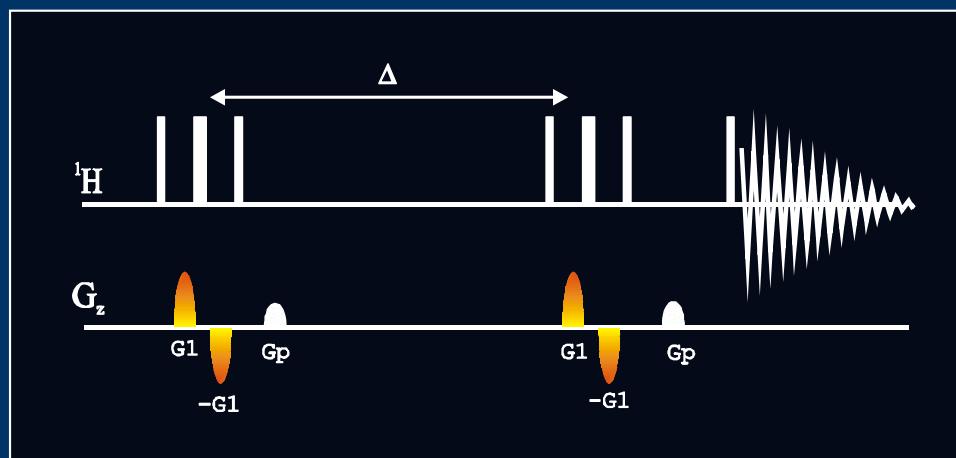


**MEDIDAS DE COEFICIENTE DE DIFUSIÓN POR RMN.
METODOLOGÍA, ASPECTOS EXPERIMENTALES Y
FUNDAMENTOS.**



Tesis Doctoral
NURIA ESTURAU ESCOFET
JUNIO 2011



Universitat Autònoma de Barcelona

**MEDIDAS DE COEFICIENTE DE DIFUSIÓN POR RMN.
METODOLOGÍA, ASPECTOS EXPERIMENTALES Y
FUNDAMENTOS**

NURIA ESTURAU ESCOFET

Tesis Doctoral

PROGRAMA DE DOCTORADO QUÍMICA

**DIRECTORES: DR. TEODOR PARELLA COLL Y DR. FRANCESC
SÁNCHEZ-FERRANDO**

DEPARTAMENT DE QUÍMICA, FACULTAT DE CIÈNCIES

2011



Universitat Autònoma de Barcelona

**MEDIDAS DE COEFICIENTE DE DIFUSIÓN POR RMN,
METODOLOGÍA, ASPECTOS EXPERIMENTALES Y
FUNDAMENTOS**

MEMORIA DE INVESTIGACIÓN PRESENTADA POR

NURIA ESTURAU ESCOFET

PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS
DENTRO DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Bellaterra, Junio 2011

Dr. TEODOR PARELLA I COLL, Investigador y Director del *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona*,
y Dr. FRANCESC SÁNCHEZ-FERRANDO Catedrático del *Departament de Química de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona*,

Informan:

Que la memoria titulada **Medidas de coeficiente de difusión por RMN. Metodología, aspectos experimentales y fundamentos**, presentada por Nuria Esturau Escofet para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra, a 12 de junio de 2011.

Francesc Sánchez-Ferrando

Teodor Parella i Coll

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido realizado con la financiación aportada por las siguientes instituciones:

La Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (AECI) mediante la concesión de la beca “MUTIS” para la realización de estudios de Doctorado (01/10/1998 a 30/06/2000).

La *Universitat Autònoma de Barcelona* por la Beca de *Formació i Suport a la Recerca* para la puesta a punto de nuevas secuencias de pulsos de RMN (01/07/2000 a 31/12/2000).

La *Generalitat de Catalunya* mediante la concesión de la beca TDOC para terminar estudios de Doctorado (01/01/2001 a 16/06/2002) y por la concesión de la bolsa de viaje TDOC para la realización de la estancia en *Cambridge University, England* (01/10/2001 a 05/01/2002).

El Ministerio de Educación y Ciencia por el soporte financiero en los proyectos DGES (PB98-0914) y Picasso (HF1996-0225).

Al *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear*, de la UAB y a *Cambridge University*, por el tiempo de instrumentos de RMN dedicado para realizar el trabajo de estas memorias.

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Francesc Sánchez-Ferrando y el Dr. Teodoro Parella i Coll. A Paco por toda la ayuda que me brindó y que me permitió viajar a España para realizar este trabajo. A Teo por la dirección, la dedicación y el invaluable apoyo que me brindó a lo largo de los años que estuve en la UAB y en todos los años posteriores.

Así mismo, deseo agradecer al Dr. Albert Virgili y al Dr. Carles Jaime del departamento de Química Orgánica todo su apoyo personal y humano. A Miquel Cabañas del laboratorio de RMN por su atención a mis consultas y las sugerencias recibidas. A todos mis compañeros del laboratorio de Química Orgánica, Xavi Grabuleda, Ivan Bea, Pascal Bonnet, Sandra Almer, Itziar Maestre, por los momentos compartidos durante mi estancia en la UAB, y en especial a Anna Muñoz, Marta Pomares, Marta Sánchez, Miriam Pérez, por los momentos compartidos durante esos años y todos los años posteriores.

Igualmente quiero agradecer al Dr. James Keeler de la Universidad de Cambridge por permitirme incorporar a su grupo de investigación durante 3 meses. Especialmente agradezco todas sus enseñanzas, dedicación y la calidez humana mostrada desde el primer día de mi estancia.

Por otra parte, quiero agradecer a mis amigos, a los ya antes mencionados, a Mercè Villanueva, Félix Busqué, Araceli Peña, Ma. Josefa Bernad, Jesús Gracia,... y a todos que me han acompañado durante estos años.

También, quiero resaltar mi agradecimiento a toda mi familia, tanto a los que viven en México como en España, y en especial a mi prima Elvira Ana Targa con quien compartí muchas vivencias durante mi estancia en Barcelona.

Por último, el agradecimiento más importante a mis padres, quienes me han apoyado en todo momento.

A todos, muchas gracias.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	1
Lista de abreviaciones y acrónimos	5
Lista de símbolos	6
1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	8
2 GRADIENTES DE CAMPO MAGNÉTICO Y DIFUSIÓN MOLECULAR. ASPECTOS TEÓRICOS	11
2.1 Orden de coherencia y operadores de desplazamiento	11
2.2 Caminos de transferencia de coherencia (CTC)	12
2.3 Selección de coherencia mediante ciclos de fase	14
2.4 Gradiente de campo magnético	15
2.4.1 Corrientes <i>eddy</i>	15
2.4.2 Linealidad de los gradientes	16
2.4.3 Bases teóricas	16
2.4.4 Concepto de desfase y reenfoque	20
2.5 Aplicaciones de los gradientes de campo magnético	21
2.5.1 Método de purga	21
2.5.2 Selección de coherencias	21
2.5.3 Gradientes y movimiento	23
2.5.4 Imagen	25
2.6 Difusión Molecular	27
2.6.1 Coeficiente de Difusión	27
2.6.2 Predicción del coeficiente de difusión	30
2.6.3 Difusión y su relación con propiedades moleculares	31
3 METODOLOGÍA	34
3.1 Secuencias de pulsos para experimentos de difusión	35
3.1.1 Experimento eco de espín (SE)	38
3.1.2 Experimento eco de espín con gradientes (PFGSE)	38
3.1.3 Experimento Eco Simulado (PFGSTE)	39

3.1.4	Experimento LED (PFGLED)	41
3.1.5	Experimentos de difusión con pulsos bipolares (BPPSTE y BPPLIED).....	42
3.1.6	Otras secuencias (GCSTE y GCSTESL).....	44
3.1.7	Experimentos de difusión acoplados a otros experimentos.....	45
3.2	Espectros de difusión en 2 dimensiones. La representación DOSY	46
3.3	La transformada de Laplace inversa y algoritmos de procesamiento.....	47
3.4	Experimentos de difusión tridimensionales.....	49
3.5	Experimentos de difusión. Parte Experimental	52
3.5.1	Obtención experimental del coeficiente de difusión	52
3.5.2	Generando un espectro DOSY	53
3.5.3	Indicaciones para los diferentes tipos de procesado	53
3.5.4	Calibración de la intensidad de los gradientes.....	54
3.5.5	Estudio comparativo de las diferentes secuencias de pulsos.....	55
3.5.6	Experimentos de difusión y supresión de H ₂ O	58
3.5.7	Experimentos tridimensionales (DOSY-COSY)	60
3.5.8	Resumen	61
4	EFECTOS DE CONVECCIÓN EN EXPERIMENTOS DE DIFUSIÓN	62
4.1	Corrientes de convección y pérdida de señal de RMN	62
4.2	Métodos para eliminar los efectos de convección	63
4.2.1	Experimentos que compensan la convección	65
4.2.2	Trabajar girando el tubo de RMN.....	66
4.3	Corrientes de convección. Parte experimental.....	67
4.3.1	Secuencia compensada DBPLIED	67
4.3.2	Comprobando y eliminando la convección	68
4.3.3	Girar el tubo a velocidades apropiadas.....	91
4.4	Resumen	96
5	MODELO TEÓRICO SOBRE EL EFECTO DEL GIRO DE LA MUESTRA EN EXPERIMENTOS QUE UTILIZAN SELECCIÓN CON GRADIENTES	98
5.1	Hipótesis de no alineación entre <i>ejes</i>	98
5.2	Magnetización observable. Experimento SE y giro de la muestra	99
5.2.1	Cálculos teóricos. Tratamiento matemático	100
5.2.2	Comprobación experimental	105
5.3	Experimento SE de imagen localizada	107

5.3.1	Tratamiento matemático. Valor de α lo largo del eje z	113
5.3.2	Comprobación experimental	113
5.4	Efecto de la polaridad y la forma de los gradientes.....	118
5.5	Efecto de la polaridad del gradiente de lectura.....	121
5.6	Imagen utilizando gradientes de polaridad invertida sin pulso de 180°	123
5.7	Resumen	124
6	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN	126
6.1	Factores instrumentales	126
6.2	Factores experimentales. Ecuación de Stokes-Einstein.....	126
6.2.1	Temperatura.....	127
6.2.2	Viscosidad	128
6.2.3	Concentración.....	129
6.3	Cyclodextrinas y coeficiente de difusión.....	130
6.3.1	Estructura y espectro de las CDs en D ₂ O	131
6.4	Coeficiente de difusión de CDs bajo condiciones experimentales controladas	133
6.4.1	Condiciones experimentales	133
6.4.2	Efecto del cambio en la concentración de CDs	133
6.4.3	Efecto de la temperatura	140
6.4.4	Efecto de fuerza iónica	143
6.4.5	Efecto del pH	145
6.5	Comparación con datos publicados en la bibliografía	147
6.6	Propiedades moleculares	149
6.7	Resumen	152
7	APLICACIONES DE LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN	154
7.1	Caracterización de mezclas.....	157
7.2	Procesos de unión o asociación	163
7.2.1	Detección de interacciones intermoleculares	163
7.2.2	Interferencia de NOE en experimentos de difusión.....	167
7.3	Intercambio Químico	168
7.3.1	Intercambio químico de protones hidroxilo.....	168

7.3.2	Fundamentos.....	169
7.3.3	Ejemplo de intercambio químico en CDs.....	170
7.3.4	Intercambio químico en la sacarosa.....	183
7.4	Resumen	186
8	CONCLUSIONES.....	188

Lista de abreviaciones y acrónimos

BPPs	Pares de pulsos bipolares
BPPSTE	Secuencia eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares
BPPLED	Secuencia eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares y tiempo longitudinal para desvanecer las corrientes <i>eddy</i>
BPPLED-WATERGATE	Experimento eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares y supresión de agua con WATERGATE
BPPLED-W5	Experimento eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares y supresión de agua con W5
CD	Ciclodextrina
α -CD	Alfa-Ciclodextrina
β -CD	Beta-Ciclodextrina
γ -CD	Gama-Ciclodextrina
CD ₃ CN	Acetonitrilo deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CYCLOPS	Ciclo de fase: <i>CYClically Ordered Phase Sequence</i>
CTC	Caminos de transferencia de coherencia
COSY	Espectroscopía de correlación
DBPPLLED	Secuencia doble eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
D ₂ O	Agua deuterada
DOSY	Espectroscopía de difusión
DSTE	Secuencia doble eco de espín estimulado
EXORCYCLE	Ciclo de fase de 4 etapas
FID	Caída libre de la inducción
GCSTE	Experimento eco de espín estimulado con gradientes compensados
GCSTESL	Experimento eco de espín estimulado con gradientes compensados y espín lock
GROESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el sistema rotatorio con gradientes
HMQC	Coherencia múltiple cuántica heteronuclear
HDO	Agua deuterada
ILT	Transformada de Laplace inversa
MeOD	Metanol deuterado
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
PEG	Polietilenglicol
PFG	Gradientes de campo pulsados
PFGSE	Secuencia de pulsos eco de espín con gradientes
PFGSTE	Eco de espín estimulado

PFGLED	Experimento con tiempo longitudinal para desvanecer las corrientes <i>eddy</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMI	Resonancia Magnética Nuclear por Imagen
ROE	Efecto nuclear Overhauser en el sistema rotatorio
ROESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el sistema rotatorio
SE	Eco de espín
STE	Eco estimulado
TOCSY	Espectroscopía de correlación total
Tr	Tiempo de recuperación de los gradientes
WATERGATE W5	Método de supresión de agua con WATERGATE W5

Listado de símbolos

A(o)	Intensidad o área de la señal de RMN con $g=0$
A(g)	Intensidad o área de la señal de RMN con fuerza de gradiente igual a g
α	Factor de no alineación entre gradiente y <i>eje z</i>
B	$B=\gamma^2 g^2 \delta^2 (4\Delta-\delta)$
B₀	Campo magnético principal
B_(z)	Campo magnético en dirección <i>z</i>
β	Ángulo de cada molécula en cada capa del tubo de RMN
D	Coeficiente de difusión
D_a o D_o	Coeficiente de difusión aparente u observado
D_f y D_b	Coeficiente de difusión de la especie libre y unida
Δ	Tiempo de difusión
δ	Duración de un gradiente
f _f y f _b	Fracciones de la especie en estado libre y unida
F_f	Fuerza de fricción
f	Coeficiente de fricción
f_o	Coeficiente de fricción de una esfera
g, G_z	Fuerza de gradiente
G₀	Gradiente aplicado
G_p	Gradiente de purga
γ	Constante magnetográfica
J	Constante de acoplamiento
k_B	Constante de Boltzmann
k	Constante de asociación

M	Peso molecular
η	Viscosidad del disolvente
$\phi_{(z)}$	Fase dependiente de la posición en el <i>eje z</i>
p	Orden de coherencia
π	Número Pi
r	Radio
r_{eff}, r_h	Radio efectivo, radio hidrodinámico
r_{max}	Radio máximo
s	Factor forma de un gradiente
T_1	Tiempo de relajación longitudinal
T_2	Tiempo de relajación espin-espin
T_e	Periodo de tiempo durante el cual las corrientes <i>eddy</i> se desvanecen
v	Velocidad
v_{max}	Velocidad máxima
ω, ω_r	Frecuencia angular

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Gracias a los avances aparecidos en las últimas décadas, como por ejemplo han sido el desarrollo de imanes superconductores y los métodos matemáticos de transformación de Fourier en los años 70, los experimentos basados en secuencias de múltiples pulsos y experimentos multidimensionales en los 80s y los gradientes de campo magnético en los 90s, la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se ha convertido en una de las técnicas analíticas más utilizadas y poderosas, tanto para la elucidación estructural y conformacional de moléculas como para el estudio de dinámica y cinética molecular. La presente Tesis Doctoral aborda uno de los campos en los que la RMN de alta resolución se ha introducido en los últimos años: el estudio del fenómeno de la difusión translacional molecular en disolución y su importancia en el análisis de mezclas de compuestos, determinación de tamaños moleculares y en el estudio de una gran variedad de interacciones inter- e intra-moleculares.

La idea de determinar la difusión translacional molecular por RMN es muy simple: Al aplicar un experimento de difusión, las señales pertenecientes a las moléculas más pequeñas se atenúan más rápidamente que las pertenecientes a moléculas más grandes, debido a que se mueven más rápidamente en solución. La base para la determinación de los llamados coeficientes de difusión (**D**) de moléculas en solución es la secuencia de pulsos eco de espín con gradientes, conocida como *Pulsed Field Gradient Spin-Echo* o PFGSE, que fue propuesta por Stejskal y Tanner en 1965. Esta secuencia es una de más importantes en RMN y es la base de la conocida aplicación de la técnica de la RMN en el mundo clínico y biomédico en forma de obtención de imágenes. Desde principios de los años 90, gracias a los avances en el diseño de sondas para RMN de alta resolución incorporando gradientes de campo magnético estables, el estudio de las propiedades de difusión molecular empieza a ser más conocido y ampliamente utilizado en el mundo químico y bioquímico. Hoy en día es considerada una poderosa herramienta en RMN y una buena alternativa a las estrategias y experimentos clásicos normalmente utilizados para la determinación estructural y el estudio de los efectos dinámicos de las moléculas en solución.

El primer y principal objetivo de esta Tesis consiste en la puesta a punto de experimentos de RMN diseñados para la determinación de coeficientes de difusión en

nuestro laboratorio, y poder utilizarlos de una manera rutinaria y eficaz. Para ello, el capítulo 2 presenta una breve introducción al concepto de difusión molecular y de gradientes de campo magnético, se pretende establecer las bases necesarias para entender como la difusión molecular es estudiada utilizando la RMN y se tratan los factores asociados a temas técnicos como las corrientes *eddy* o la no linealidad de los gradientes. En el capítulo 3 se realiza un estudio detallado de las diferentes metodologías existentes para medir la difusión molecular, haciendo especial énfasis en las ventajas y desventajas de utilizar cada una de ellas. Se introduce el experimento DOSY (*Diffusion Ordered SpectroscopY*), que consiste en representar los resultados de difusión en forma de un espectro pseudo2D, donde en las coordenadas *x* (eje horizontal) se representa el valor de desplazamiento químico (δ) y en las coordenadas *y* (eje vertical) el valor del coeficiente de difusión. También se detalla la parte experimental necesaria para adquirir y procesar los datos de difusión, y se evalúa la posible combinación de las secuencias de difusión con secuencias 2D convencionales (COSY, TOCSY...), así como su impacto en el análisis de espectros que muestran un elevado grado de solapamiento.

Una vez que los diferentes experimentos de difusión fueron implementados, evaluados y comparados con el fin de escoger cuál son los más idóneos, nuestro siguiente objetivo se centró en el estudio de los factores experimentales que más afectan la precisión y la reproducibilidad de las medidas de difusión, concentrándonos sobretodo en las llamadas corrientes de convección. El capítulo 4 se dedica por completo a evaluar los parámetros que influyen en la convección, se estudia la severidad de estos efectos sobre los experimentos de difusión, y se proponen posibles soluciones para compensar o minimizar estos problemas. Se evalúa la realización de experimentos de difusión girando el tubo a velocidades apropiadas y se hace un estudio comparativo con secuencias diseñadas específicamente para dicho fin. Posteriormente, en el capítulo 5 se plantea el objetivo de profundizar en el efecto de girar la muestra sobre los experimentos que usan gradientes tanto a nivel teórico como práctico. Esta parte del trabajo se realizó en la Universidad de Cambridge en colaboración con el Profesor James Keeler.

Después de implementar los métodos para minimizar/eliminar los efectos de convección y obtener medidas correctas, el capítulo 6 trata sobre la dependencia de ciertos factores experimentales (la temperatura, el disolvente, la concentración...) en

las medidas de difusión. Utilizando las ciclodextrinas como moléculas de estudio, se ha evaluado el efecto de las propiedades de la solución (pH, concentración y la fuerza iónica) sobre la difusión tanto de la molécula en estudio como del disolvente.

Como último objetivo de este trabajo se pretender mostrar algunas de las principales aplicaciones de la determinación del coeficiente de difusión por RMN. En el capítulo 7 se exponen aplicaciones como la caracterización de mezclas, la formación de complejos o la existencia de intercambio químico.

Finalmente, en el capítulo 8 se resumen las principales conclusiones obtenidas de esta tesis doctoral.

2 GRADIENTES DE CAMPO MAGNÉTICO Y DIFUSIÓN MOLECULAR. ASPECTOS TEÓRICOS

El uso tardío de los gradientes de campo magnético en experimentos de RMN de alta resolución fue debido básicamente a problemas técnicos. Las primeras sondas con gradientes de campo magnético estables fueron comercialmente accesibles a la mayoría de científicos a principios de los años 90, lo que permitió extender el campo de aplicaciones de la RMN. Los gradientes de campo magnético representan una alternativa muy eficaz a los ciclos de fase convencionales que se utilizan para la selección de caminos de transferencia de coherencia (CTC) y que son la base del concepto de la Resonancia Magnética mediante Imágenes (RMI). Con la finalidad de explicar el fundamento de esta técnica, en las primeras secciones del presente capítulo se exponen las bases teóricas para entender cómo los gradientes de campo magnético permiten seleccionar CTC específicos, suprimir señales no deseadas, obtener el perfil de densidad de espines o medir el movimiento de translación de las moléculas en una dirección determinada. Posteriormente, se presenta el concepto de difusión molecular, el término de coeficiente de difusión y su relación con propiedades moleculares.

2.1 Orden de coherencia y operadores de desplazamiento

Los experimentos de RMN se pueden analizar mediante diferentes modelos. Aunque el más clásico es el modelo vectorial, el más apropiado es el formalismo de los operadores producto, basados en los operadores cartesianos I_z , I_x , I_y que representan las componentes de la magnetización en los *ejes z, x, y*, respectivamente. Los experimentos que utilizan gradientes se pueden analizar mediante los llamados operadores desplazamiento I^+ , I^- :

$$I^+ = I_x + iI_y \quad [2-1]$$

$$I^- = I_x - iI_y \quad [2-2]$$

donde el operador I^+ (operador incremento) corresponde a un orden de coherencia $p = +1$, mientras que el operador I^- (operador decremento) representa un orden de coherencia $p = -1$. La combinación de las Ec. 2-1 y 2-2 da como resultado:

$$I_x = \frac{1}{2}(I^+ + I^-) \quad [2-3]$$

$$I_y = \frac{1}{2}i(I^+ - I^-) \quad [2-4]$$

El término coherencia es una generalización de la idea de magnetización transversal (I_x, I_y), donde cada coherencia tiene un número cuántico asociado llamado orden de coherencia (p). Las magnetizaciones del sistema de espines presentes en cada momento de una secuencia de pulsos pueden clasificarse en diferentes ordenes de coherencia (orden cero, mono, doble...). Las coherencias mono-cuánticas tienen $p = \pm 1$ y son las únicas que se pueden observar directamente en RMN. Las coherencias doble-cuánticas corresponden a transiciones con $p = \pm 2$, las coherencias triple-cuánticas tienen $p = \pm 3$, y así sucesivamente. La coherencia cero-cuántica corresponde a una transición con un cambio de coherencia de $p = 0$. Esto implica que en esta transición la magnetización de un espín nuclear gira en una dirección y el otro gira en la opuesta. La magnetización longitudinal, I_z , a pesar de no ser una coherencia, tiene propiedades en común con la coherencia cero-cuántica ($p = 0$).

2.2 Caminos de transferencia de coherencia (CTC)

La evolución de la magnetización existente durante una secuencia de pulsos se puede seguir mediante el diagrama de CTC. En una primera aproximación, la evolución de la magnetización puede ser modulada por tres efectos: 1) pulsos de radiofrecuencia, 2) evolución de desplazamiento químico (δ) y 3) evolución debido al acoplamiento escalar (J). De éstos, únicamente los pulsos de radiofrecuencia provocan un cambio en el orden de coherencia. Así, después del pulso de 90° inicial, típico punto de partida de la mayoría de las secuencias, se obtiene una mezcla de órdenes de coherencia +1 y -1 (Ec. 2-5 Fig.2-1a). Por otro lado, un pulso de 90° aplicado a cualquier operador transversal puede crear una mezcla de magnetización transversal y longitudinal (Ec. 2-6 y Fig.2-1b). Un pulso de 180° intercambia los operadores transversales (Ec. 2-7 y Fig.2-1c).

$$\begin{aligned} I_z &\xrightarrow{90^\circ_x} \frac{i}{2} (I^+ - I^-) \\ I_z &\xrightarrow{90^\circ_y} \frac{1}{2} (I^+ + I^-) \end{aligned} \quad [2-5]$$

$$\begin{aligned} I^\pm &\xrightarrow{90^\circ_x} \frac{1}{2} (I^+ + I^-) \pm iI_z \\ I^\pm &\xrightarrow{90^\circ_y} \pm \frac{1}{2} I^+ \mp \frac{1}{2} I^- - I_z \end{aligned} \quad [2-6]$$

$$I^\pm \xrightarrow{180^\circ_x} I^\mp \quad [2-7]$$

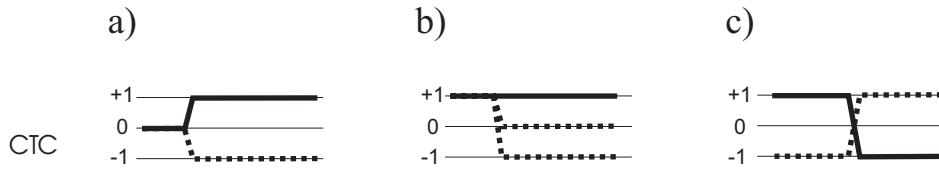


Figura 2-1. Esquemas básicos en diagramas de CTC: a) un pulso de 90° inicial genera una mezcla de órdenes de coherencia +1 y -1; b) un pulso de 90° aplicado al operador transversal +1 crea una mezcla de magnetización +1, 0 y -1; y c) un pulso de 180° intercambia el signo de los operadores de +1 a -1 y/o de -1 a +1.

Al contrario de los pulsos, la evolución bajo los efectos de desplazamiento químico sólo produce modulación en la forma sen/cos (ver Ec.2-8), y el acoplamiento escalar (J) genera términos fase/antifase bajo modulación sen/cos (ver Ec. 2-9), pero no cambian el orden de coherencia existente. Por convenio se utiliza el operador I^- para la detección en cuadratura (orden de coherencia -1), y por tanto, éste es el punto final donde debe acabar cualquier CTC. El análisis de los operadores de amplitud que acompañan al operador I^- al final de la secuencia permite predecir cuál es la sensibilidad relativa de cada experimento (ver Ec. 2-10).

$$I^p \xrightarrow{\omega_l \tau I_z} I^p \cos(p\omega_l \tau) - iI^p \sin(p\omega_l \tau) \quad [2-8]$$

$$\begin{aligned} I^\pm &\xrightarrow{\pi J \tau 2I_z S_z} I^\pm \cos(\pi J \tau) \pm 2I^\pm S_z \sin(\pi J \tau) \\ 2I^\pm S_z &\xrightarrow{\pi J \tau 2I_z S_z} 2I^\pm S_z \cos(\pi J \tau) \pm iI^\pm \sin(\pi J \tau) \end{aligned} \quad [2-9]$$

$$\begin{aligned}
 I_x &\xrightarrow{2\pi\delta_I\tau I_z} I_x \cos(\pi\delta_I\tau) + I_y \sin(\pi\delta_I\tau) \\
 &= \frac{1}{2} \left(I^+ e^{-2\pi\delta_I\tau} + I^- e^{-2\pi\delta_I\tau} \right)
 \end{aligned} \tag{2-10}$$

Para seleccionar el CTC deseado y eliminar todos los restantes, existen dos metodologías: i) la utilización de ciclos de fase (ver sección 2.3) y ii) la utilización de gradientes de campo magnético (ver sección 2.5.2).

2.3 Selección de coherencia mediante ciclos de fase

La selección de los CTC utilizando ciclo de fases consiste en repetir un número determinado de veces una secuencia de pulsos utilizando, en cada caso, diferentes ejes (x o y) para la generación de los pulsos y para la adquisición de las FIDs (caídas libre de la inducción llamadas así por sus siglas en inglés *Free Induction Decay*). Las FIDs de estas adquisiciones se combinan entre sí de tal forma que las señales deseadas se suman, mientras que las no deseadas se cancelan. Muchas secuencias de pulsos emplean los métodos básicos de ciclo de fases conocidos como CYCLOPS (*CYClically Ordered Phase Sequence*) y EXORCYCLE (*Phase cycle to suppress 'ghost' and 'phantom' artefacts in spin-echo sequences*) para los pulsos de 90° y 180° respectivamente.

Una desventaja asociada a los ciclos de fases es que, por ser un método diferencial, requiere una gran estabilidad experimental y un rango dinámico grande debido a que pequeños cambios en la amplitud, en el ancho de la banda o en la fase de las señales entre las diferentes adquisiciones pueden generar un proceso de sustracción deficiente que se puede manifiestar en forma de artefactos de resta en los experimentos 1D, o en ruido t_1 en los experimentos 2D. Otra desventaja es la necesidad de adquirir ciclos de fases completos, lo que puede provocar largos tiempos de adquisición que pueden ser evitables en casos de trabajar con muestras concentradas.

2.4 Gradiente de campo magnético

Prácticamente, los gradientes de campo magnético se pueden generar de dos maneras. La primera es utilizando la bobina de *shims* para generar un campo inhomogéneo, pero este método solo produce gradientes con amplitud de $\sim 1 \text{ G cm}^{-1}$. Los gradientes producidos con la bobina de *shims* se llaman pulsos *homospoil*. En la segunda opción, se crean variaciones controladas del campo magnético al aplicar una corriente a través de una “bobina de gradiente”, situada en el interior de la sonda, adicional a las bobinas de radiofrecuencias existentes que se utilizan para aplicar los pulsos. El campo magnético producido por esta bobina se suma al campo magnético principal (estático y permanente), y el resultado es un campo magnético diferente en cada punto de la muestra. Normalmente, la variación del campo siempre es lineal a lo largo de un eje preestablecido. Hoy en día se ofrecen sistemas con 3 bobinas de gradiente, que se pueden aplicar simultáneamente en tres direcciones (*x*, *y*, *z*). En la presente tesis doctoral sólo se discutirán gradientes en la dirección del *eje z*, en donde el campo magnético generado por el gradiente es paralelo al campo magnético principal. En las sondas comerciales, la bobina de gradiente puede generar gradientes de campo magnético de algunas decenas de G cm^{-1} durante períodos de tiempo de algunos milisegundos aunque se pueden aplicar gradientes más débiles por períodos de tiempo más prolongados.

2.4.1 Corrientes *eddy*

Las sondas que incorporan una bobina de gradientes tienen que estar diseñadas para que después de aplicar el gradiente se recupere lo más rápidamente posible la homogeneidad en toda la muestra. Desafortunadamente, el cambio rápido del campo magnético causado por pulsar una bobina de gradiente induce corrientes en el material conductor de los alrededores. Estas corrientes, conocidas como corrientes *eddy*, generan un cambio en el campo magnético que puede afectar la evolución posterior de los espines nucleares y provocar, entre otras cosas, distorsiones en el espectro resultante. Estas corrientes *eddy* pueden persistir por algunos milisegundos después de que el gradiente se ha apagado. Hay diferentes aproximaciones para minimizar dichas corrientes:

- ✓ Encender y apagar el gradiente suavemente utilizando pulsos con formas (normalmente gaussiano truncado, media onda sinusoidal o triangular) en lugar de usar un pulso rectangular.^{1,2}
- ✓ Adicionar un tiempo de recuperación antes de la adquisición para que durante este tiempo las corrientes *eddy* se desvanezcan.³
- ✓ Usar pulsos bipolares para auto-compensar las corrientes *eddy*.^{4,5}
- ✓ Utilizar bobinas de gradiente apantalladas, lo cual consiste en adicionar una bobina complementaria a la primera bobina de gradiente, diseñada de tal forma que el campo magnético fuera de las dos bobinas sea cercano a cero mientras que en el interior se mantenga^{6,7,8}. Este método en la práctica puede reducir las corrientes *eddy* en más de dos órdenes de magnitud (<1%). Esto adiciona una gran complejidad en el diseño de la bobina pero permite que experimentos de alta resolución se lleven a cabo de forma muy eficaz.

2.4.2 Linealidad de los gradientes

La calidad de la bobina de gradiente es muy importante para hacer una buena medida experimental de la difusión molecular. Los gradientes deben tener una variación lineal y constante a lo largo de toda la muestra, para que la variación en el campo magnético también sea lineal. La consecuencia de la no linealidad en la aplicación de los gradientes sería importantes deviaciones en la intensidad del campo magnético dependiendo de la posición en el *eje z*.⁹

2.4.3 Bases teóricas

Conceptualmente, las muestras de RMN pueden ser visualizadas como una columna con finas capas (llamadas isocromatos) a lo largo del *eje z*. Los espines en cada capa

¹ Price, W. S.; Hayamizu, K.; Ide, H.; Arata, Y. *Journal of Magnetic Resonance* **1999**, *139*, 205-212.

² Price, W. S.; Kuchel, P. W. *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, *94*, 133-139.

³ Gibbs, S. J.; Johnson Jr, C. S. *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, *93*, 395-402.

⁴ Wider, G.; Dotsch, V.; Wuthrich, K. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1994**, *108*, 255-258.

⁵ Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1995**, *115*, 260-264.

⁶ Mansfield, P.; Chapman, B. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1986**, *66*, 573-576.

⁷ Mansfield, P.; Chapman, B. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **1986**, *19*, 540-545.

⁸ Chapman, B.; Mansfield, P. *Journal of Physics D: Applied Physics* **1986**, *19*.

experimentan un campo magnético diferente y, por lo tanto, tienen una frecuencia de resonancia de Larmor diferente.

Los núcleos que poseen momento angular precesionan a una cierta frecuencia, ω_0 (rad s⁻¹), al estar en un campo magnético externo. Dicha frecuencia depende de la intensidad de campo magnético externo, B_0 (Teslas), mediante la ecuación:

$$\omega_0 = \gamma_I B_0 \quad [2-11]$$

donde γ es la constante de proporcionalidad intrínseca de cada núcleo llamada constante giromagnética (rad T⁻¹s⁻¹). γ_I representa la constante giromagnética del espín **I**.

En los equipos con gradientes en el *eje z* se puede considerar que la muestra está dividida en multitud de discos perpendiculares al *eje z* en los que el campo magnético, $B_{(z)}$, varía linealmente a lo largo del *eje z*, y se puede describir mediante la ecuación:

$$B_{(z)} = B_0 + zG_z \quad [2-12]$$

donde z es la posición en el *eje z*, paralelo a B_0 , y G_z es la potencia del gradiente expresado en T m⁻¹, o más comúnmente, G m⁻¹. En estas condiciones la frecuencia de resonancia de un espín **I** depende de su posición en la muestra, de manera que sólo los espines que se encuentren en el centro de la muestra ($z = 0$) precesionarán a la frecuencia ω_0 durante la aplicación del gradiente. Todos los demás espines se comportarán como si estuvieran en un campo magnético $B_{\text{efectivo}} \neq B_0$ por lo que precesionarán a frecuencias de Larmor (ω_z) distintas de ω_0 , que vendrán determinadas por la expresión:

$$\omega_{(z)} = \gamma_I (B_0 + zG_z) = \omega_I + \gamma_I zG_z \quad [2-13]$$

donde el término ω_I representa la frecuencia de resonancia (rad s⁻¹) del espín **I**.

En el sistema rotatorio, el término ω_I desaparece. Si un gradiente es aplicado durante un tiempo τ , la fase espacialmente dependiente de su posición, $\phi_{(z)}$, vendrá definida por:

⁹ Hurd, R. E.; Deese, A.; O'Neil Johnson, M.; Sukumar, S.; Van Zijl, P. C. M. *Journal of Magnetic Resonance - Series A* **1996**, 119, 285-288.

$$\phi_{(z)} = zG_z\gamma_I\tau \quad [2-14]$$

El efecto de aplicar un gradiente de fuerza G_z y duración τ , a una coherencia de orden p , se verá representado por el factor $p^*\phi$:

$$\begin{aligned} I_z(z, \tau) &= I(z, 0) \\ I^+(z, \tau) &= I^+(z, 0)e^{-I\omega_I\tau} = I^+(z, 0)e^{-I\omega_I\tau}e^{-I\gamma_I G_z \tau} \\ I^-(z, \tau) &= I^-(z, 0)e^{I\omega_I\tau} = I^-(z, 0)e^{I\omega_I\tau}e^{I\gamma_I G_z \tau} \end{aligned} \quad [2-15]$$

Es decir, que además de la evolución habitual con ω_I , un gradiente de campo magnético induce una fase espacialmente dependiente de su posición en el *eje z* de valor $\gamma_I G_z \tau$, de signo negativo para la coherencia I^+ y positivo para I^- , mientras que el operador I_z ($p=0$) no es afectado por el gradiente.

Para obtener el valor “macroscópico” de la coherencia a lo largo de la región activa de la muestra, es necesario integrar la Ec. 2-15 para todas las capas de la muestra de longitud r_{\max} :

$$\begin{aligned} I^+(t) &= \frac{1}{L} I^+(0) e^{-I\omega_I t} \int_{-\frac{1}{2}r_{\max}}^{\frac{1}{2}r_{\max}} e^{I\gamma_I G_z z} dz = I^+(0) e^{-I\omega_I t \frac{\sin(\gamma_I G_z r_{\max}/2)}{\gamma_I G_z r_{\max}/2}} \\ I^-(t) &= \frac{1}{L} I^-(0) e^{I\omega_I t} \int_{-\frac{1}{2}r_{\max}}^{\frac{1}{2}r_{\max}} e^{I\gamma_I G_z z} dz = I^-(0) e^{I\omega_I t \frac{\sin(\gamma_I G_z r_{\max}/2)}{\gamma_I G_z r_{\max}/2}} \end{aligned} \quad [2-16]$$

El gradiente, por tanto, produce una atenuación de las señales dependiente de la función seno cardinal ($\gamma_I G_z r_{\max}/2$) (Ec. 2-17), donde \mathbf{A} es la intensidad en presencia del gradiente y \mathbf{A}_0 es la intensidad inicial. Esta función presenta oscilaciones superpuestas a una atenuación global dada por $2/(\gamma_I G_z \tau r_{\max})$ (Fig. 2-2).

$$\frac{A}{A_0} = \frac{\sin(\gamma_I G_z \tau r_{\max}/2)}{\gamma_I G_z \tau r_{\max}/2} = \text{sinc}(\gamma_I G_z \tau r_{\max}/2) \quad [2-17]$$

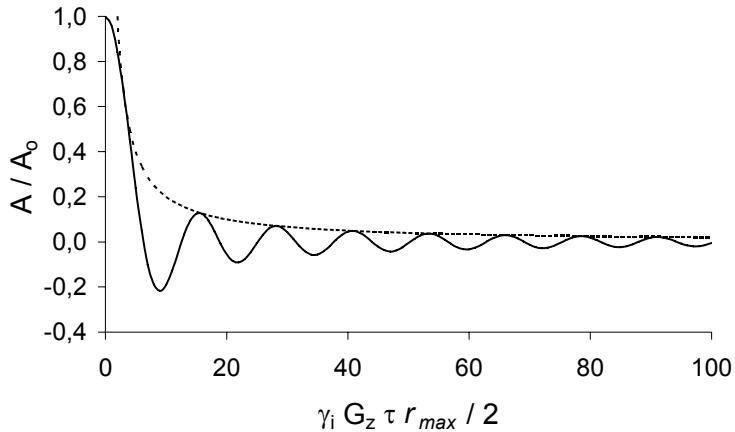


Figura 2-2. Desfase de la magnetización transversal al aplicar un pulso de gradiente. Se representa la amplitud relativa de la magnetización transversal, (A/A_0), en función de $\gamma_i G_z \tau r_{max}$ para mostrar el efecto de aplicar un gradiente pulsado en la dirección z transverso a la magnetización. La línea continua representa la atenuación de la señal en función de $\text{sinc}(\gamma_i G_z \tau r_{max}/2)$ (Ec. 2-17), y la línea punteada representa la caída asintótica global en función de $2/(\gamma_i G_z \tau r_{max})$.

La Ec. 2-17 representa la atenuación de la señal durante un gradiente pulsado e incorpora dos puntos importantes:

- La atenuación es mayor cuanto más intenso es el gradiente o mayor es su duración.
- La coherencia se atenúa más rápidamente cuanto mayor es γ (coherencias de núcleos con mayor razón giromagnética se atenúan más rápidamente).

2.4.3.1 Perfil helicoidal de la fase al aplicar un gradiente en el eje z

El efecto de la aplicación de un gradiente se puede visualizar mediante la representación del perfil helicoidal de la fase de las coherencias transversales que se crea al aplicar un gradiente en el *eje z* (Fig. 2-3). Las coherencias observables tienen componentes positivas y negativas en todos el *plano x*, por lo que, al sumarlas, éstas se pueden cancelar parcialmente y la señal observada aparece atenuada. Esta disminución de la señal depende de la fuerza del gradiente aplicado, que en la representación indicaría como de enroscada está la hélice a lo largo del *eje z*. Cuando más intenso sea el gradiente (o se aplique por mayor tiempo), más enroscada estará la hélice y la señal aparecerá más disminuida.

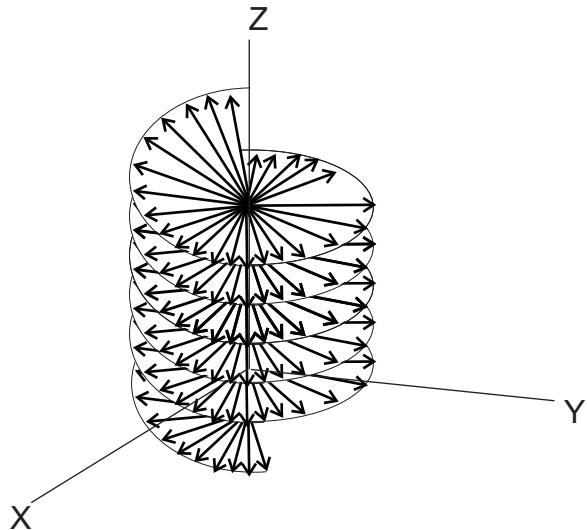


Figura 2-3. Perfil de fase helicoidal de las coherencias transversales al aplicar un gradiente en el *eje z*.

2.4.4 Concepto de desfase y reenfoque

Un gradiente de campo magnético hace que durante un cierto período de tiempo el campo magnético que experimenta un espín en cualquier punto de la muestra sea distinto de B_0 y dependiente de su posición en z . Esto produce un fenómeno de desfase donde las señales deseadas adquieren una fase, ϕ , dependiendo de su posición en el *eje z*. Esta dependencia de la fase de una coherencia de orden p en presencia de un gradiente, \mathbf{G}_z , de duración, τ , viene definida por:

$$\phi = sG_z p_1 \gamma_1 \tau \quad [2-18]$$

donde s es un factor que viene definido por la forma del gradiente utilizado y que es independiente de su duración.

Si aplicamos dos gradientes consecutivos, la fase total correspondiente a una coherencia de orden p_1 durante el primer gradiente y orden p_2 durante el segundo gradiente será proporcionada por la Ec.2-19. En esta ecuación se deduce que si se elige el segundo gradiente de modo que el término entre paréntesis sea nulo, la fase final deja de ser espacialmente dependiente y el efecto macroscópico del desfase producido por el primer gradiente se revierte. Es decir, que se produce un reenfoque de la fase. A este segundo gradiente se le llama **gradiente de reenfoque**.

$$\phi_1 + \phi_2 = (sG_1 p_1 \gamma_1 \tau_1 + sG_2 p_2 \gamma_2 \tau_2)z \quad [2-19]$$

Esto significa que solo los CTC que al final del experimento tengan una fase neta igual a cero serán detectados, mientras que todos aquellos CTC que hayan adquirido una fase neta diferente de cero no serán detectados. La condición de reenfoque se da únicamente cuando la fase neta adquirida a lo largo de todo el CTC es nula, es decir, debe cumplirse que:

$$\sum s_I G_{zI} p_I \gamma_I \tau_I = 0 \quad [2-20]$$

En el caso de utilizar gradientes con la misma forma y la misma duración, la Ec. 2-20 se puede simplificar:

$$\sum \gamma_I G_{zI} p_I = 0 \quad [2-21]$$

2.5 Aplicaciones de los gradientes de campo magnético

2.5.1 Método de purga

Los pulsos perfectos, el muestreo exacto y preciso, la digitalización correcta, etc., son aspectos un tanto utópicos, de manera que la obtención de resultados erróneos en forma de artefactos debidos a defectos instrumentales suelen ser una característica común en RMN. Los gradientes de campo se pueden emplear para eliminar señales no deseadas debidas a estas imperfecciones instrumentales. Esto se suele hacer aprovechando, en algún momento de la secuencia de pulsos, que las señales de interés se encuentran en el *eje z*. En estos casos, cuando el gradiente se usa para eliminar las coherencias transversales ($\mathbf{p} \neq 0$) sin alterar la coherencia deseada que se mantiene a lo largo del *eje z* ($\mathbf{p} = 0$), se le llama **gradiente de purga**. Estos gradientes son muy útiles en experimentos donde la magnetización de interés se mantiene largos períodos de tiempo en el plano longitudinal. Para parámetros típicos ($\gamma = 26752 \text{ rad s}^{-1} \text{ G}^{-1}$, $\mathbf{s} = \mathbf{p} = 1$, $\mathbf{G} = 10 \text{ G cm}^{-1}$, $\delta = 0.002 \text{ s}$, $r_{\max} = 1.5 \text{ cm}$), la ecuación predice que la señal residual será tan solo el 0.25% de la intensidad inicial (Ec. 2-17).

2.5.2 Selección de coherencias

Como se indicó en la sección 2.4.4, debido a que la dependencia espacial de la fase es una función del orden de coherencia (Ec. 2-18), es posible reenfocar selectivamente la

coherencia deseada mientras otros caminos continúan desfasados. Para ello los valores de los gradientes deben ser escogidos de tal forma que la fase de las coherencias de interés al final del experimento sea cero (Ec. 2-21).

Las ventajas de usar gradientes pulsados para seleccionar CTC son:

- ✓ La señal de interés puede ser seleccionada en una única adquisición, por lo que en el caso de que la relación señal/ruido sea buena, no es necesario completar los ciclos de fase, con el consiguiente ahorro de tiempo experimental.
- ✓ Se obtienen espectros más nítidos debido a que la magnetización residual es mucho menor que los artefactos de resta en los experimentos de ciclo de fases. Esto es muy importante en casos donde la señal deseada es muy pequeña (como en los experimentos NOE o en experimentos heteronucleares en muestras con abundancia natural de ^{13}C) y puede confundirse con los artefactos de resta.

A pesar de estos beneficios, el uso de gradientes pulsados para seleccionar CTC tiene algunas desventajas:

- ✗ La supresión de los CTC no deseados no es perfecta, ya que los gradientes sólo reducen a nivel de ruido las señales no deseadas, lo que puede ser un problema si estas señales son muy intensas.
- ✗ El uso de gradientes puede implicar una pérdida de señal debido al movimiento de la muestra (normalmente difusión o convección). Esta pérdida es mayor cuando más separados en el tiempo se apliquen los gradientes de desfase/reenfoque.
- ✗ En muchos casos, comparado con el experimento equivalente con ciclo de fase, al utilizar gradientes hay una pérdida de un factor teórico de 2 debido a que sólo se selecciona uno de los dos CTC que contribuyen a la señal final (salvo que los gradientes sean utilizados como gradientes de purga).
- ✗ Se debe tomar en cuenta la posible evolución del desplazamiento químico y de la constante de acoplamiento durante la aplicación de un gradiente, que normalmente es de unos milisegundos de duración. Esta evolución puede causar serios problemas en la fase de la señal a menos que sea reenfocada. La incorporación de los gradientes en periodos de eco de espín suele ser una estrategia muy útil para evitar dichas evoluciones.

2.5.3 Gradientes y movimiento

La selección de un determinado CTC mediante gradientes requiere, inicialmente, un primer gradiente para desfasar las coherencias y, en algún punto posterior de la secuencia, otro gradiente para reenfocarlas. Para que el reenfoque sea completo, las moléculas no deberían moverse a lo largo del *eje z* durante el tiempo existente entre los gradientes de desfase y reenfoque. El movimiento de las moléculas causará inevitablemente cambios en la intensidad de la señal observada debido a que el gradiente de reenfoque no será capaz de recuperar la totalidad de la magnetización a su fase inicial.

Para visualizar cómo el movimiento de las moléculas afecta el resultado de un experimento con selección por gradiente es ventajoso utilizar la versión discreta de la magnetización helicoidal mostrada anteriormente (Fig. 2-3). En este nuevo modelo (Fig. 2-4) la muestra está dividida en planos en las cuales el campo magnético aplicado es aproximadamente homogéneo. Antes de la aplicación del gradiente todos los vectores de magnetización de todos los planos están alineados (Fig. 2-4a). Durante la aplicación del gradiente de desfase, los vectores de cada plano adquieren una velocidad de precesión diferente, por lo que después del gradiente han adquirido una fase diferente, en función de su posición *z* (Fig. 2-4b). La adquisición de la FID después del gradiente de desfase no nos proporcionaría ninguna señal. En ausencia de movimiento, el gradiente de reenfoque volverá a alinear la magnetización (Fig. 2-4c). Sin embargo, si los espines se mueven entre el gradiente de desfase y el de reenfoque, la señal al final del experimento cambiará en fase y/o amplitud, dependiendo de la naturaleza del movimiento.

El experimento básico que permite estudiar estos efectos es el eco de espín con gradientes, PFGSE (ver capítulo 3).

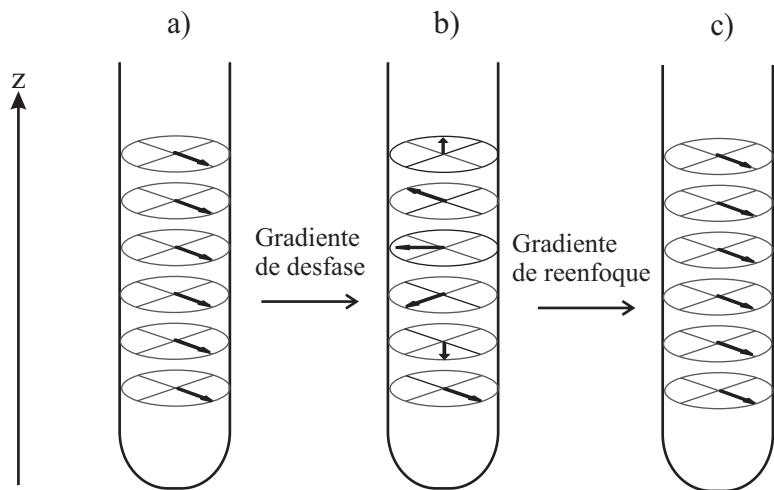


Figura 2-4. Versión discreta de la magnetización. a) Antes de aplicar el gradiente de desfase, todos los vectores están alineados. b) Despues del gradiente de desfase, los vectores han adquirido una fase dependiendo de su posición z . c) Despues del gradiente de reenfoque, los vectores están nuevamente alineados.

2.5.3.1 Movimiento coherente

Movimiento coherente es el movimiento que persiste en dirección y magnitud a lo largo de la escala de tiempo del experimento. Ejemplos de este tipo de movimiento son el flujo laminar y la convección.

La Fig. 2-5 muestra la secuencia de eventos cuando despues de aplicar un gradiente de desfase (Fig. 2-5b) y antes de aplicar el gradiente de reenfoque (Fig. 2-5c) hay un movimiento coherente en una sola dirección (en este caso el movimiento es hacia abajo). Como se ve al final del experimento (Fig. 2-5d), las coherencias son realineadas al final del experimento pero han adquirido una fase dependiente de la velocidad. Es gracias a este efecto que se pueden crear secuencias especiales (ver sección 4.2.1) para compensar el efecto del movimiento a velocidad constante, como lo es el movimiento causado por la convección (capítulo 4).

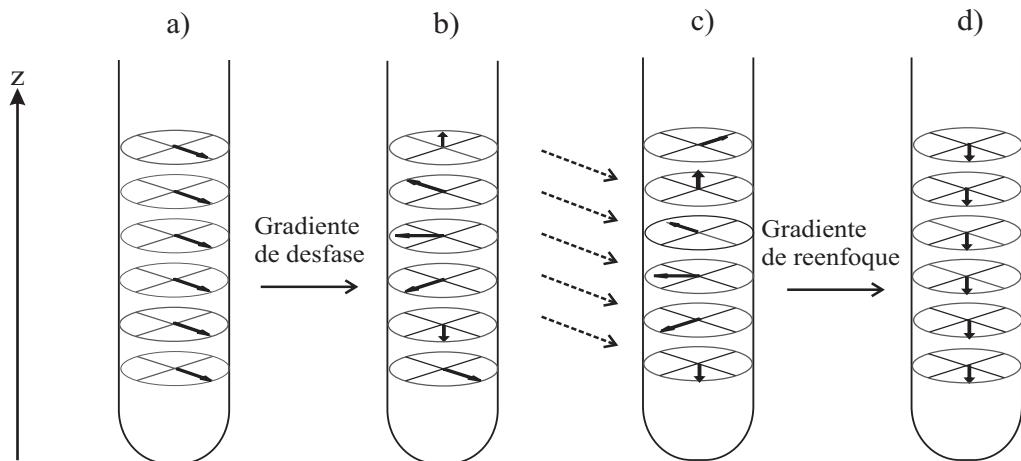


Figura 2-5. Secuencia de eventos en presencia de movimiento coherente en una dirección. a) Antes de aplicar el gradiente de desfase b) Despues del gradiente de desfase. c) Despues de un movimiento uniforme de la muestra a lo largo del eje del gradiente. d) Despues del gradiente de reenfoque. Al final del proceso, los vectores están alineados pero han adquirido una fase diferente a la inicial dependiente de la velocidad de dicho movimiento.

2.5.3.2 Movimiento Incoherente

El movimiento incoherente es el movimiento aleatorio de las moléculas. Ejemplos son el flujo turbulento y la difusión. Su efecto sobre la señal de RMN es muy diferente al del movimiento coherente: mientras que el movimiento coherente causa cambios en la fase de las señales y alguna vez cambios en la intensidad, el movimiento incoherente nunca cambia la fase, sólo reduce la intensidad de las señales debido a que causa una distribución simétrica de la fase de los espines en toda la muestra.

2.5.4 Imagen

La idea de obtener imágenes mediante la RMN (RMI) fue introducida por Lauterbur en 1973, quien demostró que la RMN podía utilizarse para mapear densidad de espines¹⁰. Desde entonces, la RMI se ha convertido en una técnica de rutina con amplias aplicaciones en medicina, ingeniería química y biología. Muchos experimentos de imagen RMI se basan en la variación espacial del campo magnético generado por los gradientes. Sin embargo, esta dependencia toma diferentes formas. En algunos experimentos, los gradientes son utilizados para resolver las señales que llegan simultáneamente de diferentes partes de la muestra. En otros experimentos, los

¹⁰ Adriaensens, P.; Polaris, A.; Kelchtermans, M.; Gelan, J. *Macromolecules* 2003, 36, 706-711.

gradientes se usan para restringir la región de la muestra que contribuirá a la señal de RMN.

A continuación se describen las bases de uno de los experimentos de imagen que en la presente tesis doctoral se utilizará para estudiar el perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z* (Fig. 2-6). El fundamento de este experimento consiste en aplicar un gradiente durante la adquisición de los datos con lo que señales de diferentes regiones de la muestra podrán ser discriminadas debido a su frecuencia de Larmor diferente. El resultado de la transformada de Fourier de estas señales es un mapa de la densidad de espín, o en otras palabras, una imagen de la muestra (Fig. 2-7). El gradiente que se aplica durante la adquisición es conocido como **gradiente de lectura** debido a que permite leer la densidad de espín a lo largo del *eje z*. En el capítulo 5, esta técnica conocida como “Imagen de Fourier en una dimensión” se combinará con la secuencia básica de difusión para poder estudiar el perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z* en los experimentos de difusión.

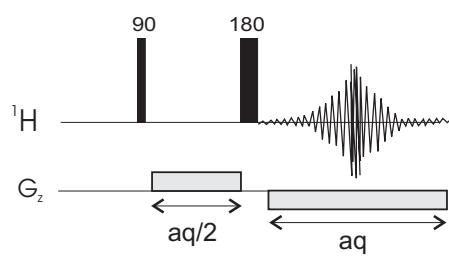


Figura 2-6. Experimento para mapear la densidad de espines a lo largo del *eje z*. En el canal de gradientes G_z , se representan gradientes pulsados con forma rectangular: “aq” es el gradiente de lectura que se aplica durante el tiempo de adquisición, y “aq/2” es un gradiente que se introduce para corregir la fase adicional producida por el gradiente durante la adquisición.

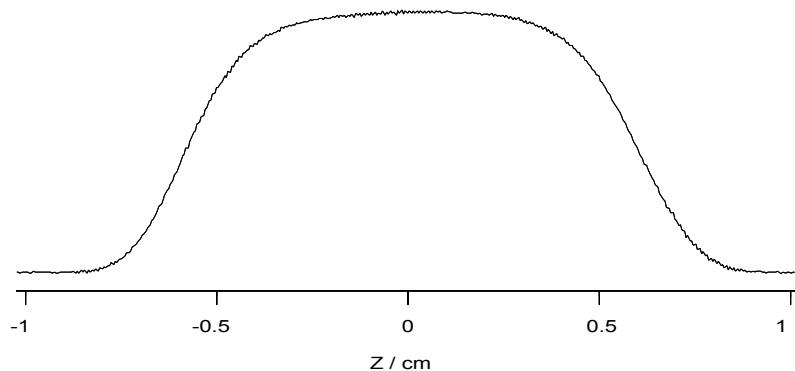


Figura 2-7. Espectro de ^1H de una muestra 1% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ adquirido en un equipo de 400 MHz con la secuencia de la Fig. 2-6. El espectro, procesado en modo magnitud, representa el perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*. Las condiciones experimentales son: tiempo de adquisición de 8.6 ms, fuerza de gradiente de 5.53 G cm^{-1} (9% de la corriente máxima) y un ancho de ventana espectral de 150 ppm.

2.6 Difusión Molecular

El término difusión es utilizado para describir muchos procesos físicos diferentes. En RMN, difusión puede referirse a difusión de espín, difusión rotacional o difusión translacional. En la presente tesis, al utilizar el término de difusión sólo se hará referencia a difusión molecular, una forma de difusión translacional debida al movimiento Browniano de las moléculas en solución que ocurre en ausencia de cualquier fuerza externa (como gradientes de concentración o campos eléctricos).

En el movimiento debido a la difusión molecular, la translación de las moléculas se debe solamente a su energía cinética. Al moverse, las moléculas colisionan entre sí y cambian la dirección del movimiento. A lo largo del tiempo, el movimiento de una molécula sigue un camino aleatorio que resulta en una propiedad conocida como coeficiente de difusión, **D**. En otras palabras, el coeficiente de difusión describe la distancia que una molécula se mueve en un medio específico durante un intervalo de tiempo específico. Por ello, el coeficiente de difusión es definido individualmente para cada molécula en un disolvente dado y a una temperatura específica.

2.6.1 Coeficiente de Difusión

El coeficiente de difusión, **D**, es un valor que representa la facilidad con que cada soluto en particular se mueve en un disolvente determinado. Depende básicamente de tres factores: i) Tamaño y forma del soluto, ii) Temperatura, y iii) Viscosidad del disolvente (el cual por sí mismo es función de la temperatura).

El aumento del tamaño del soluto o de la viscosidad del disolvente dificulta la difusión, mientras que el aumento de la temperatura la acelera. A igual masa molecular, los solutos esféricos difunden con más facilidad en el agua que los solutos alargados principalmente debido a aspectos de superficies de contacto. Las unidades del coeficiente de difusión son m^2/seg . Como ejemplo, la tabla 2-1 refleja el valor de **D** del agua (H_2O) a diferentes temperaturas. Se puede observar que **D** aumenta al aumentar la temperatura, es decir, que la misma molécula se mueve más rápido a mayor temperatura.

Tabla 2-1. Valores publicados de D del agua (H_2O) a diferentes temperaturas

$T / ^\circ\text{C}$	COEFICIENTE DE DIFUSIÓN $\mathbf{D} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$		
	Ref. 11	Ref. 12	Ref. 13
0			1.129
1		1.149	
4		1.276	
5		1.313	
10			1.536
15	1.766	1.777	
20	2.025		2.022
25	2.299	2.299	2.296
30	2.597		2.590
35	2.895	2.919	
40	3.222		3.240
45	3.601	3.575	
50	3.983		3.968
56	4.444		
60			4.772
70			5.646
80			6.582
90			7.578
100			8.623

En la tabla 2-2 se muestra un listado del valor de \mathbf{D} para una serie de compuestos con masas moleculares entre 150 g/mol y 550 g/mol, a 25 °C y en tres disolventes diferentes: CDCl_3 ($\eta=0.44 \text{ cP}$), DMSO-d_6 ($\eta=2.24 \text{ cP}$) y MeOD ($\eta=0.60 \text{ cP}$)¹⁴. Al analizar los resultados se puede concluir que: i) para un mismo disolvente, a mayor masa molecular el valor de \mathbf{D} disminuye; ii) para un mismo compuesto, el valor de \mathbf{D} disminuye al aumentar la viscosidad del medio. En algunos casos, valores invertidos pueden ser evidencias de la existencia de diferentes formas de solvatación.

¹¹ Holz, M.; Heil, S. R.; Sacco, A. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, 2, 4740-4742.

¹² Mills, R. *Journal of Physical Chemistry* **1973**, 77, 685-688.

¹³ Caboi, F.; Lazzari, P.; Pani, L.; Monduzzi, M. *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, 135, 147-156.

Tabla 2-2. Valor medio del coeficiente difusión (**D**) obtenido con la secuencia BPPLED para una serie de compuestos con masa molecular (**M**) con concentraciones entre 1 y 5 mg en 600 μ l de disolvente (CDCl₃, DMSO-d₆ o CD₃OD) a 25 °C. La variabilidad que se indica es la desviación estándar de tres medidas independientes¹⁴.

NOMBRE DEL COMPUESTO	M	COEFICIENTE DE DIFUSIÓN D / 10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹		
		CDCl ₃	DMSO-d ₆	CD ₃ OD
4-t-butilciclohexanona	154.3	14.29 ± 0.07	5.04 ± 0.02	16.00 ± 0.11
9-fluorenona	180.2	15.37 ± 0.13	4.69 ± 0.01	15.78 ± 0.12
4-bencil-4-hidroxipiperidina	191.3	12.89 ± 0.15	3.56 ± 0.02	15.89 ± 0.08
Ácido 9-fluorenona-1-carboxílico	224.2	12.91 ± 0.05	3.19 ± 0.01	ns*
Bromuro de 4-t-bencilo	227.1	13.9 ± 0.04	4.33 ± 0.05	14.29 ± 0.13
Pindolol	248.3	ns*	2.86 ± 0.02	8.75 ± 0.03
Cloruro de D-(+)-10-alcanforsulfonilo	250.7	12.47 ± 0.15	3.20 ± 0.01	12.51 ± 0.06
Trifenilmetanol	260.3	11.89 ± 0.05	3.15 ± 0.02	ns*
Hidrocloruro de procainamida	271.8	ns*	2.41 ± 0.01	8.31 ± 0.04
BOC-GLY-OSU	272.3	10.13 ± 0.15	2.97 ± 0.01	10.63 ± 0.01
Ácido 3,3,3-trifenilpropiónico	302.4	8.65 ± 0.11	2.77 ± 0.01	9.06 ± 0.02
Cloruro de 2,4,6-trisopropilbencensulfonilo	302.9	11.72 ± 0.08	3.01 ± 0.01	11.40 ± 0.03
Carbonato de 9-fluorenilmethylsuccinimidilo	337.3	9.92 ± 0.09	ns*	ns*
FMOC-L-VALINE	339.4	7.37 ± 0.03	2.48 ± 0.01	8.12 ± 0.06
Beta-D-lactosa	342.3	ns*	2.07 ± 0.02	ns*
Nifedipina	346.4	9.29 ± 0.07	2.64 ± 0.01	10.16 ± 0.15
Ácido lactobiónico	358.3	ns*	1.97 ± 0.04	ns*
Z-D-GLU-OBZL	371.4	7.22 ± 0.05	2.44 ± 0.01	7.99 ± 0.05
Flunarizina	404.5	6.89 ± 0.06	2.10 ± 0.01	7.38 ± 0.01
Diltiazem	414.5	7.36 ± 0.04	2.14 ± 0.01	7.80 ± 0.02
Cloruro de n-Bencilcinchonina	421.0	ns*	2.27 ± 0.01	ns*
FMOC-GLU(OTBU)-OH	425.5	6.77 ± 0.08	2.21 ± 0.01	7.82 ± 0.03
(+/-)Verapamilo	454.6	6.66 ± 0.07	ns*	7.79 ± 0.04
FMOC-LYS(BOC)-OH	468.5	5.74 ± 0.03	2.18 ± 0.01	7.09 ± 0.01
Dipiridamol	504.6	7.05 ± 0.05	2.26 ± 0.03	7.45 ± 0.04
Eriocromo cianina R	536.4	ns*	1.55 ± 0.04	5.10 ± 0.06

ns* No se da el valor de **D** es por falta de solubilidad en ese disolvente.

¹⁴ Esturau, N.; Espinosa, J. F. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 4103-4110.

2.6.2 Predicción del coeficiente de difusión

En un gas ideal, una molécula se moverá a una velocidad promedio dependiente de su masa y de la temperatura. En un líquido, la molécula se moverá con la misma velocidad promedio, pero la distancia recorrida estará restringida por las moléculas del disolvente que la rodean. Esta restricción, representada por la fuerza de fricción \mathbf{F}_f , es proporcional a:

$$\mathbf{F}_f = -f\mathbf{v} \quad [2-22]$$

donde f es el coeficiente de fricción y \mathbf{v} es la velocidad. Para un objeto de forma esférica moviéndose en un líquido con viscosidad, η , la ley de Stokes predice que la fuerza de fricción de una esfera cumple:

$$\mathbf{F}_f = -6\pi\eta r\mathbf{v} \quad [2-23]$$

donde r es el radio de la esfera y \mathbf{v} es su velocidad. En este caso, el coeficiente de fricción viene definido por:

$$f = 6\pi\eta r \quad [2-24]$$

Considerando la relación existente entre la energía cinética de una molécula y la fricción, el valor de \mathbf{D} se puede obtener a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad [2-25]$$

donde k_B es la constante de Boltzman (1.38066×10^{-23} kg m² K⁻¹ s⁻²), T la temperatura (en K) y η la viscosidad de la solución (en N s m⁻² = kg s⁻¹ m⁻¹). Esta ecuación fue originalmente desarrollada para partículas esféricas coloidales, donde se define bien el movimiento Browniano. Sin embargo, también es una aproximación para pequeñas partículas (no esféricas). El uso de la ecuación de Stokes-Einstein para predecir la difusión puede ser mejorada reemplazando el radio de la molécula, r , por su radio efectivo, r_{eff} , también llamado radio hidrodinámico, r_h . El valor de r_h se puede utilizar para compensar factores como las formas de moléculas no esféricas y las esferas de solvatación.

2.6.3 Difusión y su relación con propiedades moleculares

El interés en determinar la velocidad de traslación con la que una molécula difunde se debe a que dicho movimiento está relacionado con importantes propiedades moleculares. Por ejemplo, **D** puede ser utilizado para predecir la masa molecular (**M**) de un compuesto¹⁵. Ejemplos de este tipo de aplicación se pueden encontrar en diversas áreas como, por ejemplo, la distribución estadística de masas moleculares en polímeros¹⁶, la caracterización de aditivos en polímeros¹⁷, el análisis de mezclas complejas de hidrocarburos¹⁸ o en la química de alimentos (Ver más referencia en el capítulo de aplicaciones, tabla 7-1). Esto es posible debido a que **M** depende, en una primera aproximación de:

$$M = \left(\frac{kT}{6\pi\eta FD} \right)^3 \quad [2-26]$$

donde **F** es el llamado factor forma o factor Perrin que depende del coeficiente de fricción:

$$F = f/f_o \quad [2-27]$$

donde **f** es al coeficiente de fricción de la molécula y **f_o** es el coeficiente de fricción de una esfera.

