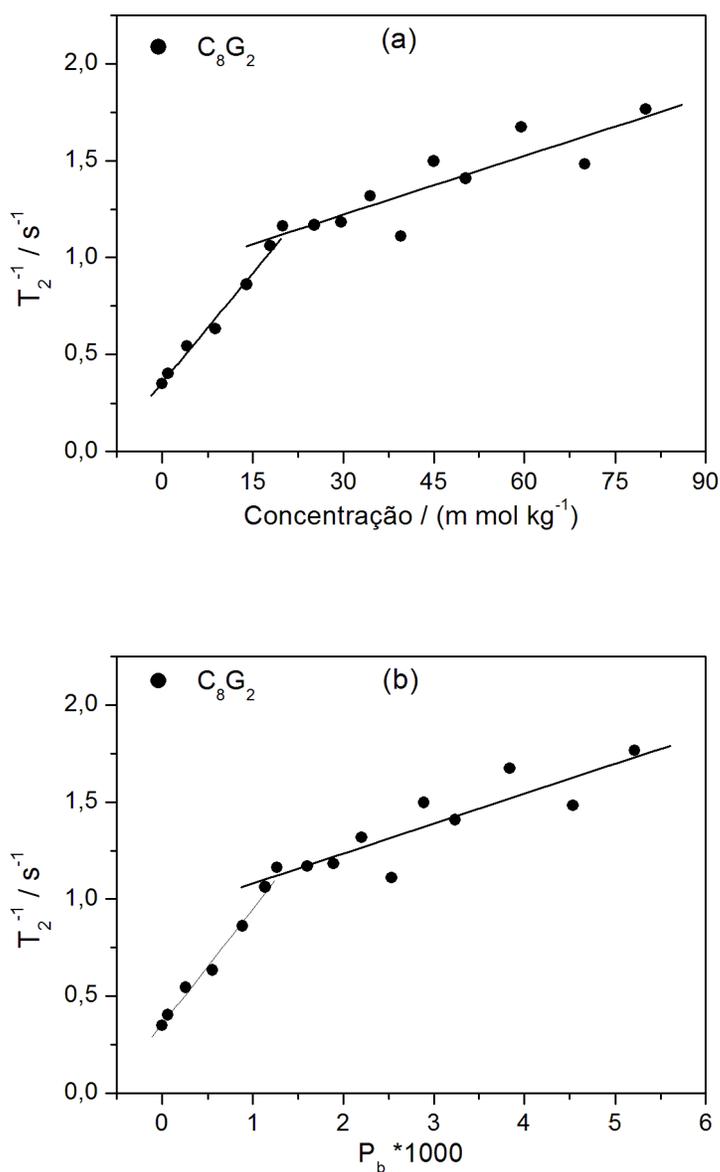
mudança foi uma nova calibração para os pulsos de  $90^\circ$  e  $180^\circ$  que mostraram-se ligeiramente mais longos  $\geq 10 \mu s$ .

### 8.3. Resultados e Discussão

As Figuras 8.2 e 8.3 apresentam os gráficos da taxa de relaxação transversal dos prótons trocáveis em função da concentração dos *n*-alquil-glicosídeos  $C_8G_1$  e  $C_8G_2$ , respectivamente, em água e a  $25^\circ C$ . Nas regiões de baixas concentrações é observado um aumento linear da taxa de relaxação spin-spin dos prótons trocáveis com o aumento da concentração dos *n*-alquil-glicosídeos. O Aumento linear de  $T_2^{-1}(H_2O)$  é uma simples consequência do aumento de sítios OH-surfactante para realizar trocas protônicas com as moléculas de água (ver a Eq. 8.6). As linhas retas nos gráficos das Figuras 8.2 e 8.3 são ajustes lineares de regiões em que a dependência de  $T_2^{-1}$  com respeito à composição,  $P_b$ , são lineares e, cujas inclinações correspondem às constante  $K_b$  dadas pela Equação 8.6. Vale à pena mencionar que os efeitos observados nos valores de  $T_2$  são devido à uma parcela inferior a 0,1% (prótons OH-alquil-glicosídeos) do total de prótons trocáveis das soluções. Este cenário é ainda mais crítico para aquil-glicosídeos com cadeias hidrocarbônicas com 9 ou mais átomos de carbono.



**Figura 8.2:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do *n*-nonil- $\beta$ -glicopiranosídeo expressa nas concentrações: (a)  $mmol\ kg^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis ( $P_b$ ) do  $C_8G_1$ . As linhas retas são ajustes lineares das duas regiões.



**Figura 8.3:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do *n*-octil- $\beta$ -glicomaltosídeo expressa nas concentrações: (a)  $\text{m mol kg}^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis do  $\text{C}_8\text{G}_2$  ( $P_b$ ).

A característica mais marcante das Figuras e 8.2 e 8.3 é a mudança de inclinação da taxa de relaxação dos prótons da água a partir de certas concentrações de surfactante. Estes eventos estão associados à concentrações críticas a partir das quais as moléculas dos *n*-alquil-glicosídeos se agregam em

micelas. Na Tabela 8.1 são resumidos os parâmetros de cada curva de ( $T_2^{-1}$  vs concentração) para os  $n$ -alquil-glicosídeos nas duas regiões de linearidade. Nesta tabela também são apresentados os dados obtidos para os alquil-sacarídeos  $C_9G_1$  e  $C_9G_2$  em  $H_2O$  e para  $C_{10}G_1$  e  $C_{10}G_2$  em  $D_2O$ . As implicações moleculares que podem ser extraídas, como o efeito do tamanho da cadeia alquílica, a influência da cabeça polar (glicose ou maltose), ou do processo agregativo sobre as interações dos  $n$ -alquil-glicosídeos com as moléculas de água são discutidos nas seções subsequentes.

**Tabela 8.1:** Parâmetros das curvas de  $T_2^{-1}H$  (trocáveis) em função da composição nos sistemas formados por  $n$ -alquil-(glico e malto)sídeos em  $H_2O$  e  $D_2O$ ..

Soluto	cmc <sup>a</sup> / (m mol kg <sup>-1</sup> )		Taxas de troca/ (10 <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )		Após cmc	
	Exp	Lit. (mol L <sup>-1</sup> )	$K_b$	$K'_b$	$K'_{b,mic}$	$f$
$C_8G_1$	26-28	25 <sup>14</sup>	0,478	0,143	128	0,27
$C_8G_2$	~20	19,1 <sup>15</sup>	0,596	0,154	142	0,24
$C_9G_1$	~7,5	~6,5	0,352	0,150	105	0,30
$C_9G_2$	9,3	6	0,461	0,188	171	0,37
Glicose	-	-	1,40	-	-	-
Maltose	-	-	0,378	-	-	-
Em $D_2O$			Valores $\times 10^3$ s <sup>-1</sup>			
	cmc	Literatura	$K_b$	$K'_b$	$f$	
$C_{10}G_1$	2,8 (2,5)*	2,2	45,6	1,56	0,034	
$C_{10}G_2$	1,8 (1,64)	1,6-1,8	162	13,1	0,081	

