

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – FERRAMENTA VERSÁTIL EM QUÍMICA FARMACÊUTICA E IMAGIOLOGIA MÉDICA

KONSTATIN LUZYANIN E MARTA ABRANTES*

A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica analítica versátil que pode ser utilizada desde a análise de compostos químicos simples à elucidação estrutural e investigação da dinâmica de proteínas e imagiologia de órgãos de seres vivos de um modo não invasivo e não destrutivo. O presente artigo pretende fornecer aos leitores uma breve introdução teórica sobre esta técnica e apresentar algumas aplicações da mesma nas áreas da Química Farmacêutica e Imagiologia Médica.

O QUE É A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR?

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica que permite obter informação estrutural e dinâmica sobre a matéria, e que se baseia na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos (Figura 1) [1–3].



Figura 1 – Espectrómetro de RMN (500 MHz) no Instituto Superior Técnico (IST/UTL) pertencente à Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (PTNMR). Para mais informações sobre a rede – consultar o site http://cqe.ist.utl.pt/networks/nmr/index_nmr.php

Foi descoberta em 1945 por Bloch e Purcell (Prémios Nobel da Física em 1952) na sequência dos trabalhos de Isidor I. Rabi (Prémio Nobel da Física em 1944). Ao longo do tempo, muitos outros investigadores contribuíram de forma decisiva para o desenvolvimento e para a aplicação desta técnica,

como se pode constatar pela lista de investigadores que foram laureados com o Prémio Nobel por contribuições para a RMN (Tabela 1)[4].

Apesar de existirem núcleos que não exibem qualquer campo magnético (por exemplo, o ^{12}C), a maior parte dos núcleos comportam-se como

Tabela 1 – Prémios Nobel relacionados com a Ressonância Magnética Nuclear

1943	Otto Stern, EUA	Prémio Nobel da Física "pelas suas contribuições na descoberta do momento magnético do prótio."
1944	Isidor I. Rabi, EUA	Prémio Nobel da Física "pelo seu método de ressonância para registar as propriedades magnéticas de núcleos atómicos."
1952	Felix Bloch, EUA Edward M. Purcell, EUA	Prémio Nobel da Física "pela descoberta de novos métodos para medições magnéticas nucleares precisas e pelas respectivas descobertas associadas."
1991	Richard R. Ernst, Suíça	Prémio Nobel da Química "pelas suas contribuições para o desenvolvimento da metodologia da espectroscopia de RMN de alta resolução."
2002	Kurt Wüthrich, Suíça	Prémio Nobel da Química "pelos seus desenvolvimentos da espectroscopia de RMN para a determinação tridimensional da estrutura de macromoléculas biológicas em solução."
2003	Paul C. Lauterbur, EUA Peter Mansfield, UK	Prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina "pelas descobertas relativas a imagiologia de ressonância magnética."

A RMN explora as propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos. Os núcleos dos átomos podem ser vistos como pequenos piões com carga que rodopiam em torno do seu eixo, gerando o seu próprio pequeno campo magnético (Figura 2).

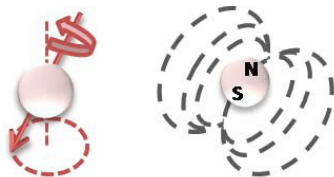


Figura 2 – Representação de um núcleo a rodopiar como um pião (à esquerda), que se comporta como um ímã tendo um pólo sul e um pólo norte (à direita)

pequenos ímãs (por exemplo, o ^1H ou o ^{13}C).

Normalmente, estes núcleos estão dispostos de forma aleatória (Figura 3).

No entanto, quando colocados sob a influência de um forte campo magnético externo, são obrigados a alinhar-se em orientações específicas.

Estas orientações alinhadas com o campo magnético caracterizam-se por terem diferentes níveis energéticos.

* Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa
Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa, Portugal
E-mail: marta.abrantes@ist.utl.pt

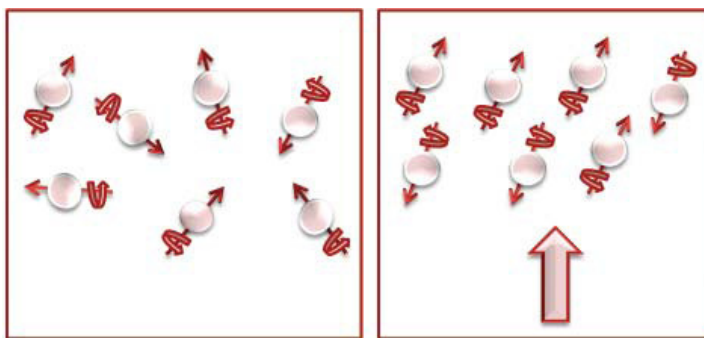


Figura 3 – Os núcleos estão normalmente dispostos de forma aleatória (à esquerda). Quando sujeitos a um intenso campo magnético (aqui representado pela seta a cheio), são obrigados a alinhar-se em orientações específicas que podem ser paralelas ou anti-paralelas ao campo magnético aplicado. Estas orientações são determinadas pelo estado energético do núcleo

Quando expostos a uma radiação electromagnética na frequência rádio, os núcleos recebem energia e são obrigados a “saltar” para uma outra orientação (de nível energético superior) (Figura 4). Ao retomarem a sua orientação original os núcleos libertam energia, emitindo uma radiação característica. Este fenómeno designa-se por ressonância magnética nuclear e dá o nome a esta técnica de caracterização. Diz-se também que a RMN é uma técnica espectroscópica, uma vez que faz uso de radiação electromagnética (neste caso na frequência rádio).

Com base neste fenómeno, numa experiência de RMN sujeita-se uma amostra a um intenso campo magnético (Figura 5). Seguidamente, expõe-se a amostra a um varrimento de radiação electromagnética na frequência rádio. No momento em que a frequência do aparelho corresponde exactamente à frequência de ressonância característica do núcleo (que se designa por frequência de Larmor), os núcleos mudam para outra orientação. Desligando a fonte de radiação electromagnética, os núcleos retomam a sua orientação original emitindo uma radiação que origina

um sinal eléctrico. Após tratamento matemático (transformação de Fourier - FT) é possível traçar um gráfico da intensidade do sinal em função da frequência aplicada a que chamamos espectro de RMN.

As frequências de ressonância dos núcleos dependem, não só da natureza do núcleo em estudo, mas também do ambiente químico, aparecendo em sítios diferentes do espectro de RMN.

As frequências de ressonância são expressas numa unidade que se designa por desvio químico (e é expressa em ppm). Este desvio químico indica a localização de um sinal de RMN em relação a um padrão, que por convenção tem um desvio químico igual a 0 ppm.

Assim sendo, a RMN permite determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto, sendo desta forma uma técnica valiosa para a obtenção de informação sobre a estrutura de moléculas. Nas figuras 6 e 7 são apresentados, a título de exemplo, espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do etanol.

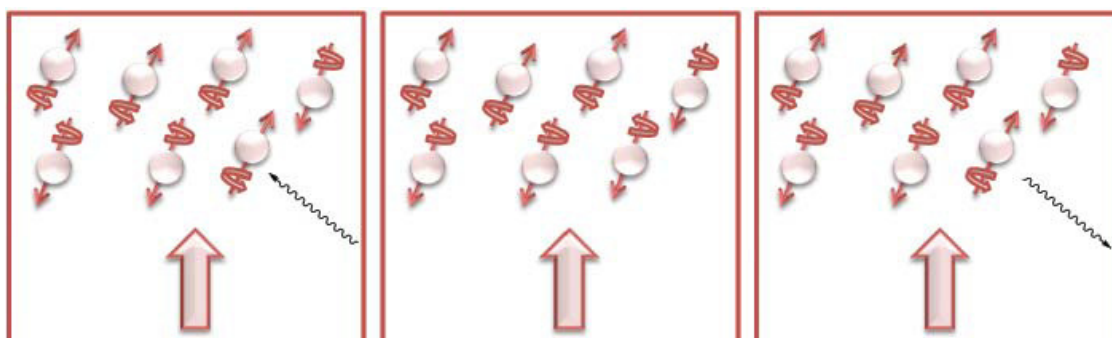


Figura 4 – O fenómeno da ressonância magnética nuclear. Quando núcleos expostos a um campo magnético intenso (seta a cheio) são também expostos a radiação electromagnética na frequência rádio (seta ondulada) (à esquerda), os núcleos “saltam” para outra orientação (ao centro). Ao retomarem a sua orientação original emitem uma radiação característica