La masa molecular de un compuesto se puede estimar utilizando curvas patrón. Como ejemplo la gráficas de la Fig. 2-8 muestra la dependencia de **D** en función del recíproco de la raíz cúbica de **M** de los compuestos listados en la tabla 2-2. Como se puede observar, la tendencia es que a mayor masa molecular, **M**, menor valor del coeficiente de difusión **D**. Las desviaciones observadas son debido a las diferentes formas de las moléculas, mientras más similares sean los compuestos analizados, en cuanto a estructura y forma, menor desviación habrá. La creación de curvas patrón para estimar **M** ha sido utilizada, por ejemplo, en proteínas¹⁹, polímeros²⁰ y aceite de oliva²¹.

¹⁵ Johnson, C. S. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, 34, 203-256.

¹⁶ Chen, A.; Wu, D. H.; Johnson, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 7965-7970.

¹⁷ Jayawickrama, D. A.; Larive, C. K.; McCord, E. F.; Roe, D. C. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1998**, 36, 755-760.

¹⁸ Kapur, G. S.; Findeisen, M.; Berger, S. *Fuel* **2000**, 79, 1347-1351.

¹⁹ Ahn, S.; Kim, E. H.; Lee, C. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2005**, 26, 331-333.

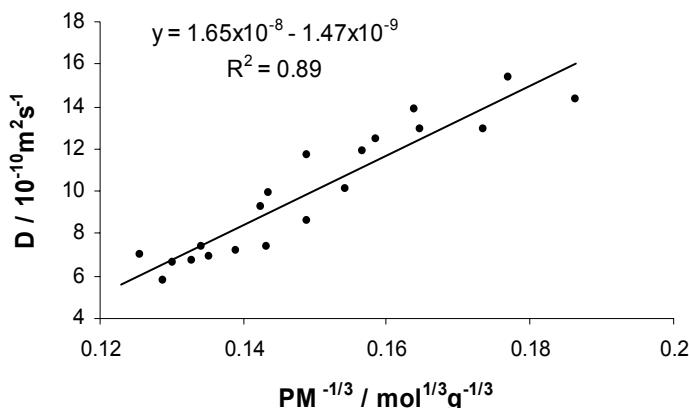


Figura 2-8. Relación lineal entre el coeficiente de difusión y el recíproco de la raíz cúbica de la masa molecular de los compuestos listados en la tabla 2-2 (disolvente CDCl_3).

De las ecuaciones 2-26 y 2-27 se deduce que si la masa \mathbf{M} es conocida y se determina experimentalmente \mathbf{D} , se puede obtener aproximaciones cualitativas sobre la forma de la molécula. Aunque esta afirmación es sólo una aproximación ya que la forma del soluto no siempre correlaciona con \mathbf{D} , para ciertas aplicaciones puede dar conclusiones cualitativas útiles. Por ejemplo, el r_h de una proteína globular puede ser estimado a partir del valor de \mathbf{D} en base a unas correlaciones empíricas entre r_h y el número de residuos \mathbf{N} en un péptido²². Para una proteína en su estado nativo (plegada) la relación es:

$$r_{h, \text{nativo}} = (4.75)N^{0.29} \text{ \AA} \quad [2-28]$$

Mientras que para una proteína desnaturalizada es:

$$r_{h, \text{desnaturalizada}} = (2.21)N^{0.57} \text{ \AA} \quad [2-29]$$

Comparando el valor experimental de r_h con los predichos con las Ec. 2-28 y 2-29 es posible determinar si una proteína se encuentra plegada, desnaturalizada o en un estado intermedio.

El r_h de un compuesto puede ser fácilmente estimado si se considera que la viscosidad de la solución es aproximadamente igual a la del disolvente deuterado puro. Algunos ejemplos que utilizan esta aproximación son la determinación de r_h en

²⁰ Augé, S.; Schmit, P. O.; Crutchfield, C. A.; Islam, M. T.; Harris, D. J.; Durand, E.; Clemancey, M.; Quoineaud, A. A.; Lancelin, J. M.; Prigent, Y.; Taulelle, F.; Delsuc, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 1914-1918.

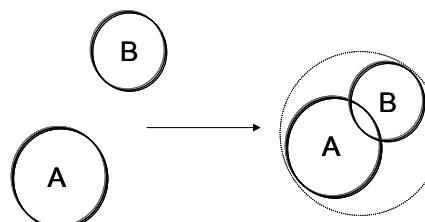
²¹ Crutchfield, C. A.; Harris, D. J. *Journal of Magnetic Resonance* **2007**, *185*, 179-182.

agregados de n-butil litio²³ o la presencia de aniones y cationes solvatados²⁴. El r_h de un compuesto también puede ser estimado por comparación con un compuesto de referencia en la misma muestra que posea un r_h conocido. En estos casos no es necesaria la determinación de \mathbf{D} con mucha precisión ni el conocimiento de la viscosidad de la solución ni de la temperatura de la medida ya que el valor de \mathbf{D} de ambos compuestos se determina simultáneamente en la misma solución mediante la relación de la Ec. 2-30²⁵. Ejemplos de compuesto utilizados como referencia son el dioxano ($r_h = 2.12\text{\AA}$)²⁶ o el tetrametilsilano²⁷.

$$r_h = \frac{D_{ref}}{D} r_h^{ref} \quad [2-30]$$

La velocidad con la que una molécula difunde también puede ser utilizada para el estudio de interacciones moleculares. El concepto es muy simple: se basa en el hecho de que el valor de \mathbf{D} de una molécula es alterado tras la adición de otra molécula siempre que haya interacción entre ambas (Fig. 2-9). Esta aproximación puede ser utilizada tanto de manera cualitativa, para identificar compuestos que se unen a un receptor específico en *screening NMR* o en interacciones ligando-huésped, como de manera cuantitativa, para determinar constantes de asociación o la formación de agregados (Ver referencias en el capítulo de aplicaciones, tabla 7-1).

Figura 2-9. Representación de la interacción entre dos moléculas A y B, donde el aumento en el r_h de AB produce la disminución de la velocidad con que las dos moléculas difunden.



$$D_{AB} \neq D_A, D_B$$

²² Wilkins, D. K.; Grimshaw, S. B.; Receveur, V.; Dobson, C. M.; Jones, J. A.; Smith, L. J. *Biochemistry* **1999**, 38, 16424-16431.

²³ Keresztes, I.; Williard, P. G. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 10228-10229.

²⁴ Balzano, F.; Cuzzola, A.; Diversi, P.; Ghiotto, F.; Uccello-Barretta, G. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 5556-5562.

²⁵ Ackerman, M. S.; Shortle, D. *Biochemistry* **2002**, 41, 13791-13797.

²⁶ Morar, A. S.; Olteanu, A.; Young, G. B.; Pielak, G. J. *Protein Science* **2001**, 10, 2195-2199.

²⁷ Cabrita, E. J.; Berger, S. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2001**, 39.

3 METODOLOGÍA

La secuencia de pulsos eco de espín con gradientes (PFGSE) es el experimento básico utilizado para determinar el valor de **D**. En teoría, aunque el experimento es capaz de medir tanto la difusión rotacional como la translacional, se suele utilizar principalmente para medir ésta última. En la bibliografía se pueden encontrar excelentes artículos de revisión con los fundamentos, las bases teóricas y las aplicaciones.^{28, 29, 30}

Para la determinación experimental del valor de **D** se adquieren una serie de espectros de ¹H utilizando una secuencia basada en PFGSE donde se aumenta progresivamente la fuerza de los gradientes y se analiza la atenuación de la intensidad de las señales en cada espectro. La relación que hay entre la intensidad de la señal observada (**A**) que se obtiene al utilizar gradientes **G_z** rectangulares es una función exponencial descrita por la ecuación:

$$\frac{A}{A_0} = \exp^{-\gamma^2 G_z^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D} \quad [3-1]$$

donde A_0 es la intensidad de la señal de referencia (con intensidad de gradiente nula), δ es la duración de los gradientes (en segundos) y Δ es la separación entre los gradientes (en segundos).

Normalmente, el parámetro más conveniente a variar es la fuerza del gradiente **G_z**, ya que el cambio de la intensidad de las señales es únicamente debido al proceso de difusión. Pero si analizamos la Ec. 3-1, aunque se podría variar Δ en lugar de **G_z**, dicha aproximación no es recomendada ya que el resultado de la variación en la intensidad de la señal no solo reflejaría el proceso de difusión, sino también la relajación, la relajación cruzada y el intercambio químico. También se podría variar la duración del gradiente (δ) en lugar de **G_z**, pero en este caso se debería mantener constante en toda la serie de experimentos el tiempo en que la magnetización está en el plano transversal, ya que de lo contrario la intensidad de la señal se vería afectada tanto por la difusión como por la relajación transversal.

²⁸ Price, W. S. *Concepts in Magnetic Resonance* **1997**, 9, 299-336.

²⁹ Price, W. S. *Concepts in Magnetic Resonance* **1998**, 10, 197-237.

³⁰ Geil, B. *Concepts in Magnetic Resonance* **1998**, 10, 299-321.

Aunque todos los experimentos que utilizan gradientes para la selección de coherencias son sensibles a la difusión, algunos son mejores que otros para obtener una medida correcta de \mathbf{D} . En la bibliografía se han descrito diferentes secuencias de pulsos para la determinación de \mathbf{D} , todas ellas tratando siempre de mejorar la precisión de las medidas. En el presente capítulo se describen las secuencias existentes en la librería de Bruker y otras de nueva creación escritas en este trabajo (ver sección 3.1), se analiza el experimento básico PFGSE y su evolución hasta obtener las secuencias de pulsos que actualmente son más utilizadas y se ilustra como todos estos experimentos pueden ser modificados y acoplados a otros elementos para obtener secuencias más sofisticadas como, por ejemplo, un experimento de difusión con supresión de disolvente (ver sección 3.1.7).

En este capítulo también se describe el método DOSY (*Diffusion Ordered SpectroscopY*)³¹ que se utiliza para representar los resultados en un formato pseudo-2D con el espectro de protón convencional en el *eje x* y el valor del coeficiente de difusión en el *eje y* (ver sección 3.2).

Cuando se tiene una mezcla en la que los componentes no presentan solapamiento en la dimensión del desplazamiento químico, los experimentos de difusión son un método muy atractivo y simple para mostrar los resultados, ya sea mediante el análisis directo de los espectros 1D o mediante la representación DOSY, gracias a la caída monoexponencial de la señales. Sin embargo, cuando hay solapamiento de señales se debe recurrir a programas computacionales con algoritmos capaces de separar la contribución de cada especie al valor de \mathbf{D} (ver sección 3.3), o se pueden combinar los experimentos de difusión con las secuencias convencionales 2D para generar espectros 3D-DOSY y reducir las probabilidades de solapamiento debido a que los picos cruzados están dispersos en todo el plano 2D (ver sección 3.4).

3.1 Secuencias de pulsos para experimentos de difusión

En las tablas 3-1 y 3-2, se encuentra un listado de los experimentos existentes para medir \mathbf{D} , el acrónimo que se utiliza en la presente tesis, el nombre de la secuencia de pulsos con la que aparece en el catálogo de la librería de experimentos de Bruker

³¹ Johnson, C. S. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, 34, 203-256.

(versión Topspin 1.3), o se hace referencia a las secciones donde se describen las secuencias que desarrollamos o modificamos y que no se encuentran en el catálogo.

Tabla 3-1 Secuencias de pulsos para experimentos de difusión

Acrónimo	Nombre del experimento	Nombre del programa de pulsos en la librería de Bruker		Ref.
		Versión 1D	Versión 2D	
PFGSE	Experimento eco de espín con gradientes <i>Pulsed field gradient spin-echo experiment</i>	zggpse		32
PFGSTE	Experimento eco de espín estimulado <i>Stimulated echo experiment (STE)</i>	stegpls1d	stegpls	33, 34
BPPSTE	Experimento eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares <i>Stimulated spin-echo experiment using bipolar gradient</i>	stebpgpls1d	stebpgpls	35
PFGLED	Experimento con tiempo longitudinal para desvanecer las corrientes eddy <i>Longitudinal eddy delay experiment (LED)</i>	ledgp2s1d	ledgp2s	36
BPPLIED	Experimento con tiempo longitudinal para desvanecer las corrientes eddy utilizando pulsos bipolares <i>Longitudinal eddy delay experiment using bipolar gradient</i>	ledbpgp2s1d	ledbpgp2s	35
DSTE	Experimento doble eco de espín estimulado <i>Double Stimulated spin-echo experiment (DSTE)</i>	dstegp3s1d	dstegp3	37
DBPPLIED	Experimento doble eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares <i>Double Longitudinal eddy delay experiment using bipolar gradient</i>	*Sección4.3.1		
GCSTE	Experimento eco de espín estimulado con gradientes compensados. <i>Gradient Compensated STimulated Echo sequence</i>	*Sección3.1.6		38
GCSTESL	Experimento eco de espín estimulado con gradientes compensados y espín lock. <i>Gradient Compensated STimulated Echo sequence Spin Lock</i>	*Sección3.1.6		38

³² Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, 42, 288-292.

³³ Tanner, J. E. *Journal of Physical Chemistry*. **1970**, 52, 2523-2526.

³⁴ Burstein, D. *Concepts in Magnetic Resonance* **1996**, 8, 269-278.

³⁵ Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1995**, 115, 260-264.

³⁶ Gibbs, S. J.; Johnson Jr, C. S. *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, 93, 395-402.

³⁷ Khrapitchev, A. A.; Callaghan, P. T. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **2001**, 152, 259-268.

³⁸ Pelta, M. D.; Barjat, H.; Morris, G. A.; Davis, A. L.; Hammond, S. J. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1998**, 36, 706-714.

BPPLIED-WATERGATE	Experimento eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares y supresión de agua con WATERGATE <i>Stimulated spin-echo experiment using bipolar gradient and WATERGATE</i>	stebpgpls191d	stebpgpls19	
BPPLIED-W5	Experimento eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares y supresión de agua con W5 <i>Stimulated spin-echo experiment using bipolar gradient and double WATERGATE</i>	*Sección 3.5.6		
DBPPLIED-W5	Experimento Doble-LED utilizando pulsos bipolares y supresión de agua con W5	* Sección 4.3.1		
STE-INEPT	Experimento eco de espín estimulado con INEPT	stebpgpin1s1d	stebpgpin1s	
Imagen-SE	Secuencia de pulsos del experimento eco de espín para obtener imágenes.	* Sección 5.3		

* Secuencias de nueva creación, no forman parte de la librería de Bruker.

Tabla 3-2 Secuencias de pulsos para experimentos de difusión combinados con experimentos convencionales

Acrónimo	Nombre del experimento combinado	Nombre del programa de pulsos en la librería de Bruker	Ref.
		Versión 2D	Versión 3D
BPPLIED-COSY	LED-COSY utilizando pulsos bipolares <i>3D-DOSY-COSY using bipolar gradients</i>		ledbpgpc02s3d *Sección 3.5.7
BPPLIED-TOCSY	LED -TOCSY utilizando pulsos bipolares <i>2D-DOSY-TOCSY using bipolar gradients</i>	ledbpgpml2s2d	ledbpgpml2s3d
BPPLIED-TOCSY-WATER_GATE	LED-TOCSY-WATERGATE utilizando pulsos bipolares <i>2D-DOSY-TOCSY using bipolar gradients and WATERGATE</i>	ledbpgpml2s192d	
BPPLIED-NOESY	DOSY-NOESY utilizando pulsos bipolares <i>3D-DOSY-NOESY using LED-bipolar gradients</i>		ledbpgpno2s3d
			45

* Secuencias de nueva creación, no forman parte de la librería de Bruker.

³⁹ Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1996**, 121, 88-91.

⁴⁰ Gmeiner, W. H.; Hudalla, C. J.; Soto, A. M.; Marky, L. *FEBS Letters* **2000**, 465, 148-152.

⁴¹ Jerschow, A.; Müller, N. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1996**, 123, 222-225.

⁴² Birlirakis, N.; Guittet, E. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 13083-13084.

⁴³ Lin, M. F.; Shapiro, M. J. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, 7617-7619.

⁴⁴ Lin, M. F.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 5249-5250.

⁴⁵ Gozansky, E. K.; Gorenstein, D. G. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1996**, 111, 94-96.

3.1.1 Experimento eco de espín (SE)

En 1950 Erwin L. Hahn demostró que un pulso de 180° después de un tiempo Δ revierte el orden relativo de los componentes de la magnetización en el plano transversal y se obtiene un efecto de reenfoque espontáneo de las señales después de un tiempo 2Δ . Por tanto, al cabo de un tiempo 2Δ los componentes de magnetización, que inicialmente fueron desfasados, vuelven a dar un máximo de intensidad de señal. A éste fenómeno se la llamó “eco” de la FID. La secuencia de pulsos eco de espín (SE) basada en el bloque $90^\circ-\Delta-180^\circ-\Delta$ (Fig. 3-1) es uno de los conceptos más simples e importantes en espectroscopia de RMN. La importancia del SE reside en que cualquier vector, independientemente de su frecuencia de Larmor, finalizará alineado con el *eje y* al final del segundo periodo de espera. Esto también se expresa manifestando que el efecto del desplazamiento químico ha sido reenfocado por la secuencia SE.

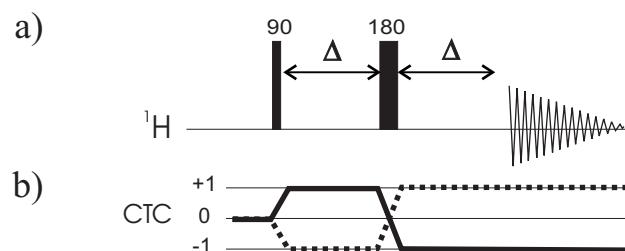


Figura 3-1 a) Secuencia eco de espín (SE). b) Diagrama del CTC. En el CTC la magnetización empieza en $\mathbf{p} = 0$ y el pulso de 90° genera una mezcla de $\mathbf{p} = +1$ (línea continua) y -1 (línea discontinua). Durante el primer periodo Δ no hay cambios en el orden de coherencia, el pulso de 180° intercambia el signo de los operadores de $+1$ a -1 y de -1 a $+1$, y durante el segundo periodo Δ tampoco hay cambios en \mathbf{p} por lo que acaba con una mezcla de $\mathbf{p} = +1$ y -1 . Solo se detecta el orden de coherencia -1

3.1.2 Experimento eco de espín con gradientes (PFGSE)

La secuencia **PFGSE** es muy similar a la secuencia SE excepto que se aplican dos gradientes pulsados (Fig. 3-2). La función del primer gradiente es la de desfasar la magnetización y la del segundo es reenfocarla. Estos dos gradientes pulsados deben ser idénticos en la forma (**s**), duración (**δ**) e intensidad (**G**) para que se cumpla la condición de reenfoque vista en la sección 2.4.4. Los gradientes de desfase y de reenfoque están separados por el tiempo de difusión (Δ). Si durante este tiempo Δ los espines se mueven (difunden) a lo largo del *eje z* no serán reenfocados por el segundo

gradiente y disminuirá la señal del eco de una forma proporcional a la media del desplazamiento de las moléculas en dirección del eje del gradiente.

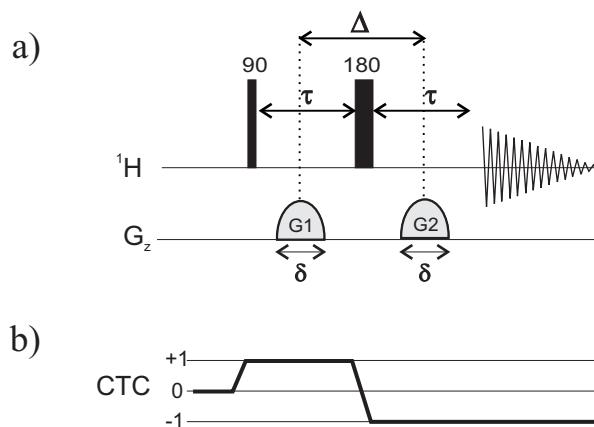


Figura 3-2. a) Experimento eco de espín con gradientes (PFGSE) y b) CTC. En el canal de G_z se representan los gradientes **G1/G2** de desfase/reenfoque, con duración δ , separación Δ (tiempo de difusión), y cuya fuerza se varía simultáneamente y de manera progresiva durante el experimento.

El experimento PFGSE es la secuencia más simple para medir el valor de D , aunque normalmente no es la mejor elección. Con él se pueden determinar con facilidad valores hasta $D = 1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Tiene la ventaja que toda la señal disponible es detectada, pero tiene la desventaja que la magnetización está largos períodos de tiempo (2τ) en el plano transversal. Cuando se trabaja con moléculas que relajan rápidamente (por ejemplo, grandes biomoléculas), el tiempo necesario para poder observar completamente la difusión suele ser largo comparado con los tiempos de relajación transversal T_2 . Además, como el periodo τ no puede ser mucho menor que $\frac{1}{J}$, hay evolución por acoplamiento escalar que provoca distorsiones de los multipletos debido a la contribución de términos en antifase. En estos casos, aunque la señal decaerá de la manera esperada, la integral será menor o incluso cero, reduciendo la relación señal/ruido y, por tanto, afectando seriamente la precisión de los resultados.

3.1.3 Experimento Eco Simulado (PFGSTE)

El experimento PFGSTE (Fig.3-3) se diseñó para reducir el tiempo en que la magnetización se mantiene en el plano transversal, ya que para medir la difusión sólo

es necesario que la magnetización sea transversal durante la aplicación del gradiente ($\tau = \delta + T_r$). En este experimento la magnetización es transversal durante un corto periodo τ (solo un poco mayor que la duración de los gradientes) y, por tanto, los efectos asociados a la relajación dependerán principalmente del tiempo de relajación longitudinal T_1 que suele ser mayor que la del tiempo de relajación transversal T_2 . Además de ser más insensible a los efectos T_2 , los efectos por acoplamiento escalar no son significativos porque $\tau \ll 1/T_1$. Este experimento incorpora un gradiente de purga \mathbf{G}_p , para desfasar la magnetización transversal residual en el periodo T .

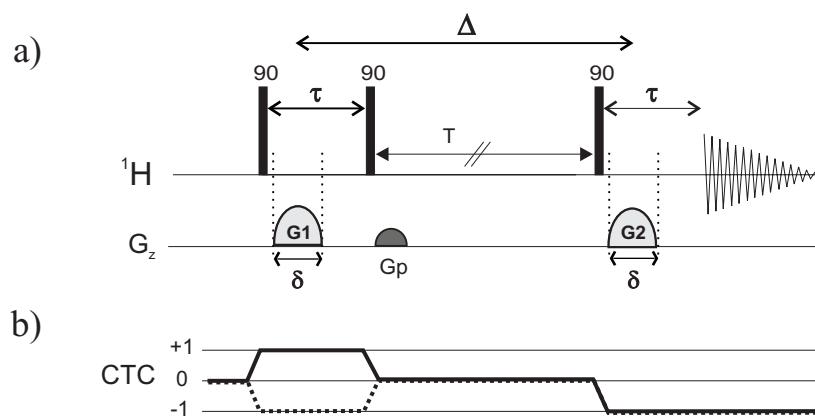


Figura 3-3. a) Experimento eco de espín estimulado (PFGSTE) y b) CTC. En el canal \mathbf{G}_z se representan los pulsos de gradiente: \mathbf{G}_p es un gradiente de purga con fuerza constante, y $\mathbf{G}_1/\mathbf{G}_2$ son los gradientes de desfase/reenfoque, con duración δ , separación Δ , y cuya fuerza se varía simultáneamente y progresivamente durante el experimento. La diferencia $\tau - \delta$ es el periodo de recuperación (T_r) de los gradientes.

Hay que resaltar que el experimento PFGSTE tiene un CTC más restringido que el PFGSE y, en consecuencia, la sensibilidad del experimento es sólo la mitad del experimento original. Esto es resultado del segundo pulso de 90° que gira los componentes de la magnetización del *eje y* al $eje \pm z$ mientras que las componentes del *eje x* continúan en el plano transversal y son eliminadas posteriormente por el gradiente de purga. Sin embargo, esta disminución del 50%, se compensa por la diferente dependencia en la velocidad de relajación ($T_1 > T_2$), por lo que en muchas situaciones, la sensibilidad de PFGSTE puede ser comparable o incluso mejor que la del experimento PFGSE. Hay que tener cuidado cuando la intensidad del gradiente es nula ($G = 0$) ya que la amplitud de las señales depende del desplazamiento químico y

se pueden ver ecos indeseados⁴⁶. En estos casos es mejor evitar estos datos en el análisis final.

3.1.4 Experimento LED (PFGLED)

Un inconveniente de la secuencia PFGSTE es que no compensa posibles errores debidos a corrientes *eddy*. Para compensar estos efectos se puede añadir un filtro-*z*, que consiste en añadir dos pulsos de 90° entre los cuales se aplica un gradiente de purga. En el corto periodo de tiempo entre estos dos pulsos la magnetización se encuentra en el *eje z* ($\mathbf{p}=0$) y el gradiente de purga desfasa la magnetización transversal no deseada (Fig. 3-4).

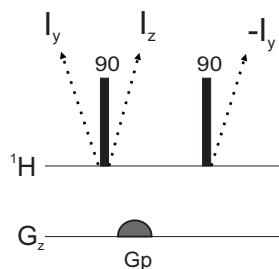


Figura 3-4. Bloque básico de un filtro-*z*. Un gradiente de purga, **Gp**, insertado entre dos pulsos de 90° para seleccionar orden de coherencia $\mathbf{p}=0$ y desfasar cualquier magnetización transversal residual.

Al adicionar un filtro-*z* a la secuencia PFGSTE se obtiene la secuencia PFGLED (Fig. 3-5). Durante el periodo de tiempo que se encuentra entre los dos últimos pulsos de 90°, **Te**, las corrientes *eddy* se desvanecen. Este experimento lleva dos gradientes de purga, **Gp**, para desfasar la magnetización transversal residual en los periodos **T** y **Te**.

Cuando se utilizan gradientes de intensidad moderada la secuencia PFGLED da espectros de muy buena calidad. Sin embargo, cuando se requieren gradientes de intensidad fuertes, el periodo **Te** necesario para obtener señales sin distorsiones puede llegar a ser inaceptablemente largo.

⁴⁶ Chen, A.; Johnson C.S, Jr.; Lin, M.; Shapiro, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 9094-9095.

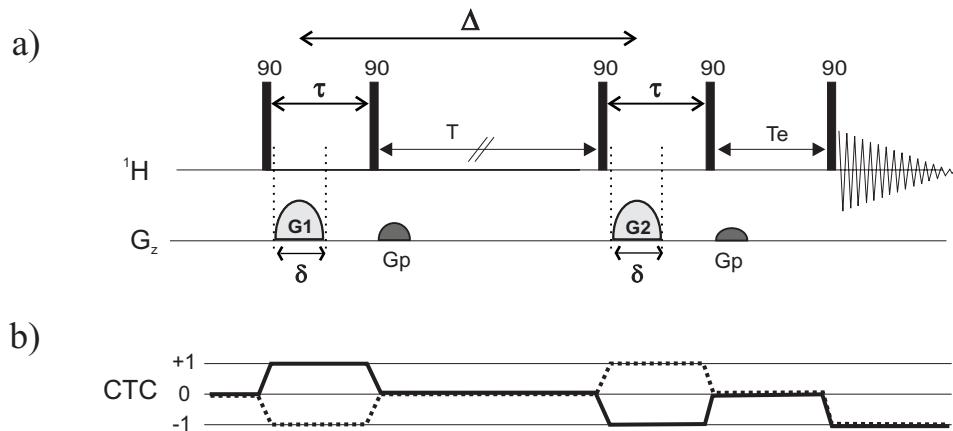


Figura 3-5. a) Experimento eco de espín estimulado con tiempo longitudinal para desvanecer las corrientes *eddy* (PFGLED) y b) CTC. En el canal G_z se representan los pulsos de gradiente: **Gp** son gradientes de purga con fuerza constante pero diferente entre sí, y **G1/G2** son los gradientes de desfase/reenfoque, con duración δ , separación Δ , y cuya fuerza se varía simultáneamente y progresivamente durante el experimento. La diferencia $\tau-\delta$ es el periodo de recuperación (T_r) de los gradientes. T_e es el periodo tiempo en que las corrientes *eddy* que desvanecen.

3.1.5 Experimentos de difusión con pulsos bipolares (BPPSTE y BPPLLED)

Una modificación que permite disminuir las corrientes *eddy* inducidas por los gradientes consiste en reemplazar el gradiente pulsado (de duración δ) por dos gradientes pulsados de diferente polaridad (de duración $\delta/2$ cada uno) separados por un pulso de radiofrecuencia de 180° (Fig. 3-6). Con esta combinación de pulsos de tipo SE se obtiene una auto-compensación de las corrientes *eddy* y, además, se reenfocan tanto la inhomogeneidad del campo B_0 como el efecto del desplazamiento químico durante la aplicación de los gradientes.

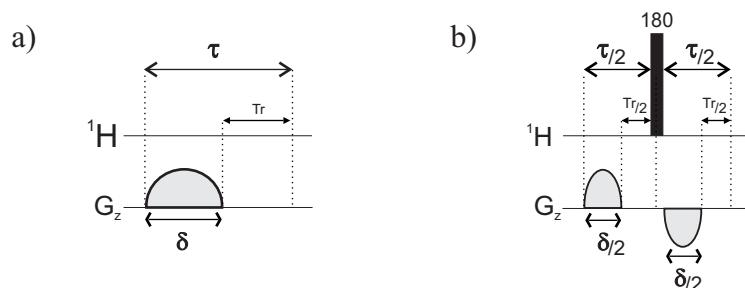


Figura 3-6. Formas de introducción de gradientes de desfase/reenfoque. a) Un gradiente de duración δ , en el que se generan errores de fase debido a la evolución libre bajo los efectos de desplazamiento químico y acoplamiento escalar. b) Bloque básico de dos gradientes de duración $\delta/2$, de polaridad invertida (llamados gradientes bipolares) incorporados en un eco de espín para minimizar los errores de fase. La diferencia $\tau-\delta$ es el periodo de recuperación de los gradientes, T_r .

Al reemplazar todos los gradientes pulsados en las secuencias PFGSTE y PFGLED por pares de pulsos bipolares (BPP=Bipolar Pulsed Pair) se obtienen las secuencias BPPSTE y BPPLIED (Fig. 3-7 y Fig. 3-8). Hoy en día, las secuencias con pulsos bipolares son de las más ampliamente aceptadas, ya que presentan la importante ventaja de que el pulso de 180° insertado en el centro de los gradientes de desfase/reenfoque elimina las modulaciones introducidas cuando hay intercambio químico⁴⁷ o intercambio de magnetización (relajación cruzada o difusión de espín)⁴⁸.

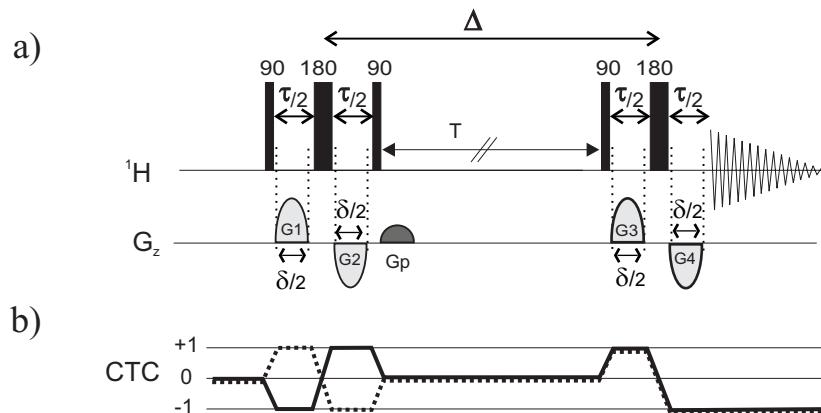


Figura 3-7. a) Experimento eco de espín estimulado utilizando pulsos bipolares (BPPSTE) y b) CTC. En el canal G_z se representan los pulsos de gradiente: G_p es un gradiente de purga con fuerza constante y $G1G2/G3G4$ de duración $\delta/2$, son los gradientes de desfase/reenfoque, con separación Δ , y cuya fuerza se varía simultánea y progresivamente durante el experimento.

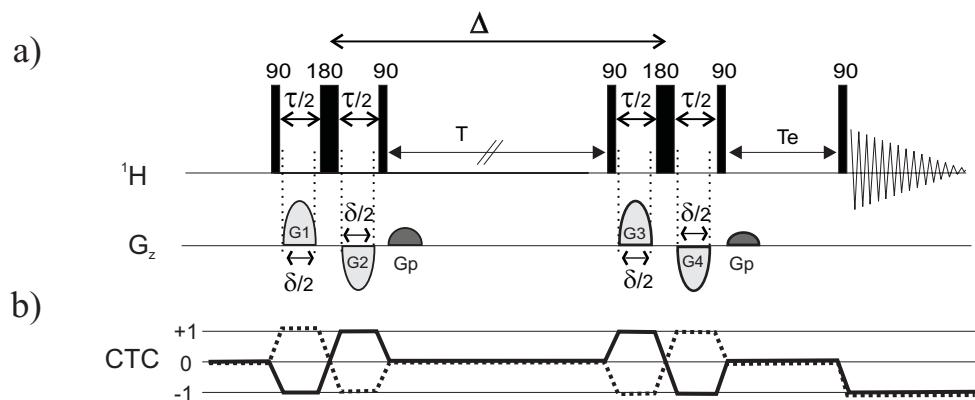


Figura. 3-8. a) Experimento eco de espín estimulado con tiempo longitudinal para desvanecer las corrientes eddy utilizando pulsos bipolares (BPPLIED) y b) CTC. En el canal G_z se representan los pulsos de gradiente: G_p son gradientes de purga con fuerza constante pero diferente entre sí, y $G1G2/G3G4$ de duración $\delta/2$, son los gradientes de desfase/reenfoque, con separación Δ , y cuya fuerza se varía simultánea y progresivamente durante el experimento. El periodo de tiempo en que las corrientes eddy se desvanecen está indicado como T_e .

⁴⁷ Chen, A. D.; Johnson, C. S.; Lin, M.; Shapiro, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 9094-9095.

⁴⁸ Dvinskikh, S. V.; Furó, I. *Journal of Magnetic Resonance* **2001**, 148, 73-77.

3.1.6 Otras secuencias (GCSTE y GCSTESL)

Existe un estudio⁴⁹ en el que comparan las secuencias antes descritas y proponen otras dos secuencias GCSTE (Fig. 3-9) y GCSTESL (Fig. 3-10) cuya única diferencia es que GCSTESL adiciona a GCSTE un pulso *spin lock* de purga antes de la adquisición. Ambas secuencias utilizan pulsos bipolares, pero como uno de los pulsos se coloca dentro del tiempo T , se tiene la ventaja de que se elimina el pulso de 180° , y por tanto, se reduce el ciclo de fases. Además, estos pulsos dentro del tiempo T funcionan como gradientes de purga. Las desventajas de GCSTE son que para sistemas de espines acoplados puede haber anomalías en la fase (asociadas a coherencias de orden cero) y puede haber efectos de modulación de la amplitud en sistemas con intercambio químico o intercambio de espines. La primera desventaja se elimina en GCSTESL gracias al pulso *spin lock* de purga, pero los efectos de intercambio continúan presentes.

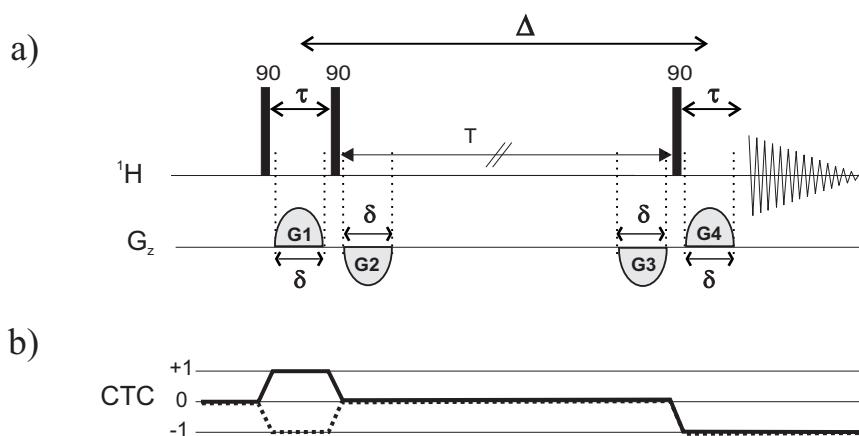


Figura 3-9. a) Experimento eco de espín estimulado con gradientes compensados (GCSTE) y b) CTC. En el canal G_z se representan los gradientes pulsados con duración δ y cuya fuerza se varía simultáneamente y progresivamente durante el experimento. $\mathbf{G1}$ es el gradiente de desfase, $\mathbf{G4}$ es el de reenfoque y su separación es Δ . $\mathbf{G2}$ y $\mathbf{G3}$ funcionan como gradientes de purga, y para compensar el efecto de los otros dos ($\mathbf{G2}$ compensa a $\mathbf{G1}$ y $\mathbf{G3}$ a $\mathbf{G4}$).

⁴⁹ Pelta, M. D.; Barjat, H.; Morris, G. A.; Davis, A. L.; Hammond, S. J. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1998**, *36*, 706-714.

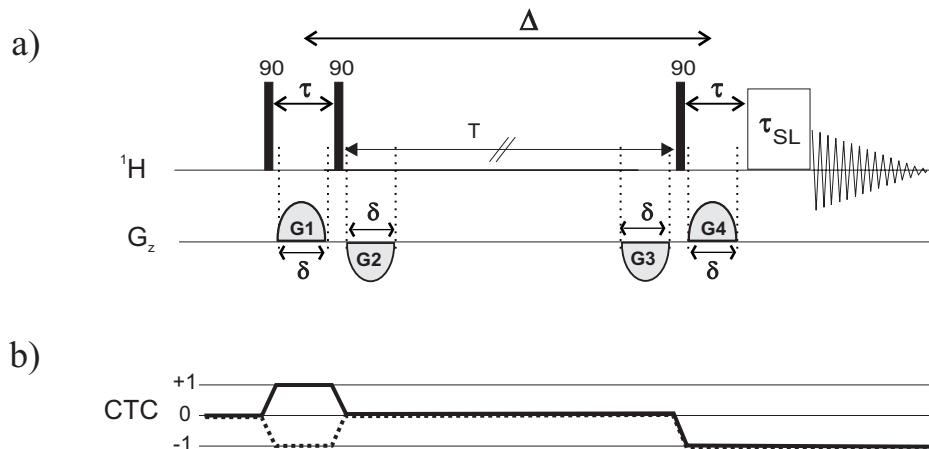


Figura 3-10. a) Experimento eco de espín estimulado con gradientes compensados y *spin lock* (GCSTESL) y b) CTC. El recuadro marcado con τ_{SL} en el canal de radiofrecuencias es un pulso *spin lock* de purga que elimina problemas de fase asociadas a coherencias de orden cero. En el canal G_z se representan los gradientes pulsados con, duración δ y cuya fuerza se varía simultáneamente y progresivamente durante el experimento: **G1** es el gradiente de desfase, **G4** es el de reenfoque y su separación es Δ . **G2** y **G3** funcionan como gradientes de purga, y para compensar el efecto de los otros dos (**G2** compensa a **G1** y **G3** a **G4**).

3.1.7 Experimentos de difusión acoplados a otros experimentos.

Todas las secuencias de pulsos para determinar \mathbf{D} pueden ser modificadas y acopladas a otros experimentos de RMN convencionales. Para ello es necesario sustituir algunos de los pulsos en las secuencias convencionales (normalmente el primero o el último pulso de 90°) por una secuencia de difusión. Por ejemplo el experimento de difusión con supresión de disolvente se puede diseñar añadiendo el método WATERGATE al final de la secuencia de difusión (Fig. 3-16) o el experimento DOSY-COSY sustituyendo el primer pulso de 90° en el experimento COSY por una secuencia de difusión (ver sección 3.5.7).



Figura 3-11. Representación de una secuencia de difusión acoplada a una secuencia convencional. En a) se sustituye el primer y en b) el último pulso de 90° de la secuencia convencional por la secuencia de difusión. X representa el canal o canales de radiofrecuencias que pueden ser ^1H y ^{13}C u otros núcleos.

3.2 Espectros de difusión en 2 dimensiones. La representación DOSY

El espectro de RMN de una mezcla de compuestos es equivalente a la superposición de los espectros individuales de cada uno de estos compuestos con unas proporciones de las señales en función de sus concentraciones relativas. Como los picos de un mismo compuesto presentan el mismo valor de **D**, es posible utilizar los experimentos de difusión para separar e identificar las señales de compuestos diferentes de una misma mezcla. Una manera muy atractiva para representar los resultados de los datos de difusión es el llamado método DOSY (*Diffusion Ordered SpectroscopY*)⁵⁰. Para el usuario final, este método consiste en la adquisición y el procesado automático de una serie de espectros de difusión adquiridos con un incremento de la intensidad de gradiente. En el procesado, se aplica la transformada de Fourier en la dimensión directa y el resultando es la serie de espectro de ¹H, a los cuales se les aplica una transformada de Laplace inversa⁵¹. El resultado final es un mapa 2D con el espectro de RMN en el *eje x* y el coeficiente de difusión (D) en el *eje y*. Dado que en una mezcla de varios componentes en disolución pueden existir especies con diferentes velocidades de difusión (siempre que estas especies posean volúmenes moleculares distintos), las señales de ¹H NMR correspondientes de cada una de estas especies aparecerán en distintas líneas horizontales del espectro DOSY. Una representación teórica de un espectro DOSY correspondiente a una mezcla de 3 compuestos con diferente **D** se encuentra en la Fig. 3-12a, donde las señales de cada compuesto figuran en una posición distinta a lo largo del *eje y*. Aunque solo cualitativamente, es posible extraer una traza horizontal para cada uno de sus componentes para así poder estudiarlo individualmente (Fig. 3-12b).

⁵⁰ Johnson, C. S. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, 34, 203-256.

⁵¹ Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 211-215.

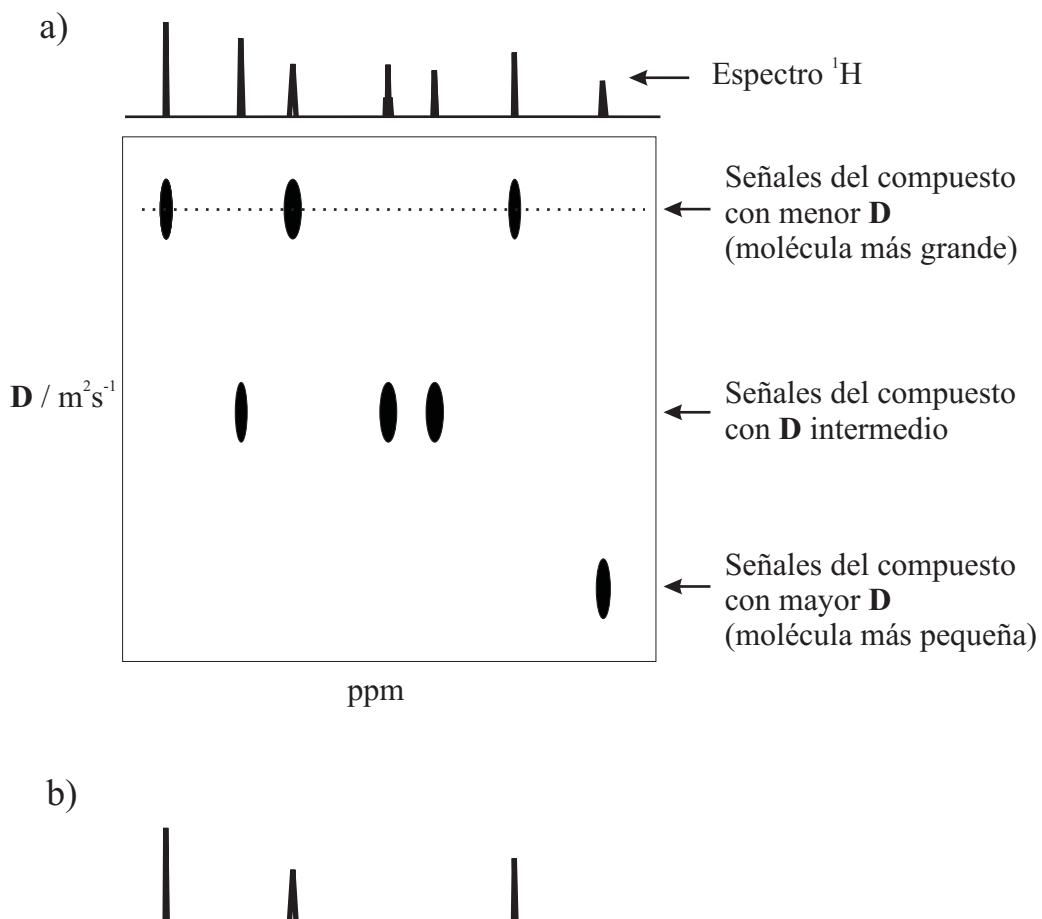


Figura 3-12. a) Representación clásica de un “espectro DOSY” correspondiente a una mezcla de 3 compuestos con diferentes velocidades de difusión. b) Traza 1D correspondiente a las señales del compuesto que aparecen en la fila marcada con la línea discontinua en (a).

3.3 La transformada de Laplace inversa y algoritmos de procesamiento

En el caso de superposición de señales de diferentes compuestos con diferentes valores de **D**, el espectro DOSY ajustado a una función mono-exponencial mostraría una única señal en la dimensión de difusión con un valor promediado de **D** (Fig. 3-13). En estos casos es muy importante ajustar la atenuación de la señal compleja a una función bi- o multi-exponencial, ya que de lo contrario la medida puede llegar a ser totalmente errónea.

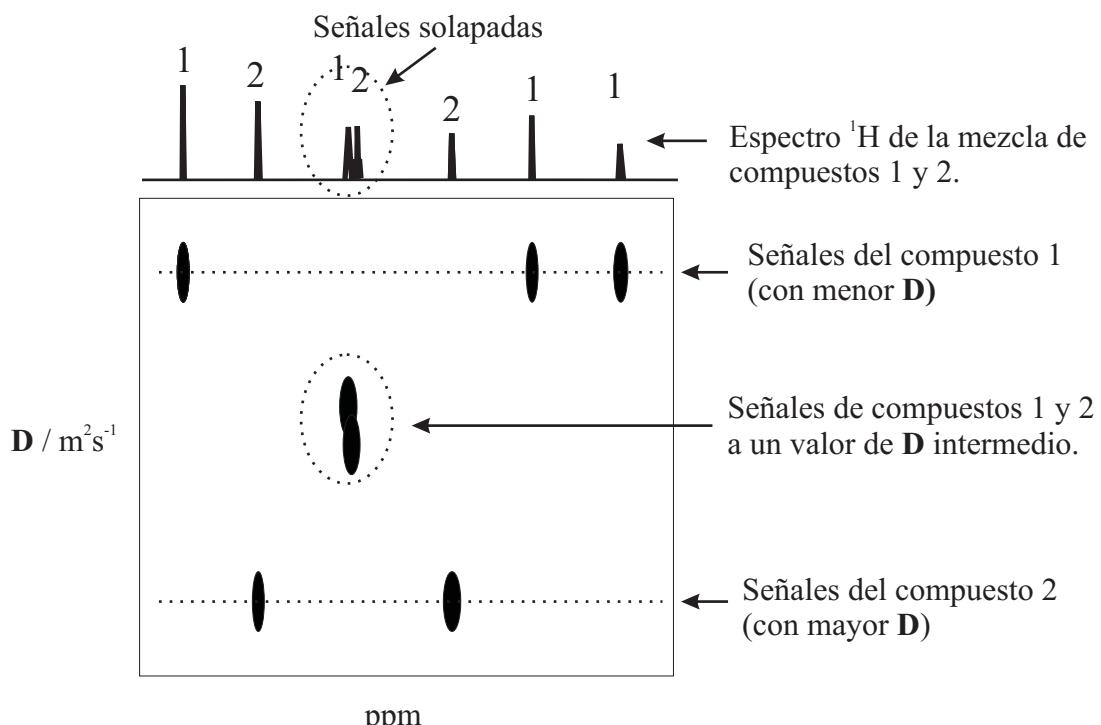


Figura 3-13. Clásica representación de un espectro DOSY procesado con una ecuación mono-exponencial de una mezcla de dos compuestos que presenta una señal solapada.

Un factor a considerar para el procesado y la visualización final de los espectros DOSY resultantes es la utilización de programas computacionales eficientes con algoritmos capaces de analizar el conjunto de datos resultantes de las transformadas de Fourier y de Laplace inversa. El mayor desafío es la aplicación de la transformada de Laplace inversa a las señales de RMN tras la transformada de Fourier ya que, la transformada de Fourier de una FID da un único espectro de RMN, mientras que la transformada de Laplace inversa de una función decremento normalmente no es única y se deben tomar en cuenta una serie de consideraciones. En la tabla 3-3 aparecen enumerados algunos programas de procesado que han sido empleados con éxito. Estos métodos se pueden dividir principalmente en dos grupos, los llamados canal simple o los multivariables. En los métodos de canal simple la caída de cada pico (o cada punto) es analizada de forma independiente del resto de los datos; la resolución de las exponenciales sobreuestas se obtiene con alguna aproximación de la transformada de Laplace inversa, como por ejemplo ajustar una bi-exponencial o utilizar los algoritmos SPLMOD, CONTIN o MAXENT. A diferencia de los métodos de canal simple, en los métodos multivariables se utiliza una sección global del espectro para extraer los espectros de componentes puros y determinar el valor de **D**, utilizando

varias premisas como el número de componentes presentes en la mezcla, el coeficientes de difusión estimado, y/o la forma exacta de la caída de la intensidad de la señal. Estos métodos incluyen programas como el DECRA, CORE y MCR. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos, es importante conocer las ventajas y las debilidades de cada uno, así como de la posible aparición de artefactos indeseados.

Tabla 3-3. Programas de procesamiento de datos de difusión.

PROGRAMA	Ref.
DECRA “Direct Exponential Curve Resolution Algorithm”	52, 53
CORE “Component Resolved”	54
MAXENT “Maximum Entropy DOSY processing”	55
MCR “Multivariate Curve Resolution”	56, 57, 58
DISCRETE	59, 60
SPLMOD	61
CONTIN “Constrained regularization program”	61, 62
SCORE “Speedy Component Resolution”	63
Bi-exponential fitting of DOSY	64

3.4 Experimentos de difusión tridimensionales

Como se ha comentado en la sección 3.1.7, es posible combinar las secuencias de difusión con las secuencias de RMN convencionales (COSY, TOCSY, HSQC etc.) para reducir las probabilidades de solapamiento entre señales debido a la mejor dispersión de los picos cruzados en un plano adicional. Esta tercera dimensión permite obtener espectros 2D característicos donde todos los picos en un mismo plano

⁵² Windig, W.; Antalek, B. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1997**, *37*, 241-254.

⁵³ Antalek, B.; Hewitt, J. M.; Windig, W.; Yacobucci, P. D.; Mourey, T.; Le, K. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, *40*.

⁵⁴ Stilbs, P.; Paulsen, K.; Griffiths, P. C. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 8180-8189.

⁵⁵ Delsuc, M. A.; Malliavin, T. E. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 2146-2148.

⁵⁶ Van Gorkom, L. C. M.; Hancewicz, T. M. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *130*, 125-130.

⁵⁷ Huo, R.; Geurts, C.; Brands, J.; Wehrens, R.; Buydens, L. M. C. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2006**, *44*, 110-117.

⁵⁸ Huo, R.; Wehrens, R.; Buydens, L. M. C. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2007**, *85*, 9-19.

⁵⁹ Provencher, S. W. *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 2772-2777.

⁶⁰ Provencher, S. W. *Biophysical Journal* **1976**, *16*, 27-41.

⁶¹ Morris, K. F.; Johnson Jr, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4291-4299.

⁶² Morris, K. F.; Cutak, B. J.; Dixon, A. M.; Larive, C. K. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 5315-5321.

⁶³ Nilsson, M.; Morris, G. A. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 3777-3782.

⁶⁴ Nilsson, M.; Connell, M. A.; Davis, A. L.; Morris, G. A. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3040-3045.

pertenecen a una especie con el mismo valor de **D**. La Fig. 3-14 muestra la representación de los espectros 2D y 3D-DOSY, de una mezcla de dos compuestos procesados con una función mono-exponencial. En la representación del espectro 3D-DOSY se observa como los compuestos están separados dependiendo de su valor de **D**. Sin embargo, las señales de los compuestos que tiene el mismo desplazamiento químico aparecen a un valor de **D** intermedio (señales de la diagonal), mientras que sus picos cruzados aparecen en el valor de **D** que les corresponde.

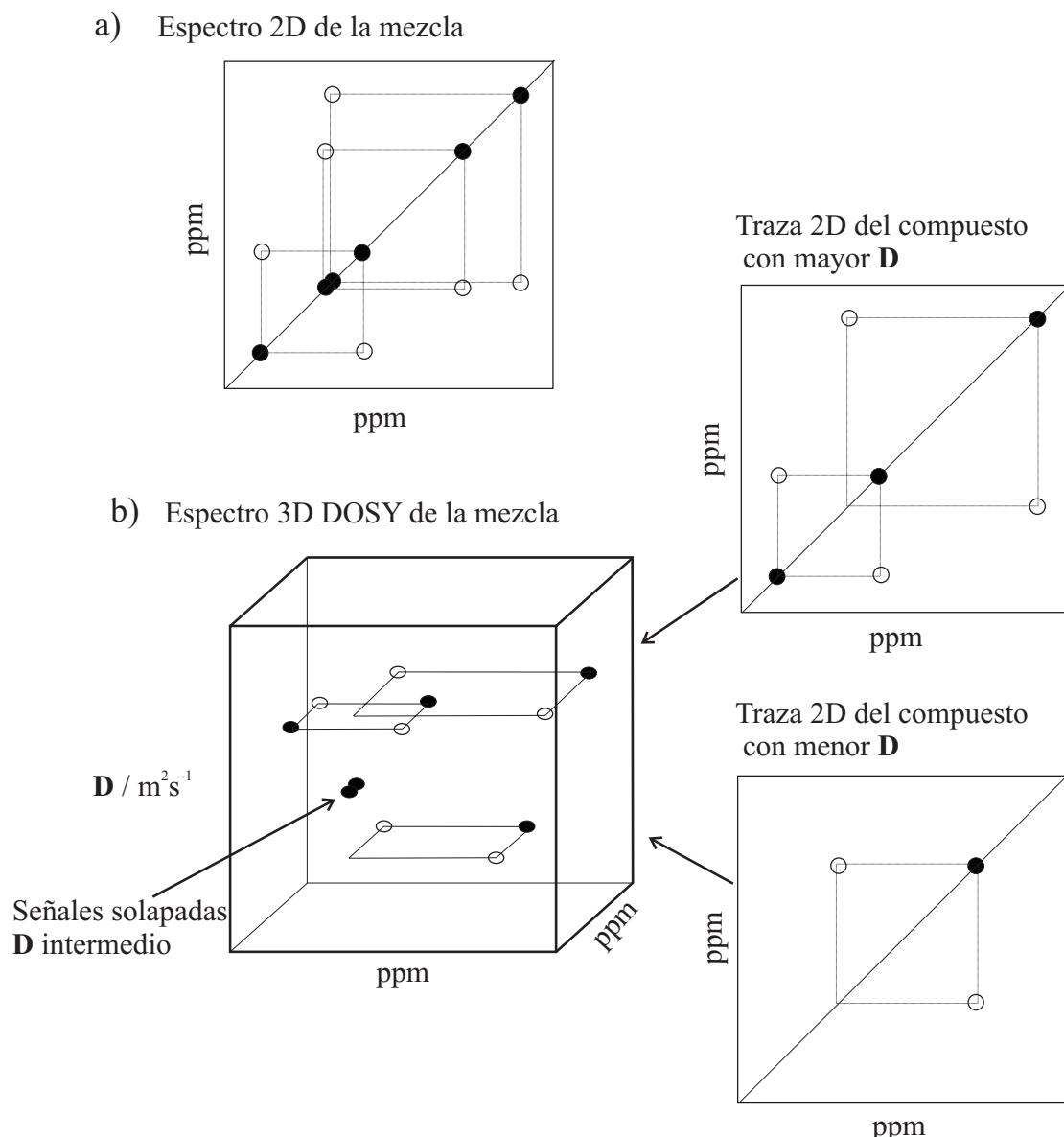


Figura 3-14. a) Representación de un espectro 2D de una mezcla de compuestos procesados con una función mono-exponencial. b) Representación de un espectro 3D-DOSY de una mezcla en la que las señales de la diagonal están solapadas y aparecen en un valor de **D** intermedio, mientras que sus picos cruzados aparecen en el valor de **D** que les corresponde.

Para la determinación experimental del valor de **D** en experimentos 3D-DOSY, se adquieren una serie de espectros 2D en los cuales, al igual que en el caso de experimentos 1D, se varía la fuerza de los gradientes y se analiza la atenuación de la intensidad de los picos cruzados. De este modo, cualquier experimento 2D puede convertirse al análogo peudo-3D-DOSY. El primero en aparecer en la bibliografía fue el experimento DOSY-NOESY⁶⁵. Posteriormente aparecieron otras versiones como los experimentos COSY-DOSY^{66,67}, TOCSY-DOSY^{68,69} también llamado DECODES (*Diffusion EnCODEd Spectroscopy*)^{70,71}, DOSY-HMQC⁷² y 2D-J-DOSY⁷³. Estas secuencias se construían concatenando la secuencia de difusión con un experimento convencional en la forma de DOSY-X o X- DOSY (ver Fig. 3-11), que es la forma en que generaron las secuencias en esta tesis. Alternativamente, han aparecido los experimentos llamados IDOSY donde los gradientes pulsados que codifican la difusión son incorporados dentro de las secuencias convencionales cuando éstas incluyen o permiten acomodar periodos de tiempo del orden de milisegundos. Las secuencias de la familia IDOSY permiten disminuir la necesidad de ciclos de fase y aumentar la relación señal-ruido. Algunos ejemplos de estas secuencias son los experimentos 2D-J-IDOSY⁷⁴, COSY-IDOSY⁷⁵, INEPT-IDOSY y HMQC-IDOSY⁷⁶.

Las principales desventajas de los experimentos 3D-DOSY son el largo tiempo experimental ya que hay que adquirir tantos experimentos 2D como número de puntos se requieran para describir la caída exponencial.

⁶⁵ Gozansky, E. K.; Gorenstein, D. G. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1996**, *111*, 94-96.

⁶⁶ Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1996**, *121*, 88-91.

⁶⁷ Gmeiner, W. H.; Hudalla, C. J.; Soto, A. M.; Marky, L. *FEBS Letters* **2000**, *465*, 148-152.

⁶⁸ Jerschow, A.; Müller, N. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1996**, *123*, 222-225.

⁶⁹ Birlirakis, N.; Guittet, E. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 13083-13084.

⁷⁰ Lin, M. F.; Shapiro, M. J. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 7617-7619.

⁷¹ Lin, M. F.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 5249-5250.

⁷² Barjat, H.; Morris, G. A.; Swanson, A. G. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *131*, 131-138.

⁷³ Lucas, L. H.; Otto, W. H.; Larive, C. K. *Journal of Magnetic Resonance* **2002**, *156*, 138-145.

⁷⁴ Nilsson, M.; Gil, A. M.; Delgadillo, I.; Morris, G. A. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 5418-5422.

⁷⁵ Nilsson, M.; Gil, A. M.; Delgadillo, I.; Morris, G. A. *Chemical Communications* **2005**, 1737-1739.

⁷⁶ Stchedroff, M. J.; Kenwright, A. M.; Morris, G. A.; Nilsson, M.; Harris, R. K. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 3221-3227.

3.5 Experimentos de difusión. Parte Experimental

Los resultados presentados en esta tesis doctoral fueron obtenidos en los espectrómetros de la marca Bruker, modelos AVANCE 500 MHz y ARX 400 MHz que están instalados en el Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Autónoma de Barcelona y el espectrómetro DRX 400 MHz instalado en el Departamento de Química de la Universidad de Cambridge, todos ellos equipados con sondas inversas de alta resolución que incorporan gradientes en el *eje z*.

Todos los compuestos y disolventes utilizados fueron obtenidos comercialmente.

3.5.1 Obtención experimental del coeficiente de difusión

Para la determinación experimental del valor de **D** fueron adquiridos una serie de espectros de ^1H utilizando una de las secuencias basadas en el eco de espín descritas en la sección 3.1. Se determina es el tiempo de difusión, Δ , y la duración de los gradientes, δ , de manera que en un primer experimento utilizando un gradiente muy suave (se recomienda entre 1-5% de la corriente máxima) el espectro resultante muestre prácticamente toda la señal inicial (\mathbf{A}_0). Luego, en un segundo experimento se utilizan gradientes fuertes (95-100% de la corriente máxima) para conseguir una atenuación prácticamente total (entre el 90-95% de atenuación respecto \mathbf{A}_0) de las diferentes señales del espectro. Una vez optimizados todos estos parámetros experimentales, se realizan varios experimentos de difusión variando únicamente, de manera progresiva, la intensidad de los gradientes de desfase/reenfoque para así describir la curva de la caída exponencial en la intensidad de la señal. Normalmente se empieza con un valor mínimo y se va aumentando la intensidad del gradiente hasta llegar al máximo seleccionado. En nuestra experiencia una media de 8-16 incrementos suele dar buenos resultados.

En condiciones óptimas y en ausencia de solapamiento de señales, la relación que hay entre la intensidad de la señal observada (\mathbf{A}) y la fuerza del gradiente es una función exponencial que depende de la forma de gradiente utilizada. Las formas más utilizadas son gradientes rectangulares (Ec. 3-1) o con forma seno (Ec. 3-2):

$$\frac{A}{A_0} = \exp^{-\gamma^2 G z^2 \delta^2 (4\Delta - \delta) D} \quad [3-2]$$

donde A_0 es la intensidad de la señal de referencia (con intensidad de gradiente nula), δ es la duración total de los gradientes que actúan como desfase (s) y Δ es la separación entre los gradientes (s).

Desde el punto de vista teórico, en los experimentos de difusión es preferible utilizar gradientes con forma rectangular para que se aproveche al máximo la intensidad de los gradientes, sobre todo si se trabaja con compuestos de alto peso molecular como, por ejemplo, polímeros o biomoléculas. Sin embargo, en la presente tesis doctoral solo se trabaja con moléculas de tamaño pequeño o mediano, por lo que en los experimentos de difusión se utilizan pulsos de gradiente con forma seno.

Una vez adquiridos los experimentos de difusión con diferentes valores de fuerza de gradiente, se analizó como decrece la intensidad de las diferentes señales (puede ser con la altura o la integral). El valor de D fue calculado mediante la representación de $\ln(A/A_0)$ vs B (donde $B=\gamma^2 g^2 \delta^2 (4\Delta-\delta)$) que da una línea recta cuya pendiente negativa es el valor de D . Al realizar los cálculos de esta forma todos los puntos son utilizados por igual para hacer el ajuste y si en los últimos puntos (donde la atenuación de las señales es grande) la relación señal–ruido es mala los resultados pueden resultar incorrectos. En ese caso, no hay que utilizar estos puntos para el análisis, o hay que obtener el valor de D ajustando directamente la función exponencial.

3.5.2 Generando un espectro DOSY

La representación DOSY se genera automáticamente utilizando los protocolos de adquisición y procesado automático incorporados en los paquetes de software comerciales. En la presente tesis se presentan dos espectros DOSY, uno procesado con el Software de Bruker (Fig. 7-10) y otro con el Software de MestreNova (Fig. 7-4).

3.5.3 Indicaciones para los diferentes tipos de procesado

Hay varias formas de procesar los datos para obtener el coeficiente de difusión, entre ellas están:

- Generar manualmente o semi-automáticamente una lista con la intensidad (o el área) de los picos de las señales de interés en cada espectro y, posteriormente, exportar los datos en un programa de cálculo para:

- Ajustar el decaimiento exponencial o,
- Ajustar la regresión lineal.
- Generar automáticamente la representación DOSY, con el desplazamiento químico en un eje y el coeficiente de difusión en el otro.

Al utilizar el método de regresión lineal, el valor de **D** se obtiene mediante una lista de picos donde cada pico del espectro está representado por un solo resultado, lo que da una alta precisión al resultado. En el caso de utilizar el software DOSY de Bruker o el Mestre-NOVA, el ajuste se hace automáticamente utilizando todos los puntos del espectro de la dimensión directa. Así, cada pico es normalmente representado por varios puntos por lo que el resultado del ajuste del decaimiento de la curva para cada uno de esos puntos puede ser ligeramente diferente, debido al ruido y/o errores de línea base. Por ello aunque el formato DOSY es una forma muy bonita de presentar los resultados, es menos precisa.

En el caso de que existan señales solapadas, el método de la recta de regresión no se puede utilizar ya que es necesario resolver una función bi-exponencial, y el llamado “método DOSY” tiene muchas limitaciones por lo que existen otros métodos complementarios como los enumerados en la sección 3.3.

3.5.4 Calibración de la intensidad de los gradientes

Para obtener el valor correcto de **D** es necesario conocer el valor de la potencia de los gradientes del equipo en que se va a realizar el experimento. En teoría la potencia de los gradientes de los equipos en la UAB es de 53.5 G m^{-1} , sin embargo esto es una aproximación del valor real.

La calibración de la potencia de los gradientes fue llevada a cabo mediante el cálculo del valor de **D** del HDO residual de una muestra de D_2O (99.9 %) a 298°K . Para ello primero se realiza el experimento de difusión y luego se ajusta el valor de la intensidad de los gradientes hasta obtener el valor de $\mathbf{D} = 1.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

El valor de la intensidad de los gradientes que se obtiene para el ARX-400 es de 54.3 G cm^{-1} y para el AVANCE-500 es de 55.4 G cm^{-1} .

3.5.5 Estudio comparativo de las diferentes secuencias de pulsos

Se probaron y compararon las secuencias PFGSTE, PFGLED, BPPSTE, BPPLED y GCSTE utilizando una muestra 15 mM de α -CD en D₂O. En cada caso se adquirieron 7 espectros (td=16K, ds = 8 y *scans* =16) variando los gradientes (**g**) entre 2.7 y 54.3 G cm⁻¹. Cada una de las FIDs se transformó con una función exponencial (lb = 1) y se aplicó la misma corrección de fase y de línea base. Las condiciones experimentales utilizadas fueron: tiempo de repetición de 2s, tiempo de difusión Δ de 150 ms, gradientes con forma seno aplicados a lo largo del *eje z* con una duración total de 2 ms (δ = 2 ms en experimentos normales y $\delta/2$ = 1 ms en experimentos bipolares), **T_e** = 50 ms en las secuencias LED, tiempo de recuperación de los gradientes (**Tr**) de 0.1 ms en las secuencias bipolares y 1 ms en las otras. El registro del valor de la intensidad de las señales para la α -CD se realizó de dos formas: 1) con la altura de 5 señales (los dos picos del doblete H₁ y un pico de las señales correspondientes a los protones H₃, H₄ y H₅), y 2) con el área de la región comprendida entre 3.3 y 3.8 ppm. El valor de **D** se calculó manualmente utilizando una hoja de cálculo Excel. Dado que las condiciones del experimento están optimizadas para obtener el valor de **D** de la α -CD, en el caso del valor de **D** del HDO solo se utilizaron los primeros 4 espectros de los 7 adquiridos ya que la señal del HDO está prácticamente atenuada en los últimos 3 espectros.

La Fig. 3-15 muestra el espectro obtenido con cada una de las secuencias, con una intensidad de gradiente de **g**=54.3 G/cm. Cuando se utiliza la secuencia PFGSTE hay una deformación en la forma de las señales, que se observa fácilmente en la diferente altura de los dos picos del protón H1. Podemos atribuir estas distorsiones del espectro a las corrientes *eddy*, ya que el periodo de recuperación del gradiente no es suficientemente grande para que desaparezcan. Estas deformaciones también se observan, en menor grado, cuando se utiliza la secuencia GCSTE que posee gradientes adicionales de purga para minimizar las corrientes *eddy*. Estas distorsiones son eficazmente eliminadas con las secuencias PFGLED, BPPSTE y BPPLED. En el primer caso por la introducción del periodo LED, en el segundo por la utilización de pulsos bipolares y en el tercero por la combinación de ambas.