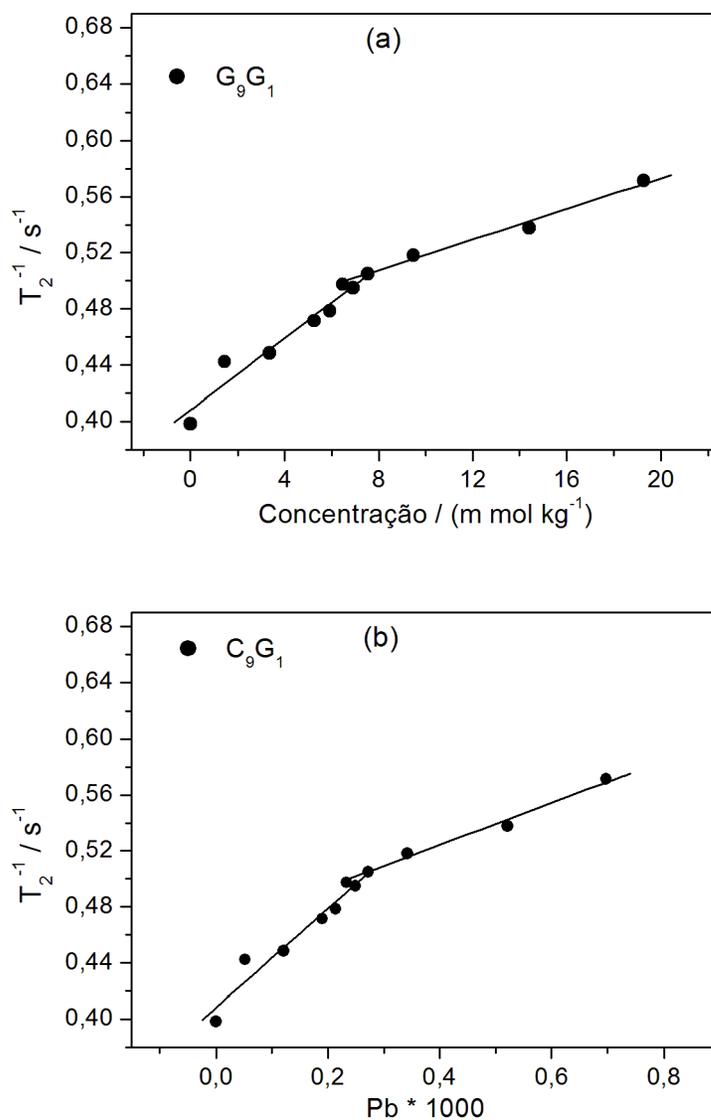
<sup>a</sup> Os desvios dos valores de cmc e das constantes  $K_b$  foram estimados a partir dos erros dos ajustes e estes ficaram em 5 e 20%.

\*Valores entre parêntesis foram convertidos para concentração  $m$  mol L<sup>-1</sup>.

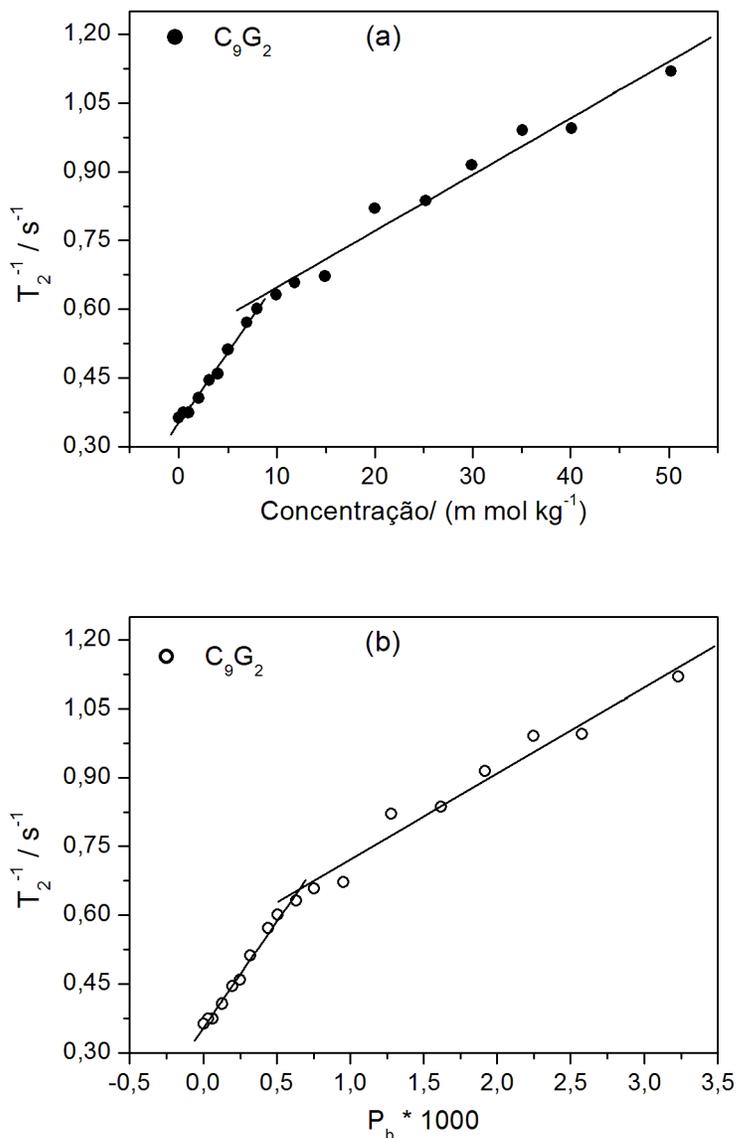
### 8.3.1. *Efeito da cadeia alquílica nas trocas químicas*

Na primeira faixa de concentração, a dependência de  $T_2^{-1}$  com respeito à concentração de alquil-glicosídeo resulta de efeitos provocados exclusivamente pelas moléculas dos surfactantes livres em solução. As perturbações das caudas hidrofóbicas são basicamente duas: (a) alteração da estruturação das moléculas de água ao redor das caudas hidrofóbicas dos alquil-glicosídeos e interações dipolares; (b) diminuição da acessibilidade dos sítios OH devido às perturbações da cauda hidrofóbica. Nas Figuras 8.4 e 8.5 são apresentados os resultados para a influência dos *n*-alquil-sacarídeos C<sub>9</sub>G<sub>1</sub> e C<sub>9</sub>G<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O. A tendência geral dos alquil-sacarídeos com 9 átomos de carbono na cadeia hidrocarbônica é a mesma daquela observada para os *n*-alquil-sacarídeos com oito, porém, com mudanças na inclinação ocorrendo em valores inferiores a 10 mmol kg<sup>-1</sup>. A partir dos dados da Tab. 8.1 nota-se a tendência de que a constante,  $K_b$ , diminui com o aumento da cadeia hidrocarbônica. Este simples efeito pode ser usado para estimar como as cadeias hidrocarbônicas encontram-se orientadas em relação às cabeças sacarídeas. Se as caudas hidrofóbicas se alinharem opostamente em relação às cabeças sacarídeas, o tamanho da cadeia não afetaria os processos de troca protônica entre os grupos OH e as moléculas de água. Assim, a diminuição de  $K_b$  com o aumento da cauda indica que as cadeias hidrocarbônicas encontram-se compactadas e, muito provavelmente, apresentam conformações tais que a sua presença espacial se estende em regiões espaciais próximas dos grupos OH. A Figura 8.6 representa esquematicamente a orientação da cadeia hidrofóbica em relação à cabeça sacarídea. A proximidade da cauda

hidrofóbica perturba a estruturação das moléculas de água nas proximidades dos grupos OH, e conseqüentemente, diminui as taxas de troca protônica.



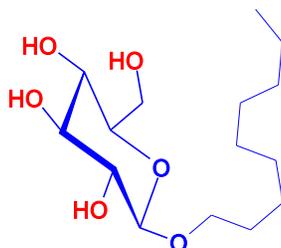
**Figura 8.4:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do  $n$ -nonil- $\beta$ -glicopiranosídeo expressa nas concentrações: (a)  $m mol kg^{-1}$ ; (b) fração molar de prótons trocáveis do  $C_9G_1$  ( $P_b$ ).



**Figura 8.5:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons OH em função da concentração do *n*-nonil- $\beta$ -maltopiranosídeo expressa nas concentrações: (a) *m mol kg*<sup>-1</sup>; (b) fração molar de prótons trocáveis do  $C_9G_2$  ( $P_b$ ).

O aumento da cadeia hidrocarbônica intensifica este efeito devido ao seu maior volume e raio de ação. As conformações das caudas hidrofóbicas estão em constante alteração com tempos característicos inferiores a nano segundos. Deste modo, os efeitos que aparecem nos resultados de relaxação magnética nuclear (escala de tempo mili segundos) é uma média populacional e temporal

das moléculas de surfactante. O resultado global destes processos é a redução das taxas de troca protônica com o aumento da cadeia hidrofóbica.



