



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

0055 99

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUIMICAS

"IMPLEMENTACION Y APLICACION EN TRES DIMENSIONES
DEL EXPERIMENTO HSQC-COSY EN RMN"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Q.F.B. OSCAR SALVADOR YAÑEZ MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO DEL RIO PORTILLA

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DE 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

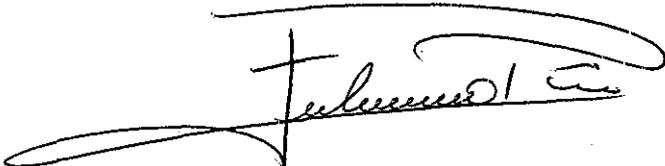
JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Eduardo Díaz Torres
Vocal	Dr. Armando Ariza Castolo
Secretario	M. en C Ricardo Jorge Cárdenas Pérez
Primer Suplente	Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas
Segundo Suplente	Dr. Enrique Ángeles Anguiano

Lugar donde se desarrolló el tema:

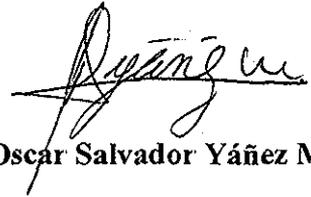
Laboratorio de Bioquímica 1 y Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear,
Instituto de Química, UNAM.

Tutor:



Dr. Federico del Río Portilla.

Sustentante:



Q.F.B. Oscar Salvador Yáñez Muñoz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por esta etapa de formación en mi vida

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico proporcionado durante mis estudios de Maestría.

A la M en C Isabel Chávez por las facilidades brindadas para el uso del equipo de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química, UNAM

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mis amigos: Haydeé, Jesús, Lluvia, Carmen, Chuy, Rosa Isela, Ari, Margaret, Naye , Yeni, Mimis, Betún, Bety Hernández, Miriam Novelo y Moustapha, por los grandes y pequeños momentos que hemos pasado juntos

A los chiquillos: Ely, Rosalba, Edith, Miriam, Alma, Juan, Ernesto, Víctor y Marco, gracias chicos por todo.

Con especial aprecio y admiración, agradezco al Dr Federico del Río por haberme permitido estar dentro de su grupo de trabajo y por su importante dirección y tiempo dedicado en la realización de este trabajo

DEDICATORIA.

A mis padres:

Nuevamente por todo el respaldo, amor y apoyo que siempre me han dado. Espero me alcance la vida para darles todo lo que se merecen. Los quiero mucho.

A mis hermanos:

Por cada oportunidad que tenemos de estar juntos que me hace admirarlos aun más. Espero que siempre estemos como ahora.

A mi tío Toño:

Por seguir conmigo y estar ahí cada que lo necesito, por su gran apoyo y todos sus consejos obsequiados, de verdad muchas gracias tío, lo quiero mucho.

INDICE

Lista de Tablas y figuras.	III
Glosario.	V
1. Introducción.	1
2. Fundamento Teórico.	3
2.1 Producto de Operadores	3
2.2 Movimientos en RMN	3
2.3 Formalismo del producto de Operadores	4
2.4 Operadores para un espín	4
2.4.1 Hamiltoniano del pulso de radiofrecuencia	5
2.4.2 Hamiltoniano del desplazamiento químico o precesión	8
2.5 Operadores para dos espines	10
2.5.1 Hamiltoniano del acoplamiento	12
2.6 Secuencia de pulsos Eco de Espín.	13
2.6.1 Eco de espín mediante el modelo de Producto de operadores	15
2.6.1.1 Representación por diagramas de árbol	15
2.6.1.2 Eco de espín	15
2.7 Experimentos bidimensionales.	23
2.7.1 Forma de la señal	23
2.7.2 Experimento COSY.	25
2.7.3 Experimento HSQC.	27
2.8 Ciclación de fases	31
2.9 Gradiente de pulso.	33

2.9 1 Selección de la coherencia por medio de gradientes.	34
3.0 Justificación.	36
4.0 Objetivo.	37
5.0 Resultados y Discusión.	38
5.1 Desarrollo teórico.	38
5 1 1 Planteamiento de la secuencia de pulsos	38
5 1.2 Análisis de la secuencia de pulsos por producto de operadores.	39
5.1.3 Optimización de la secuencia de pulsos.	41
5.1 3 1 Ciclación de Fase del experimento HSQC	41
5 1.3.2 Ciclación de Fase del experimento COSY.	44
5.1.3.3 Ciclación de Fase del experimento HSQC-COSY.	45
5 1 3 4 Uso de gradientes en el experimento HSQC-COSY.	47
5 1.3.5 Espectros obtenidos	50
6.0 Conclusiones.	59
7.0 Anexo.	60
7.1 Parámetros experimentales de RMN.	60
7 1 1 Generalidades.	60
7.1.2. Condiciones de los pulsos de radiofrecuencia.	60
7 1 3 Parámetros dimensionales	61
7.1.4 Parámetros de Procesamiento.	61
7 1.4.1 Procesamiento de un espectro en 2D a partir de datos en 3D	61
7 1 4 2 Comandos a introducir.	61
7 1.4.2 Procesamiento de un espectro en 3D	61
8.0 Bibliografía.	62

Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1. Carta de conversión para el modelo de producto de operadores	11
Figura 1. Representación vectorial del momento angular de una partícula en movimiento circular.	3
Figura 2. Movimientos rotacionales generados por la aplicación de un pulso de radiofrecuencia sobre el eje x y sobre el eje y.	5
Figura 3. Movimientos rotacionales generados por la evolución del momento angular con respecto al desplazamiento químico	9
Figura 4. Efecto de la magnetización tras evolucionar con respecto al desplazamiento químico. Además se muestra la analogía que guarda el modelo de producto de operadores con el modelo vectorial.	9
Figura 5. Formas de la señal en sistemas de dos espines acoplados.	10
Figura 6. Movimientos rotacionales generados por la evolución del momento angular con respecto al acoplamiento químico	12
Figura 7. Secuencia de pulsos del Eco de Espín	13
Figura 8. Representación del eco de espín mediante modelo vectorial con su correspondiente evolución en diagrama de fase	14
Figura 9. Secuencia de pulsos del Eco de Espín. Se considera la presencia de un segundo núcleo, lo cual lleva a considerar acoplamiento y desplazamiento químico en los tiempos de espera.	17
Figura 10. Secuencia de pulsos del Eco de espín heteronuclear.	19
Figura 11. Secuencia de pulsos del Eco de espín heteronuclear. Reenfoco del acoplamiento	21
Figura 12. Forma de la señal en un espectro de RMN	24
Figura 13. Forma de la señal en un espectro de RMN cuando existe acoplamiento.	24
Figura 14. Secuencia de pulsos COSY (Correlation Spectroscopy)	25
Figura 15. Secuencia de pulsos HSQC	28
Figura 16. Relación entre la fase del receptor y la magnetización	31

Figura 17. Cancelación de la señal por una alternación de la fase sobre los pulsos de radiofrecuencia y manteniendo constante la fase del receptor.	32
Figura 18. Representación del Camino de Coherencia	32
Figura 19. Efecto del gradiente de pulso	33
Figura 20. Selección de una coherencia mediante la aplicación de gradientes de pulsos.	34
Figura 21. Construcción de un experimento en tres dimensiones	38
Figura 22. Representación de un espectro en 3D y la obtención de planos en 2D a partir del cubo	38
Figura 23. Secuencia de pulsos en 3D que genera una correlación $^{13}\text{C}-^1\text{H}-^1\text{H}$	39
Figura 24. Ciclación de fases de la secuencia de pulsos HSQC	42
Figura 25. Ciclación de fases de la secuencia de pulsos COSY.	44
Figura 26. Eliminación de artefactos en el experimento COSY.	45
Figura 27. Eliminación de artefactos por cambios en la fase de los pulsos y del receptor	46
Figura 28. Ciclación de fase de la secuencia HSQC-COSY	46
Figura 29. Espectros bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia propuesta	47
Figura 30. Aplicación de gradientes a la secuencia HSQC-COSY.	48
Figura 31. Secuencia de pulsos HSQC-COSY	49
Figura 32. Espectros bidimensionales obtenidos con la inclusión de pulsos de gradientes en la secuencia propuesta	50
Figura 33. Experimentos HSQC, con correlación a uno y dos enlaces de distancia	51
Figura 34. Espectro COSY del mentol	52
Figura 35a-j. Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D	52

Glosario.

^{13}C	Núcleo de carbono-13
^1H	Núcleo de hidrógeno
2D	Experimentos bidimensionales.
$2I_{1x}I_{2x}, 2I_{1y}I_{2y}, 2I_{2x}I_{2y}, 2I_{2y}I_{2x}$	Operadores de coherencias cuánticas múltiples
$2I_{1x}I_{2z}, 2I_{1y}I_{2z}$	Operador que representa una magnetización en antifase del espín 1 con respecto al acoplamiento del espín 2
$2I_{1z}I_{2z}$	Operador de distribución poblacional de no equilibrio.
$2I_{2z}I_{2x}, 2I_{2z}I_{2y}$	Operador que representa una magnetización en antifase del espín 2 con respecto al acoplamiento del espín 1
$2\pi J_1 2I_{1z}I_{2z}t$	Hamiltoniano que define el acoplamiento
3D	Experimentos tridimensionales
addpar('3d')	Añade los parámetros relacionados con un experimento en 3D.
B_0	Campo magnético
B_s	Base de operadores.
CDCl_3	Cloroformo deuterado.
cm	centímetro.
$\cos(\theta)$	Coseno del ángulo teta
COSY	Correlation Spectroscopy.
d1	Tiempo de espera.
dplane(4)	Muestra el plano indicado en paréntesis de los datos en 3D
$\exp(i\theta)$	Exponencial compleja del ángulo teta.
F1	Primera dimensión del espectro multidimensional.
f1coef='1 0 0 1'	Coefficiente del interferograma en F1.
f2coef='1 0 0 -1'	Coefficiente del interferograma en F2.
F2	Segunda dimensión del espectro multidimensional
F3	Tercera dimensión del espectro multidimensional.
ft3d ('f1f3', 'f2f3')	Transformada de Fourier de los datos en 3D en los planos F1F3 y F2F3
g1	Primer gradiente aplicado
g2	Segundo gradiente aplicado
g3	Tercer gradiente aplicado
g4	Cuarto gradiente aplicado
getplane('f2f3')	Obtiene los datos para mostrar el plano F2F3.
H	Hamiltoniano.
\hbar	Constante de Planck
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
Hz	Hertz
I_{1x}	Operador del momento angular del espín 1 a lo largo del eje x.
I_{1y}	Operador del momento angular del espín 1 a lo largo del eje y
I_{1z}	Operador del momento angular del espín 1 a lo largo del eje z
I_{2x}	Operador del momento angular del espín 2 a lo largo del eje x
I_{2y}	Operador del momento angular del espín 2 a lo largo del eje y
I_{2z}	Operador del momento angular del espín 2 a lo largo del eje z
J	Constante de acoplamiento indirecta

mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
M_x	Componente de magnetización macroscópica sobre el <i>eje x</i> .
M_y	Componente de magnetización macroscópica sobre el <i>eje y</i>
N	Número de espines por unidad de volumen.
nextpl	Muestra el plano siguiente de un espectro en 3d.
o	Grados
°C	Grados centígrados
plplanes(13,13,30,1..3)	Grafica el plano F2F3 ó F1F3 de una serie de datos en 3D.
prevpl	Muestra el plano anterior de un espectro en 3d.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
sb	Aplica una constante de tipo "Sinebell" en la dimensión detectada directamente
sb1	Aplica una constante de tipo "Sinebell" en la primera dimensión detectada indirectamente
sb2	Aplica una constante de tipo "Sinebell" en la segunda dimensión detectada indirectamente.
sen (θ)	Seno del ángulo teta.
set3dproc	Genera un procesamiento en 3D.
t	Tiempo
T_2	Tiempo de relajación transversal
Tr	Tensor irreducible de orden r
wft1d('ni')	Transforma una serie de datos en 1D colectados con ni y sw1
wft1d('ni2')	Transforma una serie de datos en 1D colectados con ni2 y sw2
wft2d('ni')	Transforma una serie de datos en 2D colectados con ni y sw1.
wft2d('ni2')	Transforma una serie de datos en 2D colectados con ni2 y sw2.
Π	Producto
Ω_{zt}	Hamiltoniano que define el desplazamiento químico.
$\beta_{lx \text{ ó } y}$	Hamiltoniano de un pulso de radiofrecuencia sobre el <i>eje x</i> ó <i>y</i>
γ	Constante giromagnética.
μs	Micro segundos
σ	Operador de densidad.
τ	Tiempo de evolución en la secuencia de pulsos.

1. Introducción.

En las dos últimas décadas se ha desarrollado una gran variedad de experimentos de pulsos en Resonancia Magnética Nuclear (RMN)¹, con el objetivo de aumentar la información estructural o la sensibilidad en esta espectroscopia, pues manipulando los espines nucleares por diferentes caminos mediante uno o varios pulsos de radiofrecuencia se ha logrado extraer más información sobre la estructura molecular. Este proceso ha desencadenado una gran diversidad de experimentos en varias dimensiones cuya información, en ciertos casos (excitaciones selectivas)²⁻⁴ lleva a la solución de necesidades muy específicas, lo que ha hecho posible estudiar moléculas complejas y con ello lograr la determinación estructural.

El incremento de estos experimentos sofisticados trae consigo la necesidad de abordar diversos tratamientos teóricos que permitan explicar el comportamiento del sistema de espín cuando es sometido a múltiples irradiaciones.

Muchos de los primeros trabajos fueron enfocados en términos del modelo vectorial clásico^{5,12-14} debido a la simplicidad que ofrecía con respecto a los modelos mecánico-cuánticos. En este modelo el sistema de espín se representa mediante una magnetización macroscópica, cuyos movimientos son seguidos en un plano cartesiano de referencia rotante. Los pulsos rotan al vector o vectores de magnetización hacia el plano xy . La precesión de cada vector se lleva a cabo alrededor del eje z . Sin embargo, una de las limitantes de este modelo es que no considera interacciones tales como acoplamientos escalares que involucren una transferencia de magnetización, las cuales son procesos comunes en los experimentos n -dimensionales.

Un tratamiento mecánico-cuántico del sistema de espín cubre en su totalidad las limitantes presentadas en el modelo vectorial. Este tratamiento involucra la teoría de matrices de densidad. Por medio de una representación en matrices, el modelo, muestra sólo los valores promedio del conjunto de coherencias posibles. Dado que todas las propiedades observables del espín pueden ser calculadas, los valores promedios son suficientes para describir los componentes observables del conjunto de espines. Un conjunto de N espines $1/2$ puede ser descrito en su totalidad por una matriz de densidad de $2^N \times 2^N$ en la cual los elementos de la diagonal corresponden a la población del nivel de energía y los elementos fuera de la diagonal representan la naturaleza de las transiciones entre las coherencias correspondientes. Los efectos de los pulsos de radiofrecuencia y los periodos de libre precesión que afectan a los espines dentro de una secuencia de pulsos están determinados por transformaciones unitarias de la matriz de densidad. Cada transformación unitaria de la matriz de densidad requiere la multiplicación de dos matrices, involucrando para cada transformación, multiplicaciones de $2^N \times 2^N \times 2^N$ números complejos. El cálculo es tal que el uso analítico de este método es restringido al tratamiento de secuencias de pulsos sencillas en sistemas con pocos espines. Una de las ventajas del modelo mecánico cuántico es que sistemas de espines que presentan acoplamientos fuertes, pulsos imperfectos, etc., pueden ser descritos fácilmente. Sin embargo, la gran desventaja es la pérdida de la intuición física del comportamiento del sistema de espines. Los efectos de rotaciones sucesivas en un vector son visualizadas fácilmente, pero los efectos de una serie de transformaciones unitarias sobre una matriz no son evidentes.

Para resolver estos inconvenientes, se ha utilizado el modelo de producto de operadores,^{6-11, 13, 17} el cual combina la simplicidad del modelo vectorial así como el carácter riguroso de la teoría de matrices de densidad. El costo por el empleo del producto de operadores es que se limita a sistemas de espines que presentan acoplamiento débil y a pulsos fuertes, además de no considerar

fenómenos de relajación. Aun así, la mayoría de los fenómenos reales satisfacen estas restricciones. En el caso de presentarse fenómenos debidos a acoplamientos fuertes y pulsos fuera de resonancia (off-resonance) en el sistema de espín éstos pueden ser analizados mediante simulaciones por computadora.

2. Fundamento Teórico.

2.1 Producto de Operadores.

El producto de operadores describe el estado en el que se encuentra el sistema de espín en términos de operadores de momento angular en un tiempo definido. Formalmente, emplea matrices cuyos elementos son los momentos angulares de cada espín; así mismo, existe una matriz definida para cada Hamiltoniano que afecta al momento angular del núcleo (pulsos, desplazamiento químico, etc.). A continuación se explicará de manera más detallada el fundamento de este modelo.

2.2 Movimientos en RMN.

Los movimientos de una magnetización en RMN son la precesión alrededor de un campo magnético. Si se coloca el sistema de tal forma que el observador se encuentre por arriba del eje z , se aprecia que los vectores de magnetización describen un camino o movimiento circular. Por lo tanto, las funciones exponenciales complejas son un medio adecuado para describir dichos movimientos.

Es importante mostrar las siguientes relaciones trigonométricas:

$$\begin{aligned} \cos(-\theta) &= \cos \theta \\ \text{sen}(-\theta) &= -\text{sen} \theta \\ \exp(i\theta) &= \cos \theta + i \text{sen} \theta \\ \exp(-i\theta) &= \cos \theta - i \text{sen} \theta \end{aligned}$$

Estas relaciones establecen que los movimientos de oscilación presentes en el sistema involucran tratamientos algebraicos que se ajustan a funciones del tipo coseno y seno.

Se sabe que, si una masa tiene un movimiento circular (figura 1) posee un momento angular que, desde el punto de vista vectorial, es un vector en dirección perpendicular al plano de rotación.



Figura1 Representación vectorial del momento angular de una partícula en movimiento circular

De acuerdo con lo anterior, el espín nuclear tiene un momento angular asociado, denominado momento angular del espín, que dentro de un plano cartesiano estará definido por los componentes x , y , z . En mecánica cuántica existen operadores que representan estos tres componentes del momento angular del espín. Si el momento angular se encuentra a lo largo del eje x , y ó z , los operadores que los representan son I_x , I_y e I_z respectivamente; así se determina la posición en que se encuentra el espín en cualquier tiempo en términos de operadores de momento angular.

2.3 Formalismo del producto de Operadores.

El estado en que se encuentra el espín se puede representar por una función de onda o por un operador de densidad; generalmente se emplea este último, cuya expresión, de acuerdo con Liouville von-Neuman es:

$$d\sigma /dt = -i(H \sigma - \rho H) \quad [1]$$

donde H representa el Hamiltoniano bajo el cual el operador evoluciona, siendo en este caso, los hamiltonianos de interés: acoplamiento, desplazamiento químico y pulsos de radiofrecuencia. La solución a la ecuación [1] en función del tiempo queda representada de la siguiente forma:

$$\sigma(t) = \exp(-i H t) \sigma(0) \exp(i H t) \quad [2]$$

donde $\pm i H t$ se conocen como propagadores. Para una secuencia de pulsos habrá varios propagadores que representen al sistema. Una vez considerada la dependencia del tiempo en el operador de densidad, se definen los términos observables. Los términos observables son aquellos que se encuentran alineados sobre el eje x o y . Se definen como:

$$M_x = N \gamma h \text{Tr} [\sum I_{kx} \sigma(t)] \quad [3]$$

$$M_y = N \gamma h \text{Tr} [\sum I_{ky} \sigma(t)] \quad [4]$$

donde N representa el número de espines por unidad de volumen y k es el tipo de espín involucrado en el sistema (protón, carbono, etc.) Las ecuaciones [3] y [4] se pueden representar como una combinación lineal de una base de operadores (B_s):

$$\sigma(t) = \sum b_s(t) B_s \quad [5]$$

donde la complejidad de los cálculos depende en gran medida del grupo de operadores base seleccionados. Si se seleccionan operadores base del tipo cartesiano, el operador de densidad se expresa de una manera más sistemática, en términos de productos de operadores:

$$B_s = 2^{(q-1)} \prod_{k=1}^q (I_{kv})^{a_{sk}} \quad [6]$$

donde n es el número de espines con valor de $1/2$ en el sistema, v representa los ejes x , y o z , k es el espín involucrado, q se refiere al número de espines presentes en el producto de operadores, a_{sk} define a los espines involucrados y toma el valor de 1 para cualquier núcleo q y el valor de cero para $n-q$ espines. El producto de operadores para núcleos de espín de $1/2$ son ortogonales

2.4 Operadores para un espín.

Los operadores son funciones matemáticas que surgen de la mecánica cuántica y, como su nombre lo indica, ellos operan sobre funciones. Dentro de la mecánica cuántica, los operadores representan cantidades observables, tales como energía, momento angular y magnetización

Los operadores que representan el momento angular para un sistema de un espín solamente son I_x , I_y e I_z . El estado de equilibrio estará representado por el operador I_z y los otros dos operadores tendrán lugar sólo cuando un pulso de 90° sea aplicado al sistema en equilibrio. En analogía con el modelo vectorial, un pulso de 90° genera una magnetización transversal sobre el

plano xy que en este caso está representada por I_x e I_y . Por lo tanto, es necesario establecer los Hamiltonianos que representen los diferentes factores que modifican la magnetización en una secuencia de pulsos.

2.4.1 Hamiltoniano del pulso de radiofrecuencia.

La forma general del Hamiltoniano que representa un pulso de radiofrecuencia es:

$$\beta I_{x \text{ ó } y}$$

donde β representa el ángulo con respecto al eje z, que forma la magnetización una vez que ha sido aplicado dicho pulso y el término I_x ó I_y , indica la posición en el eje sobre el cual es aplicado el pulso. Esta posición del pulso es también denominada fase del pulso. Así, el Hamiltoniano βI_x representa un pulso de radiofrecuencia de β grados aplicado sobre el eje x (estos pulsos son usualmente de 90° , 180° y 270° o -90°).

Si se aplica el Hamiltoniano del pulso de radiofrecuencia (βI_x ó y) con un ángulo de 90° al operador del momento angular del espín en el estado de equilibrio (I_z), se generan magnetizaciones transversales sobre el plano xy (I_x ó I_y). Si el ángulo es de 180° solamente se invierte el sentido de la magnetización, es decir, pasa de I_z a $-I_z$.

El efecto de los pulsos de radiofrecuencia, puede ser expresado mediante movimientos rotacionales alrededor del plano de referencia, tal como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Movimientos rotacionales generados por la aplicación de un pulso de radiofrecuencia (a) sobre el eje x y (b) sobre el eje y. Si el pulso es aplicado sobre el eje $-x$ ó $-y$ la dirección de las rotaciones invierten su sentido respectivamente.

Esto nos lleva a establecer que cuando el Hamiltoniano actúa sobre el operador de densidad, se genera un nuevo operador y, que se conoce siguiendo las trayectorias circulares en planos definidos. La interacción del Hamiltoniano con un operador se define con base en la expresión de Liouville von-Neuman como:

$$\begin{aligned} \exp(-i \{ \text{Hamiltoniano} \} t) \{ \text{Operador de densidad} \} \exp(i \{ \text{Hamiltoniano} \} t) \\ \equiv \cos(\text{Operador del Hamiltoniano}) \{ \text{Operador de densidad} \} \\ + \text{sen}(\text{Operador del Hamiltoniano}) \{ \text{Nuevo Operador} \} \end{aligned} \quad [6]$$

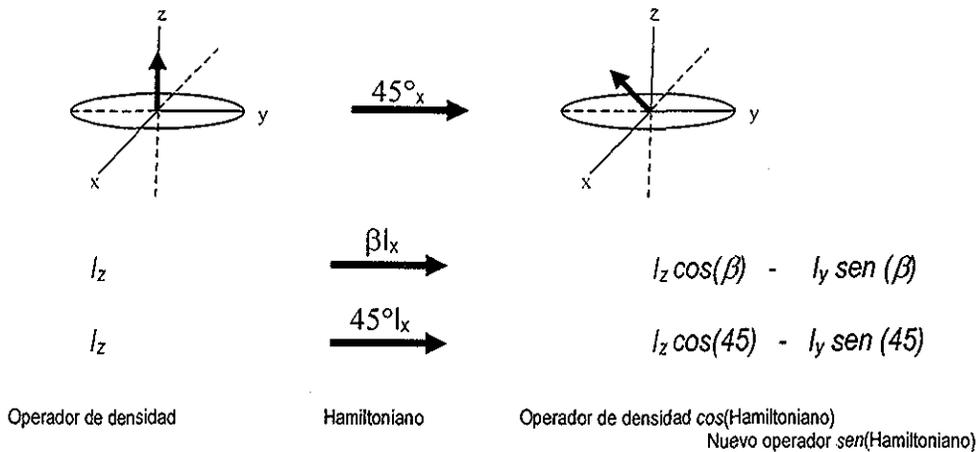
Los movimientos rotacionales mostrados en la figura 2 permiten conocer el operador que se va a generar tras aplicar un pulso de radiofrecuencia. El nuevo operador que se genere depende de

la posición en la cual se encuentre el momento angular del espín (o la posición de la magnetización vista desde el modelo vectorial), ya sea sobre el eje x, y, ó z

Para un sistema de dos espines, la formación del nuevo operador estará definido por la tabla 1 (Sección 2.5).