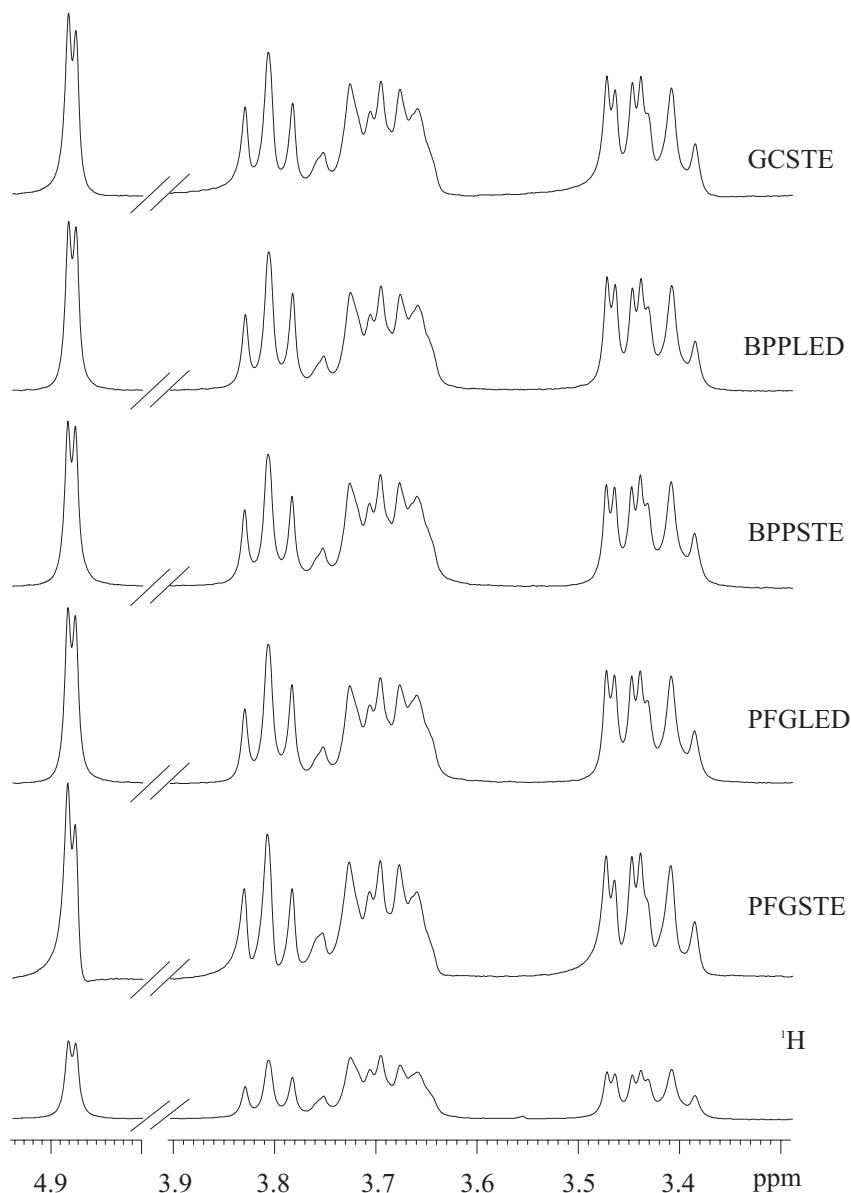


Figura 3-15. Espectros de difusión con una potencia de Gradiente de 54.3 G cm^{-1} , un tiempo de difusión Δ de 150 ms, una duración total de gradientes con forma seno de 2 ms ($\delta = 2 \text{ ms}$ en experimentos normales y $\delta/2 = 1 \text{ ms}$ en experimentos bipolares), en las secuencias con periodo LED $\text{Te} = 50 \text{ ms}$, el tiempo de recuperación de los gradientes es 0.1 ms en las secuencias bipolares y 1 ms en las otras. La intensidad de todos los espectros de difusión ha sido normalizada.

La tabla 3-4 muestra el valor medido de \mathbf{D} y el error de la desviación del análisis de la línea de regresión. Se ve como las deformaciones observadas con la secuencia PFGSTE producen un aumento en la desviación estándar. Además, como estas deformaciones son inducidas por los gradientes y como el grado de degradación se incrementa con la amplitud y duración de los gradientes el resultado es un incremento aparente en el valor del coeficiente de difusión. De entre las dos formas de registrar la intensidad de las señales (área o altura) los resultados muestran que el valor de \mathbf{D} no

difiere significativamente en este estudio y que el valor de **D** es consistente a lo largo de todo el espectro. Es importante mencionar que en relación al procesado de los espectros hay que tomar precauciones en una correcta corrección de la línea base para minimizar posibles errores y mejorar la precisión del análisis.

Con la finalidad de comparar la reproducibilidad con cada una de las secuencia se analizaron por duplicado tres muestras 15 mM de α -CD a 298 K (tabla 3-5). En base a estos resultados se seleccionó la secuencia BPPLED para ser utilizada de manera rutinaria por ser la que presenta menor error en la determinación y porque se pretende utilizar la misma secuencia para compuestos de mayor masa molecular que requieren mayor fuerza de gradientes.

La media y la reproducibilidad de este método utilizando la secuencia BPPLED, se calculó analizando un total de 6 muestras de α -CD 15 mM en D_2O , y se obtuvo un valor de $2.80 \pm 0.0022 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ ($CV=0.82\%$) para la α -CD y de $1.883 \pm 0.0088 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ ($CV=0.47\%$) para el HDO.

Tabla 3-4. Valor experimental del coeficiente de difusión **D** de la α -CD y del HDO residual en una muestra 15 mM a 25°C. La desviación que se da es el error en la regresión lineal (error típico xy).

Secuencia	$D_{\alpha\text{-CD}}^{*a}$ / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	$D_{\alpha\text{-CD}}^{*b}$ / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	D_{HDO}^{*c} / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	D_{HDO}^{*d} / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
PFGSTE	2.99 ± 0.014	2.89 ± 0.011	1.93 ± 0.023	1.94 ± 0.023
PFGLED	2.79 ± 0.005	2.80 ± 0.003	1.84 ± 0.018	1.91 ± 0.018
BPPSTE	2.87 ± 0.011	2.90 ± 0.006	1.83 ± 0.020	1.84 ± 0.019
BPPLED	2.80 ± 0.003	2.82 ± 0.003	1.88 ± 0.023	1.88 ± 0.020
GCSTE	2.88 ± 0.008	2.98 ± 0.005	1.86 ± 0.023	1.96 ± 0.012

*a) **D** promedio utilizando la intensidad del doblete de H1 y una señal de H3, H4 y H5 ($n=5$)

*b) **D** utilizando el área de la región 3.3 a 3.8 ppm ($n=1$)

*c) **D** utilizando intensidad

*d) **D** utilizando área

Tabla 3-5. Valor promedio y desviación estándar del coeficiente de difusión **D** del análisis por duplicado de 3 muestras 15 mM de α -CD a 25°C analizadas con diferentes secuencias de difusión.

Secuencia	$D_{\alpha\text{-CD}}$ / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	D_{HDO} / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
PFGSTE	2.97 ± 0.016	1.889 ± 0.0363
PFGLED	2.79 ± 0.004	1.840 ± 0.0037
BPPSTE	2.90 ± 0.004	1.868 ± 0.0288
BPPLED	2.80 ± 0.003	1.888 ± 0.0088
GCSTE	2.86 ± 0.005	1.860 ± 0.0068

3.5.6 Experimentos de difusión y supresión de H₂O

Cuando se quiere medir **D** en muestras disueltas en disolvente deuterado, la misma secuencia de difusión puede servir para filtrar/minimizar la señal residual del disolvente no deuterado⁷⁷. Sin embargo, cuando se quiere medir el valor de **D** en muestras con grandes cantidades de disolvente no deuterado es aconsejable suprimir esta intensa señal con algún método de supresión de disolvente por mucho que éste difunda más rápidamente. Esto es debido no solo a la dificultad de digitalizar adecuadamente pequeñas señales en presencia de intensas señales sino también por otras complicaciones, como son, el problema de *Radiation-Damping* y los gradientes de fondo debidos a diferencias de susceptibilidad en las interfaces de la muestra^{78,79,80,81,82}. El efecto de *Radiation-Damping* es una interferencia provocada por la propia muestra, cuando la magnetización del disolvente es muy intenso y se comporta como inductora de una nueva radiofrecuencia que redirige las magnetizaciones de los espines de la muestra de nuevo al *eje z*, por tanto el sistema se relajará mucho más rápido de lo que debiera según sus T₁ y T₂ y ello contribuye al ensanchamiento de las señales.^{83,84,85,86} Otro problema asociado a tener una señal muy intensa en el espectro es que causa que el promedio del acoplamiento dipolar de cada espín con los otros espines de la muestra no sea cero. Esto puede describirse como un campo clásico adicional llamado campo dipolar, campo dipolar a distancia o campo “desmantante”, que actúa sobre todos los espines.⁸⁷ Por todo ello, es deseable suprimir las señales de los disolventes, con algún método de supresión, no solo cuando se desean realizar experimentos de difusión sino también en experimentos de RMN convencionales.

Una de las secuencias existentes para suprimir estas señales indeseables es el eco de espín selectivo, más conocido como WATERGATE, que utiliza como elemento de

⁷⁷ Esturau, N.; Espinosa, J. F. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 4103-4110.

⁷⁸ Price, W. S.; Stilbs, P.; Jonsson, B.; Soderman, O. *Journal of Magnetic Resonance* **2001**, 150, 49-56.

⁷⁹ Price, W. S. *Concepts in Magnetic Resonance* **1998**, 10, 197-237.

⁸⁰ Broekaert, P.; Jeener, J.; Lippens, G.; Wieruszkeski, J. M. *Journal of Magnetic Resonance* **2000**, 145, 259-261.

⁸¹ Lin, Y. Y.; Lisitza, N.; Ahn, S.; Warren, W. S. *Science* **2000**, 290, 118-121.

⁸² Mao, X. A.; Ye, C. H. *Concepts in Magnetic Resonance* **1997**, 9, 173-187.

⁸³ Bloembergen, N.; Pound, R. V. *Physical Review* **1954**, 95, 8-12.

⁸⁴ Mao, X. a.; Guo, J. x.; Ye, C. h. *Chemical Physics Letters* **1994**, 222, 417-421.

⁸⁵ Mao, X. A.; Guo, J. X.; Ye, C. H. *Physical Review B* **1994**, 49, 15702-15711.

⁸⁶ Mao, X. a.; Wu, D. h.; Ye, C. h. *Chemical Physics Letters* **1993**, 204, 123-127.

⁸⁷ Broekaert, P.; Vlassenbroek, A.; Jeener, J.; Lippens, G.; Wieruszkeski, J. M. *Journal of Magnetic Resonance - Series A* **1996**, 120, 97-104.

inversión un tren de pulsos duros (3-9-19 o “bloque W5”) ⁸⁸. Este método de supresión puede implementarse como un simple eco o como un doble eco. La Fig. 3-16 muestra como el doble eco fue introducido en la secuencia BPPLED para obtener la secuencia BPPLED-W5 y poder realizar experimentos de difusión con muestras con grandes cantidades de disolvente no deuterado. La Fig. 3-17 muestra los espectros de una muestra de lisozima 2mM disuelta en 90% H₂O/10% D₂O utilizando la secuencia BPPLED y la secuencia BPPLED-W5. En el espectro (a) se ve la intensa señal del agua, que es la que impone la ganancia del experimento, y por tanto apenas se aprecian las señales de la lisozima con una relación señal-ruido muy mala. Mientras que en el espectro (b) se ve que se ha suprimido esta intensa señal y la ganancia del sistema la imponen las señales de la lisozima. Los espectros obtenidos con la secuencia BPPLED-W5 presentan una excelente línea base y una relación señal-ruido aceptable en periodos razonables de tiempo, lo que permite la corrección de fase automática y la determinación precisa de las intensidades y/o el área de las señales.

En la bibliografía se encuentran descritas otras secuencias basadas en el modulo WATERGATE^{89, 90}, así como otras secuencias basadas en otros módulos como, por ejemplo, el bloque WET⁹¹.

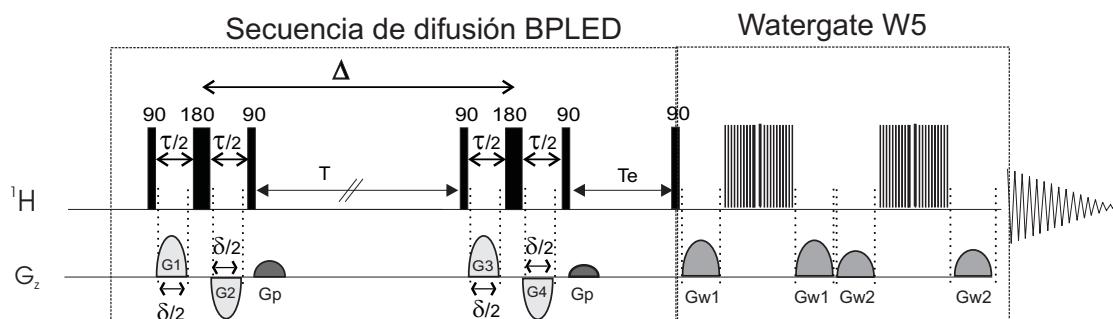


Figura 3-16. Experimento de difusión BPPLED con incorporación de un módulo de supresión de disolvente (Doble-Watergate W5). La primera parte es la secuencia de difusión BPPLED (Fig. 3-8). La segunda parte es el módulo WATERGATE donde el tren de pulsos duros se usa para invertir todas las señales menos la señal que se desea eliminar. Los gradientes que eliminan (desfasan) dichas señales son Gw1 y Gw2 que se mantienen constantes a un valor diferente del los utilizados para los gradientes de la secuencia de difusión.

⁸⁸ Price, W. S.; Elwinger, F.; Vigouroux, C.; Stilbs, P. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, *40*, 391-395.

⁸⁹ Zheng, G.; Stait-Gardner, T.; Anil Kumar, P. G.; Torres, A. M.; Price, W. S. *Journal of Magnetic Resonance* **2008**, *191*, 159-163.

⁹⁰ Zheng, G.; Torres, A. M.; Price, W. S. *Journal of Magnetic Resonance* **2008**, *194*, 108-114.

⁹¹ Simorellis, A. K.; Flynn, P. F. *Journal of Magnetic Resonance* **2004**, *170*, 322-328.

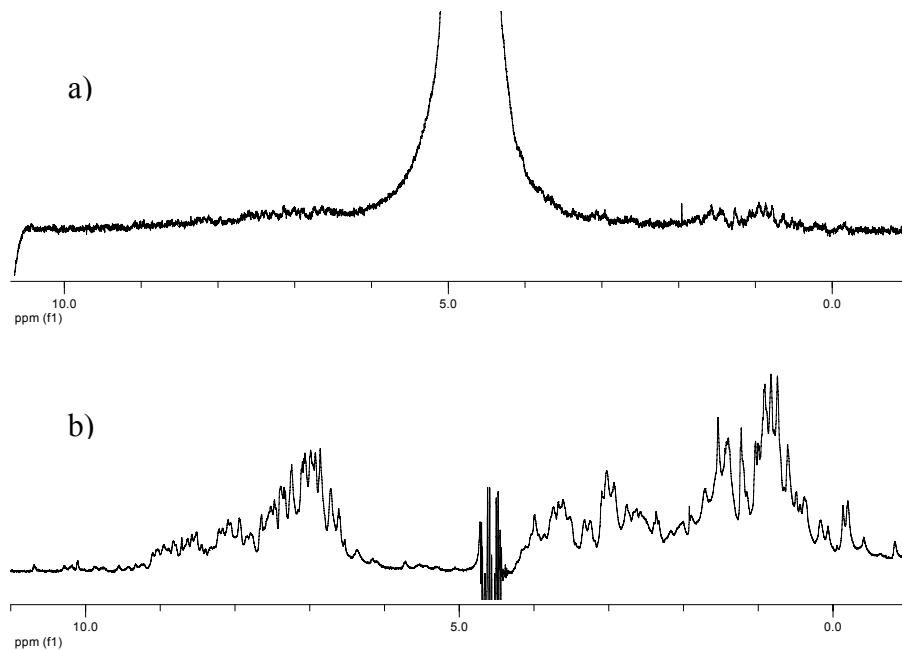


Figura 3-17. Espectros de ^1H de una muestra de lisozima en $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$ (90:10) obtenidos con las secuencias: a) BPPLED b) BPPLED-W5. Las condiciones en BPPLED son: $\mathbf{G}=5\%$, $\Delta=150$ ms, gradientes con forma seno de 3.2 ms ($\delta/2 = 1.6$ ms) con un tiempo de recuperación de gradientes de 0.1 ms, y Te de 50 ms. Las condiciones en W5 son: $\mathbf{Gw1}=37\%$ y $\mathbf{Gw2}=41\%$. $\text{NS}=256$. En BPPLED la ganancia la impone la intensa señal del agua ($rg=2$) y las señales de la lisozima quedan prácticamente en el ruido mientras que en BPPLED-W5 la ganancia la impone las propias señales de la lisozima ($rg=20$).

3.5.7 Experimentos tridimensionales (DOSY-COSY)

Ya que no se disponía de un programa de procesado que permita procesar los datos en forma 3D, los experimentos 2D-DOSY-COSY se adquirieron y procesaron por separado variando el valor de la fuerza de gradiente en cada uno de los 8 espectros 2D. Posteriormente se extrajeron las intensidades de los picos cruzados de cada uno de los 8 espectros individuales 2D para procesarlos con ayuda de una hoja de cálculo Excel, tal como se hizo para experimentos 1D.

Se diseñó la secuencia del experimento DOSY-COSY sustituyendo el primer pulso de 90° de la secuencia convencional COSY con gradientes por la secuencia BPPLED (Fig. 3-18). Por el tema de tiempo de adquisición total, se obtienen resultados aceptables con un ciclo de fases de 2, aunque es mejor aumentar el número de ciclos para mejorar la sensibilidad y obtener un resultado más preciso. Lo óptimo es completar el ciclo de fase de 16 requerido para la secuencia BPPLED.

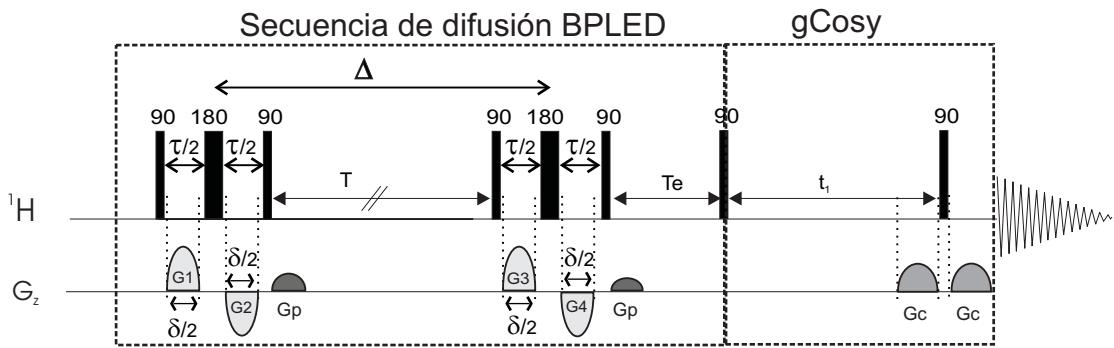


Figura 3-18. Experimento de difusión BPPLED acoplado al experimento 2D-COSY con gradientes. La primera parte es la secuencia de difusión BPPLED (Fig. 3-8). La segunda parte es el experimento COSY con gradientes donde t_1 es el tiempo de evolución libre y G_c son los gradientes de desfase/reenfoque del experimento COSY.

3.5.8 Resumen

El análisis y la puesta a punto de los experimentos de difusión permiten determinar la secuencia a utilizar para calcular el valor de \mathbf{D} de cada sistema en estudio:

- En ausencia de efectos de intercambio químico, cuando se requieren gradientes débiles (coeficientes de difusión grandes) las secuencias recomendadas son GCSTE y BPPSTE. La primera si no hay acoplamientos fuertes y efectos de intercambio y la segunda, si los hay.
- Cuando se requieren gradientes fuertes (coeficientes de difusión pequeños) las secuencias recomendadas son BPPLED y BPPSTE. La primera si la atenuación de la señal debido a la relajación T_1 durante el periodo T_e no es inaceptablemente grande y la segunda, si lo es.

La secuencia BPPLED es seleccionada para obtener el valor del coeficiente de difusión \mathbf{D} de forma general, pero no hay que olvidar que otras secuencias se pueden utilizar en casos particulares. La secuencia BPLED ha sido acoplada a los experimentos convencionales 2D-COSY, WATERGATE y en capítulos posteriores se utilizaran otras secuencias derivadas de la secuencia BPPLED (ver sección 4.2.1).

A menos de que se indique lo contrario, cuando se utiliza la secuencia BPPLED para medir \mathbf{D} las condiciones de trabajo son: Tiempo de difusión (Δ) de 150ms, tiempo Led (T_e) de 50ms, gradientes con forma seno de duración (δ) de 1ms, tiempo de recuperación de los gradientes (T_r) de 100 μ s, y numero de espectros entre 6 y 8 con intensidad de los gradientes entre 5 y 100 % de la corriente máxima.

4 EFECTOS DE CONVECCIÓN EN EXPERIMENTOS DE DIFUSIÓN

Las limitaciones técnicas de los experimentos de difusión son aquellas inherentes a la RMN, por ejemplo, la baja sensibilidad. Además, como se vio en la sección 2.5.3.1, los experimentos que utilizan gradientes son muy sensibles a cualquier efecto debido a movimientos coherentes en la muestra. Una de las fuentes de error en los experimentos de difusión es debida al movimiento coherente generado por gradientes de temperatura a lo largo del tubo de RMN. Estos gradientes térmicos se pueden generar por varias causas, pero el más común es debido al flujo de aire utilizado para regular la temperatura. La presente tesis doctoral profundiza en el estudio de estas corrientes ya que a lo largo del trabajo se manifestó como una de las fuentes de error experimental más grandes, comunes e importantes en los experimentos de difusión.

4.1 Corrientes de convección y pérdida de señal de RMN

El sistema de regulación de temperatura incorporado de los espectrómetros comerciales, ya sea para calentar o enfriar las muestras, está diseñado de tal forma que la corriente de aire o de nitrógeno gas es normalmente aplicadas en la parte inferior de la sonda (Fig. 4-1). Cuando el líquido en la base del tubo está más caliente que el de la superficie hay una tendencia de este líquido caliente, y por tanto menos denso, de subir a la superficie donde se enfriá y regresa a la parte de abajo en un ciclo continuo, lo que da lugar al fenómeno de corrientes de convección (Rayleigh-Benard).

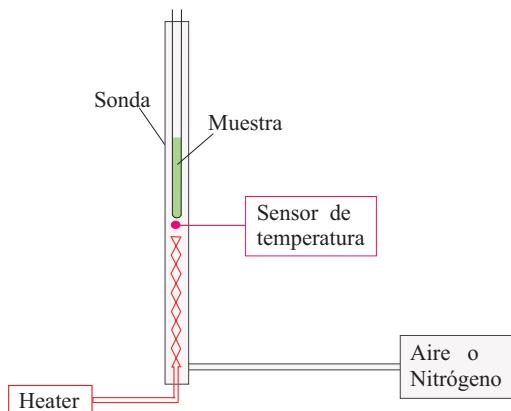


Figura 4-1. Representación del sistema de control de temperatura

El efecto de las corrientes de convección térmica ha atraído mucha atención en los últimos años. Para minimizar sus efectos se han desarrollado diversos métodos (ver sección 4.2), y para entender mejor el fenómeno se han medido las velocidades de convección en el tubo de RMN^{92,93}, se han obtenido las imágenes de los patrones del flujo^{94,95,96} y las imágenes de la distribución de velocidad sin eliminar los efectos de difusión.⁹⁷

4.2 Métodos para eliminar los efectos de convección

Está descrito que para disminuir el problema de los efectos de convección se puede reducir el diámetro del tubo y/o la altura de la muestra, incrementar la viscosidad de la muestra, incrementar la velocidad de flujo o rediseñar el sistema de control de temperatura. Sin embargo, cuando se trabaja a temperaturas superiores o inferiores a la temperatura ambiente cada vez es más difícil controlar estas corrientes y por ello se han desarrollado secuencia de pulsos que compensan dichos efectos. La tabla 4-1 resume los métodos existentes para minimizar los efectos de las corrientes de convección. En esta tabla se incluye una propuesta elaborada en esta Tesis que consiste en trabajar girando el tubo de RMN a velocidades apropiadas. A lo largo del presente capítulo se describe la eficacia de esta propuesta, que se encuentra publicada en el *Journal of Magnetic Resonance*⁹⁸.

⁹² Manz, B.; Seymour, J. D.; Callaghan, P. T. *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, *125*, 153-158.

⁹³ Loening, N. M.; Keeler, J. *Journal of Magnetic Resonance* **1999**, *139*, 334-341.

⁹⁴ Gibbs, S. J.; Carpenter, T. A.; Hall, L. D. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1993**, *105*, 209-214.

⁹⁵ Weis, J.; Kimmich, R.; Müller, H. P. *Magnetic Resonance Imaging* **1996**, *14*, 319-327.

⁹⁶ Jerschow, A. *Journal of Magnetic Resonance* **2000**, *145*, 125-131.

⁹⁷ Mao, X. A.; Kohlmann, O. *Journal of Magnetic Resonance* **2001**, *150*, 35-38.

⁹⁸ Esturau, N.; Sanchez-Ferrando, F.; Gavin, J. A.; Roumestand, C.; Delsuc, M. A.; Parella, T. *Journal of Magnetic Resonance* **2001**, *153*, 48-55.

Tabla 4-1. Métodos existentes para minimizar las corrientes de convección

Método	Ventajas / Desventajas	Ref.
Reducir el diámetro de la muestra.	Retarda la convección. / Requiere tubos especiales.	99, 100
Reducir la altura de la muestra.	Retarda la convección. / Requiere tubos especiales de volumen restringido. Presenta complicaciones debido a la homogeneidad del campo principal y a la difusión restringida.	101
Utilizar tubos de zafiro	Muy atractivo ya que tienen una conductividad térmica mucho más alta que el vidrio. / Es una opción muy cara.	
Usar disolventes más viscosos	Reduce la probabilidad de convección. / Algunas veces esta opción no es aceptable desde el punto de vista químico.	
Aumentar el flujo de aire	Hace la temperatura más uniforme y reduce los gradientes de temperatura. / Las vibraciones en la muestra limitan el flujo de aire que se puede usar.	99, 102, 103
Usar gradientes transversales en lugar de verticales	Elimina la sensibilidad al movimiento vertical. / Desafortunadamente la convección en el tubo de RMN no es puramente vertical. Los gradientes transversales no son ampliamente utilizados.	104
Invertir la dirección del flujo de aire	Reduce la convección. / Requiere rediseñar el sistema de control de temperatura.	99
Reemplazar el aire que regula la temperatura por líquido	Reduce mucho los gradientes de temperatura. / No es práctico para el trabajo de rutina.	105
Utilizar un capilar coaxial dentro del tubo de RMN	Si el capilar está vacío se aísla el interior de la muestra y si está lleno con algún líquido se aumenta la conductividad térmica de la muestra.	106, 100
Utilizar secuencias de pulsos especiales.	Compensan los efectos de convección. / Son secuencias de pulsos más complicadas. Utilizan la mitad de la señal.	104, 107, 108
Girar el tubo de RMN.	Cambia las componentes de la fuerza neta del líquido a la vertical. / Requiere la sincronización de la velocidad de giro con la duración del tiempo de difusión (Δ).	109, 110

⁹⁹ Goux, W. J.; Verkruyse, L. A.; Saltert, S. J. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1990**, 88, 609-614.¹⁰⁰ Martínez-Viviente, E.; Pregosin, P. S.; Vial, L.; Herse, C.; Lacour, J. *Chemistry - A European Journal* **2004**, 10, 2912-2918.¹⁰¹ Hayamizu, K.; Price, W. S. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2004**, 167, 328-333.¹⁰² Allerhand, A.; Addleman, R. E.; Osman, D. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107, 5809-5810.¹⁰³ Loening, N. M.; Keeler, J. *Journal of Magnetic Resonance* **1999**, 139, 334-341.¹⁰⁴ Jerschow, A.; Müller, N. *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, 125, 372-375.¹⁰⁵ Boden, N.; Corne, S. A.; Halford-Maw, P.; Fogarty, D.; Jolley, K. W. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1992**, 98, 92-108.¹⁰⁶ Hedin, N.; Furó, I. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, 131, 126-130.¹⁰⁷ Sørland, G. H.; Seland, J. G.; Krane, J.; Anthonsen, H. W. *Journal of Magnetic Resonance* **2000**, 142, 323-325.¹⁰⁸ Zhang, X.; Li, C. G.; Ye, C. H.; Liu, M. L. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 3528-3534.¹⁰⁹ Esturau, N.; Sanchez-Ferrando, F.; Gavin, J. A.; Roumestand, C.; Delsuc, M. A.; Parella, T. *Journal of Magnetic Resonance* **2001**, 153, 48-55.¹¹⁰ Lounila, J.; Oikarinen, K.; Ingman, P.; Jokisaari, J. *Journal of Magnetic Resonance - Series A* **1996**, 118, 50-54.

4.2.1 Experimentos que compensan la convección

En los experimentos de difusión con selección por gradientes, el movimiento de los espines durante el tiempo que hay entre el gradiente de desfase y de reenfoque produce cambios en la intensidad y/o en la fase de las señales. Por lo tanto, en la intensidad y/o en la fase de las señales en un experimento con selección por gradientes se reflejarán todos los tipos de movimiento en la muestra. Esto es muchas veces indeseable, ya que en la mayoría de los casos es sólo uno de los tipos de movimiento el que interesa estudiar.

Estudiar el movimiento de difusión y separarlo del movimiento de convección es relativamente fácil ya que, como se mencionó en el capítulo 2, el movimiento incoherente de la difusión siempre produce un cambio en la intensidad de las señales sin afectar la fase; mientras que el movimiento coherente de la convección cambiará la fase de las señales pero no la intensidad. Por tanto, la intensidad de las señales estará determinada por el movimiento de difusión y la fase por el movimiento de convección (o cualquier movimiento de velocidad constante).

El efecto de la pérdida de señal que se produce por cualquier movimiento en la muestra a velocidad constante se puede compensar colocando un segundo par de gradientes, iguales pero opuestos a los dos primeros (Fig. 4-2). Una explicación muy sencilla del funcionamiento de esta secuencia es que al aplicar la misma secuencia dos veces invirtiendo los gradientes, la fase inducida en la primera parte de la secuencia por el movimiento constante de la convección es igual pero tiene sentido contrario a la producida en la segunda parte y por el cambio de fase total de la secuencia es nulo. Con base a este principio A. Jerschow y N. Müller¹¹¹ proponen doblar la secuencia STE para crear una secuencia insensible a la velocidad *Double-simulated-echo experiment* (DSTE) o su versión con gradientes bipolares *Double-simulated-echo experiment with bipolar gradient pulse* (DBPPSTE) (Fig. 4-3).

¹¹¹ Jerschow, A.; Müller, N. *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, 125, 372-375.

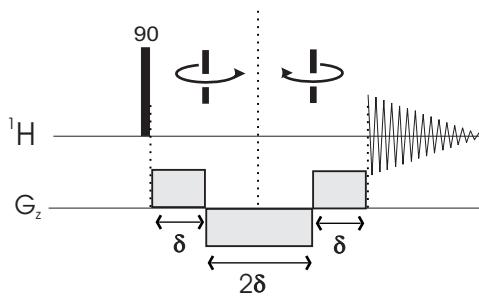


Figura 4-2. Experimento eco de espín con gradientes, donde el primer momento de gradientes es cero. El sentido del giro magnético está indicado en la parte superior. Esta secuencia es utilizada para reenfocar el cambio de fase inducida por los efectos del flujo.

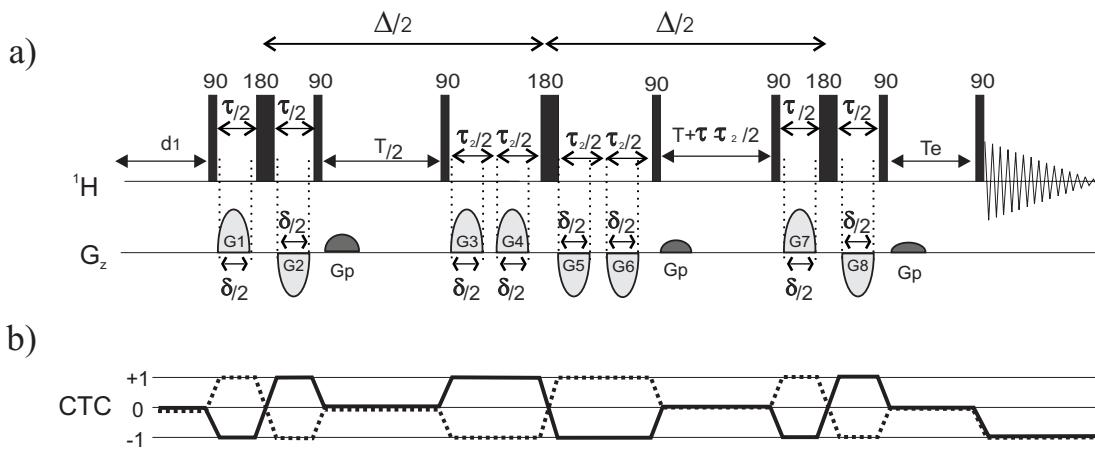


Figura 4-3. a) Experimento doble-BPPLED que compensa los efectos de convección (DBPPLED), y b) CTC. En el canal G_z se representan gradientes pulsados, G_p son gradientes de purga con fuerza constante, y los otros 8 son los gradientes de desfase/reenfoque, con duración $\delta/2$ y cuya fuerza se varía simultáneamente y progresivamente durante el experimento. $G1G2/G3G5$ y $G4G6/G7G8$ son los gradientes de desfase/reenfoque del primer y segundo eco respectivamente. El periodo de difusión Δ está dividido entre los dos ecos.

La principal limitación de este método es que solo compensa los efectos de convección con un perfil de flujo constante laminar, o sea, no compensa los efectos de convección con perfil de flujo turbulento. Así que, en algunos casos la determinación de \mathbf{D} con estas secuencias seguirá estando sobreestimada, sin embargo, siempre será más correcta que si se utiliza la secuencia no compensada.

4.2.2 Trabajar girando el tubo de RMN

Hay un estudio de inversión-recuperación para ^{129}Xe de xenón gas y ^{19}F de difloruro de xenón, disueltos en disolventes orgánicos como ciclohexano y acetonitrilo, en el que se

propone girar el tubo de RMN para eliminar los artefactos de convección¹¹². Sin embargo, hoy en día cuando se trabaja con experimentos por selección por gradientes se recomienda trabajar sin rotación de la muestra, para minimizar las posibles inestabilidades debido a la vibración, a las bandas laterales, y a los artefactos de fondo o de sustracción. Incluso se ha llegado a proponer, que para no perder los beneficios del aumento en resolución de las señales al trabajar con rotación de la muestra, un sistema computarizado que activa y desactiva el giro, de tal forma que durante el experimento está inactivo y durante el tiempo de adquisición activo^{113, 114}.

Cuando se trabaja girando la muestra en RMN, es muy importante utilizar tubos de alta calidad, perfectamente cilíndricos, que no tenga deformaciones longitudinales y/o transversales, para que no dificulten la rotación uniforme de la muestra y la homogenización del campo magnético. De lo contrario dificultaría hacer *shimming* y habría problemas con la forma de las líneas en el espectro y las bandas laterales¹¹⁵.

El objetivo planteado a lo largo de este capítulo es demostrar que trabajar girando el tubo de RMN a velocidades apropiadas permite minimizar/eliminar los efectos de convección y obtener excelentes resultados, incluso en condiciones de rutina.

4.3 Corrientes de convección. Parte experimental

4.3.1 Secuencia compensada DBPPLED

Para estudiar la posible presencia de efectos de convección se ha utilizado la secuencia DBPPLED (Fig. 4-3) en condiciones de trabajo similares a las utilizadas con la secuencia BPPLED (Fig. 3-8):

- Tiempo total de difusión de 150 ms ($\Delta/2=75$ ms)
- Tiempo Led de $Te=50$ ms
- Gradientes con forma seno de duración de $\delta=1$ ms
- Tiempo de recuperación de los gradientes de $Tr=100\mu s$.

¹¹² Lounila, J.; Oikarinen, K.; Ingman, P.; Jokisaari, J. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1996**, *118*, 50-54.

¹¹³ Wu, D. H.; Woodward, W. S.; Johnson, C. S. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1993**, *104*, 231-233.

¹¹⁴ Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 211-215.

¹¹⁵ VanderHart, D.L., "Magnetic Susceptibility & High Resolution NMR of Liquids and Solids", in *Encyclopedia of NMR*, Vol. 5, Wiley, New York, 2938-2945.

- Se adquirieren entre 6 y 8 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima.
- Número de adquisiciones para cada FID $ns=32$ (El ciclo de fases mínimo es 32)

Es importante mencionar que, bajo nuestra experiencia, la secuencia DBPPLED es muy sensible a imperfecciones en el proceso previo de *tuning/matching* y a la mala calibración de los pulsos. Por ello, cuando se obtiene un valor de **D** con un error experimental en el análisis de la regresión lineal más elevado del esperado, es aconsejable revisar todos estos parámetros y adquirir de nuevo el experimento. Un punto muy importante para tener una determinación fiable de **D**, al igual que en todas las secuencias de difusión, es tener una buena relación señal-ruido. Para ver el efecto de la baja intensidad de señales, realizamos dos experimentos a una muestra de estricnina 5 mM en $CDCl_3$ utilizando la secuencia DBPPLED con dos valores de ganancia, 256 y 96. La Fig. 4-4 muestra la atenuación de la intensidad absoluta donde se observa la disminución de la intensidad de todas las señales aproximadamente en un 65 % al bajar la ganancia de 256 a 96. Esto genera un aumento en el error experimental de 8.70 ± 0.006 ($rg=256$) a 8.59 ± 0.014 ($rg=96$).

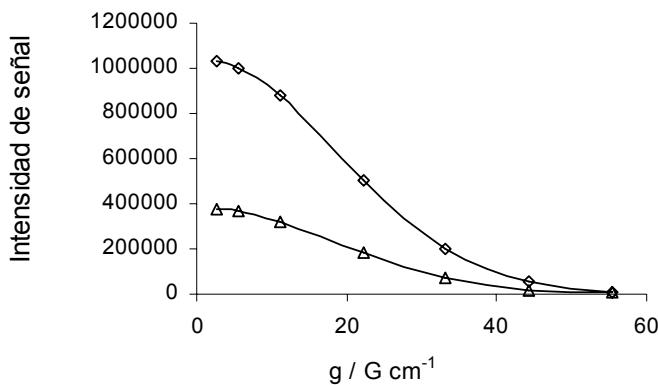


Figura 4-4. Disminución experimental de la intensidad absoluta de las señales de una muestra 5 mM de estricnina en $CDCl_3$ a temperatura ambiente utilizando la secuencia DBPPLED. Se representan dos resultados con diferente ganancia: (.....◊.....) con $rg=256$, y (—Δ—) con $rg=96$. Otras condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5,10, 20, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $Te=50$ ms, $\delta/2= 1$ ms, $Tr=100\mu s$ y $ns=32$.

4.3.2 Comprobando y eliminando la convección

Para demostrar si los efectos de convección están presentes cuando se trabaja de manera rutinaria en el laboratorio y para comparar la eficiencia de la propuesta de girar el tubo

de RMN con la secuencia compensada DBPPLED, se realizaron varios experimentos con diversos disolventes y temperaturas. Simultáneamente, se adquirieron en todos los casos tres experimentos i) la secuencia BPPLED sin giro, ii) la secuencia BPPLED con giro, y iii) la secuencia DBPPLED sin giro. En los experimentos con giro de la muestra, la velocidad de giro es de 20 Hz. Esta velocidad está condicionada a que los giros del tubo de RMN sean completos durante el tiempo que hay entre el gradiente de desfase y el de reenfoque (ver sección 4.3.3). El efecto de la rotación de la muestra sobre los gradientes es un tema que será tratado en profundidad en el capítulo 5.

La Fig. 4-5 muestra la disminución de la intensidad de las señales de una muestra de estricnina disuelta en CDCl_3 en función de la intensidad de los gradientes. La Fig. 4-5a es el resultado de trabajar a temperatura ambiente sin regulación de temperatura (295.6 K), donde claramente se observa que los tres métodos de realizar las medidas dan resultados semejantes, certificando la ausencia de efectos de convección en CDCl_3 con el sistema de regulación de temperatura apagado. Las Figs. 4-5b y 4-5d muestran los resultados obtenidos a bajas temperaturas cuando se regula la temperatura con flujo de nitrógeno gas. En los tres casos se observa que cuando el experimento se realiza sin girar la muestra, las intensidades de las señales presentan una atenuación anormal e, incluso, con oscilaciones a valores negativos en algunos puntos. Estos efectos se corrigen perfectamente al girar el tubo utilizando la misma secuencia, o al utilizar la secuencia compensada. Las Fig. 4-5e y 4-5f muestran los resultados obtenidos regulando la temperatura ligeramente por arriba de la temperatura ambiente a 298 y 303 K. En estos dos casos también se observa que cuando el experimento se realiza sin girar la muestra, las intensidades de las señales presentan una atenuación anormal, aunque los efectos no son tan marcados y no se llegan a ver las oscilaciones con puntos negativos en la caída de las señales. Estos efectos también se corrigen al girar el tubo de RMN utilizando la misma secuencia o al utilizar la secuencia compensada.

Las principales conclusiones obtenidas de las gráficas de la Fig. 4-5 son que los efectos de convección están siempre presentes en soluciones de CDCl_3 cuando se regula la temperatura. Se detectan cuando se utiliza la secuencia BPPLED sin giro. El hecho práctico es una caída más rápida de lo normal de la intensidad de las señales, presentando, algunas veces, fuertes oscilaciones que producen una pérdida total de la caída exponencial esperada, incluso encontrando valores negativos para algunos puntos. En estos casos es claro que los efectos de convección están presentes y están alterando

profundamente los resultados, por lo que es imposible realizar una medida de **D** mínimamente fiable.

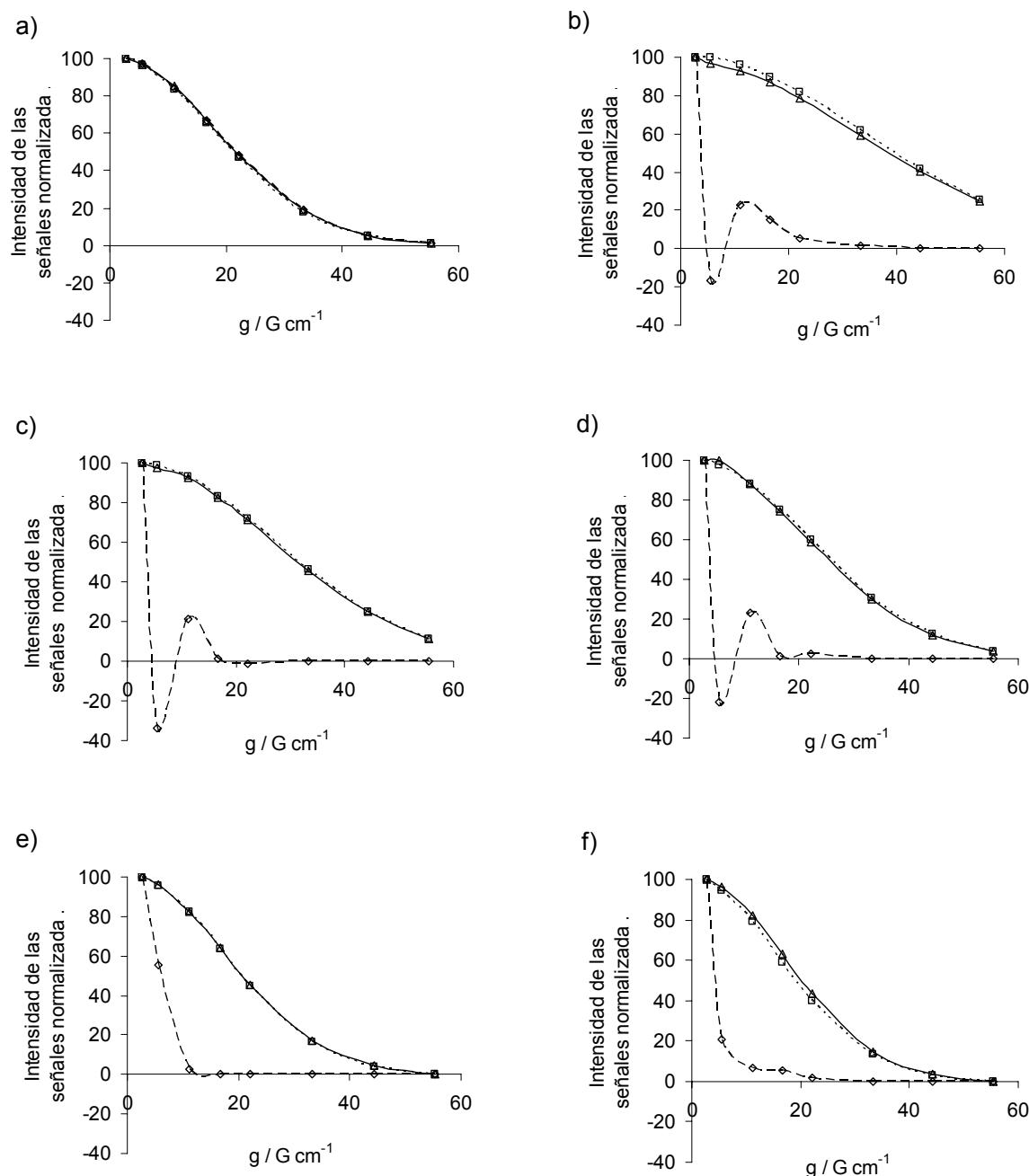


Figura 4-5. Disminución experimental de la intensidad normalizada de las señales de una muestra 5 mM de estricnina en CDCl_3 en función de la intensidad del gradiente a diferentes temperaturas. a) 295.6 K (con el sistema de regulación de temperatura apagado), b) 233 K, c) 253 K, d) 273 K, e) 298 K, f) 303 K. En cada gráfica se representan tres resultados: (----◊----) BPPLIED sin giro, (.....□.....), BPPLIED con giro a una velocidad de 20Hz, y (ΔΔΔΔΔΔΔΔ) DBPPLED. Otras condiciones experimentales son: 8 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=50$ ms, $\delta/2=1$ ms y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$.

En la tabla 4-2 se muestra los valores de **D** de la estricnina, sólo en los casos donde hay una caída exponencial sin alteraciones. El valor de **D** obtenido a temperatura ambiente utilizando BPPLED sin giro correlaciona perfectamente con los obtenidos con la misma secuencia con giro y con la secuencia compensada DBPPLIED. De igual forma que los valores de **D** obtenidos a temperatura regulada utilizando BPPLED con giro son similares a los obtenidos con la secuencia compensada DBPPLIED. El error del análisis de la regresión lineal de los datos obtenidos con giro de la muestra es comparable a los obtenidos con la secuencia compensada. Los valores calculados de **D** en función de la temperatura se encuentran graficados en la Fig. 4-6, donde se observa claramente el esperado aumento de **D** con el aumento de temperatura.

Tabla 4-2. Coeficiente de difusión **D** de la muestra 5mM de estricnina en CDCl_3 a diferentes temperaturas. La desviación determinada es el error en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Ec. 4-5.

Temperatura / K	BPPLED (sin giro) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	DBPPLIED (sin giro) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
233	ND*	2.61 ± 0.006	2.62 ± 0.009
253	ND*	4.13 ± 0.006	4.08 ± 0.004
273	ND*	6.10 ± 0.006	6.13 ± 0.009
295.5 (Regulador apagado)	8.76 ± 0.003	8.87 ± 0.007	8.70 ± 0.006
298	ND*	9.36 ± 0.005	9.22 ± 0.008
303	ND*	10.26 ± 0.003	9.85 ± 0.003

*ND: No determinado debido a un decaimiento no exponencial.

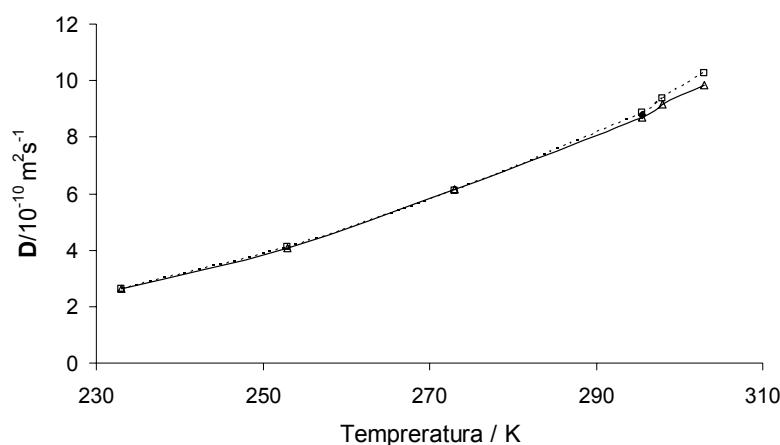


Figura 4-6. Coeficiente de difusión **D** de la muestra 5mM de estricnina en CDCl_3 en función de la temperatura. Se representan dos resultados: (.....□.....), BPPLED con giro, y (___Δ___) DBPPLIED. Ver detalles experimentales en Fig. 4-5.

Para evidenciar en que disolventes se encuentran presentes los efectos de convección realizamos varios experimentos con una muestra 5 mM de mentona disuelta en los disolventes deuterado más típicos, como son CDCl_3 , acetona, metanol, acetonitrilo, tolueno, benceno, y DMSO. En la Fig. 4-7 se encuentran las gráficas de la intensidad de las señales en función de la fuerza de gradientes a 298 K. Se observa que cuando se trabaja con la secuencia BPPLLED sin giro no se detectan efectos de convección en DMSO-d₆ pero sí en todos los demás disolventes. En las tablas 4-3 y 4-4 se muestran los valores calculados de **D** a diferentes disolventes y temperaturas. En los disolventes poco viscosos, como cloroformo, acetona, acetonitrilo y metanol, no se reporta ningún valor de **D** cuando se trabaja con las secuencia BPPLLED sin giro, ya que los efectos de convección son muy pronunciados y fáciles de reconocer en todas las temperaturas estudiadas. El mayor problema radica en los disolventes más viscosos como el tolueno y el benceno donde se presentan efectos de convección poco marcados. En estos casos se pueden dar resultados de **D** incorrectos, como los son los valores mostrados intencionadamente para benceno a 298 K y el tolueno a 308 K, que además de un valor de **D** elevado presentan un error de la línea de regresión también muy elevada. En el caso del DMSO-d₆ no se observan efectos de convección a 298 K, pero si a partir de 303 K. Dentro del error experimental, los datos obtenidos con giro de la muestra son comparables a los obtenidos con la secuencia compensada en todos los casos.

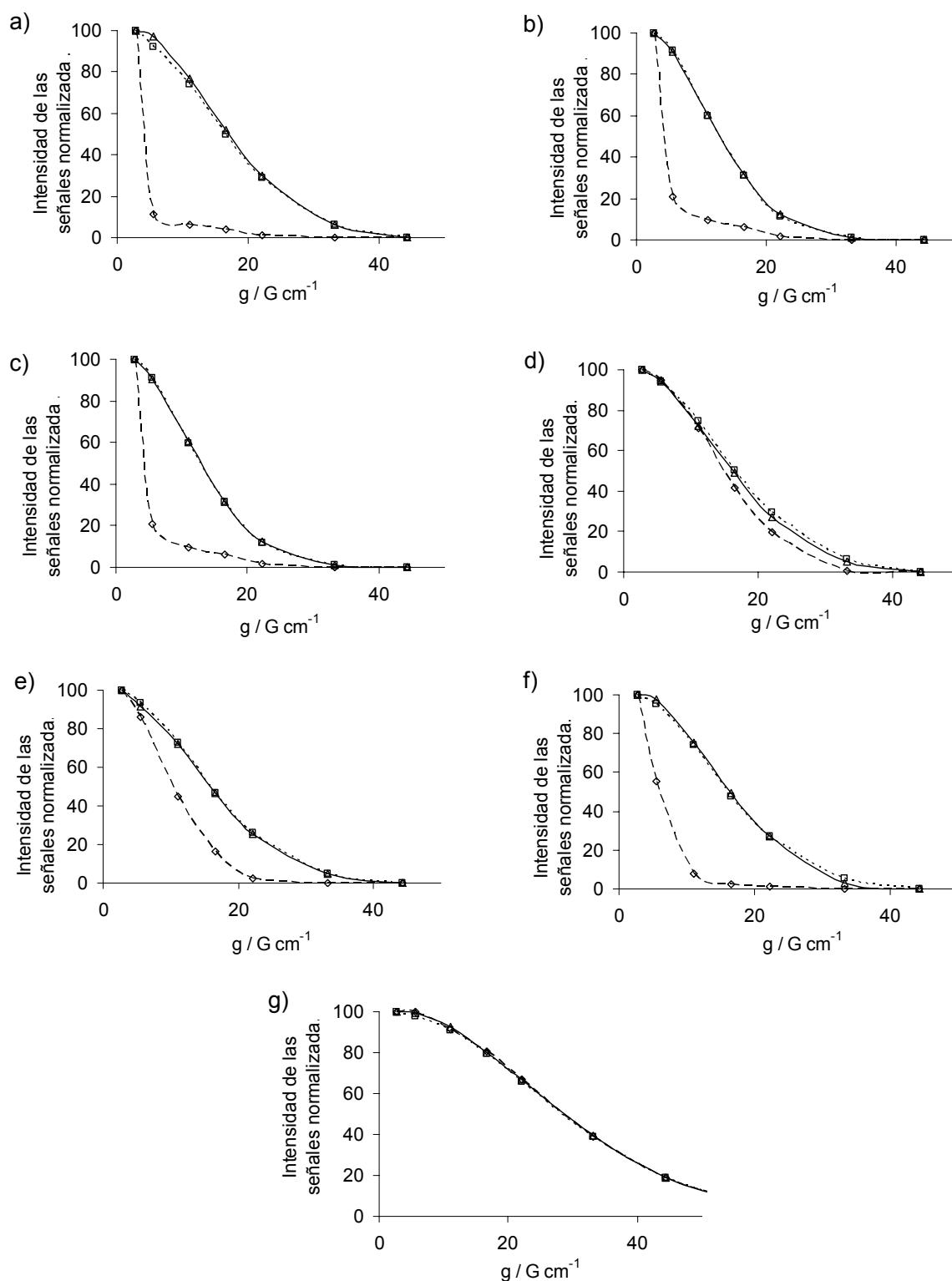


Figura 4-7. Disminución experimental de la intensidad normalizada de las señales de una muestra 5 mM de mentona en diferentes disolventes a 298 K. a) CDCl_3 , b) Acetona, c) Acetonitrilo, d) Benceno, e) Tolueno, f) Metanol, y g) DMSO. En cada gráfica se representan tres resultados: (----◊----) BPPLED sin giro, (....□....), BPPLED con giro, y (ΔΔΔ) DBPPLLED. Las condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=50$ ms, $\delta/2=1$ ms y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$.

Tabla 4-3. Coeficiente de difusión **D** de la mentona en diferentes disolventes y temperaturas. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy). Entre paréntesis se indica el número de puntos utilizados para el análisis. Ver detalles experimentales en la Fig.4-7.

Temperatura / K	Disolvente	BPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	DBPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
273	CDCl ₃	ND*	0.963 \pm 0.009 (n=6)	0.985 \pm 0.008 (n=6)
298	CDCl ₃	ND*	1.46 \pm 0.009 (n=6)	1.47 \pm 0.011 (n=6)
303	CDCl ₃	ND*	1.59 \pm 0.009 (n=6)	1.59 \pm 0.012 (n=6)
273	MeOD	ND*	0.967 \pm 0.007 (n=6)	1.024 \pm 0.012 (n=6)
298	MeOD	ND*	1.56 \pm 0.012 (n=6)	1.56 \pm 0.015 (n=6)
303	MeOD	ND*	1.62 \pm 0.014 (n=6)	1.69 \pm 0.019 (n=6)
273	CD ₃ CN	ND*	1.66 \pm 0.010 (n=6)	1.66 \pm 0.013 (n=6)
298	CD ₃ CN	ND*	2.44 \pm 0.011 (n=6)	2.46 \pm 0.012 (n=6)
303	CD ₃ CN	ND*	2.58 \pm 0.017 (n=6)	2.63 \pm 0.020 (n=6)
298	Tolueno	ND*	1.61 \pm 0.005 (n=6)	1.62 \pm 0.004 (n=6)
303	Tolueno	ND*	1.73 \pm 0.005 (n=6)	1.72 \pm 0.010 (n=6)
308	Tolueno	3.36 \pm 0.471 (n=5)	1.86 \pm 0.005 (n=6)	1.84 \pm 0.009 (n=6)
298	Benceno	1.96 \pm 0.217 (n=6)	1.46 \pm 0.005 (n=6)	1.53 \pm 0.009 (n=6)
303	Benceno	ND*	1.57 \pm 0.011 (n=6)	1.63 \pm 0.015 (n=6)
308	Benceno	ND*	1.80 \pm 0.009 (n=6)	1.81 \pm 0.008 (n=6)
298	Acetona	ND*	2.63 \pm 0.005 (n=6)	2.61 \pm 0.010 (n=6)
303	Acetona	ND*	2.82 \pm 0.014 (n=6)	2.80 \pm 0.014 (n=6)
298	DMSO	0.494 \pm 0.003 (n=7)	0.497 \pm 0.007 (n=7)	0.496 \pm 0.008 (n=7)
303	DMSO	ND*	0.575 \pm 0.011 (n=7)	0.560 \pm 0.008 (n=7)
308	DMSO	ND*	0.637 \pm 0.014 (n=7)	0.615 \pm 0.011 (n=7)

*ND: No determinado debido a un decaimiento no exponencial

Tabla 4-4. Coeficiente de difusión **D** de la mentona en diferentes disolventes con el sistema de temperatura apagado. La desviación que se da es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy). Entre paréntesis se indica el número de puntos utilizados para el análisis. Ver detalles experimentales en la Fig. 4-7.

Temperatura / K	Disolvente	BPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	DBPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
295.3	CDCl ₃	1.41 \pm 0.003 (n=6)	1.42 \pm 0.007 (n=6)	1.41 \pm 0.011 (n=6)
294.6	MeOD	1.47 \pm 0.004 (n=6)	1.56 \pm 0.005 (n=6)	1.46 \pm 0.005 (n=6)
294.8	CD ₃ CN	2.30 \pm 0.010 (n=6)	2.32 \pm 0.008 (n=6)	2.31 \pm 0.016 (n=6)
294.8	Tolueno	1.51 \pm 0.004 (n=6)	1.52 \pm 0.006 (n=6)	1.50 \pm 0.007 (n=6)
294.8	Benceno	1.41 \pm 0.010 (n=6)	1.42 \pm 0.008 (n=6)	1.42 \pm 0.013 (n=6)
294.8	Acetona	2.48 \pm 0.008 (n=6)	2.50 \pm 0.010 (n=6)	2.47 \pm 0.010 (n=6)
294.2	DMSO	0.46 \pm 0.004 (n=7)	0.44 \pm 0.005 (n=7)	0.46 \pm 0.011 (n=7)

De los resultados anteriores se deduce un truco sencillo para detectar si en un equipo de RMN el control de temperatura instalado induce efectos de convección. Consiste en realizar dos medidas, una con la unidad de control de temperatura apagada y otra encendida a una temperatura muy cercana a la temperatura ambiente. O bien, si lo que se desea es trabajar a temperaturas superiores o inferiores a la temperatura ambiente, las medidas que se deben realizar son una con giro y otra sin giro. Como ejemplo, en nuestro sistema no se detectan efectos de convección para el CDCl_3 con la temperatura apagada a 295-296 K, los efectos de convección aparecen al regular la temperatura a 298 K y desaparecen si se gira el tubo de RMN.

En contraste con la difusión que depende del tamaño molecular, la convección es función del disolvente y las condiciones utilizadas, por lo que si en un disolvente dado hay efectos de convección, todos los solutos se verán afectados de igual manera, incluso el propio disolvente. Esto se puede observar fácilmente al analizar los valores experimentales obtenidos para las señales residuales de los diferentes disolventes deuterado en las mismas soluciones con mentona (Fig. 4-8 y tablas 4-5 y 4-6). La conclusión es que en todos los casos donde se había detectado la presencia de efectos de convección sobre la señal de mentona también se observan sobre la señal residual del disolvente deuterado. En las tablas 4-5 y 4-6, con excepción del caso del DMSO-d_6 que es el disolvente con más viscosidad y menor movilidad, los datos de los espectros con mayor intensidad de gradiente no se utilizarán para los cálculos dado que en estas condiciones la señal está totalmente atenuada y sólo se registra ruido. El número de puntos utilizados para el análisis en cada caso está indicado entre paréntesis.

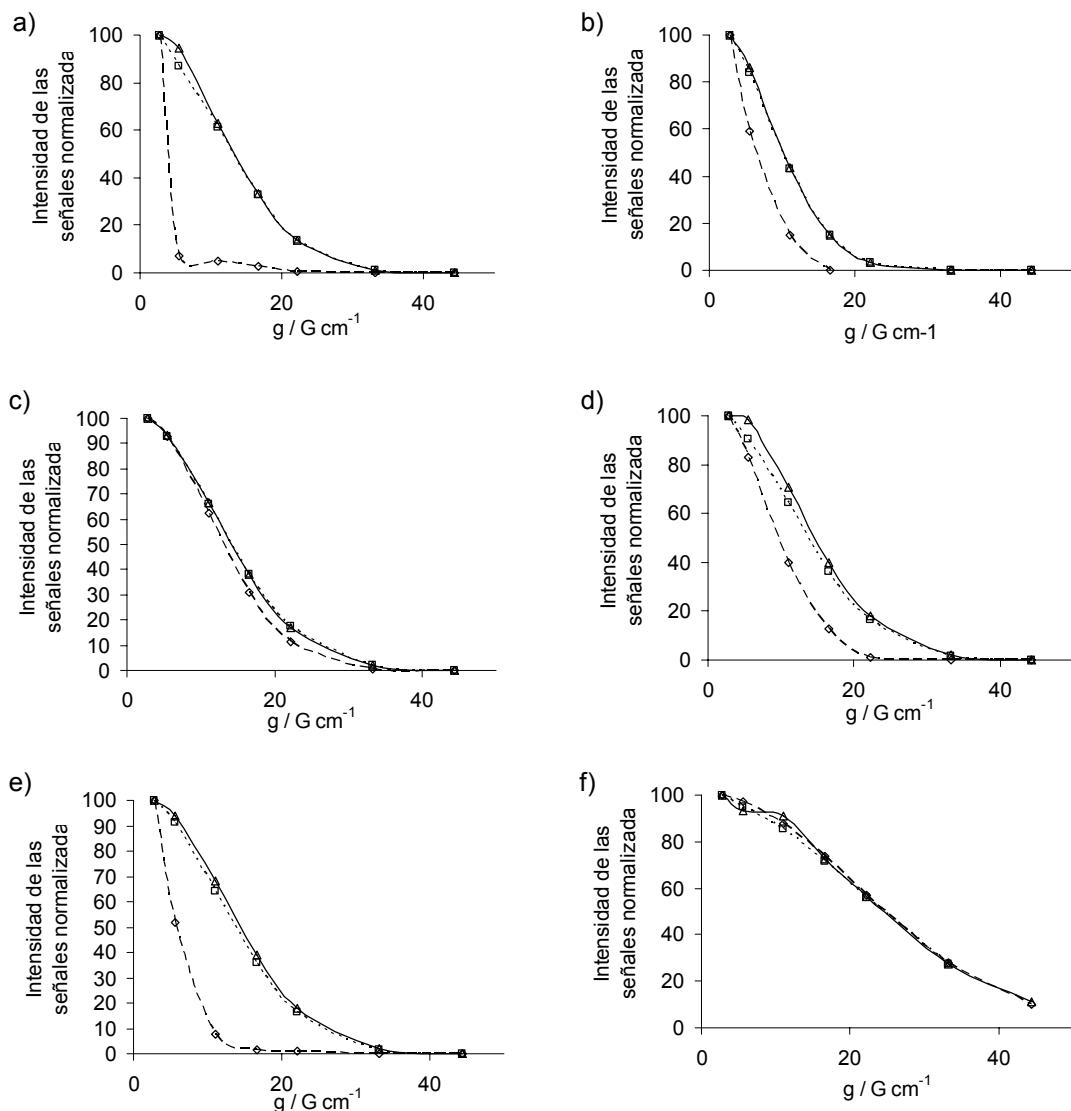


Figura 4-8. Disminución experimental de la intensidad normalizada de la señal residual del disolvente deuterado de una muestra de mentona a 298 K. a) CDCl_3 , b) Acetonitrilo c) Benceno, d) Tolueno, e) Metanol, y f) DMSO. En cada gráfica se representan tres resultados: (----◊----) BPPLED sin giro, (.....□.....), BPPLED con giro, y (—Δ—) DBPPLIED. (Ver detalles experimentales en la Fig.4-7).

Tabla 4-5. Coeficiente de difusión **D** del disolvente en la solución con mentona, con regulación de temperatura. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico *xy*). Entre paréntesis se indica el número de puntos utilizados para el análisis. Ver detalles experimentales en la Fig. 4-7.

Temperatura / K	Disolvente	BPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	DBPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
273	CDCl ₃	ND*	1.62 \pm 0.009 (n=6)	1.65 \pm 0.014 (n=6)
298	CDCl ₃	ND*	2.32 \pm 0.016 (n=6)	2.38 \pm 0.016 (n=6)
303	CDCl ₃	ND*	2.57 \pm 0.012 (n=6)	2.59 \pm 0.013 (n=6)
273	MeOH	ND*	1.28 \pm 0.009 (n=6)	1.16 \pm 0.012 (n=6)
298	MeOH	ND*	2.18 \pm 0.009 (n=6)	2.04 \pm 0.009 (n=6)
303	MeOH	ND*	2.56 \pm 0.012 (n=6)	2.30 \pm 0.013 (n=6)
273	CD ₃ CN	ND*	2.61 \pm 0.013 (n=6)	2.61 \pm 0.010 (n=6)
298	CD ₃ CN	ND*	4.08 \pm 0.009 (n=5)	4.06 \pm 0.013 (n=5)
303	CD ₃ CN	ND*	4.25 \pm 0.016 (n=5)	4.38 \pm 0.018 (n=5)
298	Tolueno	ND*	2.12 \pm 0.012 (n=6)	2.11 \pm 0.020 (n=6)
303	Tolueno	ND*	2.29 \pm 0.010 (n=6)	2.29 \pm 0.014 (n=6)
308	Tolueno	ND*	2.51 \pm 0.010 (n=6)	2.47 \pm 0.010 (n=6)
298	Benceno	3.09 \pm 0.190 (n=6)	2.08 \pm 0.015 (n=6)	2.11 \pm 0.019 (n=6)
303	Benceno	ND*	2.29 \pm 0.010 (n=6)	2.31 \pm 0.013 (n=6)
308	Benceno	ND*	2.51 \pm 0.012 (n=6)	2.53 \pm 0.007 (n=6)
298	DMSO	0.671 \pm 0.006 (n=7)	0.678 \pm 0.010 (n=7)	0.654 \pm 0.020 (n=7)
303	DMSO	3.26 \pm 0.417 (n=7)	0.762 \pm 0.008 (n=7)	0.764 \pm 0.010 (n=7)
308	DMSO	1.76 \pm 0.742 (n=5)	0.838 \pm 0.008 (n=7)	0.869 \pm 0.014 (n=7)

*ND: No determinado debido a un decaimiento no exponencial

Tabla 4-6. Coeficiente de difusión **D** del disolvente en la solución de mentona con el sistema de temperatura apagado. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico *xy*). Entre paréntesis se indica el número de puntos utilizados para el análisis. Ver detalles experimentales en la Fig. 4-7.