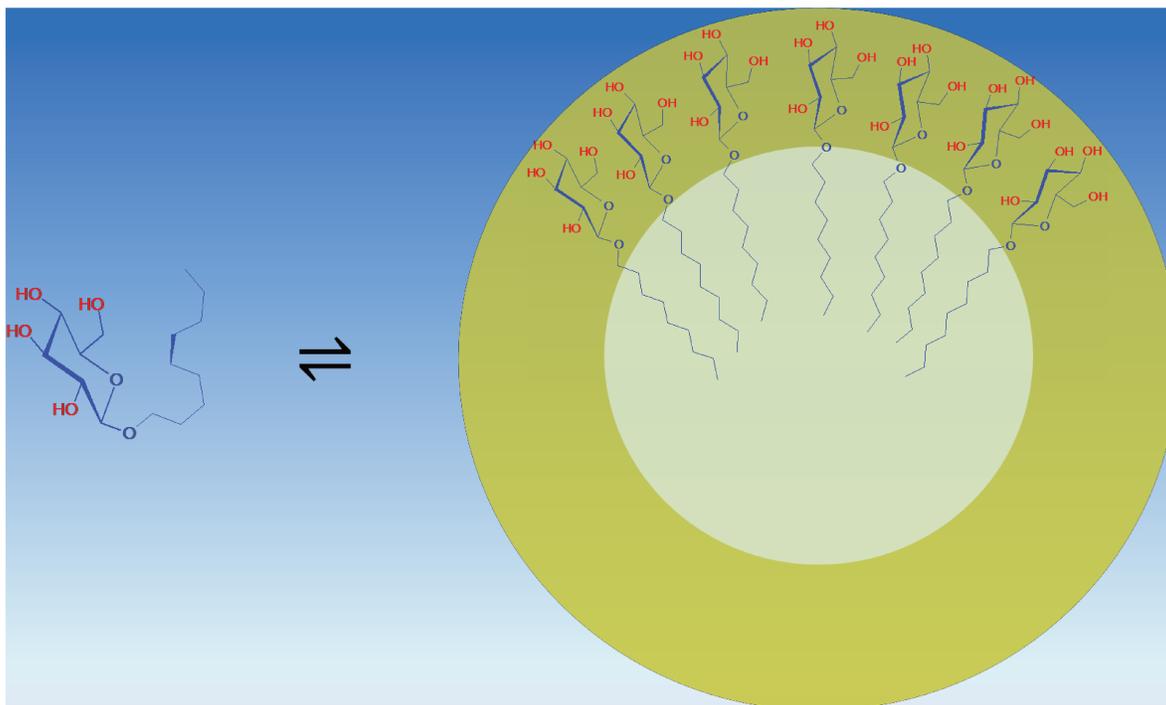
**Figura 8.6.** Representação esquemática da molécula de *n*-alquil-glicosídeo em solução aquosa.

Outro ponto da influência da cadeia a ser destacado é que a presença da cauda hidrocarbônica ligada ao oxigênio anomérico da glicose reduz enormemente a taxa de trocas de prótons (ver Tab. (8.1)). Este mesmo resultado não se aplica no caso do *n*-alquil-maltosídeo maltose em relação ao.

### *8.3.2. Efeito da agregação micelar sobre os processos de troca protônica*

Apesar deste estudo não ter como objetivo a determinação das concentrações micelares críticas, os seus valores apresentados na Tab. 8.1 mostram que há uma grande concordância com os valores da literatura. Assim, os nossos resultados endossam que as mudanças de inclinação dos gráficos de  $T_2^{-1}$  versus  $P_b$  são provocados pelos processos agregativos dos alquil-sacarídeos. Em concentrações inferiores à *cmc*, como já discutido na subseção anterior, a contribuição para os valores de  $T_2^{-1}$  são basicamente originados dos processos de troca entre os grupos OH dos unímeros e as moléculas de água.

Após a concentração crítica, as moléculas de *n*-alquil-sacarídeos irão se apresentar na forma monomérica em equilíbrio com os unímeros nas micelas, e estes também irão contribuir para os valores de  $T_2^{-1}$  dos prótons da água. A Figura 8.7 mostra esquematicamente o processo de agregação e as principais diferenças entre os unímeros livres daqueles que constituem as micelas.



**Figura 8.7:** Figura esquemática do equilíbrio entre as formas monomérica livre e no agregado micelar. Os prótons trocáveis são destacados em vermelho na molécula de *n*-alquil-glicosídeo. A região amarela na micela representa a porção espacial formada preponderantemente pelas cabeças dos *n*-alquil-sacarídeos e há uma alta quantidade de moléculas de água. Já a região clara no interior representa a região hidrofóbica ocupada majoritariamente pelas cadeias hidrocarbônicas.

Os unímeros livres em solução apresentam os grupos OH com liberdade relativamente alta (quase total) para realizarem trocas protônicas. Porém, após a agregação micelar, os grupos OH dos *n*-alquil-sacarídeos ficam muito próximos uns dos outros e, neste regime, é bastante provável que ocorra formação de ligações de hidrogênio entre as cabeças sacarídeas. Também pode

haver uma diminuição da taxa de trocas devido à concentração local de grupos OH estar acima de uma fração de prótons hidroxílicos de 0,25. Além disso, as regiões limítrofes entre as cabeças polares e as caudas apolares são consideravelmente hidrofóbicas e menos acessíveis às moléculas de água.

A descrição matemática dos valores de  $1/T_2$  em função de  $P_b$  para as concentrações acima da  $cmc$  pode ser feita baseada na Eq. (8.6)

$$\frac{1}{T_2} = \left[ \frac{P_a}{T_{2a}} + (P_b)_{cmc} K_b \right] + P_{b,micela} f K'_{b,mic} \quad (8.7)$$

Em que  $(P_b)_{cmc}$  é a fração molar dos prótons trocáveis na concentração micelar crítica,  $K_b$  é a taxa efetiva de troca dos prótons do glicosídeo antes da  $cmc$ ,  $P_{b,mic}$  é a fração de prótons trocáveis nas micelas e  $K'_{b,mic}$  é a taxa efetiva dos seus prótons OH. O termo entre colchete torna-se uma constante em concentrações acima da  $cmc$ . O valor de  $P_{b,mic}$  representa apenas a fração de prótons trocáveis dos unímeros que constituem a micela. Estes valores não são representados pelos  $P_b$  nos gráficos das Figuras 8.2(b)-8.5(b). Os valores de  $P_{b,mic}$  podem ser calculados considerando-se que a quantidade de unímero que está na forma micelar será a quantidade de total de surfactante menos a quantidade de surfactante necessária para atingir a  $cmc$ . A fração de prótons trocáveis da micela pode ser determinada a partir da Equação 8.8

$$P_{b,mic} = \left[ \frac{N_{OH}(n_{C_nG_m} - n_{cmc})}{N_{OH}(n_{C_nG_m} - n_{cmc}) + 2 \times n_{H_2O}} \right] \quad (8.8)$$

em que  $N_{OH}$  é o número de grupos OH na cabeça sacarídea,  $n_{C_nG_m}$  é a quantidade de matéria do alquil-sacarídeo expressa em mol, e  $n_{cmc}$  é a quantidade de matéria (mol) do respectivo  $n$ -alquil-sacarídeo na concentração

crítica de micelização. Nos cálculos, o número de agregação,  $N_{agg}$ , não irá, pelo menos em princípio, determinar o comportamento de relaxação. Ao invés disso, o quão livre ou o quão impedidos estão os grupos OH em realizar trocas protônicas é que irá determinar a influência dos prótons hidroxílicos na micela. O termo  $(n_{C_nG_m} - n_{cmc})$  expressa a quantidade de surfactante que encontra-se na forma micelar. Considerando que cada molécula de  $n$ -alquil-sacarídeo contribui com  $N_{OH}$  grupos hidroxílicos, a quantidade total de prótons hidroxílicos da micela é representada pelo numerador da Eq. (8).