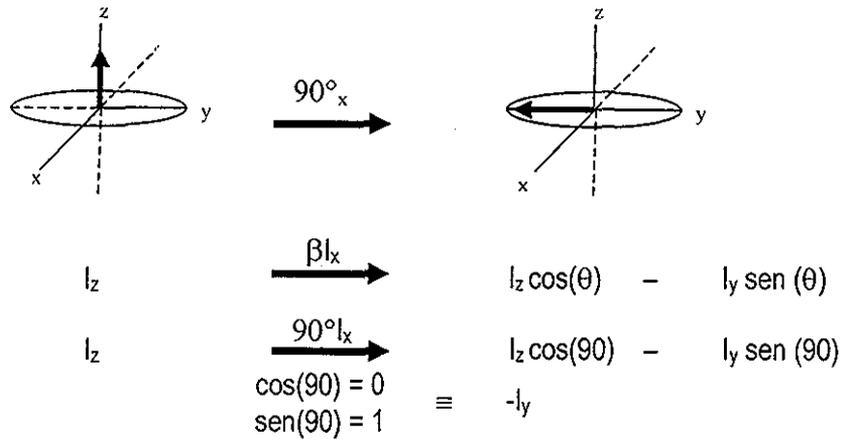
Los siguientes ejemplos recopilan lo ya mencionado, además de mostrar una analogía total del modelo vectorial con el modelo de producto de operadores

Pulso de 45° aplicado sobre el eje x:



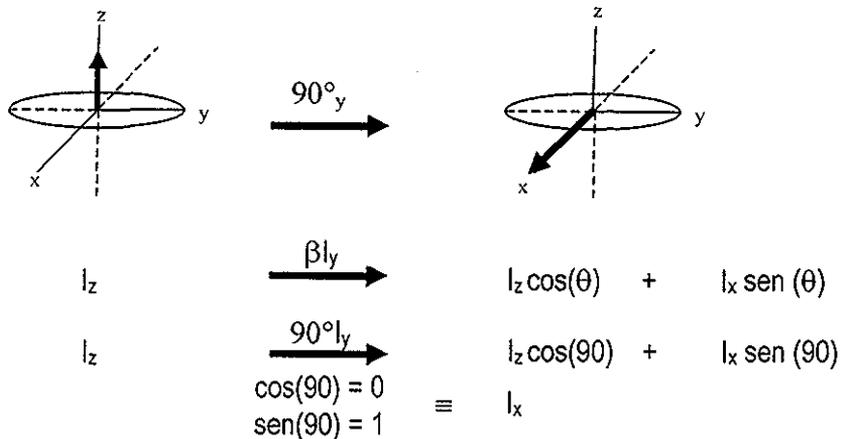
De acuerdo con la figura 2, un pulso aplicado sobre el eje x a la magnetización alineada sobre el eje z genera un componente sobre el eje -y. Por la ecuación [6] se sabe cuales son los términos finales después de la interacción de los dos operadores. Se genera un nuevo componente sobre el eje -y y prevalece parte de la magnetización sobre el eje z. Estos resultados son los mismos que se observan en el modelo vectorial, sólo que ahora expresados en términos de operadores modulados por funciones seno y coseno

Pulso de 90° aplicado sobre el eje x :



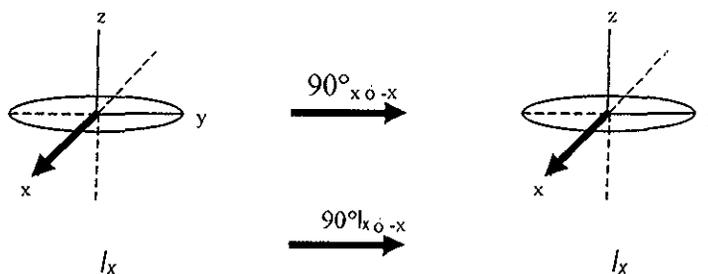
El pulso de 90° no genera dos componentes en el modelo vectorial, sino sólo una magnetización sobre el eje $-y$. El modelo de producto de operadores genera dos términos en analogía con la ecuación [6], los cuales al asignarles el valor del ángulo del pulso hace que el término en z se cancele y sólo prevalesca el término sobre el eje $-y$ (igual que el vectorial). El momento angular tras un pulso de 90° sobre el eje x se encuentra posicionado sobre el eje $-y$. De igual manera cuando el pulso es aplicado sobre el eje y , genera los términos correspondientes.

Pulso de 90° aplicado sobre el eje y :



De la figura 2 se sabe que el efecto de un pulso en el eje y sobre la magnetización en el eje z produce una magnetización sobre el eje x . Cambiar la fase del pulso implica un cambio de fase de la magnetización resultante

Quando la magnetización se encuentra sobre el eje x y se aplica un pulso de 90° sobre este mismo eje se tiene:



Esta es una regla importante, cuando el Hamiltoniano y el operador que interactúan tienen la misma fase (son paralelos) no generan ningún operador nuevo. No hay cambio en la posición de la magnetización o momento angular del espín.

La magnetización transversal generada tras la aplicación de un pulso de radiofrecuencia tiende a regresar al estado basal mediante un movimiento de precesión. Por lo tanto se tiene que definir el Hamiltoniano de precesión que actúa sobre el operador

2.4.2 Hamiltoniano del desplazamiento químico o precesión.

Después de la aplicación de un pulso, la magnetización transversal comienza a relajarse y a girar alrededor del eje z, a una frecuencia definida por $\omega = \gamma B_{\text{efectivo}}$, en donde las diferentes influencias debidas al entorno químico que afectan al núcleo están representadas en B_{efectivo} . El análisis del sistema se hace sobre un plano cartesiano que rota a la misma velocidad o una muy similar a la frecuencia de Larmor ($\omega_0 = \gamma B$); esto implica que el detector también rota a esta misma frecuencia ω_0 . El detector "observa" solamente la diferencia entre estas frecuencias, $\omega - \omega_0$. A esta diferencia de frecuencias se le conoce como frecuencia de precesión o desplazamiento químico. La diferencia entre la frecuencia de Larmor con respecto a la frecuencia del sistema rotante es la que da origen al decaimiento de la inducción libre, FID (por sus siglas en inglés de "free induction decay").

El Hamiltoniano que define el desplazamiento químico es:

$$\Omega I_{zt} \quad [7]$$

esto representa una rotación con frecuencia Ω alrededor del eje z (este último representado por el operador del momento angular I_z). Como es de esperarse, este Hamiltoniano interacciona en los tiempos de espera fijos o variables intercalados en las secuencias de pulsos

Al igual que los pulsos de radiofrecuencias, existen movimientos rotacionales definidos que permiten determinar cuál es el operador que se genera tras dejar evolucionar a la magnetización con respecto al desplazamiento químico. Esto se representa en la figura 3

* Los efectos de relajación no son considerados

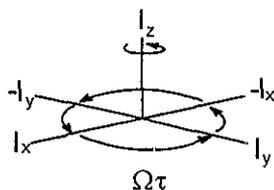


Figura 3 Movimientos rotacionales generados por la evolución del momento angular con respecto al desplazamiento químico

Supongamos que al aplicar un pulso de radiofrecuencia sobre el eje $-y$, se genera un momento angular sobre el eje $-x$ (figura 2) y ésta evoluciona con respecto al desplazamiento químico. La rotación de este vector, de acuerdo con la figura 3, genera un nuevo término en el eje $-y$. Si ahora el momento angular se encuentra sobre el eje y , la evolución de esta magnetización con respecto al desplazamiento químico genera un término sobre el eje $-x$.

Los siguientes ejemplos (figura 4) muestran la manera en la cual actúa el desplazamiento químico sobre el momento angular del espín cuando se encuentra sobre el eje x ó y . Al mismo tiempo, se hace la analogía del formalismo de producto de operadores con el modelo vectorial.

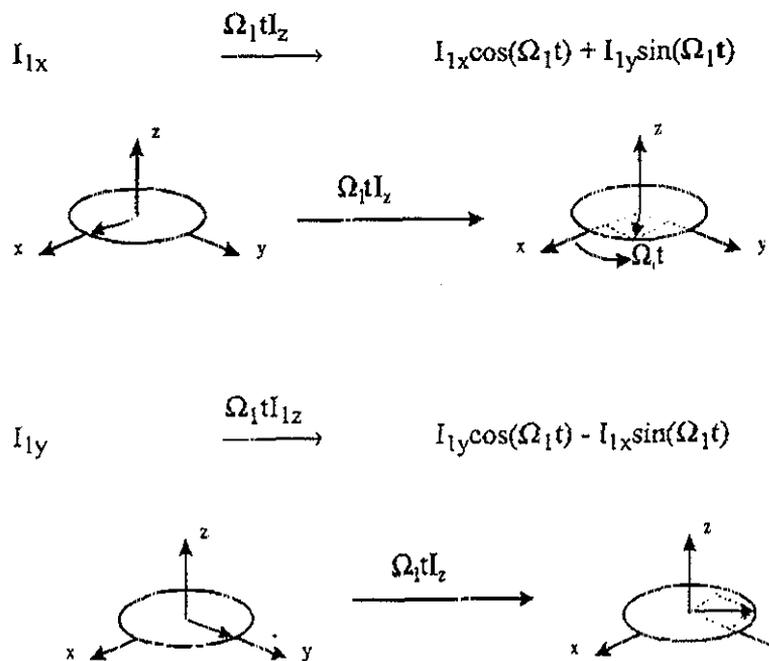


Figura 4. Efecto de la magnetización tras la evolución con respecto al desplazamiento químico. Se muestra la analogía que guarda el modelo de producto de operadores con el modelo vectorial.

El subíndice numérico indica el espín sobre el cual está actuando el desplazamiento químico, pues es muy común que se estudien sistemas con más de un espín (por ello el uso del

subíndice). Cabe señalar que el operador I_z no evoluciona con respecto al desplazamiento químico, es decir, cualquier expresión que esté alineada sobre el eje z quedará inalterada tras verse afectada por el desplazamiento químico

La expresión [8] se refiere a una magnetización del espín 1 que está girando en el plano x - y .

$$I_{1y} \cos(\Omega_1 t) - I_{1x} \sin(\Omega_1 t) \quad [8]$$

Cuando dos espines están a pocos enlaces de distancia, se lleva a cabo entre ellos otro fenómeno entre ellos llamado acoplamiento. En la siguiente parte se mostrarán los operadores que involucran a dos espines en un sistema.

2.5 Operadores para dos espines.

El modelo de producto de operadores toma gran importancia cuando considera sistemas acoplados, los cuales no podrían ser abordados desde el punto de vista vectorial. En este punto, el producto de operadores describe de forma clara y simple fenómenos de transferencia de polarización (intercambio de información entre dos espines acoplados)

Como se mencionó anteriormente, los operadores para un solo espín son I_x , I_y e I_z . Estos tres operadores son suficientes para describir al sistema. Para dos espines, se requieren estos tres operadores para cada espín. Los operadores que corresponden a cada espín son:

espín 1: I_{1x} , I_{1y} e I_{1z}

espín 2: I_{2x} , I_{2y} e I_{2z}

Los operadores I_{1z} y I_{2z} , representan, respectivamente, magnetizaciones del espín 1 y 2 alineadas sobre el eje z . Los términos I_{1x} , I_{1y} , I_{2x} e I_{2y} , representan magnetizaciones alineadas sobre el eje x ó y para el espín uno y dos. Puesto que la magnetización de un espín acoplado a otro genera un doblete en el espectro de RMN, el término I_{1x} suele denominarse bajo este contexto, una magnetización *en fase* del espín 1 alineada sobre el eje x . La expresión *en fase* significa que las dos líneas del doblete tienen el mismo sentido (figura 4).

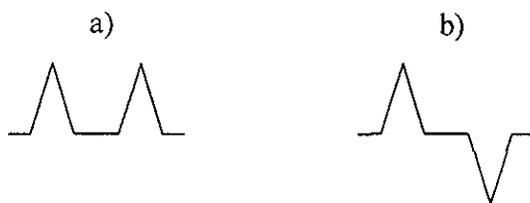


Figura 5 Formas de la señal en sistemas de dos espines acoplados. La señal en fase a) representa dos líneas de la misma forma y con el mismo sentido. La señal en antifase b) se representa con dos líneas de igual forma pero de sentido opuesto.

El término I_{1y} representa una magnetización en fase alineada sobre el eje y . La posición de la magnetización da lugar a diferentes formas de las señales. Generalmente, la señal en modo de absorción se asociará a una magnetización alineada sobre el eje x y una señal en modo dispersivo aparecerá cuando la magnetización se encuentre alineada sobre el eje y . Como se verá más adelante estas formas de las señales están determinadas por funciones coseno y seno respectivamente.

4) Existen cuatro operadores adicionales que representan magnetizaciones en antifase (figura

$$2I_{1x}I_{2z} \quad 2I_{1y}I_{2z} \quad 2I_{1z}I_{2x} \quad 2I_{1z}I_{2y} \quad [9]$$

El término $2I_{1x}I_{2z}$ representa la magnetización del espín 1 en antifase con respecto al acoplamiento del espín 2

Estos términos son muy importantes en el fenómeno de RMN, ya que a través de ellos se llevan a cabo los fenómenos de transferencia de polarización y sólo surgen cuando a la magnetización transversal se le permite evolucionar con respecto al acoplamiento. Estos no son observables, pero se generan tras evolucionar con el acoplamiento químico. Los términos observables en RMN son aquellos que se encuentran alineados sobre el plano de los ejes x ó y (I_x , I_y , $-I_x$, $-I_y$) cualquiera, diferente a estos términos no son detectables

Tabla 1 Carta de conversión para el modelo de producto de operadores. La evolución del Hamiltoniano (representado en la fila superior con un tilde) cuando actúa sobre un operador (columna izquierda sin tilde) define el estado del sistema. El término E es el operador unitario

	\tilde{I}_{1x}	\tilde{I}_{1y}	\tilde{I}_{1z}	\tilde{I}_{2x}	\tilde{I}_{2y}	\tilde{I}_{2z}	$2\tilde{I}_{1z}\tilde{I}_{2z}$
I_{1x}	$1/2E$	$-I_{1z}$	$+I_{1y}$	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$+2I_{1y}I_{2z}$
I_{1y}	$+I_{1z}$	$1/2E$	$-I_{1x}$	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$-2I_{1x}I_{2z}$
I_{1z}	$-I_{1y}$	$+I_{1x}$	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$
I_{2x}	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$-I_{2z}$	$+I_{2y}$	$+2I_{1z}I_{2y}$
I_{2y}	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$+I_{2z}$	$1/2E$	$-I_{2x}$	$-2I_{1z}I_{2x}$
I_{2z}	$1/2E$	$1/2E$	$1/2E$	$-I_{2y}$	$+I_{2x}$	$1/2E$	$1/2E$
$2I_{1z}I_{2z}$	$-2I_{1y}I_{2z}$	$+2I_{1x}I_{2z}$	$1/2E$	$-2I_{1z}I_{2y}$	$+2I_{1z}I_{2x}$	$1/2E$	$1/2E$
$2I_{1x}I_{2z}$	$1/2E$	$-2I_{1z}I_{2z}$	$+2I_{1y}I_{2z}$	$-2I_{1x}I_{2y}$	$+2I_{1x}I_{2x}$	$1/2E$	$+I_{1y}$
$2I_{1y}I_{2z}$	$+2I_{1z}I_{2z}$	$1/2E$	$-2I_{1x}I_{2z}$	$-2I_{1y}I_{2y}$	$+2I_{1y}I_{2x}$	$1/2E$	$-I_{1x}$
$2I_{1z}I_{2x}$	$-2I_{1y}I_{2x}$	$+2I_{1x}I_{2x}$	$1/2E$	$1/2E$	$-2I_{1z}I_{2z}$	$+2I_{1z}I_{2y}$	$+I_{2y}$
$2I_{1z}I_{2y}$	$-2I_{1y}I_{2y}$	$+2I_{1x}I_{2y}$	$1/2E$	$+2I_{1z}I_{2z}$	$1/2E$	$-2I_{1z}I_{2x}$	$-I_{2x}$
$2I_{1x}I_{2x}$	$1/2E$	$-2I_{1z}I_{2x}$	$+2I_{1y}I_{2x}$	$1/2E$	$-2I_{1x}I_{2z}$	$+2I_{1x}I_{2y}$	$1/2E$
$2I_{1x}I_{2y}$	$1/2E$	$-2I_{1z}I_{2y}$	$+2I_{1y}I_{2y}$	$+2I_{1x}I_{2z}$	$1/2E$	$-2I_{1x}I_{2x}$	$1/2E$
$2I_{1y}I_{2x}$	$+2I_{1z}I_{2x}$	$1/2E$	$-2I_{1x}I_{2x}$	$1/2E$	$-2I_{1y}I_{2z}$	$+2I_{1y}I_{2y}$	$1/2E$
$2I_{1y}I_{2y}$	$+2I_{1z}I_{2y}$	$1/2E$	$-2I_{1x}I_{2y}$	$+2I_{1y}I_{2z}$	$1/2E$	$-2I_{1y}I_{2x}$	$1/2E$

Otros operadores que no son observables, pero que corresponden a coherencias cuánticas múltiples son:

$$2I_{1x}I_{2x} \quad 2I_{1y}I_{2y} \quad 2I_{2x}I_{2y} \quad 2I_{2y}I_{2x} \quad [10]$$

Estos términos contienen dos elementos transversales, los cuales pueden ser convertidos a magnetizaciones en antifase tras aplicar un pulso de 90° sobre uno de los espines y de ahí evolucionar debido al acoplamiento y generar términos que se detectan.

Finalmente el término:

$$2I_{1z}I_{2z} \quad [11]$$

corresponde a un tipo particular de distribución poblacional de no equilibrio, también denominado operador de orden longitudinal de dos espines. Este término no es observable, pero puede generar un término en antifase tras la aplicación de un pulso de 90° en cualquiera de los espines y posteriormente evolucionar con el acoplamiento para generar un término observable

2.5.1 Hamiltoniano del acoplamiento.

El acoplamiento es la interacción entre dos o más espines, la cual ocurre a través de los enlaces (acoplamiento escalar) o a través del espacio (acoplamiento dipolar). Nuestra atención se enfocará al acoplamiento escalar. El Hamiltoniano que lo describe es el siguiente:

$$2\pi J_{1,2} I_{1z} I_{2z} t \quad [12]$$

al igual que el desplazamiento químico, va actuar en los tiempos (fijos o variables) de las secuencias de pulsos y no opera sobre componentes alineados en el eje z.

También existe un diagrama que nos permite saber qué operador se genera tras la evolución del momento angular con respecto al acoplamiento en una posición definida del sistema de coordenadas.

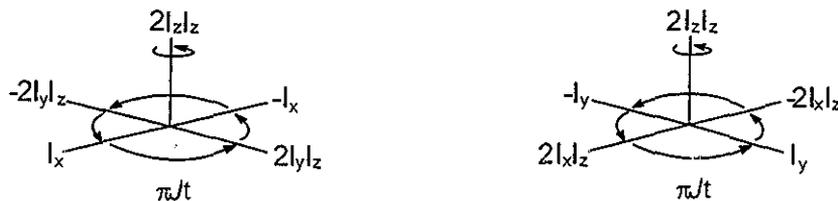


Figura 6 Movimientos rotacionales generados por la evolución del momento angular con respecto al acoplamiento escalar

Consideremos los siguientes ejemplos:

a)	I_{1x}	$\xrightarrow{2\pi J_{1,2} t I_{1z} I_{2z}}$	$I_{1x} \cos(\pi J_{1,2} t) + 2I_{1y} I_{2z} \sin(\pi J_{1,2} t)$
	Operador de densidad	Hamiltoniano	(operador de densidad) \cos (Hamiltoniano) + (Nuevo operador) \sin (Hamiltoniano)
b)	$2I_{1x} I_{2z}$	$\xrightarrow{2\pi J_{1,2} t I_{1z} I_{2z}}$	$2I_{1x} I_{2z} \cos(\pi J_{1,2} t) + I_{1y} \sin(\pi J_{1,2} t)$

c)

$$\left. \begin{array}{l} 2I_{1x}I_{2y} \\ 2I_{1x}I_{2x} \\ 2I_{1y}I_{2x} \\ 2I_{1y}I_{2y} \\ 2I_{1z}I_{2z} \end{array} \right\} \xrightarrow{2\pi J_{1,2} t I_{1z}I_{2z}} \left\{ \begin{array}{l} 2I_{1x}I_{2y} \\ 2I_{1x}I_{2x} \\ 2I_{1y}I_{2x} \\ 2I_{1y}I_{2y} \\ 2I_{1z}I_{2z} \end{array} \right.$$

A diferencia de los pulsos de radiofrecuencia y del desplazamiento químico, la evolución del acoplamiento crea términos observables (figura 6) Sólo el acoplamiento químico permite el intercambio de información de un núcleo a otro mediante procedimientos conocidos como transferencia de polarización y por ello se puede estudiar sólo a uno de los espines involucrados en el acoplamiento y obtener como resultado final un término que contenga la información del espín con quien lo esté, como se verá más adelante en experimentos bidimensionales

De los ejemplos anteriores se puede notar que, en el inciso a) solamente operadores transversales evolucionan bajo el acoplamiento químico y en el inciso b) términos en antifase que poseen un operador transversal y uno longitudinal evolucionan con respecto al acoplamiento para generar un término observable. Por último, en el inciso c) el producto de dos operadores transversales así como el producto de dos operadores longitudinales no se ven afectados por el acoplamiento químico.

Dado que los operadores I_z , I_x e I_y conmutan entre sí, la evolución del momento angular del espín con respecto a pulsos de radiofrecuencia, acoplamiento y desplazamiento químico pueden tratarse en forma independiente al igual que para cada espín. Los Hamiltonianos que actúen sobre el espín 1 sólo lo harán sobre éste y no sobre el espín 2 y lo mismo ocurrirá para los Hamiltonianos que afecten al espín 2.

Con esta breve revisión es posible analizar las secuencias de pulsos más comunes en RMN. Por lo tanto en la siguiente parte se presentará el estudio de algunas de ellas

2.6 Secuencia de pulsos Eco de Espín.

Esta secuencia de pulsos, propuesta por E. L. Hahn¹⁵ y posteriormente con la variante de Carr y Purcell¹⁶ permite la medición del tiempo de relajación T_2 . Su secuencia es la siguiente:



Figura 7. Secuencia de pulsos del "eco de espín". El pulso de 90° es un pulso de inicio o lectura, el tiempo τ , el pulso de 180° y el otro tiempo τ conforman el eco de espín

El uso de esta secuencia se vuelve importante cuando se considera su efecto sobre muestras que están en un campo no homogéneo. El efecto de esta inhomogeneidad hace que núcleos químicamente idénticos sientan un campo efectivo diferente, por lo que precesionan a frecuencias diferentes y no a una sola, teniendo como consecuencia una disminución en la intensidad de la señal registrada.

Consideremos un caso simple en el cual tenemos un solo tipo de espín en las condiciones de campo antes mencionadas. Asumiendo que los pulsos de radiofrecuencia son aplicados sobre el eje $-x$, el pulso de 90° genera una magnetización transversal alineada sobre el eje y . En el siguiente tiempo de espera la magnetización debería precesar a una sola frecuencia, pero debido a las inhomogeneidades del campo magnético se presentan diferentes frecuencias de precesión para el mismo tipo de espín (isocromatos) representadas por los vectores a , b , y c (Figura 8). Estos vectores se dispersan sobre el plano x - y . El siguiente pulso de 180° invierte el sentido de las magnetizaciones prevaleciendo la dirección de los movimientos rotacionales de cada vector. El último tiempo de espera permite que las 3 magnetizaciones se encuentren nuevamente alineadas sobre el eje y pero ahora en sentido negativo. En este punto ha ocurrido un reenfoque de la magnetización y se han eliminado los inconvenientes que presenta el someter un espín a un campo magnético no homogéneo

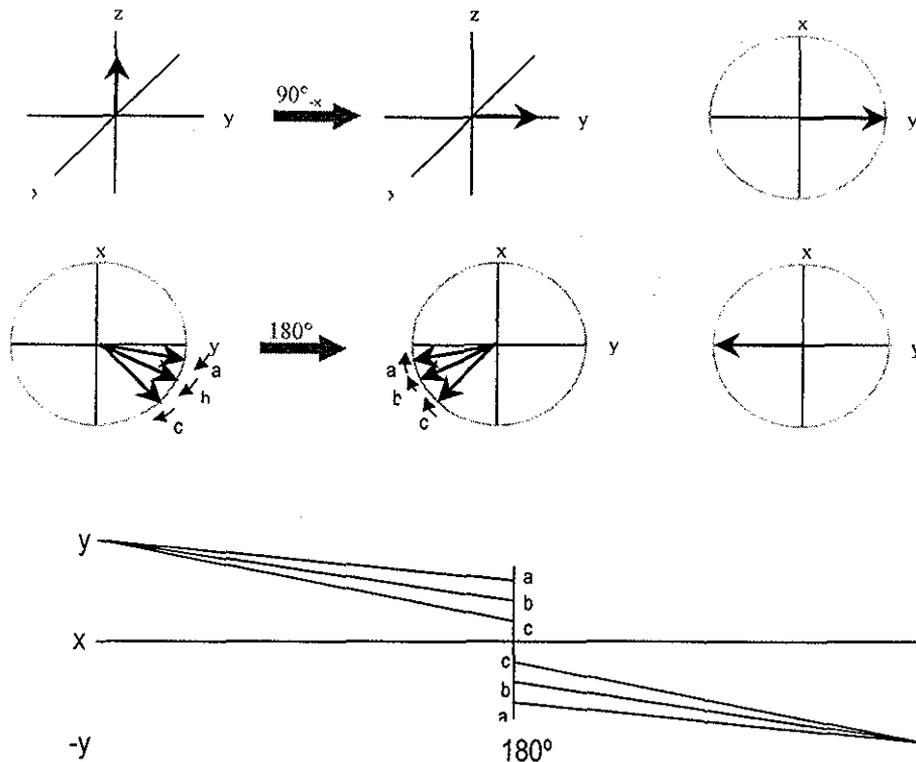


Figura 8 Representación del eco de espín mediante modelo vectorial con su correspondiente evolución en diagrama de fase. El pulso de 90° genera una magnetización transversal que debido a inhomogeneidades del campo, adopta diferentes frecuencias de precesión. El siguiente pulso de 180° y el tiempo de espera hacen que esos vectores converjan en el eje $-y$, ocurriendo con ello un reenfoque de la magnetización.

Cada una de las frecuencias de precesión se agrupan en un mismo punto y ocurrirá un reenfoque de éstas. Si ahora tenemos varios espines en un campo magnético homogéneo, cada frecuencia de precesión será el desplazamiento químico del espín observado y ocurriría el mismo fenómeno descrito anteriormente; por lo tanto, esta secuencia de pulsos logra un reenfoque del desplazamiento químico del espín.

2.6.1 Eco de espín mediante el modelo de Producto de Operadores.

2.6.1.1 Representación por diagramas de árbol.

La secuencia del eco de espín es un bloque de pulsos que se encuentra de manera frecuente en los experimentos bidimensionales de RMN. Este tipo de experimentos ya no pueden ser explicados por el modelo vectorial; por esta razón se vuelve importante analizar el eco de espín mediante producto de operadores para saber qué papel juega la inclusión de esta secuencia en un tren de pulsos más complejo.

Como se mencionó anteriormente, el producto de operadores genera términos modulados por cosenos y senos. La representación de este modelo se puede hacer empleando un diagrama de árbol⁸ con el cual la notación se hace más simple, permitiendo con ello manejar con mayor facilidad la información extraída de la secuencia de pulsos.

Por ejemplo, consideremos el efecto de un pulso de radiofrecuencia aplicado en el eje x sobre la magnetización en su estado de equilibrio I_{1z} .

$$I_z \xrightarrow{\beta I_x} I_z \cos \beta - I_y \sin \beta \quad [13]$$

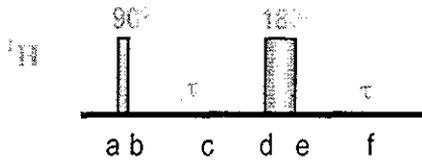
En la representación de árbol la notación es la siguiente:

$$\begin{array}{ccc} & I_{1z} & \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ \cos(\beta) & & \sin(\beta) \\ \swarrow \quad \searrow & & \swarrow \quad \searrow \\ I_{1z} & & -I_{1y} \end{array} \quad [14]$$

Esta representación es idéntica a la forma lineal mostrada en [13]. Los términos a la izquierda están modulados por la función coseno y los términos a la derecha están modulados por la función seno. Esta representación se vuelve más conveniente cuando se trabaja con secuencias de pulsos más grandes. Los términos finales se ponen en forma completa (considerando todos los efectos que estuvieron involucrados) y se procede a su análisis.

