



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Química Fundamental

Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

A Espectroscopia de RMN como Ferramenta Elucidativa:

Estruturas Moleculares, Mecanismos de Reação e

Metabonômica

Ricardo Oliveira da Silva

JANEIRO DE 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Química Fundamental

Programa de Pós-Graduação em Química

**A Espectroscopia de RMN como Ferramenta Elucidativa:
Estruturas Moleculares, Mecanismos de Reação e
Metabonômica**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Ricardo Oliveira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Mayall Simas

Co-orientadores: Prof. Dr. Fernando Hallwass

Prof. Dr. Edmundo P. A. Lopes

Recife – PE Brasil
Janeiro de 2010

Silva, Ricardo Oliveira da.

A espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa: estruturas moleculares, mecanismos de reação e metabonômica / Ricardo Oliveira da Silva.- Recife: O Autor, 2010.

xvii, 212 folhas : il. fig. tab.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2010.

Inclui bibliografia e apêndice.

1.Ressonância magnética nuclear. 2.Metabonômica. 3. Urina – análise. Título.

543.66

(22.ed.)

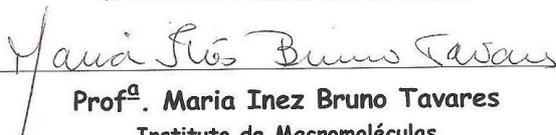
FQ 2010-056

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

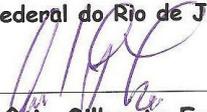
Aprovada:



Prof. Alfredo Mayall Simas
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco



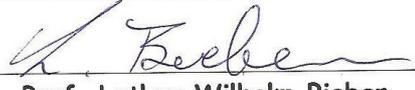
Prof.ª Maria Inez Bruno Tavares
Instituto de Macromoléculas
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Antônio Gilberto Ferreira
Departamento de Química
Universidade Federal de São Carlos



Prof.ª Ana Lucia Coutinho Domingues
Departamento de Medicina Interna
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Lothar Wilhelm Bieber
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

**“A Espectroscopia de RMN como Ferramenta Elucidativa:
Estruturas Moleculares, Mecanismos de Reação e Metabonômica”.**

Por

Ricardo Oliveira da Silva

**Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife - PE - Brasil
12 de Janeiro de 2010**

Dedicatória

Quero deixar aqui registrado uma parte da minha árvore genealógica. Meu bisavô – João Firmino, **Pai do Engenho**, menino nascido sob a Lei do Ventre Livre, viveu uma vida simples, ainda sob o clima duro da escravidão no país... Nos seus mais de cem anos, vividos com serenidade, deixou como legado o respeito e o apego à família.

Meu avô – Antônio Firmino, **Seu Deca**, nasceu no final da 1ª Guerra Mundial, viveu 90 anos e com muito esforço e dedicação criou seus 19 filhos com D. Iofanda, minha avó. A forma como conduziu sua vida e como encarava os problemas é exemplo para todos nós.

Meu pai – Antônio Fernando, **Seu Tonho**, nasceu num novo tempo, num mundo que renascia ao final da 2ª Guerra Mundial. Eletricista, trabalhador da construção civil, com todas as dificuldades que a vida lhe impunha, teve o discernimento necessário e a parceria de minha mãe, D. Preta, para garantir aquilo que julgava (e julgou corretamente) ser o melhor para seus filhos: acesso à educação!

Aqui estou eu e trago sempre comigo o exemplo dessas pessoas. Estou escrevendo minha história. Na parceria com Luziana, resguardamos os pilares já apresentados: família e educação. Isso para que nossos filhos, **Pedro e Thiago**, possam também construir seus caminhos em terra firme.

Por fim, Pedro e Thiago, esse trabalho e essas histórias são dedicados a vocês, porque nós somos o que somos porque fomos o que fomos! E nós somos o que somos porque seremos o que seremos! Não nos esqueçamos nunca disso.

Ricardo Oliveira

Agradecimentos

Uma tese nunca é igual à outra, mesmo porque ela carrega consigo as marcas, o jeito e a cara de seu autor. Esta não é diferente! Eu sou uma pessoa que interajo e colaboro com muito outros pesquisadores. Assim, a tese mostra essa característica e não posso me furtar de agradecer a todas essas pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para que aqui chegássemos.

Quero agradecer ao prof. Alfredo Simas, não apenas pela orientação, mas pela disposição e boa vontade para comigo, mesmo antes de ingressar no programa de pós-graduação, ainda como seu aluno de mestrado; à prof^a. Simone Gonçalves, pelo incentivo constante e por sempre colocar-se a disposição naquilo que fosse necessário; ao prof. Edmundo Lopes, que acreditou no nosso projeto, adotando-o e participando ativamente do mesmo; à Dr^a. Michele Godoy por seu espírito de equipe, dedicação e colaboração; ao prof. Fernando Hallwass, por sua contribuição à minha formação enquanto profissional da área de ressonância magnética nuclear.

Não posso deixar de mencionar os professores Paulo Menezes, Rajendra Mohan, Walter Azevedo, Marcelo Navarro, André Galembeck, Daniela Ferraz e Beate Santos, pelas colaborações científicas e pelas oportunidades de aprendizado que me foram oferecidas. À prof^a. Ivani, com quem ainda não tive a oportunidade de colaborar cientificamente, embora esteja certo de que logo essa colaboração será estabelecida; mas a quem desejo agradecer, sobretudo porque sei de sua torcida por meu sucesso, tanto

profissional quanto pessoal. Ao prof. Lothar, que na condição de coordenador da Central, sempre esteve à disposição, ajudando naquilo que era necessário.

Aos colegas da Polícia Científica do Estado da Paraíba, Vanduir e Afonso, pela troca de experiências e por facilitarem, na medida do possível, sempre dentro da legislação, a parte do trabalho que se refere a entorpecentes.

Algo que não posso deixar de mencionar é que às vezes uma conversa despreziosa, num corredor, pode se transformar numa colaboração científica. Isso aconteceu com certa frequência durante esses anos de trabalho. Por isso, quero agradecer aos colegas de pós-graduação que oportunizaram momentos tão agradáveis, possibilitando o estabelecimento dessas relações. São eles: Róbson Barros, Ricardo Neves, Renato Augusto, Rogério Tavares, Aderivaldo Silva, Juliana Manso, Ana Rosa, Roberta Ayres, Rubens Teles, Humberto, Rômulo Tenório, Juliano Rufino, Clécio Gomes, Maurício Santos, Cleiton e Júlio César. Quero também deixar aqui registrado os meus agradecimentos à bioquímica Izolda Moura e à Luisa Khouri, graduanda de medicina, pela parceria e presteza quando da coleta de material no Hospital das Clínicas.

Aos colegas do departamento: Maurílio, Patrícia, Carlão, Eliaquim, Marta, Dayse, Elisabete, Norma, Celso, Wellington, Margarete e Eliana. Sei o quanto essas pessoas gostam de mim e torcem pelo meu sucesso, a quem externo todo o meu agradecimento. Às companheiras e amigas bibliotecárias, Joana D'Arc e Ana.

Um agradecimento todo especial aos amigos da Central Analítica, que mais uma vez não mediram esforços para me ajudar nessa caminhada:

Severino, Lúcio, Conceição, Érida, Elias e Abene. À incansável amiga Eliete Barros, que com sua inteligência e sensibilidade tornou mais fácil a trajetória. Faltam-me palavras para te agradecer, minha amiga.

Aos meus pais – Seu Tonho e Dona Preta, e ao meu irmão Rinaldo Bola. Esse é um momento singular em nossas vidas. Esse é um dos frutos que colhemos após tanto tempo arando a terra e cuidando da plantação.

Obrigado!

A caminhada é longa, mas ter a companhia de vocês tornou tudo mais suave.

À minha família, que exatamente no meio dessa trajetória, recebeu mais um membro: Thiago, que só trouxe alegria para nosso lar.

A nossa família é fonte na qual renovamos as energias para enfrentar os desafios que a vida nos oferece.

Meus agradecimentos como uma declaração de amor aos meus filhos – Pedro e Thiago, e à minha esposa – Luziana. Obrigado e desculpe-me pelas horas que deixei de dedicar a vocês.

Agradeço a Deus por me permitir aqui chegar. Espero ter discernimento suficiente para fazer bom uso dessa oportunidade. Que todo conhecimento construído ao longo desses anos seja utilizado com o único objetivo de ajudar as pessoas.

Ricardo Oliveira da Silva

A Espectroscopia de RMN como Ferramenta Elucidativa: Estruturas Moleculares, Mecanismos de Reação e Metabonômica

Resumo

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma poderosa ferramenta para a elucidação estrutural e para o estudo de transformações químicas, intensamente utilizada na área de química orgânica. Recentemente, a fronteira de suas aplicações tem se expandido para incluir a análise de biofluidos com o fim de tentar identificar padrões associados às mais variadas condições fisiopatológicas que, ao afetarem o metabolismo, deixam sua marca de forma reconhecível nos espectros de RMN destas matrizes complexas.

Elucidação estrutural – (a) estudamos pela primeira vez as diferenças estruturais entre cloridrato de cocaína e sua base livre, conhecida como “crack”, usando a espectroscopia de RMN em solução e no estado sólido. Em solução, determinamos que o grupo benzoato tem orientação equatorial, enquanto o grupo metóxi-carbonil tem orientação axial. No caso dos experimentos realizados no estado sólido, foi possível distinguir amostras de cloridrato de cocaína e de “crack”, demonstrando que o “crack” não tem uma estrutura cristalina e, conseqüentemente, seu espectro apresenta uma maior dispersão das freqüências de ressonância; (b) investigamos e caracterizamos por RMN de ^1H , de ^{13}C e de ^{19}F , a substância que provocou a morte súbita de uma jovem de 19 anos de idade, após inalação durante uma festa, como sendo 1,1,1-dicloro-flúor etano, que é livremente comercializado; (c) caracterizamos a

estabilidade da cadeia de polifosfato de sódio e do gel de polifosfato de alumínio frente à radiação gama, usando a RMN de ^{31}P e mostramos que é factível utilizar o polifosfato em substituição a ortofosfatos em nutrição parenteral e também que é possível utilizar o gel citado como matriz polimérica para um sensor de radiação gama baseado na formação de polianilina; (d) caracterizamos e fizemos a atribuição inédita dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de uma série de compostos derivados do 1,2,4-oxadiazol com propriedades de cristais líquidos; (e) criamos um banco de dados espectrais usando RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F de uma série de trifluoroboratos orgânicos que têm aplicação em síntese orgânica; (f) investigamos um possível erro na preparação de um medicamento, em farmácia de manipulação, para tratamento de hipertensão e controle da frequência cardíaca baseado em maleato de enalapril e atenolol, sendo a análise por RMN provavelmente inédita em litígios desta natureza no Brasil.

Mecanismos de reação e processo – Identificamos intermediários de reações orgânicas, como: (g) complexos de Meisenheimer, formados durante a hidrólise alcalina do 3,5-dinitro benzoato de metila, que apresentamos na forma de uma técnica de ensino-aprendizagem na identificação de intermediários de reação; (h) hemiacetal, observado a partir da inesperada formação de formaldeído como intermediário da reação de formação de *N*-(arilmetilamino) ftalimidas, cujo mecanismo foi investigado. (i) Finalmente, estudamos o efeito das ondas de ultrassom sobre a solução de polianilina em dimetil sulfóxido (DMSO), quando observamos e caracterizamos a redução do teor de água dissolvida, tendo apresentado como hipótese explicativa a formação e o consumo do

radical hidroxila. Esta redução do teor de água na solução de DMSO na presença de um sequestrante de radicais, pode ser compreendida como uma forma rápida e eficiente de secagem do DMSO. Demonstramos ainda que as propriedades óticas das formas oxidada, dopada e não-dopada da polianilina mudam completamente após a interação com as ondas de ultrassom.

Análise de biofluidos – (j) criamos um modelo metabonômico, a partir de espectros de RMN de ^1H de urina, para distinguir amostras fornecidas por pacientes portadores de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e por pacientes não-infectados. Isso foi possível aplicando análise de componentes principais (ACP) e análise de discriminantes (DA) aos dados espectrais. Tal modelo visa se constituir em uma alternativa não invasiva ao exame de sangue, normalmente utilizado em triagens em bancos de sangue. O modelo construído apresentou valores de sensibilidade e especificidade iguais a 96,9% e 94,1%, respectivamente. Já os valores preditivos positivo e negativo são iguais a 97,0% e 93,9%, respectivamente. O modelo foi *cross*-validado, classificando corretamente 90,9% das amostras e tendo 95,5% de concordância com os resultados apresentados pelo modelo completo. Demonstramos, portanto, que a técnica e o biofluido escolhidos têm potencial para serem utilizados como método de rotina no rastreamento de casos de infecção pelo HCV, caracterizando-se como uma metodologia mais rápida e menos onerosa do que as que atualmente são utilizadas.

Palavras-chave: RMN, metabonômica, elucidação estrutural.

NMR Spectroscopy as Elucidative Tool: Molecular Structures, Mechanisms of Reactions and Metabonomics

Abstract

Nuclear magnetic resonance spectroscopy is a powerful tool for structural elucidation and to study chemical changes, intensely used in organic chemistry. Recently, the applications of NMR spectroscopy have expanding to include biofluids analysis aiming to identify patterns associated to different physio-pathologic conditions that affect the metabolism and leave its mark in NMR spectra of these complex matrixes.

Herein, we explored this potential for:

(1) Structural elucidation – (1.1) to study the structural differences between cocaine chloridrate and "crack", using NMR spectroscopy in solution and solid state; (1.2) to investigate and to characterize by ^1H , ^{13}C and ^{19}F NMR spectra of a substance that, after inhalation during a party, caused the death of a young girl; (1.3) to verify the stability of the chain of sodium polyphosphate and of aluminum polyphosphate (APP) gel after gamma irradiation, using ^{31}P NMR, aiming to use polyphosphates in substitution the orthophosphates in parenteral nutrition and APP gel as polymeric matrix for a radiation sensor of gamma irradiation based on the polyaniline formation; (1.4) to characterize and do the assignments for the ^1H and ^{13}C NMR spectra of a some substances derived of the 1,2,4-oxadiazol, with luminescent properties, used as liquid crystals; (1.5) to build a spectral database using the ^1H , ^{11}B , ^{13}C and ^{19}F NMR spectra of a series of compounds organo-trifluoro-borates that have application in organic

synthesis; (1.6) to investigate a possible wrong in the preparation of a medication, in manipulation pharmacy, for hypertension treatment and control of cardiac frequency based on enalapril maleate and atenolol.

(2) Reaction mechanisms and process – To identify intermediates of organic reactions, as: (2.1) the formation of Meisenheimer complexes during the alkaline hydrolysis of 3,5-dinitro benzoic acid methyl ester; (2.2) the investigation of the mechanism of reaction of formation of N-(arylaminoethyl) phthalimides; and (2.3) the study of the effect of ultrasound waves on a polyaniline solution in dimethyl sulfoxide (DMSO).

(3) Biofluids analysis – (3.1) building a metabonomic model to distinguish samples supplied by HCV infected patients from healthy subjects using ^1H NMR spectra of urine and applying principal components analysis (CPA) and discriminant analysis (DA) on spectral data.

We demonstrated, solving different problems, the versatility and applicability of multinuclear magnetic resonance spectroscopy and we advanced creating a metabonomic model using human samples as tool for the diagnosis of a disease that is a world problem of public health – hepatitis C.

Keywords: NMR, metabonomic, structural elucidation.

Índice

<i>Dedicatória</i>	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	x
Índice	xii
Índice de Figuras	xv
Capítulo I Objetivos e Fundamentação Teórica	1
Objetivos	2
Fundamentação Teórica.....	3
A Espectroscopia de RMN com Ferramenta para Elucidação Estrutural.....	4
RMN e Metabonômica	18
Análise de Biofluidos	18
A Análise de Urina	19
A Hepatite C e o seu Diagnóstico	21
A Espectroscopia de RMN e a Análise de Biofluidos	31
Metabonômica	34
Estatística Multivariada	41
Análise de Componentes Principais	42
Análise de Discriminantes	43
Capítulo II Desenvolvimento	53
A Multidisciplinariedade da Espectroscopia de RMN	54
Cocaína e suas formas de apresentação: Cloridrato de Cocaína e “Crack” .	55
Distinção entre Cloridrato de Cocaína e “Crack” usando Técnicas de RMN em Solução e no Estado Sólido	58
Procedimento Analítico	58
Resultados e Discussão	60
Caracterização por RMN em solução.....	62
Caracterização por RMN no estado sólido.....	69
Conclusão	74
Caracterização por RMN de ^1H e de ^{13}C de Cristais Líquidos Emissores de Luz Derivados do 1,2,4-Oxadiazol	75
Procedimento Analítico	75
Resultados e Discussão	76
Investigação de Morte Súbita após Uso de Inalante – Um Estudo de Caso .	94
Descrição do caso	94
Procedimento Analítico	95
Resultados e Discussão	96
Criação de Banco de Dados Espectrais para Sais de Trifluoroboratos orgânicos – RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F	104

Objetivo	104
Procedimento Analítico	105
Resultados e Discussão	105
Conclusão	113
Erro na Manipulação de Fármaco? – Outro Estudo de Caso.....	114
Descrição do caso	115
Procedimento Analítico	116
Resultados e Discussão	117
Polifosfato – Nutrição parenteral e matriz polimérica	123
Objetivo	127
Procedimento Analítico	127
Resultados e Discussão	128
Conclusão	131
Efeitos das Ondas de Ultrassom sobre Solução de Polianilina em DMSO .	133
Objetivo	134
Procedimento Analítico	134
Resultados e Discussão	135
Conclusão	138
Estudos de Mecanismos de Reação usando RMN de ¹ H.....	140
A Hidrólise Alcalina do 3,5-dinitro benzoato de metila	141
Objetivo	141
Desenvolvimento	141
Conclusão	147
Mecanismo de formação de N-(arilaminometil) ftalimidas a partir da reação entre arilaminas e N-hidroximetilftalimida.....	148
Objetivo	149
Procedimento Analítico	150
Resultados e Discussão	150
Conclusão	157
Desenvolvimento de Modelo Metabonômico para Investigação de Infecção pelo Vírus da Hepatite C	159
Procedimentos Legais e Éticos	159
Objetivo	159
Procedimento Analítico	159
Resultados e Discussão	163
Conclusão	170
Capítulo III Conclusão e Perspectivas	171
Conclusão	172
Perspectivas	174
Referências Bibliográficas	177
Apêndice I	189
Currículo Vitae e artigos publicados no período.....	189

CURRICULUM VITAE.....	190
Apêndice II	192
Dados espectrais utilizados na construção do modelo metabonômico para investigação de infecção pelo vírus da hepatite C	192
Apêndice III	200
Coeficientes das Componentes Principais – Modelo Metabonômico para Investigação de Infecção pelo Vírus da Hepatite C.	200
Apêndice IV.....	204
Função de Classificação para os grupos POSITIVO e NEGATIVO – Modelo Metabonômico para Investigação de Infecção pelo Vírus da Hepatite C.....	204
Apêndice V.....	205
Espectros de RMN de ¹¹ B (96,2 MHz, DMSO-d ₆) dos compostos 3, 6, 8, 11, 12, 13, 16, 19, 24, 26 e 28.	205
Apêndice VI.....	209
Espectros de RMN de ¹⁹ F (282,2 MHz, DMSO-d ₆) dos compostos 3, 6, 8, 11, 12, 13, 16, 19, 24, 26 e 28.	209

Índice de Figuras

Figura 1 – Diagramas de energia para um sistema formado pelos spins nucleares I e S. À esquerda, distribuição populacional para os spins na presença do campo externo B_0 ; à direita, quando as populações para os estados α e β do spin S são igualadas. Nesse momento surge o efeito nuclear Overhauser.	12
Figura 2 – Principais avanços da espectroscopia de RMN ao longo dos anos.	17
Figura 3 – Identificação de metabólitos em espectro de RMN ^1H de urina de humanos.	38
Figura 4 – Evolução do número de publicações (esquerda) e citações (direita) para os tópicos metabonomics ou metabonomic na web of science [®] (ISI Web of Knowledge SM) – Pesquisa realizada em 02.07.2009.	40
Figura 5 – Distribuição hipotética de frequências de dois grupos	44
Figura 6 – Classificação em dois grupos a partir de duas variáveis.	46
Figura 7 – Fórmulas estruturais da base livre de cocaína (esquerda) e cloridrato de cocaína (direita).	60
Figura 8 – Espectro de massas de amostra de cocaína apreendida durante operação policial na Paraíba. GCQ Ion Trap, 70 eV.	61
Figura 9 – Espécies presentes no espectro de massas da cocaína.	61
Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H da amostra de crack, $B_0 = 7,04\text{ T}$, CDCl_3	63
Figura 11 – Espectro RMN de ^{13}C da amostra de crack, $B_0 = 7,04\text{ T}$, CDCl_3	64
Figura 12 – Espectro DEPT da amostra de crack, $B_0 = 7,04\text{ T}$, CDCl_3	64
Figura 13 – Espectro HETCOR (^1H , ^{13}C) da amostra de crack em CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	65
Figura 14 – Espectro HMBC (^1H , ^{13}C) da amostra de crack em CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	66
Figura 15 – Espectro NOEdiff da amostra de crack em CDCl_3 . Saturação do sinal em $\delta 5,2\text{ ppm}$	68
Figura 16 – Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS (inferior) e ^{13}C CP/MAS/DD (superior) da amostra de cloridrato de cocaína, 75.4 MHz.	70
Figura 17 – Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS (inferior) e ^{13}C CP/MAS/DD (superior) da amostra de “crack”, 75.4 MHz.	71
Figura 18 – Fórmulas estruturais dos derivados de 1,2,4-oxadiazol utilizados no estudo.	76
Figura 19 – Espectros de RMN de ^1H do composto 1 , CDCl_3 (inferior) e C_6D_6 (superior), $B_0 = 7,04\text{ T}$	78
Figura 20 – Espectro COSY do composto 1 , CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	79
Figura 21 – Espectro RMN de ^{13}C do composto 1 , CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	79
Figura 22 – Expansão do espectro HMQC do composto 2a , CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	80
Figura 23 – Espectros COSY (esquerda) e NOEdiff (direita) do composto 2b – irradiação do sinal em δ_{H} 3,36 ppm, CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	82
Figura 24 – Expansão do espectro HMQC (^1H , ^{13}C) do composto 2c em CDCl_3	83
Figura 25 – Espectro RMN de ^{13}C e DEPT 135, CDCl_3 , 75 MHz do composto 2d	86
Figura 26 – Espectro HMBC do composto 2d , CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$. (Excluída região alquílica)	87
Figura 26a – Expansão do espectro HMBC do composto 2d , CDCl_3 , $B_0 = 7,04\text{ T}$	87

Figura 27 – Expansão do espectro HMQC do composto 2d , CDCl ₃ , B ₀ = 7,04 T.....	89
Figura 28 – Expansão do espectro COSY do composto 2d , CDCl ₃ , 300 MHz.....	91
Figura 29 – Espectro de RMN de ¹ H da amostra usada como inalante, 300 MHz.....	98
Figura 30 – Espectro de RMN de ¹³ C acoplado da amostra utilizada como inalante, 75,4 MHz.....	99
Figura 31 – Espectro de RMN de ¹⁹ F da amostra utilizada como inalante, 298,4 MHz.....	100
Figura 32 – Espectro de massas da amostra utilizada como inalante, 70 eV.....	100
Figura 33 – Compostos utilizados para construção do banco de dados espectrais em RMN de ¹ H, de ¹¹ B, de ¹³ C e de ¹⁹ F.	107
Figura 34 – Espectros de RMN de ¹ H, de ¹¹ B, de ¹³ C e de ¹⁹ F do composto 1 (etino trifluoroborato de potássio) em DMSO-d ₆	109
Figura 35 – Espectro de RMN de ¹ H do atenolol – (2-[4-2-hidróxi-3-(isopropilamino) propóxi] fenil] etanamida), em HCl/D ₂ O, com pré-saturação do sinal da água (δ4,72 ppm, sinal excluído), 300 MHz.....	118
Figura 36 – Espectro de RMN de ¹ H do maleato de enalapril – Ácido Butenodióico e Ácido-1-[2-(1-Etóxicarbonil-3-fenil-propilamino) propionil] pirrolidina-2-carboxílico, em HCl/D ₂ O, com pré-saturação do sinal da água (δ4,72 ppm), 300 MHz.....	119
Figura 37 – Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz) da mistura padrão de maleato de enalapril – ácido butenodióico e ácido-1-[2-(1-etóxi-carbonil-3-fenil-propilamino) propionil] pirrolidina-2-carboxílico e atenolol – (2-[4-2-hidróxi-3-(isopropilamino) propóxi] fenil] etanamida), em HCl/D ₂ O, com pré-saturação do sinal residual da água (δ4,72 ppm), correspondente à região não apresentada. No detalhe superior, expansão da região entre δ0,8 e δ1,4 ppm evidenciando o tripleto (δ0,99 ppm) e o duplete (δ1,21 ppm) atribuídos às metilas do maleato de enalapril e atenolol, respectivamente.	120
Figura 38 – Espectro de RMN de ¹ H da amostra-problema em HCl/D ₂ O, com pré-saturação do sinal residual da água (δ4,72 ppm), 300 MHz.....	121
Figura 39 – Espectros de RMN de ³¹ P de solução aquosa de polifosfato de sódio, antes (A) e após (B) irradiação gama (50 kGy), 121,4 MHz.....	128
Figura 40 – Espectros de RMN de ³¹ P MAS do gel de polifosfato de alumínio contendo anilina e nitrato de prata, antes (A) e após (B) exposição à radiação gama (70 kGy), rotação igual a 6 kHz, 121,4 MHz.....	130
Figura 41 – Espectro UV-Vis da polianilina, na forma de base esmeraldina, antes (A) e após (B) exposição às ondas de ultrassom. (C) corresponde à amostra (B) tratada com persulfato de amônio.....	136
Figura 42 – Espectros de IV da solução de polianilina em DMSO em função do tempo de exposição às ondas de ultra-som. (A) t = 0; (B) t = 30 min e (C) t = 60 min.....	137
Figura 43 – Espectros de RMN de ¹ H da solução de polianilina em DMSO antes e após 60 min de exposição às ondas de ultrassom.....	138

Figura 44 – Reações possíveis quando o 3,5-dinitrobenzoato de metila é exposto a um meio fortemente alcalino.....	142
Figura 45 – Esquema de formação do complexo de Meisenheimer.....	142
Figura 46 – Espectros de UV-Vis, em função do tempo, após adição de NaOH à solução de 3,5-dinitrobenzoato.....	144
Figura 47 – Espectros de RMN de ^1H do 3,5-dinitro benzoato de metila em DMSO. (A) Antes da adição de NaOH; (B), (C) e (D) após adição de NaOH, sendo (B) – 0 min.; (C) – 30 min; e (D) – 90 min. após a adição de NaOH.....	145
Figura 48 – Esquema de reações possíveis quando o 3,5-dinitrobenzoato de metila está na presença de hidróxido de sódio.....	146
Figura 49 – Reação de formação da N-fenilaminometil ftalimida.....	148
Figura 50 – Mecanismo (1) de reação proposto por Winstead e Heine.....	148
Figura 51 – Mecanismo (2) de reação proposto por Winstead e Heine.....	149
Figura 52 – Espectros de RMN de ^1H da mistura de p-cloroanilina e N-(hidróxi-metil) ftalimida, em DMSO- d_6 , 300 MHz, variando a temperatura de 25°C até 55°C.....	152
Figura 53 – Espectro de RMN de ^1H do formaldeído em CD_3OD , 25°C, 300 MHz.....	153
Figura 54 – Espectros de RMN de ^1H da N-(hidróxi-metil) ftalimida em CD_3OD , 300 MHz. Os sinais P1 e P2, atribuídos aos grupos metileno da N-(hidróxi-metil) ftalimida e do hemiacetal, foram utilizados para determinar a razão molar entre as espécies, nas diferentes condições de temperatura.....	154
Figura 55 – Espectros de RMN de ^1H da mistura de N-(hidróxi-metil) ftalimida e p-cloroanilina, em metanol- d_6 , variando a temperatura de 30°C até 55°C.....	155
Figura 54 – Mecanismo proposto para a formação N-(fenilaminometil) ftalimida, em metanol, a partir de N-hidróxi-metil ftalimida e anilina.....	157
Figura 56 – Diagnóstico clínico-laboratorial, realizado no Hospital das Clínicas / UFPE, para infecção pelo HCV versus Score na Função Discriminante P.....	168

Capítulo I

Objetivos e Fundamentação Teórica

Objetivos

O nosso trabalho tem como objetivo explorar o potencial da espectroscopia de ressonância magnética multinuclear como ferramenta elucidativa. Desta forma, nos propomos a enfrentar diferentes problemas, de diferentes áreas do conhecimento como a ciência forense, a química orgânica, a química supramolecular e a bioquímica, usando a ressonância magnética multinuclear como sonda principal de investigação.

Pretendemos demonstrar a versatilidade e aplicabilidade da espectroscopia de ressonância magnética multinuclear partindo de problemas que normalmente são tratados com esta técnica: elucidação e assinalamento estrutural, passando por áreas nas quais a mesma é pouco utilizada, como ciência forense; culminando com a sua aplicação na bioquímica através da construção de um modelo metabonômico capaz de distinguir amostras de urina fornecidas por pacientes diagnosticados como portadores de infecção pelo vírus da hepatite C, daquelas fornecidas por pacientes clinicamente saudáveis.

Fundamentação Teórica

Didaticamente, podemos dividir nosso trabalho em três grandes áreas: 1^a) A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na elucidação e assinalamento estrutural de compostos; 2^a) RMN como ferramenta para estudos de mecanismos de reação e processos; e 3^a) Metabonômica – RMN para fins de investigação clínica, auxiliando o profissional de saúde no diagnóstico de enfermidades.

Portanto, os trabalhos serão assim apresentados: Iniciaremos discutindo como a espectroscopia de RMN é utilizada para elucidação de compostos orgânicos, as principais técnicas utilizadas no assinalamento estrutural e no estudo de mecanismos de reação. Na seqüência, discutiremos os tópicos, e os conceitos relacionados, que fundamentam os estudos realizados na construção do modelo metabonômico para classificação de amostras de urinas de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, usando o espectro de RMN de ¹H de urina. Por fim, apresentaremos todas as pesquisas e investigações que realizamos usando a espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa, bem como a produção científica advinda dessas investigações.

A Espectroscopia de RMN com Ferramenta para Elucidação Estrutural

A importância da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, assim como a de qualquer outra ferramenta, está associada às suas aplicações. Atualmente, a espectroscopia de RMN é a principal ferramenta para elucidação estrutural de compostos orgânicos e organometálicos, bem como em estudos de interação molecular, dentre outras aplicações. Isto pode ser facilmente confirmado por buscas no site da Web of Science[®]. Por exemplo, no dia 03 de agosto de 2009, os tópicos *NMR and structure*, retornaram 91.316 artigos e índice h igual a 250; enquanto para *mass spectrometry and structure*, houve o retorno de 20.916 artigos e um índice h de 164. Já para *infrared and structure*, houve o retorno de 24.232 artigos e um índice h de 163.

A descoberta do fenômeno da ressonância magnética nuclear data dos anos 40 [1, 2]. Inicialmente, a RMN era objeto de estudo apenas dos físicos. No entanto, alguns marcos históricos foram importantes para chamar a atenção dos químicos para as possibilidades oferecidas por esse novo efeito.

Se a frequência de ressonância de um determinado núcleo dependesse apenas de suas propriedades intrínsecas, como a constante magnetogírica e o spin nuclear, e da força do campo externo aplicado B_0 , pouco interesse prático teria a RMN para os químicos ou biólogos. No entanto, a descoberta, nos anos 50, de que a frequência de ressonância sofre pequenas flutuações em função do ambiente químico ao redor do núcleo e, portanto, da estrutura molecular [3],

pode ser pontuada como primeiro impulso às pesquisas de interesse químico.

Hoje, ao mencionarmos a espectroscopia de RMN, somos induzidos a pensar em RMN de ^1H e de ^{13}C . Porém, curiosamente, os primeiros estudos que evidenciaram a existência do que chamamos de deslocamento químico (δ) e sua correlação com a estrutura molecular foram realizados com núcleos de ^{14}N e de ^{19}F a partir da observação de duas linhas de ressonância para o NH_4NO_3 no espectro de RMN de ^{14}N e de diferentes frequências no espectro de RMN de ^{19}F para compostos como o BeF_2 , BF_3 , CF_3CCl_3 , NaF e KF [4, 5]. Na verdade, no caso da RMN de ^{14}N , a descoberta foi inclusive acidental, haja vista que os pesquisadores resolveram escolher um composto com mais átomos de nitrogênio na molécula com o intuito de aumentar o sinal do ^{14}N . Por acaso, dispunham de nitrato de amônio em seu almoxarifado – e, ao escolher este composto, foram surpreendidos com o surgimento das duas linhas.

Ainda nos anos 50, Gutowsky e Hoffman conseguiram observar frequências de ressonância diferentes no espectro de RMN de ^{19}F para derivados de benzeno contendo um grupo CF_3 e átomos de flúor no anel [6]. No entanto, o que podemos usar como ponto de referência foram as observações de linhas de ressonância distintas para grupos de uma mesma molécula, sendo que a intensidade relativa dessas linhas obedeciam a relação entre os números de hidrogênios presentes em cada grupo. Isso foi feito por Dharmatti e colaboradores a partir da observação do espectro de RMN de ^1H do etanol [3]. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa publicou que a diferença entre os δ observados para os grupos OH e CH_2 do etanol era dependente da temperatura, enquanto para os grupos CH_2 e CH_3 , essa

diferença era constante, mesmo variando a temperatura . Mais do que isso, essa diferença também era função da concentração do etanol [7]. Essas evidências foram publicadas sem uma explicação para as mesmas. Pouco tempo depois, o fenômeno foi explicado como sendo uma função do maior ou menor número de ligações de hidrogênio entre as moléculas de etanol [8], abrindo um novo campo de atuação para a RMN: estudo de interações moleculares.

Outra importante contribuição para expandir a área de atuação da RMN foi a descoberta de que a taxa da troca química pode ser estimada a partir de espectros de RMN [9]. Nos início dos anos 60, os químicos orgânicos passaram a demonstrar particular interesse por estudos que buscavam compreender a influência da conformação molecular sobre o espectro de RMN e daí fazer o caminho inverso, ou seja, a partir dos espectros de RMN inferir sobre a conformação molecular. O marco histórico aqui pode ser associado aos trabalhos de Karplus [10, 11].

Naquele momento histórico, os princípios básicos da espectroscopia de RMN já estavam estabelecidos, sendo a mesma utilizada como um poderoso método para elucidação estrutural de compostos orgânicos, sobretudo pela qualidade e quantidade de informação contida nos espectros de RMN e pela facilidade da interpretação dos dados espectrais quando comparados, por exemplo, com os dados obtidos a partir da espectroscopia no infravermelho.

A partir de então, os principais avanços se deram no desenvolvimento de hardwares, seja com a obtenção de magnetos mais intensos, estáveis e homogêneos, ou na capacidade de processamento dos computadores.

Paralelo a isso, tem-se o desenvolvimento das seqüências de pulsos de rádio-freqüência (rf), em substituição aos experimentos que utilizavam onda contínua e o uso de ferramentas matemáticas como a transformada de Fourier. Esse conjunto de avanços tornou possível a realização de experimentos de correlação, ou transferência de polarização, e a obtenção de espectros bidimensionais.

Dentre estes experimentos, destacam-se aqueles que visam determinar a multiplicidade dos núcleos de ^{13}C e/ou facilitar a observação dos sinais de núcleos com constante magnetogírica e abundância natural baixas, como APT (*Attached Próton Test*), INEPT (*Insensitive Enhanced by Polarization Transfer*) e DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*). Esses experimentos foram desenvolvidos nos anos 80, acompanhando o desenvolvimento tecnológico do período [12-15].

Os experimentos bidimensionais, inicialmente, correlacionavam apenas o deslocamento químico com a constante de acoplamento (2D *J*-resolvido). Porém, rapidamente a técnica ampliou seu raio de ação, passando a determinar conectividades homo e heteronucleares. Desta forma, surgiram os experimentos COSY (*CORrelation SpectroscopY*) – que mostra correlações entre hidrogênios que apresentam constantes de acoplamento da ordem de 3 a 15 Hz, normalmente 3J , e HETCOR (*HETeronuclear CORrelation*) – que mostra correlações entre hidrogênios e carbonos que têm constante de acoplamento da ordem de 140 Hz, geralmente 1J [16, 17]. Na seqüência HETCOR, o sinal é obtido no canal do ^{13}C , implicando que o tempo do experimento é determinado pelo núcleo menos abundante e com constante magnetogírica menor. Então, o

HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*), que é uma técnica de correlação inversa, ou seja, com o sinal (e as correlações, portanto) sendo obtido no canal do ^1H , passou a ser uma alternativa eficaz [18]. Outra alternativa é o uso da seqüência de pulsos HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), que também é um método de correlação inversa [19].

No entanto, as principais dificuldades com as atribuições dos sinais nos espectros de RMN ^{13}C estão associadas aos núcleos que não estão ligados a átomos de hidrogênio, devido ao aumento do tempo de relaxação longitudinal T_1 , normalmente observado para os mesmos. Assim, seqüências de pulsos capazes de correlacionar hidrogênios e carbonos distantes duas ou três ligações foram desenvolvidas. Com isso, surgiram as seqüências COLOC (*CO*rrelation spectroscopy via *LO*ng range *C*oupling) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) [20, 21], esta última sendo um experimento de correlação inversa.

Na ressonância magnética de imagens – MRI [22], o uso de campos de gradientes pulsados é uma exigência e, portanto, uma rotina. O mesmo sendo observado nos experimentos de RMN para determinação de valores de difusão. Mas, até o início dos anos 90, praticamente não havia aplicação de campos de gradientes pulsados em espectroscopia de RMN, embora Stejskal e Tanner, nos anos 60, tenham utilizado esses campos de gradientes pulsados para medidas de difusão [23]. Isso deve-se ao paradigma estabelecido até aquele momento. Ou seja: melhores espectros eram obtidos desde que tivéssemos maiores intensidades de campo externo B_0 e fosse garantida uma

melhor homogeneidade do mesmo. Se assim era, por que perturbar a homogeneidade aplicando um gradiente de campo magnético?

A questão é que as seqüências bidimensionais exigem ciclagem de fase para selecionar os caminhos de coerência adequados. Para isso, os experimentos devem ser configurados com número de repetições iguais a múltiplos de 4, 8 ou 16, dependendo da seqüência, o que demanda muito tempo de máquina. Os experimentos que utilizam gradientes de campo pulsados fazem a seleção do caminho de coerência combinando pulsos de rf e de gradientes de campo, tornando a aquisição dos dados mais rápida. Assim, surgiram as seqüências gCOSY, gHMBC, gHSQC, dentre outras [24-27]. Nesse sentido, a aplicação de gradientes de campo magnético pulsado é outro importante marco histórico no desenvolvimento da espectroscopia de RMN, caracterizando a década de 90.

A espectroscopia de RMN também fornece dados acerca do arranjo espacial da molécula. Para isso são utilizados tanto experimentos unidimensionais quanto bidimensionais. Nesse contexto, destacam-se os experimentos que visam determinar a quiralidade e/ou o excesso enantiomérico quando houver, bem como aqueles que objetivam determinar e quantificar, quando for o caso, o efeito nuclear Overhauser (NOE).

No trabalho de mestrado, desenvolvemos uma metodologia para fazer discriminação quiral usando RMN de ^{77}Se a partir da interação entre uma série de seleno-ácidos quirais e metil benzil amina (MBA) com quiralidade definida, que atua como um agente de solvatação quiral [28]. Duas outras estratégias são freqüentemente utilizadas para discriminação quiral e determinação de

excesso enantiomérico: (a) – o uso de reagentes de derivatização quiral, sendo mais comum o uso do reagente de Morsher [29] e a espectroscopia de RMN ^{19}F ; e (b) – o uso de reagentes de deslocamento químico quiral [30].

O efeito nuclear Overhauser, por sua vez, pode ser definido como a mudança na intensidade de um sinal de RMN quando a transição de outro spin nuclear tem as suas populações alteradas em relação à condição de equilíbrio. Em termos de elucidação estrutural, o NOE que interessa é aquele que advém da saturação de uma transição correspondente a núcleos que estejam espacialmente próximos.

Assim como nos casos de experimentos 2D expostos anteriormente, aqui também temos seqüências de pulsos que fazem uso de ciclagem de fase e de gradientes de campo magnético pulsado. As principais seqüências para esse fim são NOEdiff (*Nuclear Overhauser Effect difference spectroscopy*), NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), ROESY (*Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*) e suas variantes com gradiente de campo pulsado [31, 32].

Os experimentos para observação do efeito NOE, em geral, são os últimos usados durante o processo de elucidação estrutural. Eles apenas são utilizados quando não é possível diferenciar, usando os valores de acoplamento escalar spin-spin, entre configuração *E* ou *Z* em sistemas com duplas ligações, ou entre grupos *exo* ou *endo* em compostos que contenham biciclos, por exemplo [33].

Para entendermos o efeito nuclear Overhauser, vamos considerar um sistema formado por dois spins nucleares (I e S), com spin 1/2, que não

apresentam acoplamento escalar spin-spin (via ligações químicas), mas que estão suficientemente próximos no espaço para apresentarem interação dipolar. O diagrama de energia para esse sistema é apresentado na Figura 1.

O acoplamento ou interação dipolar pode ser definido como a interação de um spin nuclear com o campo magnético produzido por outro spin nuclear. Esta interação depende da constante magnetogírica dos núcleos e da distância entre os mesmos. Matematicamente, podemos dizer que a interação dipolar (D_{IS}) é inversamente proporcional ao cubo da distância entre eles (r^3) e diretamente proporcional ao produto das constantes magnetogíricas, γ_I e γ_S .

$$D_{IS} \propto \frac{\gamma_I \gamma_S}{r^3}$$

A intensidade de um sinal de RMN depende da diferença de população entre os estados fundamental (α) e excitado (β) do spin nuclear em questão. Na presença de um campo magnético externo, segundo a distribuição de Boltzmann, há um pequeno excesso populacional no estado α , sendo o mesmo responsável pelo sinal de ressonância. Considerando que no equilíbrio as populações nos estados $\alpha\beta$ e $\beta\alpha$ são iguais a N e que a diferença de população entre esses e os estados $\alpha\alpha$ e $\beta\beta$ é igual a Δ , então, temos $(N+\Delta)$ em $\alpha\alpha$ e $(N-\Delta)$ em $\beta\beta$, respeitando a distribuição de Boltzmann.

Quando as populações para os estados referentes à transição do spin S são igualadas (saturação), a diferença entre as populações dos estados α e β do spin I mantém-se igual a Δ (Figura 1). O efeito nuclear Overhauser (NOE) surge quando o sistema busca restabelecer as populações do estado de equilíbrio. Esse objetivo pode ser alcançado através das transições de zero-

quanta ($\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$) ou duplo-quanta ($\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$). Essas transições são proibidas, segundo as regras de seleção da mecânica quântica, mas pode ocorrer uma relaxação das mesmas devido à interação spin-rede, o que faz as transições passarem a ocorrer. De fato isso acontece, haja vista que são elas as responsáveis pelo efeito nuclear Overhauser.

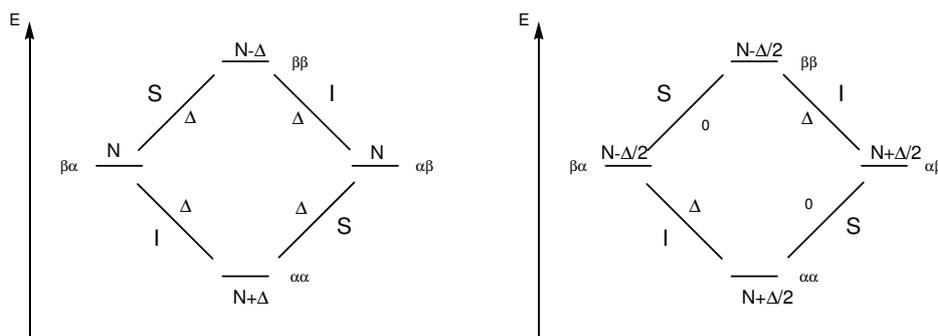


Figura 1 – Diagramas de energia para um sistema formado pelos spins nucleares I e S. À esquerda, distribuição populacional para os spins na presença do campo externo B_0 ; à direita, quando as populações para os estados α e β do spin S são igualadas. Nesse momento surge o efeito nuclear Overhauser.

Se ocorrer a transição zero-quanta, haverá um aumento na população do estado β do spin I e, conseqüentemente, uma redução no sinal de RMN atribuído a esse núcleo. Diz-se que ocorreu um NOE negativo. Por outro lado, se a probabilidade de ocorrência da transição duplo-quanta for maior do que a de zero-quanta, haverá um aumento na população do estado α do spin I, com um conseqüente aumento na intensidade do sinal de ressonância. Diz-se que ocorreu um NOE positivo.

Todos os experimentos citados até agora são realizados com a amostra em solução. No entanto, há casos em que se faz necessária a obtenção do espectro no estado sólido. Isso ocorre quando se investiga, por exemplo, o grau de cristalinidade ou amorficidade da amostra; a existência de polimorfismo em fármacos [34], o que pode gerar alterações na biodisponibilidade do

mesmo; em estudos de polímeros para determinar a taticidade ou inferir acerca de algumas propriedades macroscópicas; no estudo de novos materiais, compósitos; ou quando a amostra possui baixa solubilidade.

Em solução, devido à liberdade que as moléculas têm para se movimentar, o deslocamento químico observado é um valor intermediário, quando comparado aos que seriam observados para as conformações mais estáveis da molécula. No estado sólido, há uma restrição imposta ao movimento molecular, com isso o deslocamento químico observado é específico para a conformação A, B ou C. Então, a espectroscopia de RMN de amostras no estado sólido é uma excelente ferramenta para extrair informações acerca da estrutura molecular e da dinâmica no estado sólido, sendo aplicada a estudos de polímeros (polietileno, PVC, PVA), biopolímeros (polipeptídeos, proteínas, celulose) e catalisadores (zeólitas). Normalmente, utiliza-se a difração de raios-X para obter informações acerca da estrutura dos polímeros ou dos materiais sólidos. No entanto, a difração de raios-X tem suas limitações nesta seara, haja vista que há uma necessidade de a amostra ser cristalina e muito materiais de interesse tecnológico não atendem a esse critério, ou tem baixa cristalinidade e os estudos por difração de raios-X ficam comprometidos. A espectroscopia de RMN no estado sólido fornece esses dados e distingue amostras cristalinas de não-cristalinas, ou ambientes mais cristalinos do que outros.