Após a  $cmc$  um gráfico  $T_2^{-1}$  em função de  $P_{b,mic}$  irá fornecer uma equação de primeiro grau, com o coeficiente linear representado pelo termo entre colchetes na Eq. (8.7) e o coeficiente angular por  $fK'_{b,mic}$ . Os valores de  $f$  e  $K'_{b,mic}$  são apresentados na Tab. (8.1). Para os  $n$ -alquil-sacarídeos com baixos valores de  $cmc$   $P_{b,mic} \cong P_b$ . No entanto, para os surfactantes  $C_8G_1$  e  $C_8G_2$ , ou outros com  $cmc$  ainda maiores, esta igualdade não é válida e os valores de  $K'_b$  são superestimados como pode ser visto na Tabela (8.1).

Os valores de  $f$  mostram que os grupos OH apresentam, em média, apenas 30% da eficiência em realizar trocas de prótons em relação às moléculas de surfactante livres. Este resultado é muito importante, pois é uma prova experimental das consequências do processo de micelização nas interações água–cabeças hidrofílicas dos  $n$ -alquil-(glico e malto)sídeos.

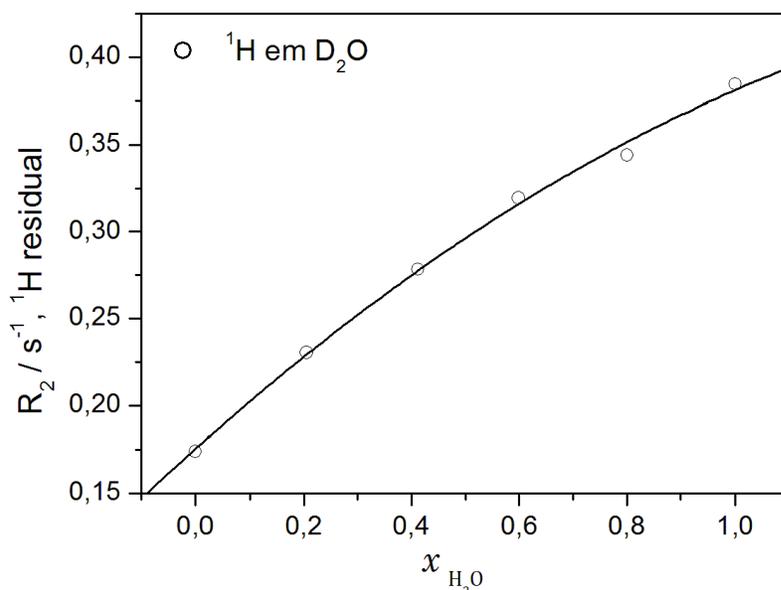
Poder-se-ia esperar que o aumento da cadeia, e o conseqüente aumento do  $N_{agg}$ , levaria à uma menor disponibilidade dos grupos OH das cabeças glicosídeas. No entanto, os valores de  $f$  (fração efetiva de grupos OH que estão trocando prótons) mostrados na Tab. (8.1), aumentam ligeiramente quando a cadeia alquílica aumenta de 8 para 9 átomos de carbono para ambos os surfactantes, glicosídeo e maltosídeo. Este fato também confirma que o

$N_{agg}$  por si só não afeta os processos de troca e, por isso, não pode ser determinado a partir do efeito da micelização nos valores de  $T_2^{-1}$ . Para o surfactante com cadeia maltosídea contendo 9 átomos de carbono, a fração efetiva de grupos participando de trocas químicas é de ~37%, enquanto para o glicosídeo também com 9, este valor é ~30%. Este resultado é coerente com o fato de que as cabeças formados por duas unidades sacarídeas apresentam maior liberdade de interação com as moléculas de água. Em Estudo de simulação por dinâmica molecular realizado para o *n*-dodeceil-( $\alpha$  e  $\beta$ )-maltosídeos, foi demonstrado ocorrer uma significativa diminuição dos números de hidratação das cabeças sacarídeas durante o processo de agregação.<sup>16</sup> Neste estudo, foi observada uma diminuição de aproximadamente 50% no número total de hidratação do grupo maltosídeo. No entanto, se o grupo diretamente ligado à cadeia alquílica for considerado, esta redução chega a 80% do valor médio do número de hidratação de moléculas de maltose em solução. Além disso, estes autores ainda mostraram haver a formação de ligações de hidrogênio contendo moléculas de água formando pontes entre grupos OH de duas cabeças sacarídeos de distintas moléculas. Assim, a considerável redução nas trocas protônicas pode ser atribuídas principalmente a dois fatores: formação de ligações de hidrogênio entre os próprios grupos OH e o impedimento espacial do grupo glicosídeo mais próximo da região hidrofóbica. No caso dos *n*-alquil-glicopiranosídeos, a cabeça é formada por uma única unidade glicosídea e necessita se organizar de forma mais empacotada na micela no sentido de impedir os contatos interacionais das moléculas de água com as cadeias alquílicas. Infelizmente para os *n*-alquil-sacarídeos maiores como  $C_{10}G_1$ ,  $C_{10}G_2$  e maiores, as concentrações micelares críticas tornam-se muito baixas ( $\sim 1 - 2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e

os efeitos de trocas protônicas sobre a relaxação dos prótons da água tornam-se muito difíceis de serem detectados.

### 8.3.3. *Agregação dos n-alquil-sacarídeos em D<sub>2</sub>O estudadas por relaxação transversal <sup>1</sup>H*

No sentido de avaliar o efeito da cadeia hidrofóbica sobre a relaxação spin-spin dos prótons em solução, foi feita a diluição em D<sub>2</sub>O. Os mecanismos de relaxação numa amostra de água pura envolvem as interações dipolares intra e intermoleculares entre os spins-1/2 dos prótons, assim, a diluição de H<sub>2</sub>O em D<sub>2</sub>O consegue isolar<sup>17,18</sup> os prótons reduzindo as taxas de relaxação transversal como mostrado no gráfico da Figura 8.8.

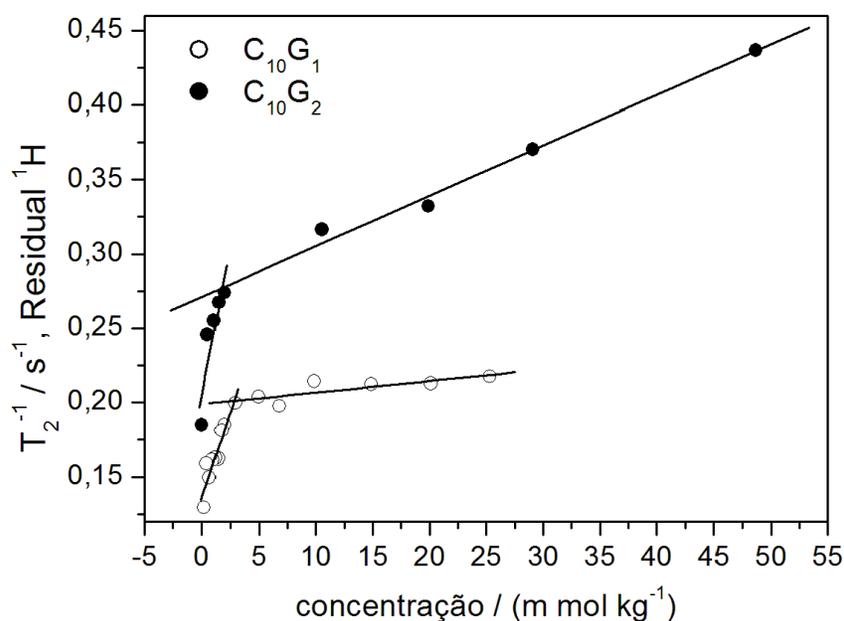


**Figura 8.8:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons em soluções binárias H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O em diferentes frações molares.