2.6.1.2 Eco de espín.

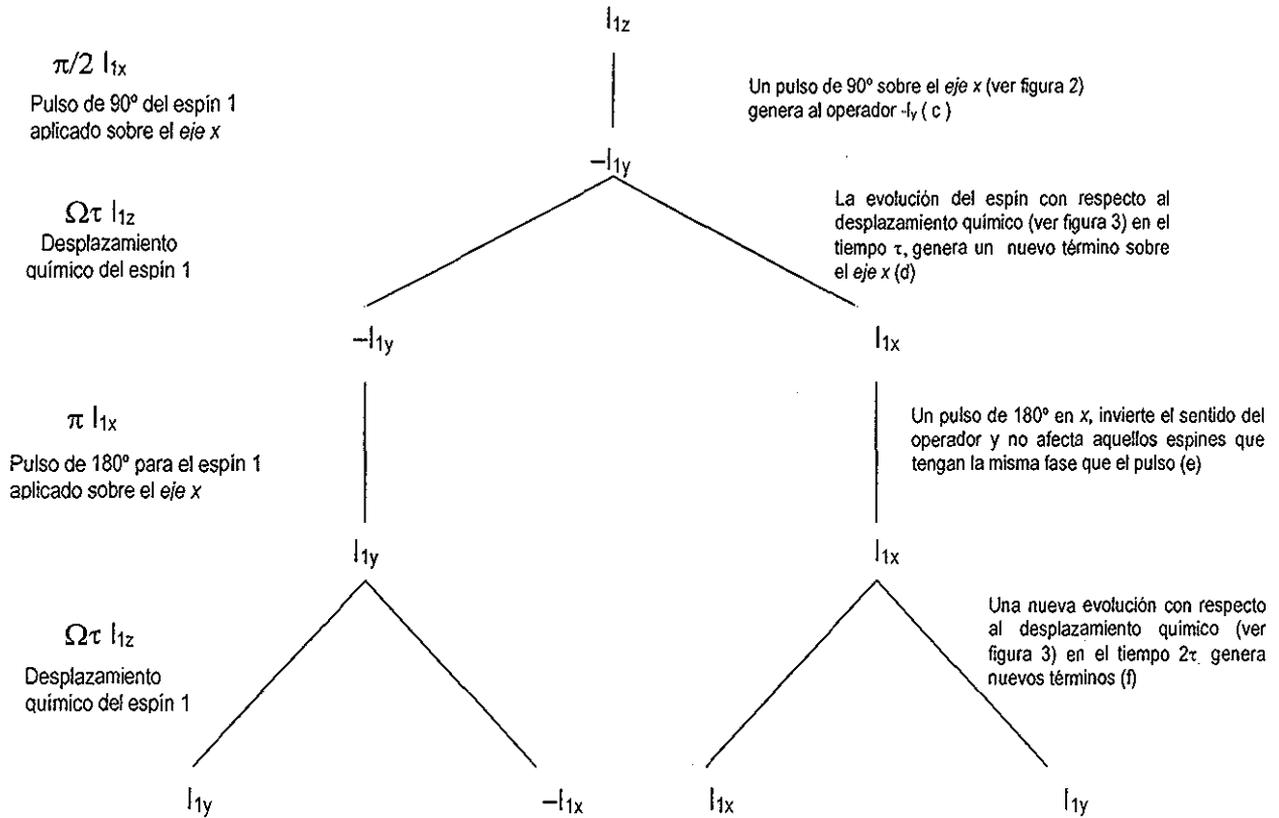
Se considerará solamente un espín aislado. Por lo tanto, el Hamiltoniano de desplazamiento químico será el único que afectará a la magnetización en los tiempos de evolución. En el diagrama de árbol se enmarca cada una de las etapas de la secuencia de pulsos para su mayor comprensión. El subíndice 1 hará referencia al núcleo de protón y el subíndice 2 hará referencia al núcleo de carbono-13.



Hamiltonianos bajo los cuales evoluciona la magnetización

Operadores

Explicación del efecto



Expresando cada uno de los términos obtenidos en su forma completa se tiene:

$$I_{1y} (\cos(\Omega\tau) \cos(\Omega\tau)) - I_{1x} (\cos(\Omega\tau) \text{sen}(\Omega\tau)) + I_{1y} (\text{sen}(\Omega\tau) \text{sen}(\Omega\tau)) + I_{1x} (\text{sen}(\Omega\tau) \cos(\Omega\tau)) \quad [15]$$

Los términos alineados sobre el eje x se cancelan, conservándose únicamente los términos posicionados sobre el eje y.

Factorizando y empleando funciones trigonométricas:

$$I_{1y} [\cos^2(\Omega\tau) + \text{sen}^2(\Omega\tau)] \xrightarrow{\cos^2\theta + \text{sen}^2\theta = 1} I_{1y} \quad [16]$$

Los términos que involucran al desplazamiento químico se cancelan. Esto indica que la magnetización del espín 1 no depende del desplazamiento químico. A este proceso se le llama reenfoque de la magnetización con respecto al desplazamiento químico, al igual que en el modelo vectorial. La intensidad de la señal en esta secuencia no depende de la frecuencia a la cual precese el espín. En el ejemplo anterior se consideró únicamente un espín nuclear en el sistema. Sin embargo, en una molécula interactúan más de un núcleo. Por lo tanto se analizará ahora el eco de espín con dos espines presentes en el sistema. La siguiente secuencia considera el efecto de otro núcleo presente, que para este caso será ^{13}C .

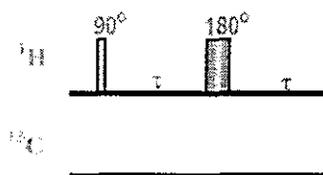


Figura 9 Secuencia de pulsos del Eco de Espín. Con este bloque de pulsos se eliminan los términos debidos al acoplamiento y desplazamiento químico.

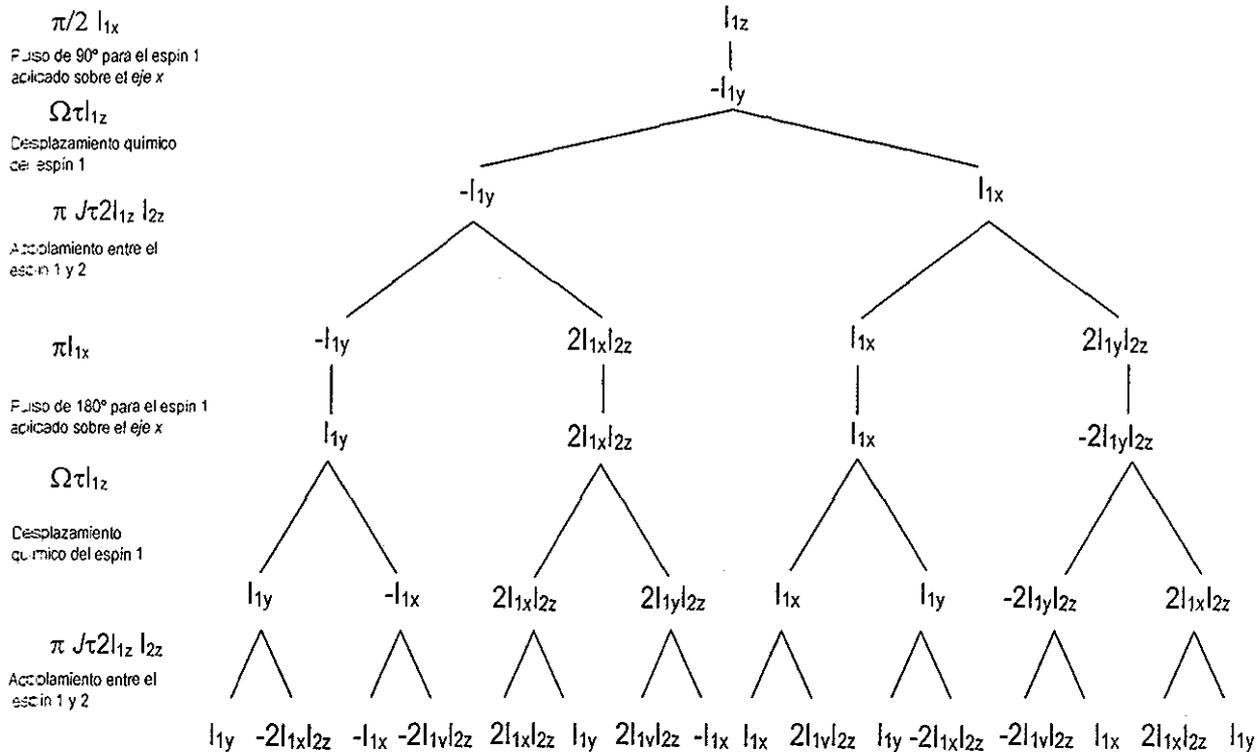
Los pulsos de radiofrecuencia en la región de ^1H sólo tienen efecto sobre los núcleos de ^1H y no sobre los núcleos de ^{13}C . En los tiempos de evolución τ , la magnetización evoluciona con respecto al acoplamiento y desplazamiento químico. No es necesario considerar el desplazamiento de ^{13}C (espín 2) porque en el análisis no aparece un operador transversal para este núcleo. Los términos que existen del espín 2 son operadores longitudinales, pero éstos no evolucionan con respecto al desplazamiento químico.

El análisis mediante producto de operadores es el siguiente:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hamiltonianos bajo los cuales evoluciona la magnetización

Operadores



La expresión completa de los términos finales en el diagrama de árbol es la siguiente:

$+ I_{1y} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$+ I_{1y} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$+ I_{1y} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$+ I_{1y} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$- 2I_{1x}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1x}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$- 2I_{1x}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1x}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$- I_{1x} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$- I_{1x} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$+ I_{1x} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$+ I_{1x} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$- 2I_{1y}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1y}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$+ 2I_{1y}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1y}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$

Factorizando los términos (con fines de simplificación, la expresión $\cos \sin(H)$ será equivalente a $\cos(H)\sin(H)$ donde $H = \pi J\tau$ ó $\Omega\tau$):

$+ I_{1y} [\cos^2(\Omega\tau)\cos^2(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1x}I_{2z} [\cos^2(\Omega\tau)\cos \sin(\pi J\tau)]$
$+ I_{1y} [\cos^2(\Omega\tau)\sin^2(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1x}I_{2z} [\cos^2(\Omega\tau)\cos \sin(\pi J\tau)]$
$+ I_{1y} [\sin^2(\Omega\tau)\cos^2(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1x}I_{2z} [\sin^2(\Omega\tau)\cos \sin(\pi J\tau)]$
$+ I_{1y} [\sin^2(\Omega\tau)\sin^2(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1x}I_{2z} [\sin^2(\Omega\tau)\cos \sin(\pi J\tau)]$

$$\begin{array}{ll}
- I_{1x} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\cos^2(\pi J\tau)] & - 2I_{1y}I_{2z} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\cos \text{sen}(\pi J\tau)] \\
- I_{1x} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}^2(\pi J\tau)] & + 2I_{1y}I_{2z} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\cos \text{sen}(\pi J\tau)] \\
+ I_{1x} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\cos^2(\pi J\tau)] & + 2I_{1y}I_{2z} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\cos \text{sen}(\pi J\tau)] \\
+ I_{1x} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}^2(\pi J\tau)] & - 2I_{1y}I_{2z} [\cos \text{sen}(\Omega\tau)\cos \text{sen}(\pi J\tau)]
\end{array}$$

Ordenando los términos restantes:

$$+ I_{1y} \cos^2(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \text{sen}^2(\pi J\tau)] + I_{1y} \text{sen}^2(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \text{sen}^2(\pi J\tau)],$$

ordenando se tiene:

$$+ I_{1y} \cos^2(\Omega\tau) + I_{1y} \text{sen}^2(\Omega\tau);$$

simplificando,

$$I_{1y} [\cos^2(\Omega\tau) + \text{sen}^2(\Omega\tau)]$$

Utilizando la identidad trigonométrica de la ecuación [16], el resultado final es:

$$I_{1y} \quad [17]$$

Nuevamente se han eliminado los términos que involucran al desplazamiento químico y se cancelaron los correspondientes al acoplamiento. Esto significa que cuando apliquemos la secuencia de la figura 9, la señal generada para el protón no es modulada ni por el desplazamiento químico, ni por el acoplamiento.

Este resultado hace pensar que con tan sólo aplicar un pulso de 90° sobre el eje x a una magnetización ubicada en el eje z obtendríamos el mismo resultado (una magnetización en y), y se podría omitir el pulso de 180° y los respectivos tiempos de espera τ . Sin embargo, por el análisis descrito anteriormente, el pulso de 180° y los tiempos de espera eliminan los efectos relacionados con el acoplamiento y desplazamiento químico. Esto no se consigue con tan sólo aplicar un pulso de 90°. Es evidente que este pulso de 90° no se refiere a un pulso inicial, sino a uno que esté presente dentro de un tren de pulsos.

Otra modalidad del eco de espín es aplicar un pulso de 180° sobre un núcleo de carbono-13, como se muestra a continuación:

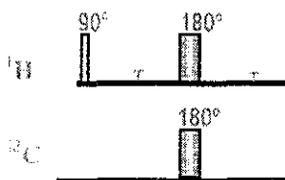


Figura 10 Secuencia de pulsos del Eco de espín heteronuclear. En este caso ambos núcleos se ven afectados por un pulso de 180°, con ello se logra eliminar los términos debidos a desplazamiento químico y sólo prevalecen términos debidos al acoplamiento.

Nuevamente en los tiempos de evolución se considera el efecto del acoplamiento y desplazamiento químico del protón.

Hamiltonianos bajo los cuales
evoluciona la magnetización

Operadores

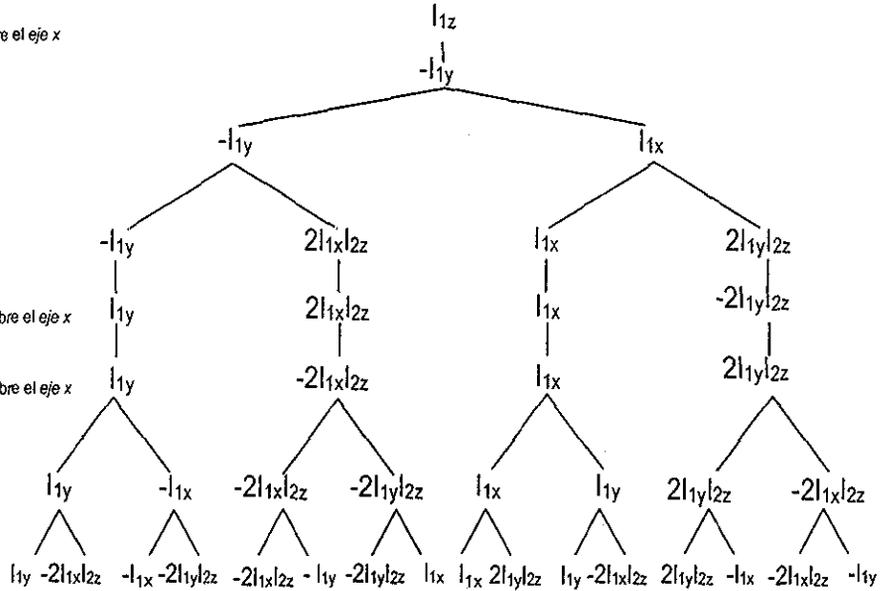
$\frac{\pi}{2} I_{1x}$
Pulso de 90° para el espín 1 aplicado sobre el eje x
 $\Omega\tau I_{1z}$
Desplazamiento químico del espín 1

$\pi J\tau 2I_{1z} I_{2z}$
Acoplamiento entre el espín 1 y 2

πI_{1x}
Pulso de 180° para el espín 1 aplicado sobre el eje x
 πI_{2x}
Pulso de 180° para el espín 2 aplicado sobre el eje x

$\Omega\tau I_{1z}$
Desplazamiento químico del espín 1

$\pi J\tau 2I_{1z} I_{2z}$
Acoplamiento entre el espín 1 y 2



Los términos obtenidos son los siguientes:

$+ I_{1y} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1x}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$+ I_{1y} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1x}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$- I_{1y} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1x}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$- I_{1y} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1x}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$+ I_{1x} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1y}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$+ I_{1x} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$+ 2I_{1y}I_{2z} [\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$
$- I_{1x} [\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1y}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$
$- I_{1x} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]$	$- 2I_{1y}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\sin(\Omega\tau)\sin(\pi J\tau)]$

Factorizando términos

$$I_{1y} \cos^2(\pi J\tau) [\overset{1}{\cos^2(\Omega\tau) + \sin^2(\Omega\tau)}]$$

$$- I_{1y} \sin^2(\pi J\tau) [\cos^2(\Omega\tau) + \sin^2(\Omega\tau)]$$

$$2I_{1x}I_{2z} \sin \cos(\pi J\tau) [\overset{1}{\cos^2(\Omega\tau) + \cos^2(\Omega\tau) + \sin^2(\Omega\tau) + \sin^2(\Omega\tau)}]$$

$$I_{1x} \sin \cos(\Omega\tau) [\overset{1}{\cos^2(\pi J\tau) + \sin^2(\pi J\tau)}]$$

$$- I_{1x} \sin \cos(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \sin^2(\pi J\tau)]$$

$$2I_{1y}I_{2z} [\sin \cos(\Omega\tau)\sin \cos(\pi J\tau) + \sin \cos(\Omega\tau)\sin \cos(\pi J\tau)]$$

$$-2I_{1y}I_{2z} [\sin \cos(\Omega\tau)\sin \cos(\pi J\tau) + \sin \cos(\Omega\tau)\sin \cos(\pi J\tau)]$$

Ordenado lo anterior y utilizando entidades trigonométricas:

$$I_{1y} [\cos^2(\pi J\tau) - \sin^2(\pi J\tau)] - 2I_{1x}I_{2z} 2\sin \cos(\pi J\tau)$$

se sabe que $\cos^2(\theta) - \sin^2(\theta) = \cos 2\theta$ y $2\cos\theta\sin\theta = \sin 2\theta$, por lo tanto el resultado final es:

$$I_{1y} \cos(2\pi J\tau) - 2I_{1x}I_{2z} \sin(2\pi J\tau)$$

Puesto que $2I_{1x}I_{2z}$ no es observable, el término que determina la señal es:

$$I_{1y} \cos(2\pi J\tau) \quad [18]$$

El resultado anterior significa que la señal no está en función del desplazamiento químico, pero sí está modulada por el acoplamiento. Esta secuencia permite el reenfoque del desplazamiento químico del espín 1 y 2.

La última modalidad del eco de espín se presenta en la figura 11.

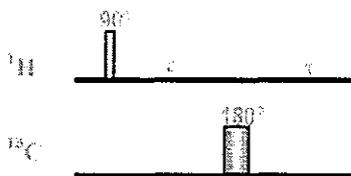


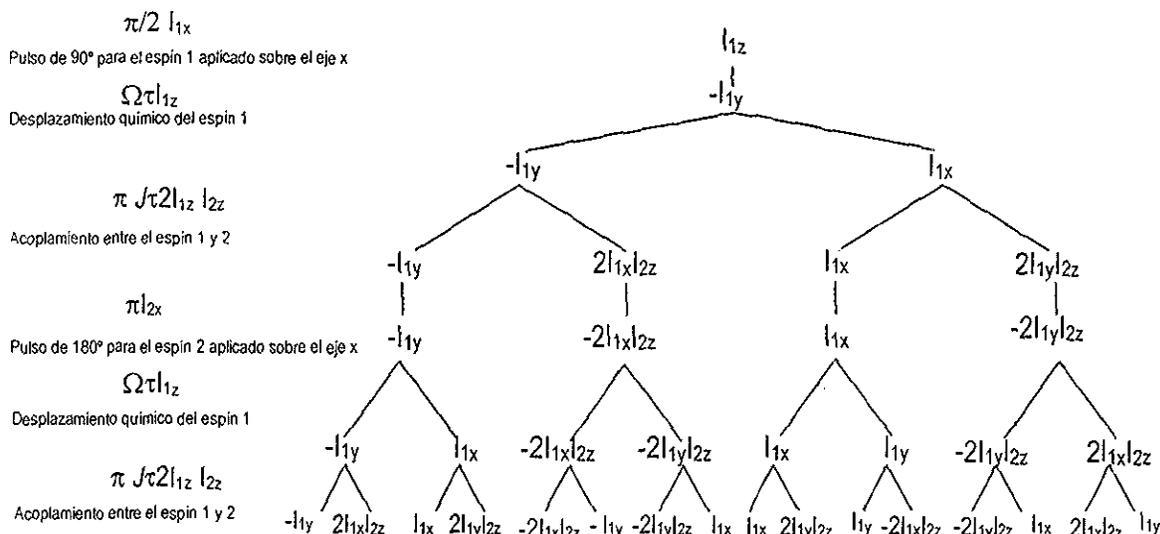
Figura 11. Secuencia de pulsos del Eco de Espín heteronuclear. Sólo el núcleo 2 (C-13) es excitado por un pulso de 180°; con ello se logra eliminar términos debidos al acoplamiento y únicamente prevalecen términos debidos al desplazamiento químico.

En este caso se aplica un pulso de 180° sobre el núcleo de C-13. El análisis es el siguiente:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hamiltonianos bajo los cuales evoluciona la magnetización

Operadores



La expresión completa de cada uno de los términos se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 & - I_{1y} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] & + 2I_{1x}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] \\
 & - I_{1y} [\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] & - 2I_{1x}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] \\
 & + I_{1y} [\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] & - 2I_{1x}I_{2z} [\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] \\
 & + I_{1y} [\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] & + 2I_{1x}I_{2z} [\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] \\
 \\
 & + I_{1x} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] & + 2I_{1y}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] \\
 & + I_{1x} [\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] & - 2I_{1y}I_{2z} [\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] \\
 & + I_{1x} [\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)] & + 2I_{1y}I_{2z} [\text{sen}(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] \\
 & + I_{1x} [\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)] & - 2I_{1y}I_{2z} [\text{sen}(\Omega\tau)\text{sen}(\pi J\tau)\cos(\Omega\tau)\cos(\pi J\tau)]
 \end{aligned}$$

Factorizando:

$$\begin{aligned}
 & - I_{1y} \cos^2(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \text{sen}^2(\pi J\tau)] & + I_{1x} \cos \text{sen}(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \text{sen}^2(\pi J\tau)] \\
 & + I_{1y} \text{sen}^2(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \text{sen}^2(\pi J\tau)] & + I_{1x} \cos \text{sen}(\Omega\tau) [\cos^2(\pi J\tau) + \text{sen}^2(\pi J\tau)]
 \end{aligned}$$

Aplicando entidades trigonométricas:

$$- I_{1y} [\cos^2(\Omega\tau) - \text{sen}^2(\Omega\tau)] + I_{1x} [2\cos(\Omega\tau)\text{sen}(\Omega\tau)]$$

el resultado final es:

$$- I_{1y} \cos(2\Omega\tau) + I_{1x} \text{sen}(2\Omega\tau) \quad [19]$$

Cuando utilizamos la secuencia de eco de espín sin aplicar un pulso de 180° en el espín 1 (protón) y aplicando un pulso de 180° en el espín 2 (carbono) se logra reenfoque el término correspondiente al acoplamiento. La señal que se registre va a depender de la frecuencia de

precesión de los espines involucrados y no del acoplamiento entre ellos. Se puede decir que este bloque de pulsos funciona como un desacoplador.

2.7 Experimentos bidimensionales.

Cuando el sistema es perturbado por un pulso como es el caso de experimentos unidimensionales, se crea un estado fuera del equilibrio donde ocurren sólo coherencias cuánticas simples (que corresponden a las magnetizaciones transversales, en modelo vectorial, o los momentos angulares en el plano xy en producto de operadores). Las interacciones en el sistema de espín dan lugar a varios procesos físicos, por ejemplo, efecto nuclear Overhauser, transferencia de polarización, coherencia múltiple cuántica, relajación cruzada, etc. El estudio de estos fenómenos proporciona información adicional a la solución estructural, pero no pueden ser medidos directamente por la aplicación de un solo pulso.

Para que ocurran estos procesos es necesario introducir más pulsos en la secuencia, en periodos fuera del equilibrio y otros periodos en los cuales la información de interés sea detectada. Este es el principio de los experimentos bidimensionales (2D), el cual fue propuesto por primera vez por Jeener¹⁸ en 1971.

La secuencia de pulsos de un experimento en 2D se divide en los siguientes bloques^{17,20}:

Preparación – evolución – mezclado – detección

Preparación: en su forma más simple consiste en un solo pulso que genera una magnetización transversal. En secuencias más complejas, se usa para generar otras coherencias tales como las cuánticas múltiples o puede establecer supresión del disolvente entre otras.

Evolución: tiempo (t_1) que se incrementa gradualmente. Para cada incremento en t_1 , se detecta un FID que depende de t_2 . Las frecuencias que evolucionan en t_1 generan señales que aparecen en la dimensión F1 del espectro final en 2D.

Mezclado: La coherencia es transferida de un espín a otro. Este periodo establece el tipo de correlación entre las dos dimensiones y como consecuencia la información en el espectro de RMN. Dependiendo del tipo de experimento, este periodo consiste de uno a más pulsos así como de uno o varios tiempos de espera.

Detección: el FID es detectado de forma convencional. Al final, la señal obtenida es una función de dos tiempos variables t_1 y t_2 .

El experimento en 2D más simple que existe es "Correlation Spectroscopy" o COSY, pero antes de analizar este experimento por producto de operadores se presenta cómo se espera la forma de la señal cuando ésta es modulada por las funciones seno o coseno.

2.7.1 Forma de la señal.

Al aplicar un pulso de 90° sobre el eje y a una magnetización en su estado basal se genera una magnetización sobre el eje x , la cual gira sobre el plano transversal. De ahí la aparición de una componente sobre el eje y . Los equipos de RMN detectan ambos componentes mediante un

proceso conocido como detección de cuadratura¹⁹ Si se asume que el decaimiento es exponencial con un tiempo constante T_2 , las señales $S_x(t)$ y $S_y(t)$ están definidas por las siguientes expresiones:

$$S_x(t) = A\cos(\Omega t)\exp(-t/T_2), S_y(t) = A\sin(\Omega t)\exp(-t/T_2) \quad [20]$$

donde A es un factor que da la intensidad absoluta de la señal.

Estas dos componentes se combinan en la computadora para dar una señal compleja en el dominio del tiempo; a la cual, tras aplicarle una transformada de Fourier compleja genera señales cuyas formas están en modo de absorción o dispersión (Figura 12)

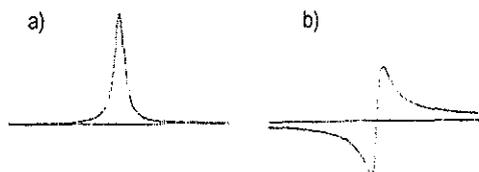


Figura 12 Forma de la señal en un espectro de RMN. a) señal en modo de absorción b) señal en modo de dispersión

La señal registrada es una mezcla de estas dos formas de línea. En RMN es común mostrar las señales del espectro en modo de absorción, las cuales corresponden a la parte real del sistema y están moduladas por funciones coseno. La parte imaginaria produce señales en forma de dispersión y están moduladas por funciones seno

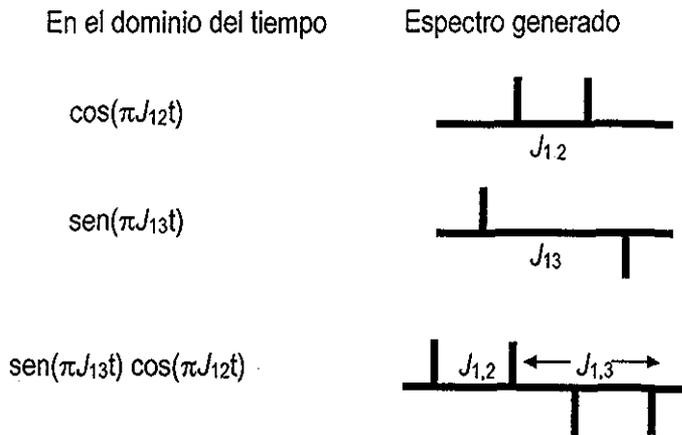
Cuando existe acoplamiento en el sistema de espines la señal se presenta de la siguiente forma (figura 13).