A principal barreira para obtenção de espectros de amostras no estado sólido são as interações dipolares. Como já dito anteriormente, as interações dipolares são inversamente proporcionais à distância. Considerando que no

estado sólido as moléculas estão mais próximas uma das outras, o efeito das interações dipolares se faz mais presente nos espectros, provocando uma maior dispersão das frequências de ressonância e, conseqüentemente, um alargamento do sinal.

Além de relacionar-se com a distância internuclear e as constantes magnetogíricas dos núcleos, as interações dipolares relacionam-se diretamente com o ângulo formado pelo vetor do campo externo B_0 e o formado pelos núcleos em questão. Essa relação pode ser expressa assim: $D \propto (3\cos^2 \theta - 1)$, onde D é a constante dipolar e θ é o ângulo formado pelo vetor internuclear e o campo externo B_0 .

Para vencer a barreira imposta pelas interações dipolares, foi necessário o desenvolvimento de equipamentos capazes de gerar altas potências de desacoplamento e rotação no ângulo mágico, que é assim chamado por ser o ângulo de $54,7^\circ$, que anula o termo $(3\cos^2\theta - 1)$.

A seqüência de pulsos mais simples utilizada para obtenção de espectro de RMN de amostra no estado sólido é a MAS (*Magic Angle Spinning*), que consiste em rotacionar a amostra no ângulo mágico, aplicar um pulso de rf e adquirir o sinal (FID – decaimento livre da indução). No caso de experimentos quantitativos, o intervalo entre cada pulso (soma dos tempos de aquisição e espera) deve ser no mínimo igual ao maior tempo de relaxação longitudinal observado para a amostra.

Para observar núcleos com baixos valores de razão magnetogírica e abundância isotópica, normalmente utiliza-se a seqüência CP-MAS (*Cross-Polarization Magic Angle Spinning*) que, além da rotação no ângulo mágico,

usa a condição de Hartmann-Hann para transferir a polarização do núcleo mais abundante para o menos abundante [35]. Em geral, utiliza-se a polarização do núcleo de ^1H para aumentar a intensidade do sinal de núcleos como ^{13}C ou ^{29}Si , por exemplo. Como a eficiência da transferência de polarização é diferente para cada núcleo observado e ainda depende do ambiente químico, em geral os espectros obtidos por CP-MAS não são quantitativos. Por outro lado, o que poderia ser uma desvantagem da técnica, pode ser explorado para estudos que dizem respeito à estrutura do composto, através da determinação do melhor tempo de contato para maximizar a transferência de polarização; a determinação do tempo de relaxação longitudinal no eixo rotatório ($T_{1\rho}$) e inferir sobre a cristalinidade ou taticidade do material, haja vista que tanto o $T_{1\rho}$ quanto o tempo de contato dependem da cristalinidade da amostra e das distâncias internucleares. Nesse contexto, a determinação do $T_{1\rho}$ e do tempo de contato (T_{CH}) é importante para inferir acerca da mobilidade e homogeneidade da amostra.

Além dos experimentos MAS e CP-MAS, outro experimento muito comum é o *Dipolar Dephasing* (DD). Este experimento utiliza a intensidade das interações dipolares C–H para distinguir entre carbonos não-protonados e protonados, bem como diferenciar entre carbonos molecularmente rígidos e aqueles que apresentam um maior grau de mobilidade. Em termos práticos, durante o intervalo de defasagem, ou seja, entre a transferência de polarização e a aquisição do sinal, o desacoplador é desligado. O mecanismo de relaxação é dominado pelo tempo de relaxação transversal T_2 . Carbonos diretamente ligados a átomos de hidrogênio, normalmente relaxam rapidamente, enquanto

os não-hidrogenados demoram mais. Com isso, deveríamos observar apenas carbonos não-hidrogenados no espectro. Por isso, antigamente esse experimento era denominado de *Non-Quaternary Suppression* (NQS). No entanto, essa denominação não é adequada, haja vista que as metilas, apesar de possuírem três átomos de hidrogênio, defasam lentamente devido à sua mobilidade, que diminui drasticamente a intensidade da interação dipolar. Então, são observados normalmente os carbonos não-hidrogenados e as metilas.

Como dissemos, as interações dipolares impuseram barreiras ao desenvolvimento da espectroscopia de RMN no estado sólido. Isso é tão intenso que praticamente a RMN no estado sólido foi desenvolvida utilizando carbono-13, devido à menor intensidade das interações dipolares e à maior janela espectral, comparadas ao hidrogênio. No entanto, com o desenvolvimento de seqüências de pulsos mais elaboradas e sondas mais sensíveis, a RMN de ^1H também ocupou seu espaço como ferramenta analítica para amostras no estado sólido.

Os experimentos apresentados são os mais comuns na espectroscopia de RMN no estado sólido. Dependendo da necessidade, há também experimentos bidimensionais e outras estratégias que podem ser utilizadas.

Em linhas gerais, podemos compreender o desenvolvimento da espectroscopia de RMN como o fruto da combinação de avanços alcançados em pesquisas específicas em RMN e em outras áreas do conhecimento, como as ferramentas matemáticas e de informática (software e hardware), bem como

a tecnologia dos supercondutores. A Figura 2 apresenta, de forma resumida, essa evolução ao longo das décadas.

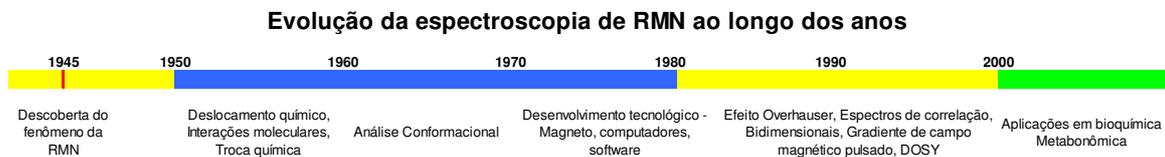


Figura 2 – Principais avanços da espectroscopia de RMN ao longo dos anos.

RMN e Metabonômica

Antes de tratarmos da estratégia metabonômica propriamente dita, precisamos discutir alguns conceitos correlacionados com o modelo desenvolvido, tais como: a análise de biofluidos, mais especificamente de urina; o desenvolvimento e as técnicas para diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C; e como a espectroscopia de RMN é utilizada na análise de material de origem biológica.

Análise de Biofluidos

No desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de biofluidos, há uma preferência natural por métodos não invasivos (reduzindo os riscos para o doador, seja ele humano ou não) e com o mínimo de interferência do analista – se possível, utilizando a amostra *in natura*, a qual deve ser mantida sob condições ambientais adequadas até o momento da análise. Esses cuidados minimizam os riscos de contaminação ou deterioração da amostra, o que comprometeria o método.

De uma maneira geral, os biofluidos utilizados em análises clínicas são urina e soro. Em casos mais específicos, outros biofluidos também são utilizados. Porém, urina e soro normalmente são pontos de partida para um diagnóstico clínico. Assim sendo e considerando que nosso trabalho foi realizado com amostras de urina, vamos restringir o presente texto a este tipo de amostra.

A Análise de Urina

Na prática clínica, um dos primeiros exames solicitados é o sumário de urina ou urinálise. Essa primazia não se deve apenas a uma questão histórica – a análise da urina foi uma das primeiras formas utilizadas pelo ser humano para avaliar sua saúde - mas, principalmente, por conta da importância de todo o processo que envolve a formação da mesma e a simplicidade na obtenção das amostras. Não é objetivo detalhar aqui esse processo. Porém, vamos procurar entendê-lo de uma forma simplificada.

A urina é produzida nos rins, em decorrência da filtração do sangue. Por outro lado, o fluxo de sangue pelos rins é determinado pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona. A renina é uma enzima produzida pelos rins, a qual controla a produção do hormônio aldosterona. Este, por sua vez, controla a reabsorção de sódio e água. Esse sistema está diretamente relacionado ao controle da pressão arterial. Assim, quando há uma queda na pressão arterial, a renina provoca a produção de aldosterona que, por sua vez, aumenta a reabsorção de água e sódio restabelecendo as condições hemodinâmicas. Isso acontece através da vasoconstrição arteriolar. O papel da angiotensina é estimular a liberação de aldosterona pelo córtex supra-renal. Dessa forma, é muito comum que problemas de hipertensão arterial estejam associados a problemas no sistema renina-angiotensina-aldosterona, e a profilaxia baseia-se, nesses casos, na administração de um diurético e/ou na utilização de drogas que regulam as enzimas de conversão da angiotensina (ECA).

A principal função do sangue é levar nutrientes e oxigênio para todas as células bem como trazer toxinas e gás carbônico para que possam ser

retirados do organismo. O material filtrado do sangue, que compõe a urina, contém informações riquíssimas sobre o metabolismo e, por conseguinte, o *status* clínico do indivíduo. Assim, na urina podem ser dosados diversos biomarcadores com essa finalidade, tais como: o teor de creatinina e uréia, que estão relacionados à atividade renal; glicose e grupos cetônicos, que se encontram presentes nas amostras de pacientes diabéticos; bilirrubina, testada em pacientes com suspeitas de hepatopatia; sangue, presente em casos de hemorragia que atingem o sistema urinário, podendo ser provocadas por cálculo renal ou infecção urinária; presença de cristais que podem estar associados à presença ou formação de calculo renal; nitritos, que indicam presença de bactérias na urina, dentre vários outros. Além das determinações específicas para certos biomarcadores, também são realizados outros ensaios com a urina e que são de grande importância na avaliação clínica do paciente ou para investigações de natureza forense, como: teste de gravidez, investigação de uso de drogas legais ou ilegais, ou até de natureza mais específica, como análise bacteriológica e investigação de doenças metabólicas hereditárias, como porfiria e glicosúria renal.

A Hepatite C e o seu Diagnóstico

O fígado é o maior órgão do corpo humano. No que diz respeito a sua posição no organismo, o mesmo é protegido pelas costelas no quadrante superior direito do abdômen humano, com a borda superior atingindo aproximadamente a altura dos mamilos. Há dois lobos anatômicos, sendo o direito cerca de seis vezes maior do que o esquerdo, e dois condutores sangüíneos principais: a veia porta, que traz o sangue venoso, contendo nutrientes, a partir dos intestinos e do baço, e a artéria hepática, que transporta sangue arterial com o oxigênio. A principal função do fígado está associada à sua atuação no metabolismo de lipídeos, proteínas, carboidratos e drogas, bem como a síntese de colesterol, fosfolipídeos e lipoproteínas. Assim, disfunções hepáticas podem trazer graves problemas para o indivíduo, podendo inclusive evoluir para óbito.

Hepatite é toda e qualquer inflamação do fígado podendo ter diversas origens, como as virais (hepatite A, B, C, D, E, etc.); as provocadas por uso de drogas lipossolúveis, como antiinflamatórios, anticoncepcionais, derivados imidazólicos; uso de bebidas alcoólicas; e distúrbios metabólicos, como doença de Wilson e hemocromatose, dentre outras formas. O que todas as hepatites têm em comum é o fato de agredirem com maior ou menor intensidade as células hepáticas e, de uma forma geral, o fígado.

Na sua maioria, as hepatites agudas são assintomáticas ou apresentam sintomas comuns a outras enfermidades virais, como febre, mal-estar e/ou dores musculares. Alguns casos podem evoluir com sintomas mais específicos, como icterícia, caracterizada pela coloração amarelo-dourada da pele e

conjuntivas. Em geral, a icterícia está associada à mudanças na coloração da urina e das fezes, devido à elevação nos níveis de bilirrubina. As hepatites crônicas também são, em geral, assintomáticas e podem progredir para cirrose hepática, algumas vezes culminando com o óbito do paciente.

Não há um método analítico que seja capaz de, por si só e ao mesmo tempo, detectar o tipo de agressão hepática, estimar a gravidade da mesma e indicar a melhor forma de tratamento. Assim, diversos métodos analíticos e determinações são utilizados para avaliar as alterações hepáticas. Os testes mais comuns que avaliam o grau de agressão ou lesão hepática são as determinações séricas dos níveis das aminotransferases (aspartato aminotransferase – AST/TGO e alanina aminotransferase – ALT/TGP), da fosfatase alcalina e da γ -glutamil transferase.

A aspartato aminotransferase é uma enzima mitocondrial presente em grande quantidade nas células que constituem o coração, o fígado, os rins e os músculos esqueléticos. O nível sérico dessa enzima aumenta quando há necrose de algum desses tecidos. A alanina aminotransferase, por sua vez, é uma enzima citosólica também presente em células hepáticas. Em termos absolutos, a concentração sérica de ALT é menor do que a observada para o AST. No entanto, proporcionalmente, há mais ALT nas células hepáticas do que nas outras células. Portanto, um aumento no nível sérico de ALT é mais específico como indicador de problemas hepáticos do que o aumento do nível sérico de AST.

Assim sendo, alterações nos níveis séricos das aminotransferases sugerem uma investigação para diagnóstico de hepatite, uma vez que essa

enfermidade é caracterizada pela destruição de células hepáticas liberando e aumentando os níveis séricos de ALT e AST. Confirmada a hepatite, investiga-se a sua causa, se viral ou não, seguindo-se o seu tratamento.

A fosfatase alcalina é uma enzima que é utilizada como biomarcador da atividade óssea, mas que também pode sugerir, quando há aumento do seu nível sérico, casos de colestase ou problemas das vias biliares. Um aumento isolado da fosfatase alcalina pode ter origem intestinal [36], mas um aumento concomitante do nível sérico da γ -glutamil transferase (γ -GT) confirma que o aumento da concentração sérica de fosfatase alcalina tem origem hepatobiliar e não óssea. A determinação da concentração sérica da γ -GT é de particular interesse quando se suspeita que a alteração hepática deve-se ao abuso de álcool ou de drogas lipossolúveis.

As determinações dos níveis séricos de γ -GT, fosfatase alcalina, ALT e AST são capazes de indicar se o tipo de dano ao fígado é hepatocelular ou se há colestase, por obstrução das vias biliares. No entanto, essas determinações não são capazes de diferenciar, por exemplo, uma hepatite viral da outra ou se a colestase é intra ou extra-hepática. Isso só é possível determinar com uso de técnicas de diagnóstico por imagem, como a ultra-sonografia, tomografia computadorizada ou MRI – Imagem por Ressonância Magnética, ou ainda através de biopsias ou testes sorológicos mais específicos.

No nosso trabalho, estamos interessados no diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), que constitui um problema de saúde pública mundial. Mais de 200 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o vírus da hepatite C e pelo menos 70% das infecções agudas progridem para

hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. Menos de 1% dos casos estão no norte europeu, enquanto mais de 29% dos casos são encontrados no norte do continente africano. A maior ocorrência é observada no Egito, cerca de 15%-20% dos casos no mundo; enquanto no Reino Unido e na Escandinávia, a prevalência é menor que 0,1%. Na Índia, por exemplo, estima-se que aproximadamente 2% das pessoas estejam infectadas pelo HCV. No Brasil, estima-se que oscile em torno de 3% a prevalência da infecção pelo HCV [37, 38]. Outra estimativa importante é que 27% dos casos de cirrose e 25% dos casos de carcinoma hepatocelular ocorrem em pacientes infectados pelo HCV.

A principal forma de transmissão do HCV é a parenteral, tornando os usuários de drogas injetáveis e os politransfundidos, como os pacientes com doenças renais e os hemofílicos, em grupos de risco. O mesmo raciocínio pode ser estendido para aquelas pessoas que tatuam o corpo sem tomar os devidos cuidados com a assepsia do material utilizado.

A evolução da infecção crônica pelo HCV é lenta e progressiva, podendo demorar 20 ou 30 anos, e o quadro clínico, na grande maioria dos casos, é assintomático. O diagnóstico da infecção, portanto, é fundamental, na medida em que se pode intervir com anti-virais e modificar a história natural da doença, impedindo sua progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular.

O diagnóstico da infecção pelo HCV não é freqüente durante a fase aguda [39]. As manifestações clínicas podem ocorrer dentro de 7 a 8 semanas (variando de 2 a 26 semanas) após exposição ao HCV, mas a maioria dos pacientes será assintomática ou apresentará sintomas leves como náuseas e

febre. A icterícia é observada em apenas 20% dos casos. Apesar de muito rara, a hepatite fulminante está descrita durante esse período [40]. A infecção aguda evolui para a infecção crônica na maioria dos casos (55% a 85%), sendo caracterizada por um período prolongado de tempo sem sintomas. Uma vez estabelecida a cronicidade da infecção, a recuperação espontânea da viremia é rara.

O maior problema acarretado pelo HCV é, sem dúvida, o processo inflamatório crônico com necrose persistente e regeneração dos hepatócitos, durante anos, promovendo a proliferação de fibroblastos com produção de colágeno (fibrose) e cirrotização do fígado [41]. O tempo médio entre a contaminação pelo HCV e o desenvolvimento de cirrose oscila em torno de 25 anos, embora em pacientes imunocomprometidos, como os transplantados, os co-infectados pelo HIV, pelo vírus da hepatite B, pelo *Schistosoma mansoni*, com consumo crônico de álcool, sobrecarga de ferro, esteato-hepatite não alcoólica, bem como os que fazem uso de drogas hepatotóxicas, haja um favorecimento e, conseqüentemente, desenvolvimento mais rápido do quadro de cirrose.

Após a cronificação, a hepatite C evolui de forma assintomática, podendo, no entanto, em alguns casos ser responsável por sintomas como: astenia, fadiga, artralgias e dores musculares que podem aparecer nesse período. A infecção pode provocar, também, as chamadas manifestações extra-hepáticas do HCV, dentre as quais se destacam: crioglobulinemia, porfiria cutânea tardia, doença linfoproliferativa, glomerulonefrite, líquen plano, tireoidite e sialoadenite auto-imunes e *diabetes mellitus*.

As complicações graves e o óbito eventualmente acometem aqueles pacientes com quadro de cirrose avançada, sendo estimado ocorrer em 20% dos casos. As clássicas complicações decorrentes da doença hepática terminal como: hemorragia digestiva, encefalopatia hepática, ascite, dentre outras, além do risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma, em torno de 4% ao ano, são responsáveis por uma alta morbimortalidade [42].

O diagnóstico da hepatite C baseia-se em dados clínicos, laboratoriais e morfológicos. Do ponto de vista clínico, os sintomas e sinais dependem do estágio da doença. Frequentemente, a hepatite crônica, mesmo na fase cirrótica, é assintomática, dificultando o reconhecimento da infecção. Os testes de rotina baseiam-se na detecção de anticorpos contra o HCV. Considerando-se que o período de janela para esse vírus varia de 4 a 6 semanas após a contaminação em pacientes imunocompetentes, esses testes não são eficazes nas fases iniciais. O período de janela pode ser maior em pacientes com o sistema imunológico comprometido, como é o caso daqueles com insuficiência renal, que necessitam de hemodiálise.

Os pacientes que apresentam cura espontânea ou terapêutica, ou seja, negatização da viremia por longos períodos, terão testes positivos para o anticorpo contra o HCV pelo resto de suas vidas, como uma cicatriz imunológica. Assim, o fato de os testes de rotina apresentarem resultados positivos para o anticorpo contra o HCV não significa que há necessariamente uma infecção em curso. Significa apenas que o paciente, em algum momento de sua vida, teve contato com o HCV. Normalmente esses testes são usados para rastreamento em bancos de sangue para excluir doadores que tiveram

contato com o vírus, mesmo que curados. Esse procedimento é importante, haja vista que a forma de contrair o HCV é semelhante para outros vírus, como o HIV ou mesmo vírus ainda desconhecidos. A política de saúde pública deve considerar essa possibilidade e, prudentemente, evitar o uso de sangue de doadores que tiveram contato com o HCV, mesmo que curados.

Os testes de rastreamento são basicamente de dois tipos: ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* ou RIBA – *recombinant immunoblot assay* [43]. Em termos de sensibilidade, os kits de terceira geração são mais sensíveis e específicos do que os de gerações anteriores. As três gerações do ELISA usam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos para captação do anticorpo para o HCV. O ELISA I tinha como alvo apenas um antígeno, o polipeptídeo c100-3, tendo uma sensibilidade da ordem de 80% e uma taxa de falso-positivos variando de 50%–70%. O ELISA II utiliza duas proteínas recombinantes do HCV, o c22-3 (derivada da região estrutural do vírus) e o c33-c (derivada da região não-estrutural NS3), além do polipeptídeo c100-3 fusionado com a proteína c33-c. Essa alteração fez com que o ELISA II reduzisse a taxa de falso-positivos para 40%–50% e aumentasse a sensibilidade. Outra vantagem do ELISA II em relação ao ELISA I foi a redução no tempo entre o momento da infecção e a detecção, que passou de 16 para 10 semanas com o ELISA II [44].

A terceira geração do ELISA apresenta uma nova configuração para os antígenos utilizados no ELISA II e adicionou um antígeno para a região NS5 do vírus. O principal ganho com o ELISA III foi a redução no tempo entre o momento da infecção e a detecção, que passou para 7 a 8 semanas, e um

aumento na sensibilidade. O ELISA se presta muito bem para rastreamento da infecção pelo HCV devido a sua alta sensibilidade. No entanto, devido a sua baixa especificidade, há a necessidade de testes suplementares, com maior especificidade, para confirmar a doença [45]. Por definição, a especificidade indica a proporção de pacientes com resultado negativo na ausência de infecção.

A determinação de uma infecção em curso é feita a partir da investigação da presença do vírus no soro, estabelecendo a presença do RNA do HCV através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A metodologia consiste na utilização de sondas de ácido nucléico (*primers*) que são fragmentos de DNA ou RNA com uma estrutura complementar a uma seqüência do ácido nucléico a ser investigado, nesse caso, o HCV. Com a PCR é possível a ampliação de seqüências genéticas específicas, de maneira que uma molécula de RNA ou DNA possa ser observada entre milhões de outras.

Em um primeiro momento, é necessário saber se há ou não o HCV na amostra do paciente. Isso requer um teste qualitativo. Um teste muito comum para essa finalidade é a PCR com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR), que catalisa a síntese do DNA complementar (DNAc) a partir da região 5'RNC do RNA viral. O limite teórico de detecção usando PCR oscila em torno de 1000 cópias do genoma por cm^3 . Outra estratégia utilizada para detecção qualitativa do RNA do HCV é a amplificação mediada pela transcriptase (TMA), que é um método simples, sendo capaz de detectar quantidades inferiores a 50 cópias do genoma por cm^3 . Inclusive, a OMS orienta que para tornar a administração de sangue e hemoderivados mais segura, a mesma seja

precedida por uma investigação do RNA do HCV por amplificação de ácidos nucléicos do HCV.

Na prática clínica, o diagnóstico inicia-se com a pesquisa de anticorpos contra o HCV, usando ELISA de segunda ou terceira geração. No entanto, em pacientes com hepatite crônica que não apresentam atividade inflamatória, ou que reajam positivamente para anticorpos contra o HCV, mas apresentam valores normais para as aminotransferases, é necessária a utilização do PCR qualitativo. Nesse caso, duas possibilidades se fazem presentes: ou o paciente está curado da hepatite (RNA do HCV negativo); ou a infecção está em curso (RNA do HCV positivo), mesmo com a normalidade nos níveis séricos das enzimas. Nesse caso, o tratamento pode ser feito, dependendo do resultado da biópsia.

A determinação da carga viral é importante na avaliação do prognóstico do paciente e na possibilidade de resposta ao tratamento antiviral [46]. Duas técnicas de biologia molecular são empregadas com essa finalidade: PCR e DNA ramificado, que difere da primeira porque se baseia na amplificação de um sinal e não do DNA.

Considerando que o genótipo do HCV responsável pela infecção é decisivo para o tratamento, identificá-lo é fundamental. O HCV é um vírus que tem pelo menos 6 (seis) genótipos e vários subtipos. O sequenciamento completo do genótipo é inviável para laboratórios clínicos, uma vez que envolve a identificação de quase 10 mil nucleotídeos e a subsequente construção de uma estrutura filogenética [47]. Assim, os métodos para genotipagem do HCV utilizam apenas algumas regiões mais conservadas do genoma, como as

proteínas do envoltório (E1), a *core* e a não-estrutural NS5B [48, 49]. Os pacientes infectados com genótipo I do HCV devem ser tratados por 48 semanas, enquanto aqueles infectados com o genótipo II ou III devem receber tratamento por 24 semanas.

A Espectroscopia de RMN e a Análise de Biofluidos

Historicamente, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) nunca foi muito explorada como ferramenta de análise de biofluidos. Todavia, há alguns relatos na literatura nesse sentido. Em 1957, Eric Odeblad propôs a utilização da espectroscopia de RMN ^1H para estudos de fluidos corporais [50]. Apesar de os espectros, naquele momento histórico, serem relativamente pouco informativos, o pesquisador advogava o estabelecimento de um “departamento de pesquisas médicas com RMN”.

Até o início dos anos 70, os estudos em RMN estavam direcionados para análise molecular e não tinham uma perspectiva clara no tocante a análise de biofluidos. Em 1971, Raymond Damadian demonstrou ser possível diferenciar tumores e tecidos normais a partir da análise dos seus tempos de relaxação [51]. Isso motivou uma corrida científica no sentido de utilizar a espectroscopia de RMN para o diagnóstico de doenças. Nesta mesma década, surgiu a tomografia computadorizada (TC) como ferramenta de diagnóstico e os hospitais passaram a investir grandes quantias na aquisição de instrumentação para ter uma estrutura de diagnósticos por imagem [52]. Nos últimos 30 anos, uma série de avanços foi implementada nesse campo, com o desenvolvimento da MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) e suas aplicações no diagnóstico clínico [53]. Por conta disso, ainda hoje, quando uma menção é feita à ressonância magnética entre os profissionais da medicina, a associação feita é com a MRI.

Por outro lado, sabe-se que a composição bioquímica dos biofluidos reflete o *status* metabólico do indivíduo. Assim sendo, conhecer

detalhadamente a composição do biofluido municia o profissional de saúde com informações importantíssimas a respeito do estado clínico e bioquímico do paciente. Esse foi o paradigma que orientou os primeiros trabalhos e estudos que utilizaram a espectroscopia de RMN com fins clínicos. As primeiras intervenções nesse sentido datam do início da década de 80 do século passado [54, 55] com estudos buscando identificar comprometimento da atividade renal ou de doenças metabólicas a partir de obtenção de espectros de RMN ^1H de amostra de urina. Há também o trabalho desenvolvido por Matsushita *et al* que obtiveram espectros de RMN ^1H de amostras de urina de humanos para determinar o teor de trimetilamina [56].

Alguns fatores influenciaram decisivamente para que, até o início dos anos 90, a espectroscopia de RMN não fosse muito utilizada em análise de biofluidos. O primeiro desses fatores é o fato de que os biofluidos possuem grande quantidade de água. Os espectros de RMN ^1H dos biofluidos são dominados pelo sinal de ressonância da água, o que inviabilizava a observação dos sinais de ressonância associado às moléculas dos metabólitos presentes nos mesmos. Essa dificuldade foi vencida com o surgimento das seqüências de pulsos para supressão do sinal da água, seja com a utilização de pulso de radiofreqüência, seja com a utilização de pulsos de gradiente de campo [57].

Mesmo sendo possível a obtenção de espectros de RMN ^1H com supressão do sinal da água, o desenvolvimento e a utilização de métodos de RMN ^1H nas análises de biofluidos não se tornaram freqüentes. Isso se deve a duas outras características da espectroscopia de ressonância magnética nuclear: a baixa sensibilidade e a sobreposição dos sinais de diferentes

metabólitos presentes nos biofluidos. Sendo pouco sensível e sem poder distinguir sinais de diferentes metabólitos, tudo caminhava no sentido de que a espectroscopia de RMN nunca poderia ser utilizada na análise de biofluidos. No entanto, com o desenvolvimento tecnológico e o surgimento de equipamentos com alto campo, atingindo frequências de ressonância de 300, 600 e 900 MHz, o problema da sobreposição e da sensibilidade foram atenuados.

A natureza não-seletiva da espectroscopia de RMN, que em princípio seria uma desvantagem da técnica para estudos de fluidos corporais, se mostra como uma qualidade muito importante se observada por outro prisma. Vejamos: com a espectroscopia de RMN torna-se possível a observação de efeitos de interação molecular e a construção de uma “impressão digital metabólica” que pode ser utilizada para fazer associações com disfunções orgânicas, desordens do metabolismo ou mesmo para estudar rotas metabólicas e toxicidade de fármacos. Mas, o fator responsável pela mudança de paradigma nesta seara foi a utilização de ferramentas estatísticas na interpretação dos dados de RMN ^1H . Ou seja, a análise multivariada dos espectros de RMN ^1H de biofluidos, utilizando técnicas como a análise de componentes principais (ACP) e análises de discriminantes (DA), por exemplo, permitiu associar mudanças no perfil de metabólitos endógenos dos biofluidos à exposição a agentes químicos, hábitos alimentares ou estados patológicos, sendo possível discriminar e agrupar as amostras sem a necessidade de pré-tratamentos mais elaborados ou separação física dos componentes da amostra, tal qual os tratamentos exigidos para as análises por via

cromatográfica, por exemplo. O objetivo a partir de então deixou de ser quantificar uma determinada substância no biofluido, mas observar mudanças no perfil de metabólitos endógenos neste biofluido. Há uma série de trabalhos nessa linha de pesquisa, utilizando urina e/ou soro, sejam provenientes de animais, sejam de humanos. Estes métodos são rápidos, simples, reprodutivos e, na maioria das vezes, minimamente invasivos - características essenciais para um bom método analítico. Isso deu origem a uma nova área do conhecimento denominada metabonômica [58-61].

Metabonômica

A metabonômica pode ser definida como a medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica, relacionada com o tempo, de sistemas vivos a algum estímulo fisiopatológico ou modificação genética [61]. Normalmente, a estratégia metabonômica é aplicada a biofluidos que são obtidos de maneira não-invasiva (urina) ou minimamente invasivas (sangue). Mas, há também relatos na literatura da utilização de biofluidos de obtenção mais complexa, como fluido cérebro-espinhal, seminal, sobrenadantes de cultura de células, extratos de tecidos e sêmen, dentre outros.

As análises clínicas, via de regra, buscam determinar a presença e a quantidade de algum biomarcador específico que possa auxiliar no diagnóstico de uma enfermidade. Para investigar o funcionamento dos rins, por exemplo, utiliza-se o teor de creatinina, que está associado à atividade renal; a função hepática é acompanhada pelos níveis séricos das aminotransferases (AST e ALT). Essas determinações podem ser feitas utilizando imunoenaios, como o ELISA ou utilizando algum método cromatográfico mais específico, como

HPLC-MS (cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas) ou GC-MS (cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas).

Durante a década de 90, foram introduzidas algumas ferramentas analíticas que tinham como objetivo comum descrever qualitativa e quantitativamente todos os compostos de baixa massa molecular presentes numa célula animal ou vegetal. Esse conjunto de técnicas foi denominado metabolômica, a partir do conceito de metaboloma [62]. Por definição, metaboloma é o conjunto de todas as moléculas de baixa massa molecular (metabólitos) presentes numa célula que, em geral, participam de reações metabólicas e são necessárias para o funcionamento normal, manutenção e crescimento de uma célula. Esses metabólitos são compostos orgânicos (aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, lipídeos e carboidratos, por exemplo), inorgânicos e espécies elementares. A extensão do metaboloma varia bastante dependendo do organismo que está sendo estudado. Por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae* contém cerca de 600 metabólitos, enquanto o metaboloma humano possui centenas de milhares de metabólitos primários e secundários.

Quando comparamos o metaboloma com o proteoma (combinações a partir de 20 aminoácidos) e o transcriptoma (combinações a partir de 4 bases nucleotídicas ligadas com açúcar e grupos fosfatos), o metaboloma oferece infinitas possibilidades de combinação, o que produz uma grande variação nas propriedades físicas (volatilidade) e químicas (massa molecular, ligações de hidrogênio, polaridade, solubilidade). Além disso, a concentração desses

metabólitos pode variar, em ordem de grandeza, de pM (10^{-12} mol/L) até mM (10^{-3} mol/L). Com tantas variáveis, determinar todos esses metabólitos a partir de uma simples análise (metabolômica) é tecnologicamente impossível na atualidade.

Diferentemente da estratégia normalmente aplicada nas análises clínicas convencionais e na metabolômica, a estratégia metabonômica fundamenta-se num princípio básico dos sistemas vivos denominado de homeostase: toda vez que um ser vivo é exposto a algum agente tóxico, patológico ou mesmo a alguma situação de estresse, o organismo responde no sentido de restabelecer a situação de equilíbrio, de forma semelhante à do Princípio de Le Chatelier. Essa busca por restabelecer o estado de equilíbrio, provoca uma alteração na concentração de metabólitos endógenos nos biofluidos envolvidos no processo. Na análise clínica convencional, os métodos visam determinar a presença ou a alteração na concentração de um metabólito específico, seja ele endógeno ou exógeno. Na estratégia metabonômica analisa-se o biofluido como um todo e, usando ferramentas estatísticas, associam-se mudanças no perfil dos metabólitos presentes no biofluido com a agressão sofrida.

No desenvolvimento das estratégias metabolômica e metabonômica, alguns conceitos são importantes, tais como:

Análise de Metabólitos – Determinação qualitativa e quantitativa de um ou mais metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica. Esse tipo de análise exige uma preparação cuidadosa da amostra com a separação do metabólito de interesse. Normalmente, utiliza-se uma separação cromatográfica seguida de um método sensível de detecção, como MS

(espectrometria de massas) ou UV/VIS (espectroscopia na região do ultravioleta e visível), garantindo, assim, baixos limites de detecção.

Perfil Metabólito – Identificação e quantificação de um conjunto de metabólitos previamente definidos, geralmente relacionados a alguma rota metabólica específica. Assim como na análise de metabólitos, uma preparação criteriosa da amostra seguida de análise cromatográfica e MS ou UV é necessária. Na indústria farmacêutica, esse expediente é utilizado com frequência no estudo de novas drogas, na identificação dos metabólitos exógenos para identificar a rota metabólica da droga e toxicidade, bem como no estudo dos efeitos do tratamento terapêutico.

“Impressão Digital Metabólica” – É uma análise global e rápida, objetivando classificar uma amostra. A identificação e quantificação dos metabólitos normalmente não são necessárias. Ou seja, é uma ferramenta de rastreamento utilizada para discriminar amostras de diferentes origens ou *status* biológico. O tratamento da amostra é simples e, como não é necessária uma separação cromatográfica, o tempo de análise é muito curto. No entanto, o sucesso dessa técnica está diretamente ligado a uma adequada manipulação dos dados usando ferramentas estatísticas apropriadas. Isso é necessário porque não há uma etapa de separação dos metabólitos e, portanto, a sobreposição dos dados é uma constante.

A “impressão digital metabólica” está particularmente inserida na estratégia de análise metabonômica, uma vez que dispensa a identificação dos metabólitos, visando única e exclusivamente classificar as amostras. No nosso trabalho, é esse modelo que adotamos.

Apesar da “impressão digital metabólica” dispensar a identificação dos metabólitos, quando a análise utiliza a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, em muitos casos isso é possível. É comum na literatura [63] a identificação de alguns metabólitos – creatinina, lactose, óxido de trimetil amônio (TMAO), por exemplo, nos espectros de RMN ^1H de urina ou soro, quando for o caso. Há inclusive a construção de bancos de dados com essas informações.

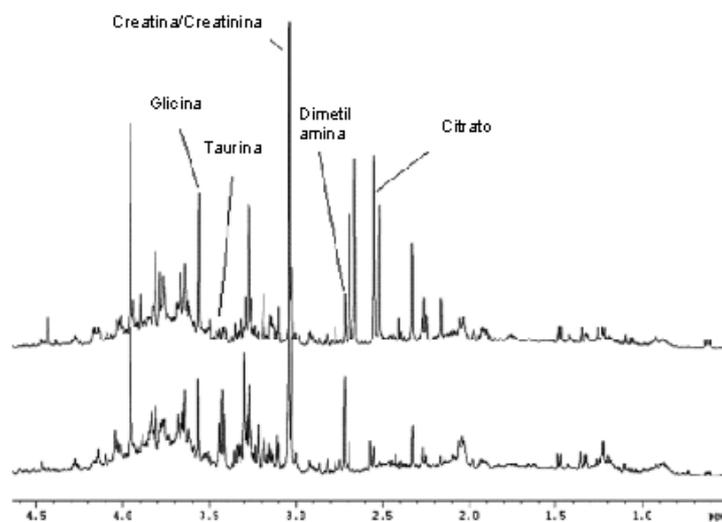


Figura 3 – Identificação de metabólitos em espectro de RMN ^1H de urina de humanos.

Então, se o objetivo é identificar e quantificar um determinado metabólito ou um conjunto de metabólitos, as técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massas são imbatíveis. Por outro lado, se o objetivo é traçar um perfil metabólico e associá-lo a alguma doença ou circunstância em particular, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem uma importante contribuição a dar. A espectrometria de massas, associada às técnicas cromatográficas, é a grande rival da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, se é que podemos assim afirmar, no que diz respeito à sua aplicação para fins metabonômicos [64-66]. De uma maneira geral, a

espectrometria de massas, acoplada a algum sistema cromatográfico, se presta muito bem na identificação química dos metabólitos e, por conta de sua alta sensibilidade e seletividade, na quantificação desses metabólitos no biofluido. Por outro lado, a ressonância magnética nuclear é muito prática no tocante à preparação da amostra, reprodutibilidade, versatilidade e na construção de perfis espectrais correlacionados com a condição biológica do doador da amostra.

Um fator complicador para utilizar o espectro de RMN ^1H da urina humana para fins de diagnóstico, ou classificação, está associado à grande variabilidade na composição de metabólitos endógenos quando comparada à composição de metabólitos endógenos presentes em urina de cobaias. Isso se dá por conta de fatores como mudanças na dieta, hábitos culturais, condições climáticas, dentre outros [67]. Bollard e colaboradores [68] compararam os dados espectrais obtidos a partir de urina de humanos, coelhos, ratos e camundongos, e demonstraram que a variância nos dados de humanos é significativamente maior do que as obtidas a partir de cobaias.

Essa variação é preocupante uma vez que a mesma pode ser (e freqüentemente é) mais significativa do que a variação que o pesquisador, porventura, queira investigar. Em outras palavras, em estudos que utilizam análise de componentes principais (ACP), as primeiras componentes estarão, via de regra, associadas a essas variações inerentes e não ao objeto de investigação. Isso explica o fato de ser mais comum na literatura observarmos maior número de trabalhos, no caso de amostras de humanos, que utilizam

análise de discriminantes (DA), uma vez que esta ferramenta faz uma associação direta com o objeto de estudo, do que trabalhos que utilizam ACP.

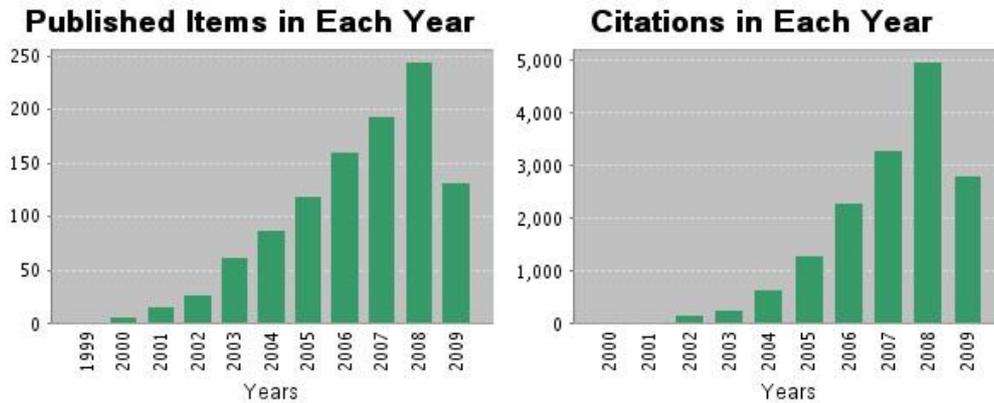


Figura 4 – Evolução do número de publicações (esquerda) e citações (direita) para os tópicos metabonomics ou metabonomic na web of science® (ISI Web of KnowledgeSM) – Pesquisa realizada em 02.07.2009.

O desenvolvimento da metabonômica como ferramenta analítica é uma realidade inegável na comunidade científica. A Figura 4 apresenta análise estatística, obtida no site da *Web of Science*®, com a evolução no número de artigos publicados ao longo dos anos para os tópicos *metabonomic or metabonomics*, bem como o número de citações com os mesmos termos. Podemos observar que os primeiros trabalhos surgiram em 2000 e que tanto o número de publicações quanto o de citações crescem fortemente ao longo dos anos. Até a data da pesquisa, haviam 1.053 artigos publicados, 15.861 citações e índice-h igual a 59.

Estatística Multivariada

Nenhum trabalho que envolva técnicas metabonômicas é suficientemente claro se não fizer uma abordagem sobre estatística multivariada e quimiometria propriamente dita. Neste trabalho, faremos uma abordagem teórica, sem aprofundamentos matemáticos, mas garantindo um rigor conceitual para que possamos compreender todas as etapas da construção do modelo. Não trataremos de todas as ferramentas multivariadas, mesmo porque este não é o objetivo do trabalho, mas daquelas que, do nosso ponto de vista, poderiam ser aplicadas ao problema.

O problema que estamos estudando claramente necessita de uma abordagem multivariada. Por isso, precisamos escolher o método mais adequado. Existem várias ferramentas multivariadas disponíveis para as mais diversas necessidades. Por exemplo: se o objetivo da análise é verificar o quanto as amostras se relacionam ou o quanto elas são semelhantes segundo as variáveis estudadas, as ferramentas mais indicadas são a análise de grupos (*cluster analysis*) e a análise de componentes principais (ACP); se a finalidade é fazer previsões, a regressão linear múltipla ou redes neurais podem ser utilizadas; se o trabalho envolve variáveis de classe, ou seja, se o problema é de classificação, a análise de discriminantes apresenta-se como opção.

O nosso problema inicial envolve variáveis de classes, uma vez que temos que classificar amostras de urinas a partir dos espectros de RMN de ^1H , como sendo de pacientes infectados, ou não, pelo vírus da hepatite C. Isto sugere o uso da análise de discriminantes. Por outro lado, nosso problema também parte do pressuposto de que as amostras dos pacientes positivos para

o HCV têm (ou deveriam ter) algo em comum e diferente das amostras fornecidas por pacientes que testaram negativo para o HCV. Isso motiva o uso de uma abordagem com base em análises de grupos ou de componentes principais.

Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (ACP) é realizada quando se pretende simplificar a descrição de um conjunto de dados, cujas variáveis são correlacionadas entre si, sem perder a informação contida nas mesmas. A técnica pode ser compreendida como um método para transformar o conjunto de variáveis originais e correlacionadas em um novo conjunto de variáveis não-correlacionadas, denominadas componentes principais. Cada componente principal (CP) é uma combinação linear das variáveis originais e explica parte da variância dos dados que não é explicada por nenhuma outra CP. Os coeficientes dessa combinação linear traduzem a importância de cada variável original para a componente. Em outras palavras: cada variável original tem um peso característico para a CP.

Em geral, as CPs são apresentadas em ordem decrescente em função do quanto elas explicam da variância dos dados. Ou seja, a CP1 é aquela que explica a maior parte da variância, seguida da CP2, da CP3 e assim por diante. É comum a representação gráfica a partir das primeiras componentes principais (CP1 *versus* CP2, por exemplo), uma vez que nessas componentes principais está a maior parte da variância dos dados. Porém, nem sempre essas componentes estão relacionadas ao objeto de estudo, sendo necessário utilizar outras componentes principais. No nosso estudo, essa afirmação se faz

presente, uma vez que o objeto de investigação – infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), não é a principal fonte de variação nos dados espectrais fornecidos pelas amostras de urinas. Assim sendo, nesses casos podem ser utilizadas outras ferramentas de estatística multivariada, ou mesmo associar mais de uma ferramenta.

A análise de componentes principais produz duas matrizes, sendo uma matriz formada pelos *scores* de cada amostra nas referidas combinações lineares, ou seja, CP, e uma segunda matriz formada pelos pesos de cada variável original nas CP. A representação gráfica citada acima é feita a partir da projeção dos *scores* de cada amostra nas CP. Portanto, cada amostra é um ponto no gráfico CP1 *versus* CP2, por exemplo.

É possível também representar graficamente os pesos de cada variável original para um conjunto de duas ou três CPs, obtendo assim um gráfico bi ou tridimensional. Essa representação é requerida quando se pretende analisar quais variáveis originais são mais importantes para distinguir as amostras.

Análise de Discriminantes

A análise de discriminantes é usada para classificar uma amostra dentro de uma população, distinguindo-a, em um universo de dois ou mais grupos, a partir de um conjunto de medidas. De uma forma geral, a análise de discriminantes é feita com um conjunto de amostras, denominado *grupo de treinamento*, cuja classificação é conhecida. Essas análises servem para a construção do modelo estatístico que será utilizado para classificar amostras de classificação desconhecida.

Diferentemente da análise de componentes principais, onde as variáveis são tratadas de forma igualitária, a análise de discriminantes requer a existência de dois grupos de variáveis: variáveis dependentes e variáveis independentes.

Antes de tratarmos da análise de discriminantes, propriamente dita, é necessário entendermos o conceito de classificação. Em estatística, utilizam-se diferentes métodos para avaliar a função discriminante. Um desses métodos é a chamada *função de classificação*.

Normalmente, quando a análise de função discriminante é utilizada para distinguir entre dois grupos, o método de Fisher e a função de classificação são utilizados. Vamos nos deter a esse tipo de caso (dois grupos), uma vez que é essa a situação que estamos estudando. Para ilustrar, suponhamos que uma determinada amostra pertença a um de dois grupos. Podemos considerar que essa amostra pode ser classificada em um desses grupos a partir de uma medida de uma característica, denominada X . Consideremos também que dispomos de amostras representativas de cada um dos grupos e temos a medida da característica X para cada uma dessas amostras. Com isso, podemos construir um gráfico da distribuição dos valores de X para cada um dos grupos. Esses valores podem ser representados como na Figura 5.