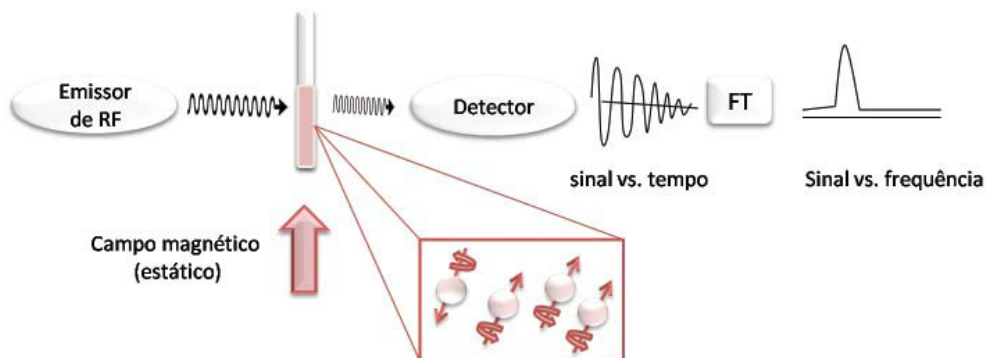


Figura 5 – A amostra a analisar é colocada no interior do aparelho dentro de um tubo e diluída com solvente deuterado (a utilização de um solvente deuterado permite minimizar os sinais que provêm deste mesmo solvente). A amostra contém núcleos activos, dispostos de forma aleatória. Após aplicação de um campo magnético (estático), os núcleos alinham-se na direcção do campo magnético. Um emissor de radiações electromagnéticas na frequência rádio emite uma sequência de ondas com diferentes frequências. Quando a frequência de ressonância do núcleo (também designada por frequência de Larmor) é atingida, os núcleos “saltam” para outra orientação. Ao retomarem a sua orientação original emitem uma radiação que é detectada originando um sinal eléctrico (designado por sinal FID). O tratamento matemático deste sinal, aplicando a transformada de Fourier (FT), origina um espectro de sinal em função da frequência aplicada com os sinais correspondentes aos núcleos em estudo, que se designa por espectro de RMN

