



PROTÓCOLO DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA RMN

INTRODUÇÃO

O preparo correto da amostra para a realização de experimentos de RMN é de suma importância e impacta a qualidade e precisão dos dados obtidos. Alguns processamentos de dados podem até melhorar a apresentação dos espectros e mapas de contornos 2D (MDC) mas nunca mudarão a qualidade dos dados.

1 – OBSERVAÇÕES SOBRE SOLVENTES DEUTERADOS

a - Nem sempre o solvente que melhor dissolve a amostra gera o melhor espectro. Sempre opte pelo solvente que origina a melhor dispersão dos sinais para que a interpretação seja facilitada.

b - Os solventes deuterados são necessários para a estabilização do campo magnético por meio de um circuito que fixa (lock) o mesmo para que não haja perturbações pela sua variação causando perda de sinal e de resolução.

c - Ao adquirir solventes deuterados em grande quantidade (mais barato), transfira pequenas quantidades (10 mL) para frascos de 10 mL para que não se abra o frasco grande frequentemente. A abertura do frasco permite a entrada de água do ambiente causando problemas dependendo do solvente.

d - O ideal é que a amostra seja preparada no interior de uma câmara seca, mas esse equipamento não está disponível na maioria dos laboratórios.

e - O processo de dissolução da amostra deve ser o mais rápido possível para que não haja absorção considerável de água.

♪ – CDCl_3

É um solvente volátil que se hidrolisa na presença de água absorvida do ambiente. CDCl_3 velho pode apresentar quantidades apreciáveis de COCl_2 , HCCl_3 , HCl , DCI (devidas à hidrólise) e H_2O (veja item 1c). Essas substâncias podem alterar de maneiras diferentes a amostra ou mascarar sinais nos espectros e MDC.

♪ – $\text{DMSO}-d_6$, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, CD_3CN , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, $(\text{CD}_3)_2\text{NCOH}$

São solventes polares muito higroscópicos. Devem ser manipulados rapidamente ou em câmara seca. A presença de grandes quantidades de água prejudica vários experimentos de RMN. Isso faz com que talvez seja necessária a pressaturação do sinal dos hidrogênios da água além de influenciar na solubilidade e nos valores de deslocamentos químicos (veja

item 1c). Com exceção da dimetilformamida deuterada, são solventes coordenantes que não devem ser usados, ou usados com cuidados especiais, para dissolver complexos metálicos.

♪ – CD₃OD, D₂O

São solventes muito higroscópicos (veja item 1c) e trocam seus deutérios com os hidrogênios de grupos hidroxila alcoólicos, fenólicos, amínicos e amídicos e da água absorvida, gerando um sinal em 4,8 ppm (HOD). Isso faz com que talvez seja necessária a pressaturação desse hidrogênio. Essa troca impossibilita o posicionamento desses grupos no esqueleto carbônico via o experimento HMBC. Para a execução de experimentos de carbono-13 (C13CPD e DEPT) forçosamente soluções aquosas devem ter padrão de calibração para C-13 (DSS, TMSP-*d*₄, 1,4-dioxano, etc).

2 – OBSERVAÇÕES SOBRE PADRÕES DE CALIBRAÇÃO INTERNA

É altamente recomendável a presença de padrões de calibração interna para a correta determinação dos deslocamentos químicos, propiciando a comparação fidedigna com dados da literatura. Os padrões descritos abaixo são para calibração de deslocamentos químicos de hidrogênio, carbono-13 e silício. Outros núcleos tais como ¹⁹F, ³¹P, ¹⁹⁵Pt, etc têm seus padrões de calibração específicos. (*Harris, R. K.; Becker, E. D.; Cabral de Menezes, S. M.; Goodfellow, R.; Granger, P. (2001). "NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC Recommendations 2001)". Pure Appl. Chem. 73 (11): 1795–1818. doi:10.1351/pac200173111795*)

♪ – TMS (Tetrametilsilano – (CH₃)₄Si)

Pode ser utilizado em todos os solventes exceto em D₂O pois não é solúvel. Calibra hidrogênio, carbono-13 e silício em 0 ppm.