Figura 13 Formas de la señal en un espectro de RMN cuando existe acoplamiento a) señal en fase modo de absorción b) señal en fase en modo de dispersión c) señal en antifase en modo de absorción d) señal en antifase en modo de dispersión

La modulación de la señal en función del tiempo cuando hay acoplamiento ocurre exclusivamente por factores de amplitud de la forma $\cos(\pi Jt)$ y $\sin(\pi Jt)$ Cuando se tienen dos espines, la transformada de Fourier sobre frecuencias moduladas por $\cos(\pi Jt)$ genera un doblete en fase en modo de absorción, si se grafica la parte real, o en modo dispersivo si se grafica la parte imaginaria (Fig 13.a y 13.b). Si la señal está modulada por la función $\sin(\pi Jt)$, tras hacer la transformada de Fourier, se obtiene una señal en antifase en modo absorción o dispersión, dependiendo de la parte real o imaginaria graficada (figura 13.c y 13.d)

Con esta información se puede predecir la forma de la señal en un espectro de RMN. Por ejemplo:



2.7.2 Experimento COSY.

La parte más importante para obtener información estructural y útil del espectro mediante la espectroscopia en dos dimensiones es la transferencia de polarización de un espín a otro. Existen dos mecanismos por los cuales se logra: acoplamiento escalar (a través de los enlaces) y el acoplamiento dipolar (a través del espacio).

En muchos experimentos multidimensionales la transferencia de polarización se lleva a cabo a través de núcleos acoplados escalarmente, ésta se produce por la evolución del sistema de espines bajo una serie de pulsos de radiofrecuencia y tiempos de libre precesión, como es el caso del experimento COSY.

Este experimento es el más simple de todos los experimentos en 2D^{17,19,20} y su secuencia de pulsos se muestra en la figura 14:

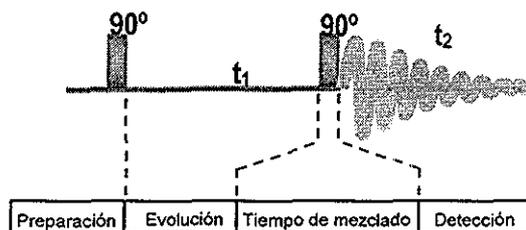
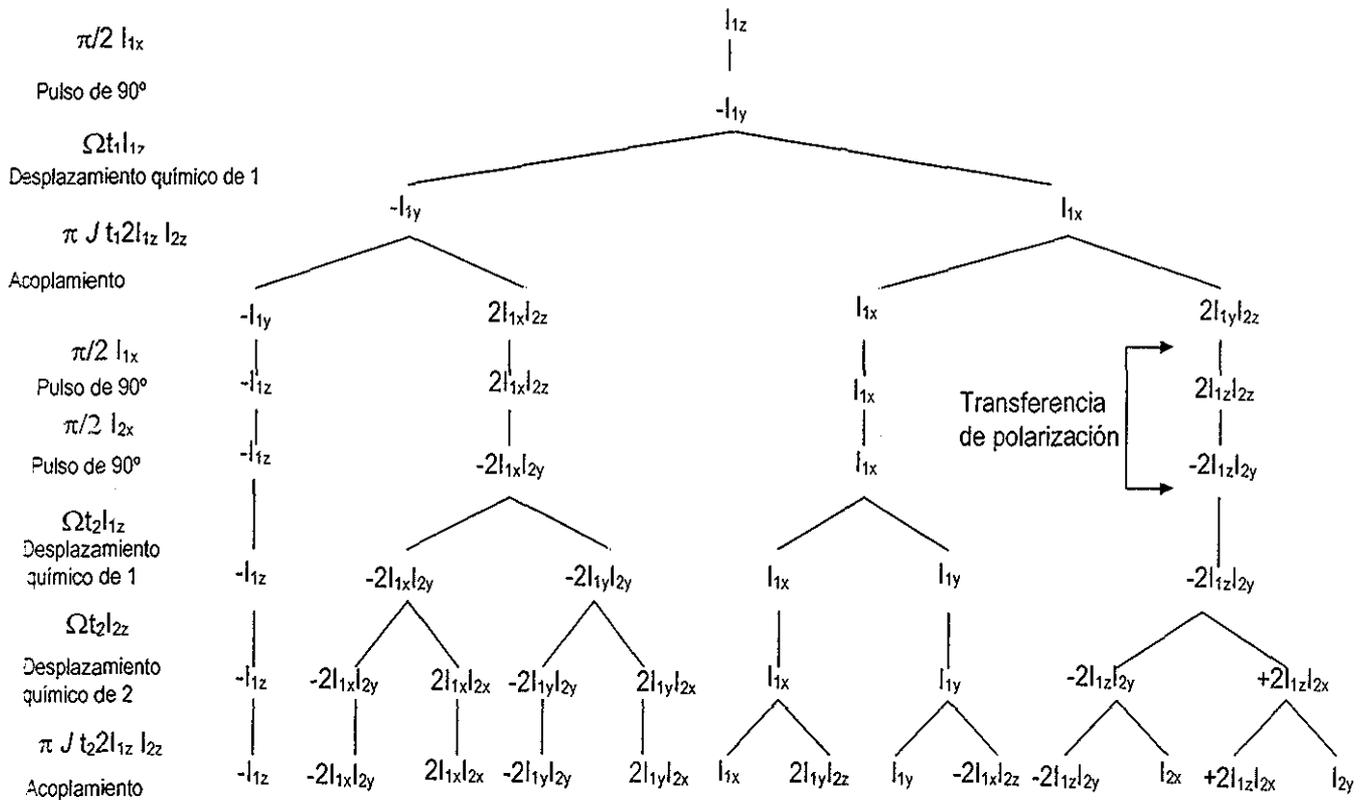


Figura 14 Secuencia de pulsos COSY (Correlation Spectroscopy). La secuencia consta sólo de dos pulsos de 90°, un tiempo variable o de evolución, t_1 , y un tiempo t_2 o de detección. Las señales detectadas indirectamente en t_1 generan la dimensión F1 del plano bidimensional y las señales en t_2 generan el plano F2. El intercambio de información entre los espines acoplados ocurre en el último pulso de 90°.

La evidencia del proceso de transferencia de polarización se presenta en las señales que se muestran en el espectro COSY fuera de la diagonal. La única forma de poder apreciar este paso es mediante el modelo de producto de operadores.

Su análisis se presenta a continuación considerando un sistema de dos espines y partiendo del espín 1.



Puesto que los únicos términos observables son los que se encuentran sobre el plano xy , solamente estos términos se representarán en su forma completa:

$$I_{1x} \text{ sen}(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J t_1) \cos(\Omega_1 t_2) \cos(\pi J t_2) \quad [21]$$

$$I_{2x} \text{ sen}(\Omega_1 t_1) \text{ sen}(\pi J t_1) \cos(\Omega_2 t_2) \text{ sen}(\pi J t_2) \quad [22]$$

$$I_{1y} \text{ sen}(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J t_1) \text{ sen}(\Omega_1 t_2) \cos(\pi J t_2) \quad [23]$$

$$I_{2y} \text{ sen}(\Omega_1 t_1) \text{ sen}(\pi J t_1) \text{ sen}(\Omega_2 t_2) \text{ sen}(\pi J t_2) \quad [24]$$

La evolución con respecto al acoplamiento genera términos en antifase (ver figura 6) tales como $2I_{1y}I_{2z}$ los cuales pueden conducir a una magnetización observable cuando evolucionan nuevamente con respecto al acoplamiento. El primer pulso genera una magnetización transversal que evoluciona en t_1 con respecto al acoplamiento y desplazamiento químico. Es en este tiempo t_1 donde aparecen los términos en antifase generados por el acoplamiento. La evolución del momento angular con respecto al acoplamiento genera términos en antifase (ver figura 6)

Cuando se aplica el segundo pulso de 90° , el operador $2I_{1y}I_{2z}$ se transforma en $-2I_{1z}I_{2y}$. Esto quiere decir que el componente transversal del espín 1 se transformó a uno longitudinal y la componente longitudinal del espín 2 pasó a ser transversal. La magnetización en antifase del espín 1 ha sido transferida a una magnetización en antifase del espín 2. Tal proceso se denomina transferencia de coherencia o de polarización y este es el punto más importante dentro de la secuencia de pulsos puesto que ocurre un intercambio de información entre los espines

involucrados En el diagrama de árbol se muestra en que paso de la secuencia de pulsos ocurre el fenómeno Posteriormente $-2I_{1z}I_{2y}$ evoluciona con respecto al desplazamiento químico y acoplamiento Este último genera un término observable para el espín 2 (I_{2x} ó I_{2y}) El análisis de la secuencia se inició partiendo del espín 1 y al final hay términos observables tanto para el espín 1 como para el espín 2; por lo tanto deben existir términos en antifase con el fin de transferir información de un espín a otro por esta técnica y éstos van a generar una coherencia en fase (I_{1x} o I_{1y}) cuando evolucionen con el acoplamiento

De los términos obtenidos del diagrama de árbol y expresados en su forma completa podemos observar que las modulaciones tanto en t_1 como en t_2 involucran desplazamiento químico y acoplamiento; de ahí, los términos [21] y [23] corresponden a las señales sobre la diagonal, puesto que tanto en t_1 como en t_2 están moduladas por el mismo desplazamiento químico (el del espín 1). Los términos [22] y [24] que corresponden al espín 2, tienen modulaciones en t_1 del desplazamiento del espín 1 y modulaciones del desplazamiento del espín 2 en t_2 Es decir, el espín 2 contiene información acerca de su desplazamiento químico y además del desplazamiento del núcleo al cual está acoplado, espín 1 Estos términos generan una señal fuera de la diagonal en el experimento COSY con coordenadas (Ω_1, Ω_2) Cuando se realiza la transformada de Fourier en t_2 se obtiene una dimensión F2 en la cual aparece el desplazamiento del espín 2 y cuando la misma operación se hace sobre t_1 , aparece una señal que correlaciona con el desplazamiento del espín 1 en la dimensión F1.

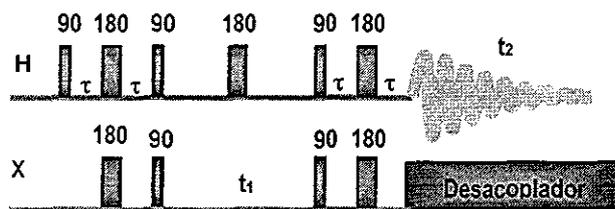
2.7.3 Experimento HSQC.

Los primeros experimentos de correlación heteronuclear basados en la observación directa de resonancias del núcleo X han sido reemplazados por experimentos cuya detección es sobre protón Estos experimentos llamados de detección indirecta o inversa incrementan de forma dramática la sensibilidad, debido a que la observación de un núcleo de gran sensibilidad es utilizado para monitorear los parámetros espectrales del núcleo X ²¹⁻²⁵

Este tipo de experimentos se basa en la detección del protón durante el tiempo t_2 (tiempo de detección), mientras que los desplazamientos químicos heteronucleares se detectan durante t_1 (tiempo de evolución) Con ello se elimina uno de los problemas más comunes en RMN, la baja sensibilidad para la detección de núcleos como ^{13}C y ^{15}N .

Esto quiere decir que es posible observar el desplazamiento químico de un núcleo cuya constante giromagnética es baja vía la observación del núcleo acoplado cuya constante giromagnética es alta, ganando con ello un incremento en la sensibilidad

Un ejemplo de este tipo de experimentos es el HSQC²⁶ (Heteronuclear Simple Quantum Correlation) La secuencia de pulsos de este experimento se muestra a continuación

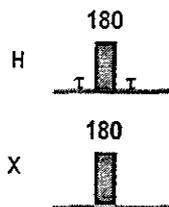


$$\tau = 1 / (4J)$$

Figura 15 Secuencia de pulsos HSQC. La secuencia consta de tres ecos de espín en donde el primero reenfoca el desplazamiento químico de ambos núcleos en los dos tiempos τ iniciales; el segundo elimina el acoplamiento y sólo prevalece el desplazamiento químico de X en t_1 y el último eco elimina nuevamente el desplazamiento de ambos núcleos y únicamente prevalece el acoplamiento en los 2 último tiempos τ . Los primeros 5 pulsos (antes de t_1) conforman un bloque INEPT²⁷ y es aquí donde se lleva a cabo la transferencia de la magnetización del protón al heteronúcleo al que se encuentra unido

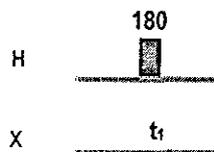
El análisis de esta secuencia mediante producto de operadores se simplifica de manera notable identificando los ecos de espín presentes en la misma. Por ejemplo, el primer eco que se observa es el que está después del primer pulso de 90° . Es un eco heteronuclear, es decir, cuenta con un pulso de 180° en ^1H y otro pulso de 180° en X, donde X para este caso es ^{13}C

Como se mencionó anteriormente un bloque del tipo:



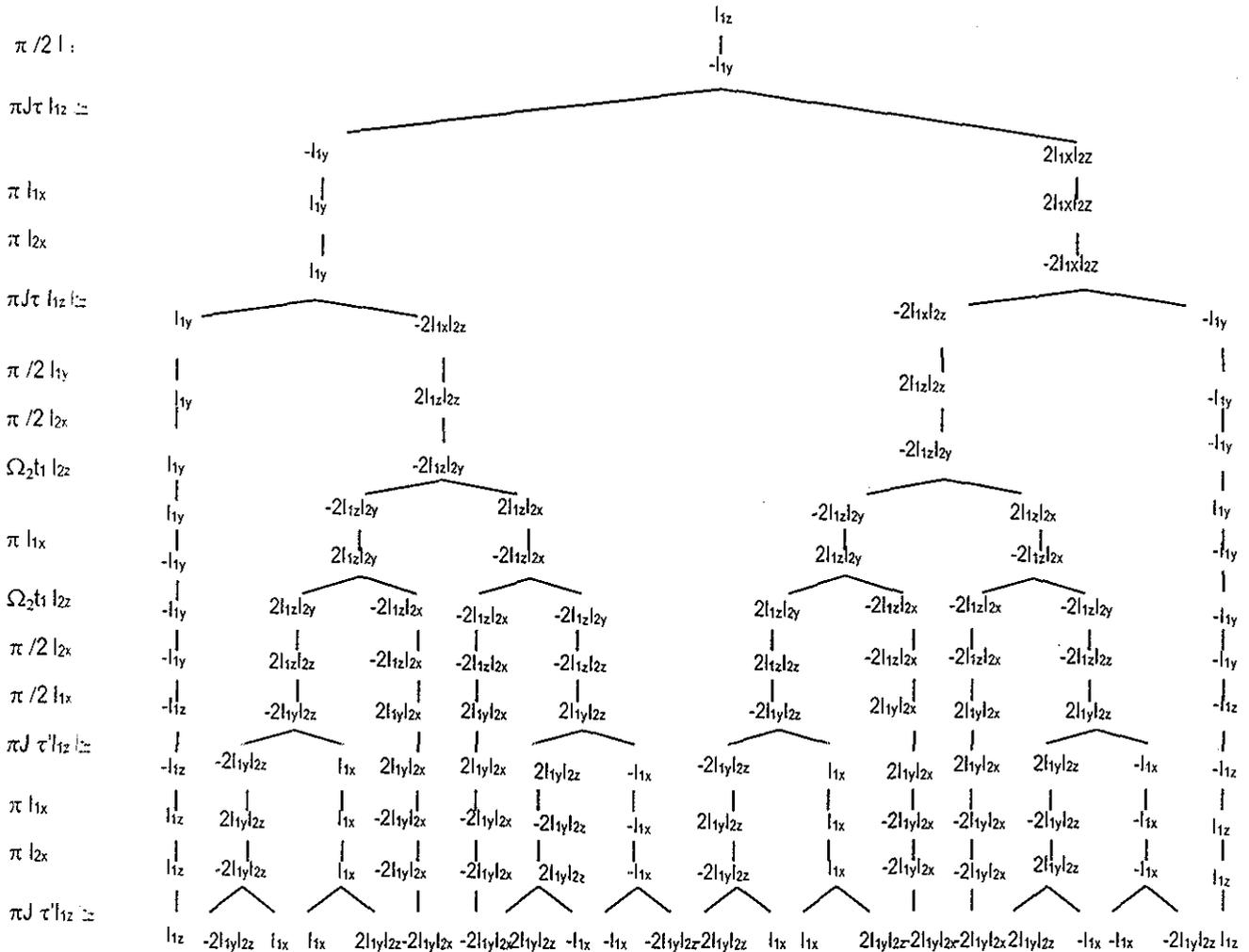
reenfoca el desplazamiento químico del espín 1 (^1H) y 2 (^{13}C) y los términos generados evolucionan sólo con la dependencia del acoplamiento. Esto implica que en los primeros dos tiempos τ , el único Hamiltoniano que afecta a la magnetización es el de acoplamiento

El siguiente eco que se observa en la secuencia es el que está dentro del tiempo t_1 , cuya estructura es:



Con este bloque se logra: reenfocar el acoplamiento, reenfocar el desplazamiento químico del espín 1 y sólo se manifiesta el efecto del desplazamiento del espín 2. Por lo tanto, en el tiempo t_1 el único Hamiltoniano que actúa sobre el momento angular es el del desplazamiento químico del espín 2

El último eco que se observa es el que está después de los dos últimos pulsos de 90° . Al igual que el primer eco observado, se trata de un eco heteronuclear y en analogía, en los dos últimos tiempos τ , ocurre un reenfoque de los desplazamientos de 1 y 2 y la magnetización en estos periodos sólo se ve afectada por el acoplamiento. El diagrama de árbol de la secuencia se muestra a continuación



Al final de la secuencia, los únicos términos observables son los que se encuentran alineados sobre el eje x. Estos términos expresados en su forma completa se expresan de la siguiente forma

$$\begin{aligned}
 & I_{1x} \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \\
 & I_{1x} \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \\
 & -I_{1x} \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \\
 & -I_{1x} \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \\
 & I_{1x} \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \\
 & I_{1x} \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \\
 & -I_{1x} \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J \tau) \sin(\pi J \tau) \\
 & -I_{1x} \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau) \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J \tau) \cos(\pi J \tau)
 \end{aligned}$$

Factorizando:

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_2 t_1) [\cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau) + \cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau) + \cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau) + \cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau)]$$

$$- I_{1x} \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_2 t_1) [\cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau) + \cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau) + \cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau) + \cos^2(\pi J \tau) \sin^2(\pi J \tau)]$$

Si $\tau = \frac{1}{4} J$

$$I_{1x} [\cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_2 t_1) - \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_2 t_1)]$$

$$I_{1x} [\cos^2(\Omega_2 t_1) - \sin^2(\Omega_2 t_1)]$$

$$I_{1x} \cos(2\Omega_2 t_1) = I_{1x} \cos(2\pi \Omega_2 t_1) = I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1)$$

Antes de la adquisición el resultado final es:

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) \quad [25]$$

Hasta este punto el espín 1 posee información, modulada en t_1 , del desplazamiento químico del espín 2. Posteriormente, durante el tiempo de adquisición (t_2), la magnetización evoluciona únicamente con respecto al desplazamiento de 1 ya que no existen términos que involucren al espín 2. El acoplamiento no se considera porque durante este tiempo está encendido el desacoplador sobre el núcleo de carbono. El resultado es:

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1)$$

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) I_{1x} \cos(\Omega_1 t_2) \quad I_{1y} \cos(\Omega_2 t_1) \sin(\Omega_1 t_2)$$

Si la detección es sobre el eje x

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_1 t_2) \quad [26]$$

La expresión [26] indica que la señal que va a generar el espín 1 está modulada por su propio desplazamiento químico en el tiempo t_2 , mientras que en t_1 es modulada por el desplazamiento del núcleo al cual se encuentra acoplado, espín 2. La señal de protón contiene información del núcleo de carbono al cual se encuentra unido. Con esto se ha demostrado el fundamento de los experimentos de detección indirecta, se registra la señal del núcleo más sensible y se obtiene información del núcleo menos sensible al cual está acoplado.

Cuando se realice la transformada de Fourier en t_2 y en t_1 , aparecerá una señal que correlaciona con el desplazamiento de protón y que al mismo tiempo correlaciona con el desplazamiento de carbono. Esta información es precisamente la que observamos en un espectro HSQC.

Hasta el momento el análisis por producto de operadores de las secuencias de pulsos nos ha permitido conocer cómo se encuentra la magnetización en cada punto de la secuencia de pulsos y cómo podemos manejar la información que queremos que se muestre en el espectro de RMN. Esto es de gran importancia si se pretende modificar o crear secuencias de pulsos.

2.8 Ciclación de fases.

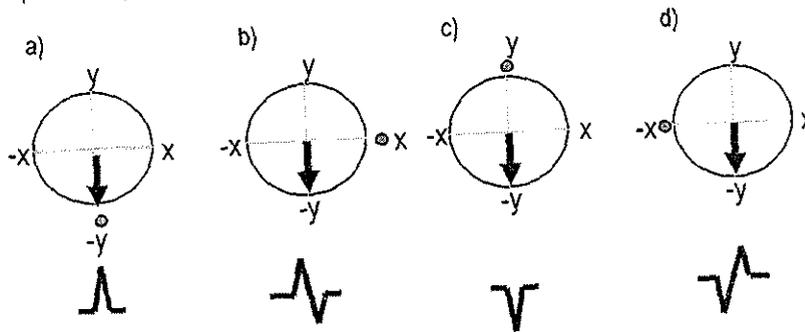
Los experimentos modernos en RMN consisten en la aplicación de múltiples pulsos de radiofrecuencia y la detección de la señal resultante. Esta señal es comúnmente referida como una magnetización transversal o coherencia cuántica simple, donde la palabra simple se usa para indicar el cambio del estado de espín de alfa a beta de un solo núcleo. Cabe mencionar que los diversos niveles de coherencia son generados por los pulsos de radiofrecuencia, pero sólo la coherencia cuántica simple es la que se puede detectar.

Por lo tanto, si un experimento consiste de varios pulsos y varios tiempos de espera fijos o variables, entonces varios niveles de coherencia se pueden generar en el transcurso de la secuencia y existir, al mismo tiempo, diferentes caminos de coherencia por los cuales el sistema de espín llega como resultado final a una coherencia simple cuántica. Si se pudieran registrar todas las coherencias que se manifiestan en la secuencia de pulsos, el espectro resultante sería muy complicado y difícil de interpretar.

Es por esta razón que métodos como la ciclación de fases o pulsos de gradientes se utilizan para dirigir una determinada coherencia a través de un camino específico durante la secuencia de pulsos y proporcionar, con ello, un espectro interpretable.

El término ciclación de fases se refiere al proceso de repetir varias veces una secuencia de pulsos con una variación sistemática de las fases relativas de los pulsos y del detector. El objetivo de este método es suprimir las señales que no son de interés al finalizar el ciclo, mientras que las señales que se desean se sumen. Esto es válido sólo cuando la fase de la señal es diferente a la de la señal que interfiere.^{17, 28-30}

Cuando se aplica un pulso sobre el eje x , y , $-x$, $-y$ se definirá una fase de 0° , 90° , 180° , 270° para ese pulso, respectivamente. La misma nomenclatura aplica para la fase del receptor. Un aspecto interesante es que, en función de la fase del receptor, se puede modificar la forma de la señal en el espectro, figura 16.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 16 Relación entre la fase del receptor y la magnetización. a) Si el detector tiene la misma fase que la magnetización o coherencia, se produce una señal en fase positiva, b) si se encuentra el detector 90° fuera de fase con respecto a la magnetización detectada, se produce una señal en dispersión, c) si el receptor y la magnetización tienen la misma fase pero con signo opuesto se produce una señal en fase negativa, d) si se encuentra el detector 90° fuera de fase con respecto a la magnetización detectada, pero con el mismo signo, se produce una señal en dispersión negativa.

Si la magnetización generada y el receptor tienen la misma fase se produce una señal de absorción, mientras que si alguna de ellas se encuentra desplazada 90° se produce una señal en dispersión. Por lo tanto, podemos modular la forma de la señal a nuestra conveniencia utilizando como alternativa la variación de la fase del receptor. Generalmente se desean señales en modo de

absorción, por lo tanto al plantear un ciclo de fases se debe considerar que la fase del receptor tenga la misma fase de la señal que se detecta

Si la fase del pulso inicial se incrementa 90° en cuatro pasos y la fase del receptor se mantiene constante se logra una cancelación de la señal, figura 17.

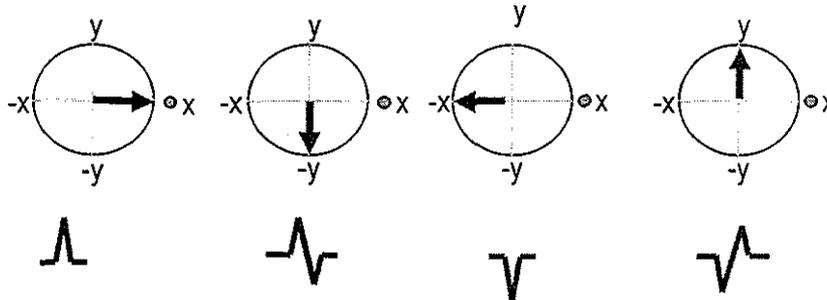


Figura 17. Cancelación de la señal por una alternancia de la fase sobre los pulsos de radiofrecuencia y manteniendo constante la fase del receptor

De esta forma se logra la eliminación de los artefactos presentes durante el tren de pulsos y se mantienen las señales de interés. Ciclaciones del tipo CYCLOPS y EXORCYCLE, formadas por cuatro pasos, son ejemplos de esquemas comúnmente usados para cancelar las imperfecciones presentes en las secuencias de pulsos.

A continuación se mencionan algunas de las reglas más importantes:

El cambio en el nivel de coherencia se lleva a cabo sólo a través de pulsos de radiofrecuencia y pueden ser positivos o negativos. Por lo tanto, una coherencia al equilibrio será transferida a alguna otra por el primer pulso y así por los siguientes pulsos hasta llegar al receptor.

La secuencia de niveles de coherencia que la señal adopta durante la secuencia de pulsos constituye el camino de coherencia. Una vez definido este camino se calculan las señales que son sumadas y las que son canceladas por la ciclación de fases

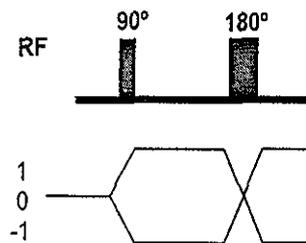


Figura 18. Representación del camino de coherencia. Los niveles de coherencia cambian por la aplicación de pulsos de radiofrecuencia. Un pulso inicial de 90° genera dos coherencias: $+1$ y -1 . Durante el tiempo de espera prevalecen estos niveles y un pulso de 180° invierte el signo de ambas coherencias. Por el método de ciclación de fases se detectan las coherencias $+1$ y -1

El espín en el equilibrio promueve una coherencia cuántica simple; por lo tanto, estas son las coherencias generadas por el primer pulso de radiofrecuencia y sólo las coherencias simples, $+1$ y -1 , son detectadas

Entre los problemas que presenta esta metodología se pueden mencionar: 1) existe la necesidad de completar un ciclo, lo cual establece ya un tiempo mínimo requerido para un experimento; 2) en experimentos bidimensionales o de mayor dimensión este tiempo mínimo puede ser demasiado largo, incluso más largo de lo que se necesitaría para alcanzar la relación señal-ruido deseada; 3) si existen señales intensas y la cancelación no es adecuada, se genera una señal conocida como ruido t_1 que es una cadena de ruido que corre paralelo a lo largo del eje de F1. En soluciones acuosas el ruido t_1 es muy intenso

Para resolver estos problemas se utilizan gradientes de campo

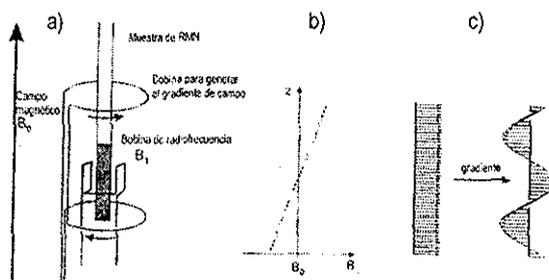
2.9 Gradiente de Pulso.