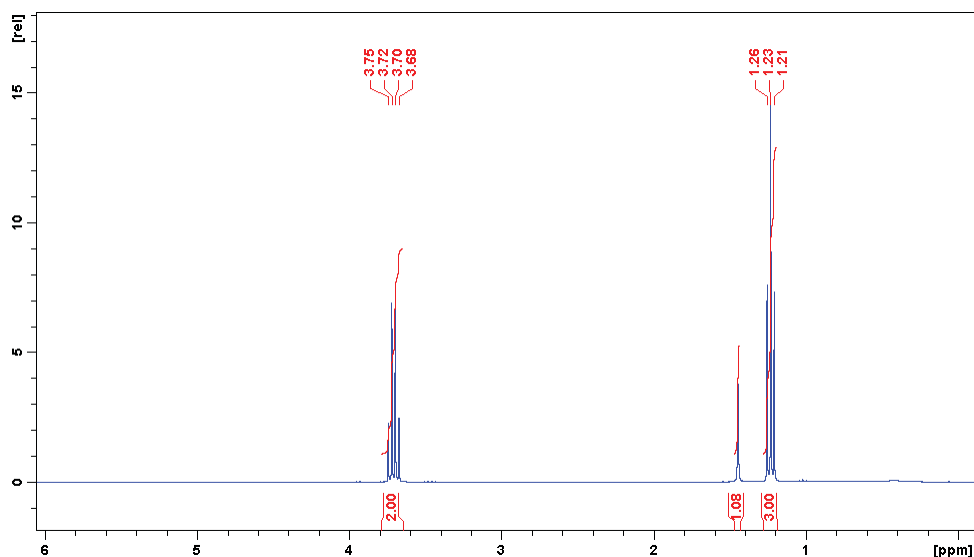


Figura 6 – Espectro de RMN de ^1H de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (diluído em clorofórmio deuterado) que permite detectar os núcleos de ^1H . São visíveis três sinais. Dois destes sinais (um quadruplete a cerca de 3.7 ppm e um triplete a 1.3 ppm) correspondem a grupos protões que têm um mesmo ambiente químico (protões dos grupos CH_2 e CH_3). O sinal a 1.6 ppm corresponde aos protões da água presente no clorofórmio deuterado. O protão do grupo OH do etanol não é visível porque está sujeito a uma troca com os protões da água. O sinal relativo ao solvente deuterado aparece fora da escala apresentada

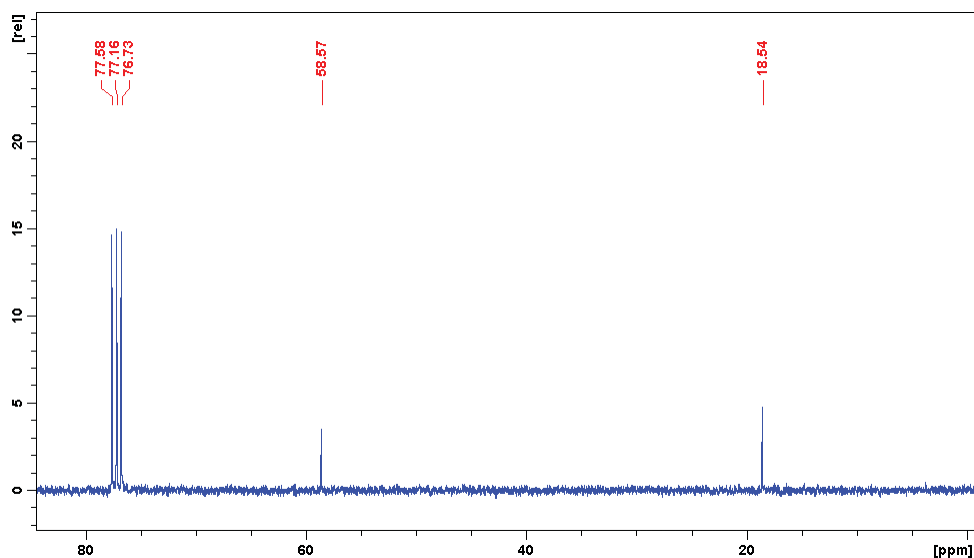


Figura 7 – Espectro de RMN de ^{13}C de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (diluído em clorofórmio deuterado) que permite detectar os núcleos de ^{13}C . São visíveis três conjuntos de sinais. Dois destes (a cerca de 18.5 e 58.6 ppm) correspondem aos dois carbonos presentes no etanol. O conjunto de sinais a 77 ppm provém do solvente deuterado

PARA QUE SE USA A RMN?

A espectroscopia de RMN é hoje usada de forma generalizada por todos os que se dedicam a estudar directa ou indirectamente compostos ou fenómenos químicos. A espectroscopia de RMN é uma técnica analítica sofisticada e poderosa que tem aplicações em diferentes áreas. A diversidade de aplicações só foi possível devido ao contínuo desenvolvimento de diferentes técnicas que se baseiam no fenómeno de RMN. Este desenvolvimento permitiu que ao longo dos tempos cada técnica fosse optimizada de acordo com as necessidades da

respectiva aplicação. A RMN pode ser utilizada tanto para a análise qualitativa como quantitativa e as suas aplicações vão desde a análise de compostos químicos simples a seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo.