As interações dipolares responsáveis pela relaxação dos prótons é modulada pelos movimentos moleculares e, por isso, o gráfico da Figura 8.8 não é

exatamente linear. As soluções  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  apresentam viscosidades ligeiramente diferentes de uma solução ideal e ao se fazer as correções da variação da viscosidade com a composição a dependência de  $T_2^{-1}({}^1\text{H})$  em função da composição comporta-se exatamente como uma reta.<sup>17</sup>

A Figura 8.9 apresenta os gráficos da taxa de relaxação spin-spin dos prótons residuais nas soluções de  $\text{C}_{10}\text{G}_1$  e  $\text{C}_{10}\text{G}_2$  em  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 8.9:** Taxa de relaxação spin-spin dos prótons residuais nas soluções dos *n*-decil-(glico e malto)piranosídeo: (○)  $\text{C}_{10}\text{G}_1$ ; (●)  $\text{C}_{10}\text{G}_2$ , em  $\text{D}_2\text{O}$  à 25 °C.

Diferentemente das soluções dos *n*-alquil-sacarídeos em  $\text{H}_2\text{O}$ , em que o sinal dos prótons são majoritariamente das moléculas de água, em  $\text{D}_2\text{O}$ , o sinal do pico ( $\delta = 4,78 \text{ ppm}$ ) é devido aos prótons trocáveis residuais. A principal vantagem reside no fato de que os efeitos de troca e/ou interações dipolares, não serão ponderados em relação à uma quantidade de prótons (cerca de 1000 vezes maior como ocorre em  $\text{H}_2\text{O}$ ). Conseqüentemente, os efeitos envolvendo agregação micelar serão mais sensíveis, como pode ser percebido pelas

variações mais abruptas das inclinações antes e depois da *cmc*. As concentrações micelares críticas em D<sub>2</sub>O são apresentadas na Tab 8.1 juntamente com as inclinações das curvas em unidades s<sup>-1</sup>. Mais uma vez a concordância entre os valores determinados nesta tese com aqueles da literatura demonstra a boa precisão da técnica de relaxometria em investigar os processos agregativos dos *n*-alquil-sacarídeos. Já os valores associados à inclinação da curva apresentados ( $K_b$  e  $K'_b$ ), variam consideravelmente a partir da *cmc*. Isto mostra que a eficiência dos processos de troca química são consideravelmente mais baixas quando as cabeças sacarídeas encontram-se na forma micelar. Em D<sub>2</sub>O a fração de trocas protônicas na micela fica em torno de 3 e 8 % respectivamente para C<sub>10</sub>G<sub>1</sub> e C<sub>10</sub>G<sub>2</sub> em relação aos seus unímeros livres. Vale à pena ressaltar que as inclinações denominadas na Tab. 8.1 para os experimentos em D<sub>2</sub>O não têm o mesmo significado daquelas em H<sub>2</sub>O. Os sistemas preparados em D<sub>2</sub>O apresentam duas origens de prótons, a primeira são os prótons residuais do D<sub>2</sub>O (menores que 0,1%) do total de átomos de H e D. A outra fonte são os prótons trocáveis dos grupos OH. Como mostrado na Figura (8.8), a adição de prótons na água deuterada induz um aumento aproximadamente linear da taxa de relaxação dos prótons residuais. Este fato explica porquê os valores de  $T_2^{-1}(^1\text{H})$ , na mesma faixa de concentrações molares, são maiores para o C<sub>10</sub>G<sub>2</sub> em relação ao C<sub>10</sub>G<sub>1</sub> (Figura 8.9). Ele também tem implicação direta na inclinação da curva na região abaixo da *cmc*. As trocas protônicas só são efetivas para o valor de  $T_2^{-1}(^1\text{H})$  quando envolvem trocas entre prótons nos sítios (água e cabeça micelar) e é proporcional ao produto das frações de grupos protonados nos sítios OD e D<sub>2</sub>O. Além disso, a contribuição para o número total de prótons pela cabeça maltosídea ( $N_{OH} = 8$ ) é duas vezes maior do que a cabeça glicosídea ( $N_{OH} = 4$ ). Como as amostras permanecem em equilíbrio antes das medidas por pelo menos 24 horas, é

esperado que os dois sítios, água e grupos trocáveis do surfactante, possuam a mesma fração de prótons. Como as trocas protônicas dependem da troca entre os sítios que possuem prótons, então, dobrando-se a fração de prótons em cada sítio, a taxa efetiva de trocas será aproximadamente quatro vezes maior, como pode ser observado comparativamente para os dois alquil-sacarídeos na Tabela (8.1).

Interessantemente, após a *cmc* a inclinação para o *n*-decil-maltosídeo ( $13,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) é cerca de 8 vezes maior do que para o *n*-decil-glicosídeo ( $1,56 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Após a *cmc* cada molécula de  $C_{10}G_2$  continua a contribuir com um número de prótons duas vezes maior que a molécula de  $C_{10}G_1$ . É estimado que as micelas deste último surfactante contenham entre 125-130<sup>19</sup> monômeros, enquanto para o surfactante maltosídeo o  $N_{Agg}$  é  $\sim 70$ . Logo, haverá uma maior quantidade de micelas menores, mais esféricas e, portanto, com maior área acessível para realizar trocas protônicas. O resultado geral é que as cabeças sacarídeas das micelas do  $C_{10}G_2$  são quatro vezes mais eficazes em realizar trocas com os prótons da água comparativamente ao  $C_{10}G_1$ . Se considerarmos que o  $N_{Agg}(C_{10}G_2) \leq 2N_{Agg}(C_{10}G_1)$  e que uma relação inversa também é válida para as suas respectivas áreas “superficiais”, a área total das micelas maltosídeas será cerca as micelas glicosídeas.

#### 8.4. Conclusões

Medidas de relaxação spin-spin dos prótons trocáveis são bastante adequados para o estudo dos processos críticos de agregação de *n*-alquil- $\beta$ -(glico e malto)piranosídeo tanto em  $H_2O$  quanto em  $D_2O$ . Além de reproduzir com bastante concordância os valores das concentrações críticas de micelização, as

medidas de  $T_2^{-1}$  ( $^1\text{H}$  trocáveis) demonstra experimentalmente a consequência do processo de formação de micelas sobre as interações das moléculas de água com os grupos OH das cabeças sacarídeas. Apesar de este ser um resultado um tanto quanto óbvio, até o presente momento não há relatos na literatura sobre esta confirmação experimental. As mudanças de inclinação dos experimentos em  $\text{D}_2\text{O}$  são mais sensíveis ao processo de agregação e também à natureza (glicose ou maltose) da cabeça do surfactante. Neste último solvente é possível o estudo de agregação de  $n$ -alquil-sacarídeos com  $cmc$ 's consideravelmente mais baixas do que em  $\text{H}_2\text{O}$ .

## 8.5. Referências

- (1) Ruiz, C. C. *Sugar-based Surfactants: Fundamentals and Applications*; Ruiz, C. C., Ed.; 143rd ed.; CRC Press/Taylor & Francis, 2008; p. 639.
- (2) Santonicola, M. G.; Lenhoff, A. M.; Kaler, E. W. Binding of alkyl polyglucoside surfactants to bacteriorhodopsin and its relation to protein stability. *Biophysical journal* **2008**, *94*, 3647-58.
- (3) Cheng, J. Y.; Riesz, P. Mechanism of the protective effects of long chain  $n$ -alkyl glucopyranosides against ultrasound-induced cytolysis of HL-60 cells. *Ultrasonics sonochemistry* **2007**, *14*, 667-71.
- (4) Rifkin, R. a; Maggio, E. T.; Dike, S.; Kerr, D. a; Levy, M.  $n$ -Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside inhibits aggregation of human interferon- $\beta$ -1b and reduces its immunogenicity. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **2011**, *6*, 158-62.
- (5) Söderman, O.; Johansson, I. Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1999**, *4*, 391-401.
- (6) Nilsson, F.; So, O. Physical-Chemical Properties of C 9 G 1 and C 10 G 1 - Alkylglucosides . Phase Diagrams and Aggregate Size / Structure. **1998**, *7463*, 4050-4058.