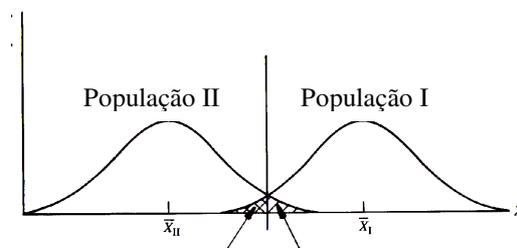


Figura 5 – Distribuição hipotética de freqüências de dois grupos

A partir da Figura 5, podemos deduzir que valores pequenos de X induzem-nos a classificar a amostra como pertencente ao grupo II, enquanto valores altos levam a classificar a amostra como integrante do grupo I. Mas, como definimos o que são valores altos e o que são valores baixos? Além disso, podemos observar também que há uma região de sobreposição no gráfico, o que provoca classificações dúbias. Como medir o grau de classificações incorretas?

O primeiro questionamento é solucionado admitindo-se um ponto C , intermediário, e classificando a amostra no grupo I se $X \geq C$, caso contrário, a amostra é classificada no grupo II. Considerando que os grupos têm a mesma variância, então o valor de C é:

$$C = \frac{(\bar{X}_I + \bar{X}_{II})}{2}$$

Onde: \bar{X}_I e \bar{X}_{II} são as médias aritméticas das medidas da característica X para os grupos I e II.

Este valor de C garante que as duas probabilidades de erro são iguais. No entanto, essa é uma situação idealizada que dificilmente acontece em casos reais. O que normalmente acontece é que as variâncias raramente são iguais e as distribuições de freqüência são grandes, provocando uma grande sobreposição nas distribuições. Isso pode ser minimizado aumentando o número de variáveis utilizadas para a classificação. Por exemplo, se utilizarmos duas variáveis, X_1 e X_2 , para a classificação, podemos produzir dois gráficos de distribuição univariada para os grupos. A combinação desses gráficos origina uma sobreposição, via de regra, menor entre as distribuições, conforme representado na Figura 6.

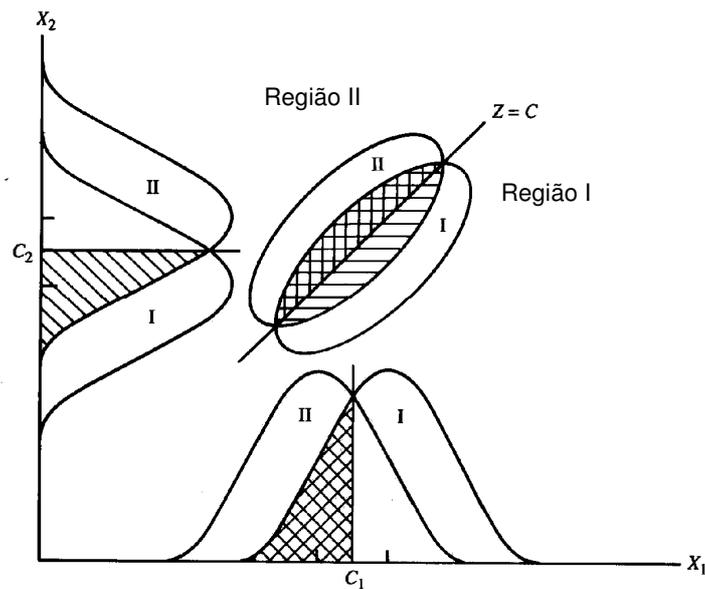


Figura 6 – Classificação em dois grupos a partir de duas variáveis.

A linha que divide a região de sobreposição das distribuições, na representação bivariada, foi representada por Fisher como uma equação $Z = C$, onde Z é uma combinação linear de X_1 e X_2 , denominada de **função discriminante de Fisher**, assim representada:

$$Z = (a_1 X_1 + a_2 X_2)$$

Enquanto C é uma constante assim definida:

$$C = \frac{(\bar{Z}_I + \bar{Z}_{II})}{2}$$

Onde: \bar{Z}_I e \bar{Z}_{II} são as médias aritméticas dos valores de Z nos grupos I e II.

A Figura 6 apresenta a distribuição de freqüência de Z separadamente para cada grupo. Neste caso, o problema de classificação bivariada é reduzido para uma situação univariada usando a variável Z .

Considerando que Z é uma combinação linear, podemos associar então uma variância S_Z^2 . Portanto, no caso de dois grupos, podemos definir a distância (D^2) entre os dois grupos assim:

$$D^2 = \frac{(Z_I - Z_{II})^2}{S_Z^2}$$

D^2 é chamado de distância Mahalanobis e os coeficientes da combinação linear (a_1 e a_2) da função discriminante são escolhidos de maneira a produzir o maior valor possível de D^2 , diminuindo a probabilidade de classificação dúbia. Estes coeficientes da combinação linear não são diretamente comparáveis. No entanto, uma indicação do efeito relativo de cada variável sobre a função discriminante pode ser obtida se padronizarmos esses coeficientes usando a matriz de covariância. Esses coeficientes assim obtidos são denominados de coeficientes discriminantes padronizados.

Mesmo escolhendo adequadamente os coeficientes da combinação linear, sempre há a possibilidade de fazer uma classificação errada. Assim, é interessante calcular a probabilidade de um determinado caso ser classificado em um ou outro grupo, o que é feito após a análise. Por conta disto, esta é denominada de probabilidade posterior. A amostra é associada ao grupo de maior probabilidade posterior.

Por definição, o ponto C produz uma igualdade nos erros de classificação, seja na classificação equivocada de um caso da população I na população II, ou vice-versa. No entanto, o valor de C pode ser ajustado para produzir outra razão de probabilidades de erro. Para isso, precisamos entender o conceito de probabilidade *a priori*. Partindo do princípio de que uma

população é constituída de populações sobrepostas, é interessante examinar o tamanho relativo das mesmas. A probabilidade *a priori* da população I é a probabilidade de um indivíduo escolhido aleatoriamente ser da população I. Em outras palavras, é a proporção de indivíduos da população sobreposta que são da população I. Assim, a probabilidade *a priori* de não pertencer à população I (e ser da população II, no caso de dois grupos) é a unidade menos a probabilidade de pertencer à população I. Num modelo multivariado normal, o valor ideal para C é dado pela expressão:

$$C = \left[\frac{(\bar{Z}_I + \bar{Z}_{II})}{2} \right] + \ln \left(\frac{q_{II}}{q_I} \right).$$

Onde: \bar{Z}_I e \bar{Z}_{II} são as médias aritméticas dos valores de Z nos grupos I e II; e q_{II} e q_I são as probabilidades *a priori* para os grupos II e I, respectivamente. Se q_{II} e q_I são iguais, então o segundo termo da expressão é eliminado ($\ln \left(\frac{q_{II}}{q_I} \right) = 0$) e voltamos à equação inicial.

Usar as mesmas amostras que foram utilizadas na construção da função de discriminação para avaliar o modelo não é a forma mais apropriada de avaliação. O ideal é ter dois conjuntos de amostras, sendo o primeiro conjunto utilizado para a construção do modelo e o segundo grupo para avaliá-lo. Porém, nem sempre isso é possível, uma vez que para tal seria necessário um grande número de amostras. Uma alternativa viável é utilizar o método da validação cruzada, que consiste em retirar uma amostra do conjunto e construir o modelo com as demais amostras e usando este modelo para classificar a amostra excluída. O mesmo procedimento é feito para todas as amostras. Ao

final do processo, avaliam-se os números de classificações corretas e incorretas obtidos pelos modelos.

A avaliação também é feita a partir das distâncias Mahalanobis (D^2), determinando a probabilidade (Prob) de uma amostra do grupo II, por exemplo, ser classificada no grupo I e vice-versa, usando a expressão:

$$\text{Prob} = \left| \frac{\left(K - \left(\frac{1}{2} \right) D^2 \right)}{D} \right|, \quad \text{onde } K = \ln \left(\frac{q_{II}}{q_I} \right)$$

No entanto, é fundamental selecionar corretamente as variáveis que serão utilizadas no modelo, selecionando apenas aquelas que têm melhor correlação com o problema estudado. Em outras palavras, selecionando aquelas variáveis que distinguem as amostras pertencentes a grupos diferentes. Alguns procedimentos podem ser utilizados para esse propósito. As técnicas de seleção de variáveis consistem de passos sucessivos e são denominadas de regressão passo a passo. Nós podemos descrever esses procedimentos considerando certos subconjuntos de variáveis independentes, no nosso caso, deslocamentos químicos (δ), e selecionando aqueles subconjuntos que apresentam maior correlação com a variável dependente.

Porém, antes de apresentar os procedimentos de seleção de variáveis, é importante descrever um importante teste que será utilizado na seleção das variáveis independentes que melhor se relacionam com a variável dependente. Esse teste é denominado de teste F.

Consideremos que nós estamos convencidos de que as variáveis X_1 , X_2 , X_3, \dots , X_P devem ser utilizadas na equação de regressão linear de um determinado sistema. Consideremos também que dispomos também das

medidas de Q variáveis adicionais ($X_{P+1}, X_{P+2}, \dots, X_{P+Q}$). Antes de decidirmos se alguma das variáveis adicionais deve ser adicionada à equação de regressão, devemos testar a hipótese de que, como um grupo, as Q variáveis não melhoram a equação de regressão. Para isso, inicialmente determinamos a soma residual quadrática da equação que foi construída com todas as (P + Q) variáveis (RSS_{P+Q}); repetimos o procedimento e calculamos a soma residual quadrática da equação que foi construída apenas com as P primeiras variáveis (RSS_P). O teste F é calculado assim:

$$F = \frac{\left[\frac{RSS_P - RSS_{P+Q}}{Q} \right]}{\left[\frac{RSS_{P+Q}}{(N - P - Q - 1)} \right]}$$

Onde N é o número total de medidas.

A hipótese é rejeitada se o valor de F for maior do que o valor de F tabelado no nível de confiança desejado para Q e (N – P – Q – 1) graus de liberdade.

Dito isto, consideremos a análise de discriminantes (DA) propriamente dita. Em linhas gerais, a DA é uma regressão multivariada que utiliza como variável dependente uma variável de classe. Assim sendo, é possível utilizar o teste F para testar a hipótese de que uma determinada variável é significativa ou não na construção da função discriminante.

Então, retomando à questão da seleção das variáveis, o primeiro procedimento que iremos descrever trata-se do método de seleção progressiva (*forward stepwise*). Inicialmente, poder-se-ia, a partir da matriz de correlação, selecionar a variável com maior correlação absoluta com a variável

dependente. Em seguida, selecionar-se-ia uma segunda variável, que necessariamente não seria a que tem maior correlação com a variável dependente, mas seria aquela que minimiza a soma residual quadrática deixada pela primeira variável selecionada. Isso equivale a dizer que a segunda variável selecionada vai maximizar o valor do teste F, indicando que esta variável é significativa para o modelo. O procedimento é repetido até que o examinador esteja satisfeito com o modelo. Mas, quando isso acontece? Em geral, utiliza-se o teste F também com essa finalidade, ou seja, determinar um valor de corte. Esse valor normalmente é denominado de **F-to-enter**.

Um segundo procedimento utilizado para seleção das variáveis a serem utilizadas na função discriminante é o método da eliminação passo a passo retroativa (*backward stepwise*). Neste método, inicia-se o processo com todas as variáveis na função discriminante e, uma de cada vez, as variáveis são eliminadas da função, utilizando novamente o teste F para distinguir as variáveis que são significativas das que não são significativas para a modelagem. Aqui, o valor de F utilizado como corte é denominado de **F-to-remove**.

Outra forma de tratar a questão da escolha das variáveis para o modelo é considerar a contribuição de conjuntos de variáveis e escolher o conjunto que melhor distingue os grupos. Isso pode ser feito utilizando um parâmetro denominado *lambda* de Wilks, que é um valor, entre 0 e 1, que indica o quanto uma variável é importante para o modelo. Quanto mais próximo de 1, mais importante é a variável para o modelo. A rigor, o *lambda* de Wilks é um teste estatístico utilizado na Análise da Variância Multivariada (MANOVA) para testar

se há diferença entre as medidas de grupos conhecidos, a partir da combinação de um conjunto de variáveis dependentes. Dessa forma, o lambda de Wilks é uma medida direta da proporção da variância na combinação das variáveis dependentes que não é explicada pela variável independente. Se uma grande proporção da variância é explicada pela variável independente, pode-se concluir que há um efeito a partir da variável independente e que, portanto, os grupos têm valores médios diferentes. Para uma leitura mais aprofundada sobre as ferramentas utilizadas na estatística multivariada, pode-se utilizar os livros de Afifi & Clark e Kachigan [69, 70].

Capítulo II

Desenvolvimento

A Multidisciplinariedade da Espectroscopia de RMN

O nosso trabalho desenvolveu-se a partir de algumas parcerias que foram estabelecidas no sentido de usar a espectroscopia de RMN para solucionar diferentes tipos de problemas relacionados com a estrutura química de determinados compostos e materiais, investigações forenses e estudos de mecanismos de reação e processos, explorando assim o caráter multidisciplinar da espectroscopia de ressonância magnética multinuclear.

Assim, nós utilizamos as mais diferentes técnicas em solução e no estado sólido para: a) elucidação estrutural – cloridrato de cocaína, “crack” e um organohalogenado, que fora utilizado como inalante, levando a vítima a óbito; b) assinalamento e criação de banco de dados espectrais – série de trifluoroboratos orgânicos e 1,2,4-oxadiazóis; c) estudos de mecanismos de reação e processos – formação do complexo de Meisenheimer durante hidrólise alcalina do 3,5-dinitro benzoato, formação de *N*-(arilaminometil) ftalimidas, estabilidade de polifosfatos frente à radiação gama, efeito das ondas de ultrassom sobre solução de polianilina em DMSO e investigação de erro de formulação de fármaco; d) metabonômica – investigação de infecção pelo vírus da hepatite C usando amostras de urina dos pacientes.

Todas essas parcerias são descritas nas páginas que seguem.

Cocaína e suas formas de apresentação: Cloridrato de Cocaína e “Crack”

A cocaína é um composto organo-nitrogenado extraído de uma planta nativa da América do Sul popularmente conhecida como coca (*Erythroxylum coca*). A mesma é encontrada normalmente na forma de pasta de coca, também chamada de *bazuca*, que é um extrato de folhas de coca misturadas com água, querosene e ácido sulfúrico; cloridrato de cocaína, que é um pó branco, cristalino, solúvel em água e que se decompõe quando submetido à altas temperaturas; ou na forma de base livre ou “crack”. A base livre e o “crack” têm a mesma estrutura química, diferindo apenas na forma de obtenção. A primeira é obtida a partir da dissolução do cloridrato de cocaína em água, adicionando uma base, como a amônia, e um solvente orgânico, como éter. Assim, o alcalóide dissolve-se na fase orgânica, podendo ser retirado da mesma por evaporação. O “crack”, por sua vez, é obtido de forma mais simples, bastando adicionar hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio e aquecer a mistura, obtendo um sólido que é comercializado na forma de pedras. Essa forma de obtenção tem a vantagem de não utilizar um solvente orgânico [71].

É comum na Bolívia, por exemplo, o hábito de mascar folhas de coca. Essa prática não produz os efeitos causados pelo uso de formas purificadas do entorpecente devido à limitada absorção gastrointestinal e da pequena quantidade de cocaína contida nas folhas de coca.

Por conta de suas diferentes propriedades químicas, cloridrato e alcalóide têm diferentes formas de administração. O cloridrato de cocaína, devido a sua solubilidade em água e o fato de decompor-se frente a altas temperaturas, normalmente é utilizado por via intravenosa ou intranasal.

O “crack” e a base livre, devido a seus pontos de fusão, podem ser fumados isoladamente ou misturados com maconha ou tabaco. A presença residual de éter na base livre traz risco e desconforto adicionais ao usuário, com isso observa-se uma redução gradual na sua utilização, tendo o “crack” passado a ser a formulação preferencial.

A tipificação do crime, segundo o Código Penal Brasileiro, quando alguém é apreendido com cloridrato de cocaína ou “crack”, é a mesma. No entanto, na rotina de investigação policial é importante determinar toda a rede envolvida com o tráfico de entorpecentes. Ou seja: é fundamental, para a investigação, determinar a historicidade da amostra. A autoridade policial não pode ficar a mercê de depoimentos e confissões apenas. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de análise que possam auxiliar a investigação.

A análise de cocaína inclui testes de orientação e confirmação. Os testes de orientação são de fácil operação, rápidos e simples, mas com baixa especificidade. Ou seja, com muitos casos de falsos-positivos. Assim, para efeitos de desdobramentos jurídicos, testes mais específicos são necessários para confirmação.

Os testes de confirmação normalmente são baseados em técnicas de cromatografia em fase gasosa (GC), ou líquida (HPLC), acopladas a sistemas

de detecção que apresentam alta taxa de sensibilidade e especificidade, como os espectrômetros de massas (MS) e espectrofotômetros no ultravioleta-visível (UV-Vis) [72, 73]. A vantagem na utilização do GC-MS é o fato de obtermos dois parâmetros de confirmação: o tempo de retenção (a partir do GC) e o espectro de massas, com dados que dizem respeito à estrutura do analito, funcionando como uma “impressão digital” do composto.

No entanto, esses testes não distinguem o cloridrato de cocaína do “crack”, uma vez que após o pré-tratamento a substância é analisada na forma de alcalóide. Neste trabalho, nós utilizamos a espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , no estado líquido e sólido, visando caracterizar e distinguir essas duas formas de apresentação da cocaína.

Distinção entre Cloridrato de Cocaína e “Crack” usando Técnicas de RMN em Solução e no Estado Sólido

A espectroscopia de RMN no estado sólido é uma poderosa ferramenta para fins de elucidação estrutural e para o estudo de cristalinidade dos compostos, sendo capaz de distinguir as formas cristalinas e amorfas de uma dada substância. É muito utilizada no desenvolvimento e estudo de polímeros, novos materiais, na indústria petroquímica e na engenharia, tendo também relato de utilização na ciência forense, com a caracterização de comprimidos de ecstasy [74]. Neste trabalho, nós caracterizamos e distinguimos amostras de cloridrato de cocaína e “crack” apreendidas no estado da Paraíba, pelas polícias civil e federal.

Procedimento Analítico

As amostras de cloridrato de cocaína e “crack” foram obtidas em operações policiais no estado da Paraíba e a confirmação de que se tratam de cocaína foi feita utilizando GC-MS.

Os espectros de massas foram obtidos utilizando um espectrômetro Finnigan MAT GCQ Ion Trap acoplado com um cromatógrafo em fase gasosa, equipado com uma coluna DB-5, 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A energia do impacto de elétrons para obtenção do espectro foi igual a 70 eV e a fonte de íons foi mantida a 175°C. As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura inicial do forno igual a 60°C, taxa de aquecimento igual a 10°C.min⁻¹, temperatura final do forno igual a 275°C e temperatura do injetor igual a 250°C. O gás de arraste utilizado foi hélio, com velocidade linear de 40 cm.s⁻¹ e razão de divisão igual a 1:60.

Os espectros de RMN em solução foram obtidos usando os seguintes parâmetros: ^1H – janela espectral igual a 5 kHz, tempo de aquisição igual a 3,7 s e 16 repetições; ^{13}C – janela espectral igual a 16,5 kHz, tempo de aquisição igual a 2,5 s, tempo de espera igual a 2,0 s e 512 repetições; os espectros bidimensionais foram obtidos com a amostra parada, enquanto ^1H , ^{13}C e DEPT foram obtidos com rotação de 20 Hz. Todos foram obtidos à temperatura ambiente. No processamento dos espectros ^{13}C e DEPT utilizou-se *line broadening* igual a 1,0 Hz. Utilizou-se os deslocamentos dos hidrogênios residuais dos solventes (D_2O – δ 4,72 ppm e CDCl_3 – δ 7,26 ppm) como referência interna de deslocamento químico.

Os espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido (CP-MAS e CP-MAS-DD) foram obtidos usando rotor de nitreto de silício, com 5 mm de diâmetro interno, girando no ângulo mágico (MAS – $54,7^\circ$) com rotação variando de 4 – 5 kHz. Utilizou-se janela espectral igual a 50 kHz, tempo de contato igual a 800 ms, tempo de espera igual a 2,0 s, tempo de aquisição igual a 50 ms e 512 repetições. Os espectros foram processados usando *line broadening* igual a 10 Hz. O sinal do grupo metil do hexametilbenzeno (HMB) foi utilizado com referência externa de deslocamento químico (δ 17,3 ppm).

Resultados e Discussão

A Figura 7 apresenta as fórmulas estruturais da cocaína, nas formas de alcalóide e de cloridrato.

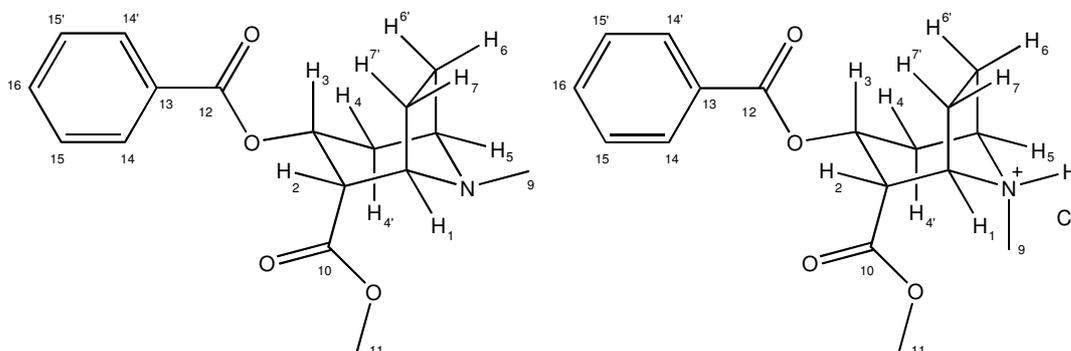


Figura 7 – Fórmulas estruturais da base livre de cocaína (esquerda) e cloridrato de cocaína (direita).

Considerando que as amostras utilizadas no estudo são resultado de apreensão policial, se fez necessário caracterizá-las; o que foi feito usando a espectrometria de massas. Todas as amostras foram dissolvidas em clorofórmio e estavam, portanto, na forma de base livre. O espectro de massas, Figura 8, apresenta alguns sinais que se destacam: o íon-molecular m/z 303 e o pico base m/z 82, tendo ainda outro sinal muito intenso em m/z 182.

O espectro é semelhante ao encontrado na literatura [75] e na biblioteca de espectros Wiley229 para a cocaína (CAS 50-36-2), podendo os sinais destacados ser atribuídos às espécies apresentadas na Figura 9.

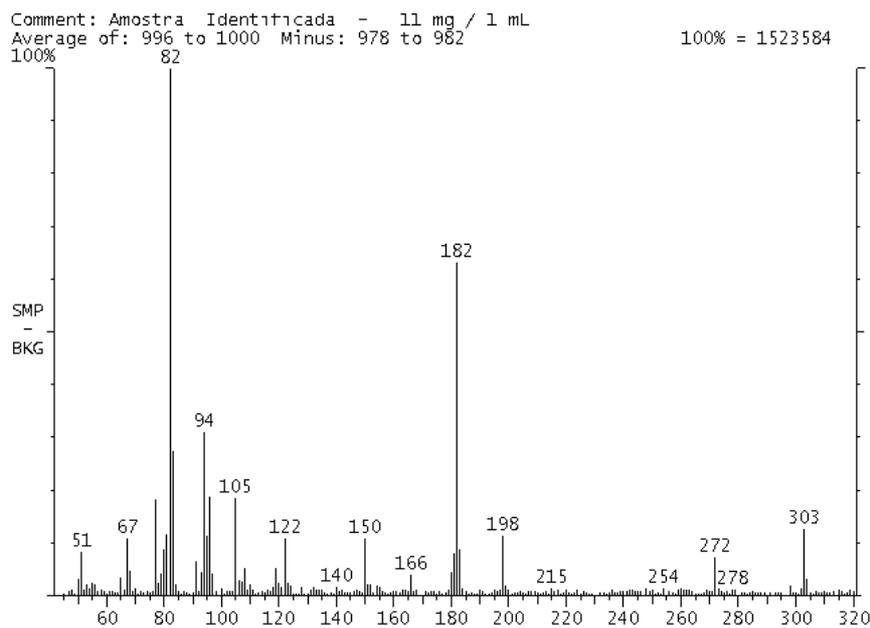


Figura 8 – Espectro de massas de amostra de cocaína apreendida durante operação policial na Paraíba. GCQ Ion Trap, 70 eV.

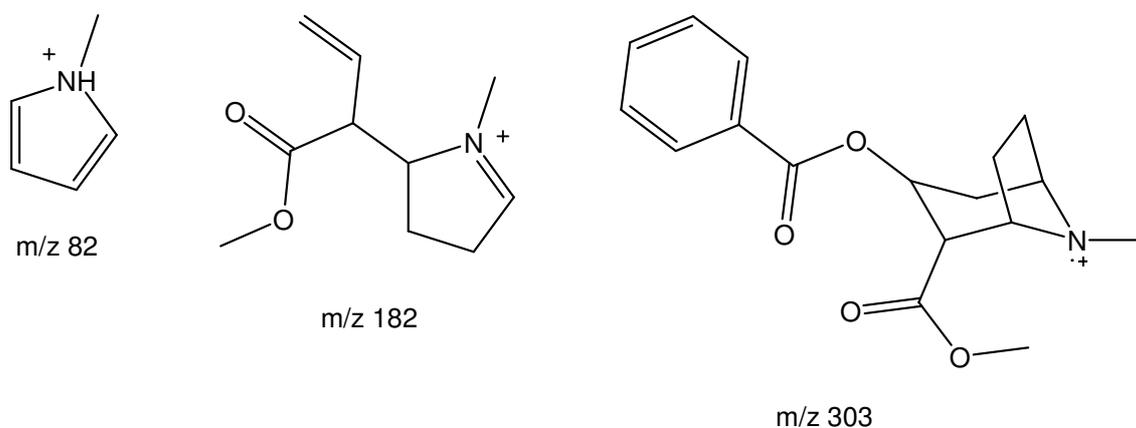


Figura 9 – Espécies presentes no espectro de massas da cocaína.

Após confirmar que as amostras efetivamente são de cocaína, a classificação como cloridrato de cocaína ou alcalóide deu-se a partir da solubilidade das mesmas (água – cloridrato; solventes orgânicos – base livre) e pelo aspecto físico (pó cristalino e branco – cloridrato; pequenas pedras e pó amarelado – base livre).

Caracterização por RMN em solução

Inicialmente, obtivemos os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C em solução, sendo que para as amostras de cloridrato de cocaína foram obtidos espectros em D_2O , enquanto os da base livre foram obtidos em CDCl_3 . A partir de experimentos COSY, HETCOR, HMBC e NOESY, foi possível fazer uma atribuição completa para os sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C observados.

Os espectros que serão discutidos nas próximas linhas foram obtidos em CDCl_3 e, portanto, tratam-se de espectros de amostras na forma de alcalóide. No entanto, a discussão também é válida para o caso do cloridrato de cocaína, cujos espectros foram obtidos em D_2O .

O espectro de RMN de ^1H (Figura 10) apresenta três sinais com deslocamento químico (δ) entre 7,0 e 8,0 ppm, correspondendo aos hidrogênios do grupo benzoato. Há dois simpletos em δ_{H} 2,3 e 3,7 ppm, que são atribuídos às metilas H-9 e H-11, respectivamente.

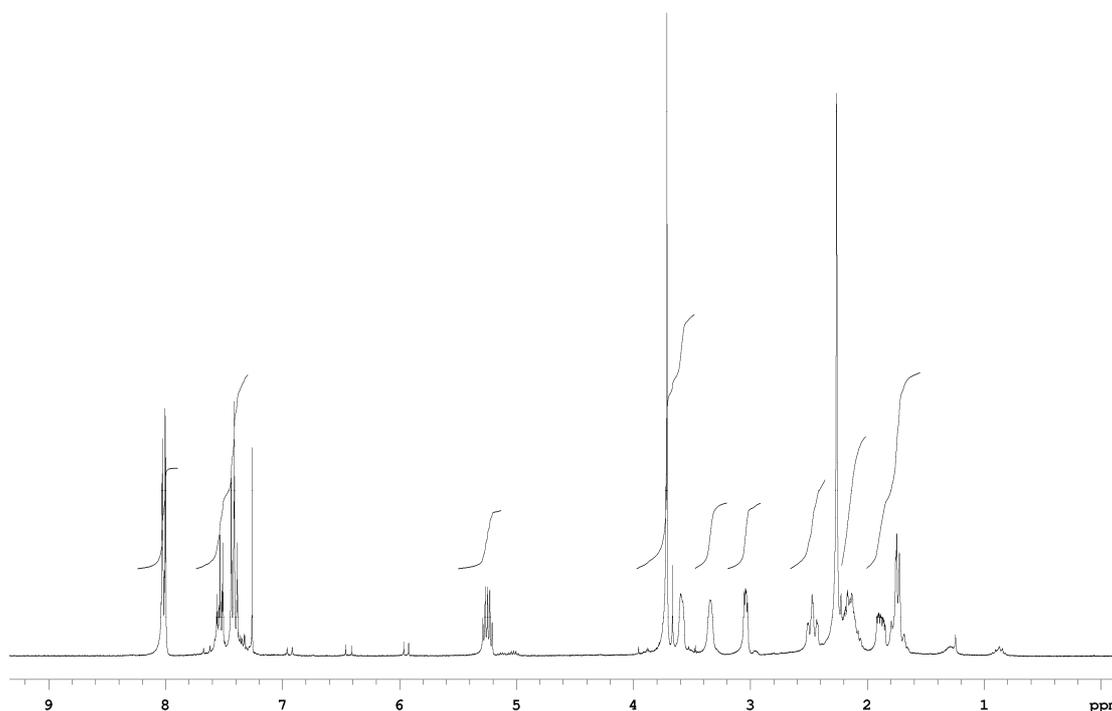


Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H da amostra de crack, $B_0 = 7,04\text{ T}$, CDCl_3 .

No espectro DEPT, Figura 12, apenas 12 sinais são observados. Comparando o espectro DEPT com o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11), que apresenta 15 sinais e considerando que a cadeia carbônica da cocaína apresenta 15 carbonos magneticamente diferentes, pode-se atribuir o sinal em δ 130,1 ppm ao carbono aromático substituído (C-13), enquanto os sinais em δ 166,1 e 170,7 ppm podem ser atribuídos às carbonilas.

No espectro DEPT podemos ainda observar três sinais atribuídos aos CH's aromáticos – δ entre 120 e 140 ppm; quatro CH's atribuídos ao anel tropano – δ entre 40 e 70 ppm; três metilenos – δ entre 20 e 40 ppm; e dois grupos metilas – δ entre 30 e 55 ppm.

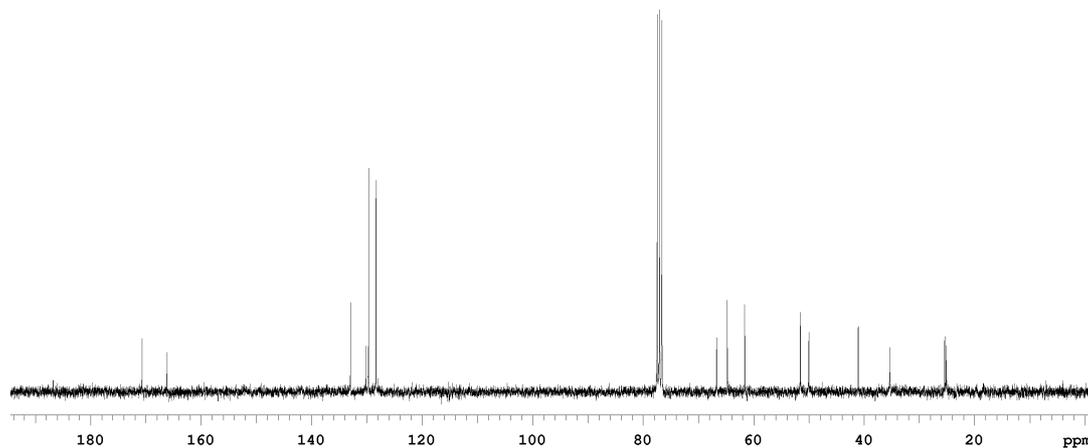


Figura 11 – Espectro RMN de ^{13}C da amostra de crack, $B_0 = 7,04 \text{ T}$, CDCl_3 .

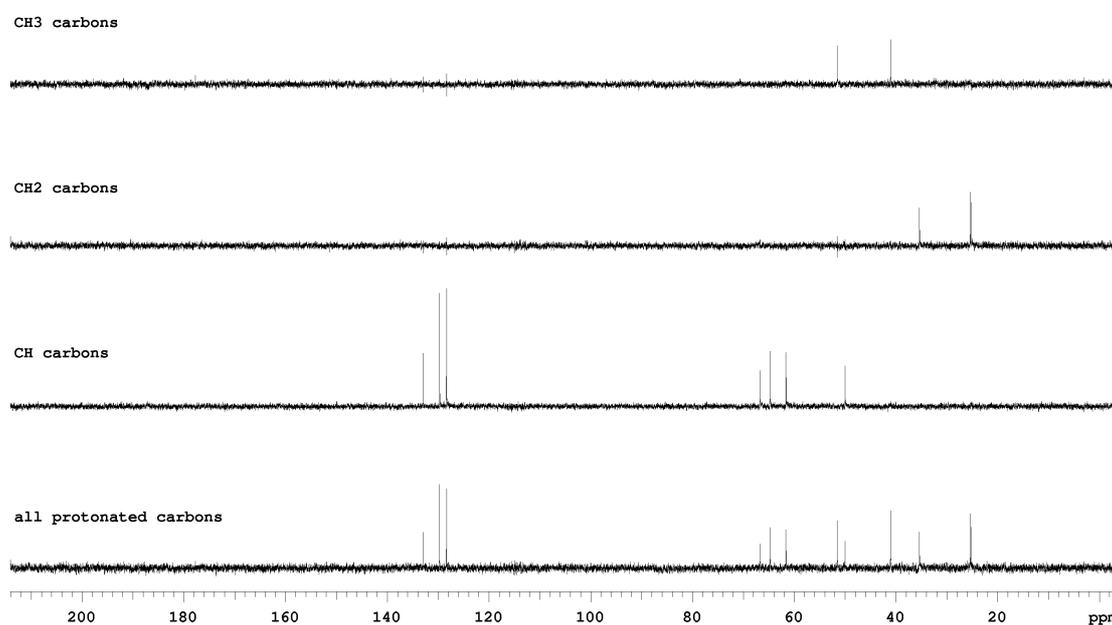


Figura 12 – Espectro DEPT da amostra de crack, $B_0 = 7,04 \text{ T}$, CDCl_3 .

Os espectros 2D HETCOR e HMBC foram configurados de maneira tal que podemos observar acoplamentos $J_{\text{C-H}}$ da ordem de 140 Hz (normalmente $^1J_{\text{C-H}}$) e 8,0 Hz (normalmente $^3J_{\text{C-H}}$), respectivamente.

No espectro HETCOR, Figura 13, o sinal em δ_{H} 3,7 ppm apresentou correlação com o sinal em δ_{C} 51,5 ppm, enquanto o sinal em δ_{H} 2,3 ppm correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 41,1 ppm. Assim, esses sinais são atribuídos aos grupos metilas C-11 e C-9, respectivamente. Essa atribuição é confirmada pelo espectro DEPT.

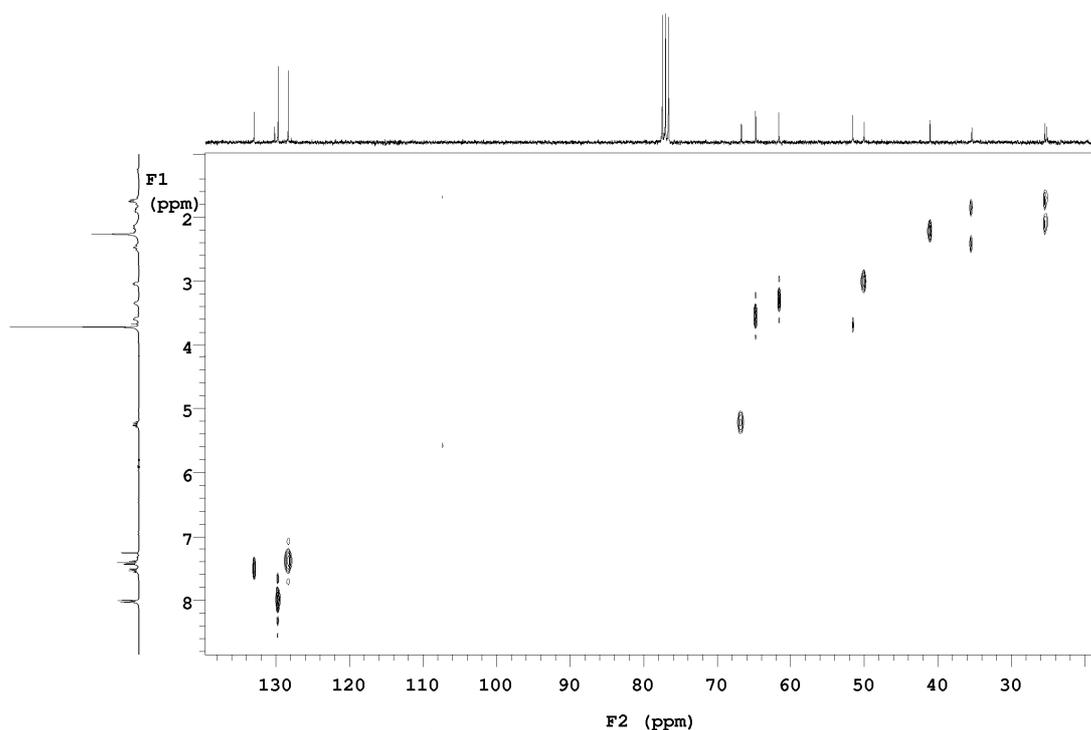


Figura 13 – Espectro HETCOR (^1H , ^{13}C) da amostra de crack em CDCl_3 , $B_0 = 7,04 \text{ T}$.

Na região dos sinais atribuídos aos carbonos do anel aromático, há um sinal não hidrogenado, já assinalado como C-13 (δ 130,1 ppm), dois sinais de mesma intensidade (δ 128,3 e 129,7 ppm) e outro menos intenso e mais desblindado (δ 132,9 ppm). Este último sinal pode ser atribuído ao carbono C-16 e, usando o espectro HETCOR, o próton H-16 apresenta-se em δ 7,6 ppm. Para atribuir os outros dois sinais de carbono nessa região, precisamos utilizar o espectro HMBC (Figura 14). O sinal do carbono C-14 deve apresentar correlação HMBC com a carbonila C-12, enquanto a carbonila C-10 deve apresentar correlação HMBC com a metila C-11. Com isso, podemos atribuir os sinais com δ_{C} 128,3 e 129,7 ppm aos núcleos C-15 / C-15' e C-14 / C-14'. Os sinais com δ_{C} 166,1 e 170,7 ppm são atribuídos às carbonilas C-12 e C-10, respectivamente. Voltando ao espectro HETCOR, podemos atribuir os sinais em δ_{H} 7,4 e 8,0 ppm aos núcleos H-15 / H-15' e H-14 / H-14', respectivamente.

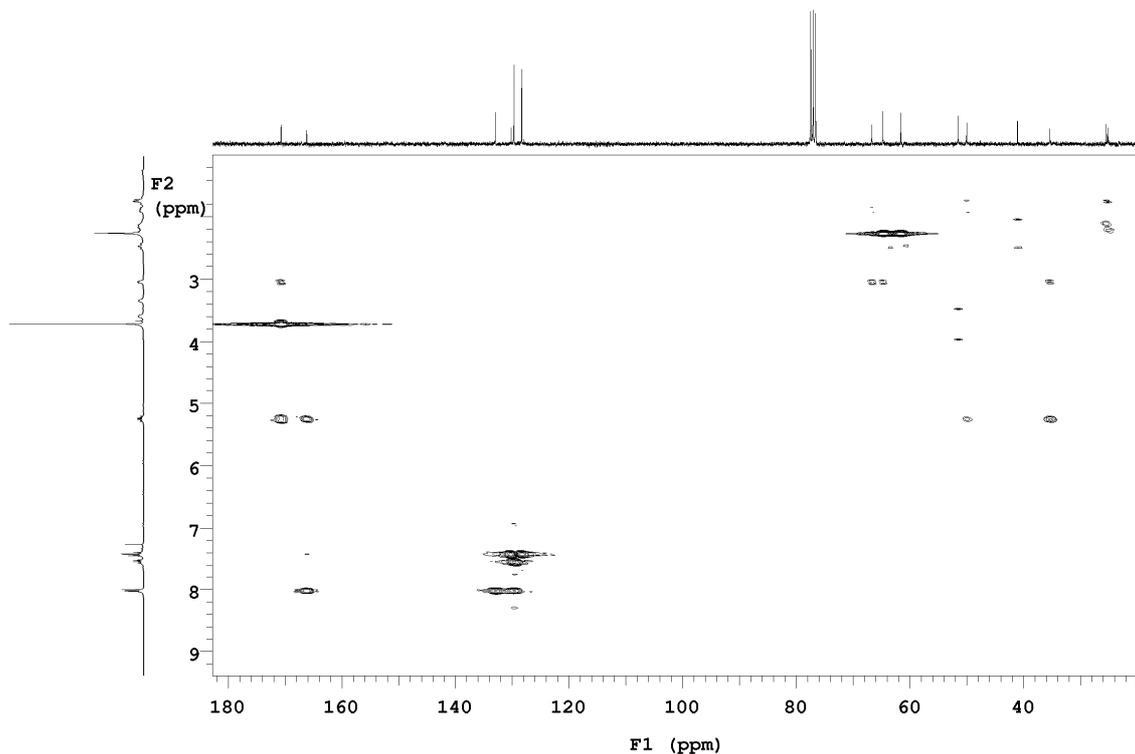


Figura 14 – Espectro HMBC (^1H , ^{13}C) da amostra de crack em CDCl_3 , $B_0 = 7,04 \text{ T}$.

Para finalizar a atribuição, precisamos voltar nossa atenção para o anel tropano. Este anel possui sete carbonos e dez hidrogênios magneticamente diferentes. No espectro de RMN de ^1H , observa-se um multipletto em δ_{H} 5,2 ppm, que no espectro HETCOR correlaciona-se com o sinal em δ_{C} 66,7 ppm. Esses sinais podem ser atribuídos aos núcleos H-3 e C-3, respectivamente.

No espectro DEPT, observa-se três sinais atribuídos a grupos CH_2 – δ_{C} 25,1, 25,4 e 35,3 ppm. Considerando que os ambientes químicos dos núcleos C-6 e C-7 são semelhantes, podemos atribuir o sinal em δ_{C} 35,3 ppm ao carbono C-4. Os dois átomos de hidrogênio ligados ao carbono C-4 são química e magneticamente diferentes, um tendo a orientação equatorial e o outro a orientação axial. Assim, eles apresentam-se no espectro de RMN de ^1H com deslocamentos químicos diferentes. De fato, no espectro HETCOR, observamos que o sinal em δ_{C} 35,3 ppm correlaciona-se com dois sinais no

espectro de RMN de ^1H – δ_{H} 1,9 e 2,5 ppm, que são atribuídos aos núcleos H-4 e H-4'. Para distinguir esses núcleos vamos usar, mais adiante, o efeito nuclear Overhauser.

No espectro HMBC, os sinais em δ_{C} 61,6 e 64,7 ppm apresentam correlação com o sinal em δ_{H} 2,3 ppm, atribuído ao grupo metil H-9. Considerando que apenas o sinal em δ_{C} 64,7 ppm apresenta correlação HMBC com sinal em δ_{H} 3,0 ppm, podemos atribuir os sinais em δ_{C} 61,6 e 64,7 ppm aos núcleos C-5 e C-1, respectivamente. A partir do espectro HETCOR, os núcleos H-1 e H-5 apresentam-se com δ_{H} 3,6 e 3,4 ppm, respectivamente.

Ainda no espectro HMBC, o sinal atribuído à carbonila C-10 (δ 170,7 ppm) apresenta correlação com um sinal em δ_{H} 3,0 ppm que, por sua vez, apresenta correlação HMBC com os sinais em δ_{C} 64,7 e 66,7 ppm, atribuídos aos núcleos C-3 e C-1; e um sinal em δ_{C} 35,3 ppm, atribuído ao núcleo C-4. Assim, o sinal em δ_{H} 3,0 ppm pode ser atribuído ao núcleo H-2. Este sinal apresenta correlação no espectro HETCOR com o sinal em δ_{C} 50,0 ppm, atribuído, portanto, ao carbono C-2.

No espectro HETCOR, os sinais em δ_{C} 25,1 e 25,4 ppm apresentam, ambos, correlação com os sinais em δ_{H} 1,7 e 2,2 ppm. Esses sinais correspondem aos núcleos H-6 / H-7 e H-6' / H-7'. Isso se justifica sabendo-se que os átomos de hidrogênio ligados ao carbono C-6 são química e magneticamente diferentes e, portanto, têm deslocamentos químicos diferentes. Raciocínio semelhante pode ser empregado no caso dos átomos de hidrogênio ligados ao carbono C-7. Então, os sinais atribuídos aos núcleos H-6

e H-7, assim como os sinais atribuídos aos núcleos H-6' e H-7', apresentam-se sobrepostos no espectro de RMN de ^1H .

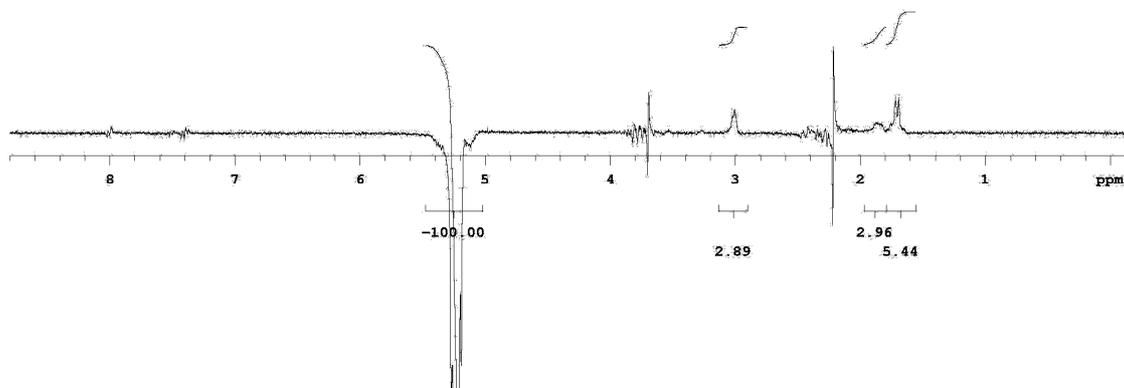


Figura 15 – Espectro NOEdiff da amostra de crack em CDCl_3 . Saturação do sinal em δ 5,2 ppm

A atribuição correta para os núcleos H-6, H-6', H-7 e H-7' só pode ser feita observando o efeito nuclear Overhauser. De acordo com as estruturas e numeração que apresentamos (Figura 7), os núcleos H-6', H-7' e H-3 estão espacialmente próximos e, portanto, devem apresentar efeito Overhauser, enquanto os núcleos H-6 e H-7 estão distantes e seguramente não apresentam NOE com H-3. A Figura 15 apresenta a subtração entre os espectros de RMN de ^1H obtidos com e sem saturação do sinal atribuído ao núcleo H-3, em δ 5,2 ppm. Observa-se o efeito nuclear Overhauser para três sinais no espectro, em δ 1,7 (5,4%), 1,9 (3,0%) e 3,0 ppm (2,9%). Assim, o sinal em δ 1,7 ppm é atribuído aos núcleos H-6' e H-7', enquanto os sinais em δ 1,9 e 3,0 ppm são atribuídos aos núcleos H-4 e H-2, respectivamente. Por conseqüência, os núcleos H-6 e H-7 apresentam-se no espectro em δ 2,2 ppm, enquanto o núcleo H-4' apresenta-se em δ 2,5 ppm.