En los últimos años, el uso de gradientes de pulsos^{31 32} se ha ampliado en los experimentos de RMN. Al ser una técnica que permite seleccionar una coherencia en específico, esta metodología ha permitido sustituir los procedimientos de ciclación de fase³³⁻³⁶

Un gradiente de pulso es la inducción de un campo magnético (diferente al campo magnético, B_0 , al cual está sometido el sistema de espines) a lo largo de algunos de los ejes de referencia, con una fuerza y duración definida. En este caso, se considerará que el gradiente de pulso es aplicado sobre el eje z.

Como se sabe, cuando los espines están sometidos al campo principal B_0 , se guarda una homogeneidad magnética, ya que normalmente se considera B_0 constante. El pulso de gradiente tiene la función de hacer, de manera deliberada, que el campo magnético se vuelva no homogéneo por un pequeño periodo. En este tiempo de no homogeneidad de campo la magnetización transversal existente se desfasa a lo largo del eje z, es decir, se elimina o se pierde la magnetización. Esta magnetización se recupera por la aplicación de un segundo gradiente de pulso de signo opuesto.

Lo más importante de este proceso es que el desfase de la magnetización está en función del orden de coherencia y de la constante giromagnética del núcleo que está siendo afectado por el pulso de gradiente. Por ejemplo, una coherencia cuántica doble se desfasa 2 veces más rápido que una coherencia simple cuántica.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 19. Efecto del gradiente de pulso a) Disposición de la bobina que genera el gradiente de campo con respecto al campo B_0 y la muestra de RMN b) El gradiente de pulso tiene su efecto a lo largo del eje z c) Una magnetización transversal se desfasa tras aplicar un gradiente de pulso. Ésta se recupera por la aplicación de otro gradiente

En el proceso de desfase, la magnetización adquiere una dependencia espacial de la fase, la cual para cualquier punto en la muestra está dado por:

$$\phi(z) = \gamma B_g t \quad [27]$$

donde γ es la constante giromagnética del núcleo, B_g es la fuerza con la que es aplicado el gradiente (usualmente en unidades de gauss por centímetro, G/cm) y t es la duración del gradiente. Si ahora se considera el desfaseamiento de una coherencia específica y el caso en el cual la forma del pulso de gradientes sea diferente, la expresión anterior queda de la siguiente forma:

$$\phi = s p \gamma B_g t \quad [28]$$

donde s , se refiere a la forma del pulso y p a la coherencia seleccionada. Las formas de los pulsos de gradientes que se utilizarán a lo largo del documento serán rectangulares.

En el caso en que la coherencia a seleccionar involucre a núcleos diferentes, la ecuación anterior se establece de la siguiente forma:

$$\phi = s B_g t \sum p_i \gamma_i \quad [29]$$

2.9.1 Selección de la coherencia por medio de gradientes.

Supongamos que dentro de una secuencia de pulsos se aplican dos gradientes de pulsos

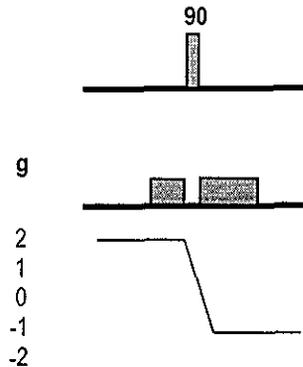


Figura 20 Selección de una coherencia de +2 a -1 mediante la aplicación de gradientes de pulsos. La representación gráfica por debajo de los pulsos aplicados se conoce como camino de transferencia de coherencia y especifica el tipo de magnetización o coherencia que está presente durante cada intervalo de la secuencia de pulsos. Cabe señalar que la representación es el camino ideal que se espera se lleve a cabo pero no necesariamente es el único que existe.

El primer gradiente tiene una dependencia espacial ϕ_1 y el segundo gradiente tiene una dependencia espacial ϕ_2 dados por:

$$\phi_1 = s_1 p_1 \gamma_1 B_{g1} t_1 \quad \phi_2 = s_2 p_2 \gamma_2 B_{g2} t_2$$

La fase total del sistema después del segundo gradiente es $\phi_1 + \phi_2$. La selección de una coherencia en particular se logra garantizando que la fase total del sistema sea igual a cero. Por lo tanto,

$$\phi_1 = -\phi_2$$

lo cual también se puede expresar de la siguiente forma:

$$\frac{-p_2}{p_1} = \frac{s_1 \gamma_1 B_{g1} t_1}{s_2 \gamma_2 B_{g2} t_2}$$

Siguiendo el ejemplo mostrado en la figura 20, se necesita seleccionar una coherencia que vaya de +2 (p_1) a -1 (p_2) mediante la aplicación de pulsos de gradientes. La forma de los pulsos es la misma en ambos casos, esto quiere decir que $s_1 = s_2$. El gradiente se aplica al mismo tipo de núcleo, entonces $\gamma_1 = \gamma_2$ y se considerará que la fuerza o potencia con la que son aplicados ambos gradientes son iguales, $B_{g1} = B_{g2}$. Estas consideraciones reducen la ecuación anterior a:

$$\frac{-p_2}{p_1} = \frac{t_1}{t_2}$$

Sustituyendo p_1 y p_2 :

$$\frac{1}{2} = \frac{t_1}{t_2}$$

Esto implica que:

$$t_2 = 2t_1$$

Haciendo que el segundo pulso de gradiente tenga una duración del doble con respecto a la duración del primer gradiente, se logrará seleccionar específicamente una coherencia que vaya de orden +2 a una de orden -1. Cuando $t_2 = 2t_1$ se puede comprobar que $\phi_1 + \phi_2 = 0$

Mediante esta forma se pueden escoger diferentes coherencias durante la secuencia de pulsos, lo cual implica que podemos usar varios pulsos de gradientes para llevar al sistema de espines por las coherencias que deseamos tener al momento de realizar la detección del sistema. Varios experimentos emplean los pulsos de gradientes para lograr dicho objetivo.

Entre las ventajas que se pueden mencionar por el uso de gradientes de campo tenemos:

Los pulsos de gradientes son introducidos en la secuencia de pulsos de tal manera que sólo las señales de interés sean observadas. No hay sustracción de las señales no deseadas, por lo tanto, el nivel de ruido de t_1 será mucho menor. Esto es muy evidente en espectros en dos dimensiones donde por una mala sustracción de señales (que es frecuente en procedimientos con ciclación de fases) se sufre de este artefacto (ruido t_1). Se requiere un número determinado de repeticiones en el experimento de tal manera que la duración del mismo está en función de la proporción señal ruido y no por la necesidad de completar un ciclo. La velocidad con respecto a ciclación de fases es de aproximadamente 5 veces ³⁷

3.0 Justificación.

La espectroscopia en dos dimensiones ha demostrado que es uno de los desarrollos más importantes en la RMN de alta resolución. Sin embargo, para moléculas mucho más complejas, aun aumentando la resolución en espectros bidimensionales, estos experimentos se vuelven insuficientes para lograr una asignación total. Por esta razón, se deben buscar alternativas que den solución a estas limitantes. Una de ellas, es incrementar el número dimensional de frecuencias en el espectro.

Este trabajo aborda algunas secuencias y bloques de pulsos mediante el modelo de producto de operadores, dando la pauta para poder analizar cualquier secuencia de pulsos que se desee. Apoyados en este modelo, se propone una secuencia de pulsos en tres dimensiones, la cual va dirigida a sistemas complejos en los cuales la sobreposición de señales se vuelve un problema para lograr la determinación estructural.

4.0 Objetivo

Implementar una secuencia de pulsos en tres dimensiones que tenga información sobre interacciones carbono–protón–protón. Para ello se establecen los siguientes objetivos particulares:

- a) Establecer la secuencia de pulsos que permita obtener la información deseada
- b) Realizar el análisis de esta secuencia mediante el modelo de producto de operadores.
- c) Implementar la secuencia en el equipo de resonancia magnética nuclear
- d) Optimizar la secuencia de pulsos para eliminar las señales que no son de interés en el espectro de RMN.
- e) Comparar los espectros obtenidos por el uso de ciclación de fases y por el uso de gradientes de pulsos

5.0 Resultados y Discusión.

5.1. Desarrollo teórico.

5.1.1 Planteamiento de la secuencia de pulsos.

Los principios y fundamentos de la RMN en 2D son extendidos a experimentos de mayor dimensión; los cuales son construidos por la combinación de experimentos bidimensionales. Dos experimentos bidimensionales combinados generan un experimento en 3D el cual puede tener transferencias de magnetización debidas a acoplamiento dipolares y escalares en la misma secuencia.^{20,38-41} La construcción de un experimento en 3D se muestra en la figura 21.

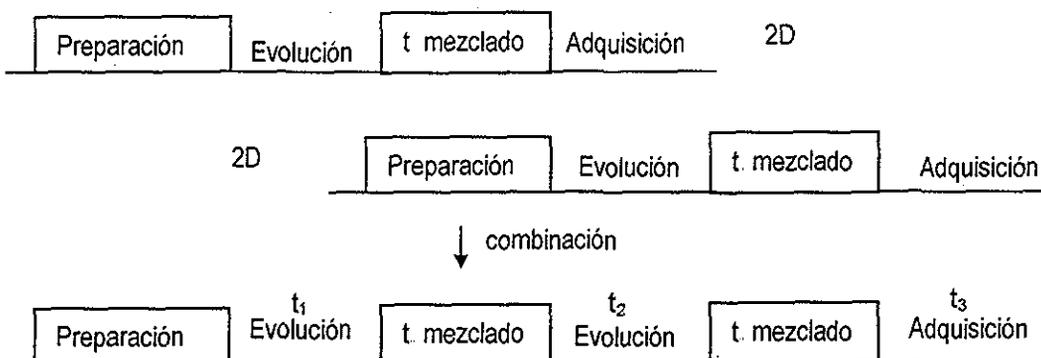


Figura 21 Construcción de un experimento en tres dimensiones. La combinación de dos experimentos bidimensionales permite tener tres tiempos variables, los cuales son necesarios para generar las dimensiones que se requieren; en los tiempos de mezclado se lleva a cabo el intercambio de información que se desea para cada dimensión

En los experimentos en 3D, la señal se registra de forma convencional durante el tiempo de adquisición, t_3 , como una función de los tiempos de evolución variables t_1 y t_2 . Estos tiempos variables se incrementan de forma independiente y así se genera un espectro en 3D en el dominio del tiempo que, tras aplicar tres transformadas de Fourier, se obtienen las dimensiones definidas como F_1 , F_2 y F_3 . El espectro se puede representar como un cubo, pero se prefiere hacer el análisis tomando planos bidimensionales del cubo tridimensional, tal y como se muestra en la figura 22.

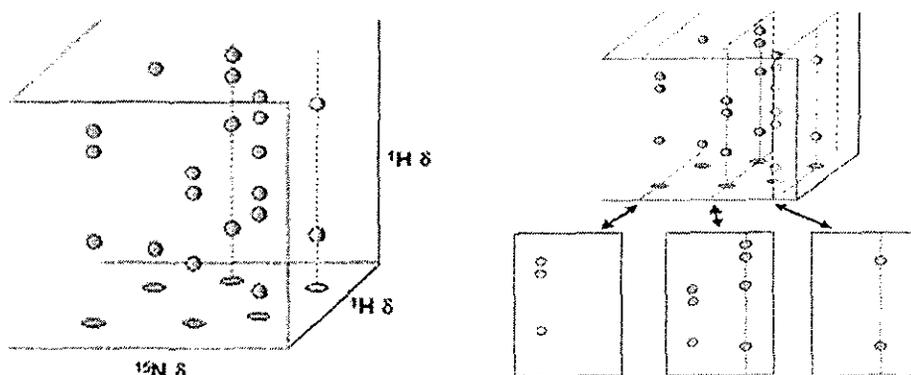
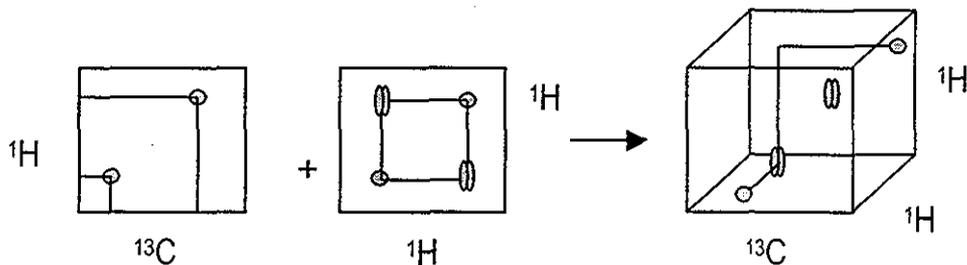


Figura 22 Representación de un espectro en 3D y la obtención de planos en 2D a partir del cubo. Es común mostrar los planos en dos dimensiones extraídos del cubo en tres dimensiones

Ya que sería un poco más explícito generar un espectro con interacciones carbono–protón–protón, se partirá de dos secuencias de pulsos en 2D de las cuales una genera interacciones carbono–protón y la otra interacciones protón–protón.



Estas secuencias de pulsos corresponden a los experimentos HSQC (se utilizará esta secuencia para aprovechar las ventajas de la detección indirecta) y al experimento COSY. Por lo tanto, la secuencia de pulsos propuesta es la siguiente:

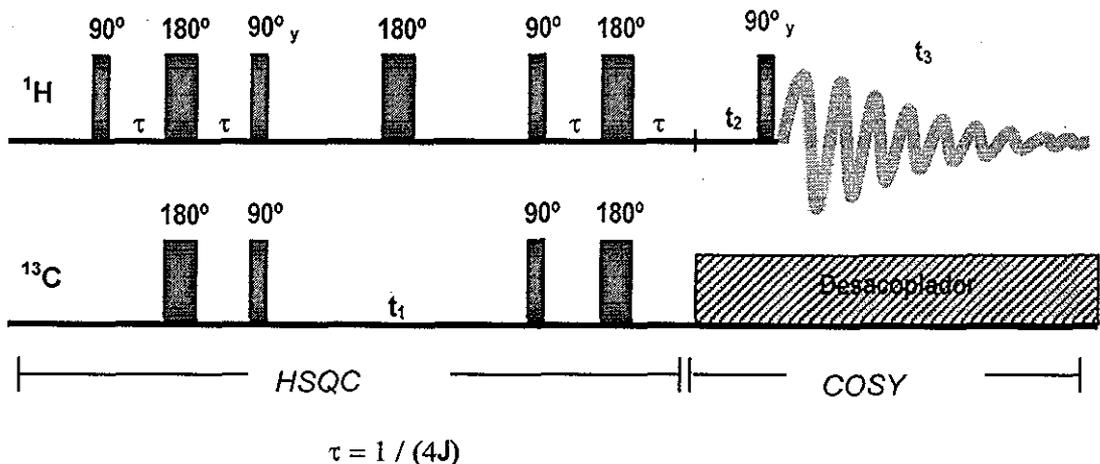


Figura 23 Secuencia de pulsos en 3D que genera una correlación ^{13}C – ^1H – ^1H . El experimento HSQC proporciona la información debida a la correlación ^1H – ^{13}C , mientras que el COSY proporciona la información de la interacción ^1H – ^1H

Como antecedentes a esta secuencia de pulsos se tiene el HMQC-COSY⁴²⁻⁴³ donde se demuestra el uso de la técnica en 3D para la solución de espectros con señales superpuestas. La propuesta en este trabajo es utilizar la secuencia de pulsos HSQC en lugar de MC e introducir el uso de gradientes de pulsos.

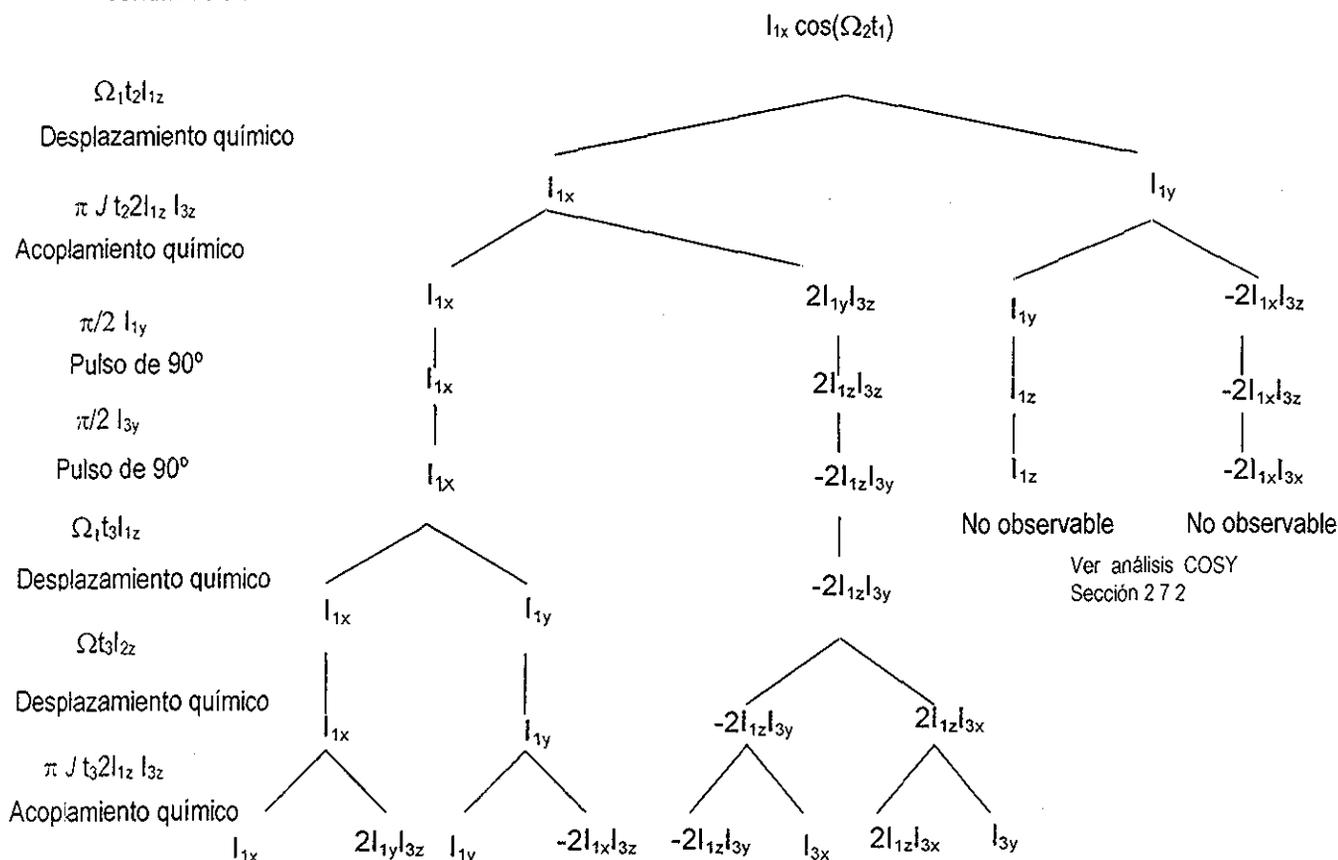
5.1.2 Análisis de la secuencia de pulsos por producto de operadores.

En la secuencia propuesta el primer experimento que conforma la secuencia es el HSQC, por lo tanto, para fines de simplificación y obtener el diagrama de árbol más simple se tomará el resultado obtenido por producto de operadores del HSQC, antes del tiempo de adquisición (expresión [25]) que es el mismo resultado que se espera para esta secuencia hasta antes del tiempo t_2 y se comenzará el análisis, justo al inicio del tiempo t_2 para esta nueva secuencia. El resultado obtenido es:

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hasta este momento (antes del tiempo t_2 en la secuencia de la figura 23) la secuencia ha generado una magnetización de protón que contiene información del desplazamiento del ^{13}C al cual está unido. A partir de este punto se considerará la evolución de esta magnetización con respecto al acoplamiento y desplazamiento químico en t_2 y t_3 , pero sólo del ^1H , puesto que partir de t_2 no existen magnetizaciones que estén relacionadas con el núcleo de carbono. El último pulso de 90° producirá la transferencia de polarización entre los protones y con ello la información debida a la interacción ^1H - ^1H . Los espines involucrados en la secuencia de pulsos son ^1H , ^{13}C y ^1H a los cuales se denominarán espín 1, 2 y 3 respectivamente. Los espines 1 y 2, sólo interactúan en el primer bloque de la secuencia (que es la que corresponde al experimento HSQC), posteriormente, en el segundo bloque de la secuencia (experimento COSY) sólo interactúan los espines 1 y 3. En el bloque COSY ya no se ve afectado el espín 2, puesto que no se aplican más pulsos sobre el mismo y se elimina el acoplamiento 1 con 2 manteniendo encendido el desacoplador. Como ya se sabe, el resultado de la interacción del espín 1 con 2 es $I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1)$, por lo tanto, el diagrama de árbol mostrado a continuación se basa solamente en el comportamiento del espín 1 con 3, llevando consigo la información obtenida de la interacción del espín 1 con 2. El diagrama de árbol se muestra a continuación.



Expresando los términos observables en su forma completa:

$$I_{1y} \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_1 t_2) \cos(\pi J t_2) \sin(\Omega_1 t_3) \cos(\pi J t_3) \quad [30]$$

$$I_{3y} \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_1 t_2) \sin(\pi J t_2) \sin(\Omega_3 t_3) \sin(\pi J t_3) \quad [31]$$

$$I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_1 t_2) \cos(\pi J t_2) \cos(\Omega_1 t_3) \cos(\pi J t_3) \quad [32]$$

$$I_{3x} \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\Omega_1 t_2) \sin(\pi J t_2) \cos(\Omega_3 t_3) \sin(\pi J t_3) \quad [33]$$

De lo anterior podemos mencionar lo siguiente: cualquier protón detectado en el tiempo de adquisición tendrá una correlación con el desplazamiento químico del carbono al cual se encuentra unido, puesto que todos tienen la función $\cos(\Omega_2 t_1)$. Habrá protones que están modulados por su propio desplazamiento químico, [30] y [32], tanto en t_2 como en t_3 (estos corresponden a las señales sobre la diagonal en un experimento COSY) y habrá protones que mostrarán señales en su desplazamiento químico y además en el desplazamiento del protón al cual se encuentran acoplados. Ejemplos de ellos se muestran en las relaciones [31] y [33], ya que estos protones están modulados por su desplazamiento en t_3 y por el desplazamiento del protón vecino en t_2 . Al realizar la transformada de Fourier de [31] y [33] sobre t_3 el espín 3 (protón) va a generar una señal ubicada en su propio desplazamiento químico en la dimensión F3; la transformación en t_2 , va a generar otra señal en la dimensión F2, pero ahora en el desplazamiento del espín 1 (protón al cual se encuentra acoplado). Por último cuando se transforme t_1 va a aparecer en F1 la señal del espín 3 en el desplazamiento químico del espín 2 (carbono al cual se encuentra unido).

El análisis por producto de operadores demuestra que la secuencia de pulsos propuesta produce la información que se desea, interacciones carbono-protón-protón.

5.1.3 Optimización de la secuencia de pulsos.

Hasta el momento se ha considerado que los pulsos aplicados generan específicamente la información que se desea obtener. Sin embargo, un pulso de radiofrecuencia causa una amplia gama de coherencias. Una coherencia se puede visualizar como una magnetización transversal debida a transiciones simples y ésta es transferida a uno o más diferentes órdenes de coherencia, provocando con ello que se manifieste una diversidad de señales (entre ellas las de interés) que generalmente son interferencias.

Las señales que nos interesan siguen un camino de coherencia específico hasta el receptor y este camino se representa en un diagrama de niveles de coherencia. Cualquier otra señal que llegue al receptor por una ruta diferente se denomina artefacto o señal de interferencia.¹⁸

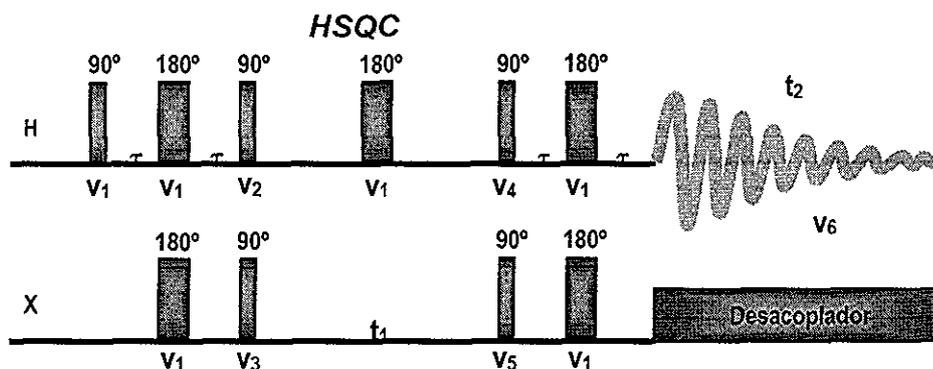
Esto lleva a la necesidad de utilizar métodos que permitan la elección de una coherencia entre varias posibles para garantizar al término de la secuencia de pulsos la información deseada. Un método para lograr lo anterior es la ciclación de fases.

Por lo tanto, a la secuencia de pulsos propuesta (HSQC-COSY) es necesario establecerle una ciclación de fases adecuada que permita su optimización. Cada pulso y el receptor tendrán una fase definida que irá cambiando (si es necesario) hasta completar un ciclo.

Esta secuencia de pulsos es resultado de la combinación de dos experimentos bidimensionales, HSQC y COSY, así que se analizó cada una de estas secuencias con sus respectivas ciclaciones de fases.

5.1.3.1 Ciclación de Fase del experimento HSQC.

Para el experimento HSQC tenemos lo siguiente:



Fases de Ciclos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
V ₁	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
V ₂	y	y	-y	-y	y	y	-y	-y	y	y	-y	-y	y	y	-y	-y
V ₃	x	-x	x	-x	x	-x	x	-x	x	-x	x	-x	x	-x	x	-x
V ₄	x	x	x	x	-x	-x	-x	-x	x	x	x	x	-x	-x	-x	-x
V ₅	x	x	x	x	x	x	x	x	-x							
V ₆	x	-x	-x	x	-x	x	x	-x	-x	x	x	-x	x	-x	-x	x

Figura 24 Ciclación de fases de la secuencia de pulsos HSQC. Con esta ciclación se eliminan los principales artefactos presentes en el HSQC, señales debidas a ¹H-¹²C y sólo prevalecen las señales ¹H-¹³C

Esta secuencia cuenta con una ciclación de fases de 16 pasos. En la tabla de la figura 24 se muestra la fase de cada pulso y del receptor para cada ciclo. El análisis del HSQC que se realizó anteriormente correspondió al primer ciclo y ese mismo procedimiento se tendría que hacer para cada ciclo, es decir, 15 veces más con las respectivas fases en los pulsos y el receptor, para saber cuales son los términos generados. Puesto que el desarrollo resulta ser laborioso, el análisis de esta secuencia de pulsos con su respectiva ciclación de fases se realizó mediante un programa implementado en *Mathematica* (software de programación) llamado POMA (product operator formalism in Mathematica),⁴⁴ el cual proporciona resultados acerca del comportamiento de espines débilmente acoplados bajo la influencia de pulsos selectivos, no selectivos, ciclación de fase y precesión en los tiempos de evolución. Cabe señalar que el manejo de las secuencias de pulsos mediante el diagrama de árbol permite visualizar y comprender mejor el programa POMA.