Os campos mais comuns de aplicação da RMN incluem:

- 1) Análise estrutural aplicada à química e à biologia;
- 2) Imagiologia médica: tomografia de ressonância magnética nuclear ou imagiologia de ressonância magnética nuclear (maior área de aplicação);

- 3) Prospecção geofísica (por exemplo, de petróleo): geotomografia de ressonância magnética nuclear.

O presente artigo vai focar-se sobre as duas primeiras aplicações.

ANÁLISE ESTRUTURAL APLICADA À QUÍMICA E À BIOLOGIA

A utilização da espectroscopia de RMN está muito associada à determinação da estrutura molecular em solução mas os estudos efectuados em estado sólido são também frequentes. A RMN pode ser aplicada não só na elucidação estrutural de pequenas e

médias moléculas, como também no estudo de macromoléculas, como proteínas ou ácidos nucleicos. Para além de ser muito útil na elucidação da estrutura molecular, a RMN pode ser também usada para estudar processos dinâmicos de moléculas e para estudar interações/reacções entre moléculas.

As experiências mais comuns de espectroscopia de RMN baseiam-se na observação directa de núcleos de ^1H em solução. As características favoráveis deste núcleo (elevada abundância natural, elevada razão giromagnética) possibilitam medições de alta sensibilidade e baixo tempo de aquisição para este núcleo e são responsáveis pelo vasto número de aplicações desta técnica que vai desde compostos muito simples com baixo peso molecular até proteínas.

Por exemplo, no espectro de ^1H do etanol (Figura 6) são obtidos três sinais com 3 desvios químicos diferentes: um para o grupo CH_3 , o outro para o grupo CH_2 e um último para o grupo OH . Um grupo CH_3 tem tipicamente um desvio químico por volta de 1 ppm, um grupo CH_2 ligado a um grupo OH tem um desvio químico por volta de 4 ppm e um grupo OH tem um desvio químico entre os 2 e os 3 ppm dependendo do solvente utilizado na experiência. O formato do sinal e a sua área dão mais informação sobre a estrutura química. A área do sinal está relacionada com o número de prótons relativos a um sinal. No exemplo em questão, o sinal do grupo CH_2 tem uma área de integração que equivale a 2/3 do tamanho do sinal do grupo CH_3 . O formato dos sinais (singuletos, dupletos, tripletos, etc.) está essencialmente relacionado com a vizinhança de núcleos do mesmo tipo.

O mesmo tipo de raciocínio pode ser aplicado para os outros tipos de núcleos que são frequentemente estudados por RMN, tais como, por exemplo, ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F , ^{195}Pt . No entanto, é importante mencionar que a relação entre a área de um sinal e o número de núcleos a que corresponde só é possível para espectros de RMN de ^1H .

Uma aplicação interessante da espectroscopia de RMN consiste em

estabelecer a pureza isomérica de espécies farmacologicamente activas. Por exemplo, a *cisplatina*, fármaco antitumoral (Figura 8A), é um complexo metálico que contém platina como centro metálico. Um dos principais problemas associados à aplicação biológica destes complexos metálicos está associado ao facto de estes complexos poderem existir sob forma de vários isómeros, por exemplo, *cis-* e *transplatina* (Figura 8A e B, respectivamente).

A presença do isómero *trans* (*transplatina*) e/ou de outros complexos de Pt origina picos com diferentes desvios químicos, podendo desta forma ser claramente distinguidos da *cisplatina*. As técnicas de RMN que mencionámos até agora são técnicas unidimensionais (1D). Estas técnicas revelam informação sobre o tipo e proporção de núcleos sob observação, mas nem sempre dão informação sobre a forma como os núcleos estão ligados uns aos outros, ou seja nem sempre pro-