Tabela 1 – Atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das amostras de “crack” e cloridrato de cocaína.

Número (Figura 7)	“Crack” em CDCl_3		Cloridrato de Cocaína em D_2O	
	RMN de ^1H (δ - ppm)	RMN de ^{13}C (δ - ppm)	RMN de ^1H (δ - ppm)	RMN de ^{13}C (δ - ppm)
1	3,6	64,7	4,1	63,9
2	3,0	50,0	3,5	46,1
3	5,2	66,7	5,4	64,5
4	1,9		2,1	
4'	2,5	35,3	2,4	32,7
5	3,4	61,6	4,0	63,2
6	2,2		2,4	
6'	1,7	25,4	2,0	23,8
7	2,2		2,3	
7'	1,7	25,1	2,3	22,7
9	2,3	41,1	2,8	39,0
10	-	170,7	-	173,3
11	3,7	51,5	3,5	53,4
12	-	166,1	-	167,2
13	-	130,1	-	128,5
14 / 14'	8,0	129,7	7,8	129,6
15 / 15'	7,4	128,3	7,4	129,0
16	7,6	132,9	7,6	134,5

No caso do cloridrato de cocaína, pequenas variações nos valores de δ são observadas, principalmente no anel tropano. Essas variações são em função da formação do sal e do efeito do solvente, que provocaram um ligeiro aumento nos valores de δ_{H} e uma redução nos valores de δ_{C} . É interessante notar que os valores de δ_{C} e δ_{H} para os núcleos C-5 e H-5 aumentaram no cloridrato de cocaína. Isto pode ser explicado considerando que a formação do cátion diminui a densidade eletrônica em C-5 e H-5, desblindando-os.

Caracterização por RMN no estado sólido

Os espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS das amostras de cloridrato de cocaína e “crack”, Figuras 16 e 17, apresentaram três regiões distintas: a primeira, entre δ 10 ppm e 70 ppm, contendo os sinais correspondentes aos

carbonos alifáticos; uma segunda, entre δ 120 ppm e 140 ppm, contendo os sinais atribuídos aos carbonos aromáticos; e, por fim, uma região entre δ 150 ppm e 170 ppm, com os sinais atribuídos às carbonilas. Os sinais atribuídos às bandas laterais também são visíveis nos espectros. Por sinal, devido às bandas laterais, a obtenção dos espectros foi realizada com rotação superior a 4 kHz, para evitar a sobreposição de sinais das bandas laterais, devidas aos sinais da região aromática, com os sinais das carbonilas.

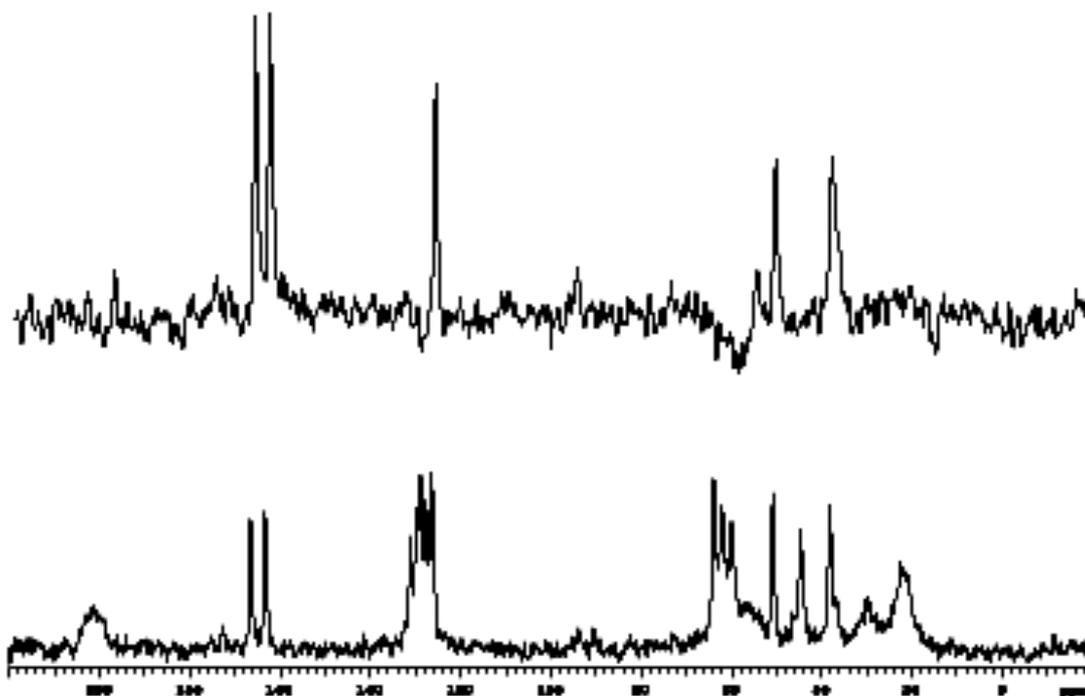


Figura 16 – Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS (inferior) e ^{13}C CP/MAS/DD (superior) da amostra de cloridrato de cocaína, 75.4 MHz.

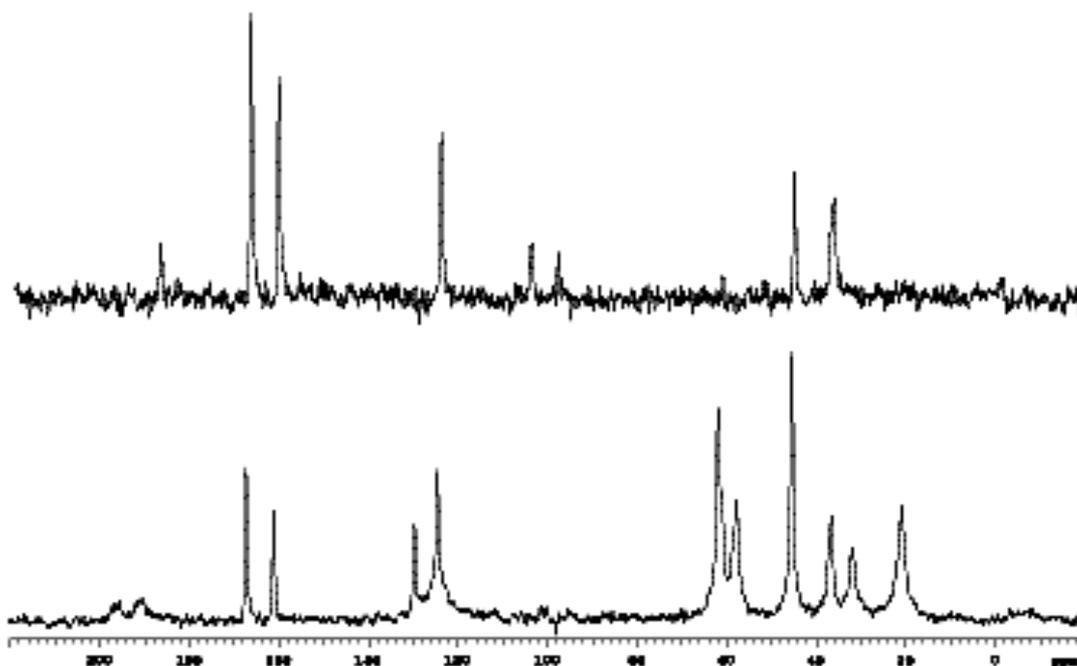


Figura 17 – Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS (inferior) e ^{13}C CP/MAS/DD (superior) da amostra de “crack”, 75.4 MHz.

No espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da amostra de “crack”, observamos os dois sinais correspondentes às carbonilas C-10 e C-12, com δ_{C} 167.5 ppm e 161.4 ppm, respectivamente; e apenas dois sinais na região aromática, em δ_{C} 124.9 ppm e 130.0 ppm, o qual pode ser atribuído ao carbono C-16, enquanto o sinal em δ_{C} 124.9 ppm é uma sobreposição atribuída aos sinais dos carbonos C-13, C-14 e C-15.

O espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS/DD apresenta apenas os sinais referentes a núcleos não ligados a átomos de hidrogênio. A exceção fica para as metilas, que normalmente não são totalmente eliminadas do espectro. Isso acontece, como já afirmamos, devido ao rápido movimento desses grupos, aumentando o tempo de relaxação dos respectivos núcleos. Assim, analisando o espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS/DD da amostra de “crack”, podemos confirmar as atribuições feitas para as carbonilas, observar que o sinal

correspondente ao carbono C-13 apresenta-se com δ_C 124.9 ppm e identificar os sinais correspondentes às metilas C-9 e C-11 em δ_C 36.8 ppm e 45.5 ppm, respectivamente.

Na região entre δ_C 10 e 70 ppm, deveríamos observar 9 (nove) frequências de ressonância correspondendo aos núcleos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9 e C-11. No entanto, observamos apenas 6 (seis) sinais, o que implica dizer que há sobreposição de sinais nessa região. Então, usando as informações obtidas no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS/DD e a atribuição feita a partir dos experimentos em solução, concluímos que os sinais devidos aos núcleos C-6 e C-7 apresentam-se sobrepostos em δ_C 21.0 ppm; os sinais atribuídos aos carbonos C-2 e C-9 sobrepõe-se em δ_C 36.8 ppm; e os núcleos C-1 e C-3 apresentam-se em δ_C 62.0 ppm. Os carbonos C-4 e C-5 apresentam-se em δ_C 32.0 ppm e 58.0 ppm, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da amostra de cloridrato de cocaína, podemos observar que há uma melhor definição dos sinais, ocorrendo apenas uma sobreposição em δ_C 22.5 ppm, atribuída aos núcleos C-6 e C-7. A tabela 2 apresenta um resumo da atribuição dos espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS e ^{13}C CP/MAS/DD das amostras de cloridrato de cocaína e “crack”.

Assim como no caso da amostra de “crack”, o espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS/DD da amostra de cloridrato de cocaína apresentou os sinais correspondentes às carbonilas C-10 e C-12 (δ_C 166.5 e 163.3 ppm), ao núcleo C-13 (δ_C 126.4 ppm) e às metilas C-9 e C-11 (δ_C 38.1 e 50.8 ppm).

Tabela 2 – Atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS e ^{13}C CP/MAS/DD de amostras de “crack” e cloridrato de cocaína.

Número (Figura 7)	Alcalóide (“crack”) – δ /ppm	Cloridrato de Cocaína – δ /ppm
1	62,0	62.0
2	36,8	44.6
3	62,0	63.9
4	32,0	29.9
5	58,0	59.9
6	21,0	22.5
7	21,0	22.5
9	36,8 *	38.1 *
10	167,5 *	166.5 *
11	45,5 *	50.8 *
12	161,4 *	163.3 *
13	124,9 *	126.4 *
14	124,9	128.8/129.7
15	124,9	127.7
16	130,0	131.1

* Confirmados no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS/DD.

A espectroscopia de RMN no estado sólido fornece dados que dizem respeito à cristalinidade da amostra. Nesse sentido, considerando que o cloridrato de cocaína e o “crack” têm interações intermoleculares e configurações no estado sólido diferentes, os espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS devem evidenciar essas diferenças.

De fato, claramente essas diferenças são notadas nos espectros. O cloridrato de cocaína, por ser cristalino, apresenta um espectro com melhor resolução, sendo possível observar as frequências de ressonância para cada núcleo do anel aromático e distinguir os sinais para cada carbono do anel tropano, exceto para os núcleos C-6 e C-7 que têm um ambiente químico muito parecido. Por outro lado, o espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da amostra de

“crack” apresenta os sinais alargados com muitas sobreposições, caracterizando-a como uma espécie não-cristalina, amorfa.

Assim, conseguimos distinguir, de forma não-invasiva e inequívoca, amostras de cloridrato de cocaína de amostras de “crack”, ilegalmente comercializadas.

Conclusão

Conseguimos fazer a atribuição completa para os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de amostras de cloridrato de cocaína e “crack”, em solução. Determinamos, experimentalmente, que o grupo benzoato tem orientação equatorial, enquanto o grupo metóxi-carbonil tem orientação axial.

No caso dos experimentos realizados no estado sólido, foi possível distinguir amostras de cloridrato de cocaína e de “crack”, demonstrando que o “crack” não tem uma estrutura cristalina e, conseqüentemente, há uma maior dispersão das freqüências de ressonância.

Caracterização por RMN de ^1H e de ^{13}C de Cristais Líquidos Emissores de Luz Derivados do 1,2,4-Oxadiazol

Nas últimas décadas, há um crescente interesse por compostos orgânicos que apresentam propriedades luminescentes devido às suas aplicações tecnológicas, sobretudo como OLED's – Diodos Orgânicos Emissores de Luz [76-79]. Dentre as moléculas orgânicas com essas propriedades, destacam-se aquelas altamente conjugadas e que possuem anéis heterocíclicos com deficiência de elétrons, o que implica na capacidade que as mesmas têm de transportar elétrons [80-82]. Gallardo e colaboradores têm sintetizado e caracterizado uma série desses novos compostos baseados em 1,2,3-triazóis, 2,1,3-benzotiadiazóis e 1,2,4- ou 1,3,4-oxadiazóis [83-85]. No tocante à estrutura química desses compostos, a caracterização é feita, normalmente, utilizando a espectrofotometria no infravermelho e a espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , comparando os espectros com dados disponíveis na literatura para estruturas semelhantes. Sendo assim, nós resolvemos fazer o assinalamento dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para quatro derivados de 1,2,4-oxadiazol e o intermediário, 3-(*p*-decanóxi fenil)-5-(*p*-iodo fenil)-1,2,4-oxadiazol, que foram sintetizados no laboratório de síntese orgânica da UFPE, por Ricardo Neves.

Procedimento Analítico

Todos os espectros foram obtidos em CDCl_3 , a temperatura ambiente, usando o sinal residual de CHCl_3 (δ_{H} 7.26 ppm e δ_{C} 77.0 ppm) com referência interna para o deslocamento químico. O composto intermediário também teve o

espectro de RMN de ^1H obtido em benzeno- d_6 . Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos com 16 repetições, pulso de rf de 45° e tempo de aquisição igual 3.7 s, enquanto os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos com 1800 repetições, pulso de rf de 30° e tempo de aquisição igual a 1.0 s. Os espectros bidimensionais foram obtidos com a amostra parada.

Resultados e Discussão

A Figura 18 apresenta as estruturas dos compostos utilizados no estudo.

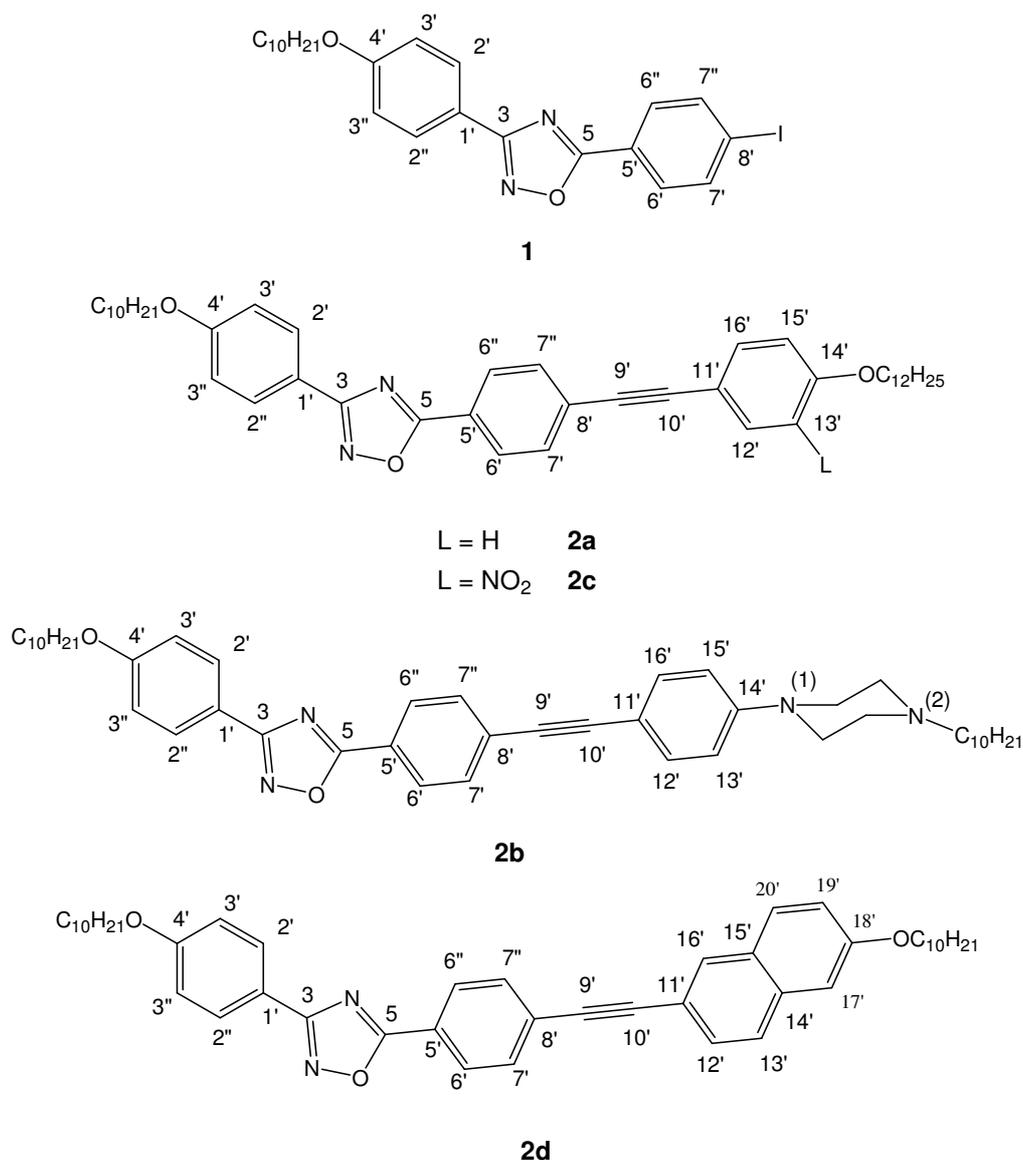


Figura 18 – Fórmulas estruturais dos derivados de 1,2,4-oxadiazol utilizados no estudo.

Apesar de não apresentar propriedades luminescente, a atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **1** é importante para a correta atribuição dos sinais para os quatro derivados de 1,2,4-oxadiazol (**2a-d**). A Figura 19 apresenta o espectro de RMN de ^1H do composto **1**. A região alquílica é de fácil atribuição, uma vez que podemos atribuir os tripletos em δ 0,89 e 4,03 ppm à metila e ao grupo $[\text{OCH}_2]$, enquanto os sinais entre δ 1,0 e 2,0 ppm são atribuídos aos metilenos da cadeia alquílica. Na região aromática, nós deveríamos observar quatro conjuntos de sinais referentes a dois sistemas AA'BB' dos dois grupos fenílicos *para*-substituídos. No entanto, no espectro obtido em CDCl_3 , observamos dois sinais centrados em δ 6,99 e 8,07 ppm, atribuídos aos núcleos H-3'/H-3'' e H-2'/H-2'', respectivamente; e um simpleto centrado em δ 7,91 ppm, com área de integração correspondendo a 4 hidrogênios, atribuídos aos núcleos H-7'/H-7'' e H-8'/H-8''. A sobreposição desses sinais é inesperada e nós creditamos isso ao efeito do solvente, uma vez que quando o espectro de RMN de ^1H da amostra é obtido em benzeno- d_6 , observamos os quatro conjuntos esperados. Para confirmarmos a atribuição, obtivemos o espectro COSY do composto **1** (Figura 20). Neste espectro, observa-se que os sinais em δ 6,99 e 8,07 ppm correlacionam-se entre si e o sinal em δ 7,91 ppm não apresenta correlação com nenhum outro sinal. No mais, observa-se a correlação do tripleto em δ 4,03 ppm com o multipletto em δ 1.82 ppm, atribuído ao metileno vizinho, bem como as outras correlações da cadeia alquílica. No espectro de RMN de ^{13}C do composto **1**, figura 21, observa-se que o sinal referente ao núcleo C-8' tem δ_{C} 100,0 ppm, enquanto o sinal referente ao núcleo C-4' tem δ_{C} 161,6 ppm.

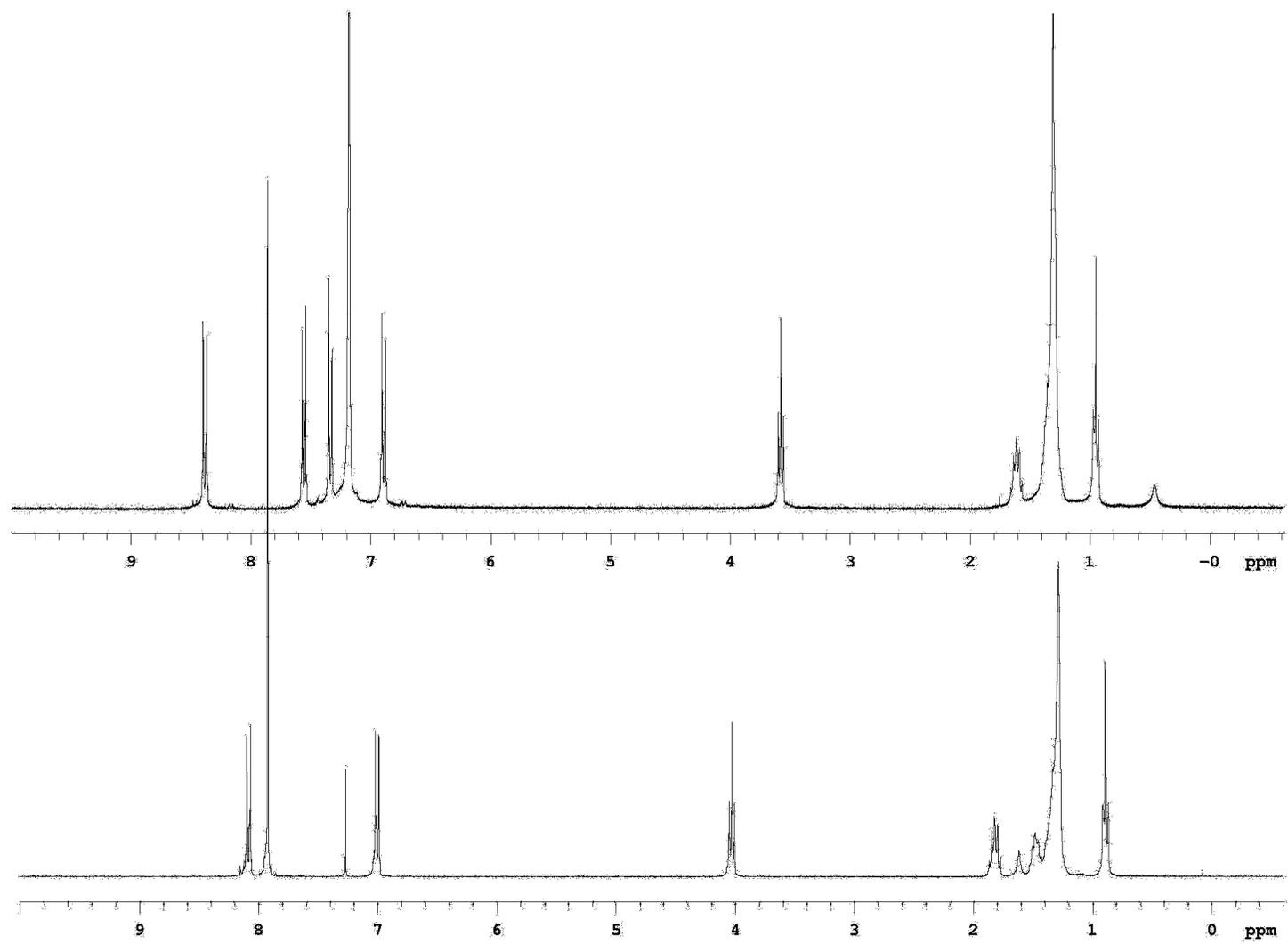


Figura 19 – Espectros de RMN de ^1H do composto 1, CDCl_3 (inferior) e C_6D_6 (superior), $B_0 = 7,04 \text{ T}$.

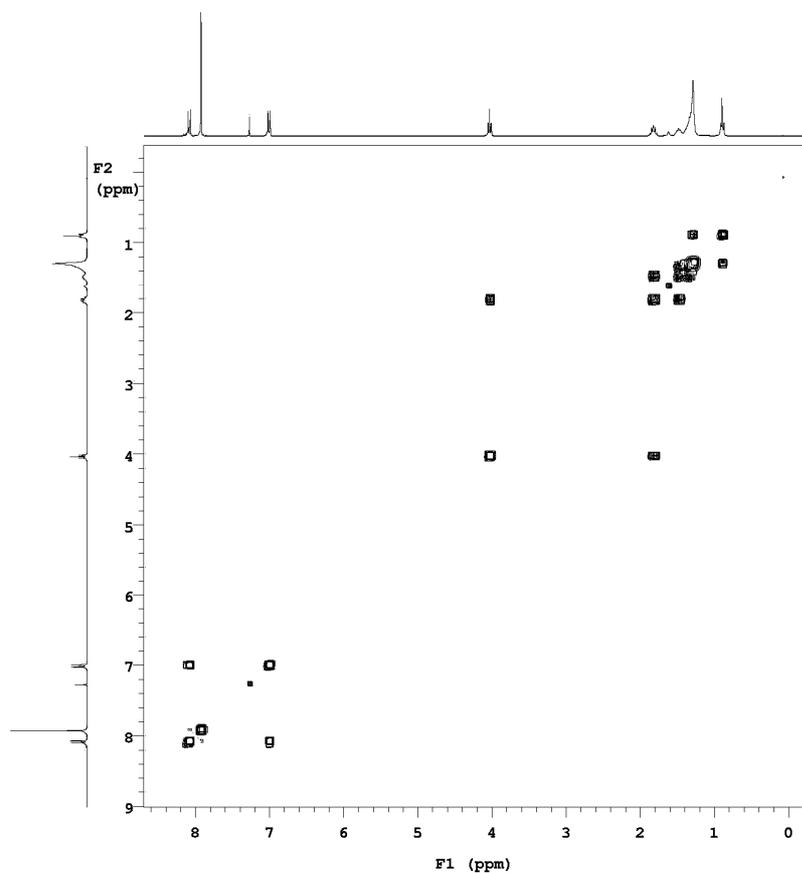


Figura 20 – Espectro COSY do composto 1, $CDCl_3$, $B_0 = 7,04$ T.

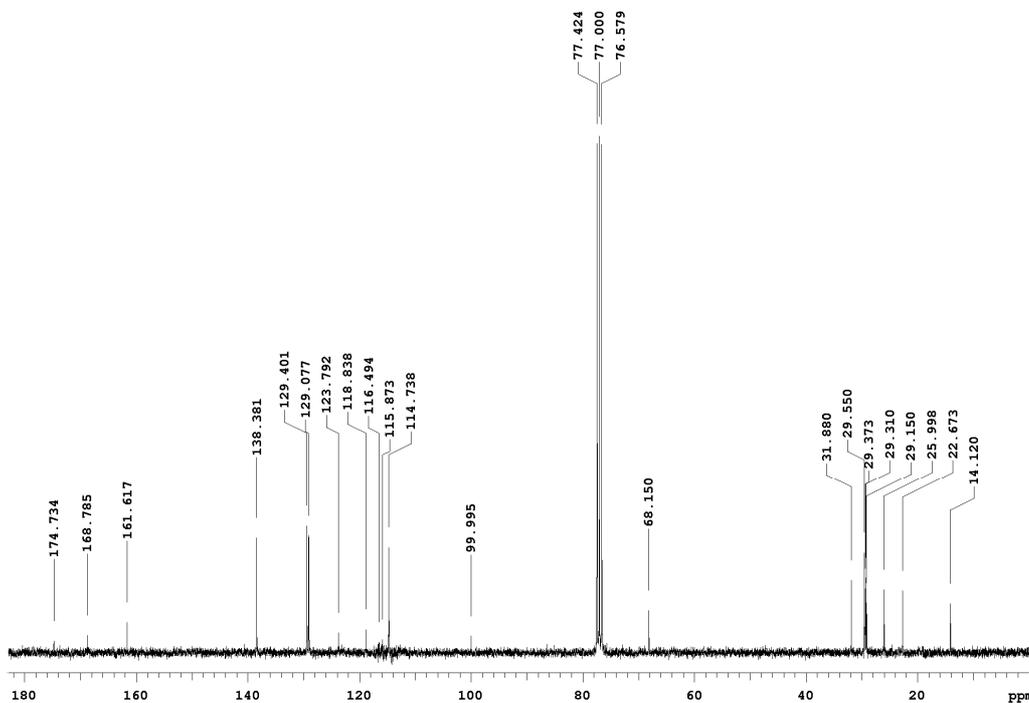


Figura 21 – Espectro RMN de ^{13}C do composto 1, $CDCl_3$, $B_0 = 7,04$ T.

Quando o iodo é substituído por um grupo *p*-dodecanoxifeniletinil (**2a**), pequenas mudanças são observadas nos deslocamentos dos núcleos de hidrogênio do anel “A” – carbonos 1’,2’,2”,3’, 3” e 4’, enquanto os dos anéis “B” – carbonos 5’, 6’, 6”, 7’, 7” e 8’ – e “C” – carbonos 11’, 12’, 13’, 14’, 15’ e 16’, também apresentam-se como sistemas AA’BB’. Os sinais com δ 7,65 e 8,20 ppm são atribuídos aos núcleos H-7’/H-7” e H-6’/H-6”, respectivamente. Já os sinais centrados em δ 6,80 e 7,50 ppm são respectivamente atribuídos aos núcleos H-13’/H-15’ e H-12’/H-16’. Usando o espectro HMQC (Figura 22), é possível atribuir os sinais no espectro de RMN de ^{13}C , aos carbonos não-substituídos do anel. Assim, os sinais com δ_{C} 114,6, 114,7, 128,0, 129,1, 131,9 e 133,2 ppm são atribuídos aos núcleos C-13’/C-15’, C-3’/C-3”, C-6’/C-6”, C-2’/C-2”, H-7’/H-7” e H-12’/H-16’, respectivamente.

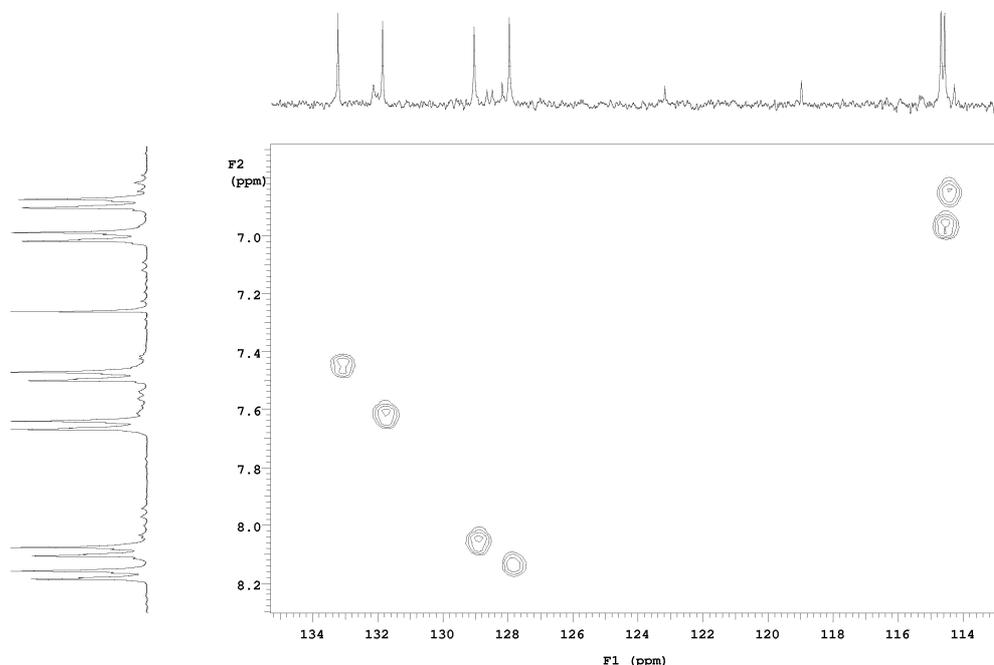


Figura 22 – Expansão do espectro HMQC do composto **2a**, CDCl_3 , $B_0 = 7,04 \text{ T}$.

O espectro HMBC do composto **2a** mostra a correlação entre o sinal em δ_H 7,65 ppm (H-7'/H-7'') com o sinal em δ_C 87,3 ppm que, portanto é atribuído ao núcleo C-9'. Conseqüentemente, o sinal em δ_C 93,2 ppm é atribuído ao núcleo C-10', que apresenta correlação HMBC com o sinal atribuído ao núcleo H-12'/H-16' (δ_H 7,50 ppm).

No composto **2b**, o grupo dodecanóxi é substituído por um grupo N-decil piperazina. Assim, a principal mudança observada no espectro de RMN de 1H foi o desaparecimento de um dos tripletos atribuídos a um dos grupos $[OCH_2]$ e o surgimento de um tripleto alargado em δ_H 2,48 ppm, com área de integração correspondendo a 2 hidrogênios, e dois dupletos de dupletos em δ_H 2,71 e 3,36 ppm, com área de integração correspondendo a 4 hidrogênios cada. A partir do espectro COSY do composto **2b** (Figura 23), que mostra que os sinais em δ_H 2,71 e 3,36 ppm estão correlacionados, podemos atribuir o sinal em δ_H 2,48 ppm ao grupo $[NCH_2]$. Por outro lado, a atribuição para os outros dois sinais, que pertencem ao anel piperazina não é tão trivial. Para isso, utilizamos o espectro NOEdiff (*Nuclear Overhauser Effect*) para definir qual dos grupos metilenos está ligado ao grupo N(1) e qual liga-se ao grupo N(2). A premissa utilizada foi: os hidrogênios vizinhos ao nitrogênio N(1) devem apresentar NOE com os núcleos H-13'/H-15'. Assim, ao irradiarmos o sinal em δ_H 3,36 ppm, observamos o efeito NOE no sinal em δ_H 6,87 ppm (H-13'/H-15'), o que nos fez atribuir o sinal em δ_H 3,36 ppm aos metilenos vizinhos ao nitrogênio N(1) e o sinal em δ_H 2,71 ppm aos metilenos vizinhos ao nitrogênio N(2).

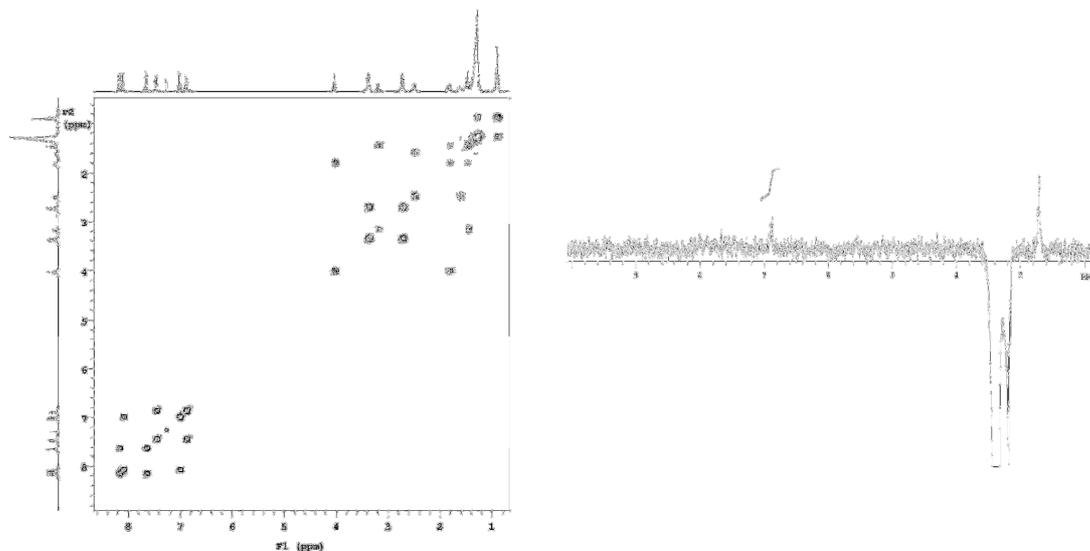


Figura 23 – Espectros COSY (esquerda) e NOEdiff (direita) do composto **2b** – irradiação do sinal em δ_H 3,36 ppm, $CDCl_3$, $B_0 = 7,04$ T.

A partir do espectro HMQC do composto **2b**, podemos atribuir os sinais em δ_C 47,6 e 52,8 ppm aos metilenos do anel piperazina ligados ao nitrogênio N(1) e N(2), respectivamente; enquanto o sinal em δ_C 58,7 ppm ao metileno da cadeia alquílica ligado ao N(2). O grupo metileno ligado ao oxigênio apresenta-se no espectro em δ_C 68,1 ppm.

No caso do composto **2c**, as principais mudanças observadas se dão nos hidrogênios e carbonos do anel “C” devido à presença do grupo nitro. No espectro de RMN de 1H de **2c**, o sinal em δ_H 7,65 ppm apresenta área de integração correspondente a três hidrogênios. Ou seja, esse sinal pode ser atribuído aos núcleos H-7’/H-7” e a um dos hidrogênios do anel “C”. Isso fica evidente quando observamos o espectro HMQC do composto **2c** (Figura 24), uma vez que este sinal apresenta correlação com dois sinais no espectro de RMN de ^{13}C , em δ_C 132,1 (H-7’/H-7”) e 137,0 ppm.

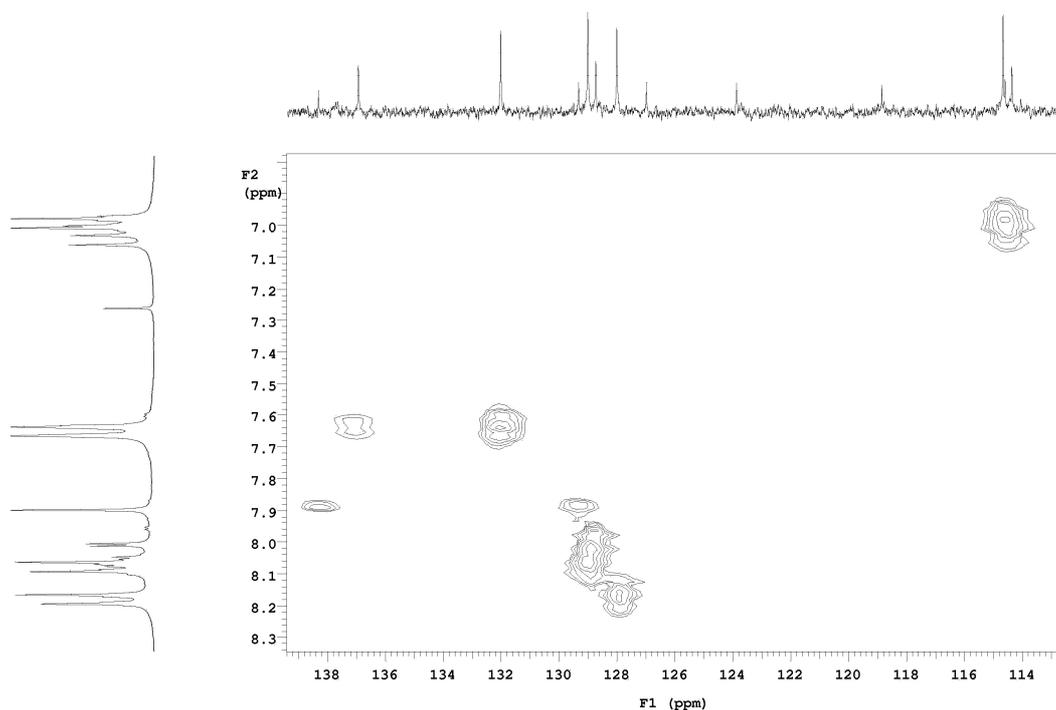


Figura 24 – Expansão do espectro HMQC (^1H , ^{13}C) do composto **2c** em CDCl_3 .

Ainda no espectro de RMN de ^1H do composto **2c**, observamos um duplete em δ_{H} 7,04 ($J = 8,8$ Hz) e 8,01 ppm ($J = 2,1$ Hz). O sinal centrado em δ_{H} 7,04 ppm é atribuído ao núcleo H-15' e, devido à correlação HMQC, o núcleo C-15' apresenta-se no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 114,4 ppm. No espectro COSY, o sinal em δ_{H} 7,04 ppm apresenta correlação com o sinal centrado em δ_{H} 7,65 ppm, que é atribuído, portanto, ao núcleo H-16'. Isso nos fez atribuir o sinal em δ_{C} 137,0 ppm ao núcleo C-16'. Assim, o duplete em δ_{H} 8,01 ppm é atribuído ao núcleo H-12'. Utilizando o espectro HMQC, o núcleo C-12' apresenta-se no espectro em δ_{C} 128,8 ppm.

O composto **2d** possui quatro anéis, sendo um grupo naftil e duas fenilas *para*-substituídas. Assim como para os outros compostos, o espectro de RMN de ^1H pode ser didaticamente dividido em três regiões. Os sinais

correspondentes à cadeia alquílica mantiveram o deslocamento químico inalterado entre δ 0,80 e 2,00 ppm. Os grupos [OCH₂] apresentam-se no espectro de RMN de ¹H em δ 4,03 e 4,09 ppm. A região aromática apresenta uma grande quantidade de sinais, sendo visíveis três conjuntos de sinais em δ_{H} 7,01, 8,10 e 8,20 ppm, apresentando-se como sistemas AA'BB', com área de integração igual a dois e constantes de acoplamento da ordem de 1,8 e 9,0 Hz. O quarto sinal que completa esse sistema, apresenta-se sobreposto a mais dois sinais em δ_{H} 7,71 ppm; essa região ainda apresenta um duplete em δ_{H} 7,12 ppm ($J = 2,7$ Hz); dois dupletos de dupletos em δ_{H} 7,18 ppm ($J = 2,4$ e 9,0 Hz) e δ_{H} 7,55 ppm ($J = 1,5$ e 8,4 Hz); e um simpleto largo em δ_{H} 8,01 ppm com área de integração igual a um.

A Figura 25 apresenta os espectros de RMN de ¹³C e DEPT do composto **2d**. Assim como no caso do espectro de RMN de ¹H, também é possível dividi-lo em regiões: alifática – δ_{C} 14,0 – 32,0 ppm; carbinólica e acetilênica – δ_{C} 68,0 – 94,0 ppm; aromática – δ_{C} 100,0 – 135,0 ppm; e uma região de carbonos oxadiazólicos e fenólicos – δ_{C} 150,0 – 180,0 ppm. A partir do espectro DEPT, pode-se atribuir o sinal em δ_{C} 14,1 ppm às metilas das cadeias alquílicas, enquanto todos os grupos CH₂ se apresentam entre δ_{C} 22,0 e 32,0 ppm, exceto os grupos [OCH₂], que se apresentam sobrepostos em δ_{C} 68,2 ppm.

Na região que compreende os carbonos aromáticos, fenólicos e oxadiazólicos, há 19 frequências de ressonância distintas. A observação da fórmula estrutural do composto **2d** sugere a presença de 20 carbonos

magneticamente diferentes. Com isso, conclui-se que há pelo menos uma sobreposição de sinais nessa região.

Os sinais com δ_C 88,2 e 93,7 ppm são atribuídos aos carbonos com configuração *sp*, ou seja, aos núcleos C-9' e C-10'. O sinal em δ_C 93,7 ppm apresenta correlação HMBC (Figura 26) com os sinais em δ_H 7,55 e 8,01 ppm, enquanto o sinal com δ_C 88,2 ppm apresenta correlação HMBC apenas com o sinal em δ_H 7,71 ppm. Considerando-se que o carbono C-9' apresenta correlação HMBC apenas com os núcleos H-7'/H-7'', que são magneticamente equivalentes, enquanto o carbono C-10' apresenta correlação HMBC com os núcleos H-12' e H-16', magneticamente distintos, podemos atribuir os sinais em δ_C 88,2 e 93,7 ppm aos núcleos C-9' e C-10', respectivamente.