♪ – DSS (Trimetilsililpropanossulfonato de sódio) e TMSP-*d*₄ (ou TSP- *d*₄) - (Deutero-Trimetilsililpropionato de sódio)

São utilizados para soluções aquosas. Calibram hidrogênio, carbono-13 e silício em 0 ppm. Como são sólidos cristalinos e estáveis em solução podem ser utilizados também para quantificação (qNMR) quando sua quantidade em massa, na solução, é conhecida.

3 – OBSERVAÇÕES SOBRE EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS

♪ – ULTRASSOM, VÓRTEX

Auxiliam na solubilização de amostras cristalinas.

♪ – MICROPIPETAS, PIPETAS PASTEUR E TETINHAS

Utilizados para a transferência de solventes e da solução para o tubo de RMN.

♪ – ALGODÃO E MAGNETO DE DISCO RÍGIDO DE COMPUTADOR

Utilizados para a filtração de partículas magnéticas ou não quando da transferência da solução para o tubo.

♪ – TUBO DE RMN E TAMPA

Existem tubos para RMN de diversas qualidades que são dependentes da potência do campo magnético. No caso do espectrômetro instalado no LMCM, os tubos devem ser para 400 MHz. As recomendações abaixo visam a proteção da sonda de RMN. Partículas que possam eventualmente ser introduzidas na sonda através de tubos podem danificar a sonda severamente gerando alto custo para reparo e interrupção da utilização da mesma.

- ♪ - Não secar tubo na estufa pois podem empenar;
- ♪ - Não usar etiquetas. Use caneta apropriada para escrever no vidro;
- ♪ - Não use *parafilm* ou filmes. Somente a tampa;
- ♪ - Não pegue na parte de baixo do tubo. Pode engordurar;
- ♪ - Ao lavar o tubo não o risque na parte de baixo;
- ♪ - Lave o tubo adequadamente e deixe-o secar ao ambiente;
- ♪ - Não use suportes que possam sujar a parte inferior do tubo.

2 – PREPARAÇÃO DE AMOSTRA PARA RMN EM SOLUÇÃO

O processo descrito abaixo garante que os dados obtidos pelos experimentos de RMN são exclusivamente devidos somente aos experimentos podendo ter sua interpretação fidedigna.

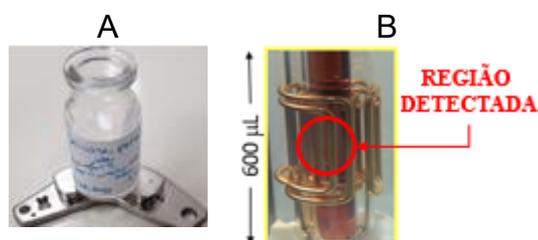
♪ – PESAGEM DA AMOSTRA

A amostra deve ser rigorosamente pesada para que se possa programar o tempo de duração de cada experimento. O receptor do espectrômetro reconhece a concentração (extremamente alta, alta, média, baixa, extremamente baixa) dos hidrogênios do analito em solução através do sinal de RMN produzido por eles. O parâmetro que identifica essas concentrações é o **rg** (*receiver gain* = ganho do receptor). Um valor alto de **rg** significa que o receptor está amplificando demais o sinal identificando que a solução tem baixa concentração de hidrogênios do analito. O contrário é válido. O valor alto limite de **rg** nos novos espectrômetros é 203. Quando se obtém esse valor de **rg** não se pode afirmar se a solução está com concentração baixa ou extremamente baixa. Esse valor de **rg** significa que tempos de duração longos ou extremamente longos deverão ser utilizados para os experimentos de carbono-13 e 2D's ou até a inviabilização desses experimentos. Valores de **rg** abaixo de 10 significam que a amostra tem uma concentração muito alta. Essa situação facilita a obtenção de espectros de C-13, mas pode diminuir demasiadamente a resolução do espectro de hidrogênio. Portanto, é imperativo que o usuário aprenda qual é a melhor concentração de sua amostra para que não haja subutilização do espectrômetro. Uma "regra de bolso" aproximada é que se a massa molar da substância é 300 g/mol, pese aproximadamente 15 mg da amostra e registre o valor de **rg**. Como exemplo, com uma solução de kavaina de **rg 35**, pode-se fazer experimentos de hidrogênio, C13CPD, DEPT135, COSY, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY em 60 minutos!