Temperatura / K	Disolvente	BPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	DBPPLED (sin giro) D / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
295.3	CDCl ₃	2.27 \pm 0.007 (n=6)	2.30 \pm 0.014 (n=6)	2.25 \pm 0.025 (n=6)
294.6	MeOD	2.00 \pm 0.020 (n=6)	2.02 \pm 0.004 (n=6)	2.20 \pm 0.020 (n=6)
284.8	CD ₃ CN	3.77 \pm 0.020 (n=5)	3.83 \pm 0.030 (n=5)	3.60 \pm 0.032 (n=4)
294.8	Tolueno	2.01 \pm 0.008 (n=6)	2.03 \pm 0.006 (n=6)	2.00 \pm 0.020 (n=6)
294.8	Benceno	1.96 \pm 0.003 (n=6)	1.97 \pm 0.007 (n=6)	1.97 \pm 0.014 (n=6)
294.2	DMSO-d ₆	0.59 \pm 0.013 (n=7)	0.52 \pm 0.006 (n=7)	0.59 \pm 0.023 (n=7)

Para explorar los efectos de convección y el giro de la muestra en otros disolventes y con otros compuestos, medimos el coeficiente de difusión a una muestra 10mM de β -CD disuelta en D₂O a diferentes temperaturas. En esta ocasión se muestra la gráfica de

$\ln(A/A_0)$ vs B cuando el experimento se realiza a diversas temperaturas, sin giro (Fig.4-9a) y con giro (Fig.4-9 b). La gráfica obtenida con la secuencia compensada no se muestra ya que es igual a la obtenida con giro. En estas condiciones los efectos de convección aparecen a 303 K y aumentan dramáticamente al aumentar la temperatura. La tabla 4-7 y la Fig. 4-10 muestran los valores de \mathbf{D} obtenidos en función de la temperatura, donde se observa claramente que a partir de los 303 K se dan resultados incorrectos cuando el experimento se realiza sin giro. Nuevamente se confirma que el valor de \mathbf{D} de la señal residual del disolvente no deuterado en dichas soluciones se ve afectada de igual manera (tabla 4-8).

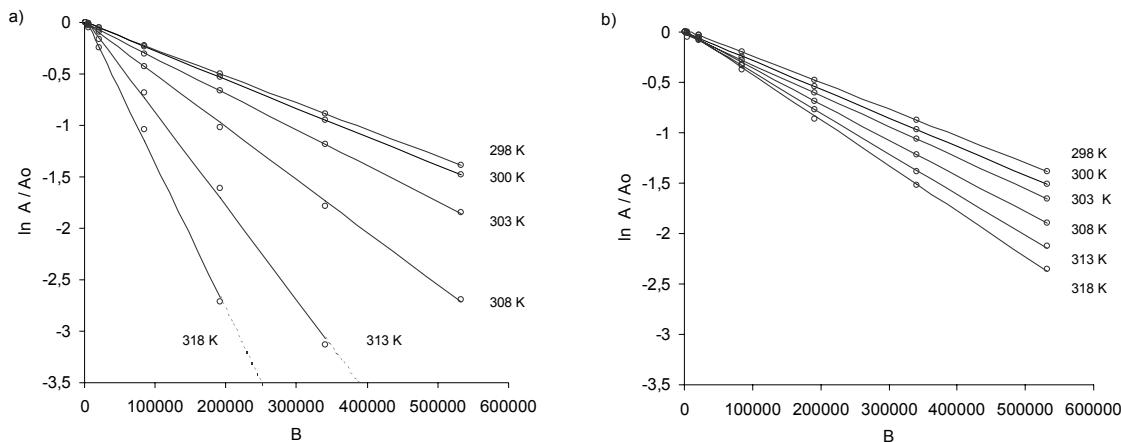


Figura 4-9. Gráficas de $\ln(A/A_0)$ vs B ($B = \gamma^2 g^2 \delta^2 (4\Delta - \delta)$) de una muestra de β -CD 10mM en D_2O a diferentes temperaturas utilizando la secuencia BPPLED. a) Sin giro, b) con giro. Las condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $T_e=50$ ms, $\delta/2=1$ ms y $T_r=100$ μ s.

Tabla 4-7 Coeficiente de difusión \mathbf{D} de β -CD 10mM en D_2O a diferentes temperaturas. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Fig. 4-9 .

Temperatura / K	BPPLED (sin giro) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	DBPPLIED (sin giro) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
298	2.60 ± 0.002	2.64 ± 0.010	2.62 ± 0.012
300	2.78 ± 0.002	2.84 ± 0.006	2.86 ± 0.009
303	3.48 ± 0.006	3.08 ± 0.010	3.10 ± 0.012
308	5.12 ± 0.030	3.56 ± 0.011	3.54 ± 0.014
313	8.91 ± 0.064	4.04 ± 0.020	4.12 ± 0.021
318	14.12 ± 0.074	4.49 ± 0.022	4.62 ± 0.025

Tabla 4-8 Coeficiente de difusión \mathbf{D} del agua residual en la muestra β -CD 10mM /D₂O a diferentes temperaturas. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Fig. 4-9 .

Temperatura / K	BPPLED (sin giro) $\mathbf{D}/10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	BPPLED (con giro) $\mathbf{D}/10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	DBPPLED (sin giro) $\mathbf{D}/10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$
298	0.19 ± 0.004	0.19 ± 0.012	0.19 ± 0.014
300	0.20 ± 0.003	0.20 ± 0.008	0.20 ± 0.011
303	0.22 ± 0.010	0.22 ± 0.012	0.22 ± 0.018
308	0.27 ± 0.034	0.25 ± 0.014	0.25 ± 0.020
313	0.32 ± 0.057	0.29 ± 0.030	0.28 ± 0.030
318	0.39 ± 0.080	0.31 ± 0.034	0.30 ± 0.032

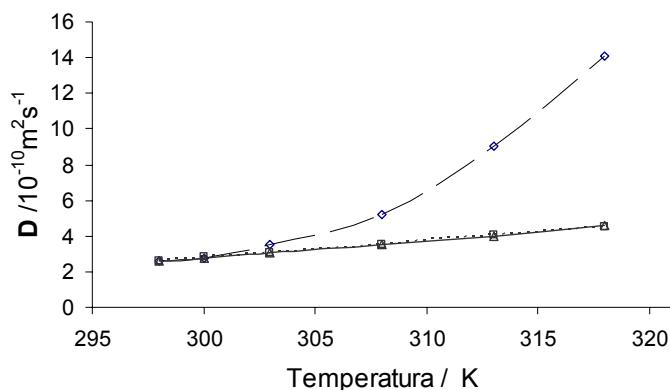


Figura 4-10. Coeficiente de difusión \mathbf{D} de una muestra 10 Mm de β -CD en D₂O en función de la temperatura. Se representan tres resultados: (----◊----) BPPLED sin giro, (.....□.....), BPPLED con giro, y (—△—) DBPPLED. Ver detalles experimentales en la Fig. 4-9.

Para explorar como el giro de la muestra minimiza los efectos de convección a temperaturas mucho más altas, medimos el coeficiente de difusión a una muestra 10 mM de α -CD en D₂O y DMSO-d₆ a diferentes temperaturas (tabla 4-9) y se encontró que en DMSO-d₆ a 347 K el trabajar con giro de la muestra no compensa los efectos de convección como lo hace la secuencia compensada.

Para comprobar los resultados obtenidos a altas temperaturas y compararlos con los publicados, preparamos una muestra de 80% glicol en DMSO-d₆ (Fig. 4-11 y tabla 4-10). En estas condiciones, los efectos de convección empiezan a aparecer cerca de 308 K y a temperaturas extremas (347 K) el giro del tubo de RMN no compensa completamente los efectos de convección. Experimentalmente demostramos que existe

mejoría si se aumenta la velocidad de giro de 20 a 40 Hz, pero no es suficiente para eliminar completamente este efecto indeseado. A 330 K se obtiene un valor de $4.22 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ girando la muestra mientras que se obtiene un valor erróneo de $9.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ si no se gira. Müller y colaboradores¹¹⁶ describen el valor de $4.19 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y de $4.37 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ con las secuencias STE y LED respectivamente, para las mismas condiciones.

Tabla 4-9 Coeficiente de difusión **D** de una solución 10mM de α -CD en D_2O . Las condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=50$ ms, $\delta/2=1\text{ms}$ y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy).

Temperatura (K)	Disolvente	BPPLED (sin giro) D / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLED (con giro) D / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	DBPPLLED (sin giro) D / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
295 (off)	D_2O	2.60 ± 0.003	2.61 ± 0.004	2.60 ± 0.006
347	D_2O	*ND	9.09 ± 0.016	9.25 ± 0.011
295 (off)	DMSO	1.06 ± 0.003	1.06 ± 0.010	1.09 ± 0.007
298	DMSO	2.39 ± 0.034	1.23 ± 0.005	1.20 ± 0.008
308	DMSO	*ND	1.61 ± 0.025	1.58 ± 0.018
347	DMSO	*ND	10.64 ± 0.772	3.30 ± 0.008

*ND: No determinado debido a un decaimiento no exponencial

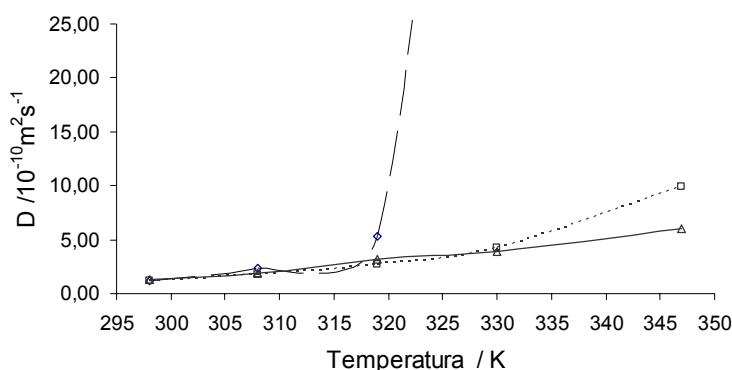


Figura 4-11. Coeficiente de difusión de 80% glicol en DMSO-d₆ en función de la temperatura. Se representan tres resultados: (----◊----) BPPLED sin giro, (....□....), BPPLED con giro, y (-Δ-) DBPPLLED. Las condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=50$ ms, $\delta/2=1\text{ms}$ y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$. El valor de **D** utilizado para graficar el punto de 330 K con la secuencia BPPLED sin giro es el valor erróneo de $9.46 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ utilizado sólo para continuar la línea.

¹¹⁶ Jerschow, A.; Müller, N. *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, 125, 372-375.

Tabla 4-10. Coeficiente de difusión **D** de una muestra de 80% glicol en DMSO-d₆ a diferentes temperaturas. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Fig. 4-11

Temperatura / K	BPPLED (sin giro) D / 10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹	BPPLED (con giro) D / 10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹	DBPPLIED (sin giro) D / 10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹
298	1.20 ± 0.014	1.21 ± 0.018	1.24 ± 0.006
308	2.30 ± 0.037	1.80 ± 0.009	1.92 ± 0.013
319	5.27 ± 0.102	2.77 ± 0.030	3.01 ± 0.028
330	ND*	4.21 ± 0.031	3.96 ± 0.019
347	ND*	10.90 ± 0.045 (20 Hz) 9.85 ± 0.058 (40 Hz)	6.05 ± 0.018

*ND: No determinado debido a un decaimiento no exponencial

Para evaluar los efectos de convección en grandes moléculas que requieren uso de gradientes más fuertes y probarlos en condiciones habituales, se seleccionó la molécula de lisozima en una solución 2mM en 90%H₂O/10%D₂O. Para ello, al igual que en la sección 3.5.6 donde se introdujo el bloque de supresión de agua W5 en la secuencia BPPLED, se introdujo el mismo bloque W5 en la secuencia DBPPLIED para crear la secuencia DBPPLIED-W5 (Fig. 4-12). Es importante mencionar que en este caso el objetivo evaluar los efectos de convección utilizando esta secuencia. Se ha encontrado una gran atenuación de las señales en estas condiciones, lo cual dificulta la medida del coeficiente de difusión, la necesidad de acumular más tiempo (NS=256) para encontrar una relación señal/ruido aceptable. Esto es debido a que la secuencia compensada DBPPLIED funciona adecuadamente para pequeñas moléculas, pero en el caso de grandes moléculas, como proteínas, no es aconsejable debido a que es una secuencia muy larga y muy sensible a tiempos de relajación T₂ muy cortos. La tabla 4-11 y la Fig. 4-13 muestran los resultados obtenidos, que están de acuerdo con los descritos en la literatura para la lisozima a 298 K en 90% H₂O.¹¹⁷ Los datos revelan que los efectos de convección en H₂O pueden estar presentes por encima de los 300 K cuando hay regulación de la temperatura.

¹¹⁷ Price, W. S.; Tsuchiya, F.; Arata, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 11503-11512.

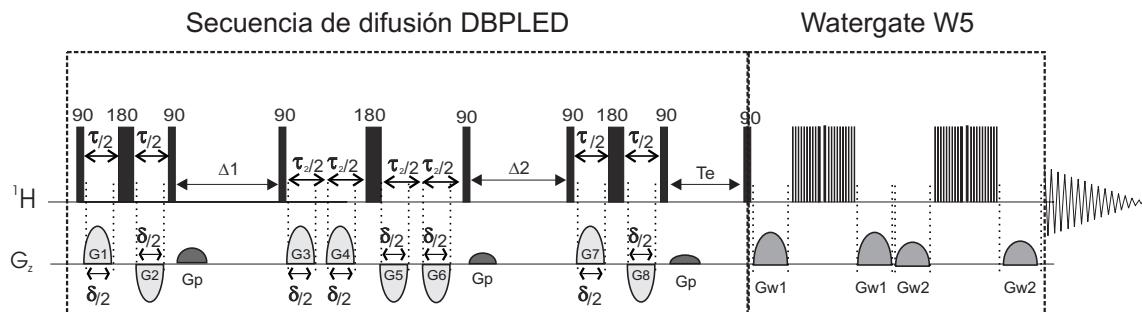


Figura 4-12. Experimento de difusión DBPPLED con incorporación de un módulo de supresión de disolvente (Doble-Watergate W5). La primera parte es la secuencia de difusión DBPPLED (Fig. 4-3). La segunda parte es el modulo WATERGATE. En esta segunda parte, el tren de pulsos duros que se usa para invertir todas las señales menos la señal que se desea eliminar. Los gradientes que eliminan (desfasan) dichas señales son **Gw1** y **Gw2** se mantienen constantes a un valor diferente a los utilizados en los gradientes de la secuencia de difusión.

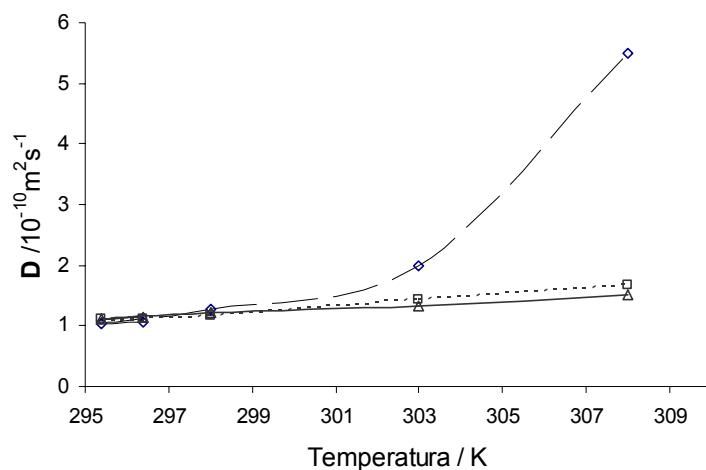


Figura 4-13. Coeficiente de difusión de la lisozima en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ en función de la temperatura. Se representan tres resultados: (---◊---) BPPLIED-W5 sin giro, (.....□.....), BPPLIED-W5 con giro, y (Δ) DBPPLED-W5. Las condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=10$ ms, $\delta/2=1.6$ ms y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$. En W5: **Gw1**=37% y **Gw2**=41%. El número de adquisiciones (ns) en BPPLIED-W5 es de 128 y en DBPPLED-W5 es de 256.

Tabla 4-11. Coeficiente de difusión **D** de lisozima 2 mM en 90%H₂O/10%D₂O a diferentes temperaturas. Entre paréntesis se indica el número de puntos utilizados para el análisis cuando es menor a 7. La desviación es el error obtenido en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Fig. 4-13.

Temperatura (K)	BPPLLED-W5 (sin giro) $D/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLLED-W5 (con giro) $D/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	DBPPLLED-W5 $D/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
295.4	1.05 ± 0.006	1.11 ± 0.013	1.10 ± 0.023
296.4	1.07 ± 0.012	1.12 ± 0.011	1.13 ± 0.022
298	1.33 ± 0.012	1.17 ± 0.008	1.19 ± 0.023
303	1.97 ± 0.055	1.35 ± 0.013	1.34 ± 0.021
308	5.54 ± 0.040 (np=4)	1.66 ± 0.040 (np=6)	1.52 ± 0.015 (np=6)

4.3.2.1 BPPLLED con giro vs DBPPLLED

Los efectos de convección que pueden aparecer en un sistema dado pueden ser eliminados si se trabaja con giro de la muestra o con secuencias como la DBPPLLED. La principal desventaja que presenta el giro de la muestra para minimizar la convección es que no funciona si la temperatura de trabajo es muy elevada (347 K), mientras que con la secuencia DBPPLLED si se compensan en todos los casos estudiados. Sin embargo, el experimento DBPPLLED presenta algunas limitaciones: **i)** es una secuencia muy sensible a imperfecciones en *tuning/matching* y a la mala calibración de los pulsos, **ii)** requiere doblar el ciclo de fases (mínimo de 32), por lo que se incrementa al doble el tiempo de adquisición, y **iii)** la pérdida de señal por relajación puede ser muy considerable en moléculas con tiempos de relajación T₂ cortos (proteínas, ácidos nucléicos, o complejos biomoleculares).

4.3.2.2 Convección en los experimentos NOE

Los efectos de convección no son exclusivos de los experimentos de difusión, sino que pueden estar presentes en cualquier experimento de RMN que utilice gradientes como método de selección de coherencias. Además. Estos efectos son más pronunciados en secuencias de pulsos donde los gradientes de desfase y reenfoque están separados por un periodo de tiempo grande, como ocurre en experimentos que detectan el NOE como

la secuencias GOESY (1D NOESY selectivo con gradiente de reenfoque) (Fig. 4-14b)¹¹⁸ y GROESY (1D ROESY selectivo con gradiente de reenfoque) (Fig. 4-14d)¹¹⁹.

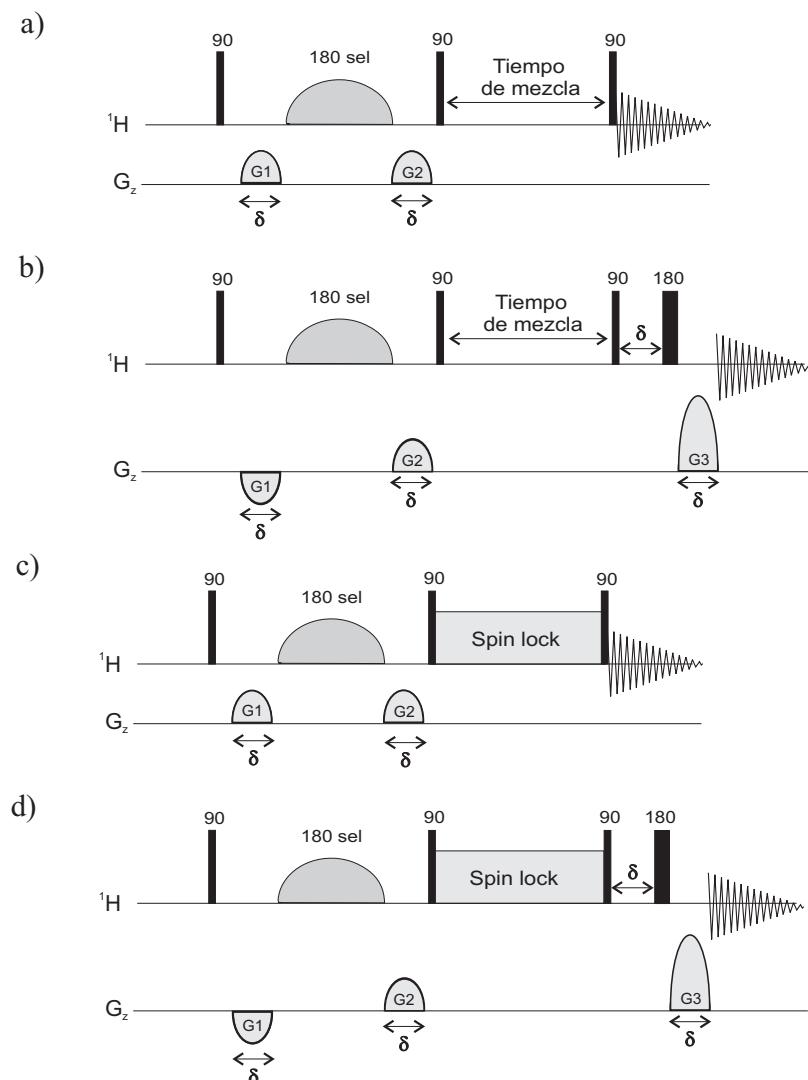


Figura 4-14. Secuencias de pulsos de experimentos NOE y ROE. a) 1D-NOESY ($G_1:G_2=1:1$) b) GOESY ($G_1:G_2:G_3=-1:1:2$), c) 1D-ROESY ($G_1:G_2=1:1$), y d) GROESY ($G_1:G_2:G_3=-1:1:2$).

Para suprimir la pérdida de señal por convección en estos experimentos NOE también se han propuesto secuencias compensadas¹²⁰ donde se modifican las secuencias

¹¹⁸ Stonehouse, J.; Adell, P.; Keeler, J.; Shaka, A. J. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 6037-6038.

¹¹⁹ Adell, P.; Parella, T.; SanchezFerrando, F.; Virgili, A. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1995**, *108*, 77-80.

¹²⁰ Jerschow, A.; Müller, N. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *132*, 13-18.

de dos formas diferentes. En una de ellas la intensidad de los gradientes se optimiza en función del periodo de espín lock, de manera que se mantiene la misma selección de coherencias que la versión con ciclo de fases aunque cuando se utilizan tiempos de mezcla largos puede haber problemas experimentales debido a que los gradientes sean muy largos. La otra modificación consiste en doblar la secuencia STE y colocar un gradiente adicional en el centro (Fig. 4-15). Será esta última secuencia GROESY-compensada la que utilizamos para comparar con la propuesta de utilizar la secuencia normal con giro de la muestra.

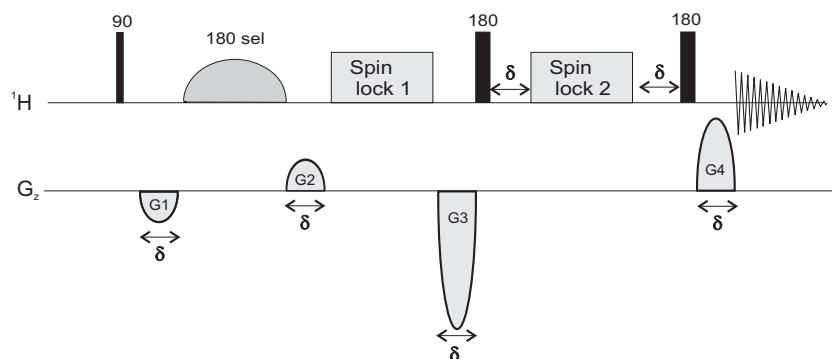


Figura 4-15. Secuencias de pulsos GROESY-compensada ($G_1:G_2:G_3:G_4=1:1:-4:2$). El tiempo $Spin\ lock\ 1=Spin\ lock/2$ - duración del pulso selectivo de $180^\circ - 3\delta/4$. El tiempo $Spin\ lock\ 2=Spin\ lock - Spin\ lock\ 1$.

Con los experimentos GOESY y GROESY se obtienen espectros muy limpios debido a que no está involucrada la espectroscopía diferencial asociada al ciclo de fases a expensas de la pérdida en sensibilidad por un factor de 2 debido a la selección de coherencias. La rotación de la muestra permite obtener resultados similares que con las secuencias NOE sin gradiente de reenfoque (Figs. 4-14a y 4-14c) a temperatura regulada. La Fig. 4-16 muestra un espectro GROESY aplicado al protón H15a de la estricnina en $CDCl_3$ a temperatura ambiente y a temperatura regulada. Cuando el experimento se realiza con giro el espectro obtenido presenta un máximo de sensibilidad y una mejora en resolución (Fig. 4-16c) mientras que se observa una gran atenuación cuando no se gira la muestra (Fig. 4-16d). Como los efectos de convección son más pronunciados a mayor intensidad de gradientes es aconsejable utilizar la mínima intensidad de gradiente necesaria para la selección de coherencia. Otros efectos asociados a la presencia de corrientes de convección en los experimentos NOE son que se desplaza el máximo de NOE observado a valores de tiempo de mezcla menores (Fig.

4-17), y en los casos donde los efectos de convección son severos se pueden obtener caídas oscilatorias de las señales para tiempos de mezcla largos, igual que se ha descrito para los experimentos de difusión.

En nuestra experiencia, los experimentos compensados NOE y ROE propuestos por Müller muestran baja sensibilidad debido probablemente a una mayor dependencia en la calibración de pulsos y al ajuste general del sistema (Fig. 4-18). Además, el hecho de doblar la secuencia de pulsos STE y poner un gradiente adicional en el centro de la secuencia puede introducir nuevos artefactos provenientes de procesos de transferencia de coherencia en sistemas acoplados.

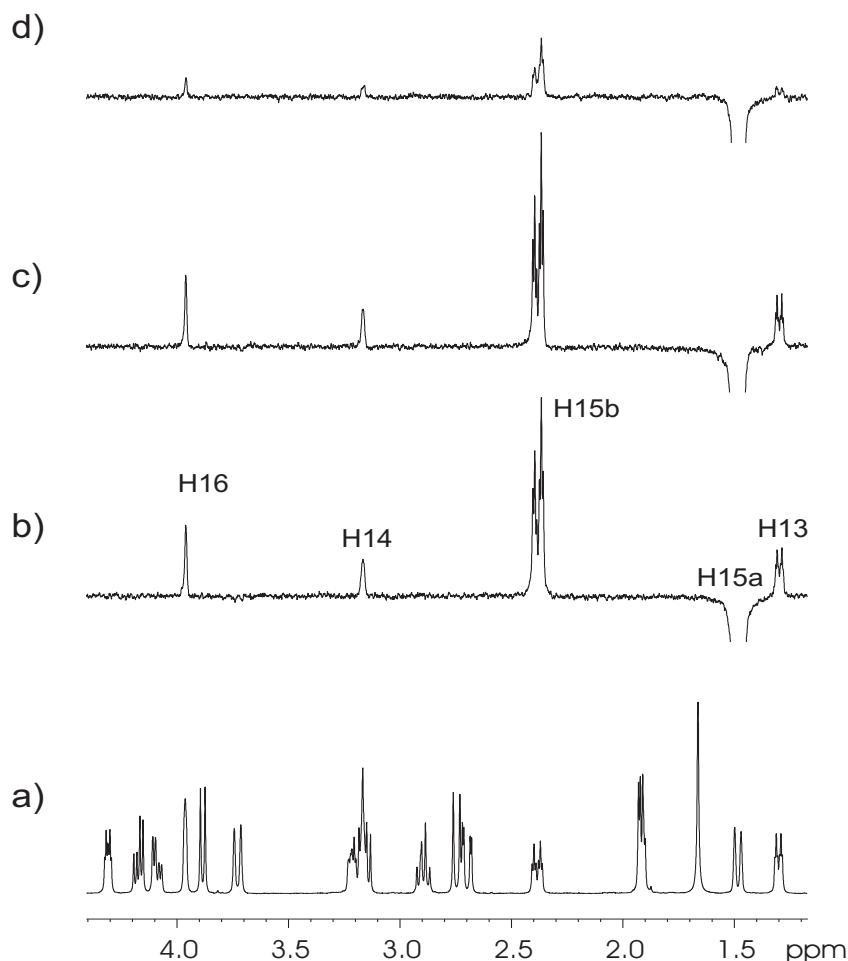


Figura 4-16. a) Espectro ^1H convencional a 500 MHz de la estricnina en CDCl_3 . b-d) Espectros 1D GROESY: b) a temperatura ambiente; c) a 298K, con giro de 20 Hz; d) a 298K, sin giro. El protón H15a se invirtió selectivamente con un pulso de 180° selectivo de 20 ms (forma gausiana truncada al 1%). Para el tiempo de mezcla ROE se aplicó onda continua (3 KHz) durante 500 ms.

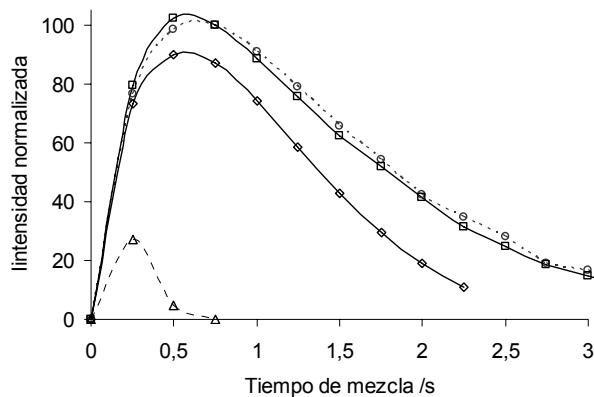


Figura 4-17. Curva de crecimiento ROE para el protón H15a de la estricnina utilizando el experimento GROESY. El tiempo de *spin lock* se varió de 0.25 a 3.25 s. Ver detalles experimentales en la Fig. 4-16. Se representan cuatro resultados: (—□—) con giro a temperatura ambiente (~296 K); (.....○.....) con giro a 298 K; (—◊—); sin giro a temperatura ambiente (~296 K); y (....Δ....) sin giro a 298 K.

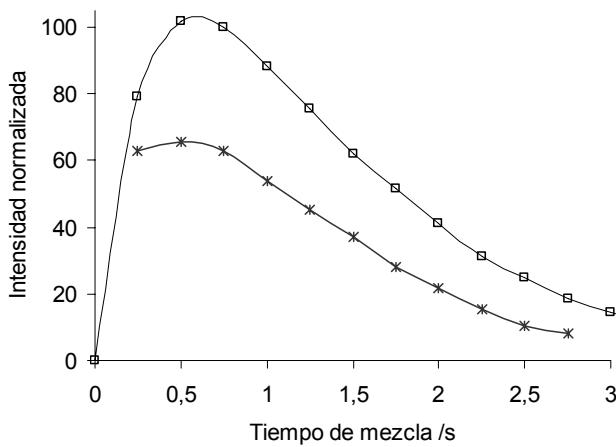


Figura 4-18. Curva de crecimiento ROE para el protón H15a de la estricnina. Los parámetros son los mismos que en la Fig. 4-17. Se representan dos resultados adquiridos a temperatura ambiente (~296 K): (—□—) utilizando la secuencia GROESY con giro; y (—*—) utilizando la secuencia GROESY-compensada sin giro.

4.3.2.3 Efecto del giro sobre la convección sin considerar la difusión

Para medir la velocidad de convección, N.M. Loening y J. Keeler¹²¹ han descrito un método que se basa en los experimentos de difusión diseñados para compensar la convección. Utilizan una secuencia donde el tiempo de difusión está dividido en dos

¹²¹ Loening, N. M.; Keeler, J. *Journal of Magnetic Resonance* **1999**, 139, 334-341.

periodos (Δ_1 y Δ_2), y alteran estos periodos de difusión de tal forma que la suma de los dos se mantiene constante aunque la diferencia varia. Con esto consiguen un experimento donde la atenuación depende únicamente de la convección y calculan la velocidad máxima de convección, v_{\max} , mediante la ecuación:

$$\frac{S(\Delta)}{S_0} = \frac{\sin(\gamma s G_0 v_{\max} \tau \Delta)}{\gamma s G_0 v_{\max} \tau \Delta} \quad [4-1]$$

donde Δ es la diferencia entre los dos periodos de difusión ($\Delta_1 - \Delta_2$), G_0 es la intensidad del gradiente aplicado, τ es la duración del gradiente, s el factor forma, γ la constante giromagnética, S_0 es la señal cuando la diferencia entre los dos periodos de difusión es igual a cero y $S(\Delta)$ es la señal cuando si hay diferencia entre los dos periodos de difusión.

Se modificó la secuencia compensada DBPPLED de manera que el tiempo total de difusión total se mantiene constante en 150 ms y se varían los dos periodos de difusión en intervalos de 5ms, al principio $\Delta_1 = \Delta_2 = 75$ ms y al final $\Delta_1 = 145$ ms y $\Delta_2 = 5$ ms. La intensidad de cada uno de los gradientes bipolares de desfase/reenfoque se mantuvo constante al 20%. El resto de los parámetros no se modifica (Fig. 4-19).

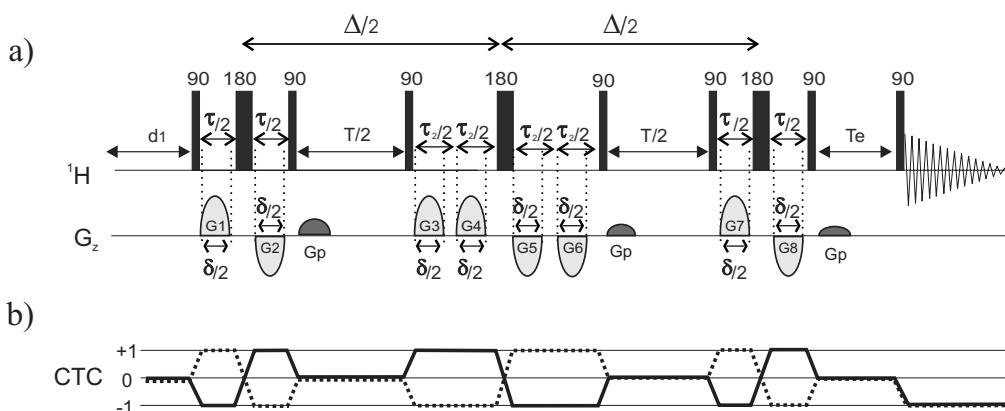


Figura 4-19. Secuencia DBPPLED modificada para medir la velocidad de convección. El tiempo de difusión total ($\Delta_1 + \Delta_2$) se mantiene en 150 ms pero los dos periodos de difusión Δ_1 y Δ_2 se varían en intervalos de 5ms (al principio $\Delta_1 = \Delta_2 = 75$ ms y al final $\Delta_1 = 145$ ms y $\Delta_2 = 5$ ms). La intensidad de los gradientes de reenfoque/desfase se mantiene constante al 20%. El resto de los parámetros son los mismos que en la secuencia DBPPLED.

Con esta secuencia DBPPLED modificada se realizaron 4 series de experimentos en las condiciones descritas. Los resultados se muestran en la Fig. 4-20. Las principales conclusiones son que, a temperatura ambiente (con el sistema de regulación de temperatura apagado), no hay atenuación de las señales debido a la convección (Fig.

4-20a-b) y no hay diferencia si el experimento se realiza sin giro (a) o con giro (b). Sin embargo, a 320 K se observa la atenuación de la señal por los efectos de convección, y a medida que $\Delta 1$ y $\Delta 2$ son más diferentes la atenuación de las señales es más evidente (Fig. 4-20 c). Esta atenuación de señal debida a la convección no se observa cuando se gira la muestra (Fig. 4-20d).

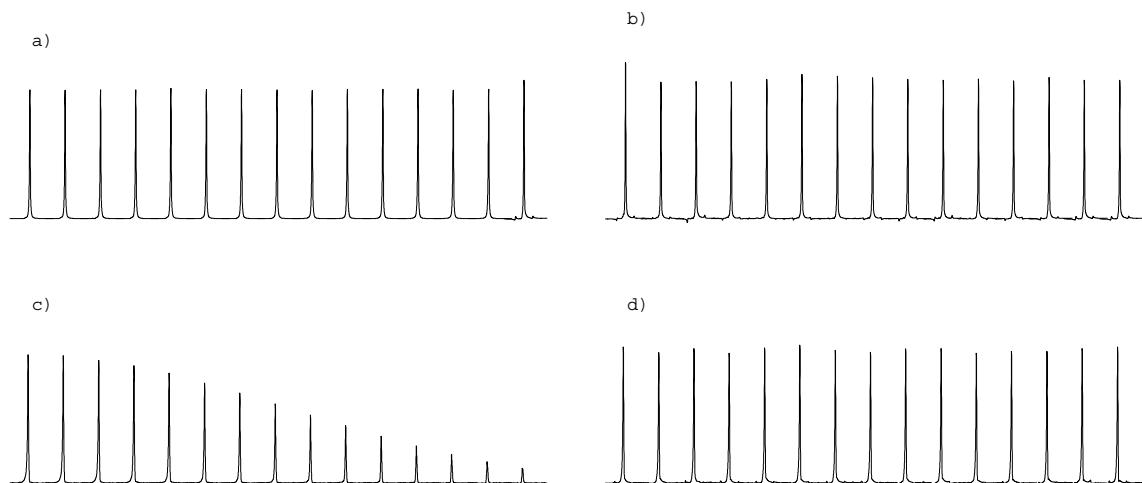


Figura 4-20. Efecto de la secuencia DBPPLED modificada (Fig. 4-19) sobre la señal residual de agua en una muestra de D_2O . Los dos tiempos de difusión se varían en periodos de 5 ms. El tiempo de difusión total es de 150 ms. Esto quiere decir que en las 4 figuras, la primera señal de la izquierda corresponde a $\Delta 1=\Delta 2=75$ ms y que la última de la derecha corresponde a $\Delta 1=145$ ms y $\Delta 2=5$ ms. a) y b) Temperatura ambiente (295.2 K), c) y d) 320 K, a y c) sin rotación, b y d) con rotación de la muestra.

Con este experimento, se ha confirmado nuevamente que el girar la muestra es un método muy eficiente para minimizar los efectos de convección. Sin embargo, si se analizan las intensidades de las señales, cuando se trabaja a temperatura ambiente con giro y sin giro (Fig. 4-20 a y b), se observa que el efecto de girar la muestra puede provocar un aumento de inestabilidad. El coeficiente de variación, CV, aumenta de 0.44% cuando no se gira a 3.4 % cuando se gira, y en los espectros se observa un aumento de bandas laterales. Para verificar estos resultados, el experimento a 330 K se repitió con un tiempo total de difusión de 320 ms variando los dos períodos de difusión $\Delta 1$ y $\Delta 2$ en intervalos de 10 ms. En este caso los resultados se presentan con la gráfica de intensidad de señal en función de la diferencia de deltas $\Delta 1-\Delta 2$ (Fig. 4-21) y se confirman las mismas conclusiones: el giro del tubo de RMN minimiza la convección pero adiciona una cierta fluctuación en la intensidad de las señales. Este resultado indica que no se puede utilizar cualquier velocidad de giro en los experimentos de difusión.

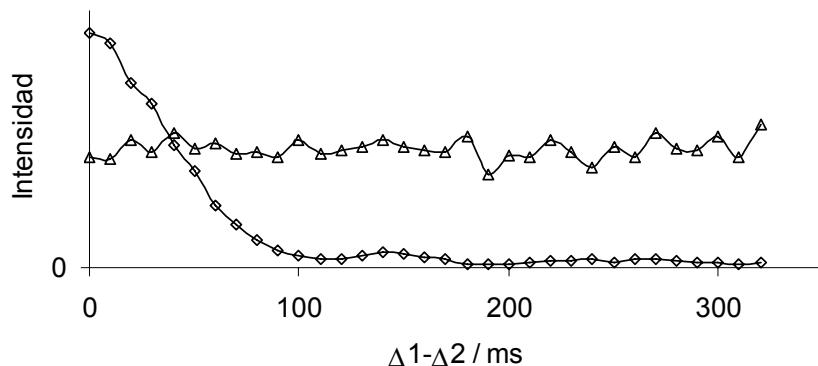


Figura 4-21. Gráfica de la intensidad de la señal residual de agua en D_2O , en función de la diferencia de deltas $\Delta 1-\Delta 2$, a 330 K y utilizando la secuencia de la Fig. 4-19. El tiempo de difusión total (Δ) es de 320 ms con variación en intervalos de 10 ms. El primer punto de izquierda a derecha corresponde a $\Delta 1=\Delta 2=160$ ms, mientras que en el último $\Delta 1=320$ ms y $\Delta 2=0$ ms. Se representan dos resultados: (Δ) con rotación y (\diamond) sin rotación.

Con los datos de la caída de la intensidad de señal debido a la convección mostrados en la Fig. 4-21, se ajustó dicha caída a una función seno. El mejor ajuste encontrado con la Ec. 4-1 da una velocidad máxima de convección, v_{\max} , de 0.01 cm s^{-1} (Fig. 4-22). Hay que subrayar que para realizar estas medidas se está utilizando una secuencia modificada, mientras que para los cálculos se está utilizando la ecuación propuesta para la secuencia original.

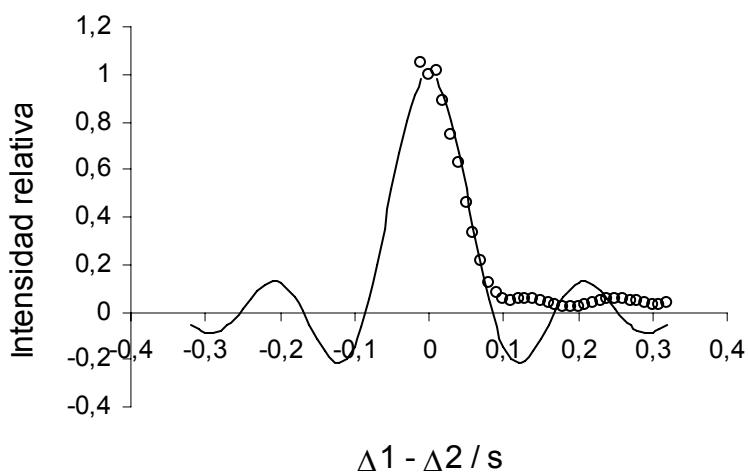


Figura. 4-22. Gráfica de la intensidad de señal (A/A_0) en función de la diferencia $\Delta 1-\Delta 2$ a 330 K. Los datos experimentales son los círculos y son los mismos de la Fig. 4-21 (adquiridos sin rotación de la muestra). El tiempo de difusión total (Δ) es de 320 ms con variación en intervalos de 10 ms. El primer punto experimental de izquierda a derecha corresponde a $\Delta 1-\Delta 2=0$ ms, mientras que en el último $\Delta 1-\Delta 2=320$ ms. La línea continua representa el ajuste con la Ec. 4-1 con un valor de v_{\max} de 0.01 cm s^{-1} .

4.3.3 Girar el tubo a velocidades apropiadas

En la presente tesis doctoral, en todos los experimentos descritos hasta ahora se ha utilizando un periodo de difusión de 150 ms que es un múltiplo de 3 ciclos completos para la velocidad de giro utilizada de 20Hz. El objetivo de esta sección consiste en estudiar, en detalle, la relación que debe existir entre el tiempo de difusión y la velocidad de giro para obtener la intensidad de señal máxima. Para este estudio se han seleccionado dos moléculas de tamaño diferente: una pequeña en un disolvente orgánico poco viscoso (etilbenceno en cloroformo), y una proteína disuelta en un medio más viscoso (lisozima disuelta en 90% H₂O-10% D₂O).

Para investigar el efecto de la velocidad del giro del tubo sobre la intensidad de las señales, aplicamos el experimento BPPLED a una muestra de etilbenceno en CDCl₃ a 300K, utilizando un tiempo de difusión de 50 ms y diferentes velocidades de giro. La Fig. 4-23a-e muestra la intensidad de la señal del grupo metileno resultante cuando se aplica una intensidad de gradiente del 20% con velocidades de giro de 0, 10, 20, 30 y 40 Hz. Observamos que cuando no se gira la muestra la señal se pierde casi completamente por convección (Fig.4-23a) Cuando se gira la muestra, se recupera la intensidad de las señales aunque dicha recuperación es dependiente de la velocidad de giro (Fig.4-23b-e). Máxima intensidad se obtiene a 20 y 40 Hz que corresponden a 1 y 2 ciclos completos del tiempo de difusión, mientras que está parcialmente atenuada a 10 y 30 Hz que son $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{2}$ de ciclo, respectivamente. Las mismas conclusiones se tienen cuando los experimentos se realizan con una intensidad de gradiente del 60% pero, en este caso, la atenuación de la señal es más acentuada cuando se gira a 10 y 30 Hz. Esto significa que esta pérdida de señal parcial debida a giros incompletos tiene una dependencia experimental con la intensidad de gradiente utilizada.

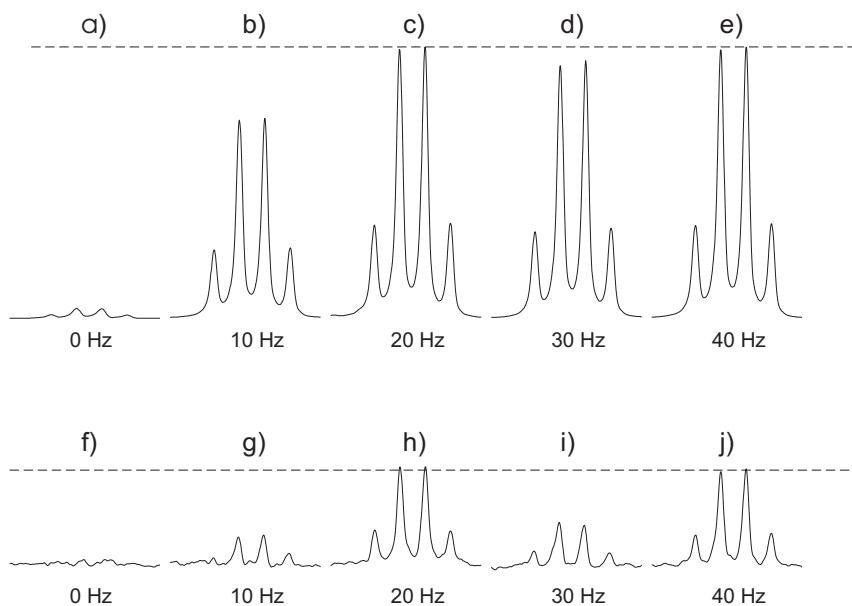


Figura 4-23. Intensidad de la señal del metíleno de una muestra de etilbenceno en CDCl_3 en función de la velocidad de giro. La secuencia utilizada es la BPPLIED con un tiempo de difusión de 50 ms a-e) $\mathbf{G}=11.08 \text{ G cm}^{-1}$, f-j) $\mathbf{G}=33.24 \text{ G cm}^{-1}$. La velocidad de giro: 0 Hz (a,f), 10 Hz (b,g), 20 Hz (c,h), 30 Hz (d,i), y 40 Hz (e,j). Los espectros (f-j) han sido aumentados 16 veces. Otros parámetros experimentales: $\mathbf{T}_e=50 \text{ ms}$, $\delta/2=1 \text{ ms}$ y $\mathbf{T}_r=100 \mu\text{s}$.

Con una muestra de etilbenceno se han estudiado las curvas de la caída exponencial con tiempos de difusión de 12.5, 25, 35.7 y 50 ms y velocidades de giro de 0, 10, 20 y 40 Hz (Fig. 4-24). En todos los casos la duración total de los gradientes de desfase/reenfoque es de 2 ms, por lo que las gráficas de mayor tiempo de difusión tienen menos puntos. Hay que resaltar que la intensidad de las señales está normalizada, por lo que el primer punto en todos los casos es de valor 1. Una vez más, se puede observar claramente que sin rotación de la muestra las señales decaen mucho más rápidamente debido a los efectos de convección y que dichas pérdidas se minimizan si se gira la muestra. También se puede concluir que cuando hay giros completos la caída exponencial es similar a la obtenida con la secuencia DBPLIED, mientras que cuando hay giros incompletos no. Aunque esto es un poco difícil visualizarlo en las gráficas, el caso más claro se observa en la Fig. 4-24d: cuando se gira a 20 y 40 Hz, que corresponde a 1 y 2 ciclos completos, el resultado es similar a cuando se utiliza la secuencia DBPLIED, pero no es así cuando se gira a 10 Hz que corresponde a $\frac{1}{2}$ giro. En este último caso, hay un aumento en la caída exponencial y por tanto un aumento aparente en el coeficiente de difusión. Estas conclusiones se observan de manera más clara al analizar el valor experimental de \mathbf{D} (tabla 4-12). El valor obtenido utilizando la secuencia DBPLIED y el valor obtenido con la secuencia BPPLIED con giro de la

muestra en los 3 casos donde se tienen ciclos completos (25 ms con 40 Hz y 50 ms con 20 y 40 Hz) siempre está por debajo de $2.20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, mientras que en los casos de giros incompletos hay un considerable aumento en el valor de **D**.

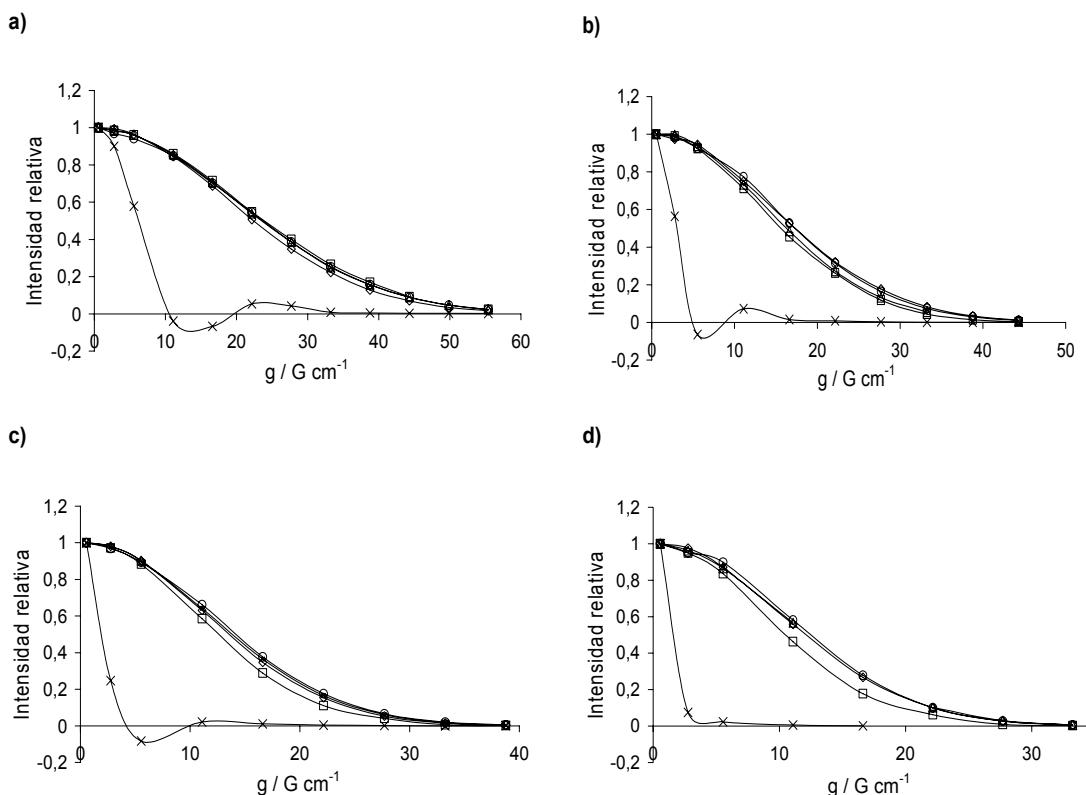


Figura 4-24. Decaimiento de la señal en función del tiempo de difusión y velocidad de giro utilizando la secuencia BPPLED y DBPPLED. Los periodos de difusión son a) 12.5 ms, b) 25 ms, c) 35.7 ms, y d) 50 ms. La velocidad de giro en la secuencia BPPLED es: 0 Hz (x), 10 Hz (□), 20 Hz (△), y 40 Hz (◊). Los datos obtenidos con la secuencia DBPPLED se indican: (o). Los parámetros experimentales son: Gradientes con forma seno, $\text{Te}=50$ ms, $\delta/2=1$ ms, y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$. En (a) se adquirieron 12 espectros con intensidad de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % de la corriente máxima, en (b) 10 espectros con intensidades de 1 a 80%, en (c) 9 espectros con intensidad de 1 a 70% y en (d) 8 espectros con intensidad de 1 a 60%.

Tabla 4-12. Coeficiente de difusión **D** de una muestra de etilbenceno a 300K en CDCl_3 , utilizando diferentes velocidades de giro y tiempos de difusión. La desviación corresponde al error en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Fig. 4-24.

Δ /ms	BPPLED (10 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLED (20 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLED (40 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	DBPPLED $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
12.5	$2.25 \pm 0.016 \text{ (} \frac{1}{8} \text{)}$	$2.29 \pm 0.012 \text{ (} \frac{1}{4} \text{)}$	$2.25 \pm 0.021 \text{ (} \frac{1}{2} \text{)}$	2.20 ± 0.022
25	$2.54 \pm 0.030 \text{ (} \frac{1}{4} \text{)}$	$2.33 \pm 0.017 \text{ (} \frac{1}{2} \text{)}$	$2.01 \pm 0.012 \text{ (} 1 \text{)}$	2.11 ± 0.012
37.5	$2.60 \pm 0.085 \text{ (} \frac{3}{8} \text{)}$	$2.15 \pm 0.008 \text{ (} \frac{3}{4} \text{)}$	$2.24 \pm 0.009 \text{ (} \frac{3}{2} \text{)}$	2.07 ± 0.025
50	$2.36 \pm 0.105 \text{ (} \frac{1}{2} \text{)}$	$2.05 \pm 0.025 \text{ (} 1 \text{)}$	$2.03 \pm 0.036 \text{ (} 2 \text{)}$	2.07 ± 0.018

Para comprobar todos estos resultados y poder realizar experimentos similares con gradientes más fuertes sin perder toda la señal por convección, se utilizó una muestra de lisozima disuelta en 90% H₂O/10% D₂O. Se realizaron experimentos con la secuencia BPPLED-W5 con un tiempo de difusión de 50 ms a dos temperaturas y diferentes velocidades de giro. La Fig. 4-25 muestra parte de las señales de la región alifática. El efecto de la velocidad de giro es más visible si se compara con la muestra anterior de etilbenceno en cloroformo. Los resultados muestran que a 300 K (Fig. 4-25a-e) prácticamente no hay convección y se obtiene la misma intensidad sin y con rotación a 20 y 40 Hz, que para un tiempo de difusión de 50ms son 1 y 2 giros completos, respectivamente. Sin embargo, se obtiene mayor decaimiento cuando se gira la muestra a 10 y 30 Hz. Los mismos resultados se obtienen al realizar los experimentos a 310 K donde los efectos de convección son más evidentes (Fig. 4-25f-j).

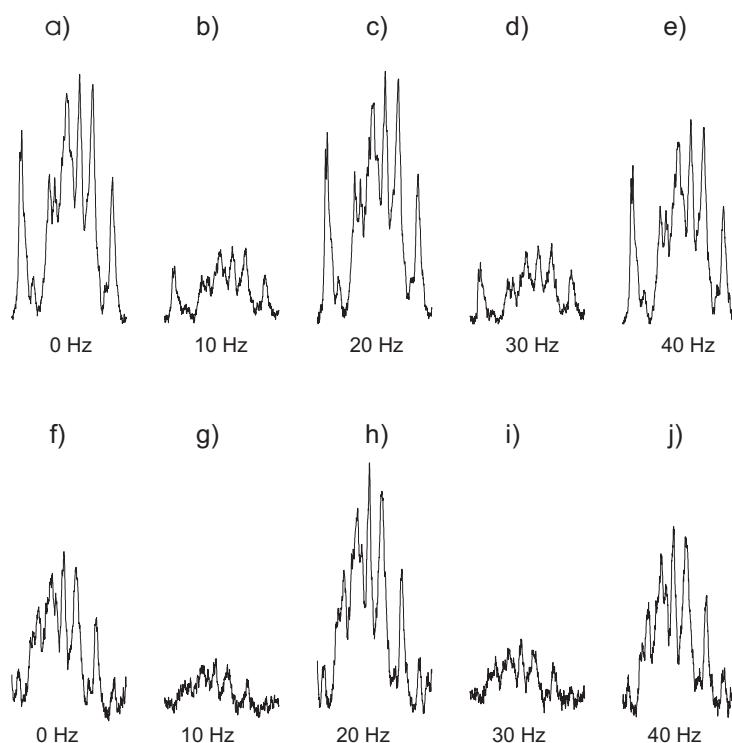


Figura 4-25. Visualización de una región alifática de la lisozima utilizando la secuencia BPPLED-W5 con diferentes velocidades de giro: 0 Hz (a,f), 10 Hz (b,g), 20 Hz (c,h), 30 Hz (d,i), y 40 Hz (e,j). Temperatura: a-e) 300K, y f-j) 310K. Otras condiciones experimentales son: $\Delta=50$ ms, $T_e= 50$ ms, $g=50$ G cm⁻¹, $\delta/2=2$ ms, y $T_r=100$ μ s.

También se estudiaron las curvas de la caída exponencial con diferentes velocidades de giro y tiempos de difusión (Fig. 4-26). Nuevamente se obtienen resultados óptimos cuando la velocidad de giro da ciclos completos y erróneos cuando

los giros no son múltiplos de 360° . A partir de los valores experimentales de \mathbf{D} se ratifica que, cuando los giros no son completos, se obtienen valores erróneos que pueden llegar a ser muy importantes y poco fiables (tabla 4-13).

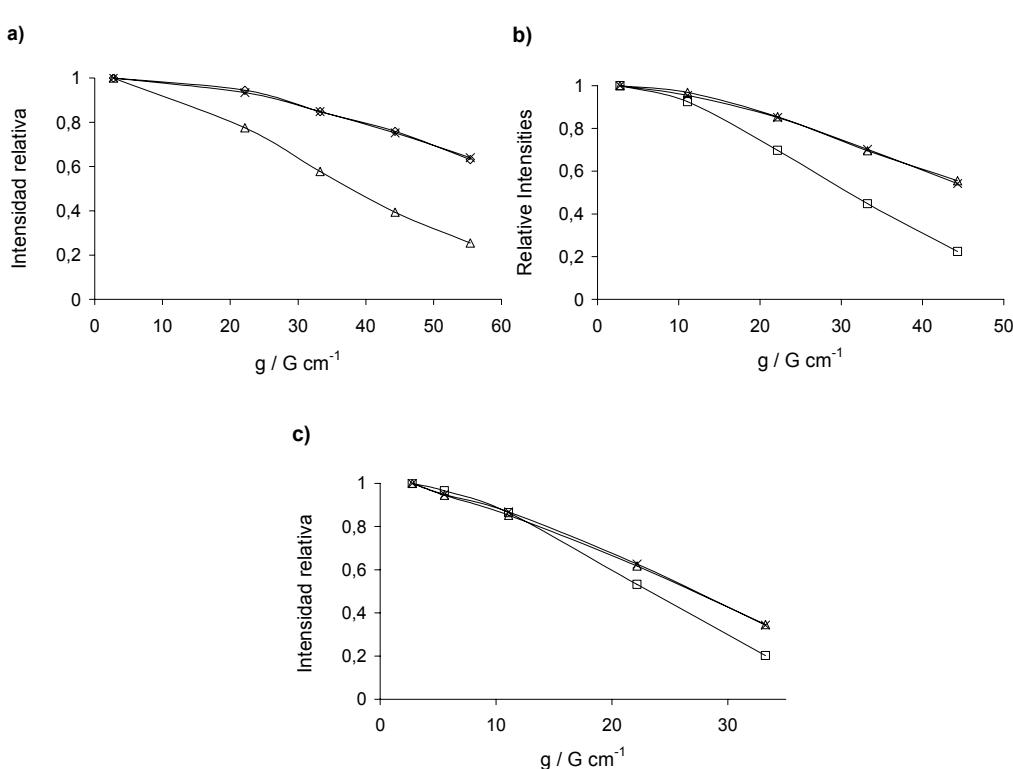


Figura 4-26. Decaimiento exponencial de la señal de la muestra de lisozima a 300 K para diferentes tiempos de difusión y velocidades de giro. Tiempo de difusión: a) 25 ms, b) 50 ms, y c) 150 ms. Velocidad de giro: 0 Hz (x), 10 Hz (□), 20 Hz (Δ), y 40 Hz (◊). Los parámetros experimentales son: experimento BPPLED-W5, gradientes con forma seno, $Te=50$ ms, $\delta/2=2$, y $Tr=100$ μ s. Se adquirieron 5 Espectros con intensidad de: (a) 5 a 100 %, (b) 5 a 80%, y (c) 5 a 60%.

Tabla 4-13. Coeficiente de difusión \mathbf{D} de lisozima (90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$) a 300 K utilizando diferentes velocidades de giro y tiempos de difusión Δ . La desviación corresponde al error en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en la Fig. 4-26.

Δ /ms	BPPLED-W5 (0 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLED-W5 (10 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLED-W5 (20 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	BPPLED-W5 (40 Hz) $\mathbf{D}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
25	1.31 ± 0.026		$3.99 \pm 0.033 (1/2)$	$1.35 \pm 0.010 (1)$
50	1.36 ± 0.006	$3.35 \pm 0.016 (1/2)$	$1.34 \pm 0.016 (1)$	
150	1.37 ± 0.010	$2.1 \pm 0.036 (3/2)$	$1.36 \pm 0.021 (3)$	

Con el interés de conocer más sobre el efecto de la velocidad de giro, se han realizado experimentos de difusión con un tiempo de difusión de 50 ms y a todas las velocidades de giro permitidas por el equipo de RMN (entre 7 y 40 Hz) (Fig. 4-27). Hay que resaltar la excelente correlación que se obtiene cuando se gira a 20 Hz y cuando no se gira y que se observan algunas inestabilidades cuando se gira a velocidades superiores de 30 Hz.

Por último, hay que señalar que también se ha estudiado el periodo LED y su relación con las velocidades de giro, y se ha determinado que la duración del periodo LED no tiene ningún efecto en la oscilación de la intensidad de señales provocada por el giro de la muestra.

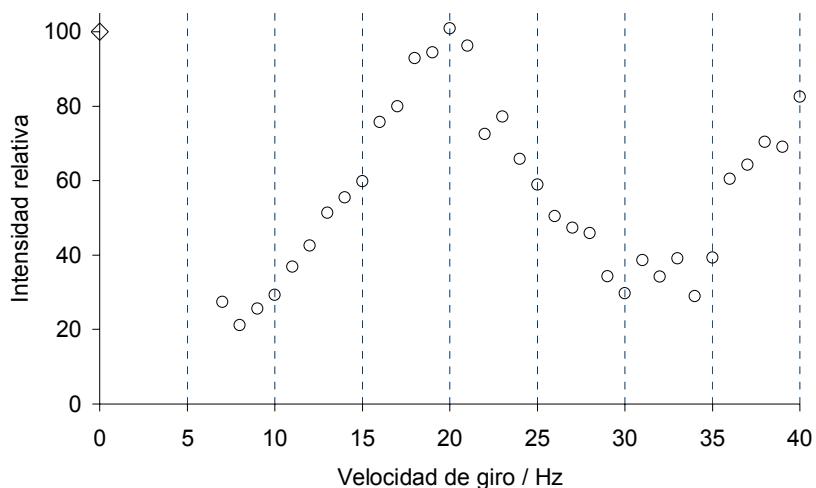


Figura 4-27. Representación gráfica de la dependencia del área de la región alifática de la muestra de lisozima mostrada en el espectro de la Fig. 4-25 con un rango completo de velocidades de giro (7-40 Hz). Otras condiciones experimentales son: experimento BPPLLED-W5, gradientes sinusoidales con fuerza de 50 G cm^{-1} , $\Delta = 50 \text{ ms}$, $\text{Te} = 50 \text{ ms}$, y $\delta/2 = 2 \text{ ms}$.

4.4 Resumen

Los efectos de convección suelen estar presentes, a menudo, cuando se requiere regular la temperatura en cualquier experimento de RMN. Su efecto sobre la medida experimental del coeficiente de difusión \mathbf{D} puede llegar a ser devastador. La magnitud del error dependerá muchísimo de la viscosidad de la muestra, siendo muy importante un control de la temperatura en la medida. Es necesario que estos efectos sean rápidamente detectados y minimizados para obtener un valor preciso y mínimamente interpretable de \mathbf{D} . Se ha demostrado que una manera muy simple de minimizar estas

corrientes consiste en girar el tubo de RMN a velocidades apropiadas en relación al tiempo de difusión utilizado. Las principales conclusiones que se pueden extraer son:

- ✓ Los efectos de convección dependerán del tipo de sonda que utilicemos y del diseño del método de regulación de temperatura.
- ✓ En los experimentos de difusión no se observan efectos de convección cuando se trabaja con el sistema de regulación de temperatura apagado.
- ✓ Si los experimentos de difusión se deben realizar a una temperatura constante, regulada y estable, hay que verificar la existencia/ausencia de efectos de convección.
- ✓ Si los efectos de convección están presentes, se ha demostrado que realizar las medidas de **D** sin giro de la muestra o sin secuencias especiales pueden dar resultados muy erróneos y sin ningún tipo de precisión.
- ✓ Cuando se trabaja con regulación de temperatura, la intensidad de los efectos convección dependen de la temperatura y del disolvente (viscosidad):
 - Para los disolventes poco viscosos, como cloroformo y acetona, los efectos de convección son muy pronunciados a cualquier temperatura.
 - Los efectos de convección para el tolueno y benceno a 298 K, son poco marcados y pero pueden dar resultados incorrectos. A temperaturas superiores, los efectos de convección son importantes.
 - Para el DMSO-d₆ y D₂O se obtienen buenos resultados a 298-300 K, pero empiezan a aparecer efectos de convección por encima de 303 K.
- ✓ La rotación de la muestra minimiza los efectos de la convección y permite una mayor reproducibilidad de las medidas.
- ✓ Dentro del error experimental, los datos obtenidos utilizando la secuencia normal BPPLED con giro de la muestra son comparables a los obtenidos con la secuencia compensada DBPPLED.
- ✓ Girar la muestra es un método más sencillo que el utilizar las secuencias compensadas y se obtienen los mismos resultados. La condición, para tener una medida precisa, es que se debe cumplir que la muestra de ciclos completos (1/Δ) de rotación alrededor del *eje z* durante el tiempo de difusión. Por ejemplo, si fijamos la velocidad de giro a un valor típico de 20 Hz, las rotaciones completas de 360° se obtienen cada 50 ms, por lo tanto se obtiene la máxima intensidad de la señal si el tiempo de difusión es 50, 100, 150 ms.

5 MODELO TEÓRICO SOBRE EL EFECTO DEL GIRO DE LA MUESTRA EN EXPERIMENTOS QUE UTILIZAN SELECCIÓN CON GRADIENTES

Una vez demostrado que los efectos de convección se pueden minimizar girando la muestra y que se pueden obtener medidas de los coeficientes de difusión con buena precisión si se coordina la velocidad de giro con el tiempo de difusión seleccionado, se decidió investigar con profundidad tanto a nivel teórico como práctico el efecto del giro del tubo de RMN en los experimentos gradientes de campo magnético. La mayor parte de este capítulo se desarrolló en el Departamento de Química de la Universidad de Cambridge (Inglaterra) en colaboración con el Profesor James Keeler.

5.1 Hipótesis de no alineación entre *ejes*

Inicialmente se planteó la hipótesis de una no alineación entre *el eje de giro* del tubo de RMN y *el eje del gradiente \mathbf{G}_z* aplicado. Es decir, que el tubo de RMN sí este realmente alineado con el *eje z*, pero el *eje de la bobina de gradiente \mathbf{G}_z* no (Fig. 5-1). De esta forma cuando se gira el tubo de RMN la molécula permanece siempre en la misma posición sobre el *eje de giro* del tubo de RMN, pero puede cambiar de posición sobre el *eje del gradiente \mathbf{G}_z* . Esto causaría que si el gradiente de reenfoque se da en un momento donde la molécula no se encuentra en la misma posición sobre el *eje del gradiente \mathbf{G}_z* que cuando se aplicó el gradiente de desfase, los espines no serán reenfocados y habrá una disminución de la señal detectada. Esta hipótesis explicaría el porqué no hay pérdida de señal cuando se dan giros múltiples de 360° y porqué la pérdida es máxima cuando los giros son de 180°. Además, también explicaría porque el efecto es más visible a medida que se usan gradientes más fuertes.