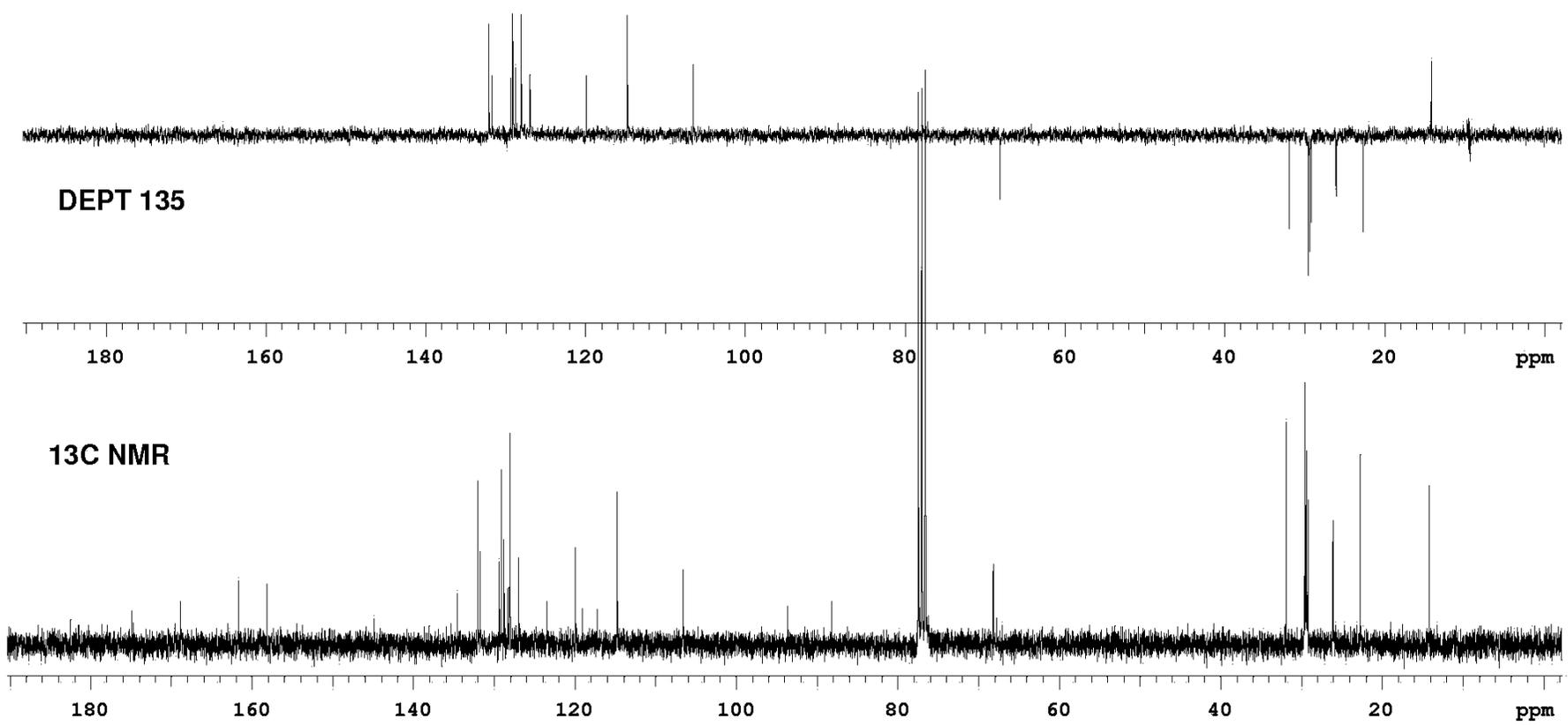


Figura 25 – Espectro RMN de ¹³C e DEPT 135, CDCl₃, 75 MHz do composto **2d**.

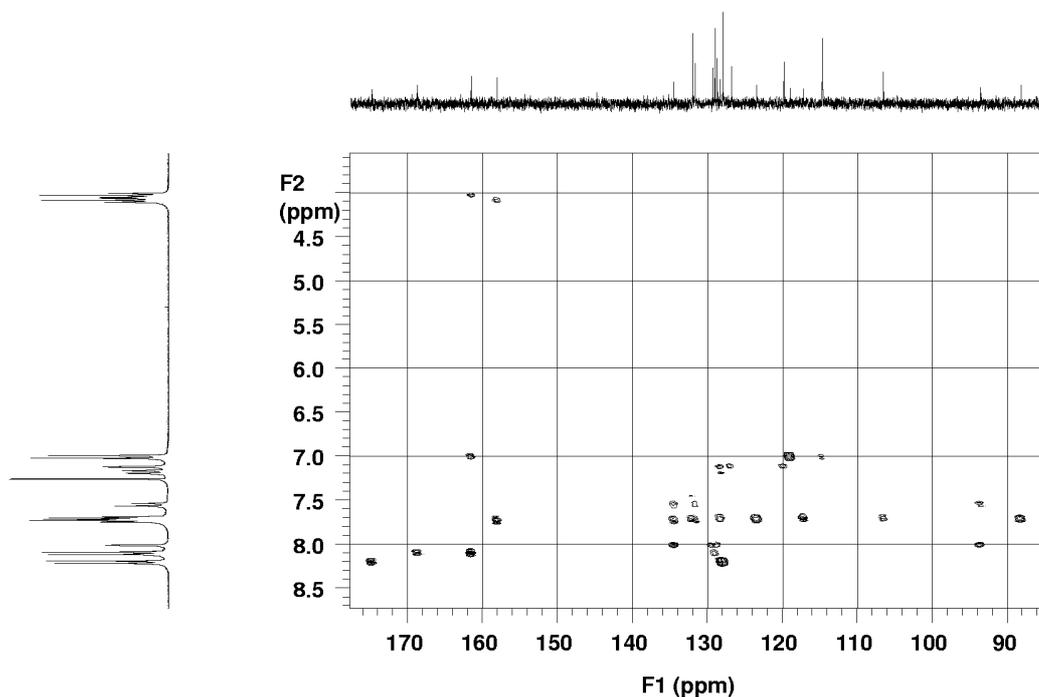


Figura 26 – Espectro HMBC do composto **2d**, CDCl_3 , $B_0 = 7,04 \text{ T}$. (Excluída região alquílica)

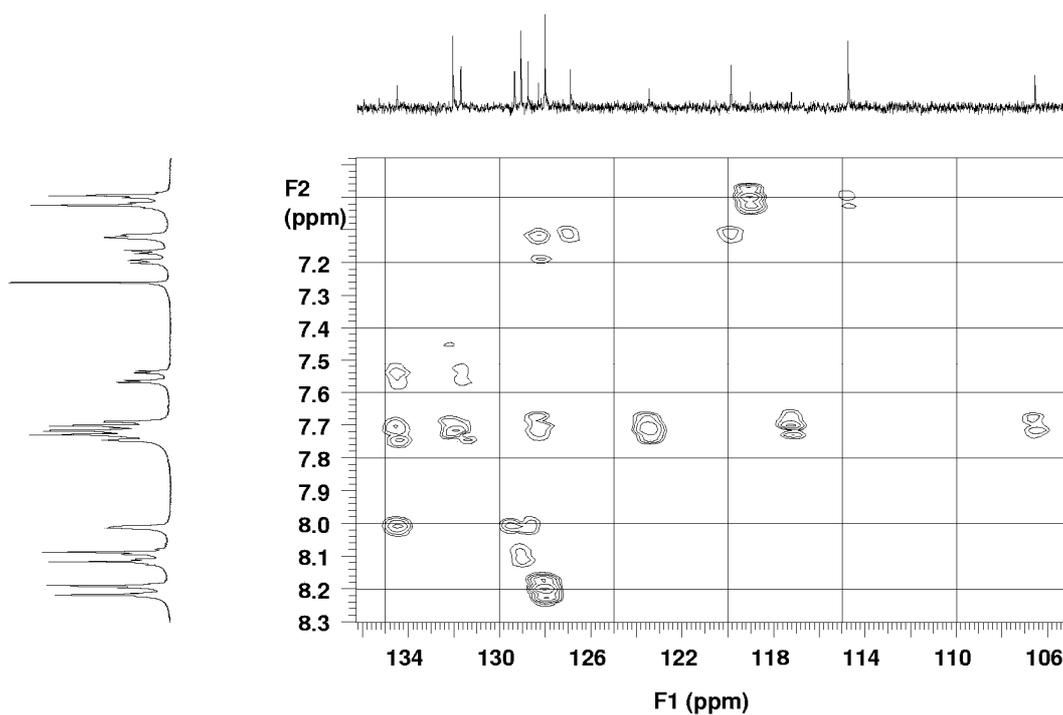


Figura 26a – Expansão do espectro HMBC do composto **2d**, CDCl_3 , $B_0 = 7,04 \text{ T}$.

O sinal com δ_{H} 7,55 ppm apresenta-se como um dupletto de dupletto com área de integração igual a um no espectro de RMN de ^1H , enquanto o sinal em δ_{H} 8,01 ppm apresenta-se como um simpleto largo, também com área de

integração igual a um. Assim, os mesmos são atribuídos aos núcleos H-12' e H-16', respectivamente.

Os sinais em δ_C 158,2 e 161,6 ppm apresentam correlação HMBC com os tripletos em δ_H 4,03 e 4,09 ppm, atribuídos aos grupos [OCH₂]. Considerando que o sinal com δ_C 161,6 ppm apresenta correlação HMBC com dois sinais, δ_H 7,01 e 8,10 ppm, que se apresentam como um sistema AA'BB', enquanto a correlação HMBC observada para o sinal em δ_C 158,2 ppm ocorre com um multiplete em δ_H 7,71 ppm, conclui-se que o sinal em δ_C 161,6 ppm refere-se ao núcleo C-4', enquanto o sinal em δ_C 158,2 ppm é atribuído ao núcleo C-18'. Como este último sinal apresenta correlação HMBC com o triplete centrado em δ_H 4,09 ppm, este é atribuído ao grupo [OCH₂] vizinho ao núcleo C-18'. Da mesma forma, o sinal em δ_C 161,6 ppm apresenta correlação HMBC com o triplete centrado em δ_H 4,03 ppm, sendo este atribuído ao grupo [OCH₂] vizinho ao núcleo C-4'.

O sinal atribuído ao carbono C-4', δ_C 161,6 ppm, apresenta correlação HMBC com o sinal em δ_H 8,10 ppm, portanto, atribuído ao núcleo H-2'/H-2". Este último, por sua vez, apresenta correlação HMBC também com o sinal em δ_C 168,8 ppm, que é atribuído ao carbono C-3. Assim, o sinal em δ_C 174,9 ppm é atribuído ao núcleo C-5. A correlação HMBC observada entre este último sinal e aquele em δ_H 8,20 ppm indica que este sinal deve ser atribuído aos núcleos H-6'/6". O sinal atribuído ao núcleo C-4' apresenta ainda uma correlação HMBC menos intensa com um sinal em δ_H 7,01 ppm, que é atribuído aos núcleos H-3'/3". Esta atribuição é confirmada através da

correlação COSY (Figura 28) observada entre este sinal e o atribuído aos núcleos H-2'/H-2'' em δ_H 8,10 ppm.

O sinal em δ_C 119,1 ppm apresenta correlação HMBC (Figura 26a) com o sinal atribuído aos núcleos H-3'/H-3'', sendo o mesmo atribuído ao carbono C-1'. O sinal atribuído aos núcleos H-6'/H-6'', δ_H 8,20 ppm, apresenta correlação HMQC (Figura 28) com o sinal em δ_C 128,1 ppm, portanto este sinal corresponde aos núcleos C-6'/C-6''. Considerando as correlações HMQC, os sinais em δ_C 114,8 e 131,7 ppm são atribuídos aos carbonos C-3'/C-3'' e C-16', respectivamente.

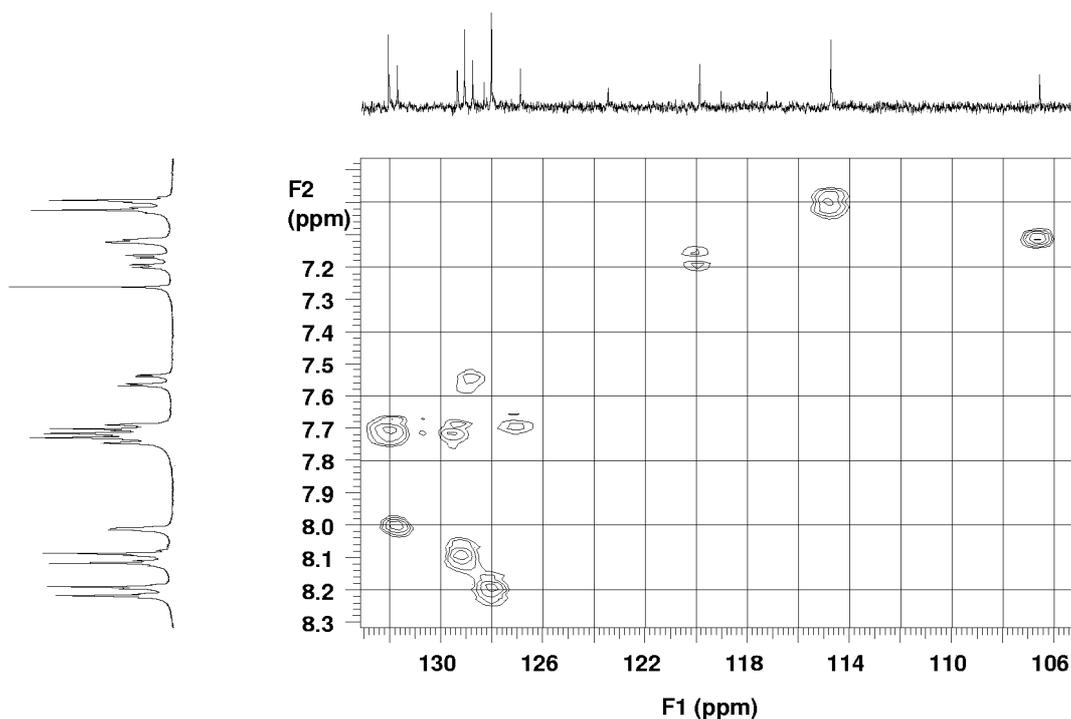


Figura 27 – Expansão do espectro HMQC do composto **2d**, $CDCl_3$, $B_0 = 7,04$ T.

O sinal atribuído ao carbono C-9', δ_C 88,2 ppm, apresenta correlação HMBC com o sinal em δ_H 7,71 ppm, que é atribuído aos núcleos H-7'/H-7''. A área de integração sob este sinal corresponde a 4, indicando que há mais dois núcleos de hidrogênio que possuem essa mesma frequência de ressonância.

Um desses núcleos é o H-20', uma vez que observa-se uma correlação HMBC (Figura 26) do sinal em δ_H 7,71 ppm com o sinal atribuído ao núcleo C-18', δ_C 158,2 ppm. No espectro HMQC, observa-se correlações do sinal em δ_H 7,71 ppm com os sinais em δ_C 126,9, 129,4 e 132,1 ppm. Considerando a intensidade desses sinais, pode-se atribuir o sinal em δ_C 132,1 ppm aos núcleos C-7'/C-7'', uma vez que o mesmo apresenta uma intensidade aproximadamente duas vezes maior do que a intensidade dos outros sinais.

O sinal em δ_C 134,5 ppm apresenta correlações HMBC com os sinais em δ_H 7,55 ppm, atribuído ao núcleo H-12', δ_H 7,71 ppm e 8,01 ppm, atribuído ao núcleo H-16'. Assim, esse sinal é atribuído ao carbono C-14'. O sinal em δ_C 128,8 ppm é atribuído ao carbono C-12', pois o mesmo apresenta correlação HMQC com o sinal em δ_H 7,55 ppm. O sinal em δ_C 129,1 ppm é atribuído aos núcleos C-2'/C-2'' porque o mesmo apresenta correlação HMQC com o sinal em δ_H 8,10 ppm, atribuído aos núcleos H-2'/H-2''.

Analisando o espectro COSY (Figura 28), observa-se que o sinal atribuído ao núcleo H-12', δ_H 7,55 ppm, apresenta correlação com um conjunto de sinais em δ_H 7,71 ppm. Assim, pode-se concluir que o outro hidrogênio que se apresenta nesta sobreposição de sinais é o H-13'. Ainda no espectro COSY, observa-se uma correlação entre os sinais em δ_H 7,18 e 7,55 ppm. Essa correlação pode ser atribuída à correlação H-19' – H-20' e, portanto, o sinal em δ_H 7,18 ppm é atribuído ao núcleo H-19'.

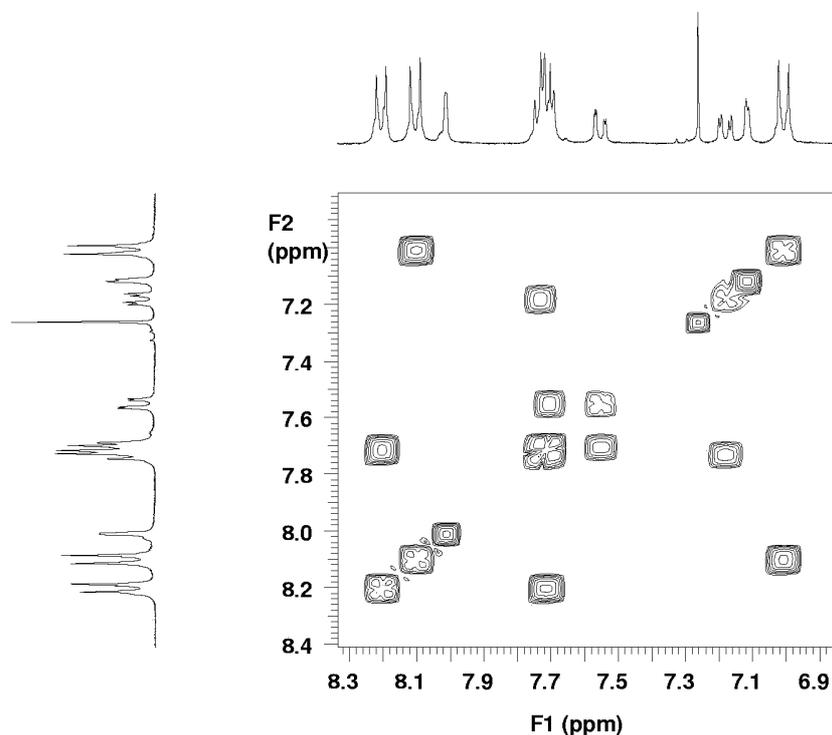


Figura 28 – Expansão do espectro COSY do composto **2d**, CDCl_3 , 300 MHz.

No espectro HMQC (Figura 27), observa-se a correlação do sinal anteriormente atribuído ao núcleo H-19' com o sinal em δ_{C} 119,9 ppm, que é atribuído ao carbono C-19'. O único sinal do espectro de RMN de ^1H que ainda falta ser atribuído é o que se apresenta com δ_{H} 7,12 ppm e, por eliminação, o mesmo é atribuído ao núcleo H-17'. Conseqüentemente, observando a correlação HMQC correspondente, atribui-se o sinal em δ_{C} 106,6 ppm ao núcleo C-17'.

O sinal referente ao núcleo H-17' deve apresentar correlação HMBC com os carbonos C-13' e C-19'. Assim, considerando-se também o espectro DEPT 135 (Figura 25), observa-se que o sinal atribuído ao núcleo H-17' correlaciona-se no espectro HMBC com o sinal em δ_{C} 126,9 ppm, que é atribuído ao carbono C-13'.

O sinal referente ao núcleo C-15' deve apresentar correlação HMBC com os núcleos H-17' e H-19'. No espectro HMBC, essas correlações são observadas a partir do sinal em δ_C 128,3 ppm, que, portanto, é atribuído ao carbono C-15'.

O sinal em δ_C 129,4 ppm apresenta correlação HMBC com o sinal em δ_H 8,01 ppm, atribuído ao núcleo H-16', e apresenta correlação HMQC com o sinal em δ_H 7,71 ppm. Assim, atribui-se o sinal em δ_C 129,4 ppm ao carbono C-20'.

A partir do espectro HMBC, observa-se que o sinal em δ_C 117,3 ppm apresenta duas correlações com os sinais em δ_H 7,71 ppm, sendo uma mais intensa e outra menos intensa. O sinal em δ_C 117,3 ppm foi atribuído ao núcleo C-11' e a correlação mais intensa se dá com o núcleo H-13', três ligações distante, e a menos intensa com o núcleo H-20', quatro ligações distante.

O sinal em δ_C 123,5 ppm apresenta correlação HMBC em δ_H 7,71 ppm. Por eliminação, este sinal só pode ser atribuído ao carbono C-5' e a correlação observada ocorre com os núcleos H-7'/H-7".

O último carbono a ser atribuído é o C-8'. O sinal de RMN desse núcleo deve apresentar correlação HMBC com o sinal do núcleo H-6'/H-6". O sinal em δ_H 8,20 ppm, atribuído ao núcleo H-6'/H-6", apresenta apenas duas correlações HMBC, sendo essas correlações com os sinais dos núcleos C-5 e C-6'/C-6". Por outro lado, a correlação observada entre os sinais dos núcleos H-6'/H-6" e C-6'/C-6" é muito intensa quando comparada a correlações semelhantes, por exemplo, entre os núcleos H-3'/H-3" – C-3'/C-3" ou H-2'/H-2" – C-2'/C-2" (ver Figura 27). Essa correlação mais intensa é explicada considerando-se que o

sinal outrora atribuído ao carbono C-6'/C-6'', δ_C 128,1 ppm, na verdade é uma sobreposição entre os sinais referentes aos núcleos C-6'/C-6'' e C-8'.

A tabela 3 apresenta um resumo com as atribuições nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para os cinco compostos.

Tabela 3 – Atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , CDCl_3 .

	Composto 1		Composto 2a		Composto 2b		Composto 2c		Composto 2d	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
3	-	168,8	-	168,7	-	168,7	-	168,8	-	168,8
5	-	174,7	-	174,9	-	174,9	-	174,7	-	174,9
1'	-	118,8	-	119,0	-	119,0	-	118,9	-	119,1
2'/2''	8,07	129,1	8,09	129,1	8,08	129,0	8,08	129,0	8,10	129,1
3'/3''	6,99	114,7	7,00	114,7	6,99	114,7	6,99	114,7	7,01	114,8
4'	-	161,6	-	161,5	-	161,5	-	161,6	-	161,6
5'	-	123,8	-	123,2	-	123,0	-	123,9	-	123,5
6'/6''	7,91	129,4	8,20	128,0	8,15	127,9		128,0	8,20	128,1
7'/7''	7,91	138,4	7,65	131,9	7,63	131,8	7,65	132,1	7,71	132,1
8'	-	100,0	-	128,2	-	128,4	-	127,0	-	128,1
9'	-	-	-	87,3	-	87,4	-	89,0	-	88,2
10'	-	-	-	93,2	-	93,7	-	90,1	-	93,7
11'	-	-	-	114,3	-	112,5	-	119,6	-	117,3
12'	-	-	7,50	133,2	7,44	132,9	8,01	128,8	7,55	128,8
13'	-	-	6,80	114,6	6,87	115,0	-	138,3	7,71	126,9
14'	-	-	-	159,7	-	150,9	-	152,6	-	134,5
15'	-	-	6,80	114,6	6,87	115,0	7,04	114,4	-	128,3
16'	-	-	7,50	133,2	7,44	132,9	7,65	137,0	8,01	131,7
17'	-	-	-	-	-	-	-	-	7,12	106,6
18'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158,2
19'	-	-	-	-	-	-	-	-	7,18	119,9
20'	-	-	-	-	-	-	-	-	7,71	129,4
CH ₃	0,89	14,1	0,88	14,1	0,88	14,1	0,88	14,1	0,89	14,1
[OCH ₂]	4,03	68,1	3,97	68,1	4,01	68,1	4,02	68,1	4,03	68,2
			4,02	68,1			4,12	69,9	4,09	68,2
CH ₂	1,0-	22,0-	1,0-	22,0-	1,0-	22,0-	1,0-	22,0-	1,0-	22,0-
	2,0	32,0	2,0	32,0	2,0	32,0	2,0	32,0	2,0	32,0
[NCH ₂]	-	-	-	-	2,48	58,7	-	-	-	-
[N ⁽¹⁾ CH ₂]	-	-	-	-	3,36	47,6	-	-	-	-
[N ⁽²⁾ CH ₂]	-	-	-	-	2,71	52,8	-	-	-	-

Investigação de Morte Súbita após Uso de Inalante – Um Estudo de Caso

Ao desenvolvermos o trabalho visando distinguir “crack” de cloridrato de cocaína, nós acabamos por estabelecer uma parceria com um grupo de peritos criminais da polícia civil do estado da Paraíba. Em um dos casos investigados por esses peritos, nós contribuímos de maneira decisiva, utilizando a espectroscopia de RMN, para a solução do mesmo. É esse caso que relatamos a seguir.

Descrição do caso

A descrição apresentada abaixo se baseia nos relatos de testemunhas e constam nos autos do processo relativo ao caso.

Uma jovem de 19 anos de idade participa de uma festa numa casa noturna de uma praia de veraneio quando lhe é oferecida, para inalar, uma substância em uma embalagem tipo aerossol. Ela vai ao toailete onde retira sua meia-calça, retorna ao salão, embebe a meia-calça com a substância contida no interior da embalagem tipo aerossol, para em seguida levá-la às vias respiratórias, inalando por algum tempo a substância nela impregnada. Logo em seguida, ela reclama de dores no peito e começa a passar mal. Os amigos, não sabendo prestar-lhe os primeiros socorros, levam-na a um hospital aonde foi constatado o óbito após alguns minutos.

No estacionamento do hospital, um policial militar encontra, embaixo de um veículo de uma das pessoas que socorreram a jovem, uma embalagem tipo

aerossol que, segundo várias testemunhas, corresponde àquela utilizada pela vítima.

Dentre outras coisas, a perícia fez determinações e não encontrou no sangue da vítima sinais de substâncias como cocaína, álcool, anfetaminas, derivados benzodiazepínicos, derivados barbitúricos, organoclorados, organofosforados, carbamatos ou clorofosforados.

Durante a investigação do caso, os peritos utilizaram cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas para determinar a composição do material contido no aerossol, mas não tiveram sucesso. No entanto, eles concluíram que o aerossol era constituído basicamente por uma única substância.

Procedimento Analítico

Coletamos a amostra do aerossol e submetemos à análise por espectroscopia de RMN sem o uso de solvente deuterado. Os espectros foram obtidos com o canal do *lock* desligado, utilizando TMS, em CDCl_3 , como referência interna de deslocamento químico (δ_{H} e δ_{C} 0 ppm). No caso dos espectros de RMN de ^{19}F , utilizamos o ácido trifluoracético como referência externa de deslocamento químico (δ_{F} 0 ppm).

Obtivemos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C acoplado e desacoplado, DEPT 135 e de ^{19}F . O espectro de RMN de ^1H foi obtido com janela espectral de 5 kHz, 16 repetições, pulso de 90° e tempo de aquisição igual a 3,74 s. O espectro de RMN de ^{19}F foi obtido com janela espectral de 50 kHz, 32 repetições, pulso de 45° , tempo de espera igual a 4,0 s e tempo de aquisição igual 0,3 s. Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos com janela espectral

igual a 16,5 kHz, tempo de aquisição igual a 2,5 s, tempo de espera igual a 2,0 s e 64 repetições.

O espectro de massas foi obtido utilizando um espectrômetro Shimadzu GCQ 5050, equipado com uma coluna DB-5, 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A energia do impacto de elétrons para obtenção do espectro foi igual a 70 eV e a fonte de íons foi mantida a 270 °C. As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura inicial do forno igual a 60 °C, taxa de aquecimento igual a 10 °C.min⁻¹, temperatura final do forno igual a 275 °C e temperatura do injetor igual a 200 °C. O gás de arraste utilizado foi hélio, com velocidade linear de 40 cm.s⁻¹ e razão de divisão igual a 1:40.

Resultados e Discussão

O laudo pericial não foi conclusivo no que diz respeito à *causa mortis*. O mesmo indica a existência de sinais de morte por asfixia, mas não excluindo outros tipos de diagnóstico de morte, haja vista que *“a morte por exaustão ou deslocamento do oxigênio ambiental, que pode ocorrer em ambientes pequenos e confinados ou pela presença de um gás que desloca o oxigênio ambiental, representa a asfixia pura. Neste tipo de morte não há características necroscópicas conclusivas, o que justifica a ausência de alguns sinais clássicos de morte por asfixia no corpo da vítima.”* O que se pode afirmar, baseado no relato das testemunhas, é que a vítima utilizou um inalante.

Na ciência forense, o termo inalante é utilizado para classificar drogas de abuso que são levadas à inalação sem que sejam submetidas a altas temperaturas, sendo essa a sua principal forma de administração. Assim, outras drogas de abuso como o tabaco, a maconha e o “crack”, que podem ser

inaladas, não são classificadas como tal, uma vez que se utiliza de outras formas de administração. Na verdade, a classificação dos inalantes não é muito simples. Oga, em Fundamentos da Toxicologia [86], apresenta quatro grupos de inalantes:

Solventes voláteis – líquidos que vaporizam à temperatura ambiente. Incluem, dentre outros, tiner e removedores de tintas, fluidos de limpeza a seco, desengordurantes, gasolina, colas, fluidos corretivos, esmaltes, éter, clorofórmio e haloetanos;

Aerossóis – líquidos ou sólidos em suspensão contidos num recipiente pressurizado. Incluem tintas, desodorantes e produtos para cabelos em spray;

Gases – nesta categoria estão inclusos alguns anestésicos de uso médico, como o óxido nitroso, e outros gases de fácil acesso por parte do usuário, como o propano e o butano, presentes nos fluidos de isqueiros e no gás de cozinha;

Nitritos orgânicos voláteis – tais compostos têm propriedades vasodilatadoras e, por conta disto, eram utilizados para aliviar dores no peito associadas com angina. No entanto, segundo Oga, hoje elas são usadas como “drogas de abuso por adolescentes ou homossexuais” para intensificar o desempenho sexual e o prazer.

É comum, portanto, encontrarmos inalantes constituídos por compostos halogenados, como o clorofórmio, utilizado no “loló”, ou o cloreto de etila, utilizado no “lança-perfume”.

Para explicar a causa da morte, era necessário, portanto, determinar o conteúdo do aerossol. O espectro de RMN de ^1H da amostra, Figura 29,

apresenta duas linhas em δ 2,75 e 2,81 ppm. Assim, poderíamos interpretá-las como dois sinais distintos ou como um duplete em δ 2,78 ppm, com J igual a 18,0 Hz. No entanto, se considerarmos essa segunda opção, teríamos que considerar que esse acoplamento se dá com um núcleo diferente de ^1H , haja vista que não há outro sinal no espectro de RMN de ^1H que justifique esse acoplamento.

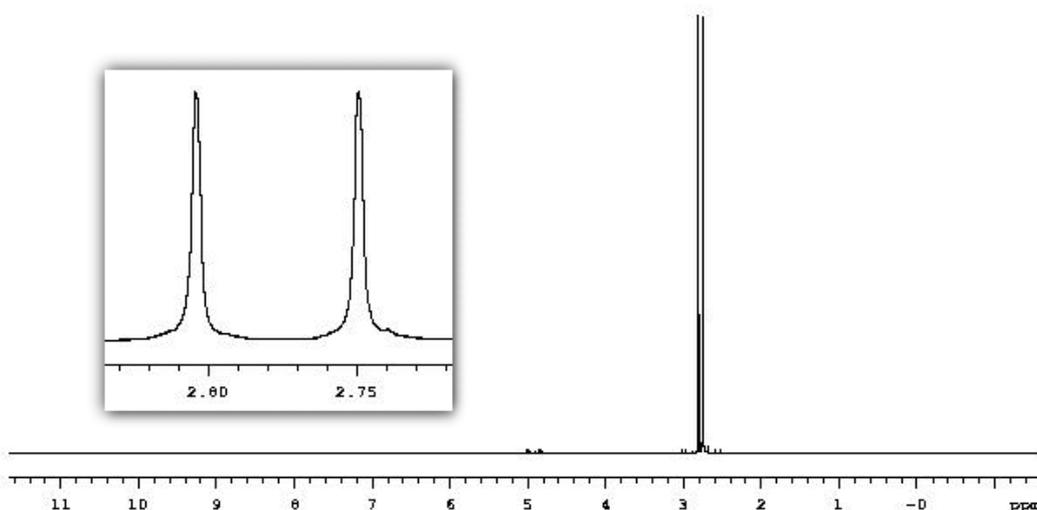


Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H da amostra usada como inalante, 300 MHz.

O espectro de RMN de ^{13}C da amostra, obtido com o desacoplador ligado, apresenta 4 linhas em δ_{C} 37,8, 38,2, 116,8 e 120,7 ppm. O espectro obtido com o desacoplador desligado não alterou as duas últimas linhas, mas alterou a apresentação das linhas em δ_{C} 37,8 e 38,2 ppm, apresentando-se agora com um quarteto de dupletos (Figura 30). Isso indica que temos uma metila em δ_{C} 38,0 ppm acoplado com um núcleo diferente de ^1H e ^{13}C , cuja constante de acoplamento é igual a 24,9 Hz. Enquanto o sinal em δ_{C} 118,7 ppm é atribuído a um carbono não-hidrogenado acoplado com um núcleo diferente de ^1H ou ^{13}C , cuja constante de acoplamento é da ordem de 294 Hz.

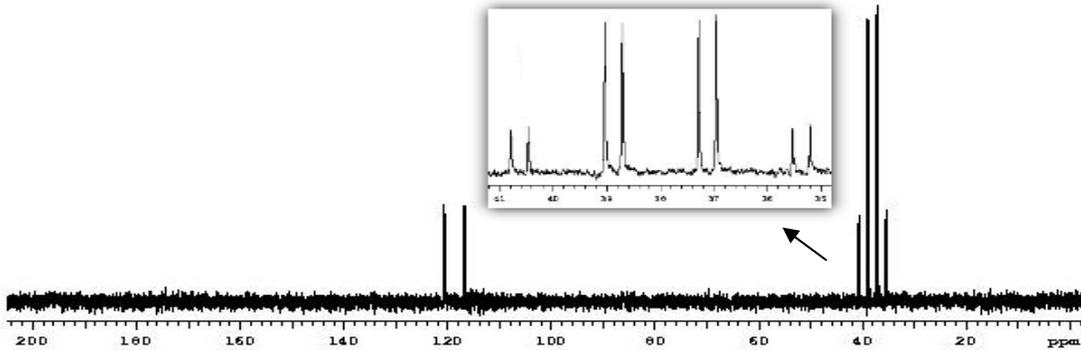


Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C acoplado da amostra utilizada como inalante, 75,4 MHz.

Considerando que a vítima utilizou um inalante, não seria absurdo considerar a possibilidade de que o composto que estávamos investigando ser um haloetano, uma vez que identificamos a presença de dois núcleos ^{13}C magneticamente diferentes. Assim, é razoável investigar a presença de flúor e/ou cloro na estrutura. Então, nossa primeira suspeita seria de que o composto conteria flúor em sua estrutura, o que poderia explicar os acoplamentos observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Nesse sentido, optamos por obter o espectro de RMN de ^{19}F , Figura 31, que apresenta um quarteto em $\delta_{\text{F}} - 44,9$ ppm e constante de acoplamento igual a 18,0 Hz. Isso implica em dizer que há um átomo de flúor na estrutura e que este núcleo está acoplado com o grupo metil. Isso justifica também os dupletos observados em $\delta_{\text{C}} 118,7$ ($J = 294$ Hz) e 38,0 ppm ($J = 24,9$ Hz).

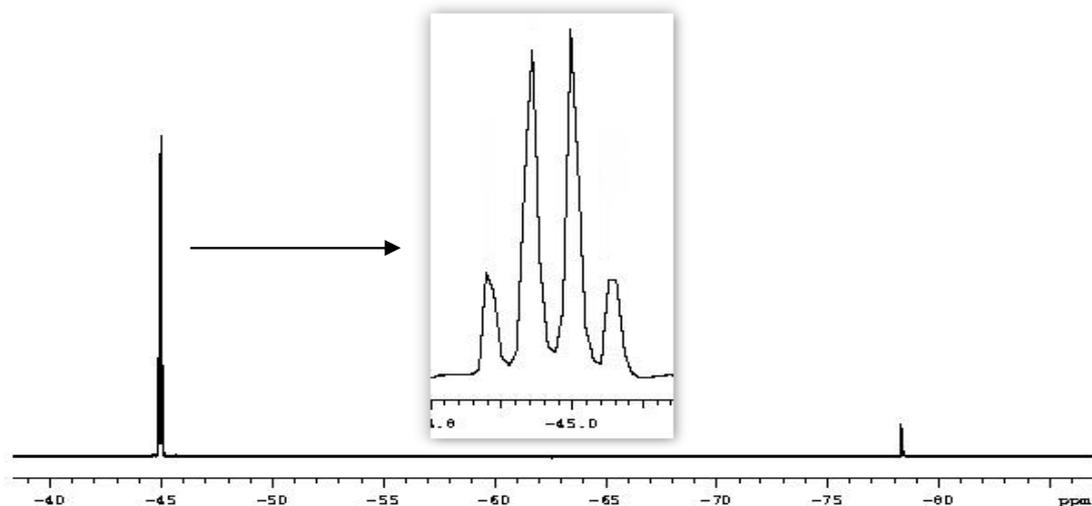


Figura 31 – Espectro de RMN de ^{19}F da amostra utilizada como inalante, 298,4 MHz.

As informações obtidas até esse momento indicam que a substância contém dois átomos de carbono, sendo um desses uma metila, enquanto o outro tem um átomo de flúor como um dos ligantes. Mas, falta ainda definir os dois últimos ligantes do segundo carbono.

O espectro de massas da amostra, Figura 32, mostra os sinais em m/z 101, 103 e 105 com uma relação de intensidades compatível com a existência de dois átomos de cloro na estrutura.

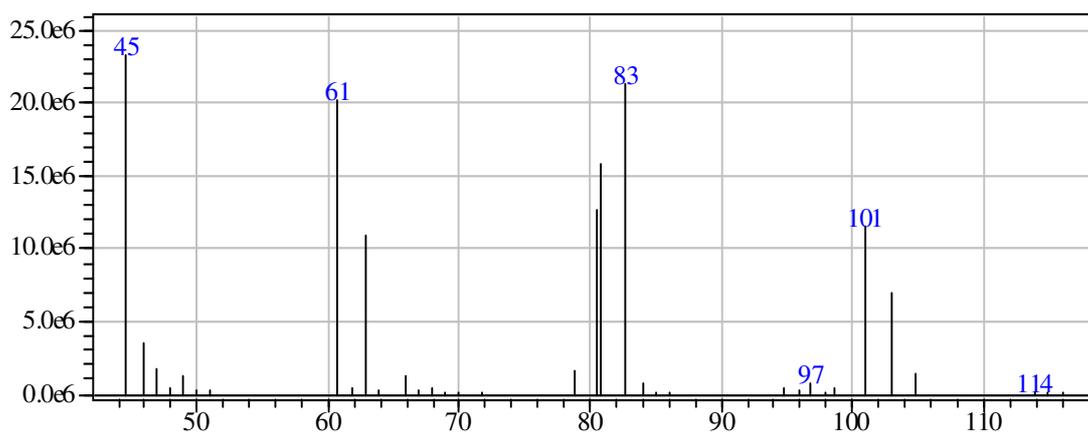


Figura 32 – Espectro de massas da amostra utilizada como inalante, 70 eV.

O elemento cloro é constituído por dois isótopos, o ^{35}Cl e o ^{37}Cl , com abundância natural de 75% e 25%, respectivamente. A presença de átomo (s) de cloro numa espécie química faz com que o sinal correspondente a essa espécie no espectro de massa apresente-se indicando as possibilidades de conter o isótopo ^{35}Cl ou ^{37}Cl . A intensidade relativa dos sinais é função da abundância natural dos isótopos.

Assim, se o composto que estamos investigando tiver dois átomos de cloro em sua estrutura, o mesmo teria a fórmula $\text{C}_2\text{H}_3\text{FCl}_2$, e teria massa molecular igual a $117 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, considerando que a massa atômica do elemento cloro é igual a $35,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. No entanto, no espectro de massas são observadas as massas das espécies contendo ^{35}Cl ou ^{37}Cl . Portanto, o íon-molecular desse composto deveria apresentar-se no espectro em m/z 116, espécie contendo dois átomos do isótopo ^{35}Cl ; m/z 118, espécie contendo um átomo do isótopo ^{35}Cl e outro do isótopo ^{37}Cl ; m/z 120, espécie contendo dois átomos do isótopo ^{37}Cl . Devido às abundâncias dos dois isótopos, o sinal em m/z 116 seria o mais intenso seguido do m/z 118 e do m/z 120.

O espectro apresenta o íon-molecular com intensidade muito reduzida, mas os sinais observados são perfeitamente explicáveis a partir da estrutura proposta. Assim, os íons m/z 101, 103 e 105 citados anteriormente podem ser obtidos a partir da perda de um radical metil. A espécie observada teria dois átomos de cloro, daí o porquê da observância dos três sinais. O pico-base no espectro está em m/z 45 e deveria corresponder à espécie $[\text{CH}_2=\text{CF}]^+$. Os sinais em m/z 61 e 63 deveriam corresponder a uma espécie que contém apenas um átomo de cloro. Esses sinais são atribuídos às espécies $[\text{CH}_2=\text{CCl}]^+$

contendo o isótopo ^{35}Cl ou ^{37}Cl . Os sinais em m/z 81 e 83 são obtidos a partir da perda de um radical cloro do íon-molecular.

Então, a estrutura que estamos propondo para o composto contido no aerossol é o 1,1-dicloro-1-flúor etano. Esse composto é comercializado sob as siglas HCFC-141b ou freon 141b. É um líquido volátil, incolor, com fraco odor etéreo e baixa toxicidade [87]. O HCFC-141b vem sendo utilizado em substituição aos clorofluorocarbonos (CFC) que são totalmente halogenados, como agente refrigerante, propelente ou solvente na limpeza de componentes eletrônicos (limpeza a seco). Em relação aos CFC's, os clorofluorohidrocarbonos (HCFC), devido às ligações C-H, são mais susceptíveis à oxidação na troposfera, reduzindo sua migração para a estratosfera e, portanto, seu efeito sobre a camada de ozônio [88].

Apesar de possuir todas as características para classificá-lo como inalante, o HCFC-141b não consta nas listas oficiais como droga de abuso e, portanto, o combate a esse tipo de utilização fica comprometido.

Por outro lado, apenas um caso de óbito associado ao HCFC-141b está relatado na literatura. Um homem de 40 anos foi encontrado morto no interior de um tanque no qual o HCFC-141b estava sendo usado como solvente. O homem não usava equipamentos de proteção individual e não havia mais líquido no interior do tanque quando o corpo foi encontrado [89].

Para confirmar que o composto investigado de fato trata-se do HCFC-141b, nós analisamos uma amostra dessa substância fornecida pela Secretaria da Receita Federal em Pernambuco, realizando os mesmos experimentos de

RMN e GC/MS aplicados à amostra investigada. Os espectros obtidos confirmaram nossas conclusões.

Nós investigamos também a possibilidade de encontrarmos metabólitos do HCFC-141b nas vísceras da vítima. Para isso, seguimos a metodologia proposta por Tong [90] que utilizou a espectroscopia de RMN de ^{19}F no extrato clorofórmico das vísceras. Submetemos esse mesmo extrato à análise por GC/MS. Infelizmente, não conseguimos identificar a presença de HCFC-141b, ou algum metabólito do mesmo, no extrato clorofórmico das vísceras. Provavelmente a não observância deve-se ao longo tempo entre a morte e o momento da análise – cerca de 20 dias. Considerando que o HCFC-141b tem ponto de ebulição muito baixo (32°C , 1 atm) e que há relatos na literatura de que gases como o freon-22 e o butano têm suas concentrações, nos fluidos corporais, reduzidas consideravelmente após mortes por asfixia [91, 92], o fato de não detectarmos esses compostos nas vísceras não inviabiliza os dados e evidências coletados.

Criação de Banco de Dados Espectrais para Sais de Trifluoroboratos orgânicos – RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F

Os organoboros são reagentes importantes em reações catalisadas por metais de transição, particularmente aquelas que são catalisadas por paládio para a produção de novas ligações C–C. A maioria das aplicações dos compostos tricoordenados de boro, sobretudo os ácidos e ésteres borônicos, são explicadas pelo fato de que esses compostos são facilmente sintetizados via reações de transmetalização ou hidroboração [93-95].

Os trifluoroboratos orgânicos são excelentes opções para substituir os boronatos, sobretudo porque eles agregam vantagens em reações do tipo Suzuki, síntese de álcoois, aminas, adição 1,2 e 1,4 à carbonila, dentre outras reações [96-99]. A principal vantagem se dá com a possibilidade de aumentar a complexidade da molécula mantendo intacta a ligação C–B, que pode ser utilizada em reações futuras. Além de suas aplicações na síntese orgânica, os trifluoroboratos orgânicos podem atuar como inibidores da serina protease e há relato da investigação das propriedades farmacológicas e toxicológicas do sal tiofeno-3-trifluoroborato de potássio [100, 101].

Objetivo

Diante da crescente importância dos trifluoroboratos orgânicos, nós nos propusemos a criar um banco de dados espectrais para 28 compostos dessa classe, usando a espectroscopia de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F .

Procedimento Analítico

Os compostos utilizados na criação do banco de dados foram sintetizados no Laboratório de Orgânica Avançada – LOA, da UFPE, por Roberta Ayres. Os espectros de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F foram obtidos em DMSO- d_6 , usando o sinal do solvente como referência interna de deslocamento (δ_{H} 2,5 ppm e δ_{C} 39,5 ppm). No caso dos espectros de ^{11}B e de ^{19}F , utilizamos $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (δ_{B} 0,0 ppm) e $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (δ_{F} 0,0 ppm) como referência externa de deslocamento químico. Os espectros foram obtidos com os seguintes parâmetros:

RMN de ^1H – tempo de aquisição igual a 3,6 s, 16 repetições, janela espectral igual a 5 kHz e pulso de 45° ;

RMN de ^{11}B – utilizamos a seqüência S2PUL fornecida no software VNMR versão 6.1C, consistindo de dois pulsos de rf. O primeiro pulso foi de 90° , seguido de um tempo de espera igual 500 ms e um segundo pulso de 180° . O tempo de aquisição foi igual a 1,0 s e o tempo de espera antes do primeiro pulso foi igual a 1,0 s. Foram 128 repetições e janela espectral igual a 16,5 kHz;

RMN de ^{13}C – tempo de aquisição igual a 1,7 s, 1024 repetições, janela espectral igual a 18,8 kHz e pulso de 90° ;

RMN de ^{19}F – tempo de aquisição igual a 0,3 s, 80 repetições, janela espectral igual a 50 kHz, pulso de 45° e tempo de espera igual a 1,0 s.

Resultados e Discussão

A obtenção de espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e de ^{19}F é relativamente comum, devido à importância e às propriedades magnéticas desses núcleos.

Assim sendo, voltaremos nossa atenção para a RMN de ^{11}B . O elemento boro possui dois isótopos que podem ser observados por RMN, ^{10}B e ^{11}B . Há uma preferência pelo ^{11}B por conta de sua alta abundância isotópica, maior constante magnetogírica e maior sensibilidade relativa. Além disso, o ^{11}B apresenta uma maior dispersão, em termos de Hz/ppm, do que a observada para o ^{10}B e as constantes de acoplamento observadas para o ^{11}B são três vezes maiores do que as correspondentes para o ^{10}B .

Os dois núcleos possuem momento quadrupolar e o mecanismo de relaxação quadrupolar normalmente é dominante para os mesmos, o que faz com que os valores de T_1 para esses núcleos sejam curtos, variando geralmente de 1 a 10 ms.

Tabela 4 – Propriedades magnéticas dos núcleos estudados.