- (7) Aoudia, M.; Zana, R. Aggregation Behavior of Sugar Surfactants in Aqueous Solutions: Effects of Temperature and the Addition of Nonionic Polymers. *Journal of colloid and interface science* **1998**, *206*, 158-167.
- (8) Andrezzi, P.; Gente, G.; La Meza, C. Sugar-Based Surfactants. In *Sugar-Based Surfactants: Fundamentals and Applications*; Carnero Ruiz, C., Ed.; CRC Press, 2008; Vol. 20086234.
- (9) Ericsson, C. A.; Söderman, O.; Garamus, V. M.; Bergström, M.; Ulvenlund, S. Effects of Temperature, Salt, and Deuterium Oxide on the Self-Aggregation of Alkylglycosides in Dilute Solution. 1. n-Nonyl- $\beta$ -D-glucoside. *Langmuir* **2004**, *20*, 1401-1408.
- (10) Ericsson, C. A.; Söderman, O.; Garamus, V. M.; Bergström, M.; Ulvenlund, S. Effects of temperature, salt, and deuterium oxide on the self-aggregation of alkylglycosides in dilute solution. 2. n-Tetradecyl-beta-D-maltoside. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21*, 1507-15.
- (11) Sabadini, E.; do Carmo Egídio, F.; Fujiwara, F. Y.; Cosgrove, T. Use of Water Spin-spin Relaxation Rate to Probe the Solvation of Cyclodextrins in Aqueous Solutions. *The journal of physical chemistry. B* **2008**, *112*, 3328-3332.
- (12) Swift, T. J.; Connick, R. E. NMR-Relaxation Mechanisms of O17 in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *The Journal of Chemical Physics* **1962**, *37*, 307.
- (13) Hills, B. P.; Cano, C.; Belton, P. S. Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. *Macromolecules* **1991**, *24*, 2944-2950.
- (14) Shinoda, K.; Yamanaka, T.; Kinoshita, K. Surface Chemical Properties in Aqueous Solutions of Non-ionic Surfactants Octyl Glycol Ether,  $\alpha$ -Octyl Glyceryl Ether and Octyl Glucoside. *Journal of Physical Chemistry* **1959**, *63*, 648-650.
- (15) Garamus, V. M.; Funari, S. S.; Malfois, M.; Willumeit, R.; Niemeyer, B. Comparison of Small-Angle Scattering Methods for the Structural Analysis of Octyl- $\beta$ -maltopyranoside Micelles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 7596-7604.
- (16) Abel, S.; Dupradeau, F.-Y.; Raman, E. P.; MacKerell, A. D.; Marchi, M. Molecular simulations of dodecyl- $\beta$ -maltoside micelles in water: influence of the headgroup conformation and force field parameters. *The journal of physical chemistry. B* **2011**, *115*, 487-99.
- (17) Anderson, W.; Arnold, J. Proton Relaxation Times in H<sub>2</sub>O—D<sub>2</sub>O Mixtures. *Physical Review* **1956**, *101*, 511-512.

- (18) Modig, K.; Halle, B. Proton magnetic shielding tensor in liquid water. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 12031-41.
- (19) Enders, S.; Häntzschel, D. Thermodynamics of aqueous carbohydrate surfactant solutions. *Fluid Phase Equilibria* **1998**, *153*, 1-21.



# Considerações Finais e Perspectivas

---

As interações intermoleculares entre água e carboidratos se manifestam por diferentes facetas. Do ponto de vista macroscópico, propriedades fundamentais como solubilidade e módulo elástico ou entalpia da transição sol-gel, são marcadamente dependentes da intensidade de ligação de hidrogênio. Para carboidratos simples, pequenos e com valores altos de solubilidade, o efeito isotópico da substituição (H por D) é praticamente negligenciável. No entanto, à medida que o carboidrato torna-se maior e menos solúvel, a substituição de H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O, induz o aparecimento de diferenças significativas em propriedades macroscópicas. No caso do polissacarídeo  $\kappa$ -carrageenan tais diferenças são amplificadas devido à cooperatividade da transição *coil-helix*. Estes resultados leva-nos a sugerir que as explicações advindas da substituição de H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O sobre as propriedades de carboidratos (solutos hidrofílicos) não são apenas devido à intensificação do efeito hidrofóbico como é sugerido na literatura. No caso dos carboidratos simples, a nossa proposta é que, à medida em que a molécula do carboidrato torna-se maior, a inserção do soluto perturba mais fortemente a estrutura da água tornando a solubilidade um processo mais difícil de ser realizado na água (D<sub>2</sub>O) com maior energia coesiva. No caso da  $\kappa$ -carragena,, a cooperatividade da transição *coil-helix*, intensifica o efeito descrito anteriormente da seguinte forma. Os efeitos da substituição isotópica provocados em partes da macromolécula irão induzir segmentos adjacentes, os quais irão propagar e reforçar esta cadeia de eventos. Nós sugerimos que simulações computacionais e/ou cálculos quânticos podem dar mais insights em nível molecular sobre este efeito com substância hidrofílicas.

Os estudos de RMN sugerem que os processos interacionais entre os grupos OH dos carboidratos e as moléculas de água dependem da natureza do carboidrato. Essa dependência não é apenas em relação ao tamanho, mas ela se manifesta em função da forma do carboidrato. As taxas de trocas protônicas entre os prótons da água e os grupos OH dos carboidratos são mais rápidas para carboidratos de cadeia aberta (como D-sorbitol), seguidas pela forma piranosídea, e apresentando taxas mais lentas a forma furanosídea. Também parece haver uma relação entre a fração de grupos OH orientados equatorialmente e as taxas de troca protônica. Açúcares com maior quantidade de grupos orientados equatorialmente apresentam taxas de trocas protônicas mais altas. Além disso, as transferências de magnetização entre as populações de spins  $^1\text{H}$  são moduladas por ambos, movimentos moleculares e pelas trocas protônicas. As condições ideais para a verificação de relaxação nuclear magnética cruzada são alcançadas na solução saturada de frutose. Para este sistema em específico, os resultados indicaram que as moléculas de água interagem preferencialmente com os prótons dos grupos OH e negligenciavelmente com os prótons CH dos carboidratos.

As trocas protônicas também mostraram-se adequados para sondar as consequências de processos agregativos de *n*-alquil- $\beta$ -glicosídeos. Foi possível mostrar experimentalmente que após a formação de micelas, os grupos sacarídeos das cabeças dos surfactantes interagem menos facilmente com as moléculas de água. Estes resultados experimentais são endossados por recentes trabalhos de simulação por dinâmica molecular. Como os sistemas formados por água e carboidratos e suas interações são de ampla ocorrência, nós vislumbramos que estudos similares aos aqui apresentados possam contribuir para o entendimento de processos interacionais mais elaborados

como, por exemplo, mecanismos de sinalização química, reconhecimento molecular, e atividade de receptores nucleares.