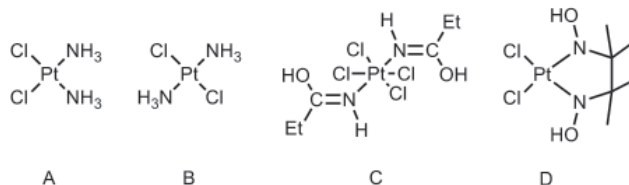


Figura 8 – Complexos de platina caracterizados por RMN de ^{195}Pt

Para aplicações farmacológicas os compostos devem ser utilizados em formas isomericamente puras já que diferentes isómeros podem ter efeitos terapêuticos/tóxicos muito diversos. Por essa razão, existe a necessidade de utilizar métodos simples e fidedignos para confirmar a pureza destes compostos. No caso das espécies baseadas em platina pode ser utilizada a espectroscopia de RMN de ^{195}Pt . O desvio químico da ^{195}Pt é sensível à natureza dos átomos doadores ligados à platina e ao isomerismo geométrico. Os desvios químicos da RMN de ^{195}Pt surgem numa larga escala de 12000 ppm (Tabela 2), o que permite uma distinção clara entre sinais sem sobreposição dos mesmos.

videnciam informação suficiente sobre as ligações intramoleculares. Esta informação pode ser obtida usando a técnicas de espectroscopia de RMN multidimensional, tais como, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC. Na Figura 9 exemplifica-se uma destas técnicas aplicada à identificação da molécula ciclosporina (representada na Figura 10).

A espectroscopia de RMN tem vindo a enfatizar a aplicação em sistemas biomoleculares e tem um papel muito importante na biologia estrutural. Com os desenvolvimentos, tanto na metodologia, como na instrumentação nas últimas duas décadas, a RMN tornou-se numa das mais poderosas técni-

Tabela 2 – Desvio químico de ^{195}Pt RMN dos compostos seleccionados

Composto	Desvio químico, ppm	Referência
Na_2PtCl_6	0	[5]
<i>cis</i> - $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ (<i>cisplatina</i>) (A)	-2149	[6]
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (<i>transplatina</i>) (B)	-2145	[6]
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_4(\text{NH}=\text{C}(\text{OH})\text{Et})_2]$ (C)	36	[7]
$[\text{PtCl}_2\{\text{HOHNCMe}_2\text{CMe}_2\text{NHOH}\}]$ (D)	-2492	[8]

O espectro de RMN de ^{195}Pt da *cisplatina* isomericamente pura origina um sinal a -2149 ppm relativamente a Na_2PtCl_6 (que é usado como padrão).

cas espectroscópicas para a análise de biomacromoléculas, permitindo a caracterização de biomacromoléculas e seus complexos até 100 kDa.