	Abundância	Spin	$\gamma / (10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1})$	Sensibilidade relativa ao ^{13}C
^1H	99,99%	1/2	26,75	$5,87 \times 10^3$
^{10}B	19,90%	3	2,87	$2,32 \times 10^1$
^{11}B	80,10%	3/2	8,58	$7,77 \times 10^2$
^{13}C	1,07%	1/2	6,73	-
^{19}F	100,0%	1/2	25,16	$4,89 \times 10^3$

O spin maior que 1/2 e o conseqüente momento quadrupolar do ^{11}B faz com que os sinais de ressonância no espectro ^{11}B , bem como aqueles correspondentes aos núcleos vizinhos ao boro, apresentem-se alargados. No nosso caso, essa situação é mais evidente nos espectros de RMN de ^{13}C , haja vista que em 24 dos 28 casos estudados, o carbono diretamente ligado ao boro também era não-hidrogenado (Figura 33). Considerando que este sinal já não usa o efeito Overhauser advindo do desacoplamento e ainda tem uma maior distribuição de freqüências em função do mecanismo de relaxação

quadrupolar, os mesmos praticamente não eram observados e, portanto, não eram relatados quando da caracterização espectral desses compostos [102].

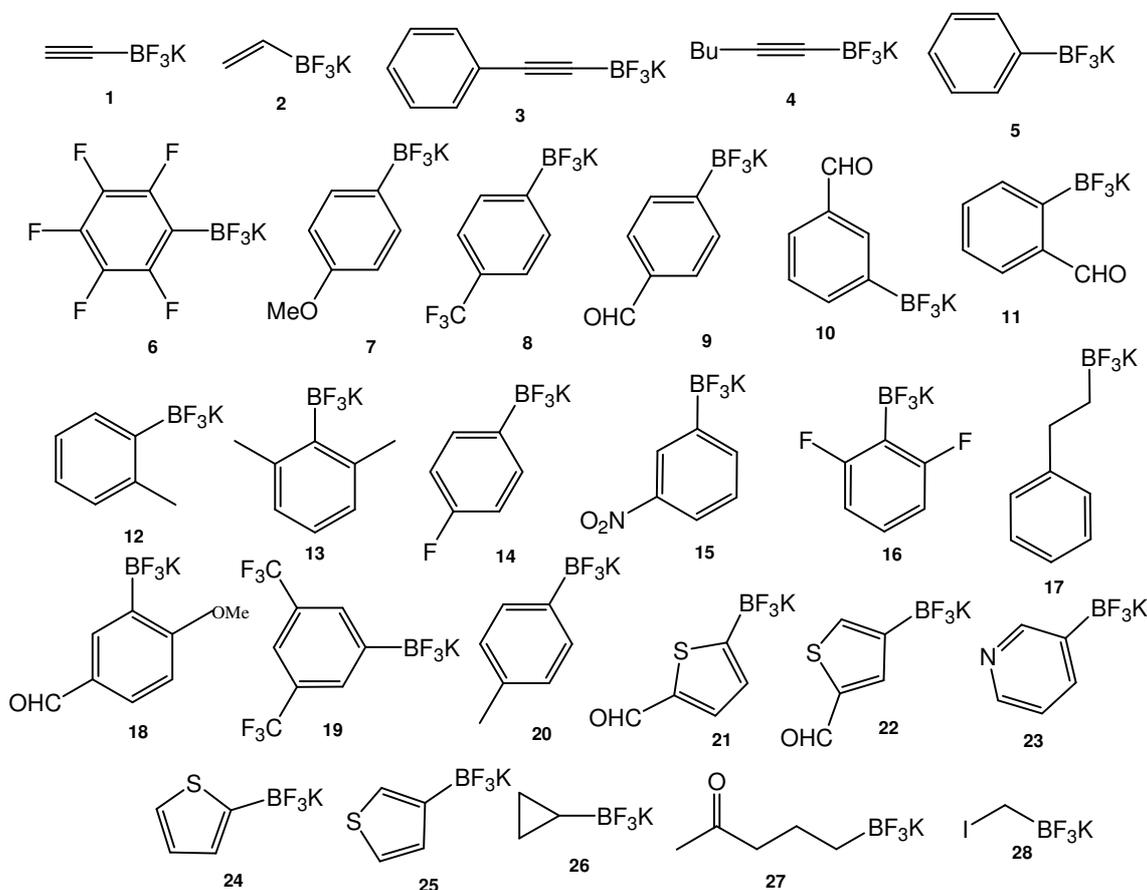


Figura 33 – Compostos utilizados para construção do banco de dados espectrais em RMN de ¹H, de ¹¹B, de ¹³C e de ¹⁹F.

Outro problema que tivemos que enfrentar, está associado ao fato de que ao obtermos os espectros de RMN de ¹¹B, os sinais correspondentes aos núcleos de boro contidos no tubo (vidro de borossilicato) de RMN sobrepuham-se àqueles que nós estávamos investigando. Associado a isto, tem-se o fato de que, devido ao momento quadrupolar, o sinal no espectro de RMN de ¹¹B já é naturalmente largo. A combinação desses fatores dificulta, inclusive, a observação das constantes de acoplamento entre os núcleos ¹¹B e ¹⁹F [103].

Para enfrentarmos essas questões, fizemos algumas modificações para garantir a observância do sinal do carbono ligado ao boro, bem como eliminar o

sinal oriundo do borosilicato e observar as constantes de acoplamentos $^{11}\text{B}-^{19}\text{F}$ no espectro de RMN de ^{11}B . Considerando que no vidro o movimento molecular é muito lento, enquanto o boro na solução está em regime de movimento molecular muito rápido, é razoável imaginar uma diferença significativa nos tempos de relaxação das duas espécies e que o tempo de relaxação transversal para o boro contido no vidro é menor do que para o boro da amostra. Assim sendo, utilizamos uma seqüência com dois pulsos de rf no eixo x, sendo o primeiro de 90° e o segundo de 180° , separados por intervalo de tempo de 500 ms. Esse intervalo de tempo foi suficiente para provocar a completa relaxação dos spins do boro contido no vidro enquanto o sinal oriundo da amostra ainda apresentava uma componente no plano xy. Dessa forma, ao aplicarmos o pulso de 180° , apenas os núcleos de interesse puderam ser observados, ou seja, os spins nucleares oriundos da amostra. Resolvido o problema da interferência do vidro, foi possível observar também as constantes de acoplamento $^{11}\text{B}-^{19}\text{F}$.

No caso do espectro de RMN de ^{13}C , para observarmos o sinal do carbono diretamente ligado ao boro, usamos pulso de 90° e aumentamos o tempo de espera para 2,3 s, fazendo com que o tempo total entre cada pulso fosse igual a 4,0 s. Assim, nós conseguimos observar o sinal correspondente ao carbono ligado ao boro. A Figura 34 apresenta os espectros de RMN do composto **1**, onde é possível observar o alargamento do sinal em δ_c 98,3 ppm, atribuído ao carbono diretamente ligado ao boro, e determinar o valor da constante de acoplamento.

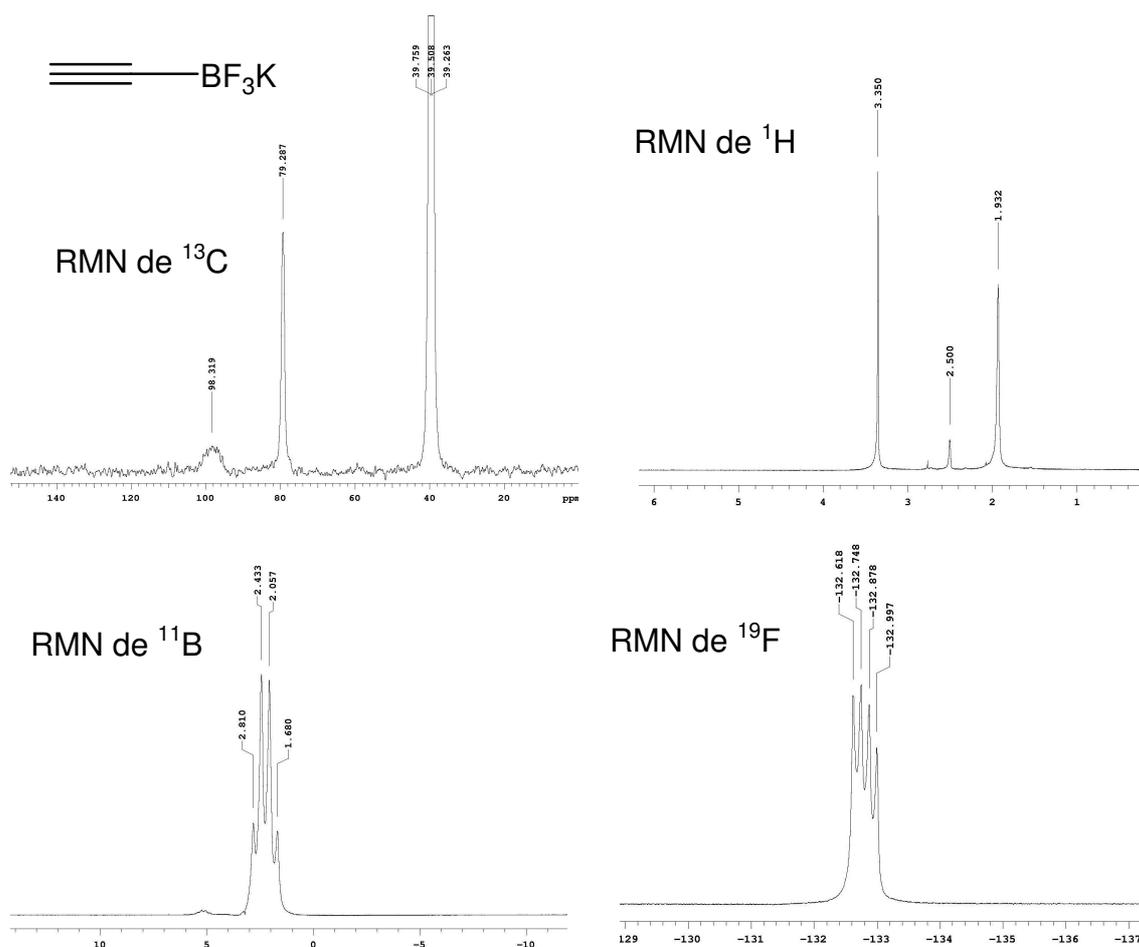


Figura 34 – Espectros de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F do composto **1** (etino trifluoroborato de potássio) em $\text{DMSO-}d_6$.

As tabelas 5 e 6 apresentam um resumo dos δ observados nos espectros de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F para os compostos estudados. Está descrito na literatura que o deslocamento químico do ^{11}B varia muito em função da natureza do ligante e do número de coordenação do boro. No nosso caso, não há alteração no número de coordenação. Assim, as variações de deslocamento químico dar-se-ão em função da vizinhança.

Nos compostos **1**, **3** e **4**, o átomo de boro está ligado a um átomo de carbono com hibridação sp . Assim, devido à anisotropia da ligação tripla blindando-os, esses núcleos apresentam-se com δ_{B} em torno de 2,0 a 3,0 ppm.

Para os compostos em que o boro se liga a um carbono sp^2 , os valores de δ_B variam 6,6 a 8,2 ppm, em função dos substituintes do sistema aromático. É interessante notar que nos extremos dessa faixa estão os compostos **16** e **13**, cujos substituintes do anel aromático estão nas duas posições *meta* em relação ao boro. Estes substituintes são o diflúor e o dimetil, respectivamente. Assim, por efeito mesomérico, o flúor faz aumentar a densidade eletrônica sobre o boro, blindando-o.

O mesmo efeito é observado no espectro de RMN de ^{13}C , com o sinal do carbono que está ligado ao boro apresentando-se mais blindado (δ_C 121,3 ppm) em comparação ao do composto **5** (δ_C 149,1 ppm) e ao do composto **13**, cujos substituintes na posição *meta* são as metilas (δ_C 126,0 ppm). Os resultados apresentados nas tabelas 5 e 6 mostram claramente que, além de alargar o sinal, o grupo triflúor-borato diminui a densidade eletrônica sobre o carbono no qual está ligado, fazendo com que seu sinal de ressonância apresente-se com frequências maiores.

Os espectros de RMN de ^{19}F mostram que os sinais do flúor ligado ao boro apresentam-se entre δ_F -142 e -130 ppm. A fim de avaliar se há mudanças no deslocamento químico ou no valor da constante de acoplamento $^{11}B-^{19}F$ em função do solvente e/ou temperatura utilizada, obtivemos espectros de RMN de ^{11}B e de ^{19}F do composto **1** em água, acetona, metanol e dimetil sulfóxido. A tabela 7 apresenta um resumo dos dados coletados nesses experimentos.

Tabela 5 – Sinais observados nos espectros de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F para os compostos de **1** a **13**.

	^1H	δ / ppm ^{11}B	^{13}C	^{19}F	$(^{11}\text{B}-^{19}\text{F})$ $^1\text{J} / \text{Hz}$
1	1,93 (s, 1H)	2,2	97,6 ; 79,1	-132,8	36,6
2	5,84-5,69 (m, 1H); 5,22-2,13 (m, 2H)	6,9	146,2 ; 121,6	-139,5	51,0
3	7,28-7,25 (m, 5H)	2,9	130,9; 128,3; 126,9; 125,4; 104,3 ; 89,5	-132,0	19,0
4	1,97 (t, 5,1 Hz, 2H); 1,34-1,29 (m, 4H); 0,83 (t, 7,2 Hz, 3H)	2,7	90,8 ; 56,9; 31,5; 22,0; 18,7; 14,0	-131,5	
5	7,43 (d, 6,6 Hz, 2H); 7,19-7,10 (m, 3H)	7,9	149,1 ; 131,6; 126,8; 125,8	-139,3	
6	–	6,0	147,9 (d, 247 Hz); 139,0 (d, 240 Hz); 136,6 (d, 247 Hz); 119,1	-132,8 ; -135,1 (m); -160,7 (t, 19 Hz, 2F); -165,5 (m)	42,0
7	7,73 (d, 7,8 Hz, 2H); 7,49 (d, 7,8 Hz, 2H); 2,51 (s, 3H)	7,4	157,9; 141,5 ; 132,8; 112,6; 55,1	-140,1	
8	7,58-7,50 (m, 2H); 7,43-7,35 (m, 2H)	7,4	155,9 ; 132,0; 126,2 (q, 30 Hz); 125,2 (q, 272 Hz); 122,8	-135,4; -140,2	
9	9,90 (s, 1H); 7,66 (d, 7,5 Hz, 2H); 7,55 (d, 7,5 Hz, 2H)	7,1	193,3; 159,5 ; 133,8; 131,6; 127,7	-140,2	
10	9,95 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 7,68 (ddd, 7,5 e 1,5 Hz, 1H); 7,61 (ddd, 7,5 e 1,5 Hz, 1H); 7,34 (dd, 7,5 Hz, 1H)	7,4	195,0; 150,3 ; 138,4; 135,1; 133,4; 127,7; 127,2	-139,9	
11	10,45 (s, 1H); 7,69 (d, 7,5 Hz, 1H); 7,63 (d, 7,2 Hz, 1H); 7,40 (dd, 7,5 e 7,2 Hz, 1H); 7,24 (dd, 7,2 e 7,5 Hz, 1H)	7,6	197,1; 156,0 ; 139,2; 132,9; 132,1; 126,0; 124,6	-132,5	51,0
12	7,30 (d, 6,0 Hz, 1H); 6,85-6,87 (m, 3H); 2,27 (s, 3H)	7,7	148,9 ; 140,5; 131,6; 128,2; 125,1; 123,4; 21,7	-137,7	52,0
13	6,81-6,76 (m, 1H); 6,69 (d, 7,2 Hz, 2H); 2,31 (s, 6H)	8,2	141,0; 126,6; 126,0 ; 124,7; 23,4	-129,6	53,0

Em negrito, os δ_{C} e δ_{F} dos núcleos diretamente ligados ao boro.

Tabela 6 – Sinais observados nos espectros de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F para os compostos de **14** a **28**.

	^1H	δ / ppm ^{11}B	^{13}C	^{19}F	$(^{11}\text{B}-^{19}\text{F})$ 1J / Hz
14	7,40-7,36 (<i>m</i> , 2H); 6,93-6,87 (<i>m</i> , 2H)	7,8	161,7 (<i>d</i> , 240Hz); 145,2 ; 133,4; 113,5 (<i>d</i> , 15 Hz)	-118,6; -139,1	
15	8,18 (<i>s</i> , 1H); 7,96 (<i>dd</i> , 8,1 e 2,0 Hz, 1H); 7,80 (<i>dd</i> , 7,2 e 2,0 Hz, 1H); 7,43 (<i>dd</i> , 7,8 e 7,2 Hz, 1H)	7,2	152,4 ; 147,4; 138,7; 128,5; 125,7; 121,1	-140,5	
16	7,16-7,06 (<i>m</i> , 1H); 6,69 (<i>t</i> , 9,0 Hz, 2H)	6,6	166,1 (<i>dd</i> , 240 e 17 Hz); 128,0; 121,3 ; 110,3 (<i>d</i> , 29 Hz)	-103,0; -132,5	45,0
17	7,21-7,02 (<i>m</i> , 5H); 2,48-2,42 (<i>m</i> , 2H); 0,40-0,28 (<i>m</i> , 2H)	5,2	148,0; 127,9; 127,7; 124,5; 32,1; 22,3	-138,3	18,0
18	9,78 (<i>s</i> , 1H); 7,87 (<i>d</i> , 2,5 Hz, 1H); 7,66 (<i>dd</i> , 8,7 e 2,5 Hz, 1H); 6,91 (<i>d</i> , 8,7 Hz, 1H); 3,74 (<i>s</i> , 3H)	7,2	192,2; 168,1; 137,8 ; 135,1; 131,0; 128,5; 109,6; 55,1	-138,2	
19	7,88 (<i>s</i> , 2H); 7,72 (<i>s</i> , 1H)	6,9	131,3 ; 128,2 (<i>q</i> , 31 Hz); 124,3 (<i>q</i> , 270 Hz); 118,8 (<i>q</i> , 3,5 Hz)	-61,7; -141,2	
20	7,22 (<i>d</i> , 7,2 Hz, 2H); 6,91 (<i>d</i> , 7,2 Hz, 2H); 2,21 (<i>s</i> , 3H)	7,9	146,0 ; 133,6; 131,5; 127,2; 21,2	-138,8	
21	9,87 (<i>s</i> , 1H); 7,84 (<i>s</i> , 1H); 7,64 (<i>s</i> , 1H)	6,4	185,3; 153,7 ; 144,0; 143,1; 136,9	-136,8	
22	9,86 (<i>s</i> , 1H); 7,85 (<i>s</i> , 1H); 7,65 (<i>s</i> , 1H)	6,6	185,1; 153,6 ; 143,9; 143,0; 136,7	-136,9	
23	8,54 (<i>s</i> , 1H); 8,29 (<i>d</i> , 4,8 Hz, 1H); 7,67 (<i>d</i> , 9,0 Hz, 1H); 7,12 (<i>dd</i> , 9,0 e 4,8 Hz, 1H)	7,7	152,6; 147,0; 142,2 (<i>br</i>); 139,6; 123,2	-139,4	
24	7,23 (<i>dd</i> , 3,9 e 3,8, 1H); 6,93 (<i>dd</i> , 3,8 e 1,2, 1H); 6,87	6,9	150,6 ; 127,5; 126,9; 124,4	-134,1	46,0
25	7,22 (<i>d</i> , 3,0 Hz, 1H); 7,10 (<i>s</i> , 1H); 7,06 (<i>d</i> , 3,0 Hz, 1H)	7,2	151,3 ; 132,0; 124,7; 123,0	-135,8	
26	(-0,02) – (-0,151) (<i>m</i> , 4H); (-0,71) – (-0,84) (<i>m</i> , 1H)	8,8	1,2; -0,4	-141,2	
27	2,28 (<i>t</i> , 7,5 Hz, 2H); 2,03 (<i>s</i> , 3H); 1,37 (<i>q</i> , 7,5 Hz, 2H); 1,07 (<i>q</i> , 7,5 Hz, 2H); -0,06 (<i>m</i> , 2H)	9,4	210,8; 43,9; 30,0; 27,7; 25,5	-137,2	
28	1,80 (<i>s</i> , 2H)	6,9		-140,7	50,0

Em negrito, os δ_{C} e δ_{F} dos núcleos diretamente ligados ao boro.

Tabela 7 – Mudanças no valor de δ_B e $J(^{11}\text{B}-^{19}\text{F})$ em função do solvente e da temperatura.

Composto	Solvente	T (°C)	δ_B / ppm	δ_F (ppm)	$^1J_{(B-F)}$ / Hz
$\equiv\text{BF}_3\text{K}$ 1	D ₂ O	25	2,6	-144,2	15,1
	D ₂ O	50	2,9	-143,8	14,6
	Acetona- <i>d</i> ₆	25	3,0	-135,8	32,8
	Acetona- <i>d</i> ₆	50	3,0	-136,0	36,2
	CD ₃ OD	25	4,0	-155,7	11,6
	CD ₃ OD	50	4,0	-155,7	11,5
	CD ₃ CN	25	2,9	-135,7	35,9
	CD ₃ CN	50	2,9	-135,8	35,9
	DMSO- <i>d</i> ₆	25	2,2	-132,8	36,6
	DMSO- <i>d</i> ₆	50	2,2	-132,9	36,1

Os resultados apresentados na tabela 7 indicam que os valores de $^1J(^{11}\text{B}-^{19}\text{F})$ e δ não se alteram em função da temperatura, mas que a constante de acoplamento $^{11}\text{B}-^{19}\text{F}$ diminui muito quando é utilizado um solvente prótico. Isso se deve ao fato de que num solvente prótico, o caráter iônico do composto é acentuado. Os apêndices V e VI apresentam os espectros de RMN de ^{11}B e ^{19}F , respectivamente, de 11 (onze) dos compostos estudados.

Conclusão

Conseguimos produzir o banco de dados espectrais com os dados de RMN de ^1H , de ^{11}B , de ^{13}C e de ^{19}F para 28 trifluoroboratos orgânicos, sendo este trabalho publicado no periódico *Magnetic Resonance in Chemistry* [104].

Erro na Manipulação de Fármaco? – Outro Estudo de Caso

Segundo a Organização Mundial de Saúde, três aspectos são cruciais para o uso de um medicamento: correta prescrição; eficácia; e segurança [105]. A correta prescrição está relacionada ao diagnóstico e, portanto, é uma responsabilidade exclusiva do profissional de saúde. No que diz respeito à eficácia e segurança de um medicamento, é importante garantir as condições de estocagem, bem como que o princípio ativo do mesmo esteja na dose terapêutica pré-estabelecida, pois a sub-dose terapêutica representa fator de morbidade aos pacientes. Mais comumente, falhas durante a produção ou nos processos envolvendo a estabilidade das preparações farmacêuticas são as causas da sub-dosagem terapêutica [106, 107]. Desta forma, um rígido controle de qualidade analítico se faz necessário para evitar este tipo de problema nos medicamentos.

Assim como no caso das análises de biofluidos, as técnicas cromatográficas (GC e HPLC) seguidas de um sensível sistema de detecção (espectrometria de massas, detector de índice de refração, detector UV/Vis) normalmente são utilizadas como métodos de rotina para medicamentos. Isso ocorre porque os medicamentos freqüentemente são misturas do princípio ativo e diversos excipientes [108].

A espectroscopia de RMN tinha a sua ação restrita basicamente aos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, sendo escassos os casos de sua utilização com propósitos analíticos. Todavia, alguns problemas específicos da indústria farmacêutica passaram a ser estudados usando a espectroscopia de RMN como sonda. É o caso, por exemplo, quando isômeros

óticos atuam de forma diferente e podem causar sérios problemas ao paciente [109]. Isso pode ser estudado com o uso de reagentes de deslocamento quiral ou agentes de solvatação quiral, observando mudanças provocadas no espectro de RMN em função da utilização dessas substâncias; o mesmo ocorre quando há uma investigação de polimorfismo. Nesses casos, observa-se que a rigor não haveria problemas com o princípio ativo, no que diz respeito à sua pureza química, mas há uma redução na biodisponibilidade do mesmo. Esse fenômeno ocorre porque há uma mudança na estrutura cristalina do fármaco, que pode ser investigada pela espectroscopia de RMN no estado sólido [34]. Há também relatos de estudos que utilizam a espectroscopia de RMN ordenada por difusão (DOSY) e RMN de ^{19}F para investigar e determinar o teor de possíveis impurezas [110].

Aqui, apresentamos um estudo de caso onde a espectroscopia de RMN de ^1H foi empregada na investigação analítica de um medicamento proveniente de formulação magistral, constituído por uma mistura de atenolol e maleato de enalapril, cuja concentração e/ou composição real dos princípios-ativos foi questionada pelo paciente.

Descrição do caso

Uma paciente idosa, com prévio diagnóstico de hipertensão arterial, procurou seu cardiologista que prescreveu os seguintes fármacos manipulados: Atenolol e Maleato de Enalapril. A manipulação seria feita de maneira tal que os dois fármacos integrassem a mesma cápsula. A paciente procurou uma grande rede de farmácias de manipulação do Recife, que preparou o medicamento prescrito. A referida paciente utilizou o medicamento manipulado

conforme a prescrição médica, mas não foi observada a melhora clínica esperada (controle da hipertensão arterial e da frequência cardíaca). Com isso, ela retornou ao seu médico que, após uma adequada anamnese, seguido de aferição da pressão arterial e da análise do eletrocardiograma, recomendou-a a imediata suspensão do medicamento manipulado e a aquisição do mesmo medicamento, porém, de origem industrializada. Essa medida resolveu o problema do ponto de vista da saúde da paciente, mantendo os valores da pressão arterial e da frequência cardíaca dentro dos limites de normalidade. Entretanto, a dúvida com relação ao medicamento manipulado persistiu. Então, a citada paciente/cliente procurou a farmácia responsável pela manipulação do medicamento em questão, e após o relato do ocorrido, os profissionais da farmácia não admitiram a existência de tal problema, assim como o questionamento da ineficácia do medicamento manipulado supracitado. Desta maneira, a paciente nos procurou com o intuito de confirmar se o medicamento se tratava de fato de uma mistura com Atenolol e Maleato de Enalapril e, em caso afirmativo, se a proporção prescrita pelo médico havia sido cumprida.

Procedimento Analítico

A estratégia analítica adotada é relativamente simples, consistindo de: obter um espectro de RMN de ^1H da amostra problema; analisar e caracterizar, usando a espectroscopia de RMN de ^1H , uma amostra comercial de atenolol (Laboratório Biosintética LTDA, comprimido com 50 mg) e outra de maleato de enalapril (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, comprimido com 10 mg); preparar, a partir das amostras anteriormente analisadas, uma mistura

dos dois fármacos e obter espectro de RMN de ^1H dessa mistura, comparando o espectro obtido com o da amostra-problema.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em solução de HCl / D_2O 3% v/v, usando uma seqüência de pulsos com pré-saturação do sinal da água com os seguintes parâmetros: janela espectral igual a 5 kHz, 32 repetições, pulso de 90° , tempo de saturação igual a 3,0 s e tempo de aquisição igual a 3,74 s. Os espectros foram processados com *line broadening* igual a 0,3 Hz.

Por tratar-se de um processo judicial, os espectros que, inicialmente, foram obtidos a pedido da reclamante, em nosso laboratório, sem a presença de um perito oficial ou da parte reclamada, foram repetidos obedecendo todos os requisitos legais com a presença de dois peritos juramentados e de um profissional designado pela empresa reclamada. A paciente/cliente abdicou do direito de estar presente, ou se fazer representar, durante a reanálise.

Resultados e Discussão

A estratégia adotada possibilitaria, dentre outras coisas, observar os sinais de RMN devidos aos excipientes utilizados na manipulação, bem como, os sinais devidos aos possíveis produtos de decomposição dos princípios-ativos.

As Figuras 35 e 36 apresentam os espectros de RMN de ^1H e as estruturas dos fármacos utilizados na manipulação, atenolol e maleato de enalapril, respectivamente, bem como a numeração utilizada na atribuição dos sinais.

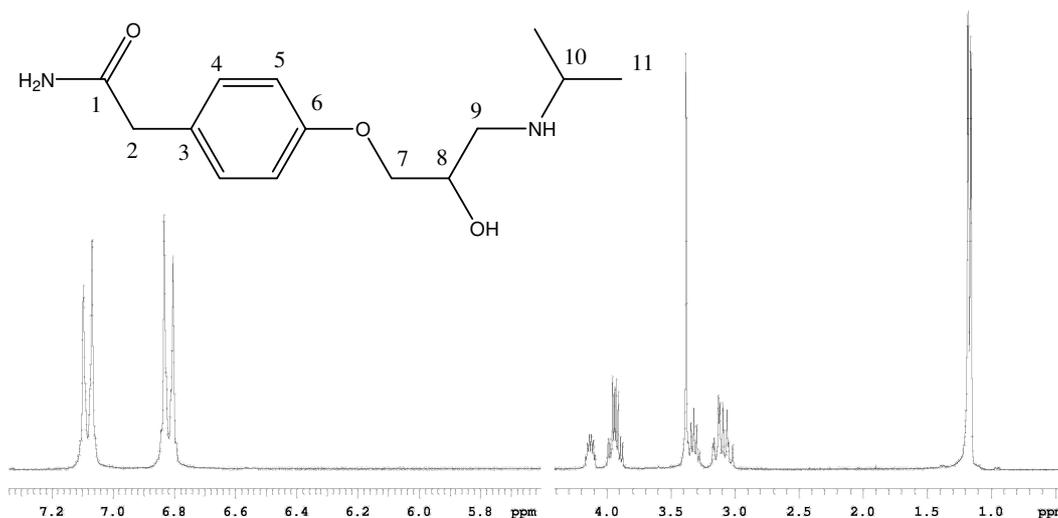


Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H do atenolol – (2-[4-2-hidróxi-3-(isopropilamino) propóxi] fenil] etanamida), em $\text{HCl}/\text{D}_2\text{O}$, com pré-saturação do sinal da água (δ 4,72 ppm, sinal excluído), 300 MHz.

A atribuição dos sinais é relativamente simples, uma vez que observamos: dois dupletos em δ 1,19 e 1,21 ppm atribuído às metilas (H-11 / H-11') do grupo isopropil; um sistema AA'BB' entre δ 6,82 e 7,08 ppm, atribuído aos núcleos H-5 / H-5' e H-4 / H-4', respectivamente; um simpleto em δ 3,38 ppm atribuído ao núcleo H-2; um hepteto em δ 3,32 ppm atribuído ao núcleo H-10; um multipletto em δ 4,13 ppm atribuído ao núcleo H-8; dois dupletos de dupletto entre δ 3,80 e 4,10 ppm atribuídos aos núcleos H-7 / H-7' que são diastereotópicos; e, pelo mesmo motivo, outros dois dupletos de dupletto entre δ 2,90 e 3,25 ppm atribuídos aos núcleos H-9 / H-9'.

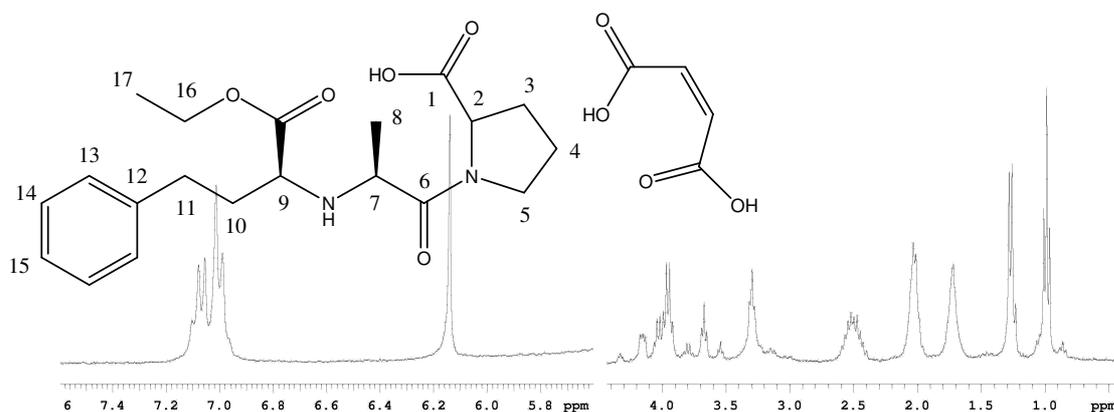


Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H do maleato de enalapril – Ácido Butenodióico e Ácido-1-[2-(1-Etóxicarbonil-3-fenil-propilamino) propionil] pirrolidina-2-carboxílico, em HCl/D₂O, com pré-saturação do sinal da água (δ 4,72 ppm), 300 MHz.

No caso do maleato de enalapril, a atribuição dos sinais não é tão simples quanto foi a atribuição para o atenolol. Mas, claramente, observamos um conjunto de sinais entre δ 6,90 e 7,20 ppm, atribuídos aos núcleos do grupo fenila (H-13, H-13', H-14, H-14' e H-15), e um simpleto em δ 6,14 ppm, atribuído ao CH do maleato. Observa-se também um tripleto em δ 0,99 ppm atribuído ao núcleo H-17. A atribuição dos sinais de RMN de ^1H para o maleato de enalapril, em D₂O, foi descrito por Zoppi e colaboradores [111]. Porém, no nosso caso, pequenas mudanças no valor de δ foram observadas em função de termos utilizado HCl/D₂O como solvente. A tabela 8 apresenta a atribuição para os dois fármacos.

Tabela 8 – Atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^1H do atenolol e do maleato de enalapril em HCl/D₂O 3%, 300 MHz.

Atenolol		Maleato de Enalapril	
Núcleo	δ /ppm	Núcleo	δ /ppm
11	1,19	17	0,99
11'	1,21	8	1,27
9	2,90 – 3,25	3, 4, 10	1,50 – 2,20
10	3,32	11	2,50
2	3,38	5	3,29
7	3,80 – 4,10	9	4,15
8	4,13	7	3,29
5	6,81	16	3,95
4	7,08	CH (maleato)	6,14
-	-	13, 14, 15	6,90 – 7,20

O espectro de RMN de ^1H da mistura de atenolol com maleato de enalapril preparada em nosso laboratório é apresentado na Figura 37. No detalhe, podemos observar o tripleto atribuído ao núcleo H-17 do maleato de enalapril (δ 0,99 ppm) e os dupletos, não resolvidos, atribuídos às metilas H-11 (δ 1,21 ppm) do atenolol. Em campo baixo, observamos o simpleto atribuído ao grupo CH do maleato (δ 6,14 ppm) e os sinais do sistema AA'BB' do atenolol e do grupo fenila do enalapril. Para efeito de cálculos para determinar a concentração relativa dos fármacos, poderíamos utilizar as áreas de integração sob o simpleto em δ 6,14 ppm e δ entre 0,9 e 1,3 ppm.

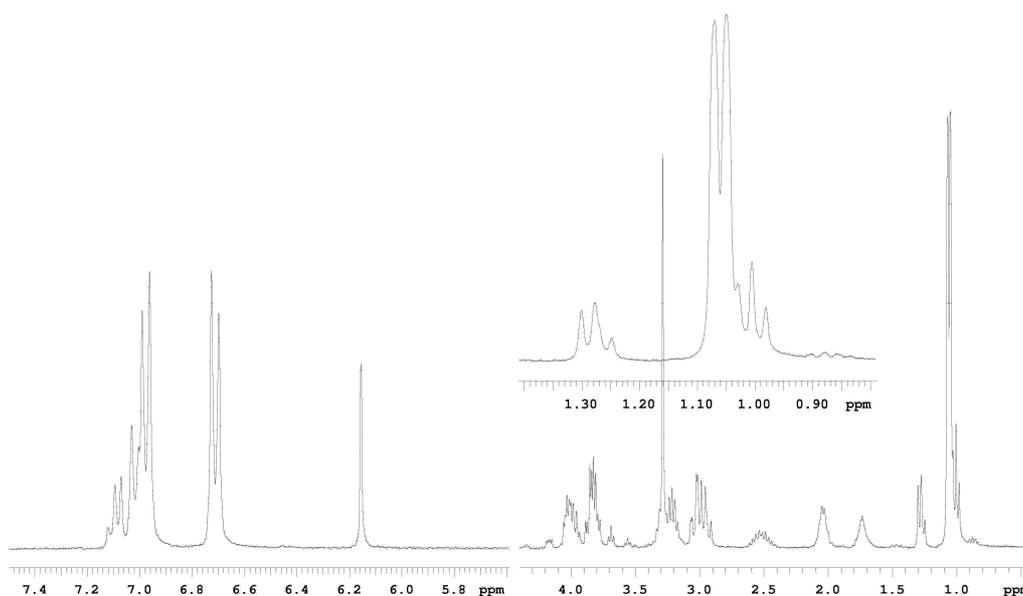


Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da mistura padrão de maleato de enalapril – ácido butenodióico e ácido-1-[2-(1-etóxi-carbonil-3-fenil-propilamino) propionil] pirrolidina-2-carboxílico e atenolol – (2-[4-2-hidróxi-3-(isopropilamino) propóxi] fenil] etanamida), em HCl/D₂O, com pré-saturação do sinal residual da água (δ 4,72 ppm), correspondente à região não apresentada. No detalhe superior, expansão da região entre δ 0,8 e δ 1,4 ppm evidenciando o tripleto (δ 0,99 ppm) e o duplete (δ 1,21 ppm) atribuídos às metilas do maleato de enalapril e atenolol, respectivamente.

Para garantir que o espectro seja quantitativo, nos certificamos de que toda a amostra fosse solúvel no sistema proposto. O passo seguinte teria sido determinar o tempo de relaxação longitudinal dos sinais que teriam suas áreas

de integração selecionadas. No entanto, ao observarmos o espectro de RMN de ^1H da amostra-problema (Figura 38), não detectamos, nem os sinais referentes ao sistema AA'BB' do anel aromático *para*-substituído do atenolol, nem os dupletos em δ 1,21 ppm, atribuídos às metilas do grupo isopropil do atenolol. Na verdade, nenhum dos sinais atribuídos ao atenolol pode ser identificado no espectro de RMN de ^1H da amostra-problema. Esse espectro é semelhante ao espectro do maleato de enalapril (Figura 36).

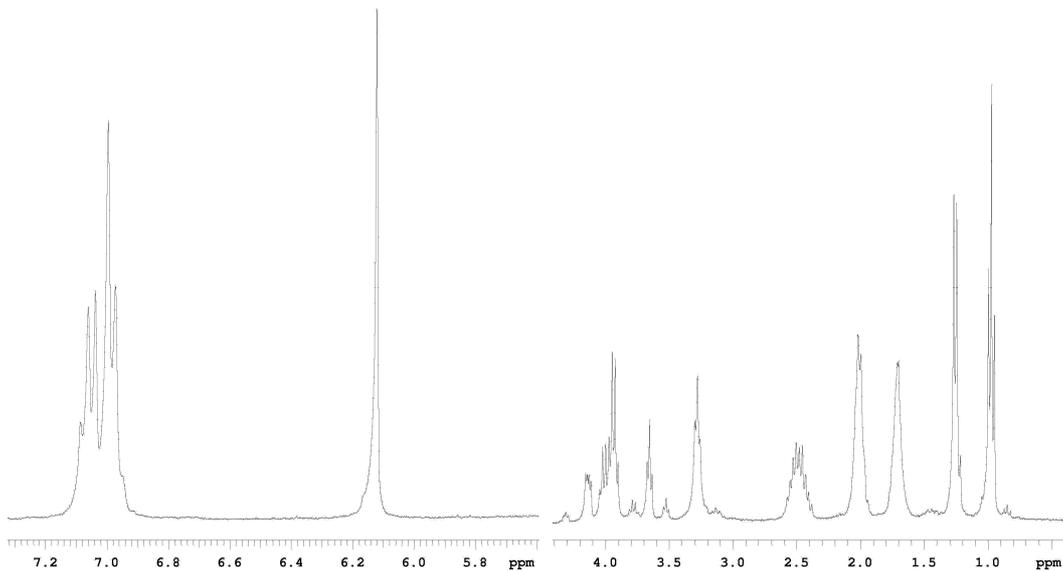


Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H da amostra-problema em $\text{HCl}/\text{D}_2\text{O}$, com pré-saturação do sinal residual da água (δ 4,72 ppm), 300 MHz.

Com isso, nós concluímos que a amostra-problema não contém atenolol, o que é perfeitamente compatível com os sintomas clínicos apresentados pela paciente/cliente após o uso da medicação. Considerando também que nenhum sinal que pudesse ser associado a um produto de decomposição do atenolol fora observado, provavelmente o atenolol não foi adicionado no momento da formulação do medicamento.

Enfatizamos que a metodologia proposta se mostrou útil, rápida, eficiente e sem interferências. Não deixando dúvidas acerca da ausência de um dos fármacos: o atenolol.

O laudo analítico e o parecer do médico são peças que integram a ação judicial movida pela paciente/cliente contra a farmácia de manipulação. O caso encontra-se em fase de julgamento.

Polifosfato – Nutrição parenteral e matriz polimérica

Na clínica médica, há duas formas de administrar um suporte nutricional: a nutrição enteral, administração por via digestiva, ou parenteral, administração por via venosa [112]. Considerando-se que a nutrição enteral utiliza a via fisiológica natural e que seu preparo é relativamente simples e barato, a opção pela nutrição parenteral só é feita quando há algum tipo de alteração ou comprometimento funcional/anatômica no sistema gastrointestinal, ou ainda quando há necessidade de manter o sistema digestivo de repouso por razões terapêuticas [113, 114].

Segundo a portaria de nº 272/MS/SNVS, a “nutrição parenteral é uma solução, ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais, estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração intravenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas” [115].

A nutrição parenteral utiliza água como veículo e as substâncias contidas na mesma podem ser separadas em três grupos: a fonte calórica, constituída por carboidratos e gorduras; a fonte protéica, formada por aminoácidos; e os micronutrientes, constituídos por sais minerais, oligoelementos e vitaminas. Nesse sentido, dezenas de componentes podem estar presentes numa nutrição parenteral. É preciso, portanto, cuidar para garantir a estabilidade físico-química, dentre outros fatores, da solução ou emulsão. Assim, é preciso estar atento para evitar a separação de fase da emulsão lipídica, a degradação por processos oxidativos e a precipitação de

fosfato de cálcio [116-118], uma vez que os íons fosfato e cálcio são importantes micronutrientes para o organismo.

No nosso trabalho, nos detivemos a esse último ponto. Alguns parâmetros devem ser levados em consideração quando da formulação da nutrição parenteral, sob pena de expor o paciente a sérios riscos à sua saúde. Por exemplo, a administração de nutrição parenteral contendo partículas com tamanhos maiores que 5 μm pode causar obstrução de artérias pulmonares, podendo o quadro clínico evoluir a óbito. Há relatos na literatura de casos dessa natureza a partir da formação de cristais de fosfato de cálcio [119, 120]. Assim, é imprescindível considerar e trabalhar no sentido de evitar tal possibilidade.

Os fosfatos podem se apresentar como ortofosfatos (PO_4^{3-}) ou como cadeias contendo n grupos fosfatos, por exemplo, pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), trifosfato ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$) ou, quando n é maior que 4, polifosfatos. Os fosfatos são espécies de grande importância científica e tecnológica, seja por seu papel nos sistemas vivos, seja por sua capacidade de produção de novos materiais [121]. Em um dos trabalhos que desenvolvemos na dissertação de mestrado [122], estudamos a transição sol-gel do ponto de vista microscópico, utilizando a espectroscopia de RMN de ^{31}P ordenada por difusão (DOSY ^{31}P). Géis e vidros de polifosfatos são muito utilizados em implantes de ossos e dentes, como fibras óticas na região do ultravioleta, no encapsulamento de material radioativo ou como matriz polimérica de suporte para novos materiais, dentre outras aplicações. A formação desses vidros e géis ocorre através da complexação do polifosfato com cátions, como o Ca^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Sn^{2+} .

Pereira propôs utilizar polifosfato como fonte de fósforo em nutrição parenteral, com base na conhecida habilidade dos polifosfatos em dificultar a precipitação ou em dissolver precipitados de metais alcalinos terrosos [123]. Inclusive, essa capacidade é utilizada no tratamento de águas industriais, uma vez que a dureza da água – a presença de íons cálcio e magnésio – é potencialmente perigosa para a eficiência térmica de caldeiras, podendo os precipitados desses íons obstruir tubulações e até mesmo provocar explosões. Nesse sentido, polifosfatos são comumente utilizados como seqüestrantes de íons cálcio e magnésio em tratamentos de águas industriais [124].

No contexto da nutrição parenteral, a utilização de polifosfato possibilitaria aumentar a concentração de grupos fosfatos disponíveis, sem riscos de precipitação. Aqui é preciso deixar claro que, para minimizar os riscos de precipitação, normalmente a solução de fosfato é acondicionada em ampolas e é adicionada à nutrição parenteral momentos antes da administração.

Porém, uma possibilidade que põe em risco a utilização de polifosfato para esse fim é a possibilidade de hidrólise da cadeia de polifosfato durante o processo de esterilização ou de preparação e administração da nutrição parenteral. A hidrólise formaria ortofosfato e aumentaria a possibilidade de precipitação de fosfato de cálcio.

A espectroscopia de RMN de ^{31}P é normalmente utilizada para determinar o tamanho médio de cadeias de polifosfatos [125]. Além disso, a RMN de ^{31}P possibilita determinar a quantidade relativa de ortofosfatos e

metafosfatos, que são fosfatos de cadeia cíclica, presentes como impurezas do polifosfato.

Barros e Azevedo demonstraram que polianilina é formada quando o monômero é exposto à radiação gama na presença de íons prata [126]. Como este processo ocorre com mudança de cor, e a intensidade da cor é proporcional à dose de radiação gama, o mesmo poderia ser utilizado como um sensor de exposição à radiação gama. No entanto, para que esse sensor seja possível, é necessário ter um material que possa suportar a anilina e que seja estável à radiação gama. A proposta, portanto, é utilizar o gel de polifosfato como matriz polimérica para um sensor de radiação gama. Assim, foi produzido um material híbrido de polianilina (PANI) e polifosfato de alumínio a partir do processo sol-gel seguido de exposição à radiação gama. Sendo mais específico, o gel de polifosfato de alumínio foi produzido a partir da mistura de uma solução aquosa contendo anilina (monômero), nitrato de prata, polifosfato de sódio e nitrato de alumínio. Após a formação do gel, o material foi centrifugado. O gel, assim produzido, foi exposto à radiação gama para formação da polianilina. Com isso, nós precisamos determinar se o gel de polifosfato de alumínio é, ou não, resistente à radiação gama.