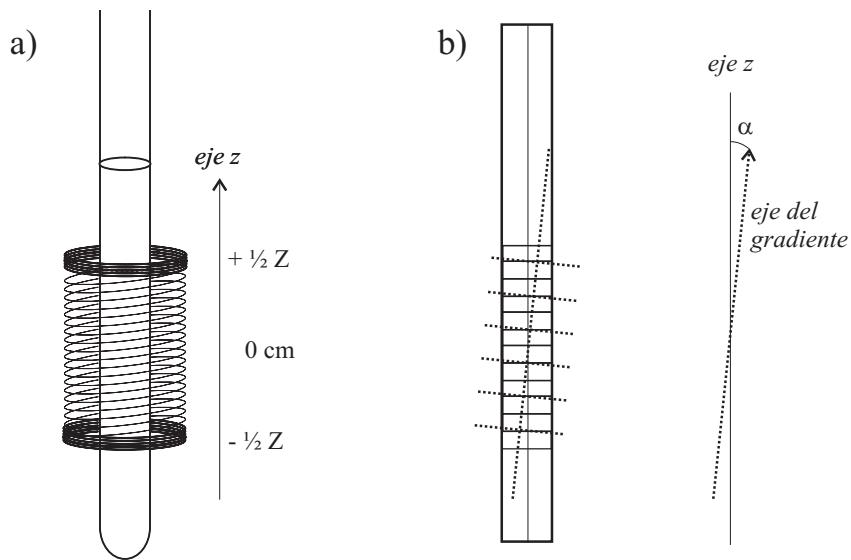


Figura 5-1. a) Representación de un tubo de RMN con la bobina de gradientes alrededor de la región activa de la muestra. b) Representación de una no alineación entre el eje de la bobina y el eje del tubo de RMN.

5.2 Magnetización observable. Experimento SE y giro de la muestra

Para poder estudiar el comportamiento de las moléculas cuando se gira el tubo de RMN se necesita conocer sus coordenadas dentro del *plano xy*. Las dos coordenadas que describen a cada una de las moléculas en este plano son : i) la distancia, r , que es la distancia que hay entre cada molécula y el centro del tubo de RMN, y ii) el ángulo, β , que es el ángulo del punto de partida de cada molécula.

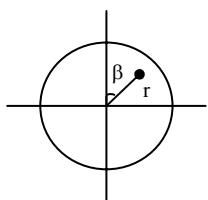


Figura 5-2. Representación de las coordenadas de una molécula en el *plano xy*, donde r es la distancia que hay entre la molécula y el centro del tubo de RMN, y β es el ángulo del punto de partida de cada molécula.

El experimento más sencillo para realizar un estudio detallado del comportamiento de la fase de los espines en los experimentos que utilizan gradientes es el experimento en donde se aplica, después de un pulso de 90° , un gradiente de desfase y posteriormente uno de reenfoque de polaridad invertida (Fig. 5-3a). Sin embargo, en este experimento hay evolución de los espines por efecto de desplazamiento químico. Así que, para simplificar al máximo los

cálculos pero sin tener el problema de la evolución de los espines, se decidió utilizar el experimento PFGSE que reenfoca dicha evolución (ver sección 3.1.1 y 3.1.2). En el presente capítulo, se utilizarán gradientes de desfase y reenfoque con forma rectangular y la misma polaridad (Fig. 5-3b).

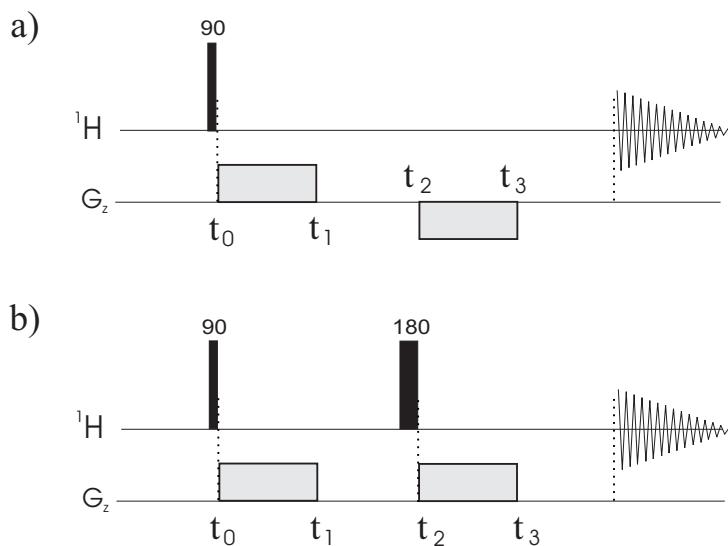


Figura 5-3. a) Secuencia donde se aplica el gradiente de reenfoque seguido del gradiente de desfase con igual intensidad pero de polaridad invertida. En este experimento hay evolución del desplazamiento químico. b) Secuencia eco de espín con gradientes (PFGSE). En este experimento no hay evolución por desplazamiento químico, los gradientes se aplican con igual intensidad y polaridad. Todos los gradientes son rectangulares.

5.2.1 Cálculos teóricos. Tratamiento matemático

El objetivo en esta sección es conocer la fase de las señales al final del experimento para poder estudiar la relación con la velocidad de giro del tubo de RMN. Dado que la fase de las señales sólo cambia con la aplicación de los gradientes, es necesario conocer la fase antes y después de aplicar cada uno de los gradientes, es decir en los tiempos t_0 , t_1 , t_2 y t_3 indicados en las secuencias de las Fig. 5-3a y 5-3b. En ambas secuencias la fase adquirida viene descrita por la misma ecuación:

$$\phi = \int_{t_0}^{t_1} \gamma G z \cdot dt + \int_{t_2}^{t_3} \gamma (-G) z \cdot dt \quad [5-1]$$

donde γ es la constante giromagnética, \mathbf{G} es el gradiente aplicado, y \mathbf{z} es la posición en el *eje z*.

Por otro lado, cuando se gira el tubo de RMN a una frecuencia, ω_r , el gradiente aplicado se puede definir como:

$$G = G_0 + \alpha r G_0 \cos(\omega_r t + \beta) \quad [5-2]$$

donde \mathbf{G}_0 es el gradiente aplicado, α es la constante que indica que el *eje de rotación* del tubo de RMN no está perfectamente alineado con el *eje del gradiente z*, r es la distancia que hay entre cada molécula y el centro del tubo de RMN y β es el ángulo del punto de partida de cada molécula. En este caso si $\alpha = 0$ (es decir que los ejes si están alineados), o $r = 0$, (cuando la molécula esta en el centro del tubo y por tanto no sufre desplazamiento debido a la rotación) significa que el gradiente aplicado $\mathbf{G} = \mathbf{G}_0$.

Sustituyendo la Ec. 5-2 en la Ec. 5-1:

$$\phi = \int_{t_0}^{t_1} \gamma(G_0 + \alpha r G_0 \cos(\omega_r t + \beta))z \cdot dt - \int_{t_2}^{t_3} \gamma(G_0 + \alpha r G_0 \cos(\omega_r t + \beta))z \cdot dt \quad [5-3]$$

Separando los términos de las integrales:

$$\phi = \int_{t_0}^{t_1} \gamma G_0 z \cdot dt + \int_{t_0}^{t_1} \gamma(\alpha r G_0 \cos(\omega_r t + \beta))z \cdot dt - \int_{t_2}^{t_3} \gamma G_0 z \cdot dt - \int_{t_2}^{t_3} \gamma(\alpha r G_0 \cos(\omega_r t + \beta))z \cdot dt \quad [5-4]$$

Como $t_0=0$, la integral del término $\int_{t_0}^{t_1} \gamma G_0 z \cdot dt$ es igual a $\gamma G_0 z(t_1 - 0)$, mientras que la integral del término $\int_{t_2}^{t_3} \gamma G_0 z \cdot dt$ es igual a $\gamma G_0 z(t_3 - t_2)$. La ecuación resultante es:

$$\phi = \gamma G_0 z(t_1) + \int_{t_0}^{t_1} \gamma \alpha r G_0 z \cos(\omega_r t + \beta) dt - \gamma G_0 z(t_3 - t_2) - \int_{t_2}^{t_3} \gamma \alpha r G_0 z \cos(\omega_r t + \beta) dt \quad [5-5]$$

Como $t_1 = t_3 - t_2$, los términos $\gamma G_0 z(t_1)$ y $\gamma G_0 z(t_3 - t_2)$ son iguales por lo que su diferencia es cero. Entonces la ecuación se reduce a:

$$\phi = \int_{t_0}^{t_1} \gamma \alpha r G_0 z \cos(\omega_r t + \beta) dt - \int_{t_2}^{t_3} \gamma \alpha r G_0 z \cos(\omega_r t + \beta) dt \quad [5-6]$$

Integrando la Ec. 5-6 se obtiene:

$$\begin{aligned} \phi &= \gamma \alpha r G_0 z \left[\frac{1}{\omega_r} \cos(\omega_r t) \sin \beta + \frac{1}{\omega_r} \cos \beta \sin(\omega_r t) \right]_{t_0}^{t_1} \\ &\quad - \gamma \alpha r G_0 z \left[\frac{1}{\omega_r} \cos(\omega_r t) \sin \beta + \frac{1}{\omega_r} \cos \beta \sin(\omega_r t) \right]_{t_2}^{t_3} \end{aligned} \quad [5-7]$$

Sacando como factor común $\gamma\alpha rG_0z\frac{1}{\omega_r}$ y colocando los límites de integración en la ecuación da:

$$\begin{aligned}\phi = & \gamma\alpha rG_0z\frac{1}{\omega_r}[\cos(\omega_r t_1)\sin\beta + \cos\beta\sin(\omega_r t_1) \\ & - \cos(\omega_r t_0)\sin\beta - \cos\beta\sin(\omega_r t_0) - \cos(\omega_r t_3)\sin\beta - \cos\beta\sin(\omega_r t_3) \\ & + \cos(\omega_r t_2)\sin\beta + \cos\beta\sin(\omega_r t_2)]\end{aligned}\quad [5-8]$$

Si se considera que $t_0=0$ entonces $-\cos(\omega_r t_0)\sin\beta - \cos\beta\sin(\omega_r t_0) = -\sin\beta$ y la ecuación anterior se simplifica:

$$\begin{aligned}\phi = & \gamma\alpha rG_0z\frac{1}{\omega_r}[\cos(\omega_r t_1)\sin\beta + \cos\beta\sin(\omega_r t_1) - \sin\beta \\ & - \cos(\omega_r t_3)\sin\beta - \cos\beta\sin(\omega_r t_3) + \cos(\omega_r t_2)\sin\beta + \cos\beta\sin(\omega_r t_2)]\end{aligned}\quad [5-9]$$

Dada la relación trigonométrica $\cos(a)\sin(b) + \cos(b)\sin(a) = \sin(a+b)$, la ecuación se simplifica de la siguiente manera:

$$\phi = \gamma\alpha rG_0z\frac{1}{\omega_r}[\sin(\omega_r t_1 + \beta) - \sin\beta - \sin(\omega_r t_3 + \beta) + \sin(\omega_r t_2 + \beta)] \quad [5-10]$$

Como los gradientes tienen la misma duración, $t_3=t_1+t_2$, el término $\sin(\omega_r t_3 + \beta)$ se puede reescribir como $\sin(\omega_r t_1 + \omega_r t_2 + \beta)$. Con ayuda del programa “Mathematica” se obtiene la siguiente expresión para esta ecuación trigonométrica:

$$\phi = \gamma\alpha rG_0z\frac{4}{\omega_r}\left[\sin\frac{\omega_r t_1}{2}\sin\left(\frac{\omega_r t_1}{2} + \frac{\omega_r t_2}{2} + \beta\right)\sin\frac{\omega_r t_2}{2}\right] \quad [5-11]$$

que finalmente se puede reescribir de la siguiente forma:

$$\phi = \gamma\alpha rG_0z\frac{4}{\omega_r}\left[\sin\frac{\omega_r t_1}{2}\sin\left(\frac{\omega_r t_3}{2} + \beta\right)\sin\frac{\omega_r t_2}{2}\right] \quad [5-12]$$

En este punto podemos ver que la condición de reenfoque se cumple cuando el término entre paréntesis cuadrado es cero. Claramente hay dos condiciones de reenfoque, una cuando $\omega_r t_1 = n2\pi$ y otra cuando $\omega_r t_2 = n2\pi$. Esto significa que se obtendrá toda la señal cuando:

- I) La duración del gradiente es a “n” períodos de vueltas completas, $\omega_r t_1 = n2\pi$.
- II) La distancia entre los inicios de los gradientes es “n” períodos de vueltas completas, $\omega_r t_2 = n2\pi$.

A primera vista, puede parecer que existe una tercera condición de reenfoque: cuando la distancia entre el inicio del primer gradiente y el final del segundo gradiente es “n” periodos de vueltas completas, $\omega_r t_3 = n2\pi$, pero esto no es homogéneo a lo largo de todo β .

Con ayuda del programa “Mathematica” se puede graficar β en función de ω_r (Ec. 5-12) para visualizar el valor de la fase adquirida en todo el plano. Como ejemplo, se muestra la dependencia de β en función de ω_r utilizando gradientes de 25 ms de duración y 37 ms de separación entre ellos ($t_1 = 25$ ms y $t_2 = 62$ ms) (Fig. 5-4). Las líneas gruesas continuas indican $\phi = 0$, mientras que las líneas finas continuas y punteadas indican valores de ϕ positivos o negativos. Claramente se observa que $\phi = 0$ cuando:

- $\omega_r = 96.66$ rad (15.38 Hz) que es cuando se cumple la condición de girar “1” ciclo completo entre el inicio de los gradientes de desfase/reenfoque.
- $\omega_r = 193.32$ rad (30.77 Hz) porque se cumple la condición de girar “2” ciclos completos entre el inicio de los gradientes de desfase/reenfoque.
- $\omega_r = 251.31$ rad (40 Hz) ya que se cumple la condición de girar “1” ciclo completo durante la aplicación de cada uno de los gradientes.

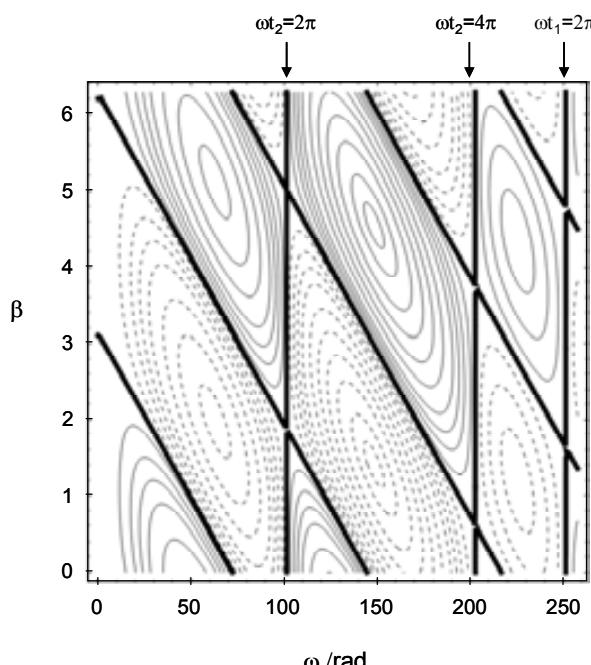


Figura 5-4. Gráfico de la Ec. 5-12 con $t_1 = 25$ ms y $t_2 = 62$ ms. Línea continua gruesa $\phi = 0$ (condición de reenfoque), y líneas continua delgada y punteada $\phi =$ valor positivo o negativo.

Experimentalmente esto significa que solamente cuando se cumple alguna de las dos condiciones de reenfoque antes mencionadas no se perderá intensidad de señal debido al giro del tubo de RMN. Sin embargo, cuando no se cumplan alguna de estas condiciones se observará pérdida de la intensidad de señal.

Para poder obtener la ecuación que nos indique la cantidad de magnetización observable, Mx , debemos integrar la Ec. 5-12 primero sobre β que va de 0 a 2π , luego sobre z que va de $-z_0$ a $+z_0$ y por último sobre r que va de 0 a r_{max} . Estas integrales también se hicieron con ayuda del programa “Mathematica”.

Primero hay que considerar que la integral de la fase sobre β va de 0 a 2π :

$$Mx = \int_0^{2\pi} \cos\phi \cdot d\beta \quad [5-13]$$

$$Mx = \int_0^{2\pi} \cos \left[\frac{4\gamma\alpha r G_0 z}{\omega_r} \left[\sin \frac{\omega_r t_1}{2} \sin \left(\frac{\omega_r t_3}{2} + \beta \right) \sin \frac{\omega_r t_2}{2} \right] \right] \cdot d\beta \quad [5-14]$$

Para resolver la Ec. 5-14 se presenta el problema del término central $\cos(\sin(\frac{\omega_r t_3}{2} + \beta))$ ya que no tiene solución, pues la solución de $\cos(\sin\beta)$ es una función Bessel, cuya integral sólo funciona de 0 a 2π y con $(\sin\beta)$, pero no con $\sin(\text{constante} + \beta)$. Sin embargo, la integral numérica revela que el resultado de la integral es el mismo para $\cos(\sin(\beta))$ que para $\cos(\sin(\beta + \text{constante}))$. Por ejemplo:

$$\int_0^{2\pi} \cos(\sin \beta) \cdot d\beta = \int_0^{2\pi} \cos(\sin(\beta + 6)) \cdot d\beta = \int_0^{2\pi} \cos(\sin(\beta + 0.1)) \cdot d\beta = 4.8$$

$$\int_0^{2\pi} \cos(2\sin \beta) \cdot d\beta = \int_0^{2\pi} \cos(2\sin(\beta + 6)) \cdot d\beta = \int_0^{2\pi} \cos(2\sin(\beta + 0.1)) \cdot d\beta = 1.4$$

Por ello en la Ec. 5-14 se puede hacer que la constante $\omega_r t_3/2$ sea cero y rescribir la ecuación:

$$Mx = \int_0^{2\pi} \cos \frac{4\gamma\alpha r G_0 z}{\omega_r} \left[\sin \frac{\omega_r t_1}{2} \sin \beta \sin \frac{\omega_r t_2}{2} \right] \cdot d\beta \quad [5-15]$$

Ahora se puede resolver la integral sobre β que va de 0 a 2π y que da como resultado la siguiente función Bessel:

$$Mx = \text{BesselJ}\left[0, \frac{4\gamma\alpha r G_0 z}{\omega_r} \left[\sin \frac{\omega_r t_1}{2} \sin \frac{\omega_r t_2}{2} \right] \right] \quad [5-16]$$

La siguiente integral a considerar es sobre z que va de $-z_0$ a $+z_0$:

$$Mx = \int_{-z_0}^{z_0} \text{BesselJ}\left[0, \frac{4\gamma\alpha r G_0 z}{\omega_r} \left[\sin \frac{\omega_r t_1}{2} \sin \frac{\omega_r t_2}{2} \right] \right] dz \quad [5-17]$$

Al resolver la integral sobre z da como resultado la siguiente función:

$$Mx = \text{HypergeometricPFQ}\left[\left\{\frac{1}{2}\right\}, \left\{1, \frac{3}{2}\right\} \frac{4\gamma^2 \alpha^2 r^2 G_0^2 z^2}{\omega_r^2} \left[\sin \left[\frac{\omega_r t_1}{2} \right]^2 \sin \left[\frac{\omega_r t_2}{2} \right]^2 \right] \right] \quad [5-18]$$

La última integral a considerar es sobre r que va de 0 a r_{\max} :

$$Mx = \int_0^{r_{\max}} \text{HypergeometricPFQ}\left[\left\{\frac{1}{2}\right\}, \left\{1, \frac{3}{2}\right\} \frac{4\gamma^2 \alpha^2 r^2 G_0^2 z^2}{\omega_r^2} \left[\sin \left[\frac{\omega_r t_1}{2} \right]^2 \sin \left[\frac{\omega_r t_2}{2} \right]^2 \right] \right] dr \quad [5-19]$$

Al resolver la integral sobre r también se obtiene una función Hypergeométrica:

$$Mx = \text{HypergeometricPFQ}\left[\left\{\frac{1}{2}\right\}, \left\{\frac{3}{2}, 2\right\} \frac{4\gamma^2 \alpha^2 r^2 G_0^2 z^2}{\omega_r^2} \left[\sin \left[\frac{\omega_r t_1}{2} \right]^2 \sin \left[\frac{\omega_r t_2}{2} \right]^2 \right] \right] \quad [5-20]$$

5.2.2 Comprobación experimental

Para estimar el valor experimental de α (Ec. 5-20) se aplicó el experimento PFGSE, con gradientes rectangulares (Fig. 5-3b) y a todas las velocidades de giro permitidas (entre 7 y 40 Hz), a una muestra de 12-corona/D₂O. Esta muestra permite obtener espectros con mejor señal-ruido que cuando se utiliza una muestra de H₂O/D₂O. Los resultados se muestran en la Fig. 5-5, donde los puntos son los datos experimentales y la línea continua es el resultado de graficar la Ec. 5-20 con un valor de $\alpha = 0.7$. La Fig. 5-5a muestra los datos al utilizar gradientes de 10 ms de duración y 45 ms de separación entre ellos. En estas condiciones un giro completo entre el inicio de los gradientes se cumple a los 22.22 Hz (139.6 rad) y dos giros completos a los 44.44 Hz (278.22 rad). En la gráfica se observa una buena correlación entre los datos experimentales con los teóricos, lo que confirma la condición de reenfoque que se dedujo en el capítulo anterior, que indica que deben completarse N ciclos completos de giro entre los inicios de los gradientes de desfase/reenfoque para que se adquiera

toda la señal. Las Fig. 5-5b y 5-5c muestran los resultados con separación entre el inicio de los gradientes de 75 y 90 ms respectivamente, y nuevamente se observa la buena correlación entre los datos experimentales y los teóricos. El resultado más destacado es el mostrado en la Fig. 5-5d donde se utilizaron gradientes rectangulares de 25 ms de duración, y es en estas condiciones donde además de que se cumple la primera condición de N ciclos completos durante el delta de difusión ($\omega=16$ y 32 Hz), se cumple la segunda condición cuando la duración del gradiente es igual a un ciclo completo ($\omega = 40$ Hz = 251.31 rad). En este último caso hay que indicar que la separación entre el inicio de los dos gradientes se determinó a 62 ms para que a la velocidad de 40 Hz no se cumpla la primera condición de reenfoque ya que se han completado $5/2$ vueltas. Hay que mencionar que los espectros adquiridos con gradientes de tan larga duración como los utilizados para obtener la Fig. 5-5d, presentan anomalías en la línea base, posiblemente debido a las corrientes *eddy*, pero fueron seleccionados por ser la duración mínima de aplicación de un gradiente para obtener un giro completo del tubo de RMN a la máxima velocidad de giro permitida por el equipo que es de 40 Hz.

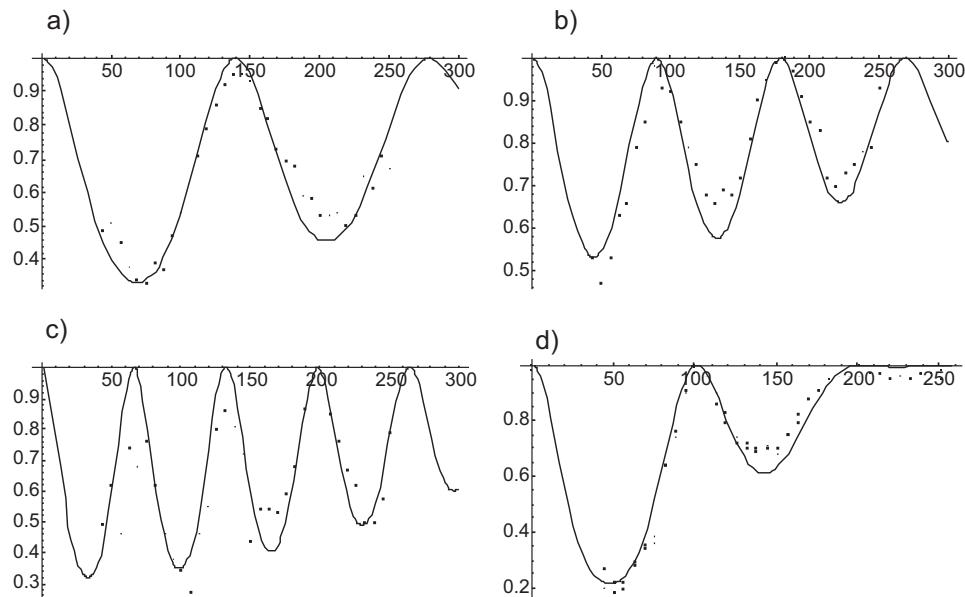


Figura 5-5. Intensidad de la señal en función de la velocidad de giro (en radianes). La línea continua es el valor teórico con $\alpha=0.7$ y los puntos son los datos experimentales. Los valores de las constantes utilizadas son: $\gamma = 2.7 \times 10^{-8}$ T, $\alpha=0.7$, $r_{\max}=2.5$ mm, $Z_0=0.5$ cm. La máxima potencia de los gradientes en el equipo utilizado es 61.5 G cm $^{-1}$ ($=0.615$ T m). Las condiciones experimentales en cada caso son: a) $G_0=0.123$ T m $^{-1}$ (20% de la corriente máxima), $t_1=10$ ms, $t_2=45$ ms, b) $G_0=0.0922$ T m $^{-1}$ (15% de la corriente máxima), $t_1=10$ ms, $t_2=70$ ms, c) $G_0=0.123$ T m $^{-1}$ (20% de la corriente máxima), $t_1=10$ ms, $t_2=95$ ms, y d) $G_0=0.0615$ T m $^{-1}$ (10% de la corriente máxima), $t_1=25$ ms, $t_2=62$ ms.

5.3 Experimento SE de imagen localizada

La hipótesis hasta ahora planteada para explicar los resultados obtenidos es una no alineación entre *el eje de giro* y *el eje de aplicación del gradiente*, lo que provoca una pérdida de señal cuando se gira el tubo de RMN. Sin embargo, para demostrar si esa pérdida es igual para todas las regiones activas de la muestra o es dependiente de la posición en el *eje z* se utilizó otra de las aplicaciones de los gradientes de campo magnético, la técnica de imagen, que consiste en realizar la resolución espacial de las señales a lo largo del *eje z*. El fundamento es medir las variaciones de densidad de espines a lo largo del volumen de la muestra de interés, que en el caso de gradientes en el *eje z*, se puede visualizar como discos apilados verticalmente uno sobre otro, con el *eje z* atravesando el centro de los discos y perpendicular al plano de los mismos. El *eje z* también es definido como co-lineal con el campo magnético externo. Por lo tanto mapear el campo magnético a lo largo del *eje z* consiste en medir el valor promedio de la densidad de espines en cada disco imaginario.

Se utilizó la secuencia imagen-SE (Fig. 5-6) que es resultado de la combinación de la secuencia SE y el módulo de imagen visto en la sección 2.5.4. Para realizar este experimento, la muestra debe tener un solo componente que dé una única señal en el espectro de RMN para evitar la superposición de imágenes con diferentes centros. La señal es adquirida al mismo tiempo que se aplica el gradiente de lectura y los tiempos están elegidos de tal forma que la formación del eco ocurre a la mitad del periodo de adquisición. En estas condiciones la señal no se trunca al principio o al final de este periodo (Fig. 5-7a), y al aplicar la transformada de Fourier se obtiene un espectro donde la fase es dependiente de la posición en el *eje z* (Fig. 5-7b). Normalmente se suele representar en modo magnitud (Fig. 5-7c). El espectro típico de una “imagen” de la densidad de espines a lo largo del *eje z*, es un perfil gaussiano, que en este ejemplo se ha centrado en 0 con la finalidad de mostrar una figura simétrica, ya que realmente está centrado en el desplazamiento químico de la señal dominante, que en este caso es la señal de H_2O . Las unidades del eje horizontal son unidades de frecuencia pero se pueden convertir directamente en unidades de distancia mediante la Ec. 2-13 (ver Fig. 2-7 de la sección 2.5.4). En el presente capítulo todas las imágenes que se muestran tienen unidades de frecuencia o de ppm ya que son las unidades que proporciona directamente el equipo.

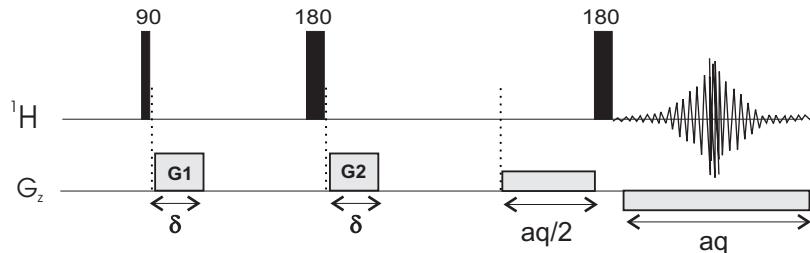


Figura 5-6. Secuencia de pulsos del experimento eco de espín para obtener imágenes (Imagen-SE). En el canal **G_z** se representan los gradientes pulsados con forma rectangular: **G₁/G₂** de duración δ , son los gradientes de desfase/reenfoque, **aq** es el gradiente de lectura que se aplica durante el tiempo de adquisición, y **aq/2** es un gradiente que se introduce para corregir la fase adicional producida por el gradiente durante la adquisición. El ciclo de fase es de 16 (EXORCYCLE en los dos pulsos de 180°).

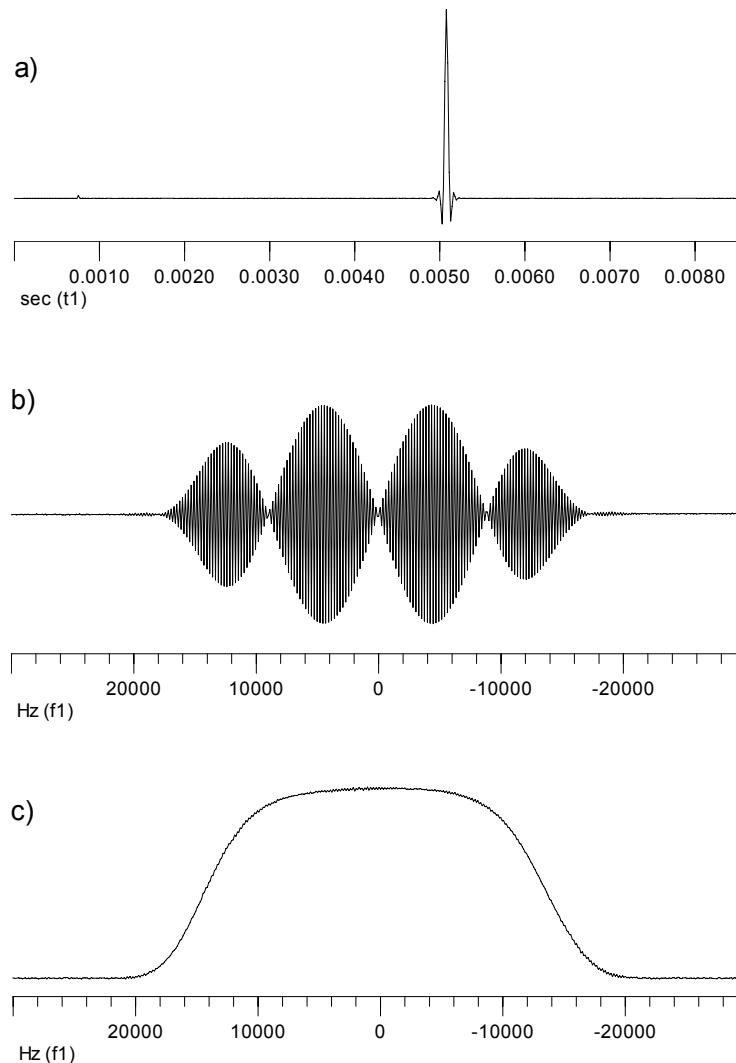


Figura 5-7. Imagen de la muestra de 1% H₂O/D₂O en un equipo de 400MHz con la secuencia imagen-SE (Fig. 5-6). a) Señal adquirida, b) espectro después de aplicar la transformada de Fourier, y c) espectro presentado en modo magnitud. Las condiciones experimentales son: tiempo de difusión Δ de 50ms, fuerza del gradiente de desfase/reenfoque **G₁/G₂** de 10% de la corriente máxima, tiempo de adquisición **aq** de 8.6 ms, fuerza del gradiente de lectura de 10% de la corriente máxima, y ancho de ventana espectral de 150 ppm.

Para ver el perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, cuando se gira o no el tubo de RMN, se utilizó una muestra de 1% H₂O/D₂O con CuSO₄ (para acelerar la relajación), y se utilizó la secuencia imagen-SE girando y sin girar el tubo con dos intensidades de gradiente de desfase/reenfoque diferentes, 10 y 20% de la corriente máxima. El tiempo de difusión utilizado fue de 50 ms, donde un giro completo se completa con una velocidad de giro de 20 Hz. Los resultados se muestran en la Fig. 5-8. Las imágenes de la muestra adquirida sin giro y con un giro completo entre los gradientes de desfase/reenfoque se muestran en la Fig. 5-8a, en la que se observa una superposición total de ambas imágenes en las dos condiciones, comprobando que se adquiere la misma cantidad de señal en todas las regiones del *eje z* cuando no se gira y cuando se gira a una velocidad de 20 Hz. Los resultados de las imágenes de la muestra con un giro completo y con medio giro se muestran en la Fig. 5-8b, donde se observa una anomalía en el perfil gaussiano cuando se gira a la velocidad de 10 Hz. Esta deformación en la forma gausiana presenta diferente grado de disminución de la intensidad de la señal dependiendo de su posición, lo que demuestra que la pérdida de señal debida a giros incompletos no es igual para todas las regiones del *eje z*. Estos resultados se confirman con los experimentos realizados al utilizar el doble de la intensidad de gradientes (20% de la corriente máxima). Nuevamente se observa que el perfil es el mismo cuando se gira con un ciclo completo que cuando no se gira (Fig. 5-8c), y que hay una anomalía en el perfil gaussiano, en este caso mucho más notoria, cuando se gira a la velocidad de 10 Hz (Fig. 5-8b).

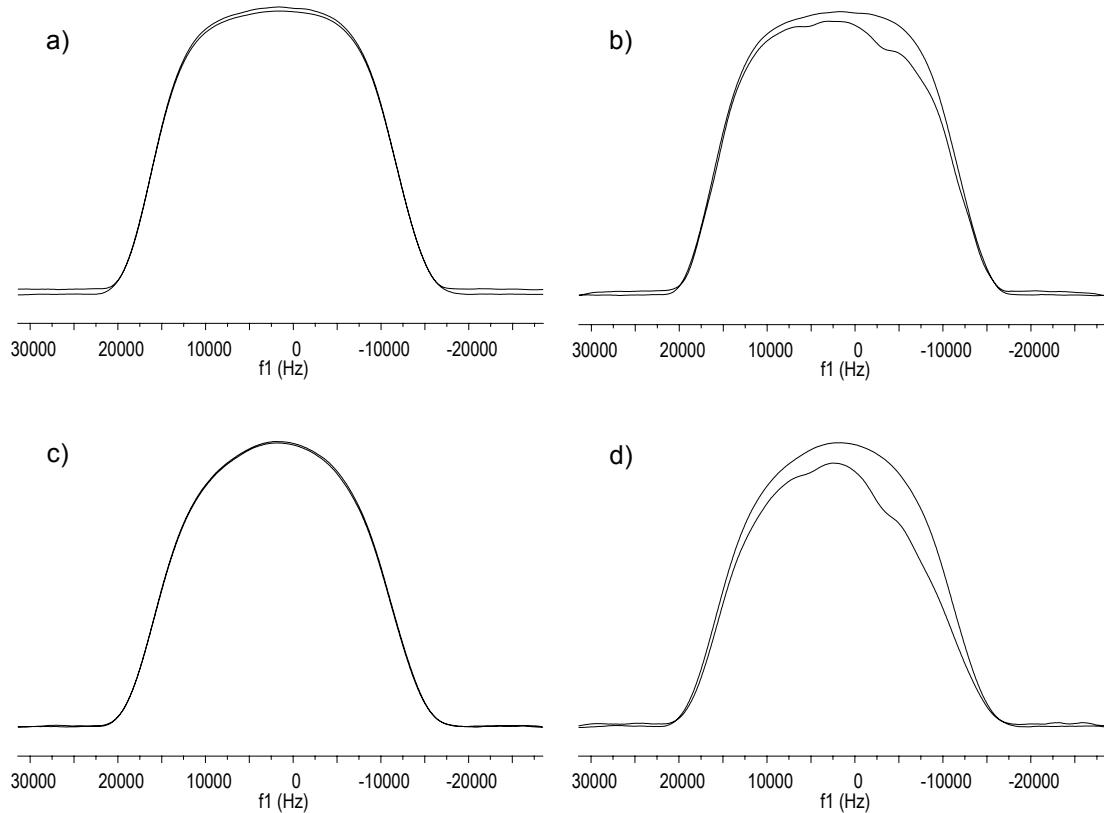


Figura 5-8. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de 1% H₂O/D₂O en un equipo de 400MHz. La intensidad del gradiente de desfase/reenfoque en a) y b) es 10% y en c) y d) 20%. Se representan 8 resultados: a) y c) sin giro y con giro a una velocidad de 20 Hz, donde se ve en cada caso que ambos perfiles se sobreponen y b) y c) sin giro (perfil superior) y con giro a una velocidad de 10 Hz (perfil inferior). Las condiciones experimentales son: tiempo de difusión Δ de 50 ms, tiempo de adquisición **aq** de 8.6 ms, la intensidad del gradiente de lectura es 10% de la corriente máxima, y el ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

Para comprobar todos estos resultados y realizar experimentos similares con gradientes más fuertes, de entre 5 y 50 % de la corriente máxima, se seleccionó una muestra de corona-12 que permite obtener espectros con una buena relación señal-ruido en estas condiciones. En todos los casos se realizaron dos experimentos, uno sin girar el tubo y otro girando el tubo a la velocidad de 10 Hz, velocidad a la cual se ha completado $\frac{1}{2}$ ciclo entre los gradientes. Los resultados de las imágenes obtenidas se muestran en la Fig. 5-9, donde se puede observar nuevamente la pérdida de señal y la forma anómala de la imagen cuando se gira a 10 Hz. Al analizar esta figura se puede concluir que la deformación de la forma gausiana y la pérdida de señal es mayor a medida que aumenta la fuerza de los gradientes. Además, se puede concluir que el fenómeno es independiente de la muestra que se use.

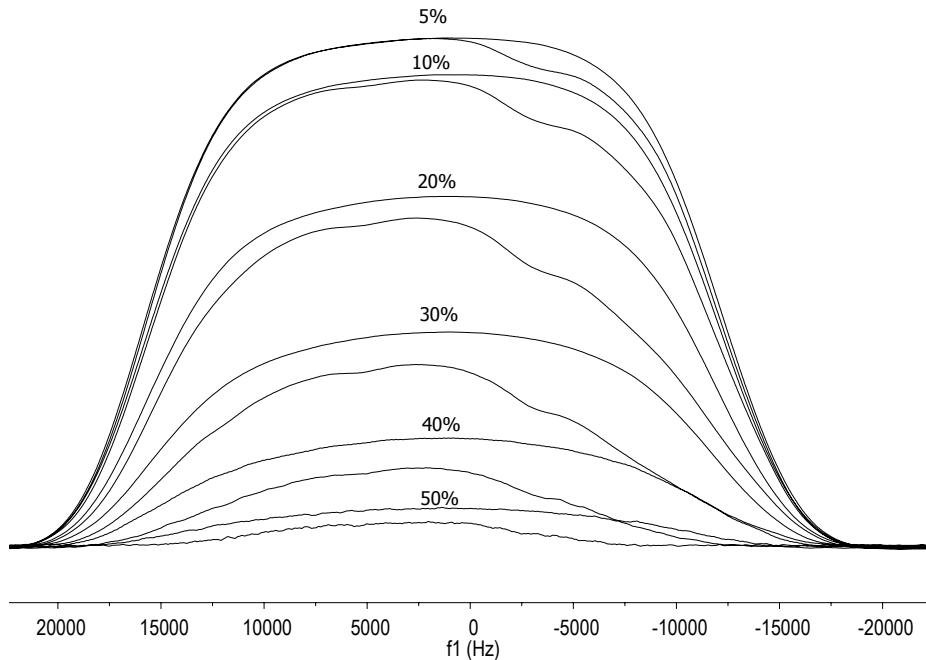


Figura 5-9. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de corona-12/D₂O en un equipo de 400MHz (d1=5s). Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 5-8 excepto que la intensidad de los gradientes de desfase/reenfoque se varía en cada experimento y está indicada en la figura. Para cada intensidad de gradiente se representan 2 resultados: a) sin giro (perfil superior) y b) con giro a una velocidad de 10 Hz (perfil inferior).

Hasta ahora se han mostrado solo experimentos de imagen con giros completos y medios giros. A continuación se muestran los experimentos de imagen a todas las velocidades de giro permitidas por el equipo de RMN (entre 7 y 40 Hz). En esta ocasión se ha utilizado una muestra de PEG/D₂O, ya que también presenta una señal que domina el espectro de RMN y su tamaño molecular permite aplicar gradientes más intensos y obtener espectros con buena relación señal-ruido.

La Fig. 5-10 muestra los datos al utilizar gradientes de 5 ms de duración y 50 ms de separación entre ellos. En estas condiciones un giro completo entre el inicio de los gradientes de desfase/reenfoque se cumple a los 20 Hz y dos giros completos a las 40 Hz. En la gráfica se observa que para estas dos velocidades de giro se obtiene una imagen similar a la que se obtiene si no se gira la muestra, mientras que a todas las otras velocidades hay perdida de señal.

La Fig. 5-11 muestra los datos al utilizar gradientes de 25 ms de duración y 62 ms de separación entre ellos, en estas condiciones un giro completo entre el inicio de los gradientes de desfase/reenfoque se cumple a los 16 Hz y dos giros completos a las 32 Hz. En estas condiciones la duración del gradiente es igual a un ciclo completo a la velocidad de 40 Hz. Hay que indicar que a esta velocidad se han completado $\frac{5}{2}$ vueltas entre el inicio de los dos gradientes. Las conclusiones que se extraen son que las imágenes presentan el mismo perfil cuando no se gira y cuando se gira a 16, 32 y 40 Hz, mientras que a las velocidades intermedias presentan una pérdida de la intensidad que no es tan notoria como en la Fig. 5-10 debido a que se están utilizando fuerzas de gradientes menos altas, esto debido a que con gradientes de tan larga duración hay que tener cuidado de no aplicar potencias altas para no dañar el equipo

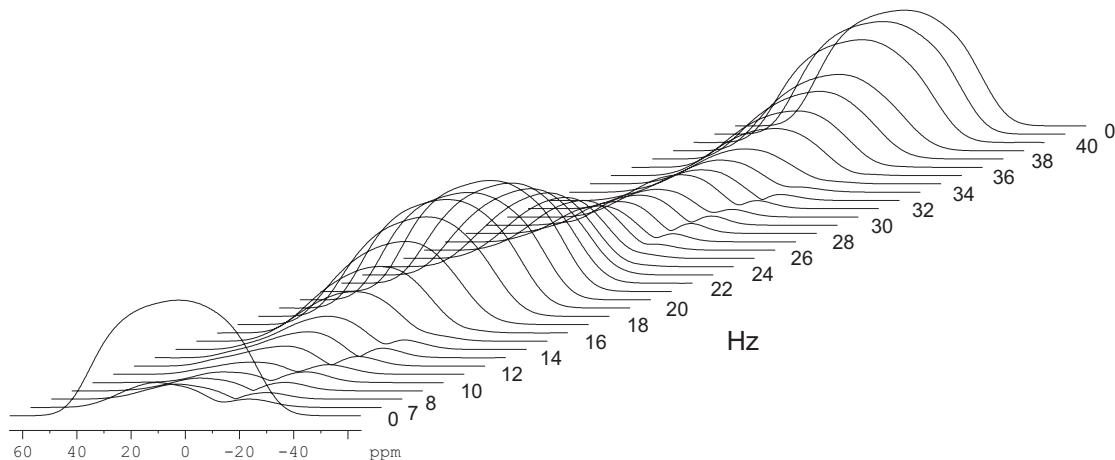


Figura 5-10. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG/D₂O en un equipo de 400MHz (d1=5s). Se representan 35 resultados, la primera imagen y la última adquiridas sin giro de la muestra y las intermedias adquiridas con giro de la muestra variando la velocidad desde 7 hasta 40 Hz. Las condiciones experimentales son: duración de los gradientes de desfase/reenfoque 5ms (t₁), tiempo de difusión de 50ms (t₂), la intensidad del gradiente de desfase/reenfoque de 60% de la corriente máxima, el tiempo de adquisición de 8.6 ms, la intensidad del gradiente de lectura es 10% de la corriente máxima, y el ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

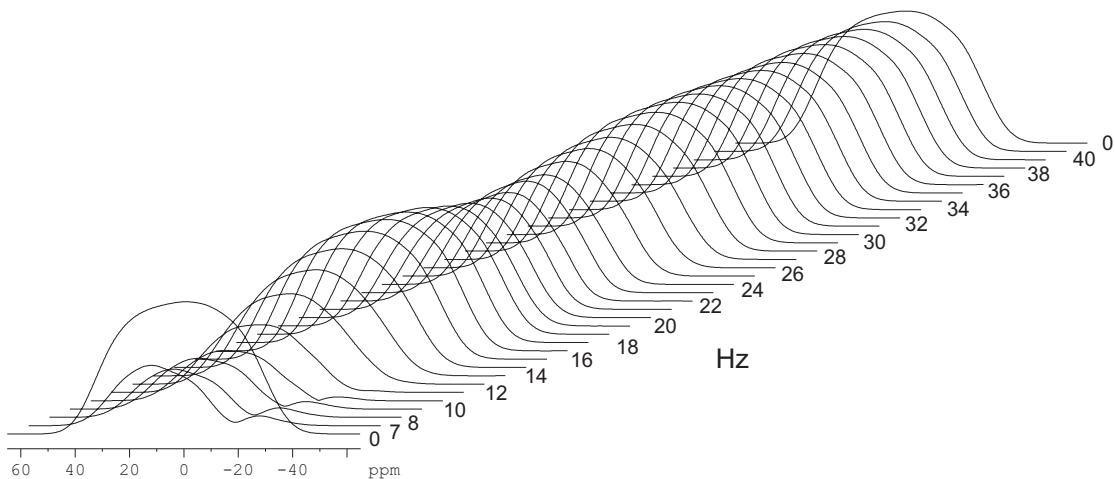


Figura 5-11. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG/D₂O en un equipo de 400MHz (d1=5s). Se representan 35 resultados, la primera imagen y la última adquiridas sin giro de la muestra y las intermedias adquiridas con giro de la muestra variando la velocidad desde 7 hasta 40 Hz. Las condiciones experimentales son: duración de los gradientes de desfase/reenfoque 25 ms (t_1), tiempo de difusión de 62 ms (t_2), la intensidad del gradiente de desfase/reenfoque de 10% de la corriente máxima, el tiempo de adquisición de 8.6 ms, la intensidad del gradiente de lectura es 10% de la corriente máxima, y el ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

5.3.1 Tratamiento matemático. Valor de α lo largo del *eje z*

Una vez demostrado experimentalmente que el valor de α no es constante a lo largo de z , se decidió realizar las integrales para obtener la magnetización observable, Mx , para cada disco del tubo de RMN. Para ello la Ec. 5-16 no se integra sobre z , sino que sólo se integra sobre r que va de 0 a r_{max} :

$$Mx = \int_0^{r_{max}} \text{BesselJ} \left[0, \frac{4\gamma\alpha G_0 z}{\omega_r} \left[\sin \frac{\omega_r t_1}{2} \sin \frac{\omega_r t_2}{2} \right] \right] \cdot dr \quad [5-21]$$

y al resolver la integral sobre r se obtiene la siguiente ecuación:

$$Mx = \text{HypergeometricOF1Regularized} \left[2, -\frac{4\gamma^2 \alpha^2 r_{max}^2 G_0^2}{\omega_r^2} \left[\sin \left[\frac{\omega_r t_1}{2} \right]^2 \sin \left[\frac{\omega_r t_2}{2} \right]^2 \right] \right] \quad [5-22]$$

5.3.2 Comprobación experimental

En esta sección se comparan los datos teóricos con los datos experimentales mostrados en las Fig. 5-10 y Fig. 5-11 obtenidos con la secuencia “SE-imagen”. Para manejar de forma sencilla los datos experimentales se ha utilizado un programa

desarrollado en el Departamento de Química dirigido por el Dr. James Keeler de la Universidad de Cambridge que convierte los datos de los espectros de RMN a valores en una hoja de cálculo. Todos los espectros de las Fig. 5-10 y Fig. 5-11 se exportaron con este programa a una hoja Excel, y gracias a esto los datos se pudieron manejar y graficar de manera más sencilla.

La Fig. 5-12 muestra la gráfica del perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z* de dos de las imágenes utilizadas para crear la Fig. 5-10, la imagen con perfil gaussiano adquirida sin giro de la muestra y la imagen adquirida con giro de la muestra a la velocidad desde 8 Hz, que de entre todas las imágenes con giro de la muestra es la presenta mayor atenuación y deformación. De igual forma en la Fig. 5-13 se muestran dos de las imágenes utilizadas en la Fig. 5-11. En ambas gráficas es muy fácil observar que hay disminución en la intensidad de la señal a lo largo de todo el *eje z* cuando se gira a 8 Hz, pero la pérdida de señal no es la misma para todas las posiciones del *eje z* y es más pronunciada a los -0.1 y -0.2 cm que a los +0.3 cm.

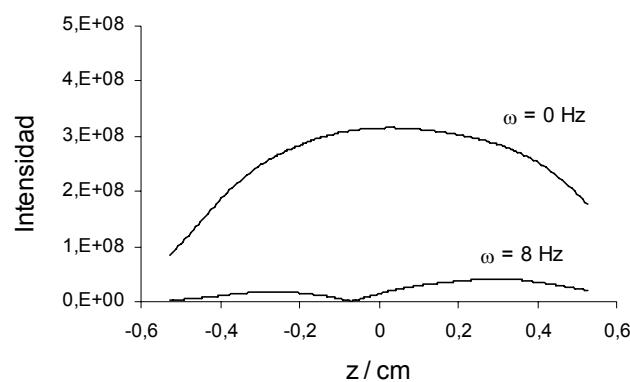


Figura 5-12. Gráfica del perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*. Los datos son los mismos que la Fig. 5-10 ($t_1=5$ ms y $t_2=50$ ms). Se grafican sólo 2 resultados: la imagen con perfil gaussiano adquirida sin giro de la muestra y la imagen adquirida con giro de la muestra a la velocidad de 8 Hz.

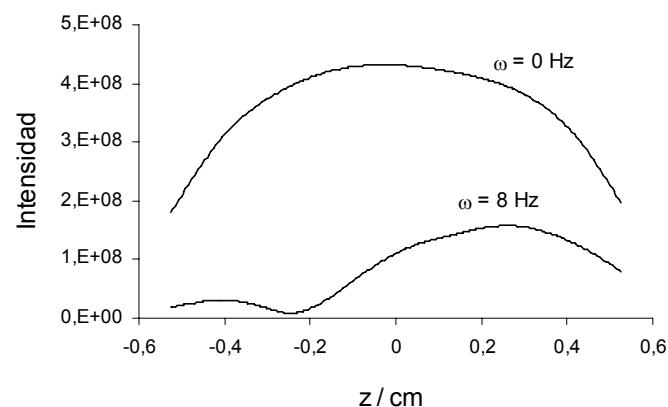


Figura 5-13. Gráfica del perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*. Los datos son los mismos que la Fig. 5-11 ($t_1=25$ ms y $t_2=62$ ms). Se grafican sólo 2 resultados: la imagen con perfil gaussiano adquirida sin giro de la muestra y la imagen adquirida con giro de la muestra a la velocidad de 8 Hz.

La caída de la intensidad de la señal en cada disco del tubo de RMN en función de la velocidad de giro utilizando los mismos datos experimentales previamente

adquiridos con $t_1=5$ ms y $t_2=50$ ms, se muestra en la Fig. 5-14. La Fig. 5-14a muestra los datos de los 211 discos en los que se dividió cada imagen, mientras que la Fig. 5-14b solo muestra dos regiones, una donde la pérdida es menor ($z = +0.25$) y otra donde es mayor ($z = -0.3$). En estas condiciones un giro completo entre el inicio de los gradientes de desfase/reenfoque se cumple a los 20 Hz y dos giros completos a las 40 Hz. En la gráfica de la Fig. 5-14a se observa que para estas dos velocidades de giro se recupera entre el 90% y el 100% de la señal para todos los discos del *eje z*, mientras que a otras velocidades hay pérdida de señal. Por ejemplo, para la velocidad de 30 Hz, en la que se han completado $\frac{3}{2}$ vueltas, se tiene una pérdida de señal que va entre el 70% y el 100% dependiendo de la posición en el *eje z*.

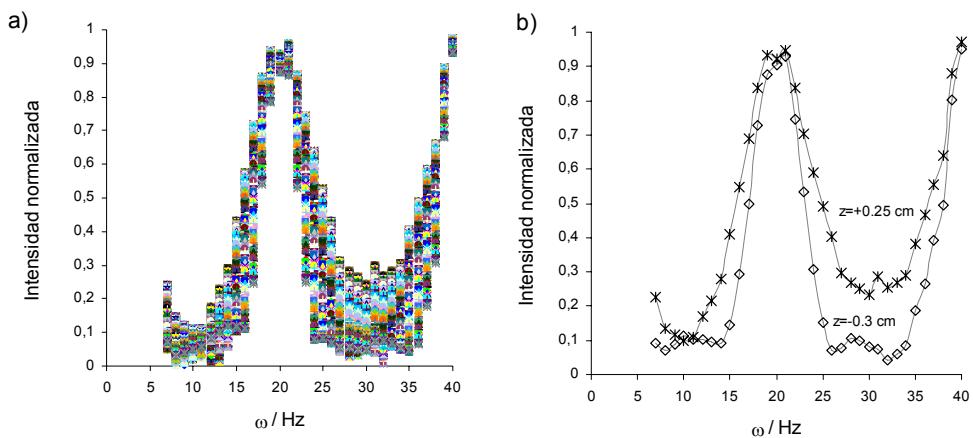


Figura 5-14. Gráfica de la intensidad de señal para cada disco del tubo de RMN en función de la velocidad de giro. Las intensidades se han normalizado a 1 con los valores de la imagen sin giro de la muestra. Los datos son los mismos de la Fig. 5-10 ($t_1=5$ ms y $t_2=50$ ms). a) Todos los discos del tubo de RMN desde -0.53 hasta +0.53 cm (en total 211 cm). b) Dos discos del tubo de RMN, a +0.25 cm seleccionado por ser uno donde menos perdida hay y -0.3 cm seleccionado por ser uno donde más perdida hay.

Las Fig. 5-15 y 5-16 muestran los mismos datos de la Fig. 5-14b pero están representados junto con el valor teórico de α utilizando la Ec. 5-22. De entre los valores de α que se probaron se seleccionaron como los que mejor describen los datos experimentales, los valores de $\alpha = 0.0013$ (Fig. 5-15) y $\alpha = 0.0020$ (Fig. 5-16). En el primer caso (Fig. 5-15), encontramos una buena correspondencia entre los datos experimentales y el valor de α seleccionado. Sin embargo, en el segundo caso (Fig. 5-16), observamos que la ecuación predice que se pueden obtener valores de intensidad negativa y debido a la forma de procesado de las imágenes en modo magnitud esto no es posible.

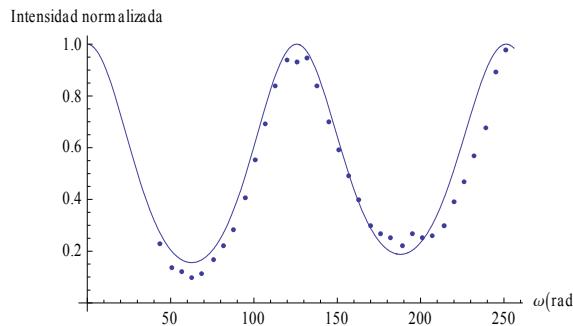


Figura 5-15. Gráfica de la intensidad de señal para el disco de $z=+0.25$ cm en función de la velocidad de giro (en radianes). Los datos experimentales son los mismos de la Fig. 5-14. La línea continua es el valor teórico con $\alpha=0.0013$ y los puntos son los datos experimentales. Los valores utilizadas en la Ec. 5-22 son: $\mathbf{G}_0=0.369 \text{ T m}^{-1}$ (60% de la corriente máxima), $t_1=0.005$ s, $t_2=0.050$ s, $\gamma=2.7 \times 10^{-8} \text{ T}$ y $\mathbf{r}_{\max}=0.0025$ m.

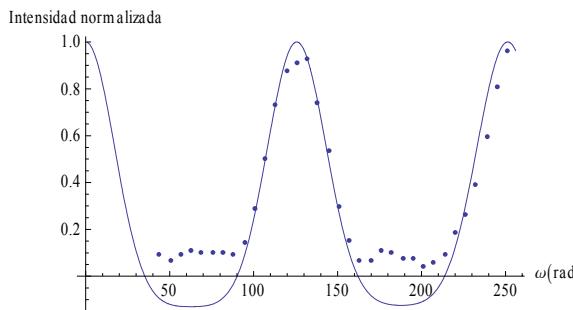


Figura 5-16. Gráfica de la intensidad de señal para el disco de $z=-0.3$ cm en función de la velocidad de giro (en radianes). Los datos experimentales son los mismos de la Fig. 5-14. La línea continua es el valor teórico con $\alpha=0.002$ y los puntos son los datos experimentales. Los valores utilizadas en la Ec. 5-22 son: $\mathbf{G}_0=0.369 \text{ T m}^{-1}$ (60% de la corriente máxima), $t_1=0.005$ s, $t_2=0.050$ s, $\gamma=2.7 \times 10^{-8} \text{ T}$ y $\mathbf{r}_{\max}=0.0025$ m.

La caída de la intensidad de la señal en cada disco del tubo de RMN en función de la velocidad de giro utilizando los mismos datos experimentales previamente adquiridos con $t_1=25$ ms y $t_2=62$ ms se muestran en la Fig. 5-17. La Fig. 5-17a muestra los datos de los 211 discos en los que se dividió cada imagen, mientras que en la Fig. 5-17b solo se muestran dos regiones, una donde la pérdida es menor ($z = +0.23$) y otra donde es mayor ($z = -0.5$). En estas condiciones un giro completo entre el inicio de los gradientes de desfase/reenfoque se cumple a los 16 Hz y dos giros completos a los 32 Hz, mientras que un ciclo completo durante la aplicación del gradiente se cumple a los 40 Hz. En la gráfica de la Fig. 5-17a se observa que para estas 3 velocidades de giro se recupera entre el 90% y el 100% de la señal para todos los discos del *eje z*, mientras que a otras velocidades hay pérdida de señal, como por ejemplo, para la velocidad de 24 Hz ($3/2$ giro) se tiene una pérdida de señal que va entre el 15% y el 80% dependiendo de la posición en el *eje z*.

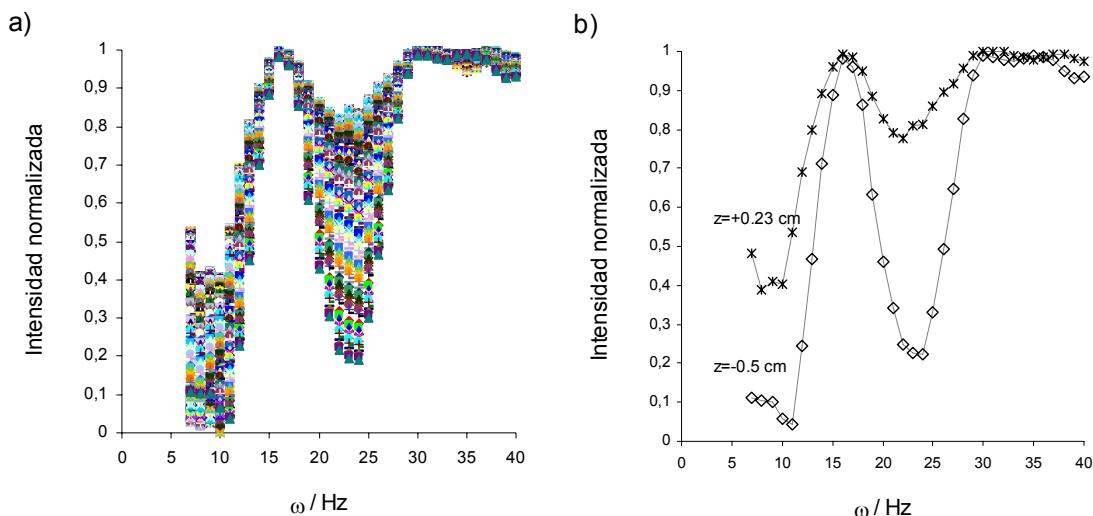


Figura 5-17. Gráfica de la intensidad de señal para cada disco del tubo de RMN en función de la velocidad de giro. Las intensidades se han normalizado a 1 con los valores de la imagen sin giro de la muestra. Los datos son los mismos de la Fig. 5-10 ($t_1=25$ ms y $t_2=62$ ms). a) Todos los discos del tubo de RMN desde -0.53 hasta $+0.53$ cm (en total 211 cm). b) Dos discos del tubo de RMN, a $+0.23$ cm seleccionado por ser uno donde menos perdida hay y -0.5 cm seleccionado por ser uno donde más perdida hay.

Las Fig. 5-18 y 5-19 muestran los mismos datos de la Fig. 5-17b graficados junto con el valor teórico de α utilizando la Ec. 5-22. De entre los valores de α que se probaron se seleccionaron como los que mejor describen los datos experimentales, los valores de $\alpha = 0.0012$ (Fig. 5-18) y $\alpha = 0.0028$ (Fig. 5-19). En el primer caso (Fig. 5-18), encontramos una buena correspondencia entre los datos experimentales y el valor de α seleccionado. Sin embargo, en el segundo caso (Fig. 5-19), nuevamente observamos que la ecuación predice que se pueden obtener valores de intensidad negativa y debido a la forma de procesado de las imágenes en modo magnitud esto no es posible.

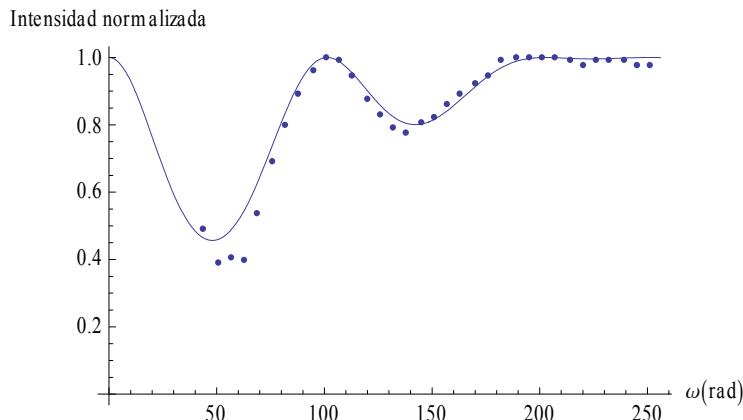


Figura 5-18. Gráfica de la intensidad de señal para el disco de $z=+0.23$ cm en función de la velocidad de giro (en radianes). Los datos experimentales son los mismos de la Fig.5-17. La línea continua es el valor teórico con $\alpha=0.0012$ y los puntos son los datos experimentales. Los valores utilizados en la Ec. 5-22 son: $G_0=0.0615 \text{ T m}^{-1}$ (10% de la corriente máxima), $t_1=0.005 \text{ s}$, $t_2=0.050 \text{ s}$, $\gamma=2.7 \times 10^{-8} \text{ T}$ y $r_{\max}=0.0025 \text{ m}$.

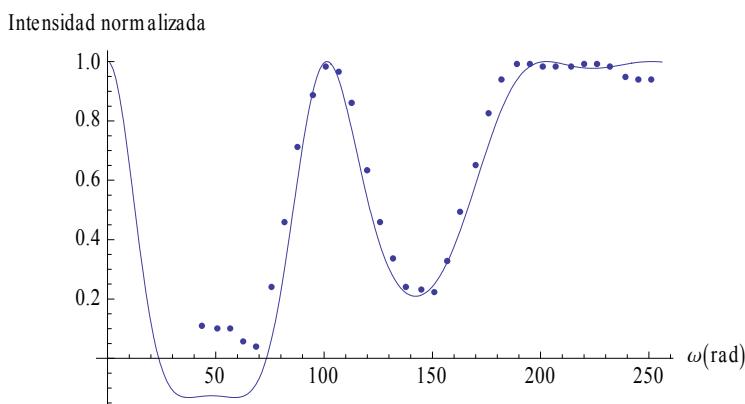


Figura 5-19. Gráfica de la intensidad de señal para el disco de $z=-0.5$ cm en función de la velocidad de giro (en Radianes). Los datos experimentales son los mismos de la Fig.5-17. La línea continua es el valor teórico con $\alpha=0.0028$ y los puntos son los datos experimentales. Los valores utilizados en la Ec. 5-22 son: $G_0=0.0615 \text{ T m}^{-1}$ (10% de la corriente máxima), $t_1=0.025 \text{ s}$, $t_2=0.062 \text{ s}$, $\gamma=2.7 \times 10^{-8} \text{ T}$ y $r_{\max}=0.0025 \text{ m}$.

5.4 Efecto de la polaridad y la forma de los gradientes

Se realizaron los mismos experimentos imagen-SE con una muestra de PEG en un equipo de 500 MHz, girando a dos velocidades diferentes, una donde se completa 1 vuelta durante el tiempo entre los gradientes y la otra donde solo se da $1/2$ vuelta. Además, se estudió el efecto en la polaridad de los gradientes aplicando gradientes positivos y negativos, y el efecto en la forma de los mismos aplicando gradientes con forma rectangular y sinusoidal. Dado que la fuerza de los gradientes con forma

sinusoidal es el ~60% de los gradientes rectangulares con la misma duración, se utilizó el 60% de la corriente máxima al aplicar los gradientes rectangulares y 95.2% al aplicar sinusoidales, para así tener la misma amplitud en todos los casos. Los resultados se muestran en la Fig. 5-20. Nuevamente se observa que en el caso de utilizar gradientes con giros incompletos durante el tiempo entre los gradientes existe una pérdida de señal, sin embargo, el perfil generado no es el mismo si los gradientes aplicados son positivos o negativos (Fig. 5-20a y 5-20b). En cuanto al efecto de aplicar gradientes con forma rectangular o sinusoidal en las condiciones estudiadas, se observa que no hay diferencia alguna en el perfil generado.