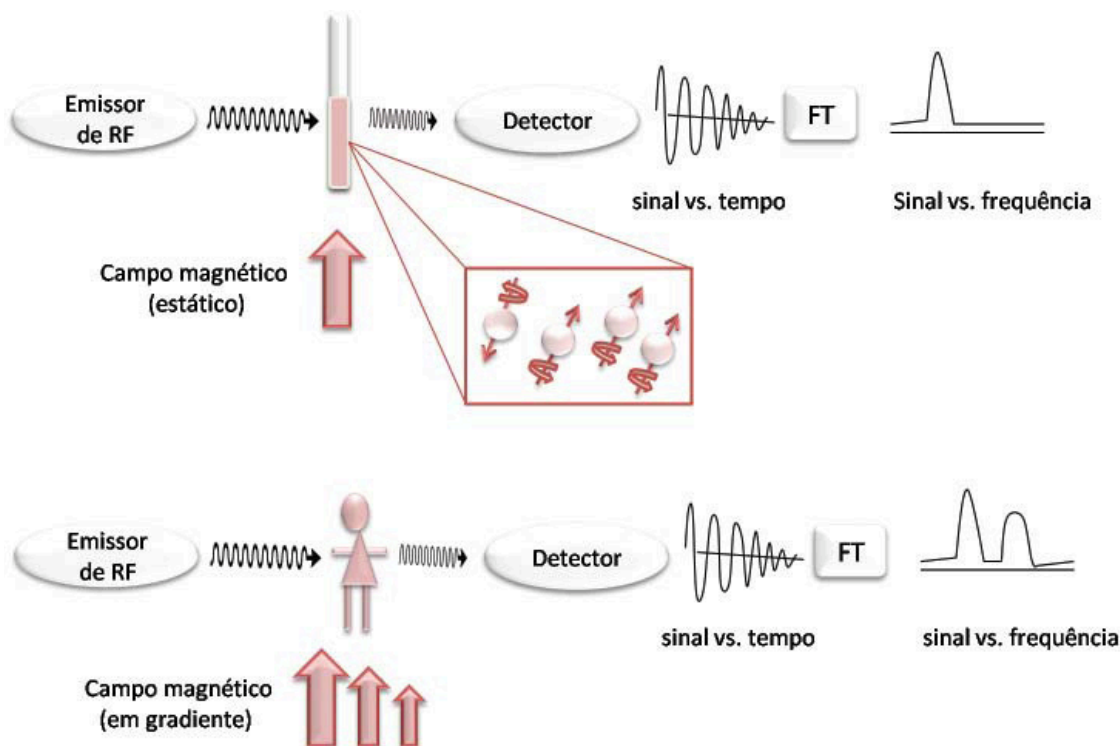


Figura 12 – Em relação a uma experiência de RMN de ^1H convencional a IRM permite obter informação sobre a localização espacial de prótons em tecidos. A aplicação de um campo magnético em gradiente origina um sinal que contém informação não só sobre a existência de prótons mas também sobre a sua localização

A figura 12 ajuda a visualizar o fenómeno por detrás da IRM [9]. Na RMN de ^1H sujeita-se uma amostra (e desta forma os seus prótons) a um intenso campo magnético homogéneo e, de seguida, a uma radiação com frequência rádio (tal como descrevemos anteriormente). Como aplicamos um campo magnético igual a toda a amostra (estático) e a frequência do sinal dos prótons depende deste campo magnético, todos os prótons com as mesmas características (ou ambiente químico) originam espectros com um só sinal.

Este sinal revela a presença de prótons mas não dá informação sobre a sua localização. Na IRM aplica-se a um tecido um campo magnético com um gradiente calibrado. Com o aumento do campo magnético (da esquerda para a direita) a frequência emitida pelos núcleos (após exposição à rádio frequência) aumenta também da esquerda para a direita na amostra. Ou seja, para duas zonas com o mesmo tipo de prótons são emitidos dois sinais a diferentes frequências.

Este é o princípio para a localização dos prótons. Na figura 12 só está esquematizada a localização ao longo de um eixo horizontal. No entanto, se for utilizado um campo magnético rotativo, recolhe-se informação sobre os vários eixos, que se for combinada com o auxílio de informática, produz um mapa tridimensional da densidade de prótons (que pode ser visualizada em cortes).

Uma vez que, como mencionámos antes, a densidade de prótons varia com o tipo de tecido (por causa dos diferentes conteúdos de água dos mesmos), diferentes sinais são também obtidos para diferentes tipos de tecidos.

REFERÊNCIAS

Recomendamos as referências [1-3] para os que pretendem aprofundar os conhecimentos na área de RMN.

[1] Timothy D.W. Claridge, *High-resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Elsevier, 1999.

- [2] J.N.S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, 1995.
- [3] R. Abraham, J. Fisher, P. Loftus, *Introduction to NMR Spectroscopy*, Wiley, Chichester, 1988.
- [4] (<http://nobelprize.org>)
- [5] R.K. Harris, E.D. Becker, S.M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger. *Pure Appl. Chem.* 2001, 73, 1795–1818.
- [6] D.P. Bancroft, C.A. Lepre, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6860–6871.
- [7] K.V. Luzyanin, M. Haukka, N.A. Bokach, M.L. Kuznetsov, V.Yu. Kukushkin, A.J.L. Pombeiro, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 1882–1887.
- [8] K.V. Luzyanin, P.V. Gushchin, A.J.L. Pombeiro, M. Haukka, V.I. Ovcharenko, V.Yu. Kukushkin, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 6919–6930.
- [9] Para explicar a técnica de IRM a um público mais jovem recomendamos vivamente o jogo didático sobre este tema que está alojado no site do Prémio Nobel em (http://nobelprize.org/educational_games/medicine/mri/).