Então, o fator que liga os trabalhos descritos acima é o fato de o polifosfato, seja no estado sólido ou em solução, ser exposto à radiação gama, bem como a capacidade da espectroscopia de RMN de ^{31}P avaliar a estabilidade da cadeia de polifosfato frente a essa exposição. Assim, nós realizamos experimentos utilizando RMN de ^{31}P no estado sólido (RMN de ^{31}P MAS), e em solução, visando estudar a estabilidade da cadeia de polifosfato

frente à radiação gama, considerando que este tipo de emissão, além de iniciar o processo de polimerização no caso da anilina, é uma eficiente ferramenta utilizada para fins de esterilização na indústria farmacêutica [127]. Utilizamos como parâmetro de avaliação o tamanho médio da cadeia do polifosfato antes e após a exposição à radiação gama, e também a razão entre as áreas de integração sob os sinais atribuídos aos núcleos Q^0 e a soma dos núcleos Q^1 e Q^2 .

Objetivo

Investigar a estabilidade da cadeia do polifosfato de sódio e do gel de polifosfato de alumínio frente à radiação gama usando a espectroscopia de RMN de ^{31}P em solução e no estado sólido.

Procedimento Analítico

As amostras foram preparadas com polifosfato de sódio (Vetec), nitrato de alumínio [$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Merck], nitrato de prata (Merck) e anilina (Nuclear), que foi destilada sob pressão atmosférica e mantida sob baixa temperatura e ambiente seco até o momento da utilização.

A exposição à radiação gama foi realizada com uma fonte de cobalto (Radionics Laboratory, Scotch Plains, New Jersey, USA) com capacidade de fornecer uma taxa de $12,6 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$.

Os espectros de RMN de ^{31}P foram obtidos num espectrômetro de RMN Varian Unity Plus 300, operando a 121,4 MHz. Os espectros em solução foram obtidos com pulso de 45° , tempo de aquisição igual a 1,6 s, tempo de espera igual a 5,0 s e 64 repetições. O processamento foi feito com *line broadening* igual a 1,0 Hz. Os espectros no estado sólido foram obtidos com rotação no

ângulo mágico (MAS) da ordem de 6 kHz, tempo de espera igual a 1,0 s e 160 repetições. O processamento foi feito com *line broadening* igual a 10,0 Hz. Por conta da sobreposição dos sinais no espectro de RMN de ^{31}P MAS, as áreas de integração sob os sinais foram obtidas após deconvolução espectral, usando função gaussiana, utilizando o software VNMR 6.1C fornecido pela Varian Inc.

Resultados e Discussão

A Figura 39 apresenta o espectro de RMN de ^{31}P em solução aquosa do polifosfato de sódio antes e após a exposição a 50 kGy.

Na interpretação dos espectros, utilizamos a nomenclatura Q^n , onde Q representa o núcleo de fósforo que está sendo observado e n é o número de fosfato (s) vizinho (s) [128]. Assim, um grupo ortofosfato é designado como Q^0 e um grupo pirofosfato é formado por dois núcleos Q^1 . O trifosfato tem dois núcleos Q^1 e um núcleo Q^2 , enquanto os metafosfatos, fosfatos de cadeia cíclica, possuem apenas núcleos Q^2 .

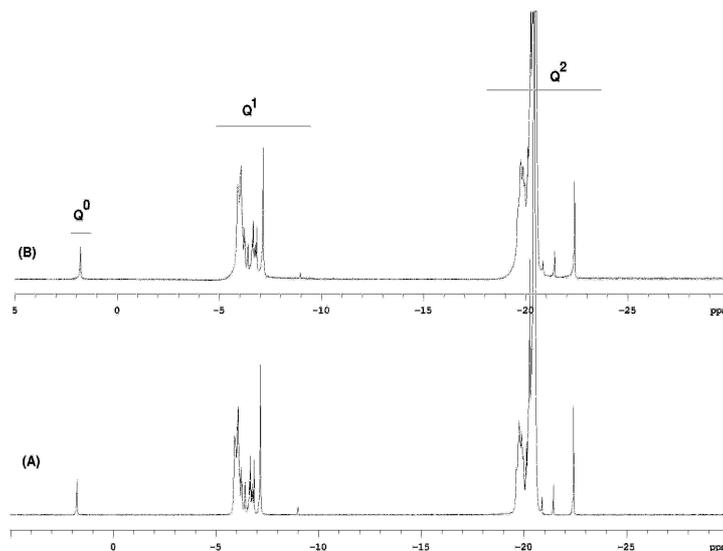


Figura 39 – Espectros de RMN de ^{31}P de solução aquosa de polifosfato de sódio, antes (A) e após (B) irradiação gama (50 kGy), 121,4 MHz.

O interessante de usar a nomenclatura Q^n é o fato de que no espectro de RMN de ^{31}P há regiões de δ bem definidas para esses núcleos. Assim, Q^0 tem δ entre -1 e 4 ppm; Q^1 entre δ -10 e -5 ppm; e Q^2 entre δ -23 e -18 ppm. As áreas de integração sob os sinais podem ser utilizadas para determinar o tamanho médio da cadeia (TMC) do polifosfato, usando a expressão abaixo:

$$TMC = 2 \left(\frac{Q^2 + Q^1}{Q^0} \right)$$

No espectro de RMN de ^{31}P da amostra, podemos observar que há metafosfatos (δ -22,5 ppm) como contaminante do polifosfato. Assim, para calcular o TMC do polifosfato, temos que desconsiderar a contribuição desse sinal para a área de integração correspondente aos núcleos Q^2 .

O valor do TMC medido antes da exposição à radiação gama foi igual a 9,53, enquanto o valor medido após a exposição à 50 kGy foi igual a 9,55. Ou seja, o TMC não se alterou com a exposição à radiação gama, indicando que a cadeia de polifosfato de sódio é resistente a uma exposição de 50 kGy.

A dose de 50 kGy não foi escolhida arbitrariamente. Considerando-se que a dose utilizada para esterilização, em geral, não passa de 20 kGy, utilizar 50 kGy deu-nos segurança quanto à confiabilidade na conclusão a que chegamos.

Na Figura 40, temos os espectros de RMN de ^{31}P MAS das amostras de gel de polifosfato de alumínio antes e após a exposição à 75 kGy. Por conta da complexação com o íon alumínio e da variação de pH do meio, as regiões atribuídas aos núcleos Q^0 , Q^1 e Q^2 são diferentes daquelas observadas no caso do polifosfato de sódio. Assim, núcleos Q^0 apresentam-se com δ entre -5

e 0 ppm; núcleos Q¹ tem δ entre -20 e -8 ppm; e núcleos Q² tem δ entre -40 e -20 ppm.

O objetivo aqui é determinar se, em termos de estabilidade frente à radiação gama, o gel de polifosfato pode ser utilizado como matriz polimérica de um sensor de radiação gama. Em tese, uma aplicação possível para esse sensor seria utilizá-lo em embalagens de produtos que seriam esterilizados por radiação gama. Então, o raciocínio utilizado no caso do polifosfato de sódio exposto à radiação gama é válido aqui também. Ou seja: submeter o gel a uma dose superior àquela que o material deve ser submetido quando de sua utilização e observar sua estabilidade estrutural.

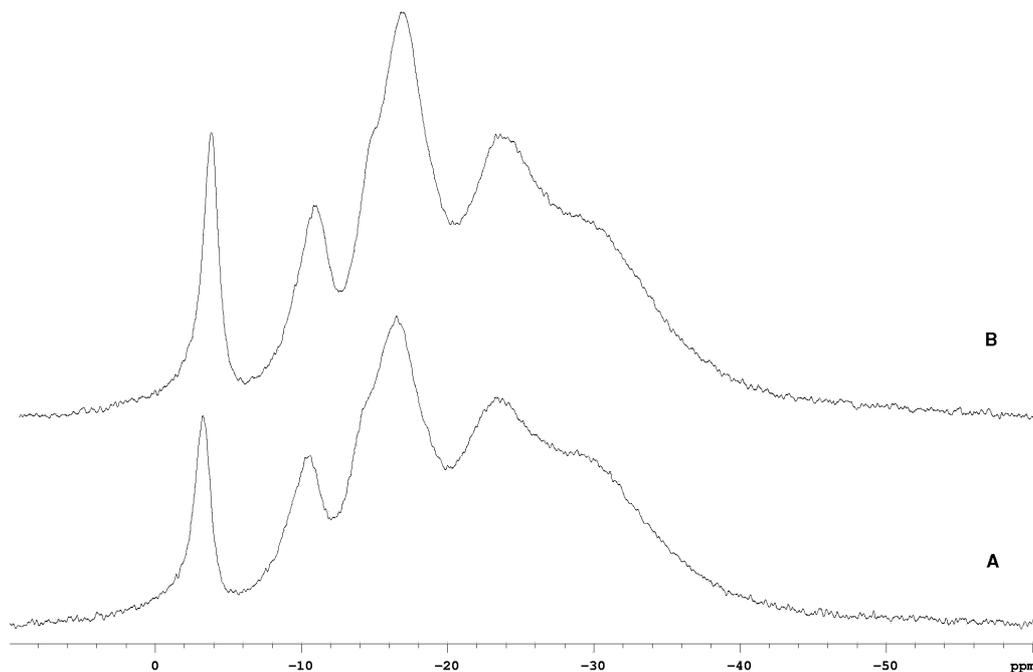


Figura 40 – Espectros de RMN de ³¹P MAS do gel de polifosfato de alumínio contendo anilina e nitrato de prata, antes (A) e após (B) exposição à radiação gama (70 kGy), rotação igual a 6 kHz, 121,4 MHz.

No caso do gel de polifosfato de alumínio, por se tratar de uma estrutura macromolecular, não podemos calcular um tamanho médio de cadeia. A análise da estabilidade da cadeia foi feita observando as áreas de integração e

a relação entre elas, para cada tipo de núcleo. A tabela 9 apresenta os valores das áreas de integração observados para cada tipo de núcleo, usando a nomenclatura Q^n , nos espectros antes e após a exposição à radiação gama.

Tabela 9 – Áreas de integração sob os sinais no espectro de RMN de ^{31}P MAS das amostras de gel de polifosfato de sódio antes e após irradiação gama

	Q^0	Q^1	Q^2
0 kGy	6,37	35,78	57,85
70 kGy	6,93	37,23	55,84
Δ (irr – n-irr)	+ 0,56	+ 1,45	– 2,01

Os resultados apresentados na tabela 9 indicam que, após a exposição à radiação gama, há uma redução da ordem de 3.5% na quantidade relativa de Q^2 e um aumento equivalente nas quantidades de Q^0 e Q^1 .

Por outro lado, considerando-se a alta dose de exposição, 70 kGy, podemos afirmar que o gel de polifosfato de alumínio apresenta estabilidade à radiação gama suficiente para ser utilizado como matriz polimérica de sensores de radiação gama baseados na formação de polianilina, haja vista que as doses a que esses sensores seriam expostos são significativamente menores que 70 kGy. O polifosfato de sódio também pode ser utilizado, observando o aspecto estabilidade frente à radiação gama, como fonte de fosfatos em nutrição parenteral.

Conclusão

Conseguimos atestar que a cadeia do polifosfato de sódio é resistente à radiação gama até, pelo menos, uma dose de 50 kGy. Com isso, e respeitando apenas esse aspecto, o polifosfato constitui-se em uma alternativa viável para

substituir o ortofosfato na composição de nutrição parental, usando a radiação ionizante como ferramenta para esterilização.

O gel de polisfosfato de alumínio pode ser utilizado como matriz polimérica para sensores de radiação gama baseados na formação de polianilina, haja vista que o mesmo mostrou-se estável frente a uma exposição de 70 kGy.

Efeitos das Ondas de Ultrassom sobre Solução de Polianilina em DMSO

Dentre os polímeros condutores, a polianilina é um dos mais estudados em função do baixo custo do monômero, da facilidade de síntese e alta estabilidade quando comparado a outros polímeros condutores [129]. Nanopartículas de polianilina podem ser preparadas utilizando ondas de ultrassom [130] para melhorar o processo de síntese e obter melhor uniformidade na distribuição de tamanho. O mesmo pode ser feito na síntese de colóides de polianilina, modificando sua morfologia e melhorando sua condutividade.

A propagação de ondas de ultrassom em um líquido ocorre com formação de bolhas que crescem e implodem, respeitando uma periodicidade determinada pela fonte do ultrassom. Essas implosões e fragmentações das bolhas são centros de um fenômeno de altíssima energia. A rápida formação, crescimento e colapso implosivo das bolhas geram pequenas regiões aquecidas no meio, com tempo de vida curto, da ordem de nanosegundos, cujos valores de temperatura e pressão podem ser superiores a 10000°C e 10000 atm, respectivamente [131]. Isso pode modificar fortemente as propriedades físicas e químicas do meio reacional, podendo alterar os resultados da reação.

A polianilina, na sua forma poliesmeraldina – não-dopada, em meio alcalino, é totalmente solúvel em DMSO [132]. Esse é um dos motivos para que este meio (DMSO) seja utilizado para estudo das propriedades óticas não-

lineares da polianilina [133]. Nesse sentido, nós estudamos o efeito das ondas de ultrassom sobre a polianilina em solução de DMSO, observando mudanças na forma de apresentação do polímero condutor após a ação das ondas de ultrassom.

Considerando que o DMSO é muito higroscópico, nós usamos a espectroscopia de RMN de ^1H para investigar o teor de água no DMSO antes, durante e após a atuação das ondas de ultrassom sobre o meio, além de propor um mecanismo de sonólise da água, objetivando explicar as mudanças observadas na forma de apresentação do polímero condutor.

Objetivo

Estudar o efeito das ondas de ultrassom sobre uma solução de polianilina em DMSO usando as espectroscopias de RMN de ^1H , no infravermelho e no UV-Vis.

Procedimento Analítico

A polianilina foi preparada usando a metodologia proposta por Cao e colaboradores [134], utilizando anilina (Nuclear) bidestilada. A solução de polianilina na forma de base esmeraldina foi preparada dissolvendo 1 mg da mesma em 100 mL de DMSO (Merck). Uma alíquota dessa solução foi transferida para um tubo de ensaio e submetida a um banho de ultrassom (Branson modelo 2210, 47 kHz, 35 W.cm⁻²) por 1 hora. Em intervalos regulares, amostras foram coletadas e analisadas por espectrofotometria no UV-Vis (Espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda 6, duplo feixe, cubetas de quartzo e caminho ótico igual a 1 cm), infravermelho (Espectrofotômetro Bruker

IFS66 FT, usando pastilhas de KBr) e espectroscopia de RMN de ^1H (pulso de 90° , tempo de aquisição igual a 3,74 s e tempo de espera igual a 6,26 s).

Resultados e Discussão

Numa análise macroscópica do experimento, pudemos observar que, durante a ação das ondas de ultrassom, houve uma mudança de cor da solução que inicialmente era azul passando para verde. Essa mudança é evidenciada nos espectros de UV-Vis, observando que há uma redução da intensidade da banda de absorção centrada em 625 nm, a qual desaparece totalmente ao fim do processo. O espectro de UV-Vis (Figura 41) observado após 1h de atuação das ondas de ultrassom é semelhante àquele observado para a polianilina na sua forma parcialmente reduzida, com uma intensa absorção em 310 nm e uma baixa absorção em 450 nm [135, 136]. Esse fenômeno também é observado quando uma solução de polianilina em DMSO é exposta à radiação ionizante, resultando numa redução do estado de oxidação do polímero [137]. Como afirmamos anteriormente, o DMSO é muito higroscópico e, portanto, a presença de água no mesmo é uma constante. Nesse caso, podemos considerar que há formação de radicais $\text{H}\cdot$ e $\cdot\text{OH}$, e que os mesmos se recombinam restaurando a água presente no meio. No entanto, podemos considerar também que uma fração desses radicais não se recombina e interage com o soluto, dando origem aos mesmos produtos observados quando essas soluções são expostas à radiação ionizante.

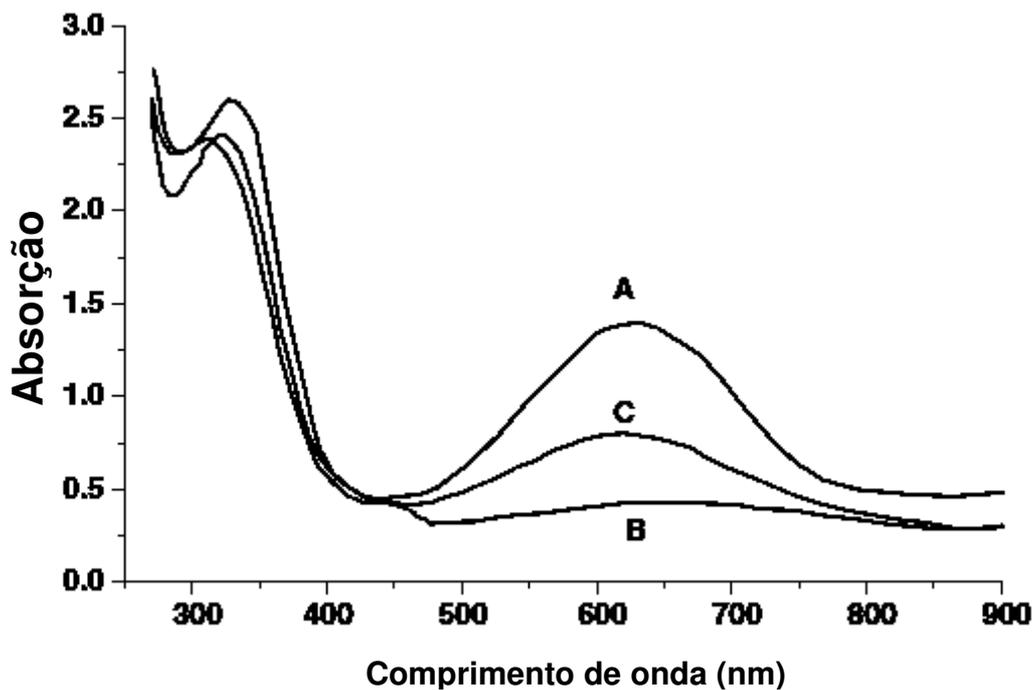


Figura 41 – Espectro UV-Vis da polianilina, na forma de base esmeraldina, antes (A) e após (B) exposição às ondas de ultrassom. (C) corresponde à amostra (B) tratada com persulfato de amônio.

Para confirmar a hipótese de que está ocorrendo um processo de redução da polianilina, realizamos o mesmo experimento com amostras de polianilina dopada e polianilina oxidada, tendo o mesmo fenômeno sido observado. Ou seja: redução na intensidade das bandas em 800 nm e em 550 nm, respectivamente. Outra possibilidade seria a ocorrência de um fenômeno de degradação da estrutura polimérica. A fim de testar essa hipótese, nós tratamos a amostra de polianilina na forma esmeraldina que foi exposta às ondas de ultrassom com um agente oxidante: o persulfato de amônio. Se o fenômeno fosse um processo redox, haveria um aumento da intensidade da banda centrada em 625 nm; se fosse uma degradação da cadeia polimérica, a banda em 625 nm não seria restabelecida. O resultado apresentado na Figura 41 sinaliza, portanto, para um processo redox.

Outro fenômeno interessante e que só percebemos a partir da análise dos espectros de IV e RMN de ^1H , é que conforme o processo de exposição às ondas de ultrassom se desenvolve, ocorre uma redução na quantidade relativa de água. Nos espectros de IV, Figura 42, observamos uma redução na intensidade das bandas atribuídas à água, ou seja, em 3500 , 1650 e 550 cm^{-1} .

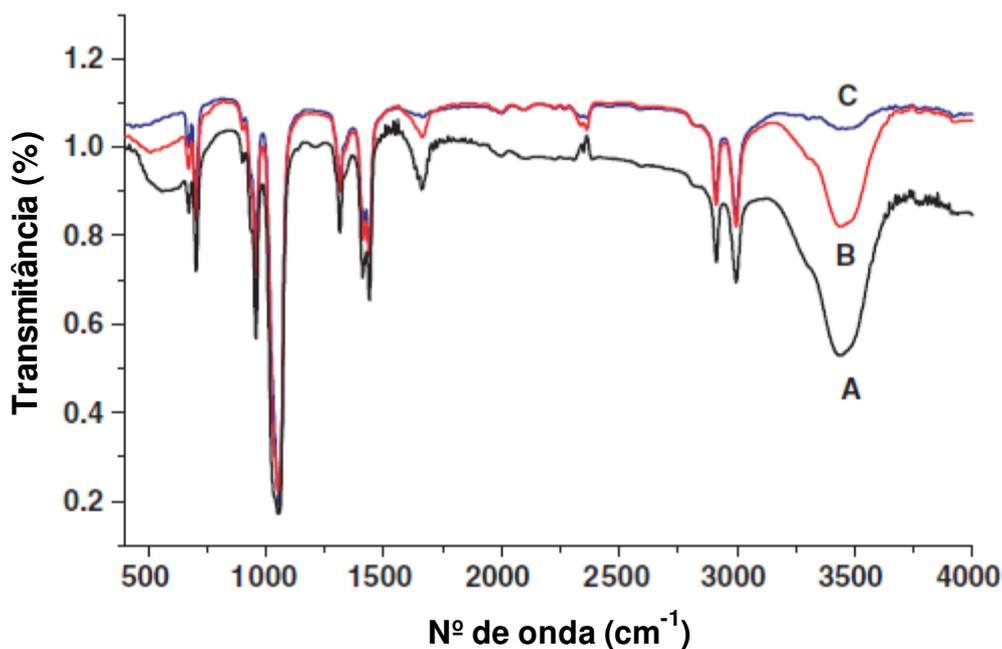


Figura 42 – Espectros de IV da solução de polianilina em DMSO em função do tempo de exposição às ondas de ultra-som. (A) $t = 0$; (B) $t = 30\text{ min}$ e (C) $t = 60\text{ min}$.

Visando confirmar e quantificar a redução na quantidade relativa de água no sistema, nós analisamos por RMN de ^1H a solução de polianilina em DMSO antes e após uma hora de exposição às ondas de ultrassom. Para que os espectros fossem quantitativos, determinamos o valor de T_1 para os sinais do DMSO e da água, usando a seqüência de pulsos de inversão e recuperação. O maior valor de T_1 medido foi para o sinal da água, sendo o mesmo igual a $1,7\text{ s}$. Assim, ajustamos as condições de análise de tal forma que a soma dos tempos de espera e aquisição fosse igual a $10,0\text{ s}$.

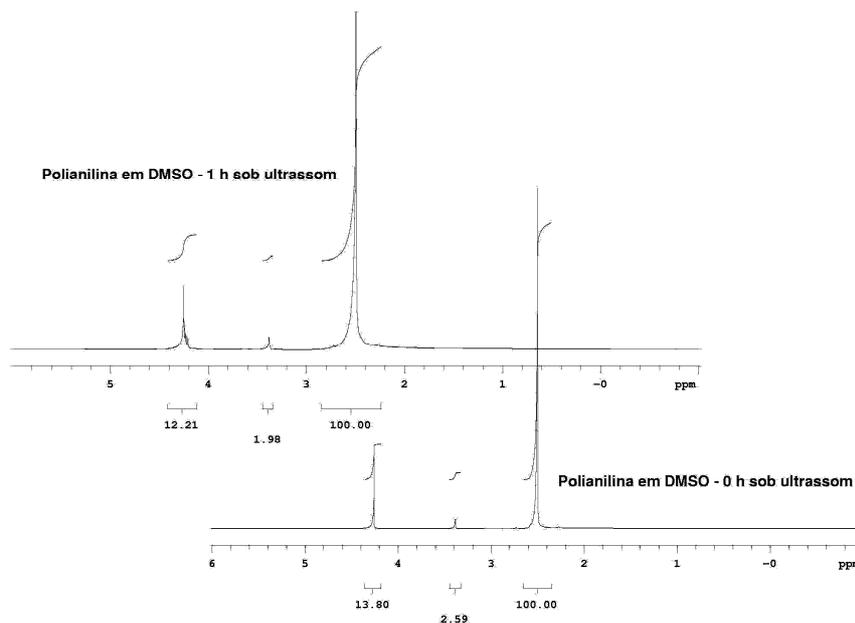


Figura 43 – Espectros de RMN de ^1H da solução de polianilina em DMSO antes e após 60 min de exposição às ondas de ultrassom.

Os espectros apresentados na Figura 43 indicam que após a interação com ondas de ultrassom, a concentração relativa de água foi reduzida em 11,6%

Conclusão

Conseguimos observar o efeito das ondas de ultrassom sobre a solução polianilina em DMSO, demonstrando que ocorre um processo de redução do polímero condutor com uma diminuição na concentração de água na solução. Isso ocorre porque se instala um processo de sonólise da água com a formação de radicais $\text{H}\cdot$ e $\cdot\text{OH}$. Uma parcela desses radicais interage com a polianilina originando espécies semelhantes àquelas observadas quando a polianilina é exposta à radiação ionizante. Assim, explica-se a mudança de espécies químicas observadas para o polímero condutor, bem como a redução

na concentração de água. Este trabalho foi publicado na revista *Ultrasonic Sonochemistry* [138].

Estudos de Mecanismos de Reação usando RMN de ^1H

As reações orgânicas passam por intermediários de reação que, em geral, tem tempo de vida muito curto, convertendo-se rapidamente em moléculas mais estáveis. Dentre essas espécies, as mais comuns são os carbocátions, radicais livres, carbânions e carbenos, e dificilmente essas espécies são caracterizadas por métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV ou RMN) ou espectrométrico (MS).

Comparando-se os métodos espectroscópicos, o UV-Vis é uma técnica mais sensível do que as outras, sendo utilizada inclusive em estudos de cinética de reação. A sua desvantagem se refere ao fato de a mesma oferecer poucas informações no que diz respeito às estruturas químicas da substância que está sendo analisada. A espectroscopia no infravermelho (IV), por sua vez, oferece mais informações acerca da estrutura molecular, mas é menos sensível do que a espectroscopia no UV-Vis. A RMN é muito menos sensível do que as outras. No entanto, no que diz respeito ao fornecimento de dados acerca da estrutura química do analito, a RMN é incomparável. Considerando que o conhecimento da estrutura molecular é fundamental para compreender a cinética da reação, entende-se porque a espectroscopia de RMN é a principal ferramenta para identificar os componentes em equilíbrios que ocorrem lentamente.

Neste trabalho, apresentamos dois ensaios nos quais utilizamos a espectroscopia de RMN para identificar intermediários de reação e inferir sobre os mecanismos sob os quais as reações estudadas acontecem. No primeiro trabalho, investigamos e caracterizamos os intermediários da hidrólise alcalina

do 3,5-dinitrobenzoato de metila; e no segundo caso, investigamos o mecanismo da reação de formação de algumas N-(arilaminometil) ftalimidas, a partir da reação entre N-hidróximetil ftalimidas e arilaminas.

A Hidrólise Alcalina do 3,5-dinitro benzoato de metila

Objetivo

Criar uma estratégia didático-pedagógica para acompanhar a formação de complexos de Meisenheimer usando as espectroscopias de RMN de ^1H e no UV-Vis.

Desenvolvimento

Em princípio, a hidrólise alcalina do 3,5-dinitro benzoato de metila deveria produzir metanol e o sal 3,5-dinitro benzoato. No entanto, durante a reação do referido éster com hidróxido de sódio em DMSO, observa-se mudança de coloração da solução, de hialino para vermelho, retornando para hialino, após homogeneização. Essa mudança de coloração poderia ser atribuída a algum intermediário da reação que, por ter um tempo de vida relativamente longo, poderia ser observado por técnicas espectroscópicas.

Devido à presença dos grupos nitro nas posições 3 e 5, há uma deficiência parcial de elétrons nas posições 2, 4 e 6 do anel aromático. Assim, na presença de uma base forte (hidróxido de sódio), podemos imaginar que, além do ataque à carbonila do éster, paralelamente ocorreria uma substituição nucleofílica nas posições 2, 4 e 6 do anel (Figura 44). Quando esse ataque ocorrer nas posições 2 e 6, teremos a formação da mesma espécie química,

enquanto no caso do ataque à posição 4 dar-se-ia origem a um isômero de posição da espécie anterior.

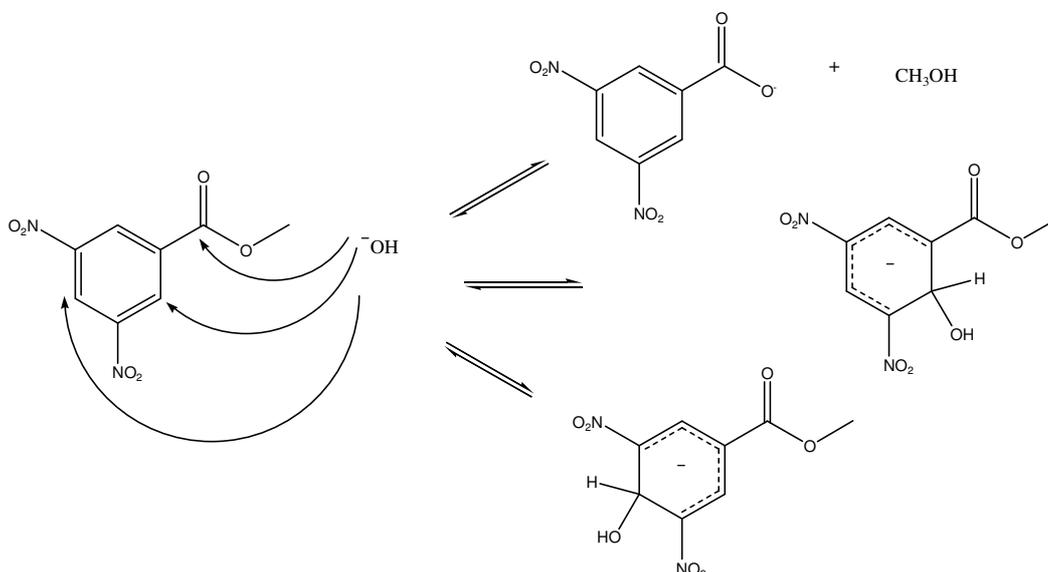


Figura 44 – Reações possíveis quando o 3,5-dinitrobenzoato de metila é exposto a um meio fortemente alcalino.

A análise da literatura mostra que estas espécies são conhecidas como complexos de Meisenheimer: carbânions formados pelo ataque nucleofílico aromático e que tem certa estabilidade, podendo ser estudados por métodos espectroscópicos. Os complexos de Meisenheimer normalmente são coloridos, principalmente aqueles que são obtidos a partir de derivados do trinitrobenzeno, dinitrobenzeno e *m*-dinitrobenzeno, conforme representação abaixo:

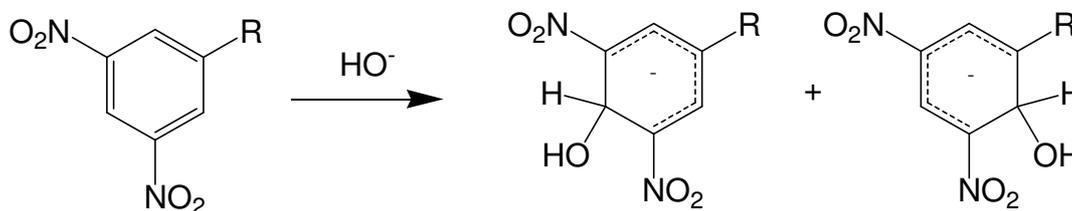


Figura 45 – Esquema de formação do complexo de Meisenheimer.

Diante disto, nós desenvolvemos uma estratégia de ensino-aprendizagem que utiliza as espectroscopias de RMN e UV-Vis para acompanhar e caracterizar a formação dos complexos de Meisenheimer na hidrólise alcalina do 3,5-dinitro benzoato de metila.

A idéia principal é estimular a curiosidade dos alunos no sentido de explicar o aparecimento da coloração vermelha quando pequenas quantidades de hidróxido de sódio são adicionadas à solução de 3,5-dinitrobenzoato de metila em DMSO-d₆, a partir dos espectros de UV-Vis e de RMN de ¹H.

O espectro UV-Vis (Figura 46) apresenta três bandas centradas em 386, 523 e 555 nm, sendo as duas últimas associadas à formação dos complexos de Meisenheimer a partir do ataque nucleofílico nas posições *orto* e *para* do 3,5-dinitrobenzoato, respectivamente. A banda centrada em 386 nm é comum aos dois isômeros [139-141].

É interessante notar que durante a reação de hidrólise ocorre uma variação nas intensidades dessas bandas que podem ser associadas à estabilidade das espécies. Por exemplo, a banda centrada em 555 nm diminui sua intensidade de forma mais rápida do que a banda em 523 nm (Figura 46), o que implica em afirmar que o isômero *orto* é mais estável, termodinamicamente, do que o isômero *para*.

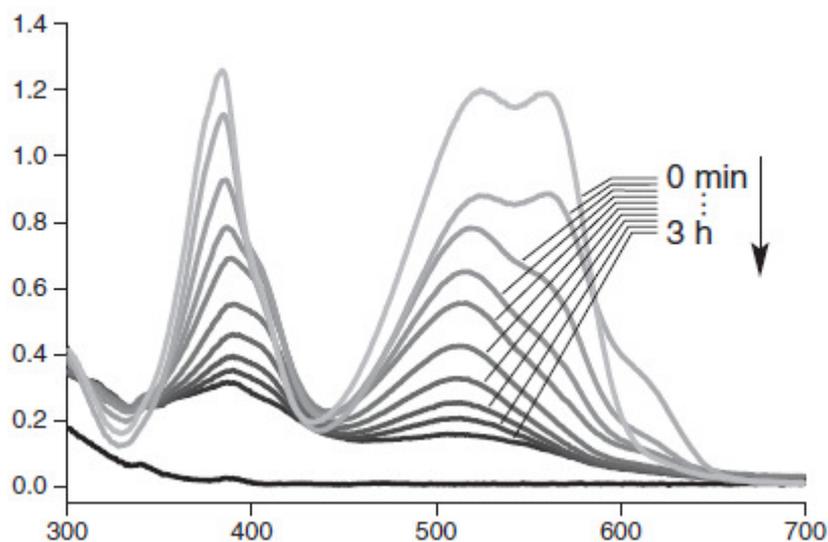


Figura 46 – Espectros de UV-Vis, em função do tempo, após adição de NaOH à solução de 3,5-dinitrobenzoato.

Ao final da reação, as bandas centradas em 386, 523 e 555 nm desapareceram por completo do espectro, indicando que os complexos de Meisenheimer são espécies que são formadas e consumidas no processo. Ocorre que os complexos de Meisenheimer existem num equilíbrio químico (Figura 48) e, à medida que o éster é consumido na reação de hidrólise, os equilíbrios que envolvem os complexos de Meisenheimer são deslocados, em função do princípio de Le Chatelier, no sentido de restauração do éster, consumindo os complexos.

Os espectros de RMN de ^1H dessas amostras, Figura 47, auxiliam na interpretação e identificação dos complexos de Meisenheimer, *orto* e *para*, bem como o acompanhamento do consumo dessas espécies em função do tempo. Assim, antes de analisarmos os espectros de RMN de ^1H , podemos inferir que após a adição de NaOH, deveremos observar o surgimento de três simpletos associados às metilas do metanol e dos isômeros *para* e *orto* do complexo de Meisenheimer. O complexo *para* é simétrico; portanto, há dois hidrogênios

ligados ao anel que são magneticamente semelhantes e que devem se apresentar no espectro com uma área de integração duas vezes maior do que aquela observada para o hidrogênio ligado ao carbono que sofreu o ataque nucleofílico. Por outro lado, o complexo *orto* deve apresentar três sinais distintos para os hidrogênios do anel do complexo.

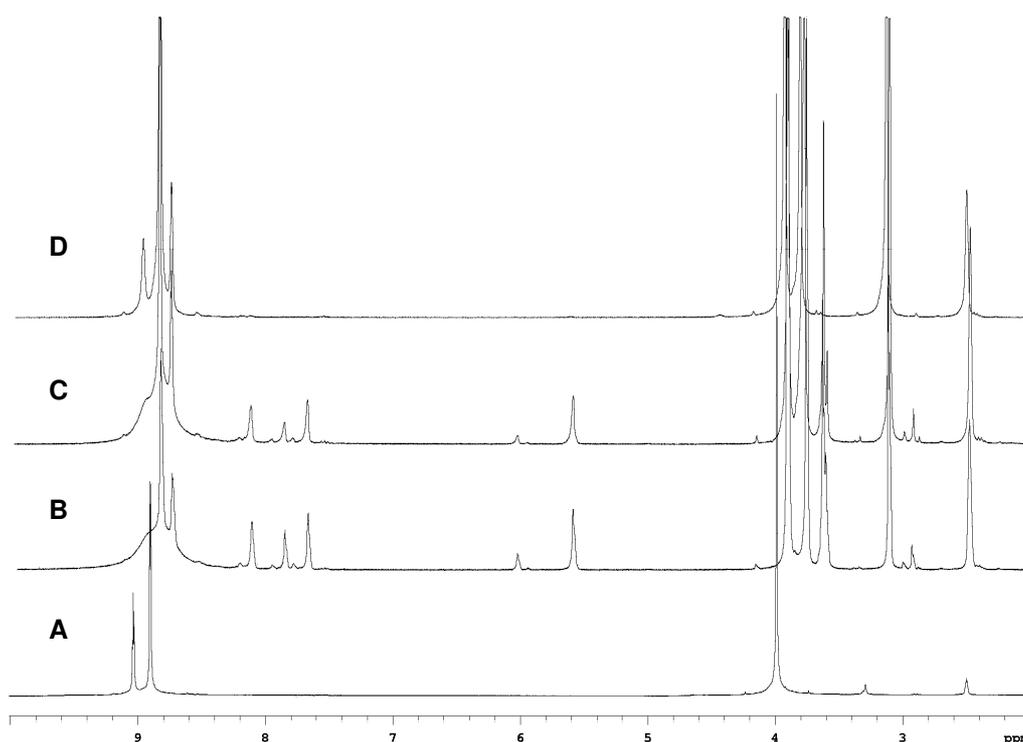


Figura 47 – Espectros de RMN de ^1H do 3,5-dinitro benzoato de metila em DMSO. (A) Antes da adição de NaOH; (B), (C) e (D) após adição de NaOH, sendo (B) – 0 min.; (C) – 30 min; e (D) – 90 min. após a adição de NaOH.

De fato, os espectros de RMN de ^1H mostram esses sinais esperados. As metilas se apresentam com δ 3,13 ppm para o metanol e δ 3,62 e 3,65 ppm para os complexos *para* e *orto*, respectivamente. Os sinais do anel do complexo *para* apresentam-se em δ 7,88 e 6,05 ppm, com razão entre as áreas de integração igual 2:1. Enquanto os sinais do anel do complexo *orto* apresentam-se em δ 5,62, 7,70 e 8,15 ppm com áreas de integração equivalentes.

Inicialmente, as relações entre as áreas de integração sob os sinais atribuídos aos dois isômeros do complexo de Meisenheimer indicam que a razão molar entre os isômeros é de aproximadamente 1 do complexo *para* : 3,7 do complexo *meta*. Com o andamento da reação, e o consumo do éster na hidrólise, observa-se que os sinais atribuídos ao complexo *para* tem uma redução mais acentuada do que a observada para os sinais atribuídos ao complexo *orto* (δ 3,68, 5,70, 7,78 e 8,22 ppm). Isso nos ajuda a atribuir corretamente os sinais referentes às metilas dos isômeros, bem como corroborar os resultados observados no espectro UV-Vis, oferecendo informações que dizem respeito à estrutura das espécies.

No tocante ao ataque nucleofílico, observamos que não há formação de novos compostos, que no caso seriam os fenóis correspondentes (Figura 48). A produção desses fenóis faria surgir três sinais na região aromática, sendo que dois deles teriam razão entre suas áreas de integração igual a 1:1, bem como o surgimento de dois sinais referentes às metilas e o (s) sinal (is) dos hidrogênios fenólicos. Assim, podemos imaginar o seguinte esquema para a reação:

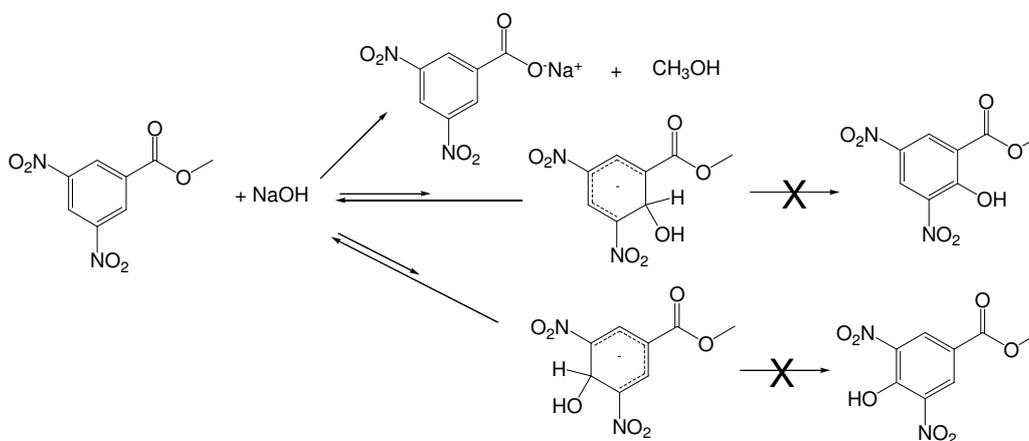


Figura 48 – Esquema de reações possíveis quando o 3,5-dinitrobenzoato de metila está na presença de hidróxido de sódio.

Na estratégia de ensino-aprendizagem, nós propomos que os alunos tentem determinar, a partir dos espectros de RMN de ^1H , a estrutura dos intermediários formados, bem como que façam inferências acerca dos equilíbrios termodinâmicos envolvidos no processo.

Conclusão

Conseguimos desenvolver a estratégia didático-pedagógica usando as espectroscopias de RMN de ^1H e UV-Vis para acompanhar a formação dos complexos de Meisenheimer durante a hidrólise alcalina do 3,5-dinitro benzoato de metila, sendo esse trabalho publicado no *Journal of Chemical Education* [142].

Mecanismo de formação de *N*-(arilaminometil) ftalimidas a partir da reação entre arilaminas e *N*-hidroximetilftalimida

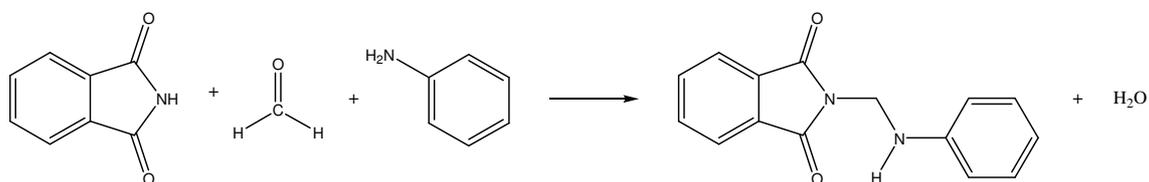


Figura 49 – Reação de formação da *N*-fenilaminometil ftalimida.

De acordo com Winstead e Heine, a reação apresentada na Figura 49 pode ocorrer por duas rotas: (1) A ftalimida reagiria com o formaldeído produzindo a *N*-(hidróxi-metil) ftalimida, que por sua vez reagiria com a anilina; ou (2) o formaldeído inicialmente reagiria com a anilina, formando a *N*-(hidróxi-metil) amina, que condensaria com a ftalimida dando os produtos esperados [143]. As Figuras 50 e 51 apresentam os mecanismos citados acima.

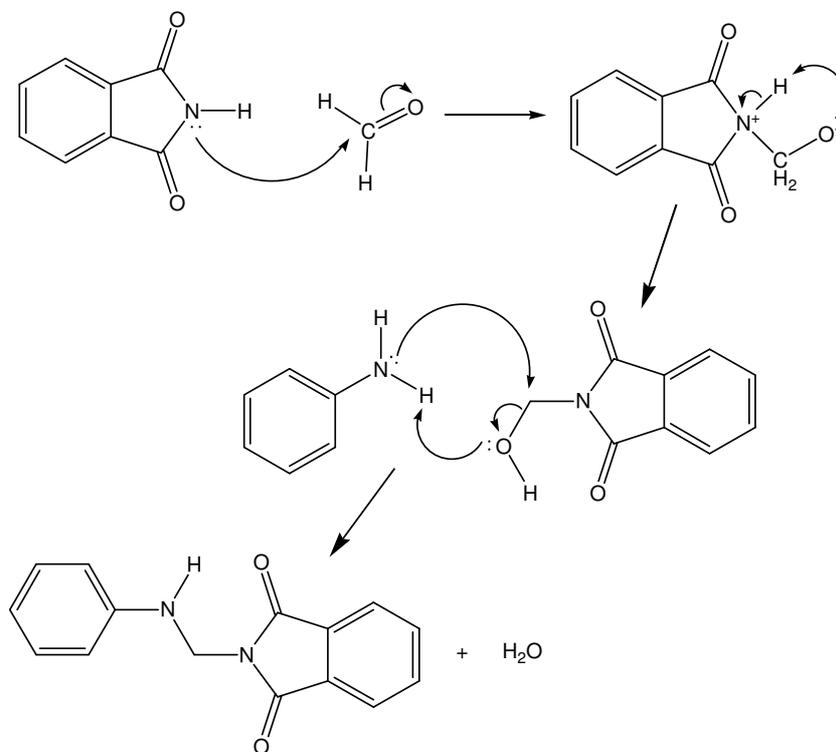


Figura 50 – Mecanismo (1) de reação proposto por Winstead e Heine.

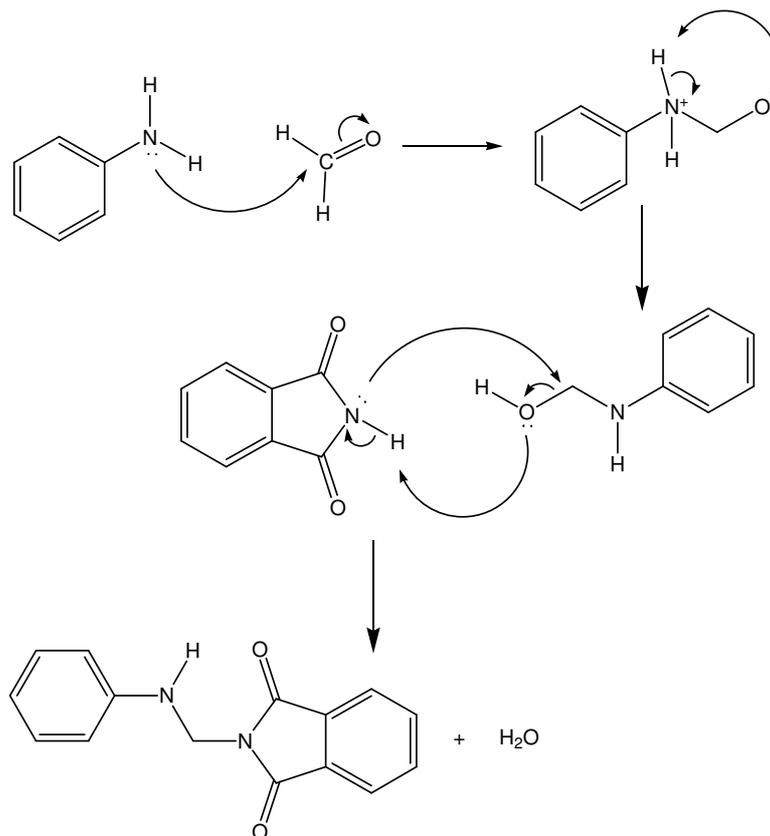


Figura 51 – Mecanismo (2) de reação proposto por Winstead e Heine.