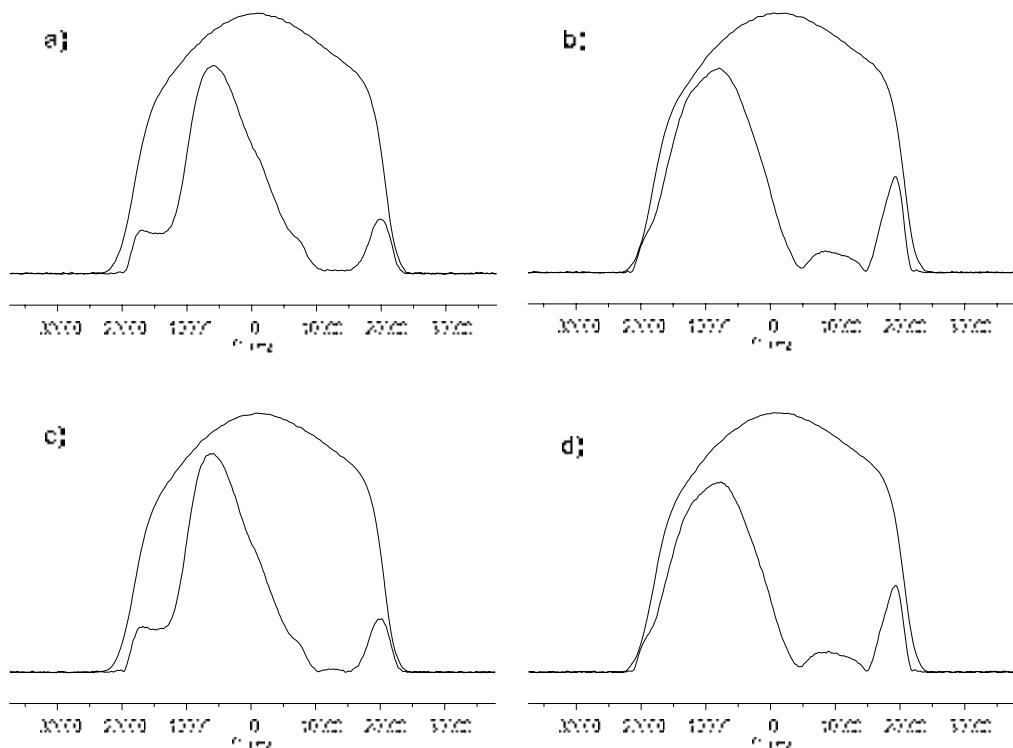


Figura 5-20. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG en un equipo de 500MHz. a) y b) gradientes rectangulares, con una fuerza de a) +60% y b)-60%. c) y d) gradientes sinusoidales, con una fuerza de a) +95.2% y b) -95.2%. En todos los casos se gira a una velocidad de 20 Hz (perfil superior) y de 10Hz (perfil inferior). Las condiciones experimentales son: tiempo de difusión de 50ms, duración de gradientes de 5ms, tiempo de adquisición de 6.8 ms, intensidad del gradiente de lectura es 9.9% de la corriente máxima, y ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

Para confirmar los resultados utilizando otra sonda, realizamos los mismos experimentos en un equipo de 250 MHz. En estas condiciones la pérdida de señal por giros incompletos es tan alta (Fig. 5-21) que se decidió bajar la intensidad de gradientes para poder analizar mejor la pérdida y la deformación del perfil gaussiano de la imagen (Fig. 5-22). Nuevamente se confirma que el perfil generado no es el mismo si los gradientes aplicados son positivos o negativos, y que no hay diferencia alguna entre aplicar gradientes con forma rectangular o sinusoidal con la misma amplitud.

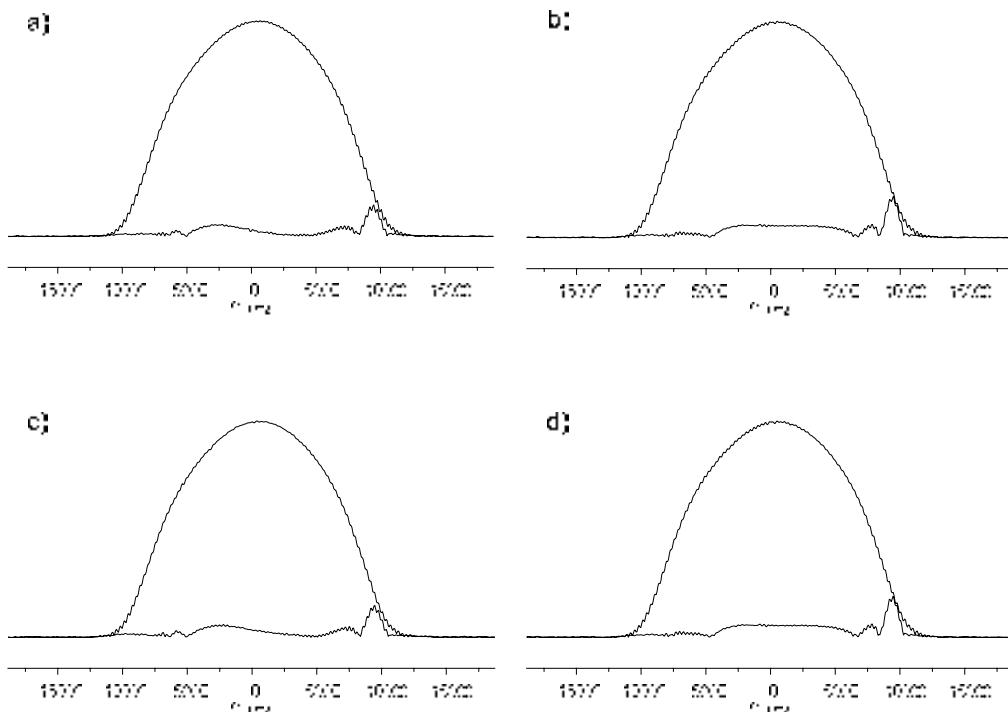


Figura 5-21. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG en un equipo de 250MHz. a) y b) gradientes rectangulares, con una fuerza de a) +60% y b)-60%. c) y d) gradientes sinusoidales, con una fuerza de a) +95.2% y b) -95.2%. En todos los casos se gira a una velocidad de 20 Hz (perfil superior) y de 10Hz (perfil inferior). Las condiciones experimentales son: tiempo de difusión de 50ms, duración de gradientes de 5ms, el tiempo de adquisición de 6.8 ms, intensidad del gradiente de lectura es 4.9% de la corriente máxima, y ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

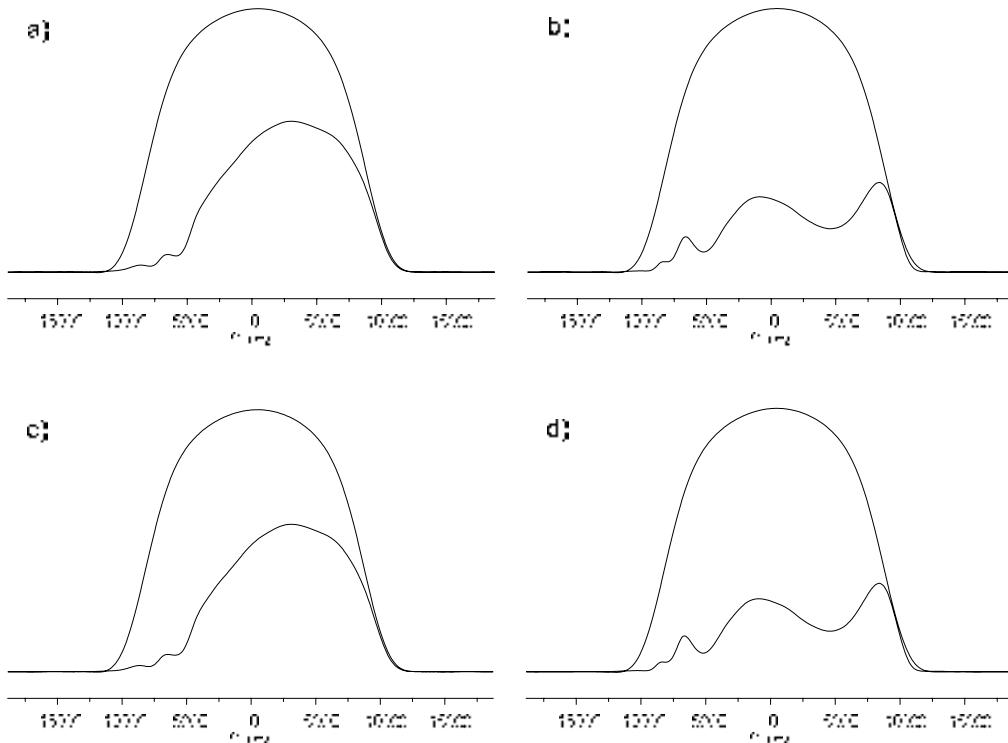


Figura 5-22. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG en un equipo de 250MHz. a) y b) gradientes rectangulares, con una fuerza de a) +20% y b)-20%. c) y d) gradientes sinusoidales, con una fuerza de a) +31.7% y b)-31.7%. En todos los casos se gira a una velocidad de 20 Hz (perfil superior) y de 10Hz (perfil inferior). Las condiciones experimentales son: tiempo de difusión de 50ms, duración de gradientes de 5ms, tiempo de adquisición de 6.8 ms, intensidad del gradiente de lectura es 4.9% de la corriente máxima, y ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

5.5 Efecto de la polaridad del gradiente de lectura

Para conocer el efecto de la polaridad del gradiente de lectura, se realizaron los experimentos Imagen-SE con una muestra de PEG en un equipo de 500MHz, girando a la velocidad donde se ha completado $\frac{1}{2}$ vuelta entre el inicio de los gradientes sinusoidales de desfase/reenfoque, y se invirtió tanto la polaridad de dichos gradientes como la polaridad del gradiente de lectura. Los resultados se muestran en la Fig. 5-23, donde se observa que la polaridad del gradiente de desfase/reenfoque produce diferentes perfiles, y que el efecto de invertir la polaridad del gradiente de lectura es una inversión del perfil de la imagen.

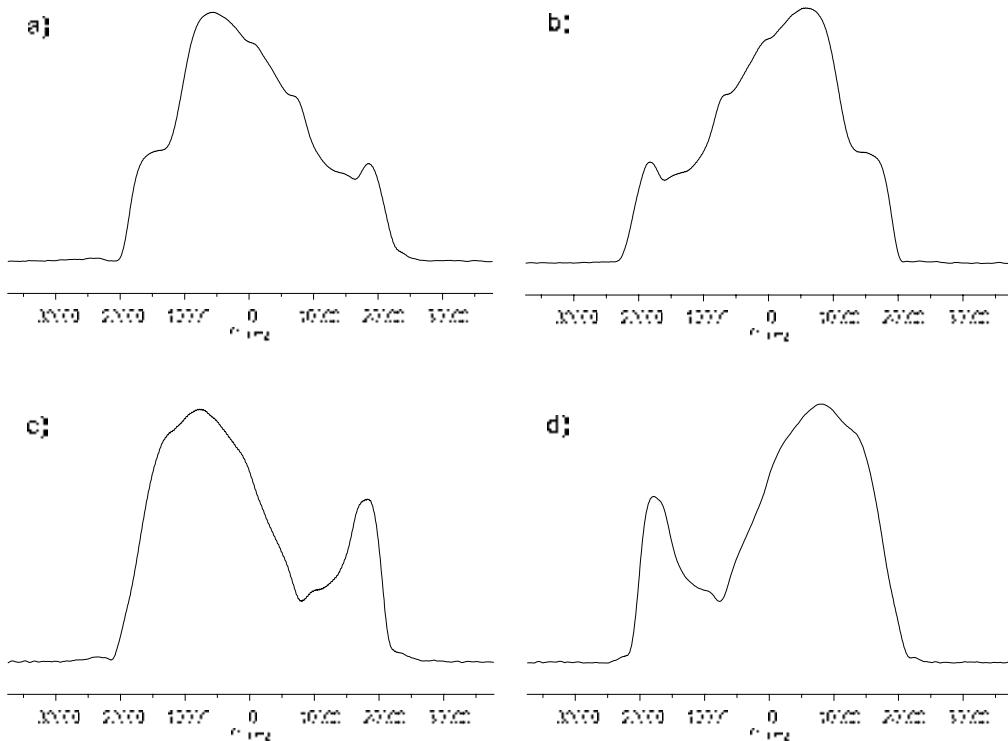


Figura 5-23. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG en un equipo de 500MHz. En todos los casos se gira a una velocidad de 10 Hz y se aplican gradientes de desfase/reenfoque sinusoidales con una fuerza de a) y b) +60%, y c) y d) -60%. La fuerza de gradientes de lectura es de a) y c) -9.9% de la corriente máxima y b) y d) +9.9%. Las otras condiciones experimentales son: tiempo de difusión de 50ms, duración de gradientes de desfase/reenfoque 5ms, tiempo de adquisición de 6.8 ms, y ancho de ventana espectral de 150 ppm.

Para entender con mayor profundidad el efecto de la polaridad del gradiente de lectura, se realizaron los experimentos Imagen-SE con la muestra de PEG en el equipo de 500MHz, colocando el tubo 2 cm por arriba de la posición correcta, y se adquirieron dos experimentos con la polaridad del gradiente de lectura invertido. Los resultados se muestran en la Fig. 5-24 donde se observa que el efecto de invertir la polaridad del gradiente de lectura es una inversión del perfil de la imagen. En la Fig. 5-24a la parte de abajo, donde no hay tubo, aparece del lado izquierdo del espectro y en la Fig. 5-24b aparece del lado derecho del espectro.

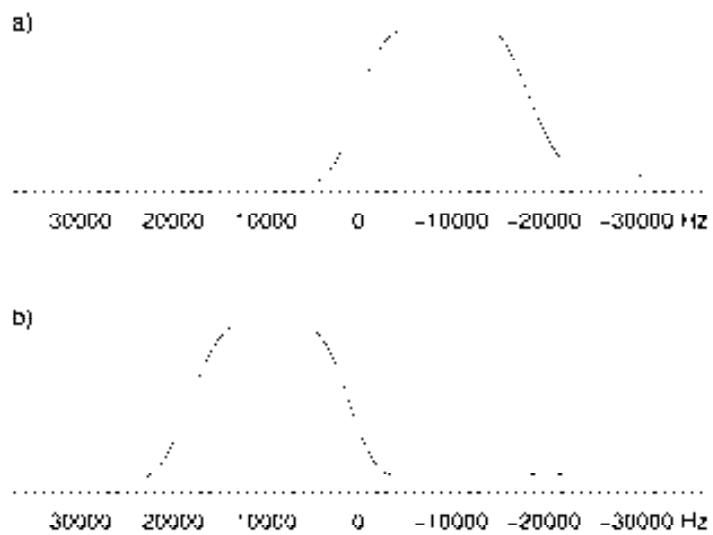


Figura 5-24. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG en un equipo de 500 MHz con el tubo colocado 2 cm por arriba de la posición correcta. En ambos casos se aplican gradientes de desfase/reenfoque sinusoidales con una fuerza de 20%. La fuerza de gradientes de lectura es de a) -9.9% de la corriente máxima y b) +9.9%. Las otras condiciones experimentales son: tiempo de difusión de 50ms, duración de gradientes de desfase/reenfoque de 5ms, tiempo de adquisición de 6.8 ms, y el ancho de ventana espectral de 150 ppm.

5.6 Imagen utilizando gradientes de polaridad invertida sin pulso de 180°

Los experimentos de imagen se repitieron en condiciones similares utilizando la secuencia análoga de la Fig 5-3a, o sea, sin el pulso de 180° de reenfoque y con los gradientes de igual intensidad pero polaridad invertida. La Fig. 5-25 muestra los resultados obtenidos utilizando las mismas condiciones que en la Fig. 5-22. La principal conclusión es que al aplicar gradientes de polaridad invertida para desfasar y para reenfocar la señal, el perfil generado es el mismo independientemente del orden en que se apliquen los gradientes, es decir que aplicar positivo para desfasar y negativo para reenfocar da igual que aplicar negativo para desfasar y positivo para reenfocar. Además, al igual que en la Fig. 5-22 se concluye que no hay diferencia entre aplicar gradientes con forma rectangular o sinusoidal con la misma amplitud.

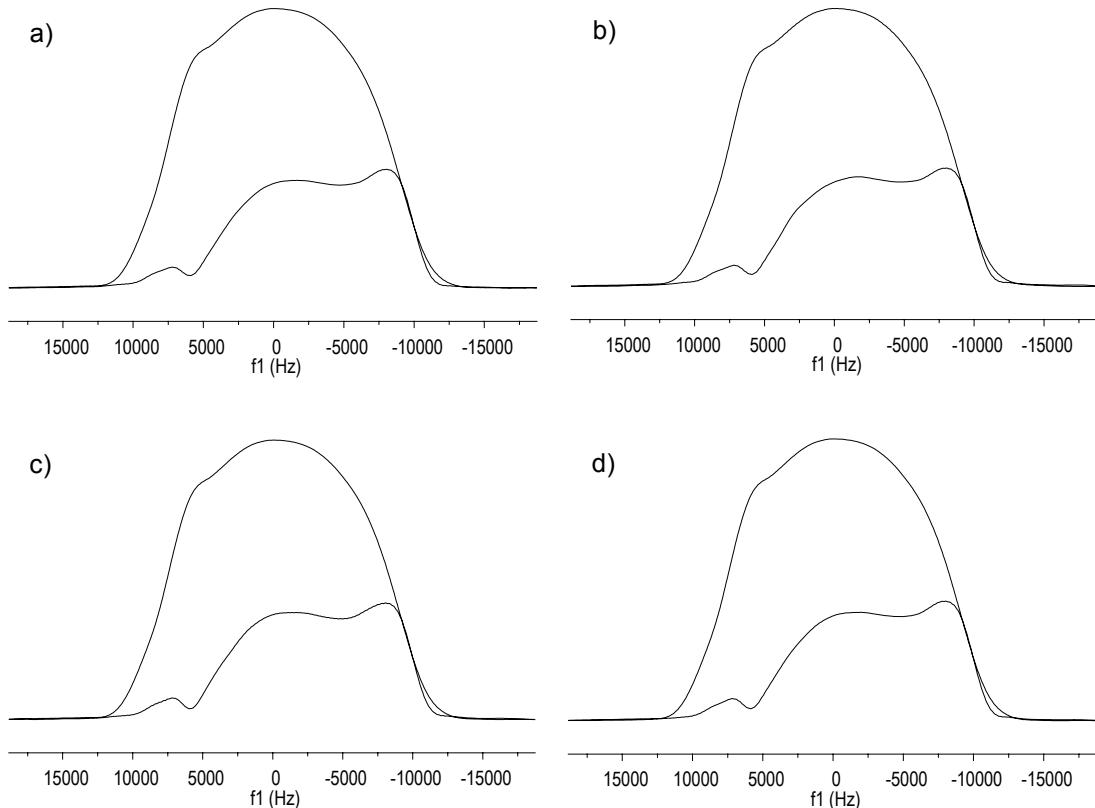


Figura 5-25. Perfil de densidad de espines a lo largo del *eje z*, con la muestra de PEG en un equipo de 250MHz utilizando la secuencia de la Fig. 5-3a. a) y b) gradientes rectangulares, c) y d) gradientes sinusoidales. La fuerza de los gradientes de desfase/reenfoque es a) +20/-20%, b)-20/+20%, c)+31.7/-31.17% y d)-31.7/+31.7%. En todos los casos se gira a una velocidad de 20 Hz (perfil superior) y de 10Hz (perfil inferior). Las condiciones experimentales son: tiempo de difusión de 50ms, duración de gradientes de 5ms, tiempo de adquisición de 6.8 ms, intensidad del gradiente de lectura es 4.9% de la corriente máxima, y ancho de ventana espectral es de 150 ppm.

5.7 Resumen

La descripción teórica y la comprobación práctica de la fase de las señales al final del experimento SE cuando se gira el tubo de RMN indica que la duración del periodo de difusión Δ debe coordinarse con la velocidad de giro para que existan N ciclos completos entre los gradientes de desfase/ reenfoque, o que durante la aplicación de los gradientes δ existan N ciclos completos, de lo contrario existe una pérdida de señal.

La secuencia desarrollada Imagen-SE permite obtener la resolución espacial de las señales a lo largo del *eje z*, y se puede concluir que la pérdida de señal que se produce al girar la muestra ciclos incompletos durante el tiempo de difusión, no es

constante a lo largo del **eje z**. Además, el perfil generado con la secuencia imagen-SE al girar la muestra con giros incompletos durante el tiempo de difusión, permite concluir:

- El perfil generado es característico de cada sonda.
- El perfil es diferente si se aplican gradientes positivos o negativos.
- El efecto de cambiar la polaridad del gradiente de lectura es una inversión del perfil.
- No hay diferencia en el perfil si se usan gradientes rectangulares o sinusoidales con la misma amplitud.

6 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN

El objetivo de esta sección consiste en analizar y evaluar los principales factores experimentales y las interferencias que influyen en la determinación experimental del valor de **D**.

6.1 Factores instrumentales

Como se ha descrito anteriormente (capítulos 2, 3 y 4), para obtener el valor de **D** con precisión y exactitud es esencial controlar cualquier factor que pueda introducir errores o imprecisiones en la medida, distorsiones de la línea base o en la forma de las señales. Por ejemplo, es muy importante controlar:

- Una correcta calibración de todo el instrumento, pero principalmente de los gradientes de campo magnético. Tiene mucha importancia el control de la linealidad (ver sección 2.4.2), la reproducibilidad, la exactitud, y la calibración de los mismos. Además, es primordial la eliminación de las corrientes *eddy* (ver sección 2.4.1) y de las vibraciones de la muestra respecto a la bobina.
- Un buen sistema de control de temperatura, y la ausencia de efectos de convección (capítulo 4).
- La utilización de la secuencia adecuada, con una buena relación señal-ruido y digitalización de las señales de interés, sin efectos de *Radiation-Damping* o gradientes de fondo (capítulo 3).

6.2 Factores experimentales. Ecuación de Stokes-Einstein

Si se controlan y corrigen todos los factores que puedan alterar la determinación de **D**, su valor depende principalmente de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad [6-1]$$

- El tamaño y la forma que adopta en solución la molécula bajo estudio.
- El disolvente y la viscosidad de la muestra. Hay que considerar la concentración de los diferentes solutos, la fuerza iónica (concentración de sales), el pH y todas las condiciones experimentales en las que se determina el valor de **D**, sobre todo si se analizan y comparan valores obtenidos en diferentes condiciones.
- La temperatura.

6.2.1 Temperatura

El valor de **D** varía directamente con la temperatura por lo que cuando se hace una medida es primordial conocer, entre otras posibles variables, la temperatura a la que se ha determinado. Por eso, lo primero que hay que hacer es una calibración de la temperatura real de la muestra cuando está dentro de la sonda. El método comúnmente aceptado es utilizar una muestra estándar que posea un espectro del que se conozca su dependencia con la temperatura. En este trabajo se ha utilizado una muestra estándar 80% de etilenglicol en DMSO-d₆ para temperaturas inferiores a la temperatura ambiente y una de 4% de metanol en metanol-d₄ para temperaturas superiores.

Las especificaciones de la unidad de control de temperatura de los espectrómetros utilizados tienen una precisión de ± 0.1 K. Sin embargo, puede ser normal encontrar fuertes inestabilidades debido al flujo de aire. Por ejemplo, en uno de los equipos se encontró muy mala estabilidad (± 0.8 K) cuando se utilizaba el aire comprimido de las instalaciones para controlar la temperatura. No obstante, se observó que inestabilidades en la regulación de temperatura no desvían significativamente el valor experimental de **D**, pero sí provocaba una baja reproducibilidad de los resultados. Estas oscilaciones de temperatura se corrigieron regulando la temperatura con el flujo de N₂ gas proveniente de un *Dewar* de nitrógeno líquido, mejorando con ello la reproducibilidad de los resultados.

Es importante destacar que pequeños gradientes de temperatura en el tubo de RMN no alteran significativamente el valor experimental de **D**, gracias a que la

dependencia de **D** con la temperatura es prácticamente lineal. Por tanto el valor experimental obtenido de **D** en una muestra con temperatura uniforme no difiere del de una muestra con un gradiente pequeño de temperatura si el promedio de la temperatura es el mismo en ambos casos. Sin embargo, aunque los gradientes de temperatura que se pueden generar en los espectrómetros de RMN no afectan directamente al fenómeno de la difusión, sí pueden inducir corrientes de convección importantes e indeseadas (ver capítulo 4) que pueden causar grandes desviaciones en la medida real de **D**.

Al analizar la ecuación de Stokes-Einstein, es importante mencionar que el efecto del cambio de temperatura (ΔT) sobre **D** es más importante en moléculas pequeñas que en las grandes. Por ejemplo, una variación en $\Delta T=2\text{K}$ para una molécula pequeña (de 298K a 300K) provocaría un aumento de **D** de alrededor de 0.64%, En el caso del H_2O ($\mathbf{D}=2.27 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ a 298K) se obtiene un variación de $\Delta\mathbf{D}=1.52 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) mientras que para una molécula grande como la lisozima ($\mathbf{D}=1.20 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) la variación es mínima ($\Delta\mathbf{D}=8.05 \times 10^{-13} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$).

6.2.2 Viscosidad

El coeficiente de difusión varía inversamente con la viscosidad. Si se cambia el disolvente o se modifica la temperatura, la viscosidad del disolvente cambia y, por tanto, el valor de **D** también cambia. En la Fig. 6-1 y la tabla 2-1 se muestra el valor de **D** de una muestra 5mM de mentona obtenido en diversos disolventes y a diversas temperaturas. Tal como predice la teoría, se comprueba experimentalmente como el aumento de la viscosidad de la solución provoca una disminución lineal en el valor del coeficiente de difusión **D**.

Tabla 6-1. Coeficiente de difusión **D** de una solución 5mM de mentona en diferentes disolventes y temperaturas. Los datos de viscosidad son tomados de la bibliografía*. Los datos de difusión son los mismos descritos anteriormente en la tabla 4-3. Ver detalles experimentales en la Fig. 4-7.

Disolvente	Temperatura / K	η / cP	$D / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
Acetona	298	0.326	2.61 ± 0.010
Acetonitrilo	298	0.357	2.46 ± 0.012
Benceno	308	0.553	1.81 ± 0.008
MeOH	298	0.602	1.56 ± 0.015
Benceno	298	0.636	1.53 ± 0.009
DMSO	308	1.8	0.615 ± 0.011
DMSO	298	2.18	0.496 ± 0.008

*Almanaque de Bruker de 2001

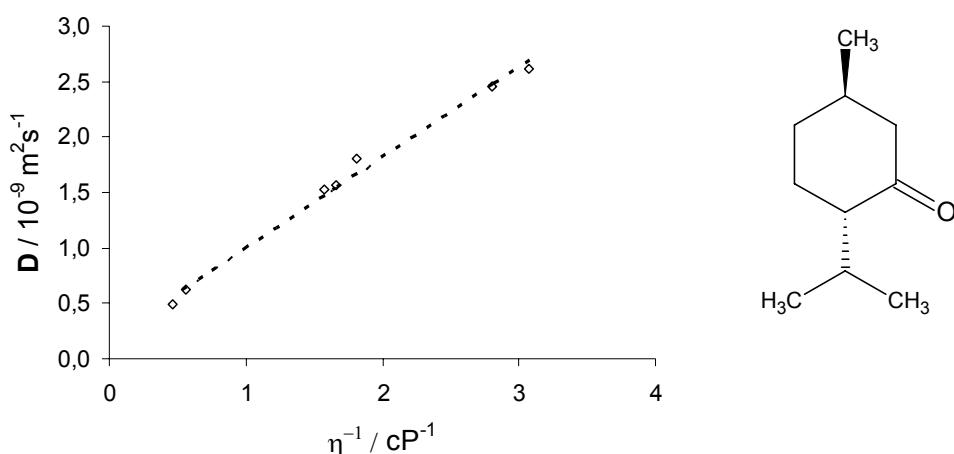


Figura 6-1. Gráfica del coeficiente de difusión **D** de una muestra 5mM de mentona en función del inverso de la viscosidad.

6.2.3 Concentración

La viscosidad de un disolvente puede variar considerablemente por efecto de la temperatura pero también puede cambiar por cualquier modificación en la composición de la muestra, como lo es la concentración del compuesto en estudio. Esto es muy relevante ya que la baja sensibilidad de la RMN hace que normalmente se utilicen muestras relativamente concentradas (concentraciones de 1mM-100mM) cuando se compara con otras técnicas analíticas.

6.3 Ciclodextrinas y coeficiente de difusión

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de glucosa que presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden acoger moléculas orgánicas no polares. Hace tiempo que existe un creciente interés en las CDs y su facilidad en la formación de complejos tipo *host-guest*. Por ejemplo, en la industria farmacéutica se utilizan para aumentar la solubilidad de algunos fármacos en agua.

Las CDs y sus complejos son muy atractivos para ser estudiados a través de la determinación del coeficiente de difusión ya que cuando una molécula pequeña interactúa con una molécula grande su coeficiente de difusión disminuye permitiendo detectar la formación del complejo de inclusión. Más aún, la dependencia del coeficiente de difusión del huésped en la CD permite determinar la constante de asociación en el complejo. En la bibliografía se puede encontrar un gran número de ejemplos sobre la determinación del coeficiente de difusión por RMN en CDs y sus complejos. Algunos ejemplos ilustrativos podrían ser el estudio de la interacción del péptido β -amiloideo del Alzheimer con la β -CD¹²², la evaluación de la constante de asociación entre los ácidos ciclohexil acético y cólico con la β -CD¹²³ y entre la L-fenilalanina, la L-leucina y la L-valina con la α -CD¹²⁴. Las medidas de difusión también han permitido determinar la constante de asociación de complejos que inducen cambios muy pequeños en el desplazamiento químico, como lo son los complejo entre la γ -CD y el 12-corona-4 y sus análogos de tetraza y de tetratio¹²⁵. Del mismo modo se han realizado experimentos de valoración para estudiar la constante de disociación entre la β -CD y ácido adamantano carboxílico a dos temperaturas diferentes, 25 °C y 0 °C, donde el complejo huésped:CD es 1:1, y 2:1 respectivamente¹²⁶. Otros ejemplos son el estudio de la interacción entre las CD y sus

¹²² Danielsson, J.; Jarvet, J.; Damberg, P.; Gräslund, A. *Biochemistry* **2004**, 43, 6261-6269.

¹²³ Cameron, K. S.; Fielding, L. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 6891-6895.

¹²⁴ Wimmer, R.; Aachmann, F. L.; Larsen, K. L.; Petersen, S. B. *Carbohydrate Research* **2002**, 337, 841-849.

¹²⁵ Gafni, A.; Cohen, Y. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, 120-125.

¹²⁶ Tošner, Z.; Aski, S. N.; Kowalewski, J. *Journal of Inclusion Phenomena* **2006**, 55, 59-70.

análogos con surfactantes no iónicos^{127,128}, entre la α -CD y la quinuclidina¹²⁹, entre la β -CD y el anestésico proparacaina¹³⁰.

6.3.1 Estructura y espectro de las CDs en D₂O

Según el número de unidades de glucosa que forman la CD se le nombra con una letra griega diferente: α -Ciclodextrina, β -Ciclodextrina y γ -Ciclodextrina, para 6, 7 y 8 unidades de moléculas de glucosa respectivamente. En la Fig. 6-2 y Fig. 6-3 se muestran las tres CDs estudiadas en la presente tesis y la estructura básica de las unidades que las conforman. En la Fig. 6-4 se muestran los espectros de ¹H adquiridos en D₂O a 298 K y en la tabla 6-2 están indicadas la asignación de los desplazamientos químicos de los protones.

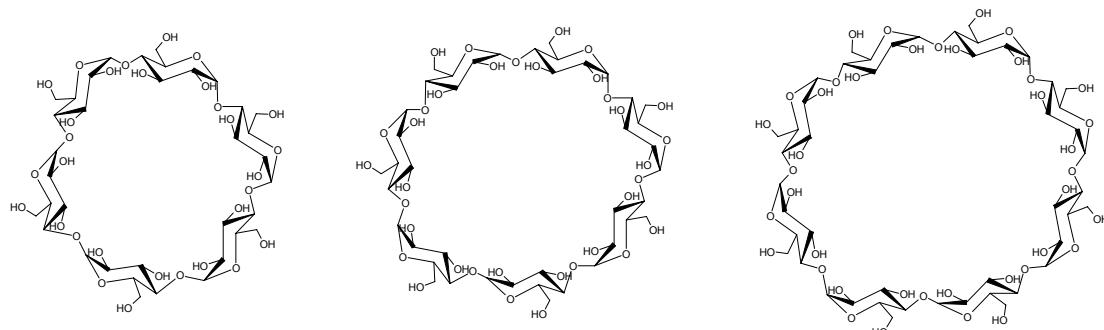


Figura 6-2. Estructura de las ciclodextrinas: de izquierda a derecha α , β y γ .

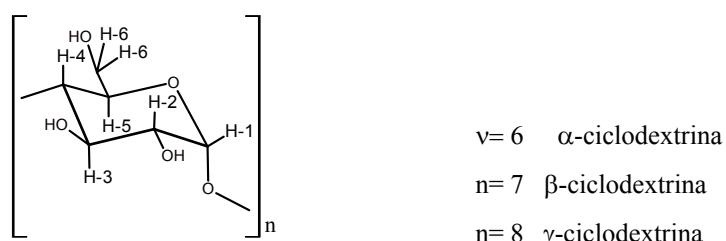


Figura 6-3. Estructura básica de las unidades de ciclodextrinas.

¹²⁷ Abrahmsen-Alamij, S.; Alami, E.; Eastoe, J.; Cosgrove, T. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 246, 191-202.

¹²⁸ Alami, E. O. *Doktorsavhandlingar vid Chalmers Tekniska Hogskola* **2001**, 1-67.

¹²⁹ Aski, S. N.; Kowalewski, J. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2008**, 46, 261-267.

¹³⁰ Arantes, L. M.; Scarelli, C.; Marsaioli, A. J.; De Paula, E.; Fernandes, S. A. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, 47, 757-763.

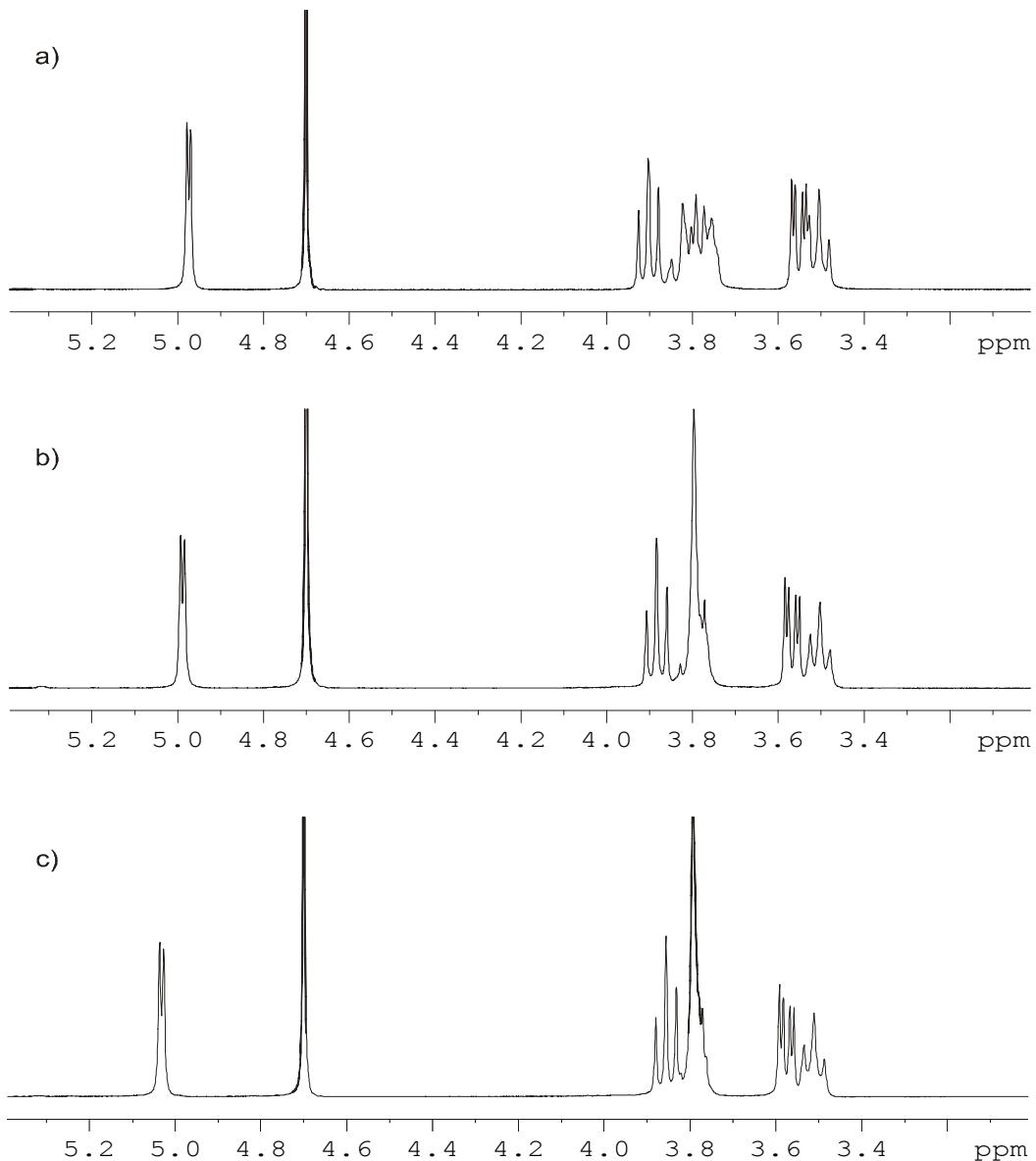


Figura 6-4. Espectros ^1H (500 MHz) en D_2O a 298 K. a) α -CD, b) β -CD, y c) γ -CD.

Tabla 6-2 Desplazamiento químico (δ) de los protones de las CDs (ppm)

CD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a-H6b
α	4.97	3.55	3.90	3.50	3.76	3.80
β	4.99	3.57	3.88	3.50	3.78	3.79
γ	5.03	3.58	3.86	3.51	3.78	3.79

6.4 Coeficiente de difusión de CDs bajo condiciones experimentales controladas

El objetivo en esta sección consiste en determinar el valor de **D** de la α -CD, la β -CD y la γ -CD en una solución de D_2O bajo condiciones experimentales controladas (concentración, temperatura, pH y $[NaCl]$) y analizar la relación cualitativa y cuantitativa con sus masas moleculares y los radios hidrodinámicos.

6.4.1 Condiciones experimentales

Para calcular el valor experimental de **D** de las CDs en soluciones de D_2O a 298 K se utilizó la secuencia BPPLIED, se adquirieron 7 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, se utilizaron gradientes con forma seno, un tiempo de difusión de 150 ms, y gradientes de desfase/reenfoque de 2 ms ($\delta/2 = 1$ ms).

Se prepararon soluciones de CDs con concentración, fuerza iónica y pH controlado. Es muy importante resaltar que todas las soluciones de CDs se analizaron al poco tiempo de preparar (0-24 hrs.), especialmente la β -CD 15 mM, ya que al poco tiempo presenta turbidez e incluso precipitación.

6.4.2 Efecto del cambio en la concentración de CDs

En la Fig. 6-5 se muestra la medida experimental de **D** de las diferentes CDs determinadas en soluciones con concentraciones variables entre 5 y 40 mM para la α -y la γ -CD y, entre 5 y 15 mM para la β -CD debido a que la máxima solubilidad de la β -CD es de 14.5 g/100 ml. En todos los casos la temperatura se reguló a 298 K. Las barras de error se calcularon con el resultado del análisis por duplicado de 4 soluciones para cada concentración. El máximo error obtenido para cada CD es 1.38 % para 40 mM de α -CD, 1.10 % para 22.5 mM de γ -CD y 2.92 % para 15 mM de β -CD (mayor error posiblemente asociado con problemas de solubilidad).

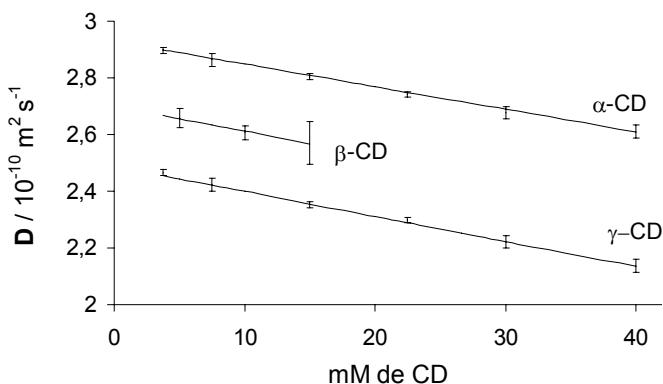


Figura 6-5. Coeficiente de difusión **D** de las CDs en D_2O a 298K en función de la concentración de CDs. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLED, 7 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=10$ ms, $\delta/2=1$ ms y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$.

En la gráfica se observa claramente como hay una disminución en el valor experimental de **D** al aumentar la concentración de CDs debido en parte al aumento en la viscosidad de las soluciones y en parte al fenómeno de auto-obstrucción o auto-collision. Este fenómeno es debido a que las moléculas deben difundir a lo largo de caminos más largos para llegar a un punto determinado dado que otras moléculas obstruyen su camino, o explicado de otra forma, porque las moléculas colisionan con otras moléculas y por tanto recorren caminos más cortos en el mismo tiempo.^{131,132}

La viscosidad de las soluciones acuosas de CD difiere poco de la del agua pura. Por ejemplo, la viscosidad del agua pura reportada a 25.1°C es 8.93 mP, mientras que la viscosidad de una solución de α -CD 0.95 mM es 8.99 mP y la viscosidad de una solución de β -CD 9.98 mM es 9.46 mP¹³³. Por ello, adicionalmente al efecto del cambio inherente de la viscosidad, el valor de **D** disminuye debido al fenómeno en sí de aumentar la concentración de las moléculas. Al analizar los resultados se puede observar que la disminución en la medida de **D** correlaciona con el aumento en la concentración molar, siendo más pronunciado en la β -CD y la γ -CD que en la α -CD. Por ejemplo, podemos observar como el valor de **D** en el caso de la α -CD varía ~15% al cambiar la concentración de 10mM a 40mM.

¹³¹ Baranowska, H. M.; Olszewski, K. J. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1996**, 1289, 312-314.

¹³² Price, W. S.; Tsuchiya, F.; Arata, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 11503-11512.

¹³³ Flohr, K.; Paton, R. M.; Kaiser, E. T. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97.

Dado que las CDs están constituidas por unidades básicas monoméricas de glucosa, se decidió estudiar el valor de **D** de la glucosa en el mismo disolvente (D_2O), y en concentraciones variables entre 35 y 320 mM, que corresponden al rango de concentración estudiado para las CDs expresado en miligramos disueltos (mg/ml). El objetivo para este estudio es poder evaluar la diferencia al trabajar con unidades de glucosa libres o agrupadas. Las soluciones de glucosa fueron preparadas en D_2O 24 horas antes de analizarlas para asegurar que se ha alcanzado el equilibrio entre las formas tautoméricas α y β . El valor de **D** de la glucosa se obtuvo registrando las señales de los dobletes del protón anomérico, ya que previamente se comprobó que las formas α y β tienen aproximadamente el mismo coeficiente de difusión.

Los resultados experimentales del valor de **D** en función del peso para la glucosa y las tres CDs se muestran en la Fig. 6-6 y en la tabla 6-3, donde claramente se observan rectas con unas pendientes decrecientes bien definidas. Además, se puede concluir que al aumentar la concentración de los compuestos, la disminución de **D** es más pronunciada cuanto menor es el compuesto. En este caso la mayor pendiente se observa para la glucosa y la menor para la γ -CD.

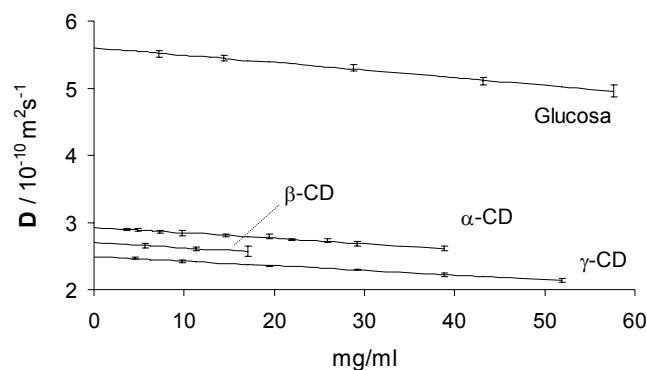


Figura 6-6. Coeficiente de difusión de las CDs y la glucosa en D_2O a 298 K en función de la concentración de los mg disueltos en 1 ml. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 6-5.

Tabla 6-3 Datos de las líneas de regresión de la Fig. 6-6.

Compuesto	D a dilución infinita $/ 10^{-10} m^2 s^{-1}$	Pendiente $/ 10^{-10} m^2 s^{-1}$	R^2
Glucosa	5.60	-11.2	0.997
α -CD	2.93	-8.2	0.999
β -CD	2.70	-7.8	0.988
γ -CD	2.49	-6.8	0.997

También se estudió la dependencia experimental de las concentraciones del soluto (CDs o glucosa) sobre el valor de **D** del propio disolvente, en este caso la señal residual de HDO. Los resultados de representar el valor de **D** en función de los mg disueltos en 1 ml para cada uno de los solutos, se muestran en la Fig. 6-7 y la tabla 6-4. Se observa como el valor de D_{HDO} disminuye al aumentar la concentración tanto de las CDs como de la glucosa debido al aumento en la viscosidad de las soluciones y al fenómeno de auto-obstrucción. De estos resultados se puede concluir que en el rango de concentraciones estudiadas:

- No se observan diferencias para D_{HDO} en soluciones con la misma masa ya sea de glucosa o de CDs.
- A pesar de que las soluciones de glucosa son totalmente transparentes y las de CDs son ligeramente turbias, no hay diferencias para D_{HDO} debido a diferencias de solubilidad entre las unidades de glucosa libre o agrupada.
- Está descrito que en la cavidad de las CD se pueden incluir moléculas de agua, específicamente 6 en la α -CD, 11 en la β -CD y 17 en la γ -CD¹³⁴. Sin embargo, no se detectan diferencias significativas para D_{HDO} debido al posible fenómeno de inclusión, asociación o formación de puentes de hidrógeno del agua con las CDs.
- No se puede utilizar la señal residual del disolvente como método de calibración. Es muy importante resaltar la disminución del valor experimental del D_{HDO} al aumentar la concentración de un compuesto. Por ello, el uso de la señal del HDO como método de calibración interno puede introducir un importante error en la medida, que dependerá de la viscosidad y condiciones del propio medio.

¹³⁴ J. Szejtli, Cyclodextrin and their inclusion complexes. Akademia Kiado Budapest. 1982.

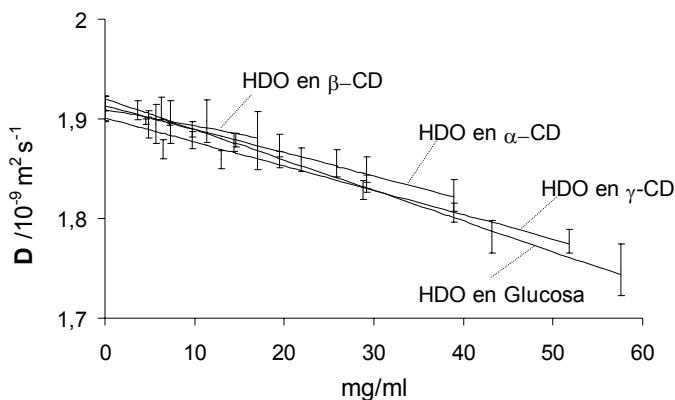


Figura. 6-7. Coeficiente de difusión **D** del HDO a 298 K en función de los mg disueltos en 1 ml de CDs y de glucosa. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLED, 5 espectros con intensidad entre 5 y 60 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $T_e=10$ ms, $\delta/2=1$ ms y $T_r=100$ μ s.

Tabla 6-4. Datos de las líneas de regresión de la Fig.6-7.

Compuesto	D a dilución infinita / 10^{-10} $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Pendiente / 10^{-10} $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	R^2
Glucosa	1.919	-3.1	0,993
α -CD	1.901	-2.4	0,929
β -CD	1.901	-1.7 *	0,829
γ -CD	1.912	-2.3	0,978

6.4.2.1 Efecto de la mezcla de ciclodextrinas

Para determinar el valor experimental de **D** en las mismas condiciones y eliminar el error asociado con la preparación de las muestras, se midió el coeficiente de difusión de una mezcla de 9.72 mg/ml de cada CD en D_2O . Las mezclas analizadas fueron mezcla de 2 CDs ($\alpha + \gamma$ y $\beta + \gamma$) y de 3 CDs ($\alpha + \beta + \gamma$). Para este estudio, dado que la mayoría de las señales de las CD tienen desplazamiento químico parecido y aparecen muy solapadas, sólo se analizó la intensidad de los protones anoméricos ya que son los únicos que tienen desplazamientos químicos diferentes.

En la Fig. 6-8 se muestra la región de los protones anoméricos de las 2 mezclas de CDs ($\alpha + \gamma$ y $\beta + \gamma$). En dicha figura se observa claramente cómo al aumentar la intensidad de los gradientes en la secuencia BPPLED, la α -CD presenta mayor atenuación que la γ -CD (Fig. 6-8 b) si se compara con el experimento adquirido con menor intensidad de gradiente (Fig. 6-8a). Esto confirma a simple vista que la α -CD

difunde más rápido por ser más pequeña que la γ -CD. La misma conclusión se puede obtener al analizar los datos de la β -CD que presenta mayor atenuación si se compara con la γ -CD (Fig. 6-8d) en el experimento adquirido con menor fuerza de gradiente (Fig. 6-8c).

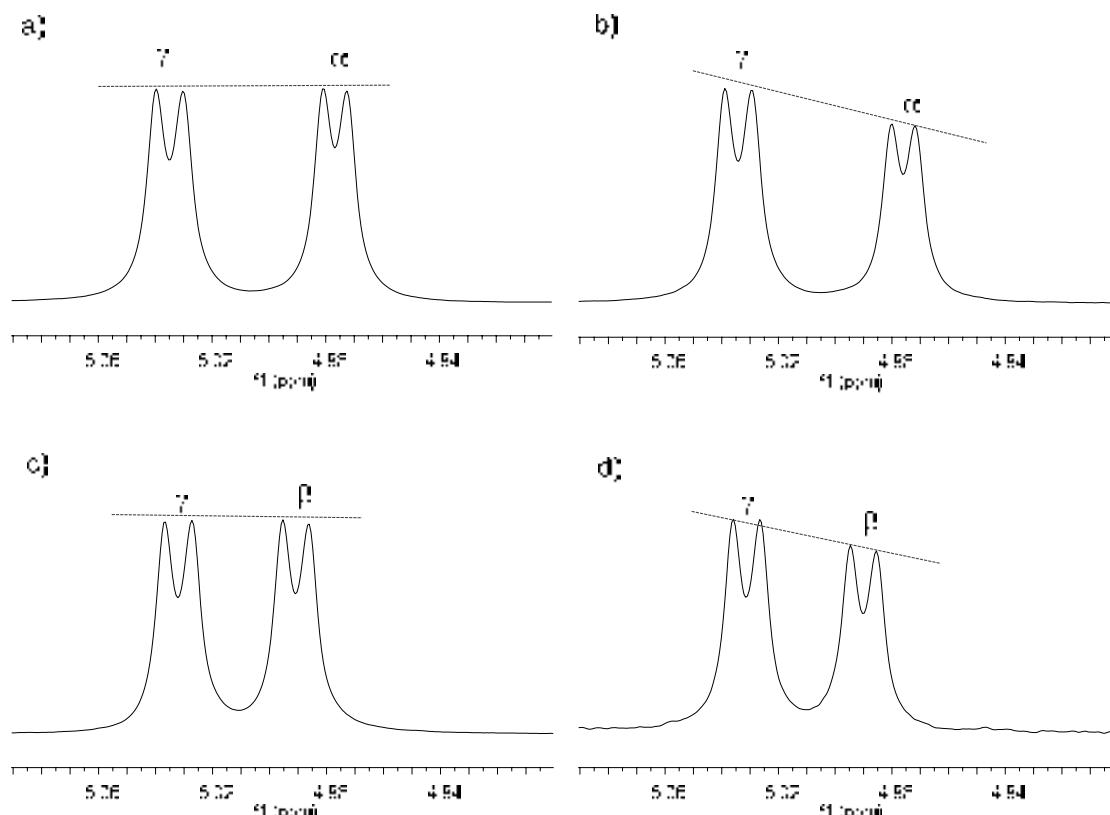


Figura 6-8. Espectros de difusión de la región del protón anomérico de 9.72 mg/ml de cada CD en D_2O . a y b) Mezcla de α -CD y γ -CD, c y d) mezclas de β -CD y γ -CD. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLED, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $T_e=10$ ms, $\delta/2=1$ ms y $T_R=100\mu s$. La intensidad de gradiente es: a y c) 5% de la corriente máxima, b y d) 80% de la corriente máxima. En todas las figuras se ha normalizado la intensidad del protón anomérico de la γ -CD.

Los espectros de difusión correspondientes a la mezcla de las 3 CDs se muestran en la Fig. 6-9. Como se puede observar, las señales de la α -CD y la β -CD tienen un cierto grado de solapamiento por lo que en este caso la intensidad de la señal que se analizó para obtener el valor de **D** en la α -CD es el pico de la derecha y en la β -CD el pico de la izquierda.

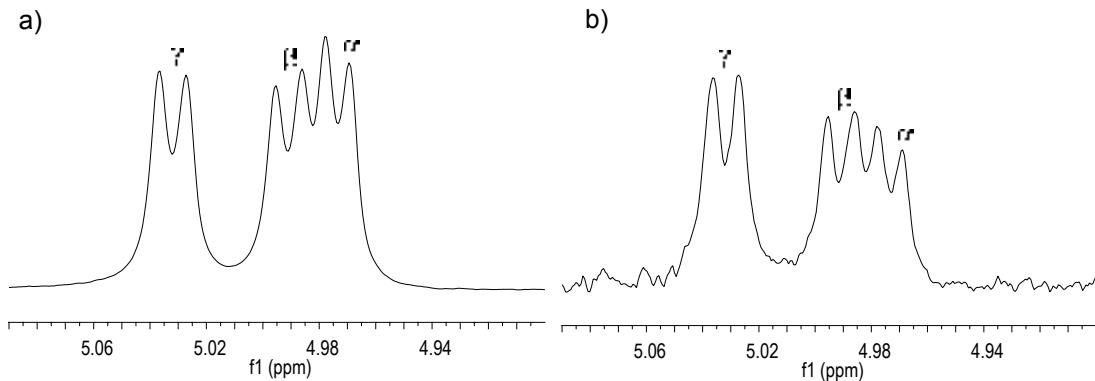


Figura 6-9. Espectros de la región del protón anomérico correspondientes a una mezcla de α -CD, β -CD y γ -CD. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLED, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $T_e=10$ ms, $\delta/2=1$ ms y $T_r=100$ μ s. La intensidad de gradiente es: a) 5% de la corriente máxima, b) 80% de la corriente máxima. En ambas figuras se ha normalizado la intensidad del protón anomérico de la γ -CD.

En la Fig. 6-10 se muestra la gráfica del valor experimental de **D** obtenido para una mezcla de 2 CDs ($\alpha + \gamma$ y $\beta + \gamma$) o 3 CDs ($\alpha + \beta + \gamma$). Como podemos observar se obtiene muy buena correspondencia al representarlas en función de los mg/ml de todas las CD solución. Por ejemplo, el coeficiente de difusión de una solución de 9.72 mg/ml de α -CDs es $2.85 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$, sin embargo el coeficiente de difusión disminuye a $2.73 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ si en la misma solución hay 9.72 mg/ml de γ -CDs.

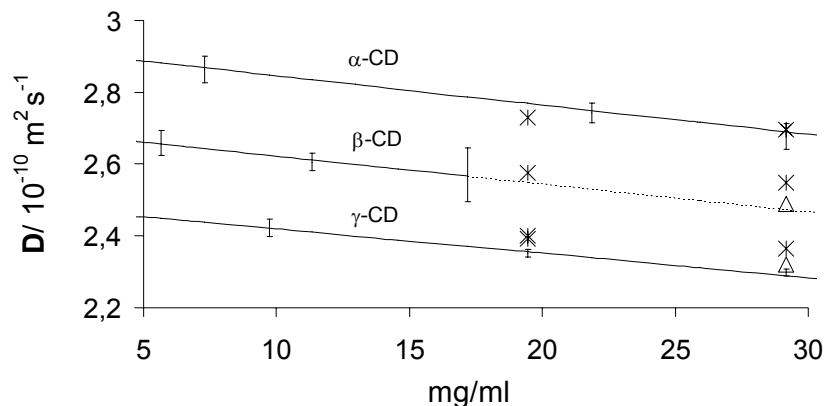


Figura. 6-10. Coeficiente de difusión **D** de la mezcla de 9.72 mg/ml de cada CD en D_2O sobre la misma gráfica de la Fig. 6-6. Se presentan los datos de mezclas de 2 CD a 19.44 mg/ml ($\alpha + \gamma$ y $\beta + \gamma$), y de 3 CD a 29.16 mg/ml ($\alpha + \beta + \gamma$). Los asteriscos (*) son valores obtenidos a 400MHz, y los triángulos (Δ) a 500 MHz.

Tabla 6-5 Valor del coeficiente de difusión **D** para cada CD según datos de la Fig. 6-5 (sólo una única CD en solución). La desviación que se describe es el promedio de la desviación encontrada para todos los puntos de cada una de las rectas de la Fig. 6-5.

Concentración	D_{CD/10⁻¹⁰ m s⁻¹}		
	α -CD	β -CD	γ -CD
9.72 mg/ml	2.85 \pm 0.024	2.62 \pm 0.045	2.42 \pm 0.015
19.44 mg/ml	2.77 \pm 0.024	2.55* \pm 0.045	2.36 \pm 0.015
29.16 mg/ml	2.69 \pm 0.024	2.48* \pm 0.045	2.29 \pm 0.015

* Valor extrapolado

Tabla 6-6. Valor experimental del coeficiente de difusión **D** para cada CD en mezclas de 2 y 3 CDs, donde la concentración de cada una de las CDs en la mezcla es de 9.72 mg/ml. Las mezclas se analizaron una sola vez, la desviación que se describe es el error en la regresión lineal (error típico xy).

Mezcla	D_{CD/10⁻¹⁰ m² s⁻¹}		
	α -CD	β -CD	γ -CD
$\alpha+\gamma$	2.73 \pm 0.010		2.39 \pm 0.009
$\beta+\gamma$		2.58 \pm 0.019	2.40 \pm 0.011
$\alpha+\beta+\gamma$	2.70 \pm 0.014	2.55 \pm 0.026	2.36 \pm 0.009
$\alpha+\beta+\gamma^*$	2.70 \pm 0.019	2.49 \pm 0.024	2.32 \pm 0.014

* A 500 MHz, el resto a 400 MHz.

6.4.3 Efecto de la temperatura

Para conocer el efecto de la temperatura sobre el coeficiente de difusión de las CDs, se determinó el valor de **D** de las mismas soluciones de CD estudiadas en la sección anterior a diferentes temperaturas (293K, 298K, 303K y 308K). La secuencia utilizada en todos los casos fue la BPPLED sin giro de la muestra. En la Fig. 6-11 y la tabla 6-7 se muestran los resultados para la α -CD, donde se observa una buena relación lineal a 293K y 298K, pero a partir de 303K se encontraron resultados anómalos debido a los efectos de convección, que son muy notorios a 308K. Esta parte de la tesis realmente se realizó antes de estudiar los efectos de convección descritos en los capítulos anteriores. En lo que concierne a esta sección los datos obtenidos a 308K han sido eliminados de las siguientes gráficas, pero se han dejado los valores de 303K para incidir en el error que se comete al realizar los experimentos con la presencia de efectos de convección, a veces, casi imperceptibles.

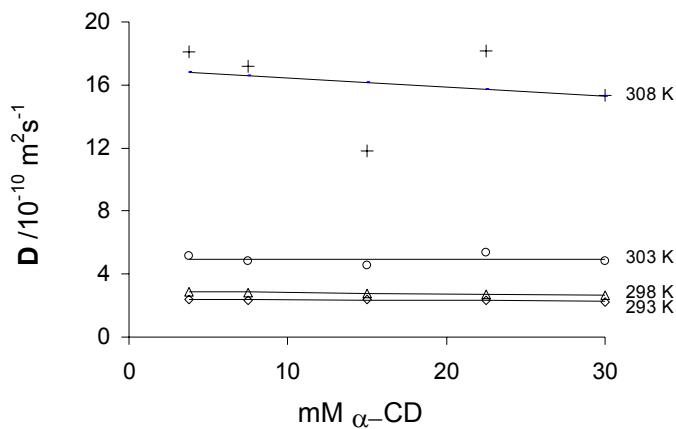


Figura 6-11. Coeficiente de difusión **D** de la α -CD en D_2O a diferentes temperaturas y concentraciones. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLED, 7 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=10$ ms, $\delta/2=1$ ms y $\text{Tr}=100$ μs .

Tabla 6-7. Datos de las líneas de regresión de la Fig. 6-12.

Temperatura	D a dilución infinita $/ 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	Pendiente $/ 10^{-13} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	R^2
293	2.4243	-3.9	0.884
298	2.9165	-6.6	0.987
303	4.929	+0.07	0.00001
308	17.023	-4.33	0,0542

Las gráficas de la Fig. 6-12 muestran el valor experimental del coeficiente de difusión de las CD a diferentes temperaturas (293K, 298K y 303K). La principal conclusión que se extrae es que al aumentar la temperatura, aumenta la difusión de las moléculas.

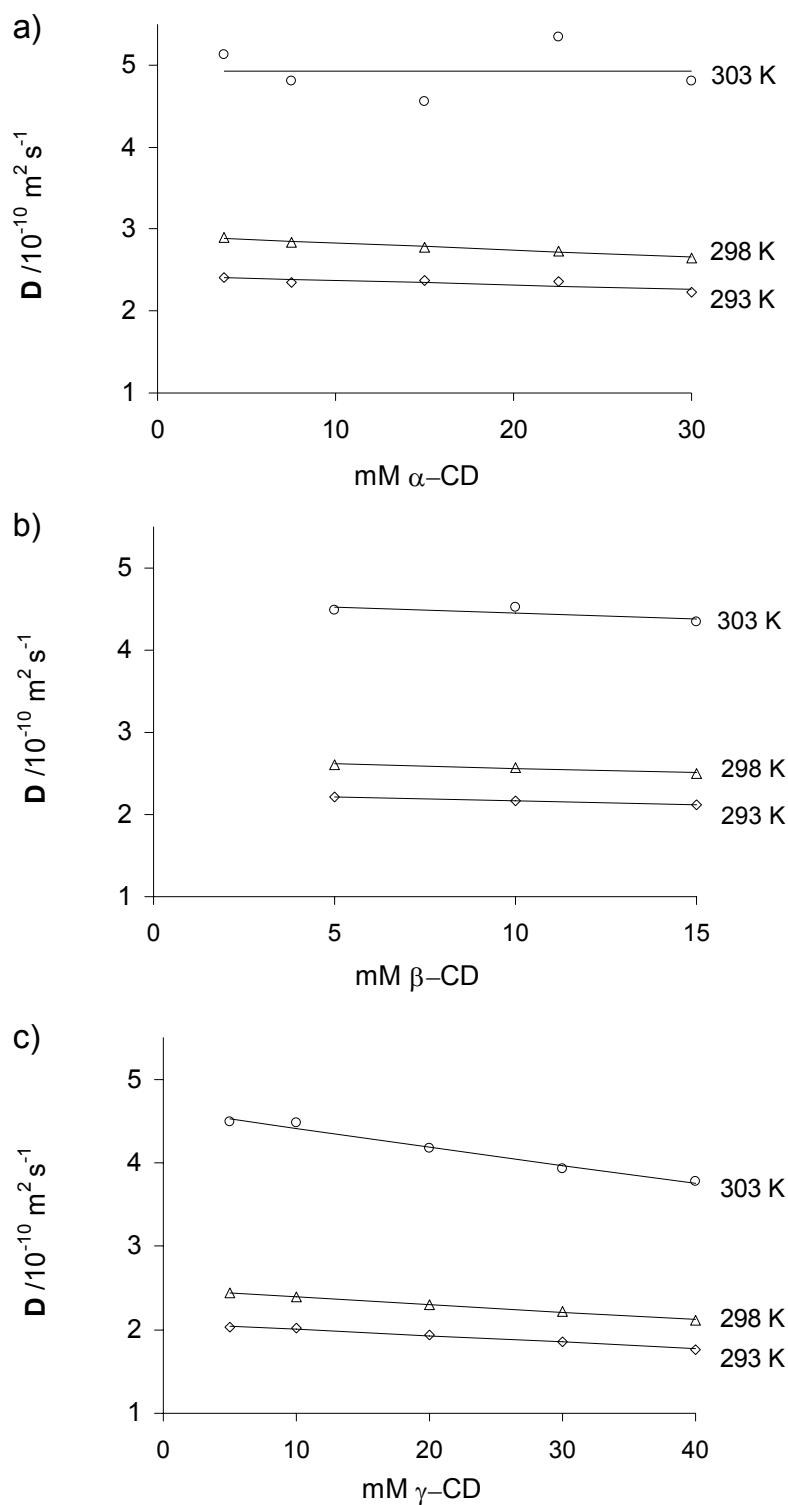


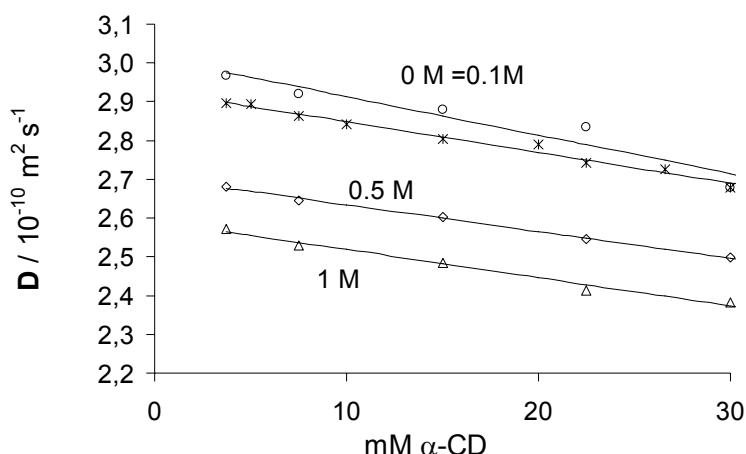
Figura 6-12. Coeficiente de difusión \mathbf{D} de las CDs en D_2O a diferentes temperaturas y concentración de CDs. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLLED, 7 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\text{Te}=10$ ms, $\delta/2=1$ ms y $\text{Tr}=100\mu\text{s}$.

6.4.4 Efecto de fuerza iónica

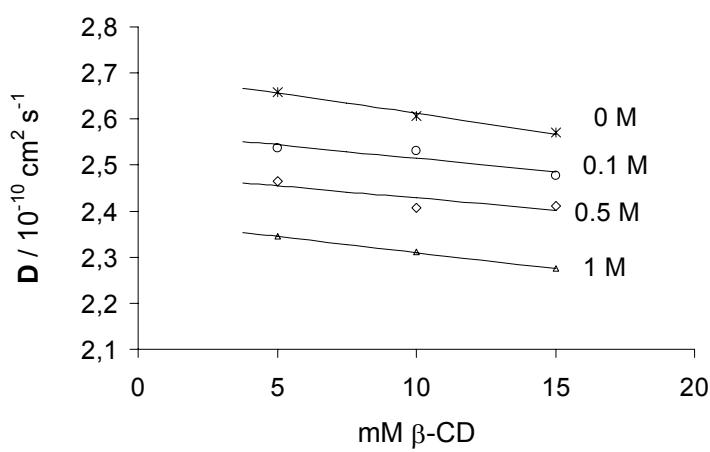
Las gráficas de la Fig. 6-13 muestran los valores experimentales de **D** para las diferentes muestras de CDs obtenidos utilizando concentraciones variables de NaCl. Todas las medidas están hechas en soluciones de D₂O a una temperatura regulada de 298K y contienen una concentración de NaCl de 0, 0.1, 0.5, y 1 M. Cómo tendencia general, se observa que a mayor fuerza iónica, el valor de **D** de las CDs disminuye. No obstante, a baja concentración de sal (0.1M) parece que el valor no cambia e incluso que existe un ligero aumento en algunos casos. Estos efectos se pueden explicar si consideramos las interacciones entre las moléculas de CDs y el disolvente polar (=agua+sal) y entre éllas mismas. La presencia de iones en solución podría generar un cambio en la fuerza de fricción y, por ende, un cambio en el valor de **D**. Si la fuerza de fricción aumenta, el valor de **D** disminuye y viceversa.