# APÊNDICES

---

## *APÊNDICE A - As Equações de Bloch*

Em 1946 Felix Bloch<sup>1</sup> propôs um conjunto de equações simples para a descrição de um *ensemble* de núcleos num campo magnético externo, derivadas a partir de argumentos fenomenológicos. Estas equações descrevem com excelente precisão o comportamento dinâmico de amostras líquidas mas não são tão precisas na descrição de amostras sólidas.<sup>2</sup> Neste apêndice é apresentada uma breve descrição das equações de Bloch e para uma busca mais aprofundada o leitor deve buscar na ref.<sup>2</sup>

Num campo magnético homogêneo a equação do movimento de um conjunto de spins livres e não interagentes pode ser descrita por  $d\mathbf{M}/dt = \gamma\mathbf{M} \times \mathbf{B}_0$ . Além disso, a tendência de a magnetização se alinhar segundo o eixo  $z$  e atingir no equilíbrio,  $M_z = M_0 = \chi_0 B_0$ , pode ser descrita com boa precisão pela equação  $dM_z/dt = -\{(M_z - M_0)/T_1\}$ . Em que  $T_1$  é o tempo de relaxação longitudinal. Como descrito na Seção 4.1, a aplicação de um campo perpendicular a  $\mathbf{B}_0$ , oscilante com frequência  $\omega_1$ , e magnitude  $B_1$ , desloca a magnetização para o plano  $x$ - $y$ . Devido a processos interacionais e à não homogeneidade de campo, com o passar do tempo ocorre a perda de coerência dos spins que precessionam o campo em  $z$  com velocidades angulares ligeiramente diferentes. A consequência é o decaimento da magnetização com uma constante de tempo característica, e este processo pode ser descrito heurísticamente pelas equações

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2}, \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2} \quad (\text{A.1})$$

Em que  $T_2$  é o tempo de relaxação transversal ou spin-spin. Considerando o sistema de referência rotante e levando em conta que o movimento dos spins está sujeito a ação do campo  $B_0$  e de um campo perpendicular  $B_1$ , obtêm-se a equação de Bloch na forma

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B}_{\text{eff}}) - \frac{\tilde{M}_x \mathbf{i} + \tilde{M}_y \mathbf{j}}{T_2} - \frac{M_z - M_0}{T_1} \mathbf{k} \quad (\text{A.2})$$

sendo o campo efetivo a combinação dos campos permanente e pulsante perpendicularmente a  $z$ ,  $\mathbf{B}_{\text{eff}} = (B_0 + \omega/\gamma)\mathbf{k} + B_1 \mathbf{i} = \frac{(\omega - \omega_0)\mathbf{k} - \omega_1 \mathbf{i}}{\gamma} = \frac{\Delta\omega \mathbf{k} - \omega_1 \mathbf{i}}{\gamma}$ , e  $\mathbf{i}$ ,  $\mathbf{j}$  e  $\mathbf{k}$ , são vetores unitários no sistema de referência girante, e os tios sobre as magnetizações referem-se a este sistema de referência. A equação de Bloch também pode ser escrita para cada componente,  $x$ ,  $y$  e  $z$ , separadamente e, assim, chega-se às famosas Equações de Bloch

$$\left. \begin{aligned} \frac{dM_x}{dt} &= -\frac{\tilde{M}_x}{T_2} + \Delta\omega \tilde{M}_y \\ \frac{dM_y}{dt} &= -\frac{\tilde{M}_y}{T_2} - \Delta\omega \tilde{M}_x - \omega_1 M_z \\ \frac{dM_z}{dt} &= \omega_1 \tilde{M}_y - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} \right\} \quad (\text{A.3})$$

## APÊNDICE B – Equações de troca química

Através de um pulso perpendicular com amplitude  $B_1$ , as magnetizações  $M_a$  e  $M_b$ , descritas pela Eq. (4.20) podem ser escritas na forma

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} M_A \\ M_B \end{bmatrix} = -L \begin{bmatrix} M_A \\ M_B \end{bmatrix} \quad (B.1)$$

Em que  $L$  é a matriz

$$L = \begin{bmatrix} i\delta_\omega + \frac{1}{T_2} + k & -k \\ -k & -i\delta_\omega + \frac{1}{T_2} + k \end{bmatrix} \quad (B.2)$$

Sendo definido  $\delta_\omega = (\omega_A - \omega_B)/2$ , e  $\omega_1 = (\omega_A + \omega_B)/2$ .

A forma funcional da equação (B.1) é similar à da Eq. (4.20), e ela é composta por equações diferenciais de primeira ordem, as quais podem ser escritas como,

$$\begin{bmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{bmatrix} = \exp(-Lt) \begin{bmatrix} M_A(0) \\ M_B(0) \end{bmatrix} \quad (B.3)$$

Em que  $\exp(-Lt)$  denota a exponencial da matriz  $L$ , Eq. (B.2). É comum e viável diagonalizar a matriz  $L$  e escrever  $M(t)$  como um problema de autovetores e autovalores. A diagonalização de  $L$  com a matriz de autovetores,  $U$ , para gerar a matriz diagonal,  $\Lambda$ , com os autovalores abaixo da diagonal.

$$\Lambda = U^{-1}L U \quad (B.4)$$

A exponencial da matriz diagonal pode ser escrita como a diagonalização da exponencial da matriz  $L$ ,

$$\begin{bmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{bmatrix} = U \exp(-\Lambda t) U^{-1} \begin{bmatrix} M_A(0) \\ M_B(0) \end{bmatrix} \quad (B.5)$$

$$\begin{bmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{bmatrix} = U \begin{bmatrix} e^{-\lambda'_1 t} & 0 \\ 0 & e^{-\lambda'_2 t} \end{bmatrix} U^{-1} \begin{bmatrix} M_A(0) \\ M_B(0) \end{bmatrix} \quad (B.6)$$

Em que  $\lambda'_1$  e  $\lambda'_2$  são as frequências com que as magnetizações  $a$  e  $b$  evoluem com o tempo. Os autovalores da Eq. (B.6) são tais que satisfazem a Eq. (B.2) segundo a condição:

$$\begin{bmatrix} i\delta + \frac{1}{T_2} + k - \lambda' & -k \\ -k & -i\delta + \frac{1}{T_2} + k - \lambda' \end{bmatrix} = 0 \quad (B.7)$$

Resultando, assim, os possíveis valores de frequência  $\lambda'$  em função do deslocamento químico,  $\delta$ , entre os sítios  $a$  e  $b$ , da taxa de troca química,  $k$ , e da taxa de relaxação transversal causada pelas interações dipolares,

$$\lambda' = \left( \frac{1}{T_2} + k \right) \pm \sqrt{k^2 - \delta^2} \quad (B.8)$$

$\lambda'$  tem o significado físico da taxa de relaxação efetiva que inclui os efeitos de troca química e deslocamento químico nas taxas de relaxação transversal dos spins nos dois sítios.

Os autovalores que satisfazem a Eq. (B.8) dependem das condições de regime de troca química. No regime de trocas lentas, de acordo com a Seção 4.5,  $k < \delta$ , são esperados dois sinais, ambos complexos, os quais são responsáveis pelos picos centrados em  $\omega_a$  e  $\omega_b$ , Figura 4.4. As frequências dos sítios  $a$  e  $b$  são descritas pela parte imaginária, enquanto suas respectivas intensidades são formadas pela parte real.<sup>3</sup> Em regime de rápidas trocas, no entanto, o termo responsável pelas frequências,  $\sqrt{k^2 - \delta^2}$ , torna-se um número puramente real podendo ser positivo e negativo em relação a  $\omega_0$ . O sinal ainda é constituído por dois picos, porém, com deslocamento químico em relação a  $\omega_0$  correspondente à metade de  $\delta$ . Nesta região,  $k \geq \delta$ , os picos começam a coalescer como mostrado esquematicamente na Figura . Em regimes de troca mais rápidos,  $k \gg \delta$ , o espectro de RMN é composto por um único pico centrado em  $\omega_0$  e com largura à meia altura incluindo termos de  $1/(\pi T_2) + \left(\frac{1}{2k}\right) (\Delta\omega)^2$ .