A continuación se muestra el formato utilizado para el análisis de la secuencia de pulsos HSQC así como el resultado final utilizando el programa POMA:

```

In:=
spin[1,z]//
pulse[90,{x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x},{1}]//
delay[t1,{1,2}]//
pulse[180,{x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x},{1}]//
pulse[180,{x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x},{2}]//
delay[t1,{1,2}]//
pulse[90,{y,y,-y,-y,y,y,-y,-y,y,y,-y,-y,y,y,-y,-y},{1}]//
pulse[90,{x,-x,x,-x,x,-x,x,-x,x,-x,x,-x,x,-x,x,-x},{2}]//
delay[t1,{1,2}]//

```

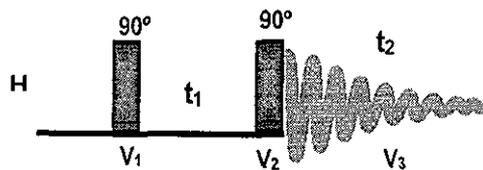
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\begin{array}{ll}
 -I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) & -I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) \\
 +I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) & +I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) \\
 -I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1) & -I_{1x} \cos(\Omega_2 t_1)
 \end{array}$$

Hasta este punto hemos obtenido los términos que genera el HSQC en la secuencia HSQC-COSY, posteriormente sigue un tiempo variable t_2 y un último pulso de 90° que en conjunto conforman la secuencia de pulsos COSY.

5.1.3.2 Ciclación de Fase del experimento COSY.

El análisis del experimento COSY mediante POMA se muestra a continuación



Ciclos Fase	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
V ₁	x	x	x	x	y	y	y	y	-x	-x	-x	-x	-y	-y	-y	-y
V ₂	x	y	-x	y	y	-x	-y	x	-x	-y	x	y	-y	x	y	x
V ₃	x	-x	x	-x	y	-y	y	-y	x	-x	x	-x	-y	y	-y	y

Figura 25. Ciclación de fases de la secuencia de pulsos COSY. Con esta ciclación se eliminan los artefactos debidos a los procesos de relajación presentes en el COSY

Esta secuencia también cuenta con una ciclación de 16 pasos

El formato y resultado utilizado en el programa POMA para la secuencia COSY se muestra a continuación:

In:=

```

spin[1,z]//
pulse[90,{x,x,x,x,y,y,y,-x,-x,-x,-x,-y,-y,-y,-y}]//
delay[t1,{{1,2}}]//
pulse[90,{x,y,-x,-y,y,-x,-y,x,-x,-y,x,y,-y,x,y,-x},{1}]//
pulse[90,{x,y,-x,-y,y,-x,-y,x,-x,-y,x,y,-y,x,y,-x},{2}]//
delay[t2,{{1,2}}]//
receiver[{x,-x,x,-x,y,-y,y,-y,-x,x,-x,x,-y,y,-y,y}]//
observable[{{1,2}}]//Simplify//sort

```

Out:=

$$\begin{array}{l}
 1/2 \text{ sen}(\Omega_1 t_1 - \Omega_2 t_2) \cos(\pi J_{1,2} t_1) \cos(\pi J_{1,2} t_2) I_{1x} \\
 1/2 \cos(\Omega_1 t_1 - \Omega_2 t_2) \cos(\pi J_{1,2} t_1) \cos(\pi J_{1,2} t_2) I_{1y} \\
 1/2 \text{ sen}(\Omega_1 t_1 - \Omega_2 t_2) \text{ sen}(\pi J_{1,2} t_1) \text{ sen}(\pi J_{1,2} t_2) I_{2x}
 \end{array}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$1/2 \cos(\Omega_1 t_1 - \Omega_2 t_2) \sin(\pi J_{1,2} t_1) \sin(\pi J_{1,2} t_2) I_{2y}$$

La eliminación de artefactos del COSY se aprecia de forma evidente en la figura 26:

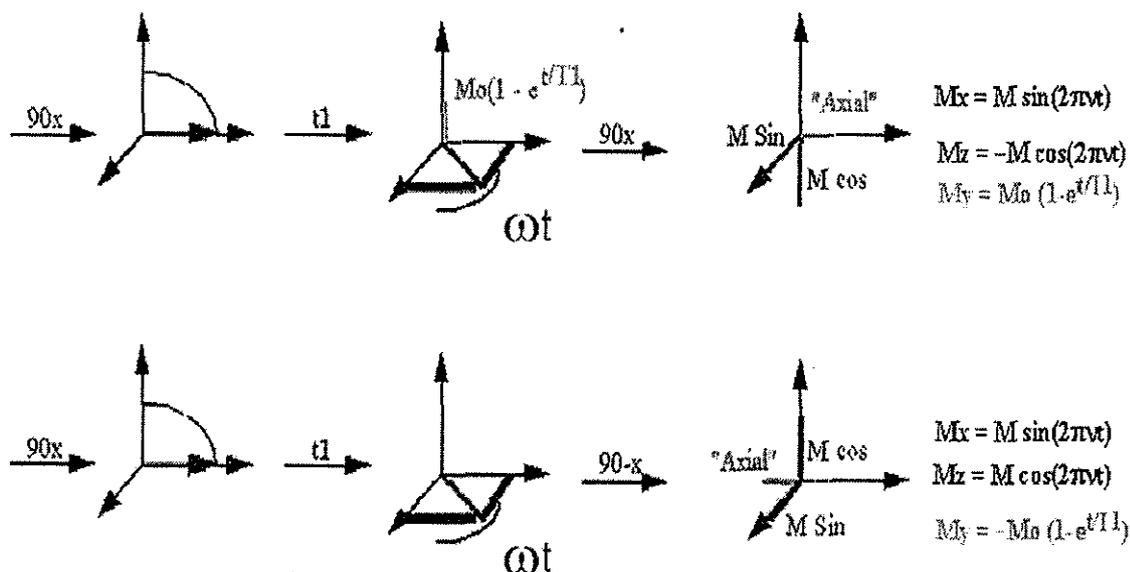


Figura 26 Eliminación de artefactos en el experimento COSY. La repetición de dos ciclos con cambio de fase en el último pulso de 90° elimina picos axiales los cuales son los principales artefactos en este experimento

El primer pulso sobre el eje x en el COSY produce una magnetización transversal. En el tiempo t_1 la magnetización comienza a precesar generando componentes en *plano xy* y al mismo tiempo se comienza a regenerar una magnetización sobre el eje z debido al relajamiento transversal del espín. El último pulso rota 90° los vectores generados en el plano xy , los cuales contienen la información deseada y, al mismo tiempo, genera una magnetización sobre el eje y , resultado de la componente que se encontraba en el eje z . Este último componente no posee información de interés, es una señal producida por fenómenos de relajación que se volvió observable por la aplicación del último pulso. Estas señales se conocen como picos axiales dentro del espectro. Para eliminar esta señal, basta con cambiar la fase del último pulso, ahora aplicándolo sobre el eje $-x$. Se repite nuevamente la secuencia, pero ahora el último pulso de 90° rota la magnetización en z hacia el eje $-y$. Cuando se sumen los resultados obtenidos, las señales axiales se eliminarán ya que en el primer ciclo se tiene una componente sobre el eje y y en el segundo ciclo una componente sobre el eje $-y$. Las señales que no interesan se cancelan mientras que las que contienen la información deseada se suman.

5.1.3.3 Ciclación de Fase del experimento HSQC-COSY.

Si en la secuencia HSQC-COSY se establece la ciclación de fase del HSQC se tiene hasta antes del tiempo t_2 16 términos alineados sobre el eje x con signo positivo y negativo de forma alternada. Esto implica que la fase del receptor debe estar sobre el eje x y tener como fase $+x$, $-x$, $+x$, $-x$, etc para que se sumen todos los componentes y con ello eliminar los artefactos debidos al HSQC

En el COSY lo que se tiene que hacer es eliminar los picos axiales y esto se logra teniendo en el último pulso de 90° la siguiente fase: x , y , $-x$, $-y$, con una fase de receptor: x , $-x$, x , $-x$ La

demonstración de la cancelación de los picos axiales se aprecia de mejor manera apoyados en el modelo vectorial. Supongamos que tenemos la magnetización en z justo antes del último pulso de 90°, recuérdese que esta magnetización es la que genera los artefactos en el COSY. Aplicando a esta magnetización el pulso de 90° en x, y, -x, -y, con el receptor en: x, -x, x, -x, tenemos:

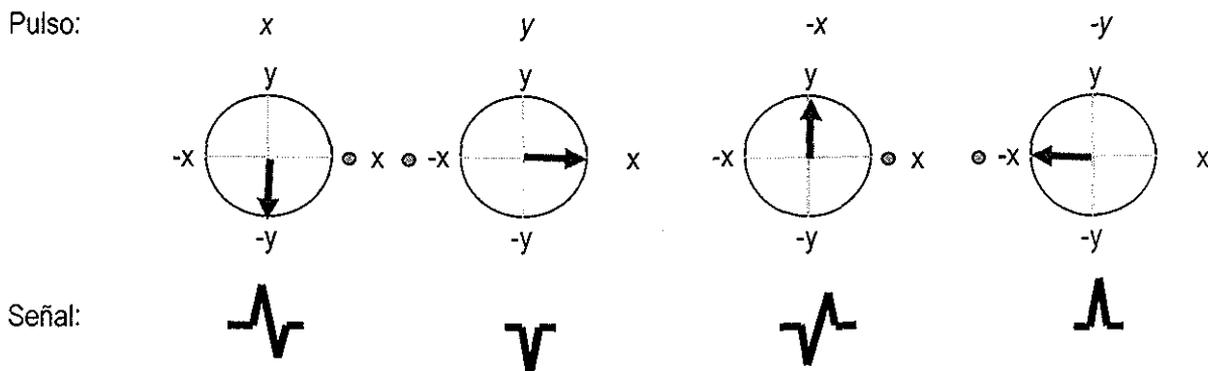


Figura 27 Eliminación de artefactos por cambios en la fase del pulso y del receptor. Si la magnetización y el receptor tienen la misma fase generan una señal de absorción, mientras que si alguna de ellas se encuentra desplazada 90° se tiene una señal en dispersión. La suma de estos 4 eventos elimina la señal.

Las señales debidas a la magnetización en z se cancelan cuando se detectan después de cuatro ciclos. La ventaja que se tiene es que, al ser la fase del receptor x, -x, se suman los términos provenientes del HSQC (y con ello se cancelan los artefactos del HSQC) y se cancelan los artefactos debidos al COSY. Por lo tanto la secuencia queda establecida de la siguiente manera:

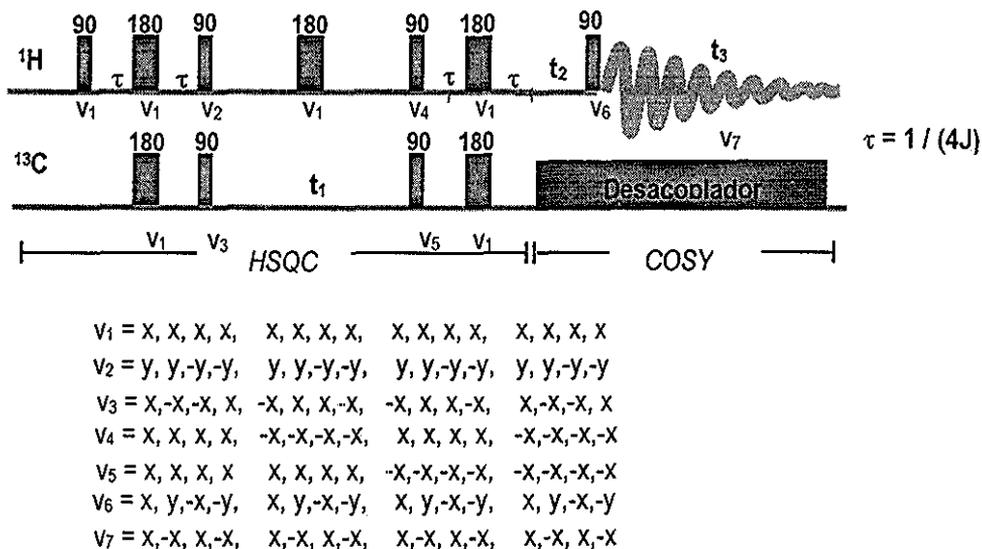


Figura 28 Ciclación de fase de la secuencia HSQC-COSY

La secuencia se implementó en un equipo de 11.74 Teslas, Varian Unity Plus, detección indirecta con la capacidad de observar 3 núcleos. Los espectros obtenidos se muestran a continuación:

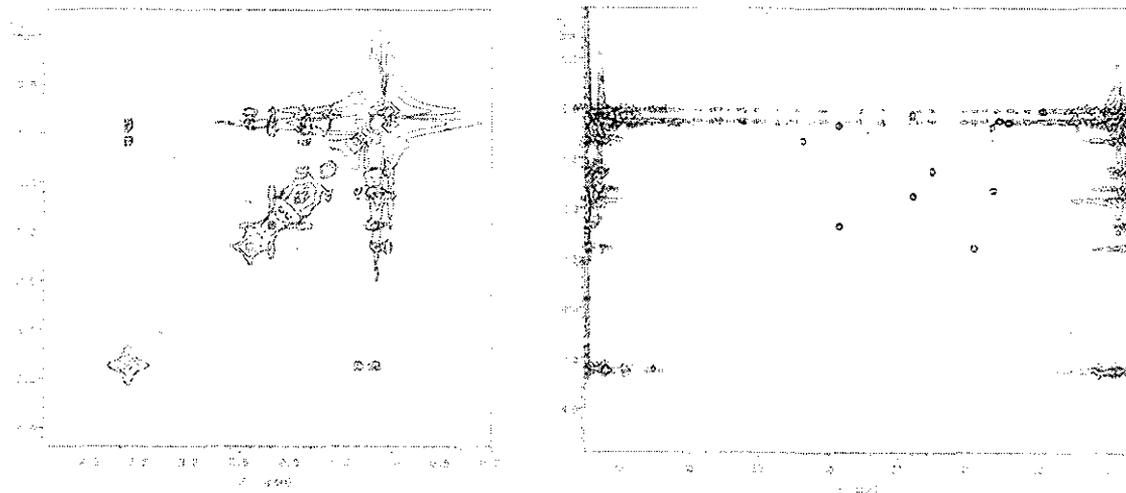


Figura 29. Espectros bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia propuesta. Ambos espectros se obtuvieron con la misma secuencia de pulsos cambiando solamente los tiempos variables t_1 (mientras que todo el tiempo $t_2=1$) para obtener el HSQC y t_2 (haciendo que todo el tiempo $t_1=1$) para obtener el espectro COSY. Del lado izquierdo se muestra el espectro COSY y del lado derecho el espectro HSQC. La muestra utilizada fue el mentol, (1 α , 2 β , 5 α)-5-Metil-2-(1-metiletil)ciclohexanol.

Con la misma secuencia de pulsos se obtienen dos espectros diferentes, correlaciones homonucleares (experimento COSY) y correlaciones heteronucleares (experimento HSQC) variando exclusivamente los tiempos t_2 y t_1 respectivamente dentro de la secuencia de pulsos. Esto significa que la manipulación de los espines del sistema se está haciendo de manera correcta, puesto que a pesar de introducir 10 pulsos antes del último pulso de 90° que genera el COSY, se obtienen correlaciones homonucleares y adicionar un tiempo t_2 y un pulso más de 90° al HSQC se siguen observando correlaciones heteronucleares.

Sin embargo, en ambos espectros se observan artefactos. Esto quiere decir que, la ciclación de fase propuesta, aún no permite eliminar las señales espurias. Se requiere incrementar la ciclación de fase. El uso de este método para la eliminación de artefactos hace que el tiempo total del experimento esté determinado por la necesidad de completar un ciclo de fases. Esto se vuelve un problema en experimentos bidimensionales, en donde se requieren varios incrementos y más aún en un experimento en 3D. Por lo tanto, el siguiente paso a considerar para la cancelación de estas señales es el uso de gradientes de pulsos.

5.1.3.4 Uso de gradientes en el experimento HSQC-COSY.

La introducción de gradientes de pulsos en las secuencias ha permitido optimizar la detección,⁴⁵⁻⁴⁹ eliminar problemas como ruido debido a t_1 ⁴⁸⁻⁵¹ mejorar la supresión del disolvente y eliminar artefactos espectrales, además de facilitar la observación de interacciones débiles a varios enlaces de distancia.⁵² Los principales artefactos presentes en el experimento HSQC-COSY son los debidos a los protones unidos a carbono-12 y los picos axiales debidos a la relajación de la magnetización, por lo que la posición de los pulsos de gradientes dentro de la secuencia de pulsos debe garantizar la eliminación de estas señales (figura 30)

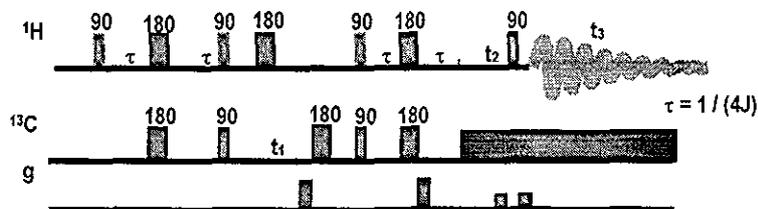


Figura 30 Aplicación de gradientes a la secuencia HSQC-COSY. El primer gradiente desfasa la magnetización de ^1H - ^{13}C mientras que el segundo la reenfoca; el tercer gradiente desfasa la magnetización ^1H - ^{13}C - ^1H y el último gradiente la reenfoca.

Para lograr la eliminación de las señales ^1H - ^{12}C , se aplica el primer gradiente cuando la magnetización transversal se encuentra sobre el núcleo de carbono-13 (el gradiente sólo afecta a magnetizaciones transversales y no a las longitudinales) y esto ocurre justo cuando finaliza el tiempo t_1 donde las magnetizaciones presentes son $2I_{1z}I_{2x}$ y $-2I_{1z}I_{2y}$ (ver sección 2.7.3). En ambos términos la magnetización de protón (espín 1) se encuentra alineada sobre el eje z por lo que el gradiente no afecta a este núcleo pero sí tendrá efecto sobre la magnetización de carbono-13, ya que se encuentra a lo largo del eje x y del eje y. Esto provoca un desfase selectivo de la señal ^1H - ^{13}C . A esta magnetización desfasada se le continúan aplicando los pulsos de radiofrecuencia, como se muestra en la figura 30, y el segundo pulso de gradiente se encarga de reenfoque a esta magnetización. En el instante del reenfoque la información del carbono-13, que se desfasó con el primer pulso, está contenida en el núcleo de protón, es decir, en el punto de reenfoque se tiene el término I_{1x} (sección 2.7.3).

Si existiera en este punto una magnetización debida a ^1H - ^{12}C sobre el plano xy, el segundo gradiente la desfasaría mientras que reenfoquearía la debida a ^1H - ^{13}C . Con esto se logra eliminar la señal de ^1H - ^{12}C . Cabe señalar que se añade un tiempo de espera y un pulso de 180° extra sobre carbono-13 para eliminar errores de fase (se reenfoca la evolución del acoplamiento y desplazamiento químico durante la acción del gradiente) que se puedan presentar durante la aplicación del primer gradiente.

Al iniciar el tiempo t_2 se tiene una magnetización sobre el eje x (ver sección 5.1.2), la cual evoluciona en este tiempo. Al aplicar el tercer gradiente desfasa nuevamente a esta magnetización, y el componente generado en z debido a procesos de relajación (sección 5.1.3.2) queda inalterado. La secuencia continúa y el último gradiente reenfoca la magnetización mientras que el pico axial generado por el último pulso de 90° se desfasa. Con ello, se eliminan los artefactos debidos a los picos axiales.

Una vez ubicados los gradientes dentro de la secuencia de pulsos se debe determinar la fuerza y duración del gradiente. Para ello es necesario conocer las coherencias que se van a observar a través de la secuencia de pulsos. Es necesario también establecer el camino o diagrama de coherencias presentes en la secuencia de pulsos propuesta.

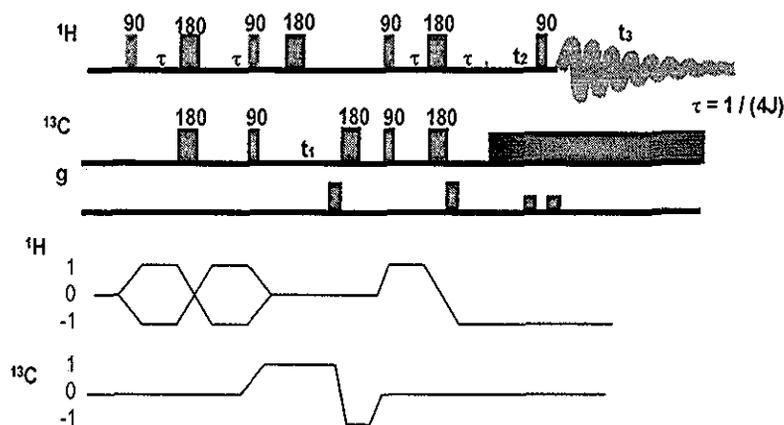


Figura 31 Secuencia de pulsos HSQC-COSY. Los niveles de coherencia muestran el camino que recorre la magnetización para cada pulso aplicado.

Para los dos primeros gradientes se tiene:

$$\phi_1 = s_1 \rho_1 \gamma_1 B_{g1} t_1$$

$$\phi_2 = s_2 \rho_2 \gamma_2 B_{g2} t_2$$

y se debe garantizar que la fase del sistema sea cero al final, es decir:

$$\phi_1 + \phi_2 = 0$$

la magnetización de carbono-13 se desfasa con el primer gradiente, pero el reenfoque se hace sobre la magnetización de protón. Por lo tanto:

$$\gamma_{13C} s_1 \rho_1 B_{g1} t_1 = -\gamma_{1H} s_2 \rho_2 B_{g2} t_2$$

$$\frac{-\rho_2}{\rho_1} = \frac{s_1 \gamma_{13C} B_{g1} t_1}{s_2 \gamma_{1H} B_{g2} t_2}$$

Considerando que, el gradiente de campo es de 20 gauss/cm y que la forma del pulso es rectangular para ambos gradientes, se tiene que $B_{g1} = B_{g2}$ y $s_1 = s_2$.

Cuando se aplica el primer gradiente la coherencia de carbono está en +1 y al aplicar el segundo gradiente la coherencia de protón se encuentra en -1, por lo tanto la coherencia va de +1 a -1 (figura 31), es decir, $\rho_2 = -1$ y $\rho_1 = +1$

$$\frac{-\rho_2}{\rho_1} = \frac{t_1 \gamma_{13C}}{t_2 \gamma_{1H}}$$

$$\frac{1}{1} = \frac{t_1 \gamma_{13C}}{t_2 \gamma_{1H}}$$

Esto implica que

$$t_1 = \frac{\gamma_{1H}}{\gamma_{13C}} t_2$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por lo tanto:

$$t_1 = 4t_2 \quad \text{ó} \quad t_2 = 1/4t_1$$

Los dos últimos gradientes sólo afectan a la magnetización de protón por lo que la constante giromagnética es la misma. Los tiempos y la forma de los pulsos son iguales en ambos gradientes y por último las coherencias van de -1 a -1 (figura 31)

$$\frac{1}{-1} = \frac{B_{g1}}{B_{g2}}$$

$$B_{g2} = -B_{g1}$$

Una vez establecida la posición, fuerza y duración de los pulsos de gradientes, se implementa esta secuencia al equipo de RMN para obtener los espectros correspondientes.

5.1.3.5 Espectros obtenidos.

La muestra antes mencionada se utilizó para probar el funcionamiento de la secuencia propuesta. Con la secuencia de la figura 31 se obtuvieron los experimentos bidimensionales HSQC y COSY variando los tiempos t_1 y t_2 (figura 32).

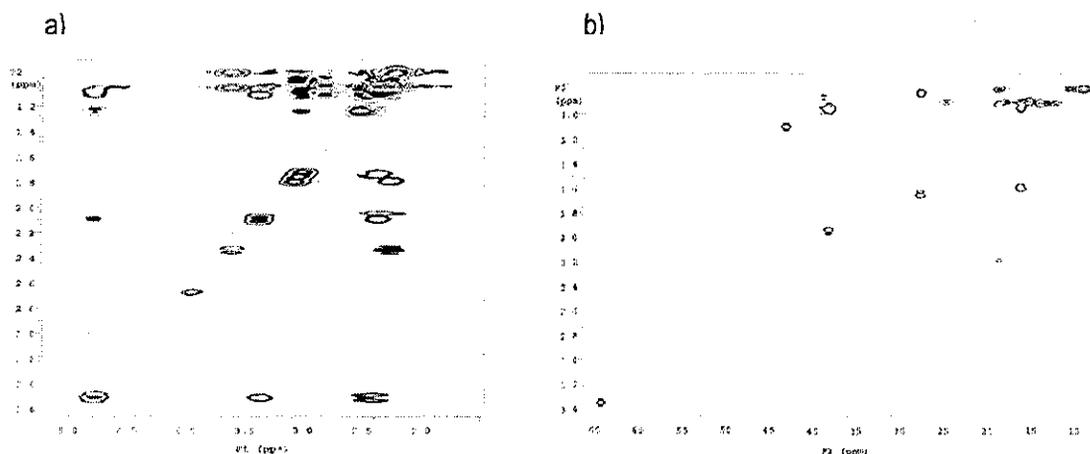


Figura 32. Espectros bidimensionales obtenidos con la inclusión de pulsos de gradientes en la secuencia propuesta. La figura 32a muestra el espectro COSY (no simetrizado) y la figura 32b el espectro HSQC. Los experimentos se realizaron en equipo Varian Unity Plus 500 que opera a una frecuencia de resonancia para protón de 499 894 MHz con una sonda de detección indirecta de 5 mm y equipado con bobinas adicionales para gradientes a lo largo del eje z. El pulso de 90° para protón fue $7.5 \mu\text{s}$. Los tiempos de espera τ fueron 17 ms que corresponde a $1/(4J)$. Cada espectro fue registrado con una ventana espectral de 3323 1 Hz y 10600 Hz para ^1H y ^{13}C respectivamente. Se realizaron 4 "scans" o repeticiones utilizando 1024 puntos para los datos colectados en las tres dimensiones. El número de incrementos fue de 64 en F1 y de uno en F2 para obtener el espectro HSQC. Para el espectro COSY el incremento en F2 fue de 64 mientras que en F1 fue de uno.

Al comparar los espectros de la figura 32 con los de la figura 29 se observa la eliminación de artefactos por la utilización de gradientes de pulsos. Es notable la diferencia de los espectros entre los métodos empleados para la eliminación de artefactos. Los gradientes permitieron obtener de forma selectiva las señales de interés; además, se requiere menos tiempo que el invertido por el método de ciclación de fases. Nuevamente se está obteniendo un espectro heteronuclear, HSQC, y uno homonuclear, COSY, a partir de una secuencia diferente a la que les da origen.