La principal conclusión que se extrae en esta sección es que cuando se intentan comparar valores de **D** de muestras parecidas adquiridos en condiciones experimentales parecidas, además de tener que considerar la temperatura y la concentración del soluto, también es muy importante tener en cuenta la posible presencia de sales.

a)



b)



c)

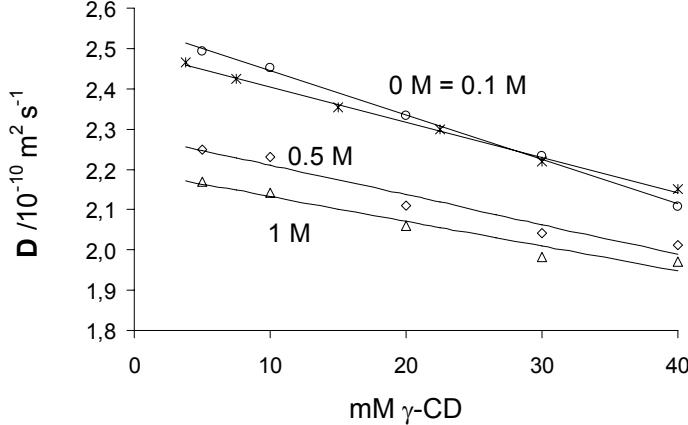


Figura 6-13. Coeficiente de difusión \mathbf{D} de las CDs en D_2O a diferente concentración de CDs y de NaCl . En cada gráfica se representan 4 resultados: 0M (*), 0.1M (o), 0.5M (◊) y 1M (□). Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLED, 7 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150 \text{ ms}$, $\text{Te}=10 \text{ ms}$, $\delta/2= 1 \text{ ms}$ y $\text{Tr}=100 \mu\text{s}$.

Tabla 6-8. Datos de las líneas de regresión de la Fig.6-13.

Compuesto	Concentración NaCl / M	D a dilución infinita / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Pendiente / $10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	R^2
α -CD	0	3.01	-9.9	0.920
α -CD	0.1	2.93	-7.9	0.990
α -CD	0.5	2.70	-6.9	0.997
α -CD	1	2.38	-7.3	0.984
β -CD	0	2.70	-8.8	0.988
β -CD	0.1	2.57	-5.9	0.827
β -CD	0.5	2.48	-5.4	0.700
β -CD	1	2.38	-6.9	0.999
γ -CD	0	2.49	-8.7	0.996
γ -CD	0.1	2.55	-11.0	0.998
γ -CD	0.5	2.28	-7.4	0.957
γ -CD	1	2.19	-6.1	0.955

6.4.5 Efecto del pH

Para conocer el efecto del pH sobre la difusión de las CDs, se midió el coeficiente de difusión de varias muestras de concentraciones variables de CDs en soluciones de D₂O a una temperatura regulada de 298K y con pH controlado. El pH se midió utilizando un potenciómetro calibrado con soluciones estándar de valor de pH de 2 y 14. A cada concentración de CD el pH se le ajustó con gotas de soluciones deuterados de HCl y NaOH (que poseían la misma [CD] correspondiente para evitar el efecto de dilución). Las gráficas de la Fig. 6-14 muestran el valor experimental de **D** obtenido en estas condiciones. Se observa que al variar el pH hay una disminución del valor experimental de **D**, aunque en este caso no podemos descartar la posible influencia debido al cambio en la fuerza iónica o la concentración de sales. El efecto de variar el pH puede ser un cambio en la protonación/desprotonación de los grupos hidroxilos y, por tanto, un cambio en la esfera de hidratación, las interacciones electrostáticas entre las moléculas de CDs con el disolvente y entre éllas mismas. Por lo tanto, cuando se intentan comparar valores de **D** de muestras parecidas adquiridos en condiciones experimentales parecidas, es muy importante tener en cuenta la posible presencia de sales y el cambio del pH de la solución.

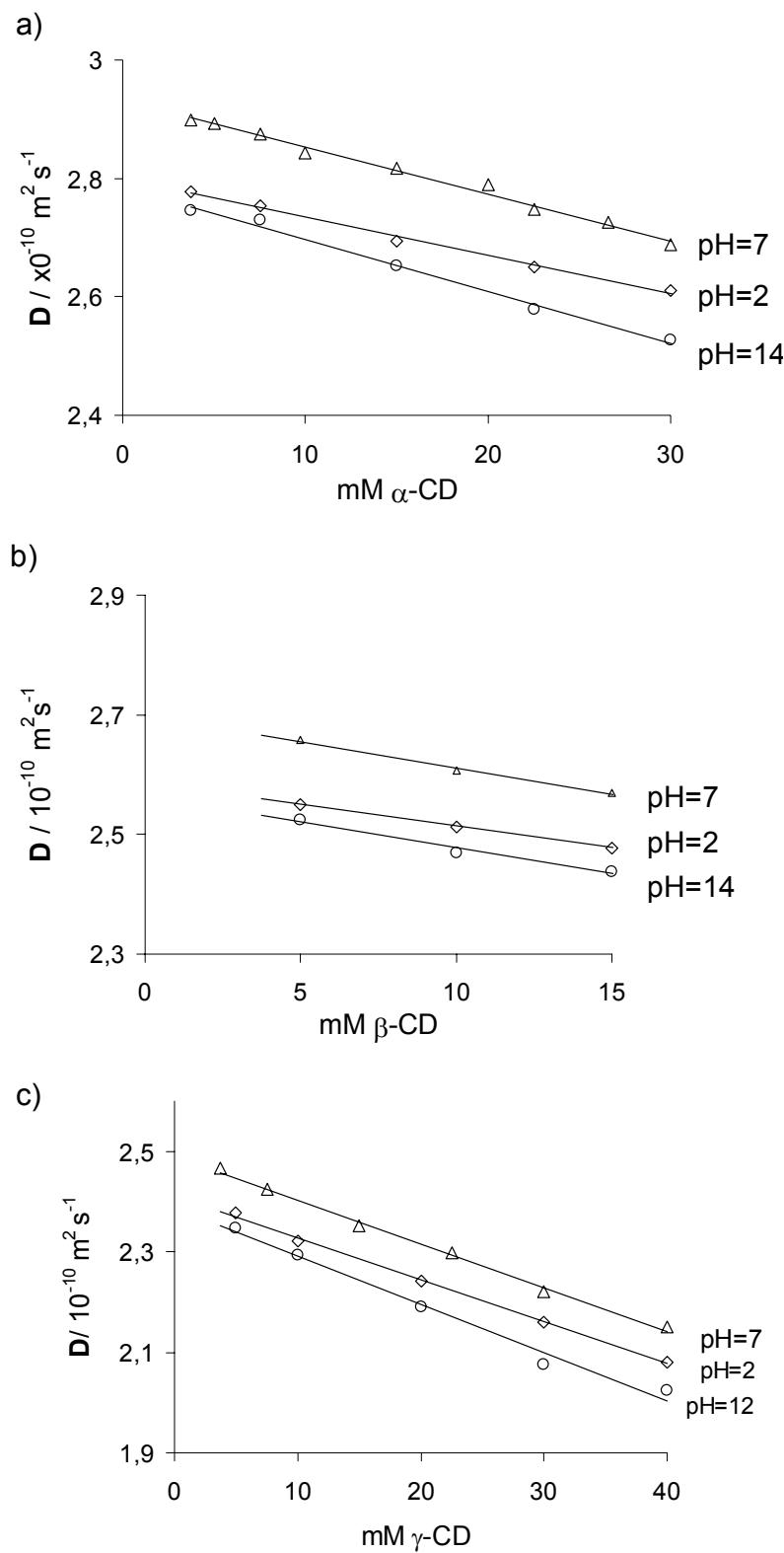


Figura 6-14. Coeficiente de difusión \mathbf{D} de las CDs en D_2O a diferente concentración de CDs y a diferente pH. En cada gráfica se representan 3 resultados: pH=7, 2 y 14. Las condiciones experimentales son: Secuencia BPPLLED, 7 Espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $\mathbf{T}_e=10$ ms, $\mathbf{\delta}/2=1$ ms y $\mathbf{T}_r=100$ μs .

Tabla 6-9. Datos de las líneas de regresión de la Fig.6-14.

Compuesto	pH	D a dilución infinita / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Pendiente / $10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	R^2
α -CD	7	2.93	-8.0	0.993
α -CD	2	2.80	-6.4	0.993
α -CD	12	2.78	-8.8	0.993
β -CD	7	2.70	-8.8	0.988
β -CD	2	2.58	-7.2	0.999
β -CD	12	2.56	-8.6	0.978
γ -CD	7	2.49	-8.7	0.996
γ -CD	2	2.40	-8.3	0.998
γ -CD	12	2.39	-9.6	0.987

6.5 Comparación con datos publicados en la bibliografía

Los datos que están publicados para las diferentes CDs son los valores de constantes de asociación o de r_h determinados a partir de valores experimentales de **D** que no siempre se publican. En la tabla 6-10 se encuentran algunos de los valores de **D** de las CD que se encuentran publicados. Si comparamos el valor de **D** que se obtuvo en esta tesis para una solución 0.01 M de α -CD a 298 K en D₂O ($2.84 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \pm 0.04$) con el reportado por Chwalek¹³⁵ en las mismas condiciones ($2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) observamos una muy buena correlación entre ambos valores. Sin embargo, aunque no determinamos los valores de **D** para concentraciones de 1mM, los valores descritos por Naidoo¹³⁷ para concentraciones 1mM son menores a los calculados extrapolando las rectas a dilución infinita. También Guerrero-Martínez¹³⁸ publica un valor inferior para dilución infinita. Con las demás publicaciones no tenemos condiciones experimentales con que comparar ya que en ellas se utilizan soluciones amortiguadas. Aunque llama la atención que se reportan valores mayores de $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, ya que el valor de **D** más alto encontrado en este trabajo es para la CD más pequeña, la α -CD en D₂O pura, que a dilución infinita dio un valor de $3.01 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y se demostró que cuando se mantiene la temperatura constante y se adiciona NaCl, DCl o NaOD el valor de **D** disminuye en mayor o menor medida. El porqué de las diferencias en los resultados se puede deber a varios factores, pero principalmente a la calibración y

linealidad de los gradientes y a la temperatura real en los diferentes instrumentos, lo cual es un punto muy importante a considerar cuando se comparan resultados.

Tabla 6-10. Valores reportados de **D** para las CDs

CD y condiciones	D / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Ref.
α -CD, 298 K en D ₂ O 0.01 M	2.8	135
α -CD, 300 K en D ₂ O 0.01 M	2.9	136
α -CD, 25 C en D ₂ O 1m M	2.292 ± 0.025	137
β -CD, 25 C en D ₂ O 1mM	2.168 ± 0.015	137
γ -CD, 25 C en D ₂ O 1mM	2.097 ± 0.017	137
α -CD, 298 K en D ₂ O a dilución infinita	2.71 ± 0.05	138
α -CD, 298 K en D ₂ O 19.2 mmol kg ⁻¹	2.39 ± 0.0177	139
α -CD, 25 C, solución diluida D ₂ O, pH=7.4 , 10mM buffer fosfato	2.65	140
β -CD, 25 C, solución diluida D ₂ O, pH=7.4 , 10mM buffer fosfato	2.44	140
γ -CD, 25 C, solución diluida D ₂ O, pH=7.4 , 10mM buffer fosfato	2.132	140
α -CD, 25 C, D ₂ O, concentración < que concentración micelar critica	2.64 ± 0.02	141
β -CD, pH=5, 298 K, 2 mmol l ⁻¹ en 0.02 mol l ⁻¹ buffer de carbonato D ₂ O	3.27	142
β -CD, pH=10, 298 K , 2 mmol l ⁻¹ en 0.02 mol l ⁻¹ buffer carbonato D ₂ O	3.16	142
β -CD, 298 K, 2mM en 0.1 M buffer de fosfatos D ₂ O a pH 7.5	3.23 ± 0.07	143
γ -CD, 298 K, 2mM en 0.1 M buffer de fosfatos D ₂ O a pH 7.5	3.09 ± 0.05	143

¹³⁵ Chwalek, M.; Auzély, R.; Fort, S. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, 1680-1688.

¹³⁶ Simova, S.; Berger, S. *Journal of Inclusion Phenomena* **2005**, 53, 163-170.

¹³⁷ Naidoo, K. J.; Chen, J. Y. J.; Jansson, J. L. M.; Widmalm, G.; Maliniak, A. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 4236-4238.

¹³⁸ Guerrero-Martínez, A.; González-Gaitano, G.; Viñas, M. H.; Tardajos, G. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 13819-13828.

¹³⁹ Valente, A. J. M.; Nilsson, M.; Söderman, O. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 281, 218-224.

¹⁴⁰ Danielsson, J.; Jarvet, J.; Damberg, P.; Gräslund, A. *Biochemistry* **2004**, 43, 6261-6269.

¹⁴¹ Cabaleiro-Lago, C.; Nilsson, M.; Söderman, O. *Langmuir* **2005**, 21, 11637-11644.

¹⁴² Arantes, L. M.; Scarelli, C.; Marsaioli, A. J.; De Paula, E.; Fernandes, S. A. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, 47, 757-763.

¹⁴³ Cameron, K. S.; Fielding, L. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, 40.

6.6 Propiedades moleculares

6.6.1.1 Estimación de la masa molecular

La Ec. 2-26, vista en la sección 2.6.3, que relaciona **D** con la masa molecular proviene de una ecuación más completa:

$$M = \left(\frac{kT}{6\pi\eta FD} \right)^3 \left[\frac{4\pi N_A}{[3(\nu_2 + \delta_1\nu_1)]} \right] \quad [6-2]$$

donde **M** es la masa molecular, **k** la constante de Boltzman, **T** es la temperatura absoluta, **η** es la viscosidad de la solución, **F** es el factor de forma, **N_A** es el numero de Avogadro, **ν₂** es el volumen parcial específico de la molécula, **ν₁** es el volumen parcial específico del agua, y **δ₁** es la cantidad fraccional del agua unida a la molécula (numero de hidratación).

Dado que no se ha encontrado en la bibliografía ni el número de hidratación **δ₁** ni el factor **F** para las CDs no podemos obtener **M** a partir del valor de **D** utilizando esta ecuación. Sin embargo, para obtener una estimación se utilizará el valor de **D** y **M** de una de las CD como referencia, y se determinará el factor de proporcionalidad de la relación **M** \propto $(1/D)^3$, para posteriormente utilizar este factor de proporcionalidad y determinar **M** de las otras dos CDs. La tabla 6-11 muestra los resultado obtenidos de **M** estimado y la desviación estándar relativa con respecto al valor teórico. Es muy notorio que cuando se usa una CD más pequeña, para el cálculo de una más grande se obtienen valores superiores a los esperados (desviación relativa de hasta 22%), mientras que cuando se usa una CD más grande, para el cálculo de una más pequeña se obtienen valores inferiores a los esperados (desviación relativa de hasta -18%). Esto lleva a pensar que debe haber una mayor diferencia entre la **M** y los valores del reciproco cúbico de **D** determinado para las CDs en solución. Por ello se decidió repetir los cálculos considerando el número de moléculas de agua que teóricamente están incluidas. Se asumió que la inclusión de moléculas de D₂O es igual a la inclusión de moléculas de H₂O. La tabla 6-12 muestra los resultados obtenidos donde se observa una disminución en la desviación relativa para todos los casos si comparamos con los resultados anteriores, pudiendo concluir que si se considera el número de moléculas de agua incluidas para estimar **M** se obtiene un mejor resultado.

También se puede concluir que se obtienen desviaciones relativas menores al utilizar los datos de **D** obtenidos en la misma solución donde las condiciones experimentales de concentración y viscosidad son las mismas que si se utilizan los datos extrapolados a dilución infinita.

Tabla 6-11. Masa molecular estimada y % de desviación relativa, de las CDs a partir de valor experimental de **D** utilizando la relación $M \propto (1/D)^3$.

CD de referencia	CD estudiada	M real /gr mol ⁻¹	M estimado ^a /gr mol ⁻¹	Desviación relativa ^a / %	M estimado ^b /gr mol ⁻¹	Desviación relativa ^b / %
α-CD	β-CD	1135	1240	9.3	1154	1.7
α-CD	γ-CD	1297	1585	22.2	1456	12.2
β-CD	α-CD	972	889	-8.5	956	-1.6
β-CD	γ-CD	1297	1450	11.8	1432	10.4
γ-CD	α-CD	972	795	-18.2	866	-11.0
γ-CD	β-CD	1135	1015	-10.6	1028	-9.4

a) Con los valores de **D** a dilución infinita (tabla 6-3).

b) Con los valores de **D** determinados en una mezcla de 9.72 mg/ml de cada una de las 3 CDs en D₂O a 400 MHz (tabla 6-6).

Tabla 6-12 Masa molecular estimada y % de desviación relativa de las CDs considerando el numero de moléculas de agua incluidas a partir valor experimental de **D** utilizando la relación $M \propto (1/D)^3$.

CD de referencia	CD estudiada	M real /gr mol ⁻¹	M estimado ^a /gr mol ⁻¹	Desviación relativa ^a / %	M estimado ^b /gr mol ⁻¹	Desviación relativa ^b / %
α-CD·6D ₂ O	β-CD·11D ₂ O	1355	1394	2.8	1296	-4.3
α-CD·6D ₂ O	γ-CD·17D ₂ O	1637	1780	8.8	1635	-0.1
β-CD·11D ₂ O	α-CD·6D ₂ O	1092	1061	-2.8	1141	4.5
β-CD·11D ₂ O	γ-CD·17D ₂ O	1637	1731	5.8	1709	4.4
γ-CD·17D ₂ O	α-CD·6D ₂ O	1092	1003	-8.1	1093	0.1
γ-CD·17D ₂ O	β-CD·11D ₂ O	1355	1281	-5.4	1297	-4.2

a) Con los valores de **D** a dilución infinita (tabla 6-3).

b) Con los valores de **D** determinados en una mezcla de 9.72 mg/ml de cada CDs en D₂O a 400 MHz (tabla 6-6).

6.6.1.2 Estimación del radio hidrodinámico

Como se mencionó en la sección 2.6.3, utilizando la relación de la Ec. 2-30 se puede estimar el r_h de un compuesto determinando simultáneamente el valor de **D** del compuesto y de un patrón interno con r_h conocido. La principal ventaja de utilizar un compuesto como patrón interno es que ambos compuestos sufrirán igual variación en el valor de **D** si hay algún cambio en la viscosidad, la temperatura, el pH o cualquier otra condición experimental. Desafortunadamente, en este trabajo no fue posible encontrar ningún compuesto para utilizar como patrón interno y determinar el r_h de las CDs. Se probó con dioxano y otros similares pero todos presentaron el problema de que se incluían en las CDs.

Se decidió utilizar el valor del diámetro externo de una de las CDs como patrón y estimar el de las otras dos (tabla 6-13). Se puede observar que al utilizar la CD más pequeña para determinar el diámetro de otra más grande se obtienen valores menores a los esperados, y cuando se utiliza el diámetro de una CD más grande para estimar el de la más pequeña se obtienen valores mayores a los esperados. Esto se puede explicar debido a que las CDs no son moléculas rígidas, sino que son moléculas flexibles que presentan una esfera de solvatación.

Tabla 6-13. Radio externo y % de desviación relativa, de las CDs a partir de valor experimental de **D** utilizando la relación $M \propto (1/D)^3$ ³.

CD de referencia	CD estudiada	D externo teórico / Å	D estimado ^a / Å	Desviación relativa ^a / %	D estimado ^b / Å	Desviación relativa ^b / %
α-CD	β-CD	15.3	14.9	-2.9	14.5	-5.2
α-CD	γ-CD	16.9	16.6	-1.8	16.5	-2.2
β-CD	α-CD	13.7	14.1	3.0	14.5	5.5
β-CD	γ-CD	16.9	16.6	-1.8	16.5	-2.2
γ-CD	α-CD	13.7	14.4	4.8	14.8	7.8
γ-CD	β-CD	15.3	15.6	1.8	15.6	2.2

a) Con los valores de **D** a dilución infinita (tabla 6-3).

b) Con los valores de **D** determinados en una mezcla de 9.72 mg/ml de cada CDs en D₂O a 400 MHz (tabla 6-6).

Por último se decidió aplicar la ecuación de Stokes-Einstein para estimar el r_h de las CDs con los valores de **D** obtenidos a dilución infinita, asumiendo una simetría esférica y utilizando la viscosidad del D₂O pura a 25 °C (1.132 cP). Los resultados se muestran en la tabla 6-6 y son razonables para las dimensiones de las CDs. Está

descrito un valor de 7.1 Å para la β -CD¹⁴⁴ asumiendo las mismas consideraciones de utilizar en valor de **D** a dilución infinita, la viscosidad del D₂O pura a 25 °C y asumiendo una simetría esférica.

Tabla 6-14. Valores de r_h estimados para las CDs a partir de la ecuación de Stokes-Einstein con los valores de **D** obtenidos a dilución infinita, asumiendo una simetría esférica y utilizando la viscosidad del D₂O pura a 25°C (1.132 cP). La desviación que se indica está calculada con el promedio de la desviación encontrada para todos los puntos de cada una de las rectas de la Fig. 6-5.

CD	r_h / Å
α -CD	7.04 ± 0.06
β -CD	7.56 ± 0.13
γ -CD	8.17 ± 0.05

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

6.7 Resumen

El valor experimental de **D** es particularmente sensible a todas las condiciones que modulan las fuerzas intermoleculares en una determinada solución tales como el pH, composición iónica, viscosidad y temperatura. Las principales conclusiones que se extraen son:

- El efecto de la temperatura sobre **D** sigue una relación lineal predicha por la ecuación de Stokes-Einstein. El conocimiento real de la temperatura al hacer una determinación es muy importante por lo que la calibración del instrumento debe ser verificada. Las inestabilidades en la regulación de temperatura no desvían significativamente el valor experimental de **D**, pero si puede provocar una baja reproducibilidad de los resultados.
- El efecto de la viscosidad de la solución sobre **D** sigue una relación inversa predicha por la ecuación de Stokes-Einstein. Un cambio en el disolvente, la concentración de los solutos o en la temperatura, genera un cambio en la viscosidad y por tanto en el valor de **D**. El efecto de aumentar la concentración de la solución genera una disminución del valor de **D** también debido al

¹⁴⁴ Guerrero-Martínez, A.; González-Gaitano, G.; Viñas, M. H.; Tardajos, G. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 13819-13828.

fenómeno de auto-colisión u auto-obstrucción que se produce al aumentar la probabilidad de que las moléculas colisionan unas con otras.

- Cómo tendencia general, el efecto de aumentar la concentración de sales produce una disminución del valor de **D** debido al cambio en las interacciones entre las moléculas de CDs y el disolvente polar (=agua+sal) y entre las CDs mismas. La presencia de iones en solución puede generar un cambio en la fuerza de fricción, y por ende un cambio en el valor de **D**, si la fuerza de fricción aumenta el valor de **D** disminuye y viceversa.
- El efecto del cambio en el pH en las soluciones estudiadas tanto a pH=2 y 12, aunque no pudo ser aislado del efecto de cambio de la concentración de sales y de la viscosidad, resulta en una disminución del valor de **D**. El variar el pH produce un cambio en la protonación/desprotonación de los grupos hidroxilos y por tanto hay un cambio en la esfera de hidratación y las interacciones entre las moléculas de CDs con el disolvente y con ellas mismas.

Es muy importante resaltar que cuando se intentan comparar valores de **D** de muestras parecidas adquiridos en condiciones experimentales parecidas, hay que tener en cuenta cualquier variación en las condiciones de trabajo y en la composición de la muestra. También es muy importante especificar el error en la medida, sobre todo en un estudio cuantitativo.

También es muy importante resaltar la disminución del valor de **D_{HDO}** al aumentar la concentración de un compuesto. Por ello, todos los estudios que utilizan la señal de HDO para calibrar los gradientes (es decir, que dan al HDO el valor de $D=1.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$) en la misma solución donde ya están el o los compuestos disueltos, están cometiendo un error cuya gravedad dependerá de la concentración y la viscosidad de la solución final.

7 APLICACIONES DE LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN

En el presente capítulo se mostrarán algunos ejemplos de las principales aplicaciones del uso de los experimentos de difusión, como son la caracterización de mezclas (ver sección 7.1), la detección de interacciones ligando-receptor (ver sección 7.2) y el estudio del proceso de intercambio químico (ver sección 7.3.1). La tabla 7-1 muestra un resumen de algunas de las aplicaciones publicadas en la bibliografía.

Tabla 7-1. Aplicaciones de la determinación de **D**.

Aplicación	Ref.
Caracterización de mezclas	145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154
Caracterización de extractos de tejidos, alimentos, productos naturales	155, 156, 157, 158, 159, 160, 161
Caracterización en geles	162, 163

¹⁴⁵ Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 211-215.

¹⁴⁶ Lin, M. F.; Shapiro, M. J. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 7617-7619.

¹⁴⁷ Griffiths, P. C.; Stilbs, P.; Paulsen, K.; Howe, A. M.; Pitt, A. R. *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 915-918.

¹⁴⁸ Jayawickrama, D. A.; Larive, C. K.; McCord, E. F.; Roe, D. C. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1998**, *36*, 755-760.

¹⁴⁹ Derrick, T. S.; Larive, C. K. *Applied Spectroscopy* **1999**, *53*, 1595-1600.

¹⁵⁰ Kapur, G. S.; Findeisen, M.; Berger, S. *Fuel* **2000**, *79*, 1347-1351.

¹⁵¹ Diaz, M. D.; Berger, S. *Carbohydrate Research* **2000**, *329*, 1-5.

¹⁵² Schraml, J.; Blechta, V.; Soukupova, L.; Petrakova, E. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2001**, *20*, 87-91.

¹⁵³ Tomati, U.; Belardinelli, M.; Galli, E.; Iori, V.; Capitani, D.; Mannina, L.; Viel, S.; Segre, A. *Carbohydrate Research* **2004**, *339*, 1129-1134.

¹⁵⁴ Valentini, M.; Vaccaro, A.; Rehor, A.; Napoli, A.; Hubbell, J. A.; Tirelli, N. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 2142-2147.

¹⁵⁵ Barjat, H.; Morris, G. A.; Smart, S.; Swanson, A. G.; Williams, S. C. R. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1995**, *108*, 170-172.

¹⁵⁶ Gostan, T.; Moreau, C.; Juteau, A.; Guichard, E.; Delsuc, M. A. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2004**, *42*, 496-499.

¹⁵⁷ Guichard, E. *Food Reviews International* **2002**, *18*, 49-70.

¹⁵⁸ Nilsson, M.; Duarte, I. F.; Almeida, C.; Delgadillo, I.; Goodfellow, B. J.; Gil, A. M.; Morris, G. A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3736-3743.

¹⁵⁹ Sobolev, A. P.; Segre, A.; Lamanna, R. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2003**, *41*, 237-245.

¹⁶⁰ Gil, A. M.; Duarte, I.; Cabrita, E.; Goodfellow, B. J.; Spraul, M.; Kerssebaum, R. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *506*, 215-223.

¹⁶¹ Politi, M.; Groves, P.; Chávez, M. I.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 84-89.

¹⁶² Kwak, S.; Lafleur, M. *Macromolecules* **2003**, *36*, 3189-3195.

¹⁶³ Kwak, S.; Lafleur, M. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *221*, 231-242.

Aplicación	Ref.
Caracterización de polímeros	164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172,
Caracterización mezclas en estado sólido	173
Química combinatoria y supramolecular	174, 175, 176, 177
Caracterización de proteínas	178, 179, 180, 181, 182, 183, 184
Estimación de dimensiones hidrodinámicas, formas o masa molecular	185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196,
Seguimiento de reacciones químicas	197

- ¹⁶⁴ Chen, A.; Wu, D.; Johnson Jr, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 7965-7969.
- ¹⁶⁵ Stilbs, P.; Paulsen, K.; Griffiths, P. C. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 8180-8189.
- ¹⁶⁶ Vangorkom, L. C. M.; Hancewicz, T. M. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *130*, 125-130.
- ¹⁶⁷ Jerschow, A.; Müller, N. *Macromolecules* **1998**, *31*, 6573-6578.
- ¹⁶⁸ Windig, W.; Antalek, B. *Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems* **1999**, *46*, 207-219.
- ¹⁶⁹ Griffiths, P. C.; Roe, J. A.; Jenkins, R. L.; Reeve, J.; Cheung, A. Y. F.; Hall, D. G.; Pitt, A. R.; Howe, A. M. *Langmuir* **2000**, *16*, 9983-9990.
- ¹⁷⁰ Spěváček, J. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2009**, *14*, 184-191.
- ¹⁷¹ Scheler, U. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2009**, *14*, 212-215.
- ¹⁷² Modesti, G.; Zimmermann, B.; Börsch, M.; Herrmann, A.; Saalwächter, K. *Macromolecules* **2009**, *42*, 4681-4689.
- ¹⁷³ Zumbulyadis, N.; Antalek, B.; Windig, W.; Scaringe, R. P.; Lanzafame, A. M.; Blanton, T.; Helber, M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 11554-11557.
- ¹⁷⁴ Pons, M.; Millet, O. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2001**, *38*, 267-324.
- ¹⁷⁵ Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L. *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, *44*, 520-554.
- ¹⁷⁶ Hori, A.; Kumazawa, K.; Kusukawa, T.; Chand, D. K.; Fujita, M.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K. *Chemistry - A European Journal* **2001**, *7*, 4142-4149.
- ¹⁷⁷ Zhao, T.; Beckham, H. W. *Macromolecules* **2003**, *36*, 9859-9865.
- ¹⁷⁸ Altieri, A. S.; Hinton, D. P.; Byrd, R. A. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 7566-7567.
- ¹⁷⁹ Dingley, A. J.; Mackay, J. P.; Chapman, B. E.; Morris, M. B.; Kuchel, P. W.; Hambly, B. D.; King, G. F. *Journal of Biomolecular NMR* **1995**, *6*, 321-328.
- ¹⁸⁰ Lin, M. F.; Larive, C. K. *Analytical Biochemistry* **1995**, *229*, 214-220.
- ¹⁸¹ Baranowska, H. M.; Olszewski, K. J. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1996**, *1289*, 312-314.
- ¹⁸² Krishnan, V. V. *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, *124*, 468-473.
- ¹⁸³ Nesmelova, I. V.; Skirda, V. D.; Fedotov, V. D. *Biopolymers* **2002**, *63*, 132-140.
- ¹⁸⁴ Dehner, A.; Kessler, H. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1550-1565.
- ¹⁸⁵ Yao, S.; Howlett, G. J.; Norton, R. S. *Journal of Biomolecular NMR* **2000**, *16*, 109-119.
- ¹⁸⁶ Simpson, A. J. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, *40*.
- ¹⁸⁷ Pregosin, P. S.; Martínez-Viviente, E.; Anil Kumar, P. G. *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions* **2003**, 4007-4014.
- ¹⁸⁸ Viel, S.; Capitani, D.; Mannina, L.; Segre, A. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1843-1847.
- ¹⁸⁹ Groves, P.; Rasmussen, M. O.; Molero, M. D.; Samain, E.; Canàfada, F. J.; Driguez, H.; Jiménez-Barbero, J. *Glycobiology* **2004**, *14*, 451-456.
- ¹⁹⁰ Crutchfield, C. A.; Harris, D. J. *Journal of Magnetic Resonance* **2007**, *185*, 179-182.
- ¹⁹¹ Augé, S.; Schmit, P. O.; Crutchfield, C. A.; Islam, M. T.; Harris, D. J.; Durand, E.; Clemancey, M.; Quoineaud, A. A.; Lancelin, J. M.; Prigent, Y.; Taulelle, F.; Delsuc, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 1914-1918.
- ¹⁹² MacChioni, A.; Ciancaleoni, G.; Zuccaccia, C.; Zuccaccia, D. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 479-489.
- ¹⁹³ Denkova, P. S.; Van Lokeren, L.; Willem, R. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 6703-6709.
- ¹⁹⁴ Tuzar, Z.; Kadlec, P.; Stepánek, P.; Kríz, J.; Nallet, F.; Noirez, L. *Langmuir* **2008**, *24*, 13863-13865.
- ¹⁹⁵ Palczewska, M.; Groves, P.; Ambrus, A.; Kaleta, A.; Kövér, K. E.; Batta, G.; Kuznicki, J. *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 6229-6237.
- ¹⁹⁶ Wilkins, D. K.; Grimshaw, S. B.; Receveur, V.; Dobson, C. M.; Jones, J. A.; Smith, L. J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16424-16431.
- ¹⁹⁷ Farrant, R. D.; Walker, V.; Mills, G. A.; Mellor, J. M.; Langley, G. J. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 15107-15116.

Aplicación	Ref.
Estudio de procesos de unión, constantes de asociación	198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213
Formación de agregados	214, 215, 216, 217, 218, 219
Formación de puentes de hidrogeno	220, 221,
Estudios para identificar compuestos que se unen a un receptor específico “screening NMR”	222, 223, 224, 225, 226, 227
Estudio de intercambio químico	228
Caracterización de compuestos asistida por formación de micelas	229, 230

- ¹⁹⁸ Mayzel, O.; Cohen, Y. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications* **1994**, 1901-1902.
- ¹⁹⁹ Mayzel, O.; Aleksiuk, O.; Grynszpan, F.; Biali, S. E.; Cohen, Y. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications* **1995**, 1183-1184.
- ²⁰⁰ Lin, M. F.; Jayawickrama, D. A.; Rose, R. A.; Delvscio, J. A.; Larive, C. K. *Analytica Chimica Acta* **1995**, 307, 449-457.
- ²⁰¹ Lin, M. F.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 5249-5250.
- ²⁰² Lin, M. F.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, 8930-8931.
- ²⁰³ Ponstingl, H.; Otting, G. *Journal of Biomolecular NMR* **1997**, 9, 441-444.
- ²⁰⁴ Chen, A. D.; Shapiro, M. J. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 669A-675A.
- ²⁰⁵ Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151-6170.
- ²⁰⁶ Valentini, M.; Pregosin, P. S.; Riegger, H. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2000**, 4507-4510.
- ²⁰⁷ Avram, L.; Cohen, Y. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 2639-2644.
- ²⁰⁸ Derrick, T. S.; Lucas, L. H.; Dimicoli, J. L.; Larive, C. K. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, 40.
- ²⁰⁹ Avram, L.; Cohen, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 15148-15149.
- ²¹⁰ Avram, L.; Cohen, Y. *Organic Letters* **2002**, 4, 4365-4368.
- ²¹¹ Wimmer, R.; Aachmann, F. L.; Larsen, K. L.; Petersen, S. B. *Carbohydrate Research* **2002**, 337, 841-849.
- ²¹² Fracaroli, A. M.; Granados, A. M.; De Rossi, R. H. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, 2114-2119.
- ²¹³ Bellachioma, G.; Ciancaleoni, G.; Zuccaccia, C.; Zuccaccia, D.; Macchioni, A. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 2224-2238.
- ²¹⁴ Lin, M.; Larive, C. K. *Analytical Biochemistry* **1995**, 229, 214-220.
- ²¹⁵ Keresztes, I.; Williard, P. G. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 10228-10229.
- ²¹⁶ Cameron, K. S.; Fielding, L. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 6891-6895.
- ²¹⁷ Valentini, M.; Pregosin, P. S.; Riegger, H. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2000**, 4507-4510.
- ²¹⁸ Zuccaccia, C.; Bellachioma, G.; Cardaci, G.; Macchioni, A. *Organometallics* **2000**, 19, 4663-4665.
- ²¹⁹ Timmerman, P.; Weidmann, J. L.; Jolliffe, K. A.; Prins, L. J.; Reinoudt, D. N.; Shinkai, S.; Frish, L.; Cohen, Y. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* **2000**, 2077-2089.
- ²²⁰ Price, W. S.; Tsuchiya, F.; Arata, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 11503-11512.
- ²²¹ Cabrita, E. J.; Berger, S. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2001**, 39.
- ²²² Bleicher, K.; Lin, M.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 8486-8490.
- ²²³ Meyer, B.; Peters, T. *Angewandte Chemie - International Edition* **2003**, 42, 864-890.
- ²²⁴ Lucas, L. H.; Larive, C. K. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research* **2004**, 20, 24-41.
- ²²⁵ Politi, M.; Chávez, M. I.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 1392-1396.
- ²²⁶ Zartler, E. R.; Yan, J.; Mo, H.; Kline, A. D.; Shapiro, M. J. *Current topics in medicinal chemistry* **2003**, 3, 25-37.
- ²²⁷ Hodge, P.; Monvisade, P.; Morris, G. A.; Preece, I. *Chemical Communications* **2001**, 239-240.
- ²²⁸ Cabrita, E. J.; Berger, S. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, 40.
- ²²⁹ Evans, R.; Haiber, S.; Nilsson, M.; Morris, G. A. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 4548-4550.
- ²³⁰ Bilia, A. R.; Camilla Bergonzi, M.; Vincieri, F. F.; Lo Nostro, P.; Morris, G. A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, 91, 2265-2270.

7.1 Caracterización de mezclas

Una de las primeras aplicaciones de la determinación de **D** por RMN fue la caracterización de mezclas, con la principal ventaja sobre otros métodos de que no requiere la separación física de sus componentes, como lo podría ser una separación cromatográfica. Es por eso que en algunos casos esta técnica se le ha llegado a llamar Cromatografía de Resonancia Magnética Nuclear^{231,232}.

La idea de utilizar los experimentos basados en PFGSE para la caracterización de una mezcla es muy simple: las moléculas más pequeñas se mueven rápido y sus señales se atenúan más rápidamente. Para mostrar un ejemplo de esta aplicación, se preparó la mezcla de acetato de etilo, pireno, acetona y triacetato de celulosa en CDCl_3 . Las estructuras y el espectro de protón de esta mezcla se muestran en las Fig. 7-1 y 7-2 respectivamente.

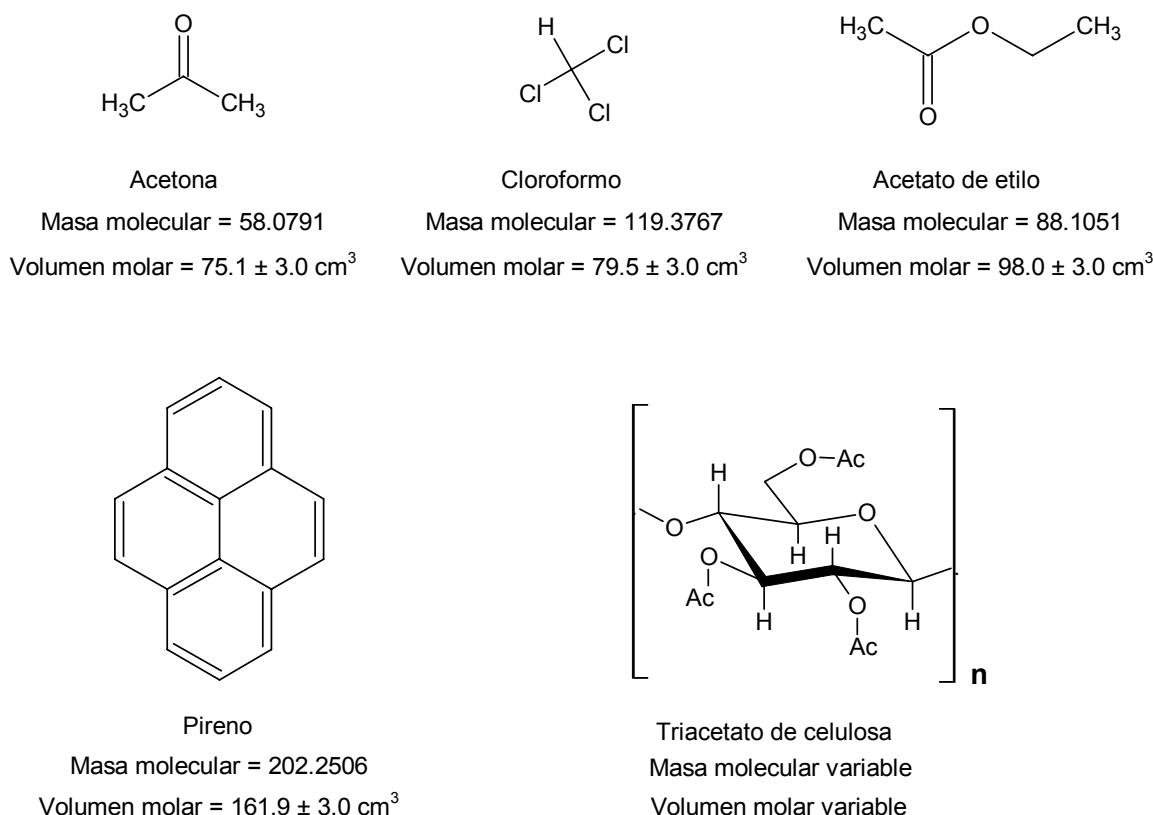


Figura 7-1. Estructuras, masa molecular y volumen molar de la mezcla de: triacetato de celulosa, pireno, acetato de etilo y acetona en CDCl_3 .

²³¹ Gounaris, J. S.; Chen, A. D.; Shapiro, M. J. *Journal of Chromatography B* **1999**, 725, 79-90.

²³² Hoffman, R. E.; Arzuan, H.; Pemberton, C.; Aserin, A.; Garti, N. *Journal of Magnetic Resonance* **2008**, 194, 295-299.

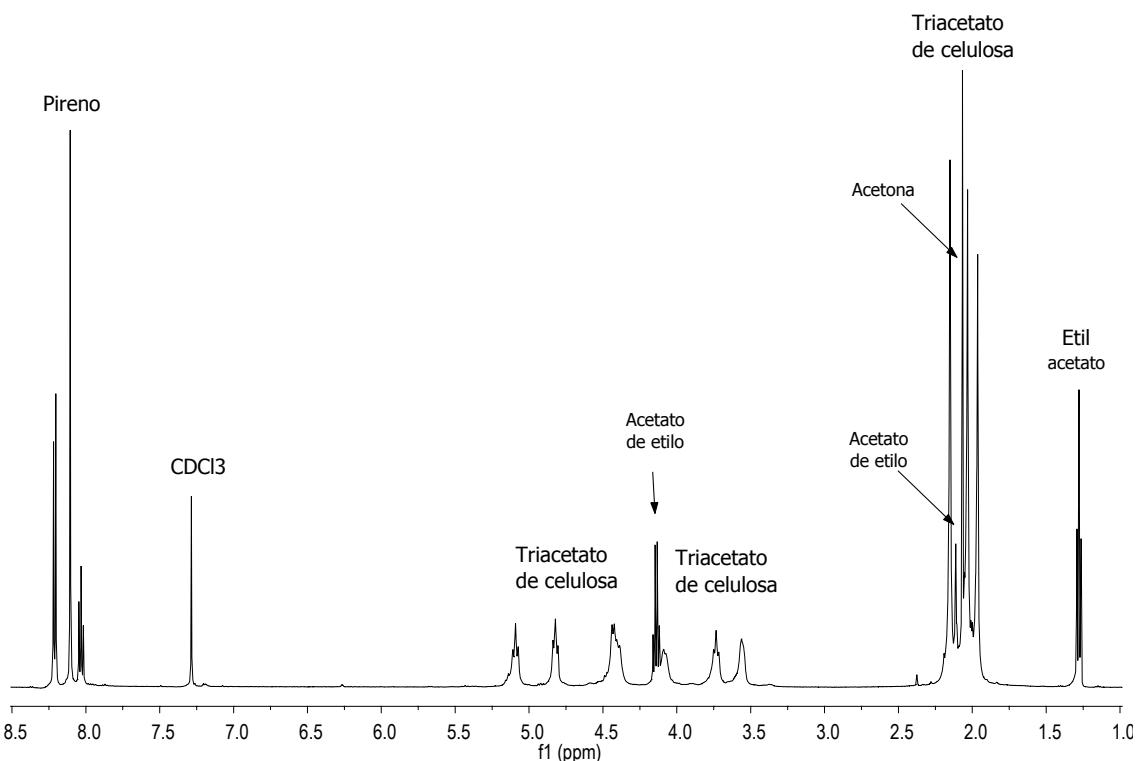


Figura 7-2. Espectro ^1H de la mezcla de: triacetato de celulosa, pireno, acetato de etilo y acetona en CDCl_3 .

A dicha mezcla se le realizaron experimentos de difusión utilizando la secuencia BPPLED. Se adquirieron 32 espectros ($\text{td}=16\text{K}$, $\text{ds}=8$ y $\text{scans}=16$) con incrementos lineales de fuerza de gradiente entre 2 y 100% de la corriente máxima, con un tiempo de difusión de 150 ms y la duración total de los gradientes con forma seno de 3 ms ($\delta/2 = 1.5$ ms). La Fig. 7-3 muestra los espectros de difusión obtenidos en función de la intensidad de gradientes. Se observa como al aumentar la fuerza de gradiente disminuye la intensidad de todas las señales de la mezcla y es muy notorio observar cómo las señales del cloroformo, del acetato de etilo, del pireno y de la acetona se atenúan mucho antes que la del tri-acetato de celulosa, que en estas condiciones, solo se ha atenuado un 60% cuando se aplica el 100% de la potencia máxima de los gradientes (espectro de la parte superior). Todos los demás compuestos están prácticamente atenuados cuando se aplica un 49 % de la potencia máxima (ver espectro número 16 de abajo a arriba).

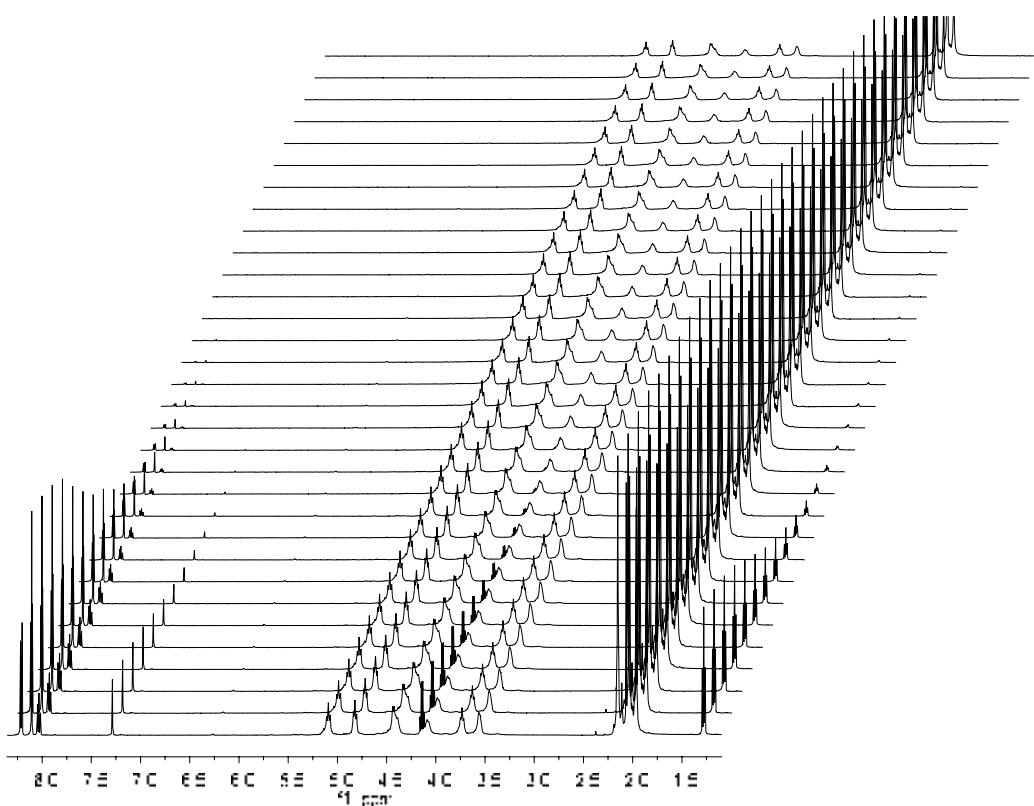


Figura 7-3. Experimentos de difusión en un equipo de 500 MHz con la secuencia BPPLED de la mezcla triacetato de celulosa, pireno, acetato de etilo y acetona en CDCl_3 . Las condiciones experimentales son: 32 espectros ($td=16\text{K}$, $ds = 8$ y $ns=16$) con incrementos lineales de intensidad de gradiente entre 2 (espectro inferior) y 100% (espectro superior) de la corriente máxima, 150 ms para el tiempo de difusión, 3 ms para la duración total de los gradientes con forma seno ($\delta/2 = 1.5$ ms) y 50 ms para Te .

El método DOSY simplifica mucho el análisis de las mezclas y permite distinguir los diferentes componentes que posean volúmenes moleculares distintos. La Fig. 7-4 muestra el espectro DOSY de la mezcla en estudio. Se observa cómo las señales de los diferentes compuestos aparecen a diferentes valores del eje de difusión, es decir que los componentes han sido separados en la dimensión de **D**. Las señales solapadas de diferentes compuestos (señales marcadas con círculos) se discutirán más adelante.

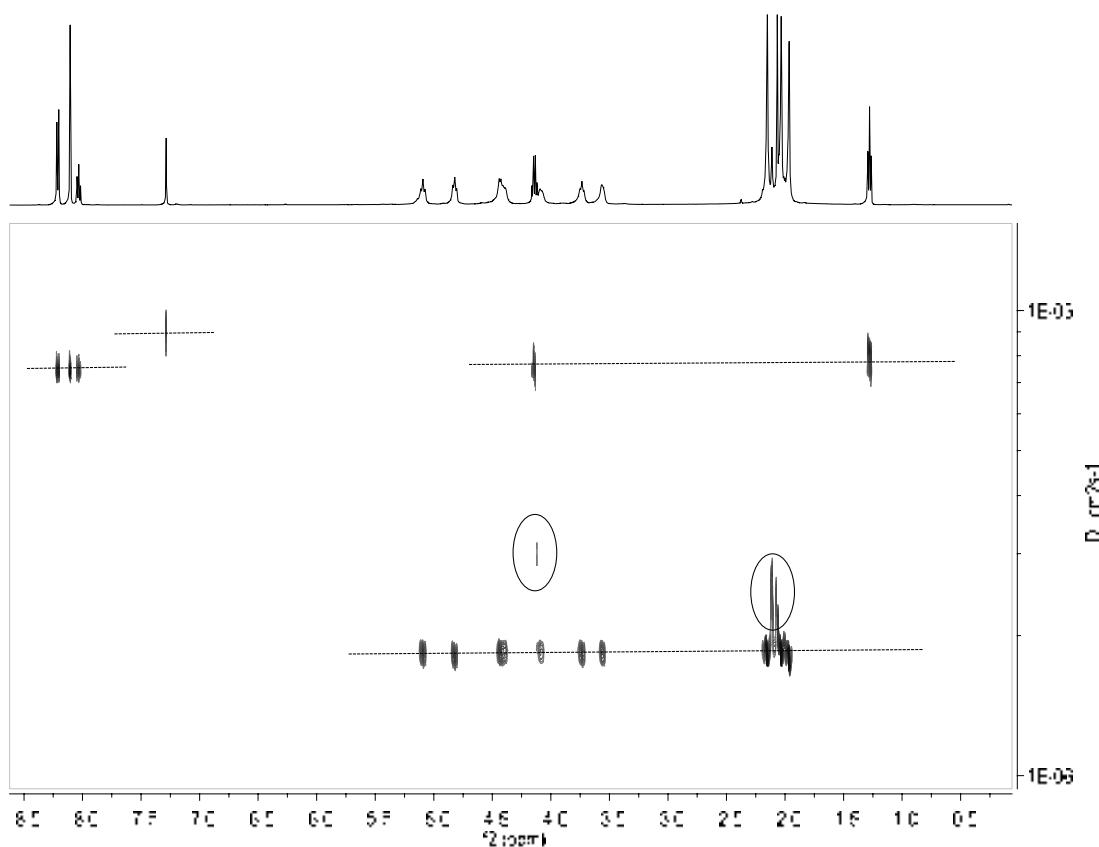


Figura 7-4. Espectro DOSY de la mezcla triacetato de celulosa, pireno, acetato de etilo y acetona en CDCl_3 . Este espectro han sido procesados con el software MestReNova versión 6.0.3-5704. El eje de difusión se encuentra en escala logarítmica y los valores de D menores se encuentran en la parte inferior del espectro, a diferencia de otros programas que los presentan al revés.

El valor de \mathbf{D} obtenido haciendo los cálculos manualmente a partir de una hoja de cálculo se listan en la tabla 7-2. En esta tabla no figura el valor de la acetona ya que su señal solapa con la del triacetato de celulosa.

Tabla 7-2. Coeficiente de difusión \mathbf{D} de la mezcla de triacetato de celulosa, pireno, etil benceno y acetona en CDCl_3 . Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 7-3. Los valores de r_h se estimaron a partir de la ecuación de Stokes-Einstein asumiendo una simetría esférica y utilizando la viscosidad del CDCl_3 puro a 25°C (0.44 cP).

Compuesto	No de espectros	$\mathbf{D}/ 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$r_h / \text{\AA}$
Acetona	ND*	ND*	ND*
Cloroformo	11	2.44 ± 0.002	2.03
Acetato de etilo	12	2.20 ± 0.007	2.25
Pireno	10	2.15 ± 0.020	2.31
Triacetato de celulosa	32	0.32 ± 0.060	15.5

*ND: No determinado debido a solapamiento de la señal.

Hay que señalar que las mezclas se analizan fácilmente si las señales no presentan solapamiento. Esto quiere decir que, para poder determinar fácilmente el valor de **D** de una mezcla, por lo menos una señal de cada compuesto no debe estar solapada con las de los otros compuestos. En la mezcla aquí estudiada, el pireno y el cloroformo presentan señales bien resueltas y sin solapamiento (Fig. 7-5a) por lo que el valor de **D** de estos compuestos es determinado sin ambigüedad. Sin embargo, en compuestos con señales que presentan solapamiento no es tan fácil, ya que el valor del coeficiente de difusión observado (D_{obs}) es el promedio de los valores individuales de los coeficientes de difusión ponderados por la fracción de cada uno de ellos (Ec. 7-1). Es decir, que para obtener los valores individuales de **D** cuando hay dos compuestos con señales solapadas se tiene que resolver una función bi-exponencial, que en nuestra experiencia no es fácil (ver sección 3.3). En esta mezcla, el acetato de etilo y la acetona presentan solapamiento con las señales del triacetato de celulosa (Fig. 7-5b,c). Por ello, el cuarteto correspondiente al CH_2 del acetato de etilo se sobreponen con una de las señales de los metinos del triacetato de celulosa y se obtiene un valor de **D** intermedio al de las dos especies (señal a 4.12 ppm, Fig. 7-5b). De igual forma, los singuletes del acetato de etilo y el de la acetona se sobreponen con los metilenos del triacetato de celulosa (señales a 2.11 y 2.07 ppm respectivamente, Fig. 7-5b). Para determinar el valor de **D** del acetato de etilo se utilizó el triplete del CH_3 (1.25 ppm) por ser la única señal que no presenta solapamiento y el valor de **D** de la acetona no se determinó.

$$D_o = f_1 D_1 + f_2 D_2 \quad [7-1]$$

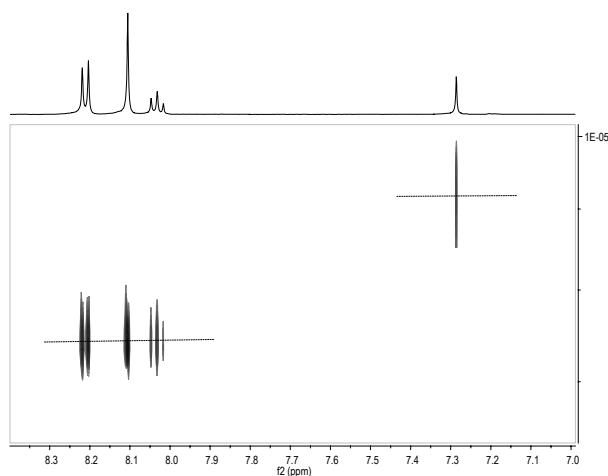
Cuando se habla de separación de mezclas surge la pregunta ¿Cómo de diferentes deben ser los valores de **D** para que se pueda usar este método de separación? Está descrito que utilizando secuencias apropiadas, eliminando los artefactos causados por las corrientes *eddy*, las corrientes de convección, la no uniformidad de gradientes y con una buena relación señal a ruido se pueden separar compuestos si su valor de **D** difiere en 2% cuando las señales están bien resueltas²³³ y en 30% si hay solapamiento de especies^{234,235}.

²³³ Barjat, H.; Morris, G. A.; Smart, S.; Swanson, A. G.; Williams, S. C. R. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1995**, 108, 170-172.

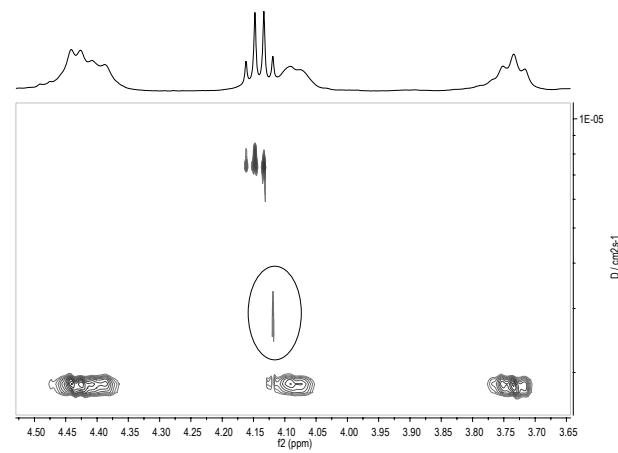
²³⁴ Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 211-215.

²³⁵ Antalek, B.; Hewitt, J. M.; Windig, W.; Yacobucci, P. D.; Mourey, T.; Le, K. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, 40, S60-S71.

a)



b)



c)

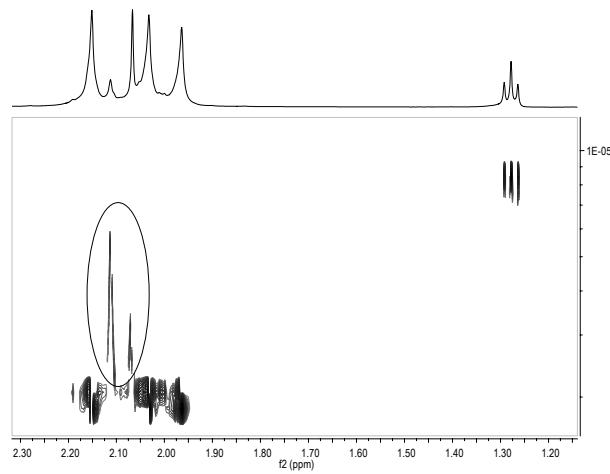


Figura 7-5. Expansiones del espectro DOSY de la Fig. 7-4

7.2 Procesos de unión o asociación

A las técnicas de análisis por RMN para la identificación de procesos de unión o asociación, como es la determinación de tiempos de relajación, desplazamiento químico, transferencia de NOE, o transferencia de saturación, se ha sumado la determinación de **D**, debido a que la difusión de un compuesto es muy sensible a cambios debidos a la formación de complejos o agregados.

El conocimiento de **D** se puede utilizar para detectar si un compuesto en solución está en estado libre o formando agregados. Esto se determina comparando el valor de **D** experimental con el calculado. Si los valores son iguales indica que se trata de un monómero, sin embargo si el valor calculado es significativamente mayor indica que se trata de un agregado. Este es un método bastante preciso para detectar dímeros, ya que la masa molecular de un monómero y de un dímero es diferente en un factor de 2. Sin embargo, detectar trímeros o tetrámeros es progresivamente más difícil ya que la relación entre la masa molecular y el volumen disminuye. Por ejemplo, si consideramos una esfera la ecuación que relaciona el volumen con el radio de la misma (Ec. 7-2) indica que si se dobla el peso molecular de la esfera, el volumen se duplica, por lo que el radio de la esfera tiene que aumentar un 26 %, si se triplica un 44 % (que es un 18 % más que el dímero) y si se cuadriplica un 59 % (que es un 15 % más que el trímero). En la práctica, estos porcentajes pueden variar debido a las diferentes formas de las moléculas y a las interacciones entre ellas.

$$V = \frac{4}{3}r^3\pi \quad [7-2]$$

7.2.1 Detección de interacciones intermoleculares

El valor de **D** nos permite determinar si un compuesto está libre o formando un complejo. Esto es gracias a que, si las moléculas están en intercambio rápido, el valor de **D** aparente del ligando, **D_a**, puede deducirse utilizando la fórmula:

$$D_a = f_f D_f + f_b D_b \quad [7-3]$$

donde **D_f** es el coeficiente de difusión del ligando en solución en estado libre, **D_b** es el coeficiente de difusión del ligando unido, y **f_f** y **f_b** son las fracciones del ligando en estado libre y unido. Como **f_f + f_b = 1**, **D_a** puede ser expresado solo con tres parámetros:

$$\mathbf{D}_a = \mathbf{D}_f - f_b (\mathbf{D}_f - \mathbf{D}_b) \quad [7-4]$$

En los casos donde la molécula receptora es mucho mayor que el ligando, se puede realizar la aproximación en que \mathbf{D}_b es igual a al coeficiente de difusión del receptor. En este caso $(\mathbf{D}_f - \mathbf{D}_b) \approx \mathbf{D}_f$ reduciendo la expresión a:

$$\mathbf{D}_a = \mathbf{D}_f (1 - f_b) \quad [7-5]$$

\mathbf{D}_f no es difícil de estimar, ya que es el coeficiente de difusión del ligando en ausencia de receptor, pero su valor debe ser modificado para compensar el efecto de la obstrucción de su movimiento debido a la presencia de las moléculas del receptor en la solución.

Utilizando la Ec. 7-5 es posible determinar la fracción de moléculas de ligando unidas a las moléculas del receptor. Realizando series de medidas de \mathbf{D} en las cuales se varía la relación de concentración entre ligando y receptor es posible determinar la constante de unión.

7.2.1.1 Estudio del complejo de inclusión del ácido p-aminobenzoico con β -CD

Los complejos de inclusión de las CDs^{236, 237} tienen muchas aplicaciones y son muy importantes en la industria farmacéutica y alimenticia, por ello se escogió como modelo para mostrar un ejemplo de la determinación de la constante de formación del complejo entre la β -CD y el ácido p-aminobenzoico (pAB) (Fig. 7-6). También, previo a la determinación de \mathbf{D} para el cálculo de la constante se realizaron experimentos 1D-ROESY, para conocer las interacciones espaciales entre el ácido 1,4-aminobenzoico y la β -CD. La Fig. 7-7a es el resultado de irradiar al protón H3 de la β -CD que producen picos ROE sobre los protones orto y meta del pAB, mientras que la Fig. 7-7b es el resultado de irradiar al protón orto del pAB produce picos ROE sobre los protones H3 y H5 de la β -CD que son los que se encuentran en la cavidad interna.

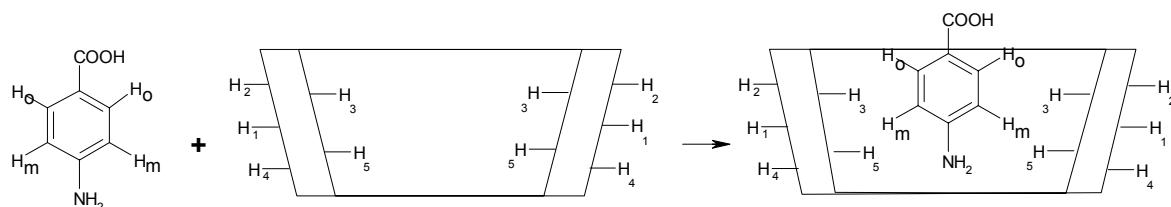


Figura 7-6. Modelo de la formación del complejo del ácido p-aminobenzoico con β -CD.

²³⁶ Hamelin, B.; Jullien, L.; Derouet, C.; Dupenhoat, C. H.; Berthault, P. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 8438-8447.

²³⁷ Gafni, A.; Cohen, Y. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 120-125.

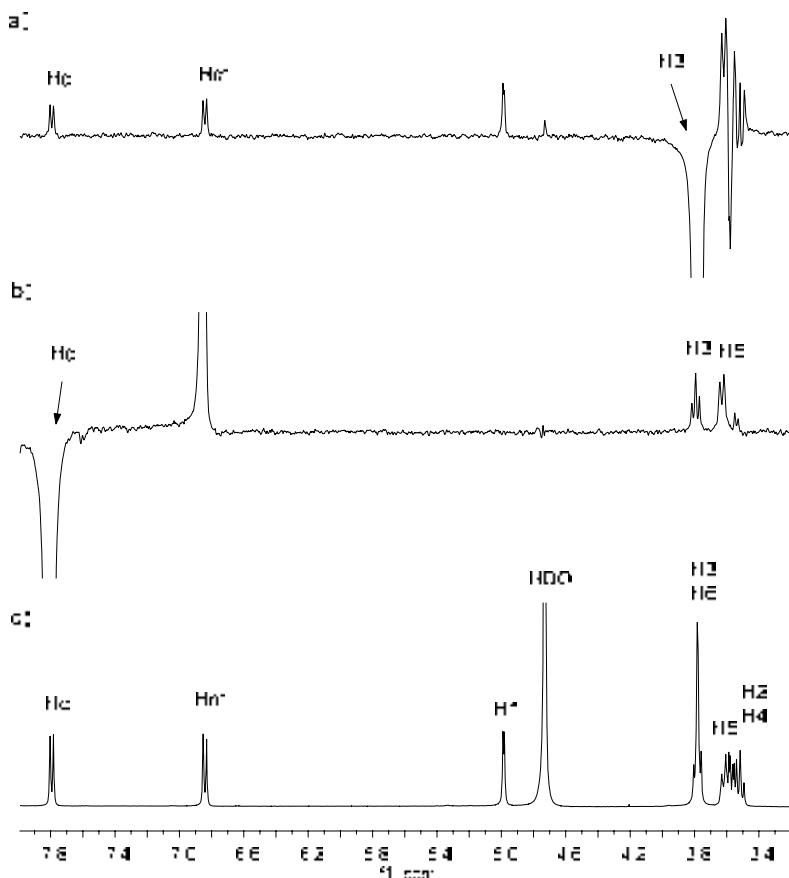


Figura 7-7. Espectros a 400 MHz del complejo ácido p-aminobenzoico con β -CD (3:1), c) ^1H convencional, a y b) Espectro 1D-ROESY selectivo irradiando: a) el protón H3 de la β -CD , y b) el protón orto del ácido p-aminobenzoico.

Para calcular la constante de formación del complejo se determinaron los valores de **D** del pAB libre, y de la β -CD y del ácido pAB complejado. Para determinar el valor de **D** del pAB libre se prepararon soluciones de concentración variable entre 2.5 y 25 mM, tanto en agua pura (D_2O) como en una solución 35 mM de glucosa en D_2O . No se encontró ningún cambio significativo en **D** debido a la presencia de unidades de glucosa “similares a la receptora β -CD” en la misma solución o a la diferencia en la viscosidad entre las soluciones. Para determinar el valor de **D** de la β -CD y el pAB complejados se prepararon soluciones de concentración variable de pAB en soluciones 5mM de β -CD. Los resultados se muestran en la Fig. 7-8 y en la tabla 7-3. Se observa como cuando la relación entre el pAB y la CD es uno a uno o menor, el coeficiente de difusión se acerca al valor de la CD. Esto significa que una fracción del pAB se encuentra dentro de la cavidad de la CD y por ello difunde más lentamente. Cuando el pAB está en exceso, la fracción de pAB libre es mayor y el valor de **D** se asemeja más al del pAB libre.

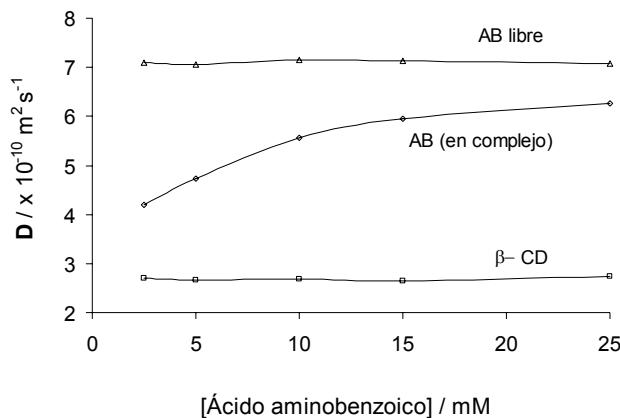


Figura 7-8. Coeficiente de difusión **D** en D_2O a 298K del pAB libre, de la β -CD libre y del complejo entre ambos en función de la concentración de pAB. Las condiciones experimentales son: Equipo de 500 MHz, secuencia BPPLED, 7 espectros con intensidad entre 5 y 100 % de la corriente máxima, gradientes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $T_e=20$ ms, $\delta/2=1$ ms y $T_r=100\mu s$.