### *APÊNDICE C – Modelo de Carver & Richards modificado*

O modelo de relaxação desenvolvido por Carver & Richards<sup>4</sup> e posteriormente modificado por Hills<sup>5</sup> descreve a relaxação de spins em regime de troca entre os sítios  $a$  e  $b$ , em função dos tempos de relaxação intrínsecos,  $T_{2a}$  e  $T_{2b}$ , do tempo de vida médio nos sítios  $\tau_{ab} = 1/k_{ab}$ , e da diferença de frequência ou deslocamento químico  $\delta\omega = |\omega_a - \omega_b|$ . A taxa de relaxação transversal

efetiva dos prótons trocáveis pode ser descrita pela Equação 5.1 e aqui reproduzida como C.1

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2\tau} \ln \lambda \quad (C.1)$$

A forma funcional do decaimento dos ecos de spin permanece exponencial desde que a magnitude do termo de  $\ln \lambda$  não seja dominante na Equação (C.1). Essa condição é plenamente satisfeita no regime de rápidas trocas,  $\frac{1}{2\tau} \gg \delta\omega$ , em que  $\tau$  é o tempo de vida médio dos prótons nos sítios,  $1/\tau_{ab} = P_a/\tau_a = P_b/\tau_b$ . O termo  $\ln \lambda$  é descrito matematicamente pela Equação (C.2 – C10).

$$\begin{aligned} \ln \lambda = & -\tau_{ab}\alpha_+ \\ & + \ln \left[ (D_+ \cosh^2 \xi - D_- \cos^2 \eta)^{\frac{1}{2}} \right. \\ & \left. + (D_+ \cosh^2 \xi + D_- \cos^2 \eta)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (C.2) \end{aligned}$$

$$2D_{\pm} = \pm 1 \pm \frac{\psi + 2(\delta\omega)^2}{(\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}}} \quad (C.3)$$

$$\xi = \left( \frac{\tau}{\sqrt{2}} \right) \left\{ \pm \left[ +\psi(\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}} \right\} \quad (C.4)$$

$$\zeta = 2\delta\omega\alpha_- \quad (C.5)$$

$$\eta = \frac{\tau}{\sqrt{2}} \left\{ \pm \left[ -\psi + (\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}} \right\} \quad (C.6)$$

$$\psi = \alpha_-^2 - (\delta\omega)^2 + \frac{4}{\tau_a\tau_b} \quad (C.7)$$

$$\alpha_+ = \frac{1}{T_{2a}} + \frac{1}{T_{2b}} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \quad (C.8)$$

$$\alpha_- = \frac{1}{T_{2a}} - \frac{1}{T_{2b}} + \frac{1}{\tau_a} - \frac{1}{\tau_b} \quad (C.9)$$

$$\delta\omega = \omega_b - \omega_a \quad (C.10)$$

Apesar da complexidade algébrica das Equações (C1-10), o termo  $\ln \lambda$  depende dos parâmetros tempo de vida nos sítios  $a$  e  $b$ ,  $1/\tau_a$  e  $1/\tau_b$ , respectivamente, do deslocamento químico ou diferença de frequências entre os sítios  $\delta\omega = |\omega_a - \omega_b|$ , das frações populacionais  $P_a$  e  $P_b$ , e dos tempos de relaxação intrínsecos  $T_{2a}$  e  $T_{2b}$ . Fisicamente, o termo  $\lambda$  representa a taxa de relaxação efetiva incluindo as contribuições das interações dipolares spin-spin, de troca química com taxa  $k$  e diferença de frequência entre os sítios  $\delta\omega$ . Para sistemas de dois sítios, estas equações estão sujeitas às condições:

$$\text{todos os spins ocupam os sítios } a \text{ e } b; P_a + P_b = 1 \quad (C11)$$

o fluxo de spins entre os sítios está em regime estacionário;  $P_a/\tau_a = P_b/\tau_b$  (C12).

## ***APÊNDICE D – Relaxometria de correlação cruzada***

### **$T_1 - T_2$**

A evolução temporal das magnetizações dos sítios  $a$  e  $b$ ,  $M_a$  e  $M_b$ , respectivamente, pode ser descrita matematicamente por<sup>6</sup>

$$\begin{bmatrix} dM_a/dt \\ dM_b/dt \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (-R_a - k_a) & k_b \\ k_b & (-R_b - k_b) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} (M_a - M_{a\infty}) \\ (M_b - M_{b\infty}) \end{bmatrix} \quad (D.1)$$

Em que  $R_b = 1/T_{1,2b}$  e  $R_a = 1/T_{1,2a}$ , são as taxas de relaxação spin-spin e spin-rede, respectivamente para as populações de spins  $a$  e  $b$ . As constantes  $k_a$  e  $k_b$  são taxas de transferência de magnetização entre os sítios que pode ocorrer por diversos mecanismos como descrito na Seção (6.1.1).

As soluções matemáticas para a Eq. (D.1) são

$$\begin{aligned} & (M_a - M_{a,\infty}) \\ &= \frac{S^+(M_a(0) - M_{a,\infty}) + A}{S^+ - S^-} \exp(s^+t) \\ &+ \frac{S^-(M_a(0) - M_{a,\infty}) + A}{S^- + S^+} \exp(s^-t) \end{aligned} \quad (D.2)$$

em que

$$A = (R_b + k_b)(M_a(0) - M_{a\infty}) + k_b(M_b(0) - M_{b\infty}) \quad (D.3)$$

Em se tratando das taxas de relaxação transversal os termos,  $M_{i\infty}$ , tendem a zero e as magnetizações  $M_j$  são as magnetizações complexas ( $M_{jx} + iM_{jy}$ ).

### **$T_2 - \text{store} - T_2$**

A relaxometria  $T_2 - T_2$  é análoga à  $T_1 - T_2$  e também pode ser descrita matematicamente pela Eq. (D.1), porém só envolvem explicitamente termos de relaxação transversal. Mais uma vez se a condição de equilíbrio estacionário se aplica  $M_a^0 k_{a2} = M_b^0 k_{b2}$ .

A intensidade ao final dos ecos de spin é calculada de acordo com a resolução da Eq. (D.1) obtendo o valor da intensidade das magnetizações ao final da primeira sequência CPMG,  $M_{a,b}(t_1)$  como descrito por Korb e colaboradores<sup>7</sup>

$$\begin{aligned}
 M_a(t_1) = & M_a^0 \\
 & - 2 \frac{(S_2^- + R_{2a} + k_{a2})M_a^0 - k_{b1}M_b^0}{S_2^- - S_2^+} \exp(S_1^+ t t_1) \\
 & - 2 \frac{(S_2^+ + R_{a2} + k_{a2})M_a^0 - k_{b1}M_b^0}{S_2^+ - S_2^-} \exp(S_1^- t_1) \quad (D.4)
 \end{aligned}$$

Equações equivalentes são encontradas para o reservatório de prótons  $b$ , e as taxas de relaxação efetivas são calculadas de acordo com a Eq. (D.5)

$$\begin{aligned}
 S_i^{+/-} \\
 = & - \frac{(R_{ai} + k_{ai} + R_{bi})}{2} \\
 & \pm \frac{1}{2} \sqrt{(R_a^{1,2} + k_a + R_b^{1,2} + k_b)^2 - 4[(R_a^{1,2} + k_a)(R_b^{1,2} + k_b) - k_a k_b]} \quad (D.5)
 \end{aligned}$$

Após cada uma das outras duas etapas da sequência  $T_2 - store - T_2$  as magnetizações são calculadas de forma análoga à Eq. (D.4).

## ***Referências- Apêndices***

- (1) Bloch, F. Nuclear induction. *Physical Review* **1946**, 70, 460-474.
- (2) Abragam, A. *Principles of Nuclear Magnetism*; Oxford University Press: New York, 1961; p. 599.

- (3) Bain, A. D. Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2003**, *43*, 63-103.
- (4) CARVER, J.; RICHARDS, R. A General Two-site Solution for the Chemical Exchange Produced Dependence of T<sub>2</sub> upon the Carr-Purcell Pulse Separation. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1972**, *6*, 89-105.
- (5) Hills, B. P.; Wright, K. M.; Belton, P. S. Proton N.M.R. Studies of chemical and Diffusive Exchange in Carbohydrate Systems. *Molecular Physics* **1989**, *67*, 1309-1326.
- (6) Hills, B.; Benamira, S.; Marigheto, N.; Wright, K. T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> correlation analysis of complex foods. *Applied Magnetic Resonance* **2004**, *26*, 543-560.
- (7) McDonald, P.; Korb, J.-P.; Mitchell, J.; Monteilhet, L. Surface relaxation and chemical exchange in hydrating cement pastes: A two-dimensional NMR relaxation study. *Physical Review E* **2005**, *72*, 1-9.