Es importante resaltar que con esta secuencia de pulsos también se logró obtener un espectro HSQC que proporciona información acerca de la correlación carbono–protón a uno y dos enlaces de distancia (figura 33)

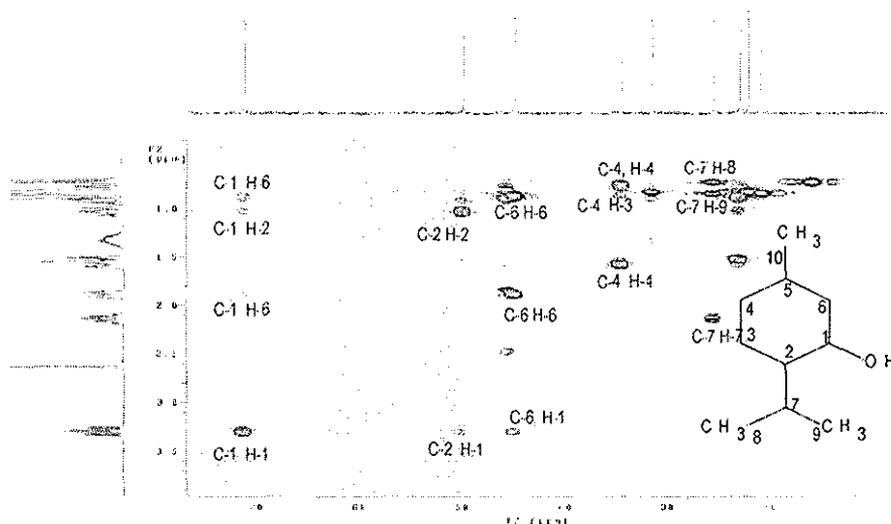


Figura 33 Experimentos HSQC con correlación a uno y dos enlaces de distancia

Esta interacción se presenta solamente entre carbonos protonados. Debido a esta característica no es posible observar las correlaciones de protones con carbonos cuaternarios, lo cual conduce a filtrar interacciones protón–carbono a tres enlaces de distancia, obteniendo de esta manera un experimento diferente al HMBC. Hasta el momento no se conoce de algún experimento bidimensional heteronuclear que pueda correlacionar exclusivamente interacciones a uno y dos enlaces de distancia entre especies protonadas, lo cual hace de este experimento un desarrollo novedoso obtenido a partir de la secuencia de pulsos propuesta.

En la figura 33 se muestran algunas de las correlaciones que presentan las señales del mentol. El carbono–1 correlaciona con su protón, H–1, al cual está unido y además correlaciona con los protones H–2, H–6 y H–6' vecinos a dos enlaces de distancia. El carbono–2 correlaciona con el protón al que se encuentra unido y también con el protón–1 que está a dos enlaces de distancia. Hay señales que no se distinguen con claridad por ser interacciones más débiles, pero que a nivel del ruido es posible observar. La opción para resolver este problema es repetir el experimento con más tiempo para disminuir el ruido y poder observar las interacciones débiles con mayor definición.

Posteriormente, se realizó el procesamiento del experimento en tres dimensiones. Los espectros obtenidos del procesamiento son planos bidimensionales homonucleares (Figura 22) de un carbono específico de la molécula. Antes de presentar los planos obtenidos del experimento en 3D se presenta el espectro COSY (figura 34) del mentol obtenido con la secuencia de pulsos habitual, para que sirva como referencia al compararlos con respecto a los planos bidimensionales COSY obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D (figura 35a-j).

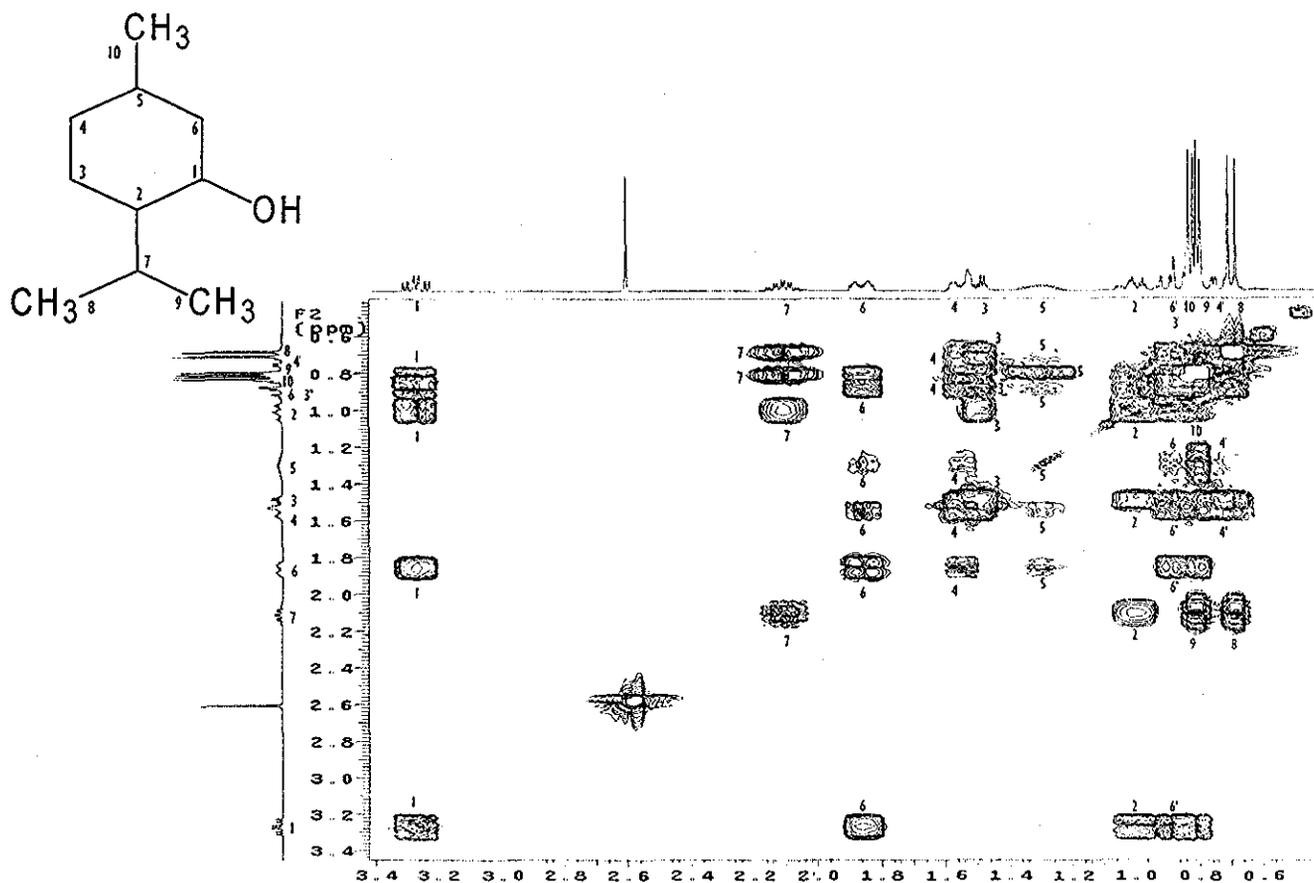


Figura 34. Espectro COSY del mentol, obtenido con la secuencia clásica para este experimento

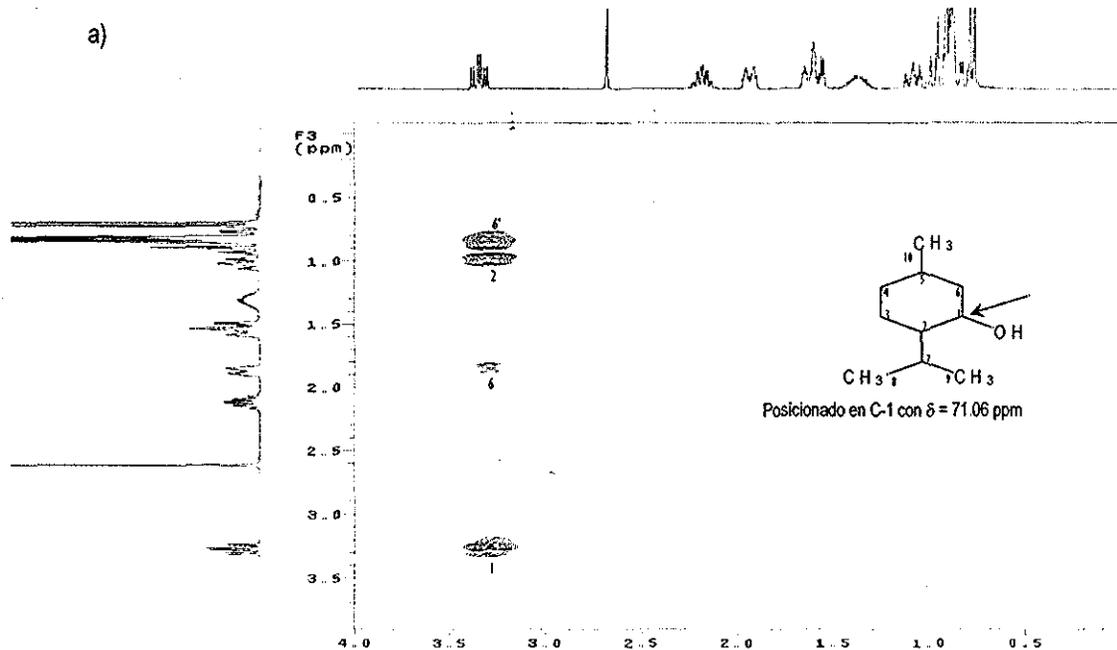


Figura 35a Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D. Se obtiene un experimento COSY para los protones sobre los carbonos seleccionados que están presentes en la molécula

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

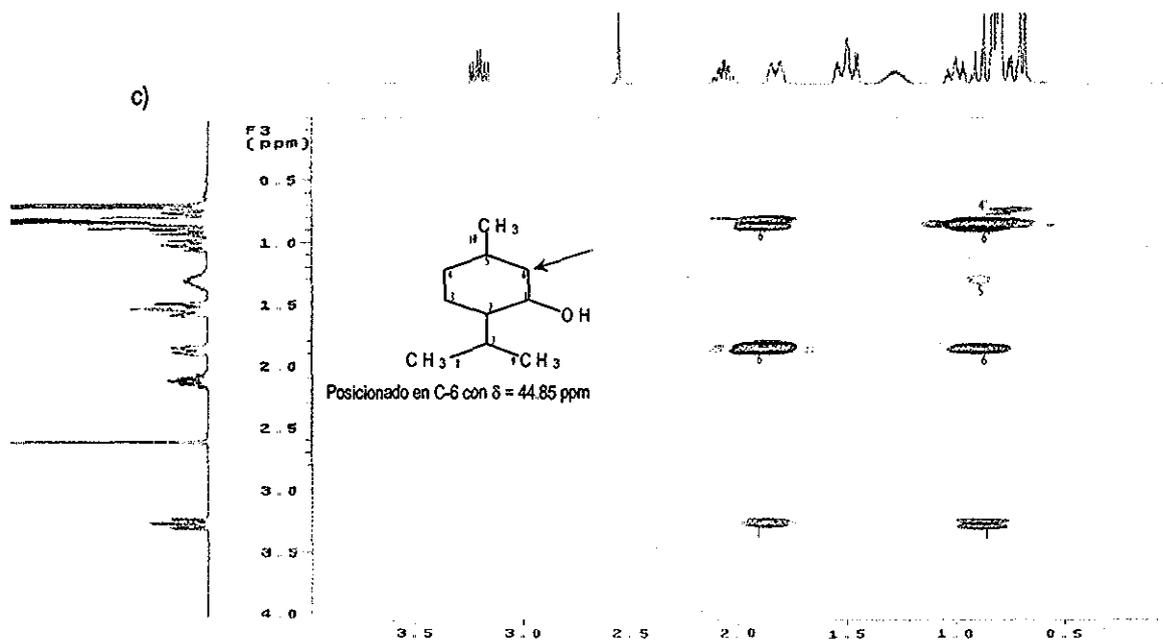
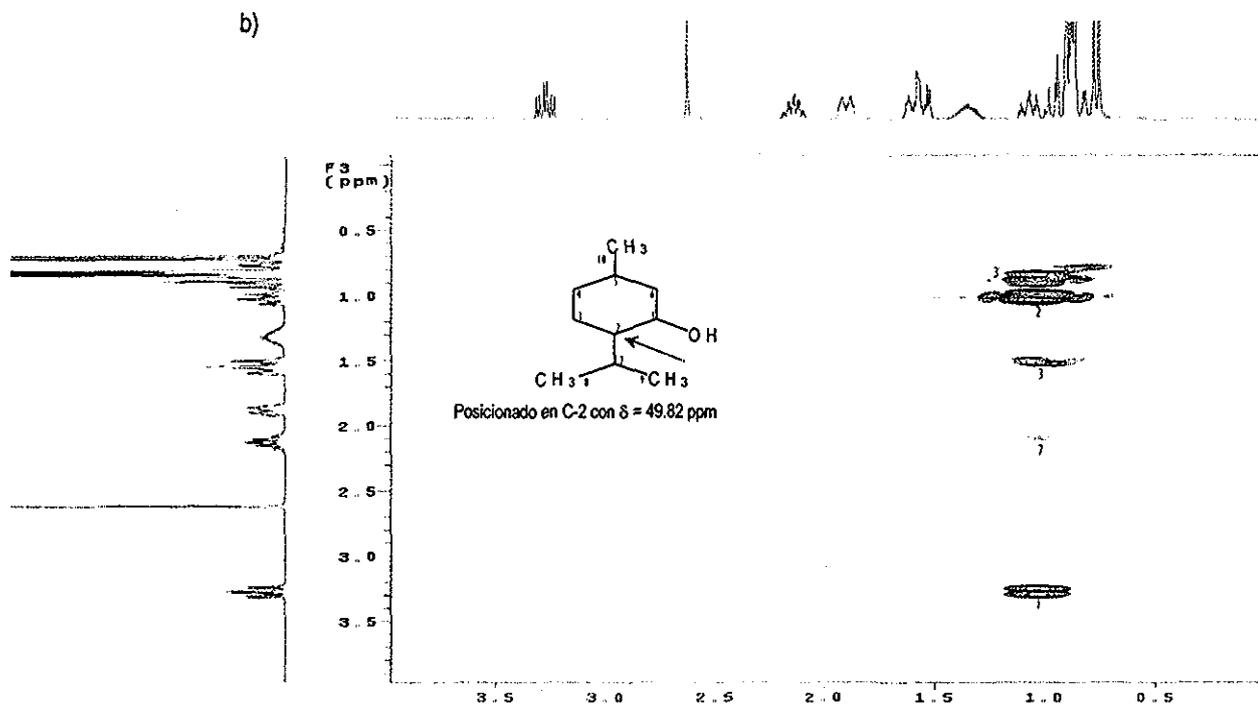
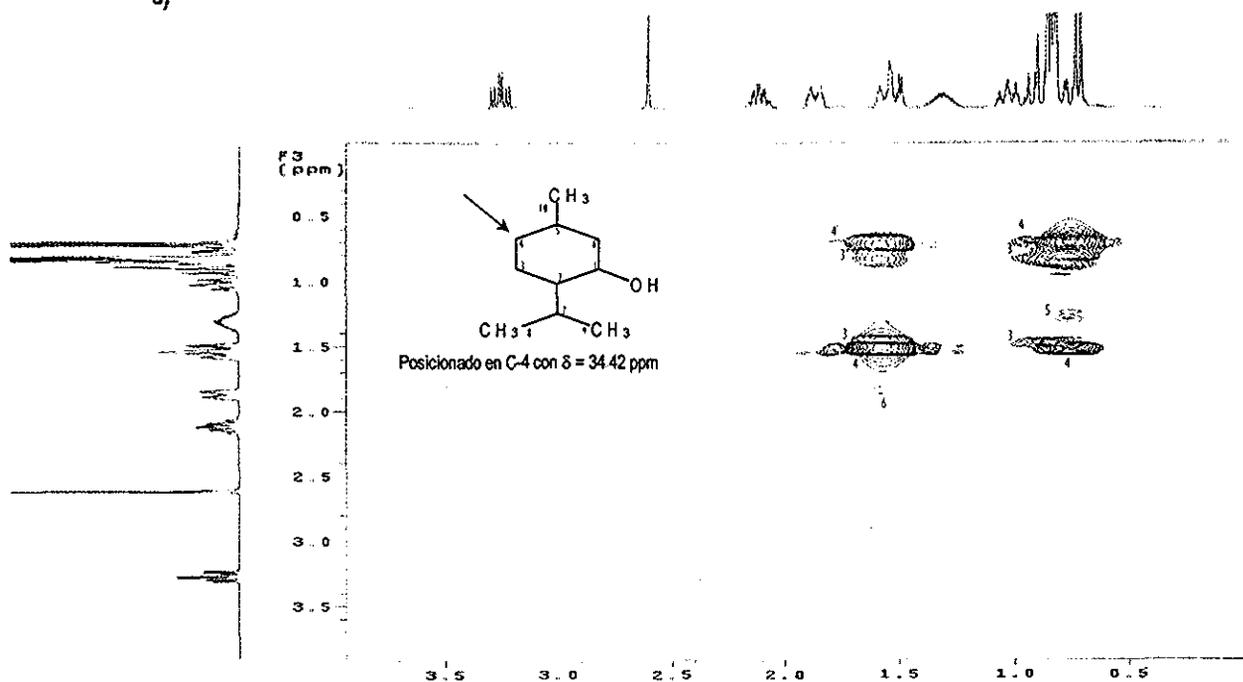


Figura 35b, 35c. Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D. Se obtiene un experimento COSY para los protones sobre los carbonos seleccionados que están presentes en la molécula

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

d)



e)

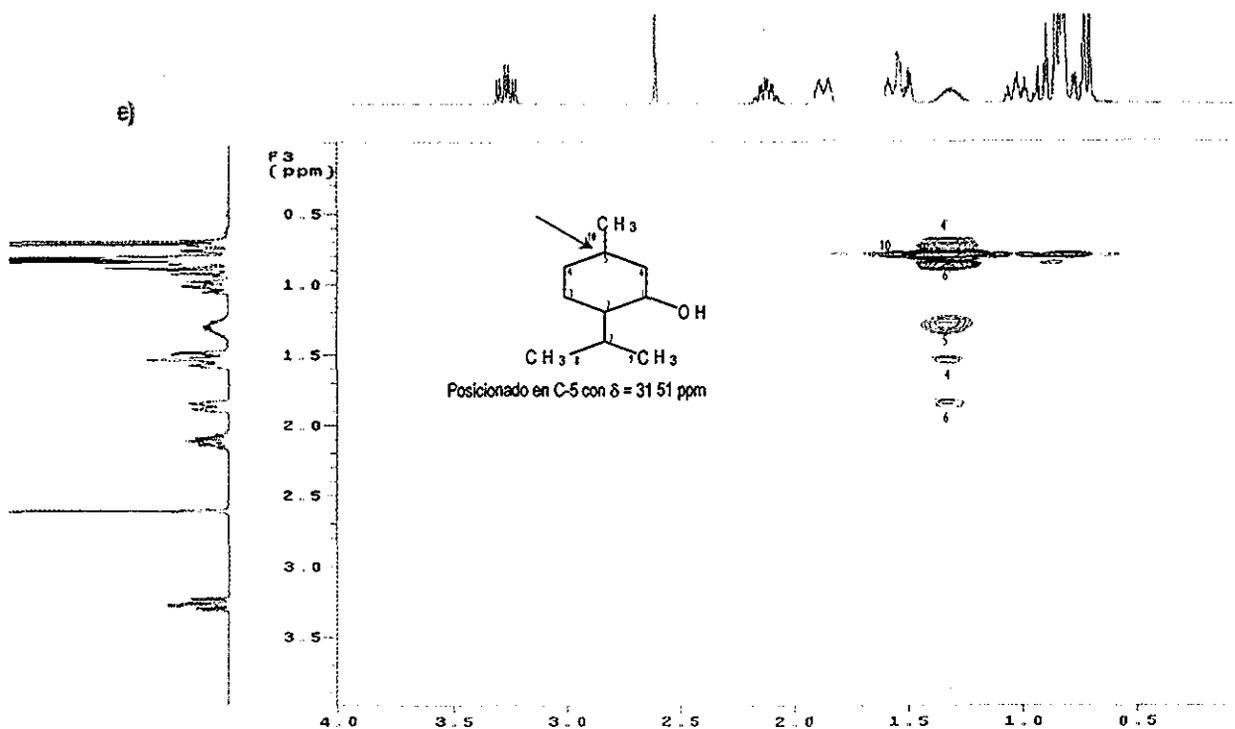


Figura 35d, 35e. Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D. Se obtiene un experimento COSY para los protones sobre los carbonos seleccionados que están presentes en la molécula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

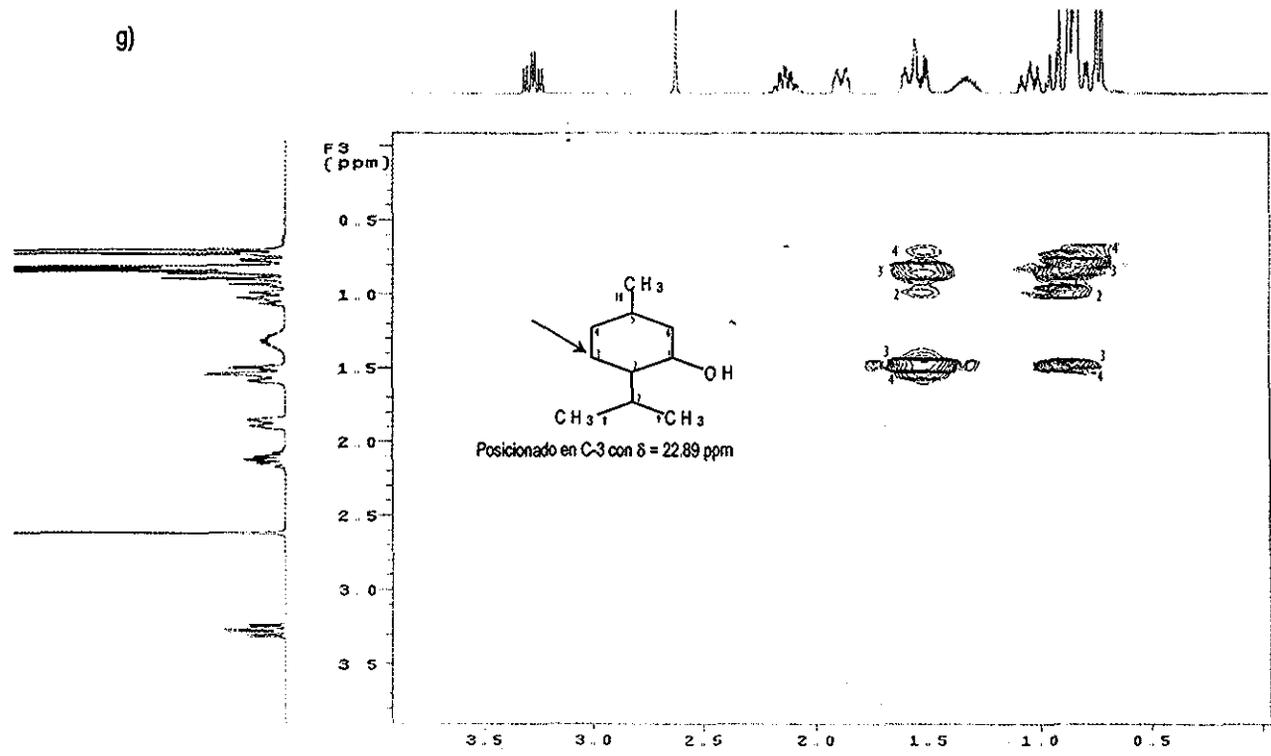
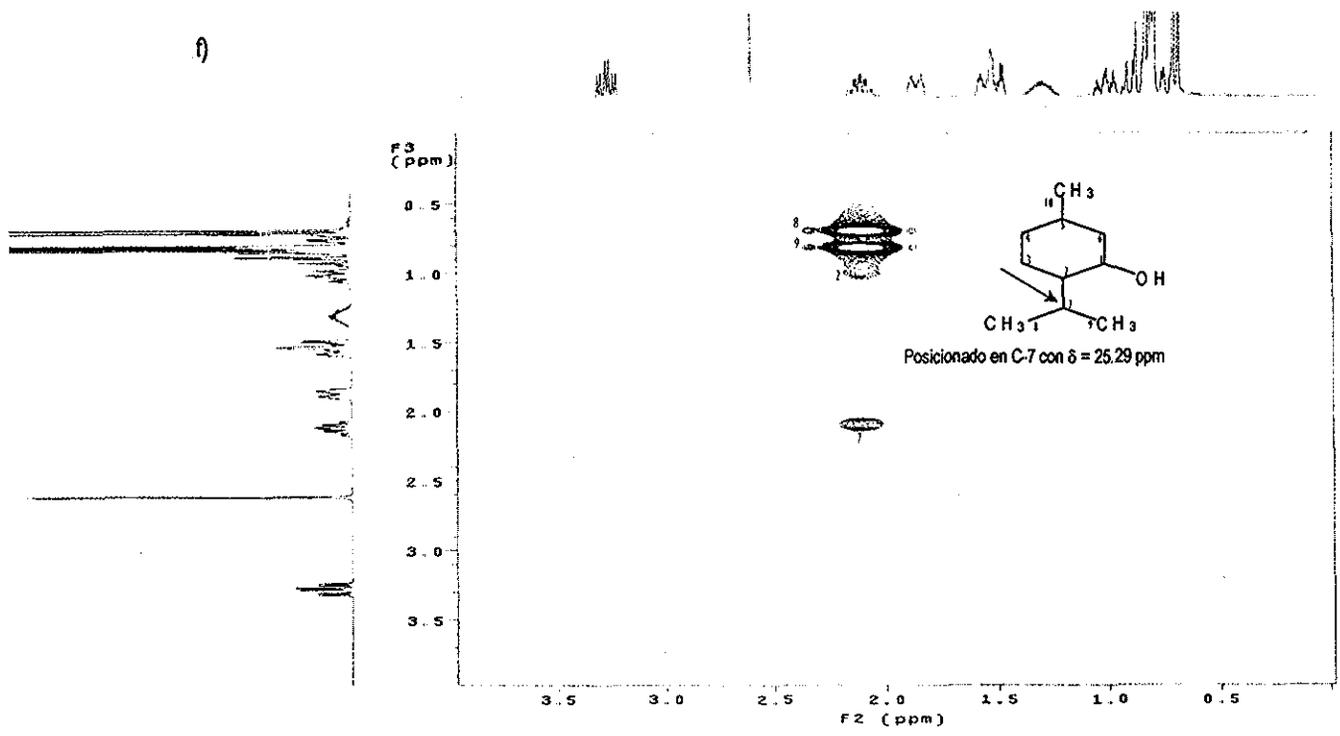


Figura 35f, 35g. Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D. Se obtiene un experimento COSY para los protones sobre los carbonos seleccionados que están presentes en la molécula.