Tabla 7-3. Coeficiente de difusión **D** del pAB libre, de la β -CD libre y del complejo entre ambos (en D_2O a 298 K) en función de la concentración de ácido amino benzoico. La desviación corresponde al error en la regresión lineal (error típico xy). Ver detalles experimentales en Fig. 7-8

[β -CD] / mM	[AB] / mM	D β -CD / 10^{-10} m ² s ⁻¹	D complejo β -CD-AB / 10^{-10} m ² s ⁻¹	D AB (sin CD) / 10^{-10} m ² s ⁻¹
5	2.5	2.70 ± 0.03	4.29 ± 0.09	7.19 ± 0.19
5	5	2.67 ± 0.03	4.70 ± 0.03	7.13 ± 0.06
5	10	2.67 ± 0.02	5.47 ± 0.05	7.11 ± 0.03
5	15	2.64 ± 0.01	5.87 ± 0.09	7.10 ± 0.05
5	25	2.64 ± 0.02	6.26 ± 0.06	7.07 ± 0.08

La fracción de moléculas de pAB libres y unidas a las moléculas de CD y el valor de la constante de formación del complejo se calculó utilizando la Ec. 7-5. Los resultados se muestran en la tabla 7-4. Considerando todas las medidas realizadas se obtiene una la constante de unión de $k=2.09$ mM con una desviación estándar de ± 0.21 .

Tabla 7-4. Constante de formación del pAB y β -CD utilizando los datos de la tabla 7-3.

[β -CD] / mM	[AB] / mM	Fracción AB en complejo	Fracción AB libre	[AB-CD] / mM	[AB] libre / mM	[CD] libre / mM	k / mM
5	2.5	0.65	0.35	1.62	0.88	3.38	1.85
5	5	0.54	0.46	2.72	2.28	2.28	1.92
5	10	0.37	0.63	3.68	6.32	1.32	2.28
5	15	0.28	0.72	4.12	10.88	0.88	2.32
5	25	0.18	0.82	4.53	20.46	0.46	2.08

7.2.2 Interferencia de NOE en experimentos de difusión

A diferencia de los efectos de intercambio químico en los experimentos de difusión, a los cuales se le dio mucha atención en los primeros años de que la técnica empezó a ser utilizada, a las interferencias NOE no se les dio atención hasta años posteriores^{238,239}. El objetivo de esta sección es incidir en una de las ventajas mencionadas en la sección 3.1.5. Se trataría de utilizar alguna secuencia con pulsos bipolares para la determinación de D_z cuando hay presencia de interacciones NOE. En el ejemplo de la mezcla del pAB y la β -CD (ver sección 7.2.1.1) se utilizó la secuencia BPPLED y se obtuvo una caída exponencial simple esperada. Sin embargo, con una secuencia monopolar como la PFGSTE, durante el largo periodo de difusión puede haber interacciones NOE entre las moléculas (cambios de intensidad en las señales) y alterar notablemente los resultados. Por ejemplo, si se considera una mezcla de dos moléculas A y B, durante el gradiente de desfase la molécula A en la posición r_A obtiene una codificación espacial $\phi = \gamma(g_*r_A)$ y una molécula B en la posición r_B obtiene una codificación espacial $\phi = \gamma(g_*r_B)$. Durante el periodo de difusión, Δ , y el periodo LED, T_e , la magnetización se mantiene en el *eje z*. Si no existe NOE entre las moléculas, cada una conservará su propia codificación cuando sea detectada. Sin embargo, este marcate espacial será “corrompido” si existe transferencia de magnetización longitudinal entre las dos moléculas por relajación cruzada durante estos periodos. El resultado es que la molécula A obtiene una codificación espacial de la molécula B y la molécula B obtiene una codificación de la molécula A. Cuando la señal es detectada, habrá intercambio de marcas entre las dos moléculas y aportará una desviación en la caída exponencial esperada.

La interferencia de NOE en los experimentos de difusión se puede dar cuando: a) Hay NOE intermoleculares, b) las especies que interaccionan tienen diferente D , y c) cuando durante el experimento hay intercambio químico. Las consecuencias son muy significativas cuando los NOEs son fuertes, llevando a desviaciones de una caída exponencial simple ya que el NOE depende del tiempo en que la magnetización se encuentre en el *eje z* (tiempo de mezcla en el experimento NOESY). Si la adquisición de los experimentos se realiza con diferentes tiempos de difusión y se obtienen variaciones en la caída de las señales, esto es una señal significativa de perturbaciones por NOE.

²³⁸ Chen, A.; Shapiro, M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 5338-5339.

²³⁹ Dvinskikh, S. V.; Furó, I. *Journal of Magnetic Resonance* **2000**, *146*, 283-289.

Cuando se usan secuencias de pulsos con gradientes monopolares, para minimizar el efecto de las interferencias NOE en los experimentos de difusión, es aconsejable seleccionar señales de las moléculas que no presenten NOE o presenten NOEs muy débiles así como utilizar tiempos de difusión lo más cortos posibles.

7.3 Intercambio Químico

7.3.1 Intercambio químico de protones hidroxilo

El estudio de los protones hidroxilo es una herramienta clave en la investigación de carbohidratos en solución, no sólo para la determinación estructural convencional de moléculas, sino para tener información de importantes propiedades relacionadas a conformación, solvatación y formación de puentes de hidrógeno. Sin embargo, debido al rápido intercambio con el agua, los protones hidroxilo deben ser observados en condiciones muy especiales para poder obtener resonancias visibles y con una forma de línea razonable. Una solución ampliamente utilizada para observarlos consiste en disolver la muestra en DMSO-d₆ puro^{240,241,242,243,244,245,246}, aunque las propiedades en este disolvente pueden ser diferentes si se comparan con soluciones acuosas. Otra alternativa, que ha sido propuesta se basa en disolver la muestra en mezclas de disolventes, como son 85% H₂O - 15% acetona-d₆^{247,248,249,250,251,252,253,254,255,256} o en H₂O-D₂O a temperaturas inferiores a 273 K^{257,258}.

²⁴⁰ Gillet, B.; Nicole, D. J.; Delpuech, J. J. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 65-68.

²⁴¹ Christofides, J. C.; Davies, D. B. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1982**, 560-562.

²⁴² M. Onda, Y. Yamamoto, Y. Inoue, R. Chujo, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1988**, 61, 4015-4021.

²⁴³ S.J. Angyal, J.C. Christofides, *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* **1996**, 1485-1491.

²⁴⁴ Bernet, B.; Vasella, A. *Helvetica Chimica Acta* **2000**, 83, 995-1021.

²⁴⁵ Bernet, B.; Vasella, A. *Helvetica Chimica Acta* **2000**, 83, 2055-2071.

²⁴⁶ Gamini, A.; Toffanin, R.; Murano, E.; Rizzo, R. *Carbohydrate Research* **1997**, 304, 293-302.

²⁴⁷ Poppe, L.; Van Halbeek, H. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, 363-365.

²⁴⁸ L. Poppe, H. van Halbeek, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 1092-1094.

²⁴⁹ H. van Halbeek, L. Poppe, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1992**, 30, S74-S86

²⁵⁰ Adams, B.; Lerner, L. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 4827-4829.

²⁵¹ Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* **1998**, 809-815.

²⁵² Sandström, C.; Magnusson, G.; Nilsson, U.; Kenne, L. *Carbohydrate Research* **1999**, 322, 46-56.

²⁵³ Bekiroglu, S.; Sandström, C.; Norberg, T.; Kenne, L. *Carbohydrate Research* **2000**, 328, 409-418.

²⁵⁴ Ivarsson, I.; Sandström, C.; Sandström, A.; Kenne, L. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* **2000**, 2147-2152.

²⁵⁵ Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* **1998**, 2385-2393.

²⁵⁶ Batta, G.; Kövér, K. E. *Carbohydrate Research* **1999**, 320, 267-272.

²⁵⁷ Johnson, C. S. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, 34, 203-256.

Los parámetros de RMN más valiosos para estudiar a los protones hidroxilo son: desplazamiento químico (δ), constantes de acoplamiento vecinal protón-protón ($^3J(H,OH)$), coeficientes de temperatura ($\Delta\delta / \Delta T$), velocidades de intercambio (k), constantes de acoplamiento protón-carbono de largo alcance ($^nJ(CH)$, $n>1$), efecto del isótopo deuterio en el desplazamiento químico de ^{13}C , y las interacciones NOEs intra- e inter-residuos. Esto es debido a que los protones hidroxilo involucrados en puentes de hidrógeno presentan algunas características generales como son: un efecto de desplazamiento químico a campo bajo, un moderado efecto de desplazamiento a campo alto al subir la temperatura, un moderado velocidad de intercambio con el agua residual, valores característicos de constantes de acoplamiento y NOEs que confirman algún grado de restricción en la rotación promedio de algún enlace. Sin embargo, ninguno de estos métodos es suficientemente sensible para proporcionar pruebas definitivas sobre la existencia de puentes de hidrógeno débiles y, por lo general, es necesario el uso de una combinación de ellos.

La determinación de D puede utilizarse para estudiar la existencia de puentes de hidrógeno débiles, cuando se cumplen dos requisitos fundamentales: 1) que el proceso de intercambio sea entre moléculas con diferente D , y 2) que la especie intercambiable presente señales a desplazamientos químicos diferentes. De esta forma, la atenuación de las señales es una función de los coeficientes de difusión y del tiempo de vida media de la especie intercambiable en cada una de las dos moléculas^{259, 260}

Es importante recordar que cuando se trabaja con sistemas donde se presenta el fenómeno de intercambio es necesario utilizar secuencias con pulsos bipolares ya el pulso de 180° insertado en el centro de los gradientes de desfase/reenfoque elimina las modulaciones introducidas cuando hay intercambio químico (ver sección 3.1.5).

7.3.2 Fundamentos.

En la escala de tiempo de desplazamiento químico, el caso que se puede estudiar es aquel donde el régimen de intercambio es lento. Mientras que en la escala de tiempo de difusión se tienen dos casos:

²⁵⁸ Moonen, C. T. W.; Van Gelderen, P.; Vuister, G. W.; Van Zijl, P. C. M. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1992**, 97, 419-425.

²⁵⁹ Andrec, M.; Prestegard, J. H. *Journal of Biomolecular NMR* **1997**, 9, 136-150.

²⁶⁰ Liu, M.; Toms, H. C.; Hawkes, G. E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *Journal of Biomolecular NMR* **1999**, 13, 25-30.

- ✓ Cuando durante el tiempo de difusión, Δ , el intercambio es rápido, la señal decae con un comportamiento exponencial donde el valor observado del coeficiente de difusión, \mathbf{D}_{obs} , resulta:

$$A_g/A_o = \exp(-B\mathbf{D}_{\text{obs}}) \quad [7-6]$$

donde \mathbf{D}_{obs} es el valor promedio del coeficiente de difusión del agua (\mathbf{D}_w) y del coeficiente de difusión del sacárido (\mathbf{D}_s), ponderado por los tiempos relativos de vida media del protón hidroxilo en el agua (f_w) y en el sacárido (f_s).

- ✓ Cuando durante el tiempo de difusión, Δ , el intercambio es lento, se debe tener en cuenta dos contribuciones, la de la parte intercambiable y la de la no intercambiable. Es este caso, la dependencia que hay entre la intensidad de las señales y la intensidad de los gradientes es una función bi-exponencial:

$$A_g = A_o' \exp\{B(\mathbf{D}_w f_w + \mathbf{D}_s f_s)\} + A_o'' \exp\{B\mathbf{D}_s\} \quad [7-7]$$

donde el primer término corresponde la parte intercambiable y el segundo a la no intercambiable. Al realizar el ajuste de las intensidades de las señales con la fuerza de los gradientes a la ecuación anterior, se pueden obtener los valores de f_w y f_s , a partir de los cuales el tiempo relativo de vida media puede ser calculado.

7.3.3 Ejemplo de intercambio químico en CDs

7.3.3.1 ¿Cómo observar los protones hidroxilo?

En los espectros de las CDs disueltas en D_2O (Fig. 6-4 de la sección 6.3.1) los protones hidroxilos de las CDs no son observados debido al intercambio rápido con el H_2O . Para poder observarlos se requieren condiciones especiales. La forma más simple es disolver la muestra en DMSO- d_6 puro (Fig. 7-9). En estas condiciones los tres protones de las CDs aparecen a su desplazamiento respectivo como señales bien definidas y con clara multiplicidad (tabla 7-5 y tabla 7-6). En estas condiciones, las propiedades son diferentes a las obtenidas en solución acuosa y no se observa intercambio con el H_2O residual del DMSO. En la sección 7.3.3.2, se mostrará que la adición de una pequeña cantidad de agua ácida consigue que se intercambien los protones hidroxilo con el H_2O . Este método permite que, dependiendo de la cantidad de ácido que se añade, se puede modular la velocidad de intercambio. En la sección 7.3.3.5 se mostrará que se pueden observar los protones hidroxilo de las CDs cuando se disuelva la muestra en una mezcla 2:5 de H_2O /acetona- d_6 a 268K.

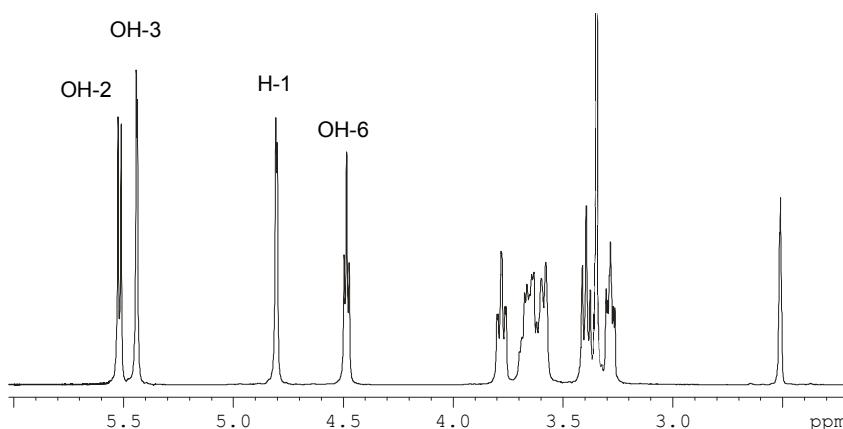


Figura 7-9. Espectro de ^1H (500.13 MHz) a 298K de una solución de 10 mg de α -CD en 0.6 ml DMSO-d₆.

Tabla 7-5 Desplazamiento químico (δ en ppm) del protón anomérico y de los protones hidroxilos de la α -CD en DMSO-d₆ a 298 K

CD	H-1	OH-2	OH-3	OH-6
α	4.80	5.53	5.45	4.50
β	4.84	5.75	5.69	4.48
γ	4.89	5.76	5.78	4.54

Tabla 7-6. Acoplamiento escalar (J en Hz) del protón anomérico y de los hidroxilos de la α -CD en DMSO-d₆ a 298 K

CD	H-1	OH-2	OH-3	OH-6
α	3.35	7.17	2.59	5.65
β	3.51	6.87	2.14	-
γ	3.66	7.17	2.59	4.54

7.3.3.2 Determinación de D de la β -CD disuelta en DMSO-d₆ con 1% de agua ácida

Los valores de **D** experimentales de todos los protones hidroxilo de las CDs son los mismos que el obtenido para los protones no intercambiables cuando se determina en DMSO-d₆ puro, confirmando la ausencia de un proceso de intercambio. Sin embargo, al adicionar una pequeña cantidad de agua ácida (1% volumen) se facilita el proceso de intercambio entre los protones hidroxilo y el agua. En la Fig. 7-10 se muestra el espectro DOSY de la β -CD. La región de interés está entre 4.3 ppm y 5.7 ppm, donde se encuentran los tres protones hidroxilo bien diferenciados además del protón anomérico H-1. En estas condiciones las señales de los protones hidroxilos se ensanchan en el espectro de protón convencional y se revela, en el espectro DOSY, que los tres protones hidroxilo tienen menor **D** que los protones no intercambiables. Además, se observa una clara diferencia de los protones hidroxilo entre sí, ya que OH-2 y OH-3 presentan un valor más similar al del protón H1 que el que presenta OH-6, lo que indica que OH-2 y OH-3 tienen menor libertad para

intercambiarse con el agua que OH-6. Esta menor acidez de los protones OH-2 y OH-3 sugiere la presencia de puentes de hidrógeno entre el OH-3 de una unidad de glucosa con el OH-2 de la glucosa contigua. Esta es la razón de la estructura rígida, especialmente en el caso de la β -CD. Por otra parte, el grupo primario OH-6 no participa en la formación de puentes de hidrógeno y por ello se intercambia más fácilmente con el agua.

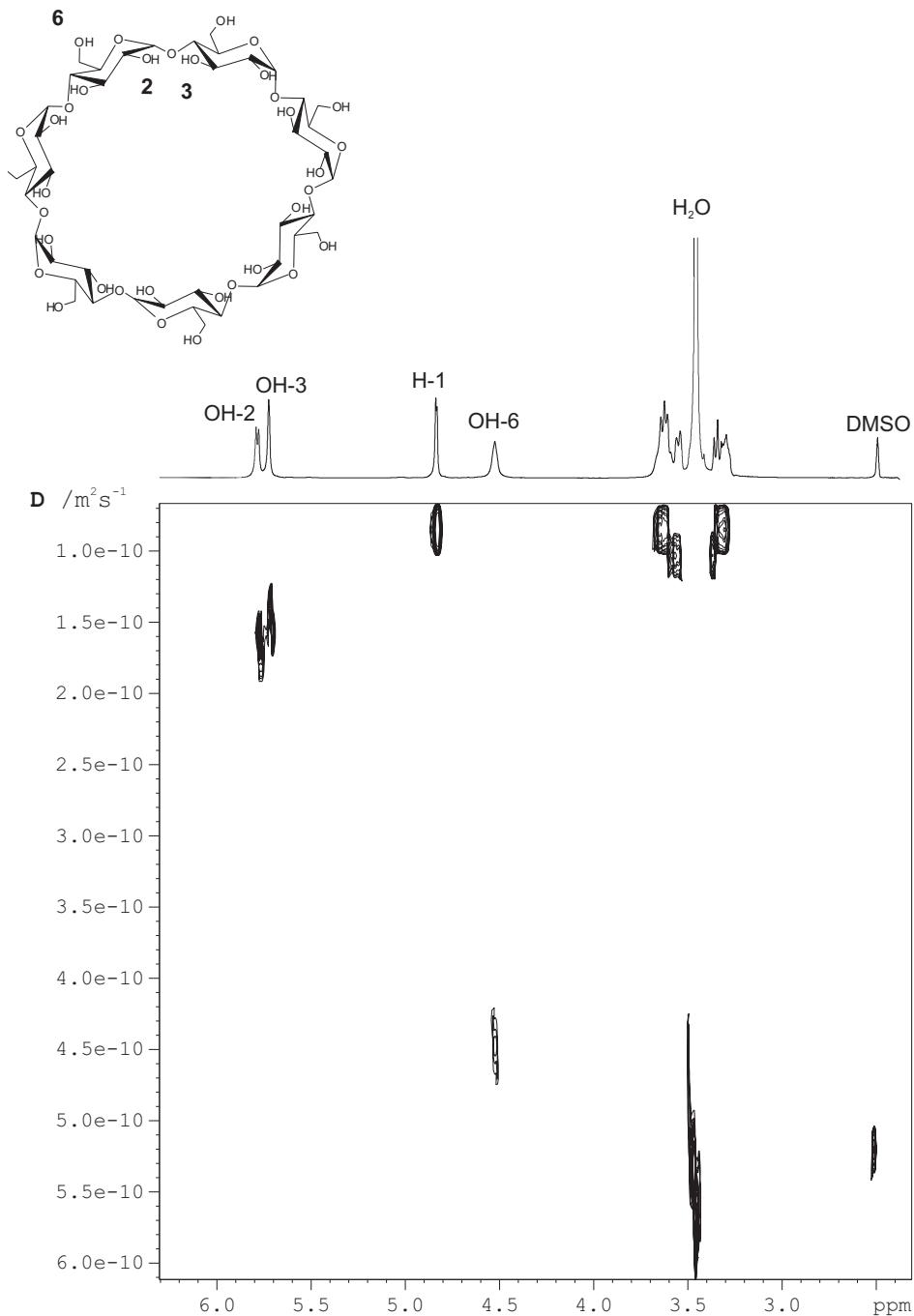


Figura 7-10. Espectros ^1H y 2D- DOSY en un equipo de 500 MHz con la secuencia BPPLIED de la β -CD en DMSO-d_6 con 1% en volumen de agua ácida. Las condiciones experimentales son: 32 espectros ($\text{td}=16\text{K}$, $\text{ds}=8$ y $\text{ns}=16$) con incrementos lineales de intensidad de gradiente entre 2% y 100% de la corriente máxima, 150 ms para el tiempo de difusión, 3 ms para la duración total de los gradientes con forma seno ($\delta/2=1.5$ ms) y 50 ms para Te .

7.3.3.3 Correlación de **D** con las velocidades de intercambio

Para comparar estos resultados, a la misma solución de β -CD en DMSO-d₆ con 1% en volumen de agua ácida, se le midió la velocidad de intercambio con el experimento 2D-EXSY adquirido con diferentes tiempos de mezcla. En el experimento 2D-EXSY la velocidad de intercambio de una especie que se intercambia con el H₂O viene dada por la relación entre el crecimiento de las áreas de los picos cruzados y de la diagonal a tiempo de mezcla cero. El área de los picos cruzados se determina directamente en cada espectro EXSY mientras que el área del pico diagonal a tiempo de mezcla cero se obtiene por extrapolación. La Fig. 7-11 muestra las curvas de crecimiento de los picos cruzados de los tres protones hidroxilo en este experimento.

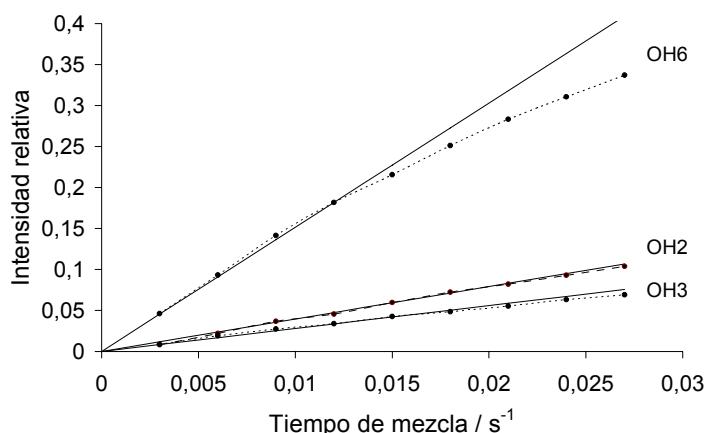


Figura 7-11. Curva de crecimiento de picos de intercambio de la β -CD en DMSO-d₆ con 1% en volumen de agua ácida, utilizando el experimento 2D-EXSY con tiempos de mezcla entre 3 a 27 ms con incrementos de 3 ms (9 puntos).

En la tabla 7-7 se observa una clara correlación entre el valor de **D**, obtenido de ajustar los datos de difusión con una función mono-exponencial, con las velocidades de intercambio obtenidas por el método EXSY, confirmando la aseveración cualitativa de que la determinación experimental de **D** puede usarse como una idea clara de la existencia de intercambio químico. Los valores de **D** de dicha tabla fueron determinados con una función mono-exponencial, y dado que realmente es una función bi-exponencial para los protones hidroxilo, es muy notorio que el error estimado en los protones intercambiables es un orden de magnitud mayor que en el error en el protón no intercambiable H1.

Tabla 7-7. Comparación entre la velocidad de intercambio y el coeficiente de difusión de los protones hidroxilo en la β -CD a 298K. La desviación corresponde al error en la regresión lineal (error típico xy)

Protón	Desplazamiento químico /ppm	Velocidad de intercambio / s ⁻¹	D /10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹
H1	4.84		0.839 \pm 0.004
OH2	5.75	4.023 \pm 0.002	1.462 \pm 0.086
OH3	5.69	2.529 \pm 0.001	1.271 \pm 0.057
OH6	4.48	12.558 \pm 0.011	2.333 \pm 0.048

7.3.3.4 Experiments DOSY-COSY en presencia de intercambio químico

Se realizaron 7 experimentos 2D-DOSY-COSY (Fig. 3-18) sobre la muestra de β -CD en DMSO-d₆ con 1% en volumen de agua ácida, variando el valor de la intensidad de gradiente en cada uno de ellos. Posteriormente, se analizaron los datos correspondientes a las intensidades de los picos cruzados de cada uno de los espectros individuales 2D. La Fig. 7-12 muestra el espectro 2D-DOSY-COSY adquirido con una intensidad de los gradientes de desfase/reenfoque del 5% de la corriente máxima. Por convención, los picos cruzados que están dispersos en todo el plano COSY se definen como (f1/f2) en donde f1 y f2 significan la evolución de protón en el tiempo variable t₁ y en el periodo de adquisición t₂, respectivamente. Así, la intensidad de cualquier pico COSY diagonal, por ejemplo (H1/H1), caerá de la misma forma que la señal del protón correspondiente (H1) en un experimento de difusión 1D convencional. Los picos cruzados mostrarán el mismo comportamiento que su correspondiente espín en la dimensión f1. Esto quiere decir que los picos cruzados entre protones no intercambiables, por ejemplo (H1/H2), darán en todos los casos el mismo valor de **D**, que corresponde al valor de **D** de la molécula. Sin embargo, los picos cruzados de los protones hidroxilo darán información diferente, dependiendo de qué espín evolucione durante el periodo de evolución variable t₁. Por ejemplo, mientras que el pico cruzado (H2/OH2) presenta la misma atenuación que el protón H2, el pico cruzado simétrico (OH2/H2) se comporta igual que el protón hidroxilo OH2. Todo esto se puede observar muy claramente en al Fig. 7-13 donde se manifiestan las caídas de las señales en función de la intensidad de gradiente para los datos extraídos del experimento de difusión 1D y del DOSY-COSY determinados en las mismas condiciones. Se observa claramente como la caída de las señales para el pico cruzado (f1/f2) es igual a la caída de la señal del espín f1 en el experimento 1D.

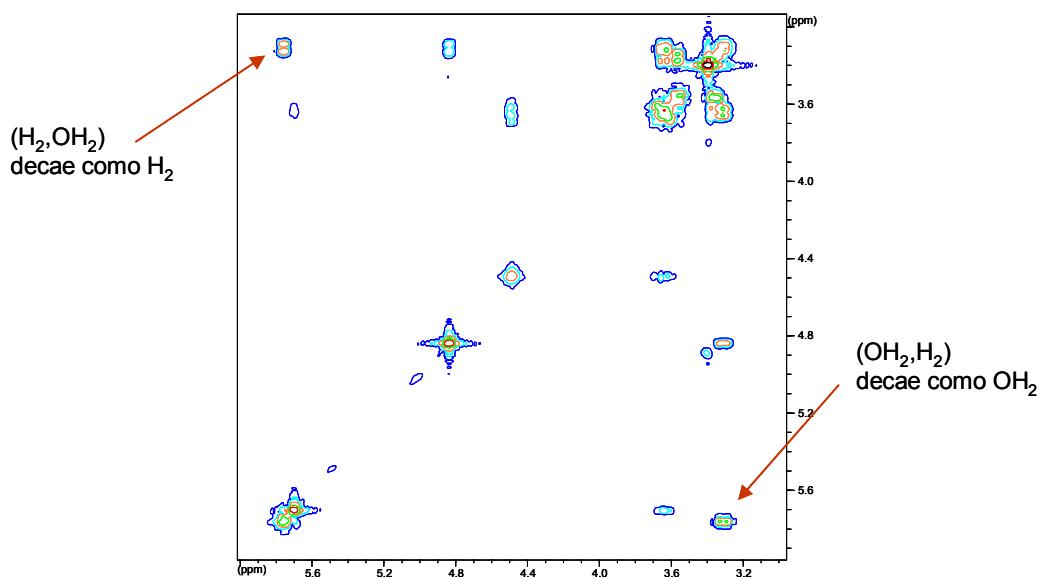


Figura 7-12. Espectro DOSY-COSY de la β -CD en DMSO- d_6 con 1% en volumen de agua ácida. Secuencia BPPLED-COSY (Fig. 3-18). Las condiciones son: Gradienes de desfase/reenfoque del bloque BPLED con forma seno, fuerza de 5% de la corriente máxima y 2 ms de duración total ($\delta/2 = 1$ ms), gradienes del bloque COSY con forma seno, fuerza de 11.03% y 1 ms de duración. Los tiempos Δ y T_e de 150 y 50 ms respectivamente. Número de incrementos 256, NS=8 y $d_1=1$ s. El tiempo total del experimento es aproximadamente 20 min.

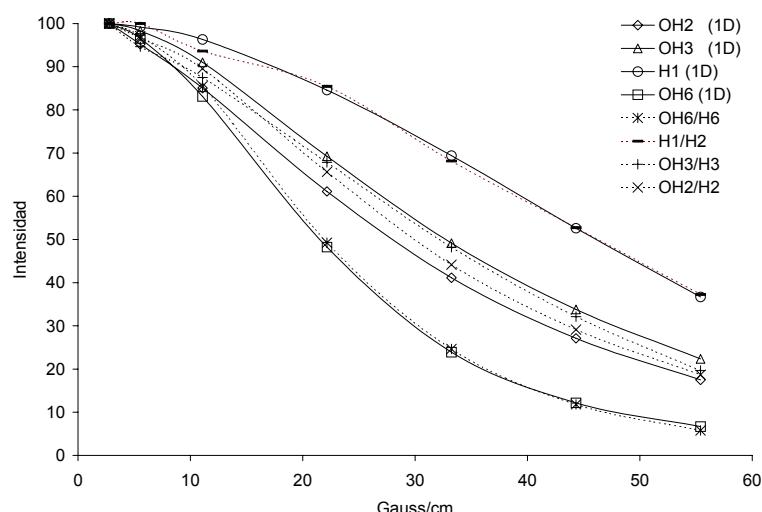


Figura 7-13. Disminución experimental de la intensidad normalizada de las señales de la muestra de β -CD en DMSO- d_6 con 1% en volumen de agua ácida en función de la intensidad de gradiente a 298 K. La secuencia utilizada es la BPPLED (1D) o la BPPLED-COSY (2D). Las condiciones experimentales son: 7 espectros con intensidad de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 % de la corriente máxima, gradienes con forma seno, $\Delta=150$ ms, $T_e=50$ ms, $\delta/2=1$ ms y $T_r=100\mu$ s.

Para evaluar el uso del experimento DOSY-COSY en la determinación de **D**, se determinó el valor de **D** de la señal del protón anomérico H1 y de todos los protones hidroxilo en el experimento 1D, y se compararon con los valores obtenido para el pico cruzado (H1/H2) y de todos los picos cruzados que involucra a los protones hidroxilo en los experimentos DOSY-COSY. Los resultados se muestran en la tabla 7-8, la principal conclusión que se extrae es que el experimento DOSY-COSY da resultados similares a los obtenidos con los experimentos 1D y, por tanto, se demuestra que la técnica puede ser utilizada en sistemas donde el espectro de protón presente algún grado de señales solapadas, tanto si se desea estudiar las señales de protones no intercambiables como de los intercambiables.

Tabla 7-8. Datos de **D** para β -CD a 298K. La desviación corresponde al error en la regresión lineal (error típico xy)

Protón	D $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$	D $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$
H1	0.839 ± 0.004	0.833 ± 0.007
OH2	1.462 ± 0.086	1.370 ± 0.055
OH3	1.271 ± 0.057	1.287 ± 0.061
OH6	2.333 ± 0.048	2.237 ± 0.040
H2-H1		0.826 ± 0.016
H2-OH2		0.829 ± 0.017
H3-OH3		0.814 ± 0.034
H6-OH6		0.788 ± 0.014
OH2-H2		1.422 ± 0.063
OH3-H3		1.348 ± 0.050
OH6-H6		2.448 ± 0.105

Al analizar los valores de las intensidades de las señales, es evidente que la atenuación relativa de cualquier protón intercambiable con respecto a un protón no intercambiable proporciona una forma muy simple y rápida de evaluar cualitativamente en qué grado dichos protones se intercambian. La tabla 7-9 muestra los valores de las intensidades de los protones intercambiables en los espectros con intensidad de gradiente de 33.24 y 44.32 Gauss/cm relativa a la intensidad del protón H1 con fuerza de gradiente de 2.77 Gauss/cm. El resultado indica el grado de intercambio del protón hidroxilo con el agua. Mientras menor es el número significa que el intercambio es mayor. La misma conclusión se obtiene si analizamos los resultados de la tabla 7-10 donde se indican los valores de la atenuación

total de los protones, considerando la intensidad del protón H1 del experimento con $g=2.77$ G cm^{-1} como 100%. Otra forma de exponer los resultados se muestra en la grafica de la intensidad relativa del cociente de los picos cruzados $(f_1/f_2) / (f_2/f_1)$ del espectro DOSY-COSY (Fig. 7-14), donde un valor cercano a uno significa que no hay intercambio y un valor menor de uno significa que si lo hay, y mientras menor es este número significa que el intercambio es mayor.

Tabla 7-9. Atenuación de la intensidad de los protones de la β -CD a 298K en los espectros 1D y 2D-COSY-DOSY con $g=44.32 \text{ G cm}^{-1}$ y 33.24 G cm^{-1} , relativa a la intensidad del protón H1 en el mismo espectro. Ver Fig. 7-13 para detalles experimentales.

	Velocidad de intercambio / s^{-1}	1D $\text{G}=33.24 \text{ G cm}^{-1}$	1D $\text{G}=44.32 \text{ G cm}^{-1}$	DOSY-COSY $\text{G}=33.24 \text{ G cm}^{-1}$	DOSY-COSY $\text{G}=44.32 \text{ G cm}^{-1}$
H1		100	100	100	100
H2/H1				99	100.8
H2/OH2				101.2	103.8
H3/OH3				112.9	104.9
H6/OH6				109	112.6
OH3	2.79	70.8	64.2	69.4	62.2
OH3/H3				70.33	61.5
OH2	3.95	59.2	51.5	69.9	61
OH2/H2				64.4	55.8
OH6	15.15	34.4	23.13	37.3	25.4
OH6/H6				35.9	22.6

Tabla 7-10. Atenuación total de la intensidad de los protones de la β -CD a 298K en los espectros 1D y COSY-DOSY con $g=44.32 \text{ G cm}^{-1}$ y 33.24 G cm^{-1} , considerando la intensidad del protón H1 del espectro obtenido con $g=2.77 \text{ G cm}^{-1}$ como 100%. Ver Fig. 7-13 para detalles experimentales.

	Velocidad de intercambio / s^{-1}	1D $\text{G}=33.24 \text{ G cm}^{-1}$	1D $\text{G}=44.32 \text{ G cm}^{-1}$	DOSY-COSY $\text{G}=33.24 \text{ G cm}^{-1}$	DOSY-COSY $\text{G}=44.32 \text{ G cm}^{-1}$
H1		69.4	52.6	68.5	52.3
H2/H1				68.2	52.7
H2/OH2				69.4	54.3
H3/OH3				77.4	54.8
H6/OH6				75	58.9
OH3	2.79	49.2	33.8	47.5	32.6
OH3/H3				48.2	32.1
OH2	3.95	41.1	27.13	47.9	31.9
OH2/H2				44.8	29.1
OH6	15.15	23.9	12.16	25.6	13.3
OH6/H6				24.6	11.8

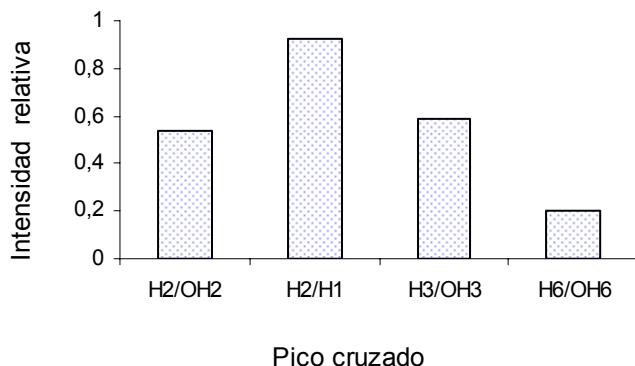


Figura 7-14. Cociente del área del de los picos cruzados (f_1/f_2) / (f_2/f_1) del espectro DOSY-COSY de la β -CD en DMSO-d₆ con 3% en volumen de agua ácida con $g= 44.32$ Gauss/cm (80 % de la corriente máxima) relativa al de $g= 2.77$ Gauss/cm (5 % de la corriente máxima).

7.3.3.5 Medidas de D de α -CD en una solución de agua/acetona

Para probar otros sistemas, se realizaron experimentos de difusión a una solución de α -CD en la mezcla 2:5 de H₂O/acetona-d₆ a 268 K y 293 K. El H₂O utilizada como disolvente previamente fue destilada, desionizada y ultrafiltrada. En este caso, dado que se está utilizando disolvente no deuterado, se utilizaron las secuencias con supresión de disolvente (ver experimento BPPLED-W5 en la sección 3.5.6) para adquirir los espectros.

La Fig. 6-9 muestra los espectros de ¹H de la α -CD a 268K y 293K. En el espectro a 268K se observa que la intensidad del protón anomérico está disminuida debido a su cercanía con la señal del agua que está siendo eliminada. En estas condiciones de disolventes y temperaturas, el hidroxilo primario OH6 aparece como una señal muy ancha debido a que en la escala de tiempo de desplazamiento químico, el intercambio con el agua es muy rápido. Por ello solo se caracterizó el proceso de intercambio en los hidroxilos secundarios OH2 y OH3.

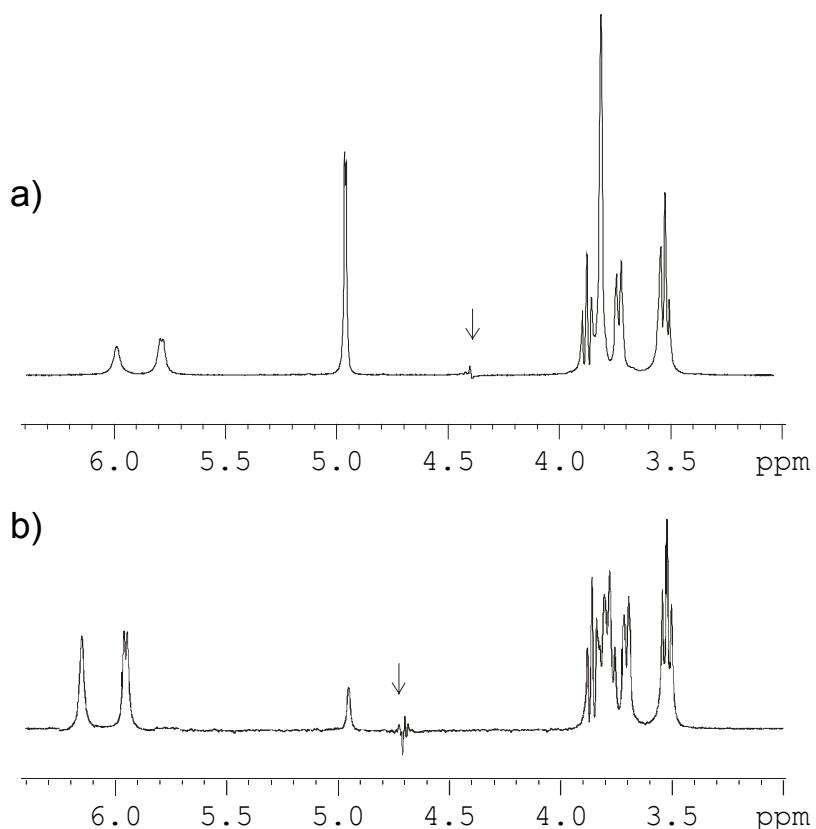


Figura 7-15. Espectros de ^1H de una muestra de α -CD en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ obtenidos con las secuencias PROTÓN-W5 a) 293 K b) 268 K. Las flechas indican la posición donde se aplicó el bloque W5 para eliminar la intensa señal del H_2O .

Se realizaron varios experimentos con diferente tiempo de difusión (50, 150 y 300 ms) y temperatura (293K y 268K). En cada caso se adquirieron 6 espectros ($\text{td}=16\text{K}$, $\text{ds}=8$ y $\text{ns}=16$) con incrementos lineales de la intensidad de los gradientes entre 5 y 100% de la corriente máxima. Se analizaron las intensidades de las señales de los protones H1, OH2, OH3 y del agua para los diferentes periodos de difusión y las diferentes temperaturas. Los valores experimentales de **D** de la α -CD son $1.07 \pm 0.08 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ a 268K y $2.25 \pm 0.15 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ a 293K, que se obtuvieron con la señal del protón no-intercambiable H1 a 293 K y los protones H2-H4 a 269K. Para el caso del agua, asumiendo que el intercambio es directamente con el bullo del agua, el valor de **D** del agua en el interior y en el exterior de la CD es el mismo con un valor de $5.12 \pm 0.12 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ a 268 K y $12.41 \pm 0.21 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ a 293K. Los resultados se muestran en la Fig.7-16. Se puede observar que la caída de la intensidad de los protones hidroxilo es mayor cuando se incrementa tanto el periodo de difusión como la temperatura. En la misma figura se muestra el ajuste de la caída de las señales con la función bi-exponencial de la Ec. 7-7, realizado utilizando el programa de ajuste “Origin”.

Los valores de los tiempos de vida media fraccionales en el agua (f_w) para los protones hidroxilo se muestran en la Fig. 7-17. Se puede observar claramente que la f_w de los protones hidroxilo es mayor cuando se incrementa tanto el periodo de difusión como la temperatura.

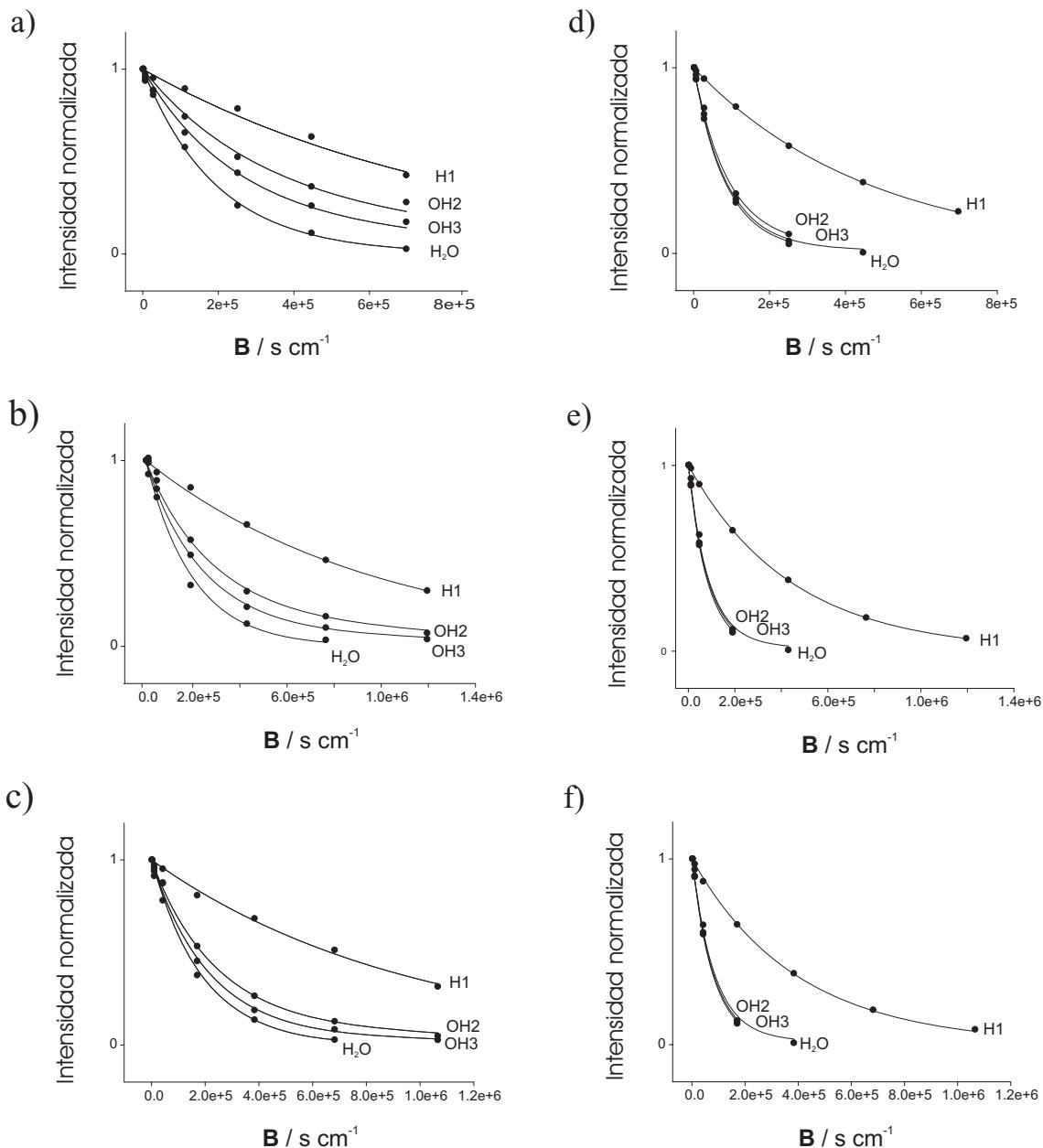


Figura 7-16. Caídas de las intensidades de las señales de los protones H1, OH2 y OH3 de la α -CD (secuencia BPPLED-W5) y del H_2O (secuencia BPPLED) en una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ en función de \mathbf{B} ($\mathbf{B}=\gamma^2\mathbf{g}^2\delta^2$ ($4\Delta-\delta$)). Los experimentos se realizaron con 3 tiempos de difusión diferentes: a) y d) 50ms, b) y e) 150 y c) y f) 300 ms, a dos temperaturas: a), b) y c) 268K y d), e) y f) 293K) y con gradientes con forma seno de 2, 1.5 o 1 ms (para $\Delta=50$, 150 y 300 ms respectivamente). En cada caso se adquirieron 6 espectros ($\text{td}=16\text{K}$, $\text{ds}=8$ y $n_s=16$) con incrementos lineales de la intensidad de los gradientes entre 5 y 100% de la corriente máxima. Las líneas continuas de las gráficas se ajustaron a la ecuación bi-exponencial 7-7 utilizando el programa de ajuste “Origin”.

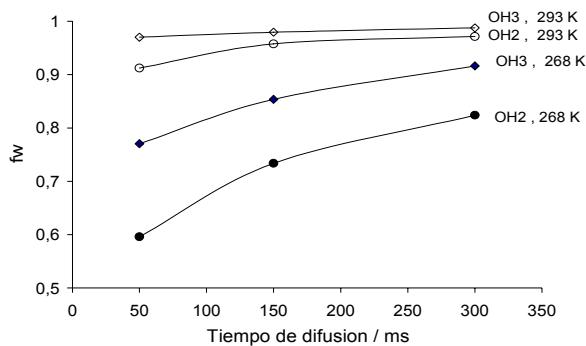


Figura 7-17. Fracción en el agua (f_w) en función del tiempo de difusión (50, 150 y 300 ms) y la temperatura (293 y 268 K) para los protones hidroxilo OH2 y OH3 de la α -CD en una mezcla H_2O /acetona-d₆. Ver detalles experimentales en Fig. 7-16.

Para comparar estos resultados, a la misma solución de α -CD en la mezcla 2:5 de H_2O /acetona-d₆, se le midió la velocidad de intercambio con el experimento 2D-EXSY. Las gráficas se muestran en al Fig. 7-18 y los valores obtenidos son 8.6 s^{-1} para OH3 y 5.5 s^{-1} para OH2 a 268K, y 23.3 s^{-1} para OH3 y 16 s^{-1} para OH2 a 293K. La Fig. 7-19 muestra la gráfica de los tiempos de vida media fraccionales de los hidroxilos en el agua en función de las velocidades de intercambio determinados en las mismas condiciones, encontrando muy buena correlación entre ellos.

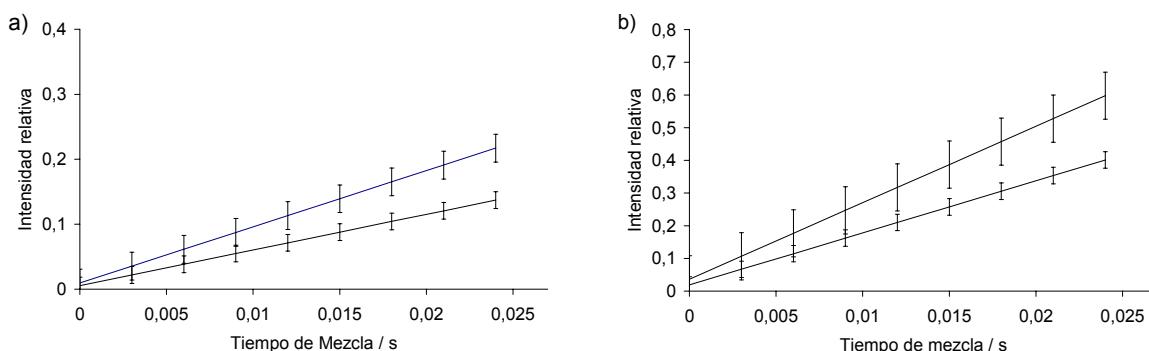


Figura 7-18. Curva de crecimiento de picos de intercambio de la α -CD en la mezcla 2:5 de H_2O /acetona-d₆, adquiriendo el experimento 2D-EXSY con tiempos de mezcla entre 3 a 24 ms (8 incrementos de 3 ms). a) 268 K y b) 293 K. En ambas gráficas la línea superior corresponde a OH3 y la inferior a OH2.

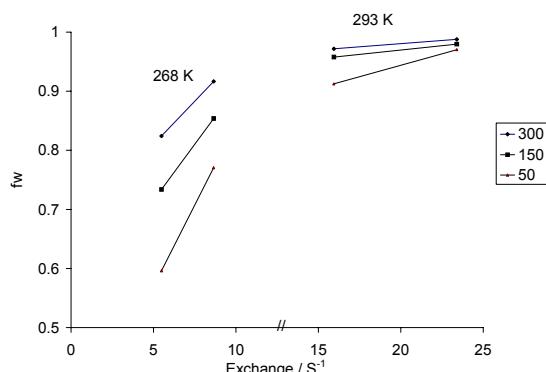


Figura 7-19. Gráfica de la fracción en el agua en función de la velocidad de intercambio para los protones hidroxilo OH2 y OH3 de la α -CD en la mezcla H_2O /acetona-d₆ a dos temperaturas y tres tiempos de mezcla.

A partir de los tiempos de vida media fraccionales (f_w) se pueden estimar los tiempos de vida media del protón en el agua y en la ciclodextrina durante el periodo de difusión, que para el caso de gradientes con forma sinusoidal es: $\Delta - 5\delta/16 - \tau/2$, donde δ es el tiempo de duración del gradiente (2, 1.5 o 1 ms), Δ es el tiempo de difusión (300, 150 o 50 ms) y τ es el tiempo de duración del gradiente más el tiempo de recuperación del mismo (100 μ s). Los resultados de los tiempos de vida media del protón intercambiable en la CD se representan en la Fig. 7-20. Se puede observar que mientras que a 268K los tiempos de vida media de los protones intercambiables de la CD presentan valores entre 10 y 50 ms, a 293 K pasan a valores inferiores a 10 ms en todos los casos, lo que indica que el protón reside prácticamente todo el tiempo en el agua. Esto significa que en la escala de tiempo de difusión se pasa de intercambio intermedio a 268K a intercambio rápido a 293K.

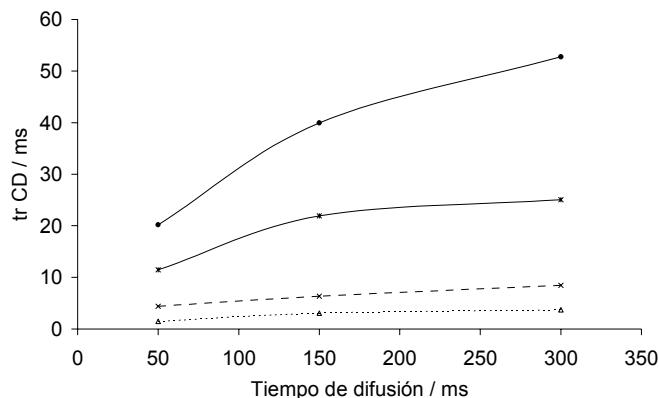


Figura 7-20. Dependencia del tiempo de residencia de los protones hidroxilo OH2 y OH3 de la α -CD en la mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ a dos temperaturas y tres tiempos de mezcla. La línea continua corresponde a los datos a 268K y la discontinua a 293K. En ambos casos la línea superior corresponde a OH2 y la inferior a OH3.

En resumen, las principales conclusiones que se pueden derivar para los protones hidroxilo de la α -CD en la mezcla 2:5 de $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ son:

- En la escala de tiempo de desplazamiento químico, el hidroxilo primario OH6 presenta un intercambio rápido con el agua y no es observable.
- En la escala de difusión, a 268K los protones hidroxilo OH2 y OH3 se encuentran en intercambio intermedio, y a 293K en intercambio rápido.
- El intercambio es mayor al aumentar el tiempo de difusión.

7.3.4 Intercambio químico en la sacarosa

Para estudiar el comportamiento de los protones hidroxilo en una muestra de sacarosa en la mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$, el valor experimental de \mathbf{D} se determinó a 268K. La Fig. 7-21 muestra dos espectros adquiridos con la secuencia BPPLED-W5. La región que se muestra incluye todos los protones hidroxilo y el protón anomérico H1 no intercambiable de la glucosa. La línea continua se adquirió con una intensidad de gradiente de desfase/reenfoque muy baja (2.77 Gauss/cm) mientras que el de la línea discontinua se adquirió con mayor intensidad (33.25 Gauss/cm). Claramente se observa que después de normalizar la intensidad de la señal del protón anomérico H1 de la glucosa en ambos espectros, todos los protones hidroxilo están más atenuados en el espectro adquirido con mayor intensidad de gradientes.

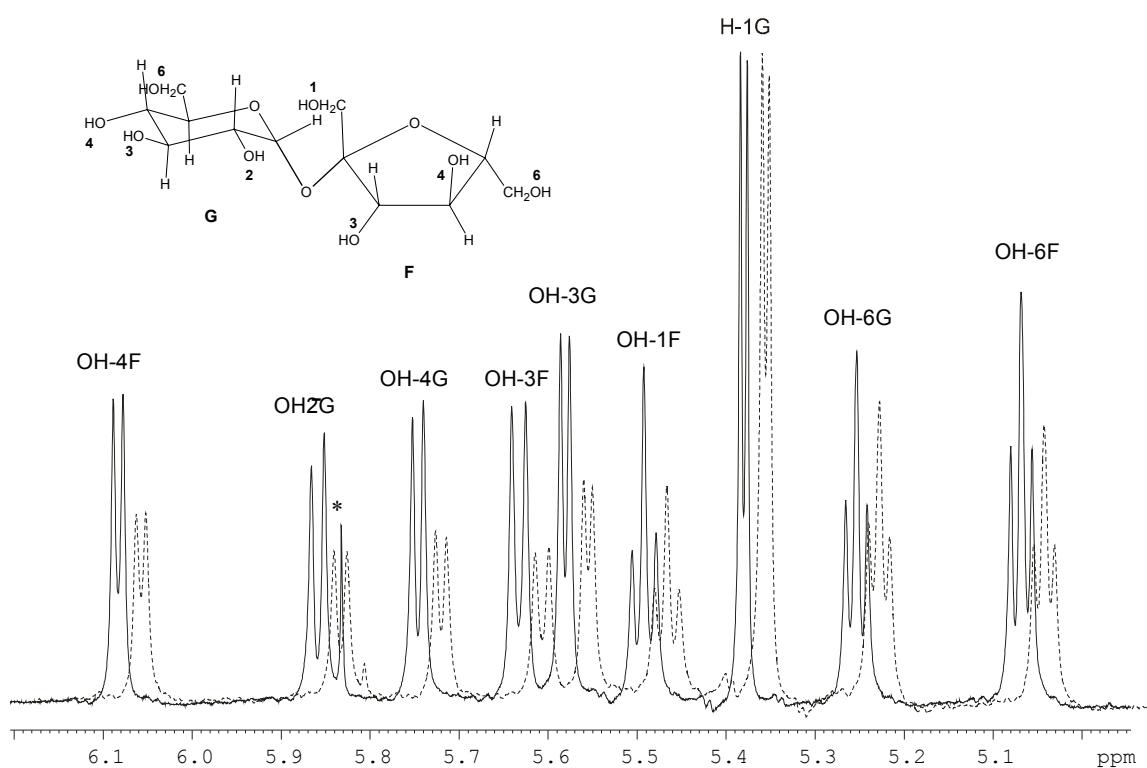


Figura 7-21. Espectros BPPLED-W5 de la sacarosa en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ (1:4) a 268K adquiridos con gradientes de desfase/reenfoque de $G= 2.77 \text{ G cm}^{-1}$ (línea continua) y $G= 33.25 \text{ G cm}^{-1}$ (línea discontinua). Las condiciones experimentales son: $\Delta=150 \text{ ms}$, gradientes con forma seno de 2 ms ($\delta/2 = 1 \text{ ms}$), $\text{Te} = 50 \text{ ms}$ y $ns=16$. Las condiciones en W5 son: $Gw1=34\%$ y $Gw2=22\%.$

En las caídas derivadas de aplicar el experimento de difusión a la muestra de sacarosa (6 experimentos con fuerza de gradiente entre 5% y 100% de la corriente máxima) se observa como todos los protones hidroxilo caen más rápido que el protón anomérico no intercambiable H1 y menos rápido que el H_2O (Fig. 7-22a). Así mismo, se observa

claramente que mientras el protón anomérico presenta una línea recta todos los protones hidroxilo tienen un comportamiento diferente (Fig. 7-22b). Esto revela que mientras que el protón anomérico presenta una caída monoexponencial bien definida que permite obtener un valor **D** con precisión, los protones hidroxilo presentan un comportamiento biexponencial como resultado del proceso de intercambio con el agua.

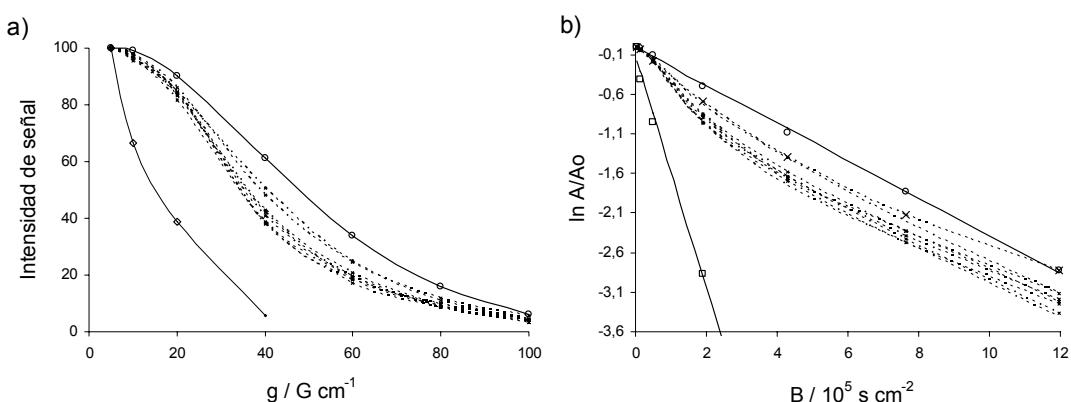


Figura 7-22. a) Curva del decaimiento exponencial, y b) representación $\ln(A/A_0)$ vs B correspondientes al experimento de difusión en una muestra de sacarosa en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ (1:4) a 268K. (Líneas continuas superiores) del protón anomérico $\text{H}1$, (líneas discontinuas) los protones hidroxilo y (líneas continuas inferiores) H_2O .

El valor de **D** de la sacarosa se calculó ajustando la intensidad de las señales del protón anomérico y de los otros protones no intercambiables a una exponencial simple ($8.46 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$). Mientras que el valor de **D** del agua, se calculó por separado en un experimento sin supresión de agua ($2.38 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$). Ajustando la intensidad de las señales de los protones hidroxilos a una función bi-exponencial (Ec. 7-7), con los datos antes mencionados de **D** de la sacarosa y del agua se obtuvieron los valores de los tiempos relativos de vida media fraccional del protón hidroxilo en el agua (f_w) durante el tiempo de difusión que es igual a $\Delta - 5\delta/16 - 1/2$ para gradientes con forma seno (tabla 7-11). Se puede concluir que todos los protones hidroxilo presentan una interacción con las moléculas del disolvente pero no hay una diferencia significativa entre los valores obtenidos debido a que ninguno de los protones hidroxilo está involucrado en fuertes puentes de hidrógeno intermoleculares. Esto está de acuerdo con datos publicados donde tampoco observaron diferencias significativas²⁶¹.

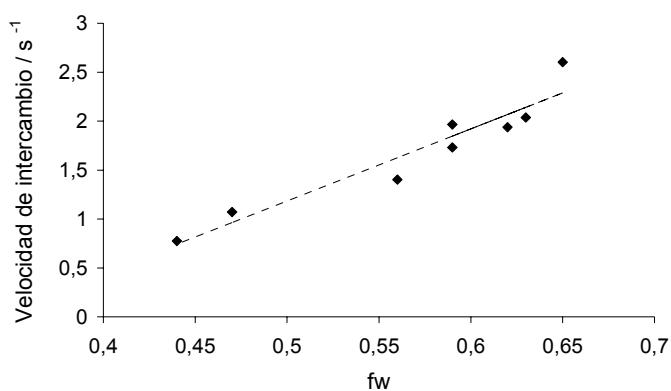
²⁶¹ Adams, B.; Lerner, L. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 4827-4829.

Tabla 7-11. Datos para la sacarosa en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$ (1:4) a 298K.

Proton	fw	Tiempo de vida media en agua /ms	Velocidad de intercambio* /s ⁻¹
OH3F	0.65	97.5	2.45
OH4F	0.62	93	2.06
OH2G	0.63	94.5	2.10
OH3G	0.59	88.5	1.77
OH4G	0.59	88.5	1.99
OH1F	0.56	84	1.42
OH6G	0.47	70.5	1.28
OH6 F	0.44	66	1.08

* Determinado con el experimento EXSY

Las velocidades de intercambio para todos los protones hidroxilo, medidas a partir del experimento 2D-EXSY son todas del mismo orden de magnitud evidenciado la ausencia de puentes de hidrógeno fuertes y persistentes. Existe una clara correlación lineal entre las velocidades de intercambio y f_w (Figura 7-23) confirmando que la determinación experimental de \mathbf{D} puede usarse como una prueba cualitativa de intercambio químico de los diferentes protones intercambiables.

**Figura 7-23.** Gráfica de las velocidades de intercambio de los protones hidroxilo de la sacarosa en función del valor de fw.

De los resultados aquí presentados es evidente que la atenuación relativa de las señales de cualquier protón intercambiable con respecto a un protón no intercambiable proporciona una forma muy simple y rápida de evaluar en qué grado dichos protones se intercambian

con el agua. Por ejemplo, si tomamos los datos de las intensidades de los protones intercambiables de la glucosa en los espectros de difusión con intensidad de gradiente de 44.32 Gauss/cm y de 2.77 Gauss/cm obtenemos un valor que correlaciona directamente con los tiempos relativos de vida media del protón hidroxilo en el agua (Fig. 7-24).

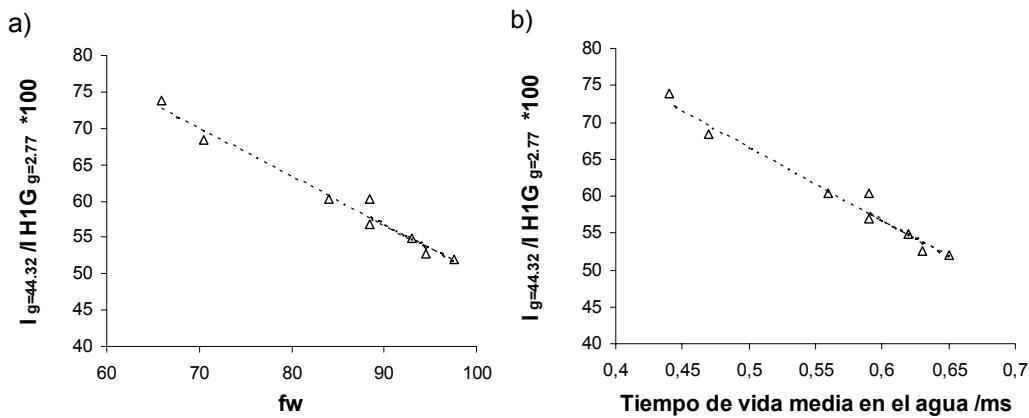


Figura 7-24. Correlación entre la intensidad relativa de los protones intercambiables de la glucosa en los espectros de difusión con intensidad de gradiente de 44.32 G cm⁻¹ respecto al protón anomérico H1 de la glucosa obtenido con G=2.77 G cm⁻¹. a) En función de f_w , b) en función del tiempo de vida media. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 7-21.

7.4 Resumen

Las principales conclusiones que se extraen de los ejemplos mostrados en este capítulo son:

- El valor de **D** permite la determinación de pureza y de la composición de mezclas cuando los componentes presentan movimiento molecular diferente.
- Con los valores experimentales de **D** se puede determinar la formación de complejos y el valor de la constante de asociación “huésped-hospedero”, que junto con el uso de experimentos NOE permite tener mayor información del fenómeno de asociación.
- Se ha demostrado que la medida de **D** es una forma muy poderosa y no invasiva de monitorizar el proceso de intercambio químico en sacáridos disueltos en mezclas DMSO:H₂O y H₂O:Acetona-d₆. Permite obtener información de la velocidad de intercambio de los protones intercambiables, la accesibilidad del disolvente, los tiempos de vida media y la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares.

- El proceso de intercambio puede ser modulado con el cambio de la temperatura y el periodo de difusión.
- Las conclusiones extraídas de los resultados experimentales de **D** en presencia de intercambio químico son consistentes con las de velocidades de intercambio obtenidos con el experimento 2D-EXSY en las mismas condiciones.
- En el caso de solapamiento, los valores experimentales de **D** pueden ser extraídos del análisis de los picos cruzados en experimentos de difusión acoplados a experimentos convencionales 2D como el DOSY-COSY.
- La intensidad del pico cruzado en un espectro DOSY-COSY refleja el valor de **D** del espín que evoluciona durante el tiempo variable t_1 . La intensidad de los picos cruzados se atenúan de manera diferente cuando están involucrados en procesos de intercambio.

8 CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se ha profundizado en el conocimiento y puesta a punto de los experimentos para la determinación del coeficiente de difusión por RMN. Los resultados demuestran que esta técnica, aunque relativamente sencilla de implementar a nivel cualitativo, se requiere un tremendo control sobre diversos factores experimentales para poder obtener resultados con fiabilidad, precisión y exactitud así como un conocimiento real del grado de error cometido en las medidas. En concreto se pueden citar como contribuciones de la tesis:

- Se han analizado y se han implementado toda una serie de experimentos de RMN que permiten determinar el coeficiente de difusión por RMN. Se ha discutido la adaptación de cada experimento según el tipo de investigación a realizar.
- Se ha demostrado que los efectos de convección son un gran inconveniente a considerar siempre en experimentos de difusión. Es muy importante detectar y evaluar la presencia de estos efectos de convección ya que pueden producir errores muy importantes en la medida.
- Se ha propuesto el uso del giro de la muestra con la secuencia BPPLED para eliminar/minimizar los efectos de convección. Se ha comparado con otras opciones y se ha demostrado la necesidad de hacer ciclos completos de rotación alrededor del *eje z* durante el tiempo de difusión.
- Se ha desarrollado un modelo teórico para explicar el efecto de girar el tubo de RMN en los experimentos que usan selección con gradientes. Se ha comprobado de forma experimental utilizando técnicas de imagen.
- Se ha diseñado el experimento DOSY-COSY para analizar de los picos cruzados en experimentos 2D que presentan mayor dispersión que en los experimentos 1D.
- Se ha demostrado el uso de la determinación de **D** para el análisis de mezclas, la determinación de constantes de asociación “huésped-hospedero” y el estudio del proceso de intercambio químico. En este caso concreto se puede obtener información de la velocidad de intercambio, la accesibilidad del disolvente, los tiempos de vida media y la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares.

- Se ha demostrado la utilidad del uso concertado de la determinación de **D** con otras técnicas de RMN como son los experimentos ROESY Y EXSY para obtener un mayor conocimiento estructural y dinámico de las moléculas en solución.