♪- PREPARO DA SOLUÇÃO

♪ - ANÁLISES SEM QUANTIFICAÇÃO

A amostra pesada em um frasco adequado (eppendorf, vidro de penicilina, etc) é dissolvida em 600 μL do solvente deuterado adequado com ou sem utilização de ultrassom, vórtex e/ou aquecimento. O volume de solução deve ser $\sim 600 \mu\text{L}$ (Figura B abaixo) para que a homogeneidade do campo magnético seja ajustada corretamente. Volumes excessivos de solução ($\gg 600 \mu\text{L}$) devem ser evitados pois além de se gastar mais solvente, diluem a solução e prejudicam a resolução devido à difusão molecular que alarga as linhas de ressonância. Após a dissolução, o frasco deve ser colocado sobre o magneto de HD (Figura A abaixo) para reter partículas magnéticas dentro do frasco, sendo a solução captada sob filtração (algodão com pipeta Pasteur ou micropipeta) e transferida para o tubo de RMN. Após tampar ou selar o tubo, codifique a amostra escrevendo no tubo com caneta apropriada. Coloque o tubo em um suporte (erlenmeyer, becker, etc forrados com toalha de papel para amortecimento)[[veja o filme](#)] e leve-o para o LMCM.



A: frasco sobre o magneto de HD; B: posicionamento do tubo dentro da sonda evidenciando a centralização da solução nas bobinas de Helmholtz.

♪ - ANÁLISES COM QUANTIFICAÇÃO

A única diferença do modo anterior (sem quantificação) é que o volume final da solução deve ser **exato** (600 μL) e não $\sim 600 \mu\text{L}$. Para isso, previamente, pipete 600 μL exatos do solvente deuterado a ser usado e coloque no tubo de RMN. Com uma caneta de ponta fina, marque a altura do menisco do solvente (Figura ao lado). Esgote esse solvente para um eppendorf. Usando esse mesmo solvente do eppendorf, pipete 300 μL , dissolva a amostra e transfira a solução para o tubo de RMN, do mesmo modo anterior (com algodão e magneto de HD). Coloque 100 μL do solvente no frasco para lavar o algodão e transfira novamente para o tubo de RMN. Repita o processo com mais 100 μL . Complete o volume (600 μL) até o menisco, cuidadosamente com o solvente deuterado. ([Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. Institute of Pharmacy and Food Chemistry, University of Würzburg, Am Hubland, 97074 Würzburg, German. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 57 \(2010\) 229–240.](#))



No caso da utilização de um padrão interno para a quantificação (e.g. DSS, TMSP- d_4 , carbonato de etileno, formiato de cálcio, etc), esse padrão (veja documento abaixo) já deverá estar pesado rigorosamente, juntamente com a amostra. (*QUANTITATIVE NMR Technical Details and TraceCERT® Certified Reference Material*) (copie esse texto e cole no Google para obter o documento). A técnica ERETIC 2 também pode ser utilizada para quantificação sem padrão interno (*TopSpin ERETIC 2 Electronic to Access In-Vivo Concentration User Manual*) (copie esse texto e cole no Google para obter o documento). A quantificação pode ser feita utilizando as duas metodologias concomitantemente. Experimentos que visam a quantificação de analitos devem seguir critérios muito precisos para a devida confiabilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo descrito é genérico se aplicando à grande maioria das amostras que são examinadas por RMN em solução. Para casos particulares, procure a equipe do LMCM para sugestões específicas e lembre-se: a qualidade de seus experimentos depende da qualidade de sua amostra. Caso você tenha a solução para um problema específico, queira por gentileza, informá-la ao LMCM para que se possa incluí-la nesse protocolo. Finalmente, a programação precisa do tempo de utilização do espectrômetro de RMN é de extrema importância pois, pela sua natureza multiusuária, o LMCM em um futuro próximo, passará a cobrar pelos serviços.

Professor Dr. José Dias de Souza Filho

Professor Voluntário do PPG CiPharma – EFAR/UFOP

Membro do Comitê Gestor do LMCM/PPG CiPharma/UFOP

Membro do Corpo Técnico do LIPq – LAREMAR/UFMG