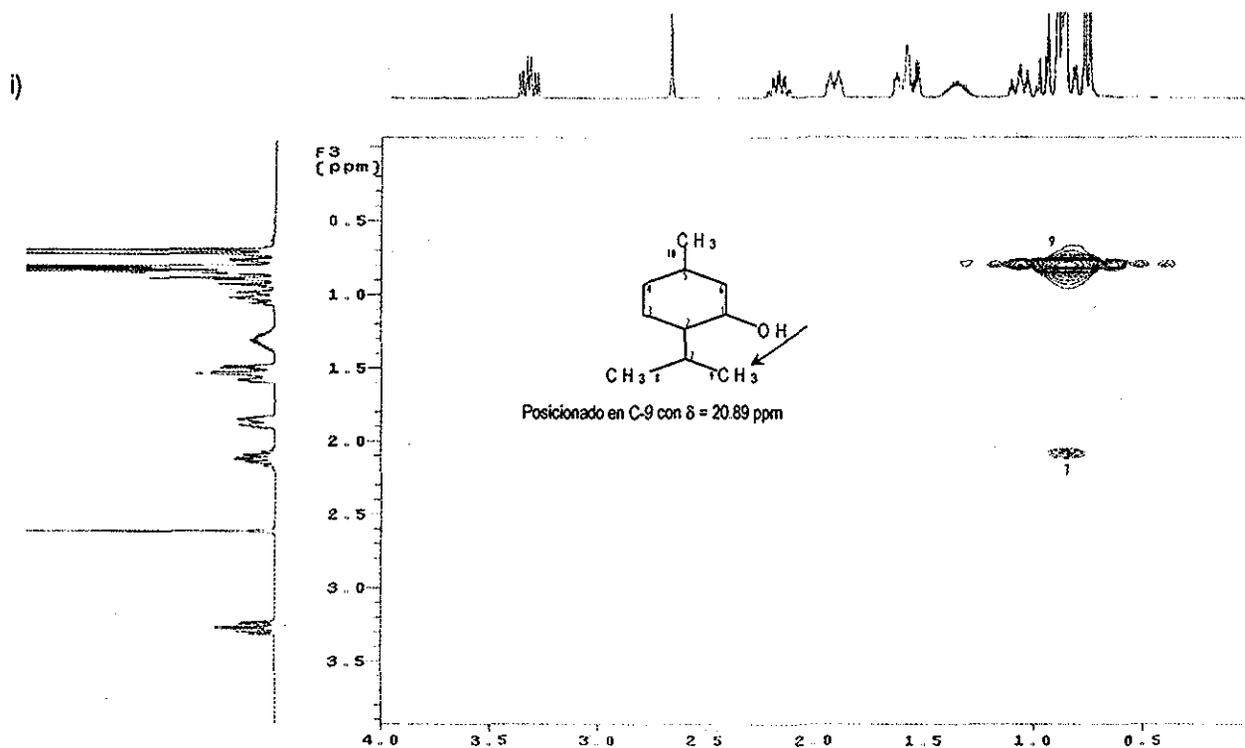
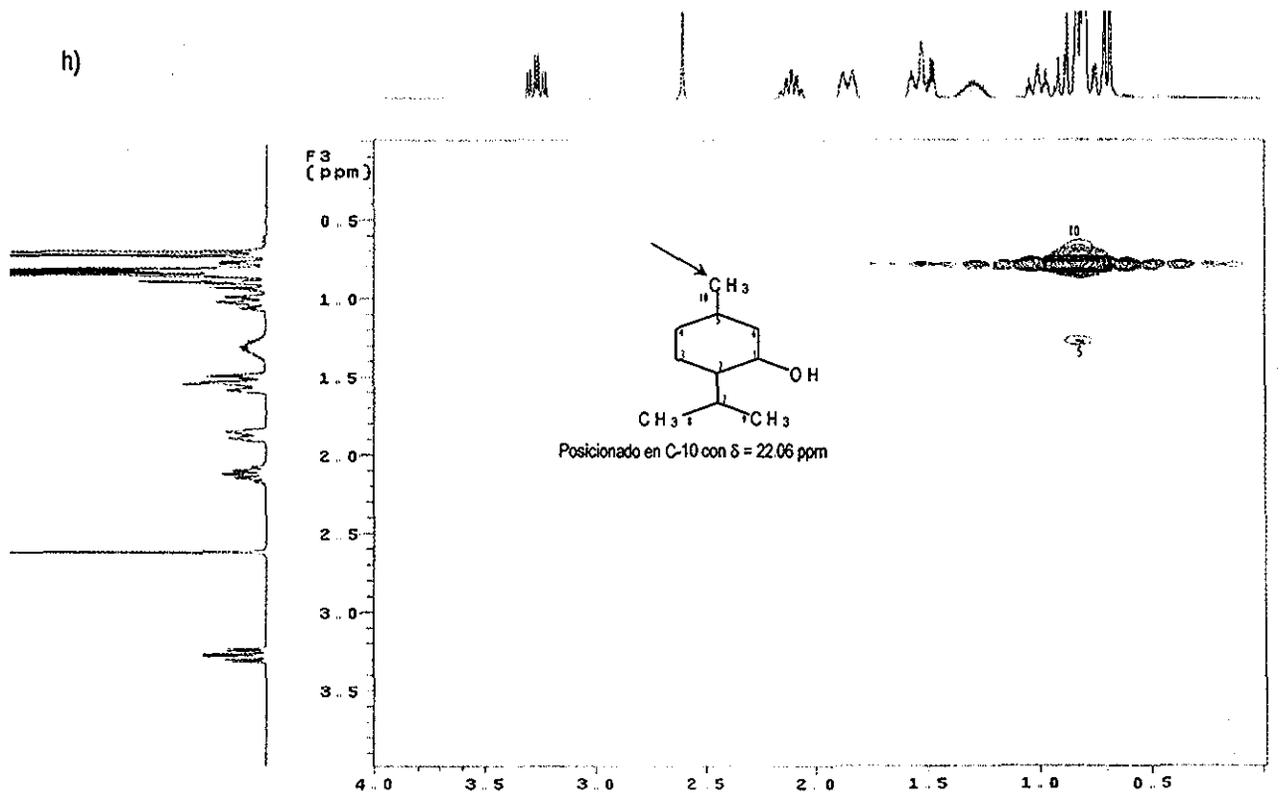


Figura 35h, 35i. Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D. Se obtiene un experimento COSY para los protones sobre los carbonos seleccionados que están presentes en la molécula

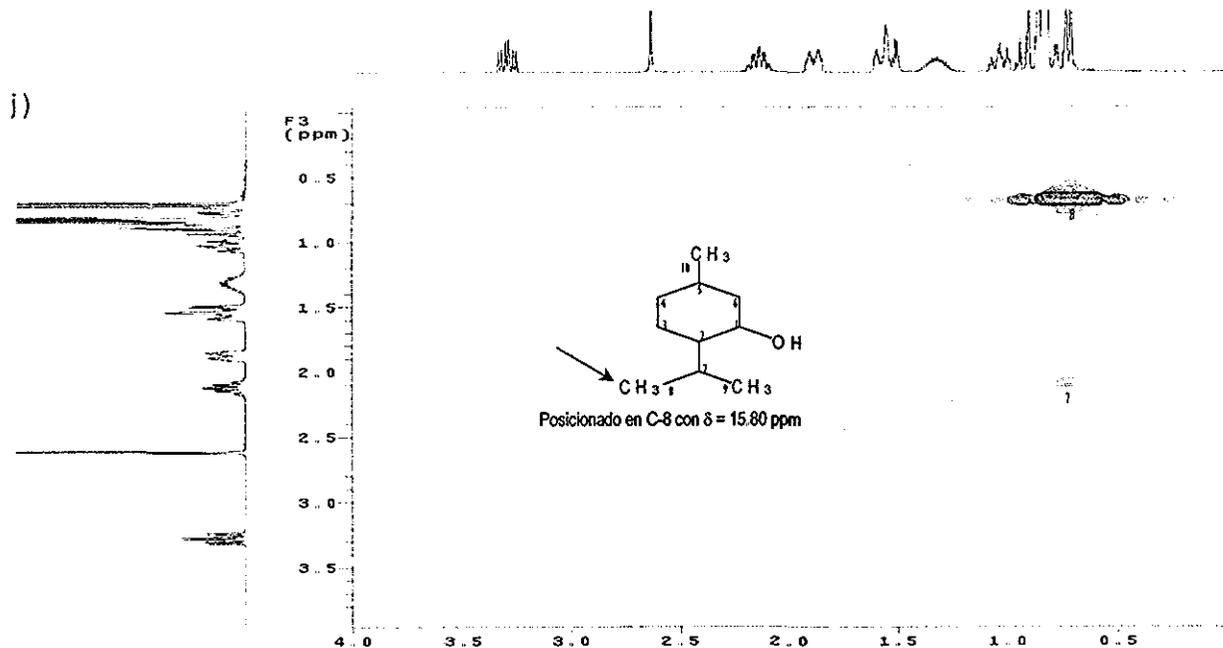


Figura 35j Planos bidimensionales obtenidos a partir de la secuencia de pulsos en 3D. Se obtiene un experimento COSY para los protones sobre los carbonos seleccionados que están presentes en la molécula.

Los experimentos se realizaron en equipo Varian Unity Plus que opera a una frecuencia de resonancia para protón de 499.894 MHz con una sonda de detección indirecta de 5 mm y equipado con bobinas adicionales para gradientes a lo largo del eje z. El pulso de 90° para protón fue de $7.75 \mu\text{s}$. Los tiempo de espera τ fueron 17 ms que corresponde a $1/(4J)$. Cada espectro fue registrado con una ventana espectral de 3323.1 Hz y 10600 Hz para ^1H y ^{13}C respectivamente. Se realizaron 8 "scans" o repeticiones utilizando 512 puntos para los datos colectados en las tres dimensiones. El número de incrementos fue de 64 tanto para la primera como para la segunda dimensión.

Como se observa en la figuras 35a-j, la secuencia de pulsos propuesta ha permitido generar un experimento COSY ^1H - ^1H para cada uno de los protones sobre los carbonos seleccionados en la molécula. Para cada carbono se van a observar las correlaciones homonucleares que presente el protón que está unido a dicho carbono. Para observar cada plano sólo se necesita elegir el carbono de interés. La dimensión en F2 y F3 muestran la correlación homonuclear mientras que en F1 y F3 se conserva la información heteronuclear.

Esto indica que tras aplicar esta secuencia de pulsos, la información que va a generar sobre el espectro es una correlación ^{13}C - ^1H - ^1H ; se consiguió obtener la información que se había planteado mediante el modelo de producto de operadores (ecuaciones [30]-[33]).

Cuando se elige una señal de los carbonos generados en F1, es posible observar la interacción de los protones en F2 y F3, y es precisamente este modo de presentación el que ofrece mayor información estructural, ya que sobre F1 se están dispersando las señales presentes en F2 y F3.

En la figura 35a se eligió al carbono asignado como C1 y se muestra solamente el espectro COSY del protón de C1. Las señales observadas son las debidas a H1 y sus respectivas interacciones con H2, H6 y H6'. Se han filtrado todas las interacciones debidas a los demás protones (figura 34) y sólo se manifiestan de forma selectiva las interacciones de H1 cuando se elige el plano del carbono C1. Lo mismo ocurre cuando se escoge el plano de carbono C2 (figura 35b) en F1, se filtran todas las señales y sólo se observa la interacción de H2 con H1, H3, H3' y H7.

Para el caso de la figura 35c, en el cual el COSY que se muestra es el de los protones de C6, se tiene un CH₂ cuyos protones no son equivalentes, por lo que en el espectro se ven las señales de H6 y H6'. Pero el desplazamiento de la señal de H6' cae precisamente en desplazamientos cercanos a H3' H10 y H9 esto hace que se sobrepongan las señales en la misma zona (figura 34). Sin embargo, cuando se hace la dispersión de estas señales en F1 posicionados en C6 se filtran todas las señales que no están acopladas al protón de C6 y sólo se observan exclusivamente las de H6 y H6'. De esta forma podemos asignar en forma correcta la señal que corresponde a H6' aunque ésta se encuentre en una zona de señales superpuestas

Cuando se selecciona el plano que genera el carbono-4 (C-4) se observa el espectro de la figura 35d. Este espectro muestra las señales de cada uno de los protones (H4 y H4') que están unidos a C-4 y los acoplamientos de H4' con H4, H3, H3' y H5 así como los de H4 con H4', H3, H3' y H6 El espectro de la figura 35e que corresponde al plano del carbono-5 (C-5) se observa la señal generada por H5 y sus respectivos acoplamientos con H4', H10, H6', H4 y H6

El espectro 35f muestra el plano del carbono-7 (C-7) en donde se observa la señal que genera H7 y sus acoplamientos con H2, H9 y H8. Nuevamente, se pueden apreciar las señales con las cuales se acopla H7 aunque éstas se encuentren en una zona donde las señales se sobreponen. El espectro 35g corresponde al plano del carbono-3 (C-3) en el cual se muestran las interacciones debidas a H3 con H4, H4', H3' y H2 y las de H3' con H4, H4', H3 y H2.

El espectro 35h corresponde al plano del carbono C-10 el cual sólo muestra la señal debida a H-10 y su acoplamiento con H5. El espectro 35i y 35j muestran los planos de C-9 y C-8 respectivamente, los cuales presentan la señal de H-9 y H-8 en cada espectro y su respectiva interacción con H-7.

Los resultados de la secuencia de pulsos demuestran que es posible asignar señales de un determinado sistema aunque éstas se encuentren en una zona de superposición y es precisamente, para sistemas más complejos en donde existe este problema en las señales que la secuencia de pulsos propuesta tiene su aplicación. La dispersión de las señales sobre carbono-13, filtrará señales que permitan una asignación adecuada.

Una de las interacciones que no se alcanza a observar en la figura 35c debida a H6' con H5 es por que la intensidad de la señal de H5 se encuentra a nivel de ruido. Esto se puede resolver dando un mayor número de transientes y mejorando la resolución en F2 dando más incrementos.

6.0 Conclusiones.

Se logró implementar la secuencia de pulsos HSQC-COSY en tres dimensiones.

La secuencia de pulsos propuesta cancela las señales COSY de todo el sistema y muestra selectivamente el COSY de los protones del carbono que se seleccione

Esta secuencia de pulsos es capaz de generar interacciones $^{13}\text{C}-^1\text{H}-^1\text{H}$

La secuencia de pulsos produce un experimento HSQC que correlaciona interacciones protón-carbono a uno y dos enlaces de distancia en dos dimensiones.

Los pulsos de RMN además de ser un eficiente camino para obtener un espectro son los que permiten manipular el sistema de espín para extraer la mayor información posible

El modelo de producto de operadores es una herramienta eficiente para conocer el comportamiento del espín en una secuencia de pulsos y con ello modificar, proponer o crear nuevas secuencias

La utilización de gradientes de campo es una metodología fundamental para lograr eliminar los artefactos presentes en el espectro y seleccionar las coherencias de interés.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

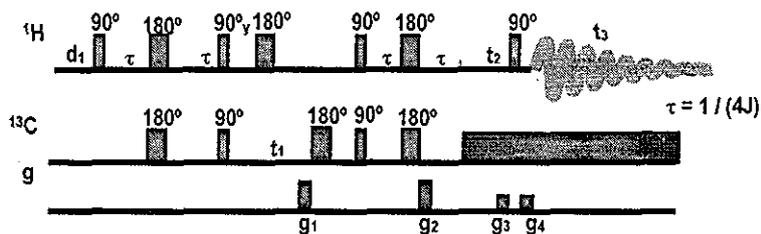
7.0 Anexo

7.1 Parámetros experimentales de RMN⁵⁴.

7.1.1. Generalidades.

Núcleos estudiados:	¹ H, ¹³ C
Instrumento:	Varian Unity Plus.
Sonda:	Detección indirecta con un diámetro de 5 mm con la capacidad de observar 3 núcleos
Campo magnético:	11 74 Teslas
Secuencia de pulsos:	HSQC-COSY (figura 31)
Referencia interna:	Tetrametil silano
Muestra:	50 mg de mentol disueltos en 0 7 ml de CDCl ₃ contenido en un tubo de RMN Wilmad de 5 mm
Temperatura:	23 °C.

7.1.2. Condiciones de los pulsos de radiofrecuencia.



Duración del pulso de 90° en ¹ H:	7 75 μs
Potencia del pulso de 90° en ¹ H:	55 dB.
Duración del pulso de 90° en ¹³ C:	15 4 μs.

Forma de g ₁ , g ₂ , g ₃ y g ₄ :	Rectangular
Duración y potencia de g ₁ :	2 ms a 20 gauss/cm
Duración y potencia de g ₂ :	0 5 ms a 20 gauss/cm
Duración y potencia de g ₃ :	0 5 ms a 20 gauss/cm
Duración y potencia de g ₄ :	0 5 ms a -20 gauss/cm

Fases de los pulsos aplicados: Todos los pulsos se aplicaron sobre el eje x excepto el tercer pulso de 90° sobre ¹H que fue sobre el eje y

Duración del tiempo de espera d ₁	1s
Duración de los tiempos de espera τ:	1 7 ms (1/4J)
Núcleo desacoplado:	¹³ C
Método utilizado para desacoplar:	Modulación de onda continua (CW).
Potencia del desacoplador:	49 dB

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.1.3 Parámetros dimensionales.

Ventana espectral en F1:	10600 Hz
Ventana espectral en F2:	3323.1Hz.
Ventana espectral en F3:	3323.1Hz.
Tiempo de adquisición:	0.154 segundos
Número de transientes:	8
Numero de incrementos en F1:	64
Numero de incrementos en F2:	64
Número de puntos utilizados:	1024
Tiempo de detección total:	13 horas

7.1.4 Parámetros de Procesamiento.

Software utilizado:	VNMR versión 6.1.
Estación de trabajo:	Sun SPARC 4
Sistema operativo:	Solaris 2.5

7.1.4.1 Procesamiento de un espectro en 2D a partir de datos en 3D.

7.1.4.2 Comandos a introducir.

Zero-filling:	
fn:	1024 puntos
fn1:	1024 puntos
fn2:	256 puntos
wft	
sb:	0.077 segundos.
wft1d('ni') ó wft1d('ni2')	
sb1:	0.006 segundos
sb2:	0.010 segundos.
wft2d('ni') ó wft2d('ni2')	
Tiempo de procesamiento:	15 minutos.

7.1.4.2 Procesamiento de un espectro en 3D.

Zero-filling:	
fn:	1024 puntos.
fn1:	256 puntos.
fn2:	1024 puntos
addpar('3d')	
f1coef='1 0 0 1'	
f2coef='1 0 0 -1'	
set3dproc	
ft3d ('f1f3','f2f3')	
getplane('f2f3')	
dplane(4)	
nextpl	
prevpl	
plplanes(13,13,30,1.3)	
Tiempo de procesamiento:	40 minutos

8.0 Bibliografía.

- [1] Kessler, H, Gehrke, M y Griesinger, C Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Background and Overview of the Experiments *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **27**, 490–536, (1998)
- [2] Kessler, H, Mronga, S. y Gemmecker, G Multidimensional NMR Experiments Using Selective Pulses *Magnetic Resonance in Chemistry*, **29**, 527–557, (1991).
- [3] Friedrich, J, Davies, S. y Freeman, R. Shaped Selective Pulse for Coherence- Transfer experiments *Journal of Magnetic Resonance*, **75**, 390-395, (1987)
- [4] Davies, S, Friedrich, J y Freeman, R. Two dimensional Spectroscopy without an evolution Period –“Pseudo COSY” *Journal of Magnetic Resonance*, **75**, 540, (1987)
- [5] Bloch, F *Phys Rev.*, **70**, 460, (1946)
- [6] Benn, R. y Günther, H “Modern pulse methods in high-resolution NMR spectroscopy,” *Angew. Chem Int Ed Engl.*, **22**, 350–380, (1983)
- [7] Sørensen, O., W, Eich, G., W., Levitt, M, H., Bodenhausen, G y Ernst, R. R “Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **16**, 163–192, (1983)
- [8] Van de Ven, F., J., M y Hilbers, C., W A Simple Formalism for the Description of Multiple Pulse Experiments Application to a weakly coupled Two –Spin ($I=1/2$) System. *Journal of Magnetic Resonance*, **54**, 512-520, (1983).
- [9] Shriver, J “Product operators and coherence transfer in multiple pulse NMR experiments,” *Concepts Magn. Reson.*, **4**, 1–33, (1992).
- [10] Wei G. y Snider, R., F. “A pictorial representation for multispin evolutions,” *Concepts Magn. Reson*, **7**, 153–163, (1995).
- [11] Lowry, D. “Correlated vector model of multiple-spin systems,” *Concepts Magn. Reson.*, **6**, 25–39, (1994)
- [12] Croasmun, W, R y Carlson, M., R Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Applications for Chemists and Biochemists. Second Edition Wiley-VCH. Canada 1994
- [13] Becker, D. High Resolution NMR. Theory and Chemical Applications. Third Edition Academic Press, 2000
- [14] Friebolin, H Basic One and Two-Dimensional NMR Spectroscopy Second Edition VCH. New York 1993
- [15] Hahn, E, L *Phys. Rev*, **80**, 580, (1950).
- [16] Carr, H, Y. y Purcell, E *Phys. Rev*, **94**, 630, (1954)
- [17] Freeman, R *Spin Choreography Basic Steps in High Resolution NMR*, Spektrum, Oxford, 1997

- [18] Jeener, J. Ampère International Summer School, Basko Polje, Yugoslavia (1971).
- [19] Derome, A. Modern NMR techniques for chemistry research, Pergamon Press, Oxford, 1988
- [20] Cavanagh, J., Fairbrother, W., Palmer III, A. y Skelton, N. Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice Academic Press USA 1996. Chapter 4, pp 237
- [21] Müller, L. Sensitivity Enhanced Detection of Weak Nuclei Using Heteronuclear Multiple Quantum Coherence *Journal of American Chemical Society*, **101**, 4481–4484, (1979)
- [22] Marek, R., Králík, L. y Skelenár, V. Gradient-Enhanced HSQC Experiments for Phase-Sensitive Detection of Multiple Bond Interactions *Tetrahedron Letters*, **38**, 665–668, (1997)
- [23] Bax, A., Griffey, R., H. y Hawkins, B., L. Correlation of Proton and Nitrogen-15 Chemical Shifts by Multiple Quantum NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, **55**, 301–315, (1983)
- [24] Bax, A., Ikura, M., Kay, L., E., Torchia, D., A y Tschudin R. Comparison of Different Modes of Two Dimensional Reverse-Correlation NMR for the Study of Proteins *Journal of Magnetic Resonance*, **86**, 304–318, (1990)
- [25] Bodenhausen, G. y Ruben, D., J. Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, **69**, 185–188, (1980).
- [26] Bodenhausen, G. y Ruben, D., J. *Chemical Physics Letters*, **69**, 185 (1980)
- [27] Morris, G., A. y Freeman R. Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer *Journal of American Chemical Society*, **101**, 760, (1979).
- [28] Bain, A. Coherence Levels and Coherence Pathway in NMR a Simple Way to Design Phase Cycling Procedures. *Journal of Magnetic Resonance*, **56**, 418–427 (1984)
- [29] Bodenhausen, G., Kogler, H. y Ernst, R., R. Selection of Coherence- Transfer Pathways in NMR Pulse Experiments *Journal of Magnetic Resonance*, **58**, 370 (1984).
- [30] Wider, G., Macurá, S., Kumil, A. y Ernst, R., R. Homonuclear Two-Dimensional ¹H NMR of Proteins Experimental Procedures *Journal of Magnetic Resonance*, **56**, 207, (1984)
- [31] Keeler, J., Clowes, R., T., Davis, A., L. y Laue, E., D. Methods in Enzymology. Pulsed Field Gradients: Theory and Practice **239**, 145–207, (1994)
- [32] Canet, D. Radio Frequency Fields Gradient Experiments *Progress Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **30**, 101–135, (1997).
- [33] Barker, P. y Freeman, R. Pulsed Field Gradients in NMR. An Alternative to Phase Cycling *Journal of Magnetic Resonance*, **64**, 334–338, (1985)
- [34] Davis, A., Lave, E. y Keeler, J. Absorption-Mode Two Dimensional NMR Spectra Recorded Using Pulsed Field Gradients *Journal of Magnetic Resonance*, **94**, 637, (1991).

- [35] Parella, T. High-Quality 1d Spectra by Implementing Pulsed-Field Gradients as the Coherence Pathway *Magnetic Resonance in Chemistry*, **34**,329–347,(1996)
- [36] Kontaxis, G , Stonehouse, J., Laue, E , D y Keeler, J The Sensitivity of Experiments which use Gradients Pulses of Coherence-Pathway Selection *Journal of Magnetic Resonance Serie A*, **111**, 70–76, (1994)
- [37] Berger, S NMR techniques employing selective radiofrequency pulses in combination with pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*, **30**, 137–156, (1997)
- [38] Griesinger, C , Sørensen, O , W y Ernst R , R. Three Dimensional Fourier Spectroscopy Application to High-Resolution NMR *Journal of Magnetic Resonance*, **84**, 14–63, (1989)
- [39] Sørensen, O , W. Three and Four Dimensional NMR experiments for Measurement of Spin-Spin Coupling Constants *Journal of Magnetic Resonance*, **90**, 433-438, (1990)
- [40] Chary, K , V , Otting, G y Wüthrich, K. Measurements of Small Heteronuclear ^1H - ^{15}N Coupling Constants in ^{15}N - labeled Proteins by 3D $^1\text{H}_\text{N}\text{NH}_{\text{AB}}$ - COSY *Journal of Magnetic Resonance*, **93**, 218-224, (1991)
- [41] Braun, S , Kalinowski, H., O y Berger S 150 and More Basic NMR Experiments, Wiley–VCH, 1998
- [42] Fesik, S , W. y Zuiderweg E , R , P. H Heteronuclear Three-Dimensional Spectroscopy A Strategy for the Simplification of Homonuclear Two-Dimensional NMR Spectra *Journal of Magnetic Resonance*, **78**, 588-593, (1988).
- [43] Fesik, S., W., Gampe, R., T. y Zuiderweg E , R., P. Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy Natural Abundance ^{13}C Chemical Shift Editing of ^1H - ^1H COSY Spectra *Journal of American Chemical Society*, **111**, 770-772, (1989)
- [44] Günter, P , Schaefer, N., Otting, G y Wüthrich, K POMA: A Complete Mathematica Implementation of the NMR Product–Operator Formalism *Journal of Magnetic Resonance series A*, **101**, 103–105, (1993)
- [45] Palmer III, A., G., Cavanagh, J., Wright, P , E y Rance, M Sensitivity Improvent in Proton-Detected Two Dimensional Heteronuclear Correlation NMR Spectroscopy *Journal of Magnetic Resonance*, **93**, 151–170, (1991).
- [46] Tolman, J., Chung, J y Prestegard, H. Pure-Phase Heteronuclear Multiple-Quantum Spectroscopy Using Field Gradient Selection. *Journal of Magnetic Resonance*, **98**, 462-467, (1992)
- [47] Hurd, R , Boban, J., y Plant, D Novel Method for Detection of Pure-Phase Double-Absorption Lineshapes in Gradient-Enhanced spectroscopy *Journal of Magnetic Resonance*, **93**, 666-670, (1991).
- [48] Hurd, R , E Gradient Enhanced Spectroscopy *Journal of Magnetic Resonance*, **87**, 422–428, (1990)

- [49] Von Kienlin, M., Moonen, C., T, W y Van der Toorn, A P C. M Van Zijl. Rapid Recording of Solvent-Suppressed 2D COSY Spectra with Inherent Quadrature Detection Using Pulsed Field Gradients *Journal of Magnetic Resonance*, **93**, 423–429, (1991)
- [50] Hurd, R. y Boban, J. Gradient- Enhanced Proton-Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence Spectroscopy *Journal of Magnetic Resonance*, **91**, 648-653, (1991).
- [51] Mehlkopf, A , Korbee, D , Tiggelman, T. y Freeman, R. Sources of t1 Noise in Two Dimensional NMR *Journal of Magnetic Resonance*, **58**, 315-323, (1984)
- [52] Canet, D , Mutzenhardt, P y Guenneau, F Nuclear spin coherence transfer induced by a single static field gradient pulse *Chemical Physics Letter*, **264**, 477–480, (1997)
- [53] Jones, J , A , Grainger, D , S., Hore, P., J. y Daniell, G , J Analysis of COSY Cross Peaks by Deconvolution of the Active Splittings. *Journal of Magnetic Resonance*, **101**, 162-169, (1993).
- [54] Harris, R , K., Kowalewski, J. y Cabral de Menezes S. International Union of Pure and Applied Chemistry Physical Chemistry División Comision on Molecular Structure and Spectroscopy Parameters and Symbols for Use in Nuclear Magnetic Resonance (IUPAC Recommendations 1997) *Magnetic Resonance in Chemistry*, **36**, 145-149, (1998)