Para termos uma melhor percepção sobre o mecanismo de reação, tentamos acompanhar a reação realizando-a num tubo de RMN e obtendo espectros de RMN de ¹H a diferentes temperaturas. Também realizamos experimentos para observar o comportamento de uma solução metanólica de *N*-(hidróxi-aminometil) ftalimida quando há variação de temperatura e se há formação de formaldeído ou de hemiacetal quando a *N*-(hidróxi-aminometil) ftalimida e um derivado de anilina são misturados em metanol.

Objetivo

Usar a espectroscopia de RMN de ¹H para estudar a reação de formação de *N*-(arilaminometil) ftalimidas a partir da reação entre arilaminas e *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e propor um mecanismo de reação para a mesma.

Procedimento Analítico

Preparamos uma solução 1:1, em DMSO-d₆, de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e *p*-cloroanilina. O espectro de RMN de ¹H dessa mistura foi obtido em diferentes temperaturas: 25 35 45 e 55°C. Experimento semelhante foi realizado em metanol-d₄, sendo que os espectros foram obtidos a 20, 30 e 40°C. Por fim, obtivemos espectros de RMN de ¹H de formaldeído em CD₃OD e de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida em metanol-d₄, variando a temperatura de 25 a 55°C.

Nos ensaios foram utilizados reagentes comerciais, sendo a *p*-cloroanilina fornecida pela MERCK, 98% m/m, e a *N*-(hidróxi-metil) ftalimida fornecida pela Aldrich Chemical Company, 97% m/m. Os solventes deuterados foram fornecidos pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos com pulso de 45°, janela espectral de 5 kHz e 16 repetições.

Resultados e Discussão

A reação que estudamos é diferente da estudada por Winstead e Heine, haja vista que já temos a *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e reagimos com o derivado de anilina. O nosso desafio, portanto, é determinar se esta reação passa ou não pela formação de formaldeído.

A Figura 52 apresenta os espectros de RMN de ¹H obtidos para a mistura, em DMSO, de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e *p*-cloroanilina, em diferentes temperaturas. Inicialmente, podemos observar os sinais em δ 4,99 (*d*, 6,9 Hz) e 5,18 ppm (*s*), atribuídos aos grupos e [OCH₂] e NH₂ da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e da *p*-cloroanilina, respectivamente. Observa-se também os sinais

referentes aos hidrogênios do anel *para*-substituído da cloroanilina em δ 6,57 e 6,98 ppm, bem como os sinais atribuídos aos hidrogênios do anel da ftalimida, entre δ 7,70 e 7,90 ppm, e um tripleto em δ 6,44 ppm ($J = 6,9$ Hz), atribuído à hidroxila da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida.

À medida que a amostra é aquecida, observa-se o surgimento de um sinal largo em δ 11,25 ppm, mas que muda o valor de δ em função da temperatura. Além deste, é possível observar a partir do espectro a 45°C que há o surgimento de sinais referentes a um segundo sistema AA'BB' centrados em δ 6,69 e 7,06 ppm. Esses sinais são evidências de que com o aquecimento há formação de *N*-(*p*-clorofenil amino metil) ftalimida. Por outro lado, não há evidências de que há formação de formaldeído, pois em nenhum momento observamos um sinal que pudesse ser atribuído a um aldeído.

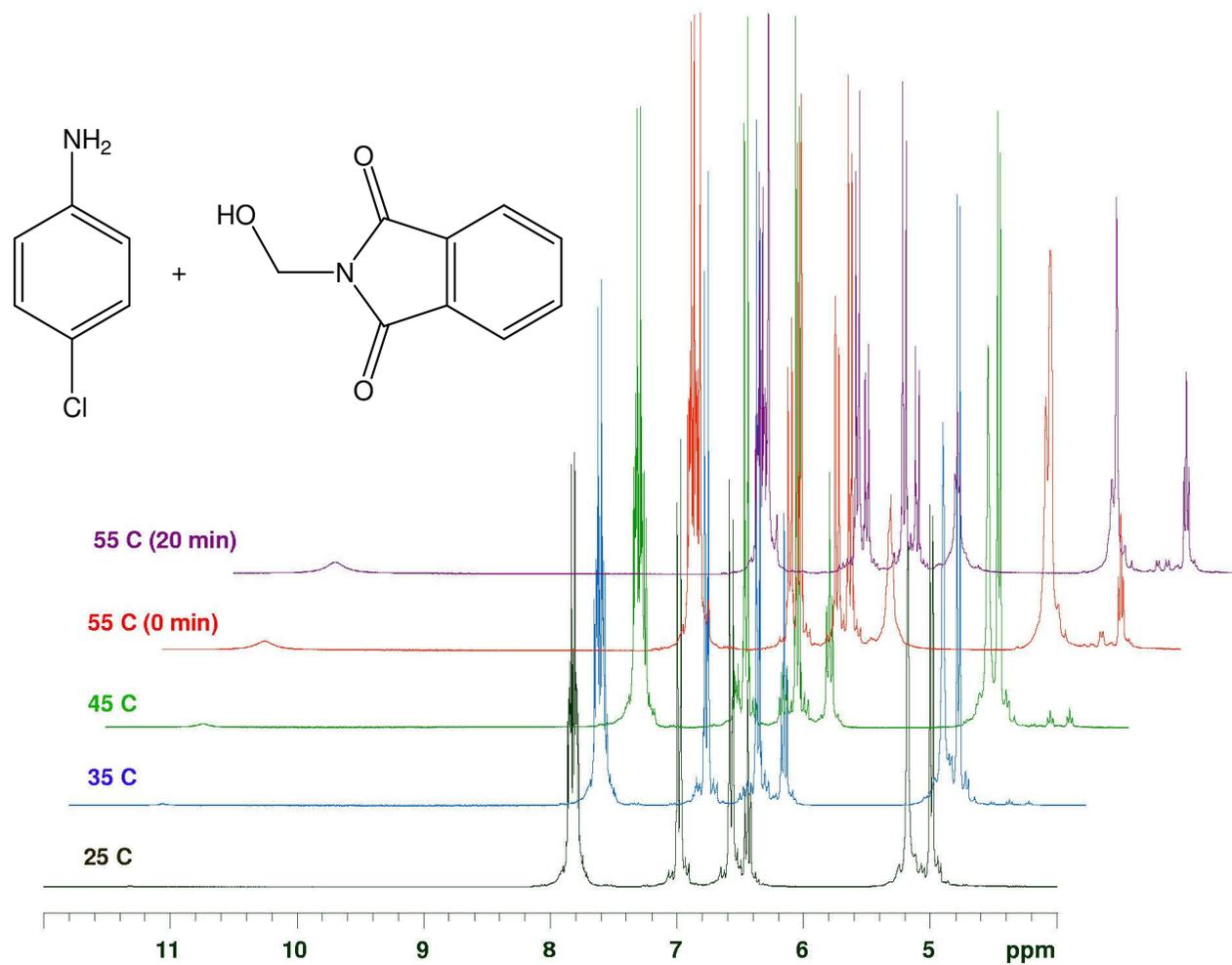


Figura 52 – Espectros de RMN de ^1H da mistura de p-cloroanilina e N-(hidróxi-metil) ftalimida, em DMSO-d_6 , 300 MHz, variando a temperatura de 25°C até 55°C.

A estratégia utilizada a partir de então foi realizar os experimentos em metanol, pois se houver formação de formaldeído, este deve combinar-se com o solvente formando um hemiacetal. Assim, obtivemos o espectro de formaldeído em metanol, Figura 53, e observamos um simpleto em δ 4,65 ppm. Normalmente, os valores de δ_H para os aldeídos estão em torno de 9-10 ppm. No caso do formaldeído, esse valor é igual a δ 9,62 ppm [144]. No nosso caso, estamos observando o sinal atribuído ao metileno do hemiacetal em δ 4,65 ppm.

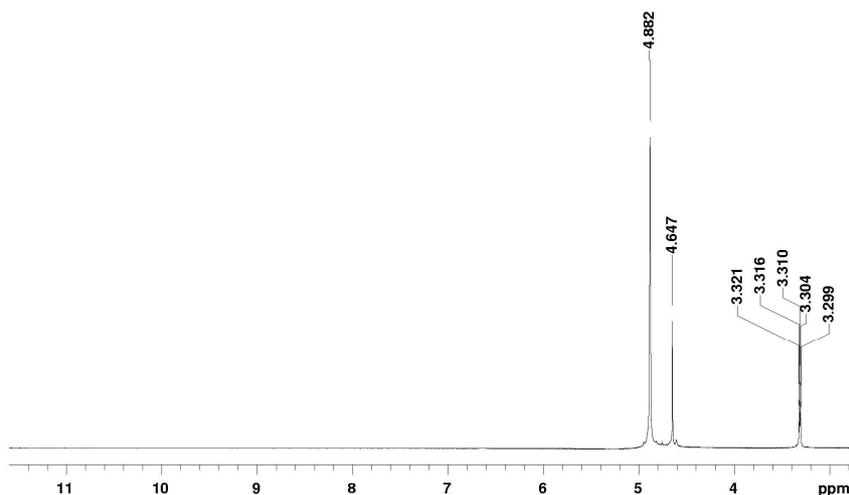


Figura 53 – Espectro de RMN de 1H do formaldeído em CD_3OD , $25^\circ C$, 300 MHz.

Então, os primeiros ensaios realizados foram obter espectros de RMN de 1H , em CD_3OD , da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida, variando a temperatura a fim de observar se há ou não formação do hemiacetal. A Figura 54 apresenta esses espectros. Claramente observamos que a $25^\circ C$ há um equilíbrio estabelecido, de maneira tal que temos o hemiacetal (δ 4,65 ppm) e o reagente inicial, sendo que para cada mol de hemiacetal há 4,24 mols de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida. O aquecimento favorece a formação de hemiacetal. Isso fica

evidente com a mudança nas áreas de integração sob os sinais em δ 5,13 ppm – P1 e δ 4,65 ppm – P2, atribuídos aos metilenos da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e do hemiacetal, respectivamente; e da mudança no perfil dos sinais da região aromática, uma vez que há formação da *N*-(*p*-clorofenil amino metil) ftalimida.

A 55°C, observamos que para cada mol de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida há três mols do hemiacetal. Como não há consumo do hemiacetal ou da ftalimida, ao baixarmos a temperatura, observamos que as relações entre as espécies retornam à condição inicial. É notável também que o δ devido ao sinal residual da hidroxila do metanol- d_4 muda em função da temperatura.

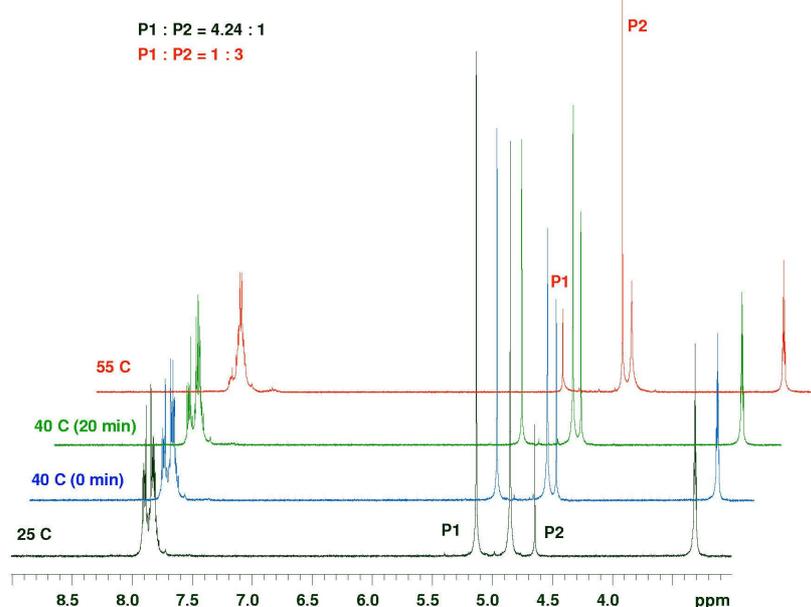


Figura 54 – Espectros de RMN de ^1H da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida em CD_3OD , 300 MHz. Os sinais P1 e P2, atribuídos aos grupos metilenos da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e do hemiacetal, foram utilizados para determinar a razão molar entre as espécies, nas diferentes condições de temperatura.

Na seqüência, obtivemos espectros de RMN de ^1H da mistura de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e *p*-cloroanilina, em metanol- d_6 , variando a temperatura. Esses espectros são apresentados na Figura 55. Inicialmente, observa-se três conjuntos de sinais na região aromática, atribuídos aos dois grupos presentes

na mistura. Além destes, há um simpleto em δ 5,13 ppm, atribuído ao grupo [OCH₂] da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida.

Com o aumento da temperatura, observa-se que há uma redução na intensidade do sinal em δ 5,13 ppm e o surgimento de um simpleto em δ 4,57 ppm. Este último sinal é atribuído ao metileno da *N*-(*p*-clorofenil amino metil) ftalimida formada na reação. Essa constatação também é corroborada pelo surgimento de um novo conjunto de sinais na região aromática, tipicamente atribuídos a sistemas AA'BB', em δ 6,69 e 7,07 ppm; e pela mudança no perfil dos sinais entre δ 7,60 e 7,80 ppm.

Diferentemente do experimento realizado com a *N*-(hidróxi-metil) ftalimida, não foi possível observar a formação do hemiacetal. Isso pode ser explicado considerando-se que o formaldeído, existente no equilíbrio, é rapidamente consumido no processo, dando origem aos produtos da reação.

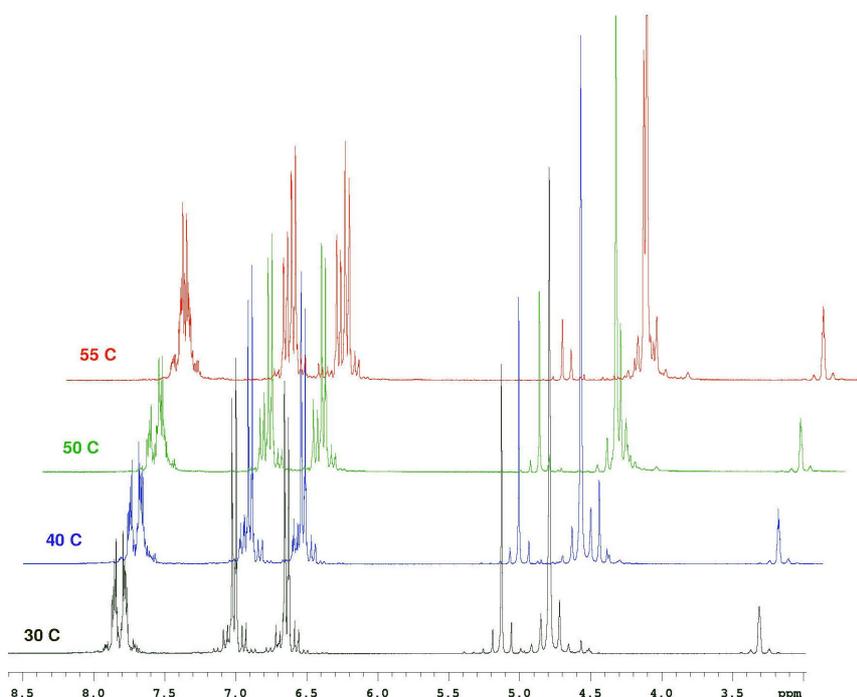


Figura 55 – Espectros de RMN de ¹H da mistura de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e *p*-cloroanilina, em metanol-*d*₆, variando a temperatura de 30°C até 55°C.

Como o solvente utilizado na reação é prótico, não foi possível observar os sinais referentes ao grupo N–H e a água produzida, sendo observado um aumento na intensidade do sinal residual da hidroxila do metanol-d₆, além da mudança no valor de δ em função da mudança de temperatura.

Diante dos fatos observados, nós propomos um mecanismo partindo da *N*-(hidróxi-metil) ftalimida, que transfere um átomo de hidrogênio para a anilina, formando formaldeído, o ânion ftalimida e anilina protonada. O formaldeído combina-se com o metanol (solvente) produzindo um hemiacetal. A anilina protonada pode transferir o hidrogênio para o ânion ftalimida, restabelecendo a anilina e a ftalimida, que por sua vez pode transferir um átomo de hidrogênio para o hemiacetal.

Assim, o hemiacetal protonado pode perder metanol e formar o íon [H₂C–OH]⁺. O grupo metileno desse cátion é então transferido para a anilina, liberando água e formando a *N*-(fenilaminometil) ftalimida. A Figura 54 apresenta o mecanismo proposto.

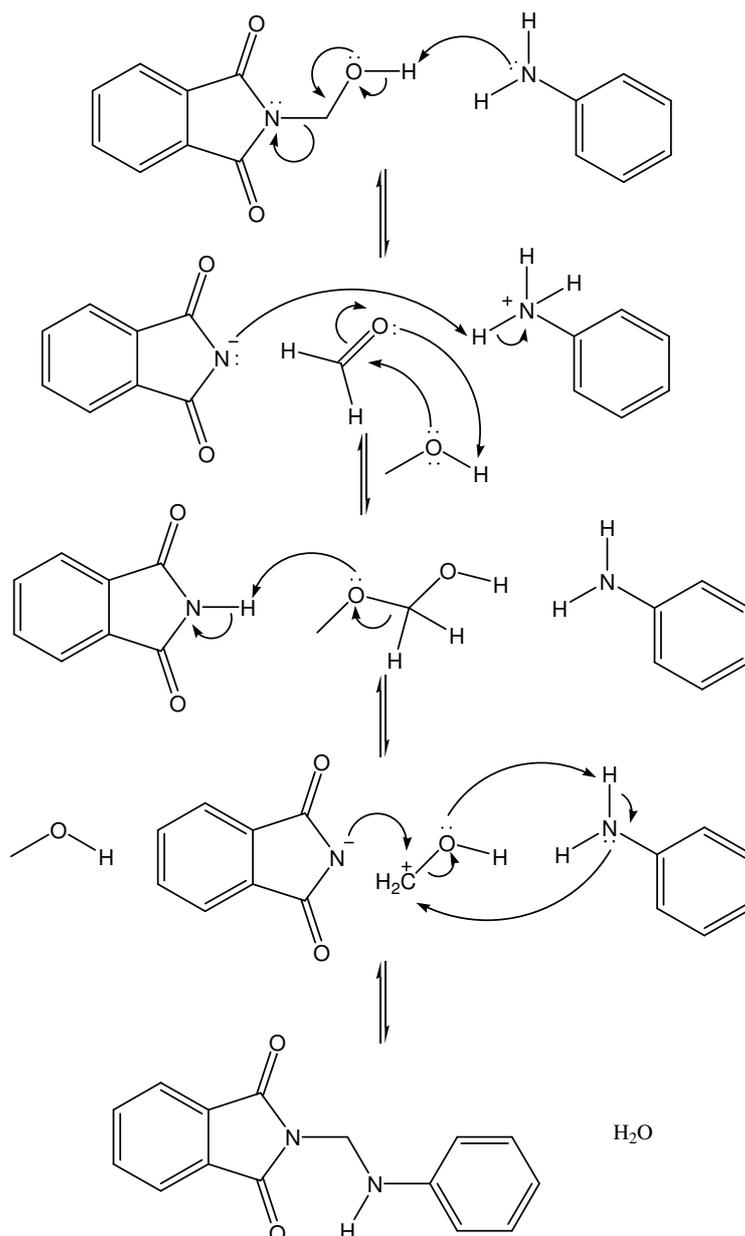


Figura 54 – Mecanismo proposto para a formação *N*-(fenilaminometil) ftalimida, em metanol, a partir de *N*-(hidróxi-metil) ftalimida e anilina.

O último experimento reforça a idéia de que a *N*-(hidróxi-metil) ftalimida, quando aquecida, estabelece um equilíbrio com a formação de formaldeído e ftalimida.

Conclusão

De acordo com os dados espectrais, foi possível propor um mecanismo para a reação de formação de *N*-(arilaminometil) ftalimidias a partir da reação

entre arilaminas e *N*-(hidróxi-metil) ftalimida. A reação se processa tendo o formaldeído como um dos intermediários, sendo o mesmo evidenciado a partir da formação do hemiacetal ($\text{CD}_3\text{OCH}_2\text{OD}$), considerando que a reação foi realizada em metanol- d_4 . Este trabalho foi publicado no *Journal of the Brazilian Chemical Society* [145].

Desenvolvimento de Modelo Metabonômico para Investigação de Infecção pelo Vírus da Hepatite C

Procedimentos Legais e Éticos

Por se tratar de um projeto que envolve a utilização de amostras biológicas, mais especificamente, amostras de urina humana, o desenvolvimento do mesmo teve início com a submissão ao Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – SISNEP, do Ministério da Saúde e ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE.

O projeto *Emprego da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear em Amostras de Soro e de Urina para Diagnóstico de Infecção pelo Vírus da Hepatite C*, CAAE – 0029.0.172.000-07 – folha de rosto n° FR123091, foi submetido ao SISNEP no dia 11 de fevereiro de 2007 e ao CEP no dia 16 de fevereiro de 2007, sendo aprovado pelo CEP-UFPE em 13 de abril de 2007.

Objetivo

Construir um modelo metabonômico, baseado na espectroscopia de RMN de ^1H , capaz de distinguir amostras de urina de pacientes com infecção crônica pelo HCV daqueles que não possuem tal infecção.

Procedimento Analítico

Foram selecionados 66 indivíduos voluntários a partir de anamnese realizada pela Dra. Michele Godoy, hepatologista lotada no Hospital das Clínicas (HC) da UFPE e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CCS da UFPE.

Os indivíduos foram classificados em dois grupos: 34 pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C – HCV-RNA e anti-HCV positivos e não-reagentes para o anti-HBc, denominado grupo POSITIVO; e 32 pacientes com diagnóstico anti-HBc positivo, mas com anti-HCV e HBsAg negativos, denominado grupo NEGATIVO.

Foram incluídos pacientes e controles de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos, que não estavam em uso de medicações para a hepatite ou outras enfermidades e que declararam o não-uso de álcool ou outras drogas psicotrópicas nos últimos 15 dias.

Foram excluídos os pacientes que apresentaram indícios de outras enfermidades, que não a hepatite crônica pelo HCV, como por exemplo, esquistossomose mansônica, ou HIV/AIDS, ou que apresentaram manifestações extra-hepáticas do HCV, como por exemplo, o *diabetes mellitus*, a tireoidite, a artrite ou a glomerulonefrite.

No ambulatório foi aplicado um questionário sob a supervisão da Dra. Michele Godoy e, em seguida, de acordo com o resultado, os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa e receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE para assinatura e inclusão no protocolo. Os pacientes com anti-HCV positivo também foram submetidos à anamnese e exame físico, conforme rotina do ambulatório. Aqueles que concordaram e assinaram o TCLE foram encaminhados ao Laboratório Central do HC-UFPE para coleta de 10 mL de sangue em veia periférica e de 50 mL de urina.

Cada amostra de sangue (após centrifugação) e de urina foi dividida em duas alíquotas e encaminhada para o Setor de Bioquímica e de Uroanálise do

Laboratório Central do HC-UFPE e para a Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE.

Foram dosados os níveis séricos das seguintes enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT). Também foi realizada a pesquisa do HCV-RNA dos pacientes anti-HCV positivos usando PCR, todas por método cinético automatizado. As amostras de urinas foram analisadas através de fitas-reagentes para urina (Labstix®).

Para as análises de RMN de ^1H , as amostras de urina foram mantidas refrigeradas até o momento dos exames. Por questões de ordem operacional, nós não conseguimos implantar as sequências de pulsos necessárias para a análise de soro. Com isso, nós direcionamos o trabalho para o estudo apenas de amostras de urina. Em um tubo de RMN com 5 mm de diâmetro interno, mistura-se 400 μl da amostra com 200 μl da solução-tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0,2 \text{ M}$). Após homogeneização, o espectro de RMN de ^1H é obtido, usando uma seqüência de pulsos com pré-saturação do sinal da água.

Em todos os espectros, utilizamos uma janela espectral igual a 5000 Hz, tempo de aquisição igual 6,4 s, pulso de 90° , *delay* de saturação igual a 3,0 s e 32 repetições. Os espectros foram processados utilizando *line broadening* igual 0,3 Hz.

Os dados foram pré-processados utilizando o VNMR (VARIAN NMR) *software*, de maneira a obtermos regiões de 0,05 ppm. No caso das amostras de urina, o intervalo foi de 10 até 0,0 ppm, sendo que a região entre 6,40 e 4,20 ppm foi excluída porque é nesta região do espectro onde se encontram os

sinais da água e da uréia, principais constituintes da urina e que atrapalhariam a interpretação dos dados por conta da pré-saturação do sinal da água. Assim, foram obtidas 154 regiões de δ (deslocamento químico), que correspondem às variáveis independentes de nosso modelo. Além disso, o espectro foi normalizado em função da intensidade de cada região. Esses dados foram transportados para o *Statistica software* versão 6.0, onde foi construída uma matriz tendo os casos (espectros) dispostos nas linhas e as variáveis (deslocamentos químicos) dispostas em colunas.

Os dados originais foram padronizados usando a média e o desvio-padrão por indivíduo. A amplitude individual de cada região foi subtraída da média observada e dividida pelo desvio-padrão. Após esse tratamento, a matriz final tem 66 casos e 155 colunas, sendo a variável dependente constituída pelo diagnóstico clínico (Positivo ou Negativo).

Foi feita uma análise de componentes principais sobre os dados, que resultou em 65 (n-1) componentes principais (CP's), que por sua vez foram organizadas numa nova matriz com 66 casos e 66 variáveis, sendo as 65 CP's acrescida da variável dependente.

Sobre esta nova matriz foi realizada uma análise de discriminantes para selecionar as variáveis que melhor correlacionam-se com a variável dependente. A seleção das variáveis foi feita usando o método *Forward Stepwise*, utilizando um valor de p igual a 0,05. Foram selecionadas 16 variáveis (CP's) que têm correlação com o problema em questão (diagnóstico positivo ou negativo). Foram construídas duas funções: Função P para classificar a amostra como positiva, e uma Função N para classificar a amostra

como negativa. O teste F para a função foi feito com 16 (nº de CP's utilizados) e 49 (n-17) graus de liberdade.

Resultados e Discussão

A partir da anamnese, foram incluídos na pesquisa e, portanto, avaliados 82 indivíduos, dos quais 2 (dois) tiveram a amostra de urina extraviada. Dentre os 80 restantes, 48 apresentavam o anti-HCV positivo, enquanto 32 apresentaram o anti-HBc positivo e testaram negativo para o anti-HCV, formando, portanto, o grupo Negativo. Dos 48 pacientes com anti-HCV positivo, 14 (quatorze - 29%) foram excluídos: 10 (dez) porque apresentavam HCV-RNA negativo e 4 (quatro) porque também apresentavam o anti-HBc positivo, restando 34 pacientes no grupo Positivo. Assim, foram analisados um total de 66 indivíduos, 34 do grupo Positivo e 32 do grupo Negativo. A tabela 10 apresenta uma comparação entre os valores médios e desvios-padrão para as taxas de AST, ALT e FA nos indivíduos que participaram da pesquisa. Considerando que os limites de normalidade nas taxas das aminotransferases são diferentes para homens e mulheres, a tabela apresenta a razão entre a taxa observada no exame laboratorial e o limite superior de normalidade para cada sexo. O mesmo procedimento foi realizado com os valores observados para a γ -GT. No caso, esses limites são: AST – 31 unidades por litro de soro, para as mulheres, e 35 u.L⁻¹, para homens; ALT – 31 u.L⁻¹, para mulheres, e 41 u.L⁻¹, para homens; enquanto para γ -GT o limite superior de normalidade foi considerado ser 55 u.L⁻¹.

Tabela 10 – Dados dos voluntários participantes da pesquisa

Características	Grupos		p
	Positivo	Negativo	
N	34	32	
Idade	47,8 +/- 13,8	41,0 +/- 11,6	0,0356
IMC	27,4 +/- 4,74	26,0 +/- 5,77	0,3533
ALT / TGP	1,72 +/- 1,77	0,57 +/- 0,23	0,0007
AST / TGO	1,60 +/- 1,64	0,68 +/- 0,23	0,0029
γ -GT	1,54 +/- 1,14	0,81 +/- 0,87	0,0108

Como seria esperado, os valores de p indicam que os grupos são distintos quando utiliza-se os valores de ALT e AST – afinal esses são os biomarcadores que normalmente são utilizados na investigação de agressão hepática. Os altos desvios-padrão observados no grupo Positivo indicam que há uma grande variação nesse grupo. Ou seja: há pacientes com valores elevados de AST e ALT, portanto, com grande atividade no processo inflamatório; e há pacientes com valores de AST e ALT dentro da faixa de normalidade, o que implica em afirmar que são portadores da infecção pelo HCV, mas o processo inflamatório, ou ainda não se instalou, ou está em estágio inicial. Outro dado extraído da tabela, é que não há distinção, com significância estatística, quando se utiliza a idade ou o IMC (Índice de Massa Corporal) dos indivíduos participantes dos dois grupos; ou mesmo os valores de γ -GT como parâmetro de avaliação. No caso dos valores observados para a enzima γ -GT, a pequena diferença estatística entre os grupos ($p = 0,0108$) quando comparada com as diferenças observadas para os valores de AST e ALT, confirma que as aminotransferases constituem enzimas associadas à necrose hepatocelular. Além disso, sugere também que o HCV pode eventualmente agredir as vias biliares e proporcionar elevação dos níveis séricos de γ -GT.

No que diz respeito aos dados fornecidos pela espectroscopia da RMN, é necessário fazer um pré-tratamento nos mesmos. Por tratar-se de dados espectrais, inicialmente realizamos a normalização dos dados para torná-los passíveis de comparação. A análise de componentes principais produziu 65 (n-1) CP's. Ao projetarmos, aos pares, as diferentes CP's, não conseguimos separar de forma satisfatória as amostras dos grupos POSITIVO e NEGATIVO.

Isso, de certa forma, já era esperado, tendo em vista que hábitos alimentares são as principais fontes de variação nos dados espectrais obtidos a partir da urina. Por outro lado, as mudanças provocadas por conta do processo infeccioso pelo HCV devem ser mínimas. Porém, com a análise de componentes principais, nós conseguimos condensar toda a variação dos dados espectrais em, agora, 65 variáveis (CP's). Assim, construímos uma nova matriz com 66 casos e 66 variáveis (65 CP's e o diagnóstico clínico-laboratorial), que foi utilizada na análise de discriminantes.

A seleção das variáveis foi realizada usando o método *Forward Stepwise*, utilizando um valor de p igual a 0,05. Foram selecionadas 16 variáveis (CP's) que têm correlação com o problema em questão (diagnóstico positivo ou negativo). Foram construídas duas funções, Função P para classificar a amostra como positiva, e uma Função N para classificar a amostra como negativa. O teste F para o modelo foi realizado com 16 (nº de CP's utilizadas) e 49 (n-17) graus de liberdade. Obtivemos um valor de F igual a 9,632, mais de 20 (vinte) vezes maior do que o valor de $F_{16,49}$ com 95% de confiança, que é igual 0,470, indicando que o modelo apresenta significância estatística.

O número de amostras utilizadas, 66, não permitiu que separássemos um grupo de calibração e outro de teste, uma vez que tal separação reduziria em muito o número de graus de liberdade. Com isso, optamos por fazer uma validação cruzada. Ou seja: construímos 66 modelos diferentes usando as mesmas CP's selecionadas, no entanto, excluindo uma amostra por vez e testando cada modelo construído com a amostra excluída. Então, os modelos produzidos durante a validação cruzada apresentaram acurácia de 90,9%, considerando as classificações feitas para as amostras que não foram utilizadas na construção dos mesmos.

Na validação cruzada, os modelos continuaram a classificar erroneamente as mesmas amostras que o modelo completo, errando também na classificação de mais três amostras com diagnóstico negativo. Essas seis amostras estão destacadas na tabela 11 que contém os *scores* obtidos para as funções P e N, bem como o diagnóstico clínico-laboratorial, para cada paciente. Em vermelhos estão as amostras que o modelo completo classificou erradamente e, em azul, estão aquelas que foram classificadas erradas na validação cruzada.

Tabela 11 – Diagnóstico clínico-laboratorial e scores nas funções N e P para cada amostra.

Amostra	Diagnóst.	FN	FP	Amostra	Diagnóst.	FN	FP
17	Negativo	5,1668	-9,1678	50	Positivo	-1,5999	-2,7991
3	Negativo	4,1348	-8,1965	33	Positivo	-3,1839	-1,3083
2	Negativo	3,9698	-8,0412	40	Positivo	-3,6762	-0,8450
14	Negativo	3,6021	-7,6952	35	Positivo	-3,7235	-0,8005
19	Negativo	3,1065	-7,2287	42	Positivo	-3,7562	-0,7697
4	Negativo	2,9234	-7,0564	47	Positivo	-4,1396	-0,4089
8	Negativo	2,8446	-6,9822	52	Positivo	-4,2083	-0,3441
31	Negativo	2,6001	-6,7521	53	Positivo	-4,5256	-0,0455
18	Negativo	2,4972	-6,6552	45	Positivo	-4,6748	0,0949
5	Negativo	1,8195	-6,0174	49	Positivo	-4,7022	0,1206
25	Negativo	1,7772	-5,9776	34	Positivo	-4,7501	0,1657
32	Negativo	1,7479	-5,9500	59	Positivo	-4,7873	0,2008
9	Negativo	1,5496	-5,7634	46	Positivo	-4,8262	0,2374
16	Negativo	1,0621	-5,3046	36	Positivo	-5,0914	0,4870
15	Negativo	0,9251	-5,1756	57	Positivo	-5,1827	0,5729
27	Negativo	0,4197	-4,6999	48	Positivo	-5,5893	0,9556
21	Negativo	0,3178	-4,6041	55	Positivo	-5,7695	1,1252
28	Negativo	0,2179	-4,5100	41	Positivo	-5,8597	1,2101
30	Negativo	0,0940	-4,3934	56	Positivo	-5,9811	1,3243
20	Negativo	-0,0224	-4,2839	60	Positivo	-6,0496	1,3881
11	Negativo	-0,1544	-4,1596	43	Positivo	-6,1243	1,4591
26	Negativo	-0,2283	-4,0900	39	Positivo	-6,1492	1,4825
1	Negativo	-0,2344	-4,0843	58	Positivo	-6,1917	1,5225
24	Negativo	-0,5027	-3,8318	62	Positivo	-6,4012	1,7198
6	Negativo	-0,6463	-3,6966	65	Positivo	-6,5228	1,8341
10	Negativo	-1,0177	-3,3470	64	Positivo	-6,6388	1,9433
13	Negativo	-1,0336	-3,3321	63	Positivo	-6,7054	2,0060
12	Negativo	-1,4059	-2,9817	66	Positivo	-6,7914	2,0869
23	Negativo	-1,4817	-2,9104	44	Positivo	-6,9089	2,1975
29	Negativo	-1,5633	-2,8336	38	Positivo	-7,2044	2,4757
22	Negativo	-1,5793	-2,8185	54	Positivo	-7,4287	2,6868
7	Negativo	-2,2215	-2,2141	61	Positivo	-7,6607	2,9051
37	Positivo	-1,3537	-3,0308	51	Positivo	-9,2459	4,3971

Diagnóst. – Diagnóstico clínico-laboratorial; FN – Função N; Função P; em vermelho: erros de classificação do modelo; em azul: erros durante a validação cruzada.

A tabela 11 está organizada em ordem crescente para os *scores* encontrados para a função P. Como esperado, as amostras a partir dos voluntários com infecção pelo HCV apresentaram altos valores na função P e baixos valores na função N. O inverso foi observado com amostras de voluntários do grupo HCV negativo. Esses dados também estão representados no gráfico da Figura 56, que relaciona os *scores* alcançados por cada amostra

na função P com o diagnóstico clínico-laboratorial para a infecção pelo HCV. Os destaques em vermelho e azul na tabela 11 mostram claramente que há um intervalo de *scores* no qual a classificação é duvidosa. Esse intervalo também é destacado no gráfico.

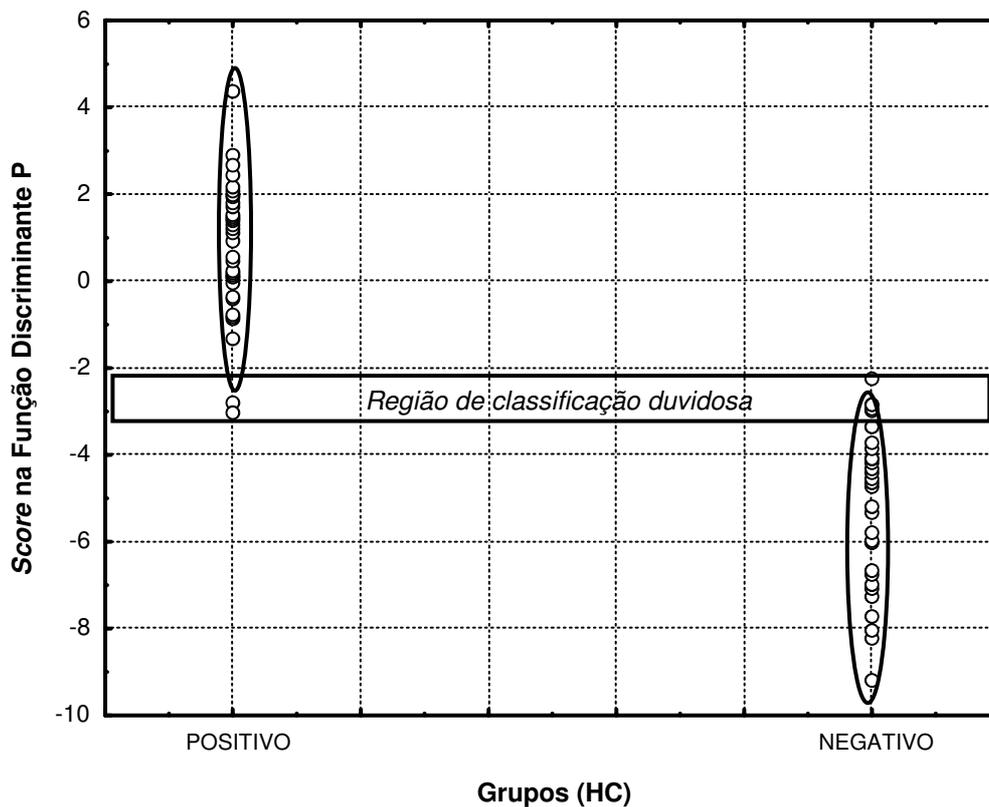


Figura 56 – Diagnóstico clínico-laboratorial, realizado no Hospital das Clínicas / UFPE, para infecção pelo HCV versus Score na Função Discriminante P.

A existência dessa região de classificação duvidosa explica o fato de que três amostras, que foram classificadas corretamente como negativas para a infecção pelo HCV com o modelo completo, tenham a classificação alterada quando da validação cruzada. Essas amostras (22, 23 e 29) têm *scores* na região que classificamos como duvidosa. Os resultados obtidos pelo modelo completo e os da validação cruzada estão resumidos na tabela 12. De acordo com esses resultados, o modelo apresentou um valor de sensibilidade igual a

96,9% e especificidade igual a 94,1%. O valor preditivo positivo, definido como a probabilidade de existir a doença se o teste indicar positividade, é igual a 97,0%; enquanto o valor preditivo negativo, definido como a probabilidade de não existir a infecção se o teste indicar negatividade, é igual a 93,9%.

Tabela 12 – Resumo da classificação feita pelo modelo metabonômico versus diagnóstico clínico-laboratorial para infecção pelo HCV.

		Predição do modelo		
		HCV positivo	HCV negativo	Total
Completo	HCV positivo	32	2	34
	HCV negativo	1	31	32
%	HCV positivo	94,1	5,9	100,0
	HCV negativo	3,1	96,9	100,0
Validação cruzada				
	HCV positivo	32	2	34
	HCV negativo	4	28	32
%	HCV positivo	94,1	5,9	100,0
	HCV negativo	12,5	87,5	100,0

95,5% dos casos foram corretamente classificados pelo modelo; Na validação cruzada, 90,9% dos casos foram corretamente classificados.

Mesmo considerando que o número de amostras utilizado na construção do modelo ainda é pequeno, os valores obtidos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo pelo modelo metabonômico, credenciam a metodologia para ser aplicada como ferramenta de rastreamento na investigação de infecção pelo HCV. Isso se deve ao fato de que os valores de avaliação obtidos são muito próximos dos observados para os testes de rotina utilizados na prática médica.

Nos apêndices II, III e IV estão listados os dados espectrais normalizados usados na construção do modelo metabonômico, bem como os pesos de cada amostra para as componentes principais e as funções de

classificação para cada grupo – POSITIVO e NEGATIVO. Este trabalho foi submetido e aceito para publicação no periódico *Journal of Viral Hepatitis* [146].

Nós continuamos com a coleta de dados, no sentido de confirmarmos os resultados e podermos ter um conjunto de amostras tal que permita ter um grupo de calibração e um grupo de teste, que no nosso entendimento é a forma mais adequada de avaliação do modelo.

Conclusão

O modelo construído apresentou valores de sensibilidade e especificidade iguais a 96,9% e 94,1%, respectivamente. Já os valores preditivos positivo e negativo são iguais a 97,0% e 93,9%, respectivamente. O modelo foi *cross*-validado, classificando corretamente 90,9% das amostras e tendo 95,5% de concordância com os resultados apresentados pelo modelo completo.

Demonstramos, portanto, que a técnica e o biofluido escolhidos têm potencial para serem utilizados como método de rotina no rastreamento de casos de infecção pelo HCV, caracterizando-se como uma metodologia mais rápida e menos onerosa do que as que atualmente são utilizadas.

Capítulo III

Conclusão e Perspectivas

Conclusão

Nesta tese, nós demonstramos, com exemplos práticos e diversos, a versatilidade e aplicabilidade da espectroscopia de ressonância magnética multinuclear na solução dos mais diferentes problemas, das mais diferentes áreas, desde aqueles aparentemente convencionais até os mais inovadores, chegando à fronteira do conhecimento.

Quatro diferentes direções de pesquisa foram abordadas, a saber:

- ✓ Forense, como nos casos da morte súbita por uso de inalante – RMN de ^1H , de ^{13}C e de ^{19}F , e do erro de manipulação na produção de medicamento – RMN de ^1H ;
- ✓ Estudos de mecanismos de reação e processo – estudamos a formação do complexo de Meisenheimer e derivados de ftalimidas, o efeito das ondas de ultrassom sobre uma solução de polianilina em DMSO e a estabilidade de polifosfatos frente à radiação gama;
- ✓ Elucidação e assinalamento estrutural – para isso, fizemos uso de ferramentas uni e bidimensionais, analisando séries de trifluoroboratos orgânicos, derivados de 1,2,4-oxadiazóis com propriedades luminescentes, e distinguindo amostras de “crack” e cloridrato de cocaína;
- ✓ Análise de biofluidos – desenvolvemos um modelo metabonômico para distinguir amostras de urina fornecidas por pacientes infectados pelo HCV de pacientes não infectados, tendo o mesmo apresentado altos valores preditivos (positivo e negativo), de especificidade, sensibilidade e acurácia.

Ficou demonstrado que a espectroscopia de ressonância magnética multinuclear pode (e deve) ser aplicada na solução de problemas que vão além daqueles normalmente estudados nos laboratórios de pesquisa, como é o caso da elucidação estrutural de novos compostos, por exemplo.

Por outro lado, sua aplicação na investigação forense é algo que não é muito explorado, tendo campo para expansão, sobretudo se for associada à estratégia metabonômica, algo que ainda, até onde pudemos investigar, é inexistente.

A estratégia metabonômica tem crescido muito rapidamente e é uma área onde trabalhos pioneiros, apresentando resultados de fato úteis para a sociedade, podem ser realizados, como foi o caso de nosso estudo em que desenvolvemos com sucesso um modelo de diagnóstico para classificação de amostras de urina fornecidas por pacientes portadores de infecção pelo vírus da hepatite C.

Perspectivas

Tratamos fundamentalmente da aplicação da espectroscopia de ressonância magnética multinuclear à solução de diversos problemas, das mais diferentes áreas. Os resultados obtidos propiciam novos estudos, sobretudo no tocante às análises de biofluidos, usando metabonômica.

Assim, além de continuarmos aplicando as técnicas de RMN na solução de problemas associados à ciência forense ou outras necessidades mais específicas da química analítica, pretendemos estender a construção do modelo metabonômico aqui realizado no sentido de melhorar os valores de especificidade e sensibilidade obtidos. Pretendemos também avançar, visando à construção de um modelo, a partir de espectros de RMN de ^1H de amostras de soro, que seja capaz de determinar o estágio e a gravidade do processo infeccioso provocado pelo HCV. Isso seria interessante, haja vista que essa determinação é feita a partir da biópsia do fígado, que é um procedimento extremamente invasivo e relativamente arriscado, exigindo inclusive o internamento do paciente. O desenvolvimento de uma metodologia minimamente invasiva é, portanto, plenamente justificável e altamente desejável.

Pretendemos também desenvolver projeto usando espectros de RMN de ^1H de amostras de sêmen buscando correlacionar mudanças no perfil de metabólitos endógenos com o diagnóstico de câncer de próstata. Há relatos na literatura de estratégias metabolômicas, determinando a concentração de citrato no líquido seminal e correlacionando a mesma com a ocorrência ou não de câncer de próstata [147, 148]. Alguns inconvenientes podem ser apontados

no uso desta metodologia, como o fato de a determinação da concentração poder ser dificultada se houver outro(s) sinal(is) na região utilizada para a integração, ou se a concentração de citrato for muito baixa. Em princípio, seria preferível realizar a análise diretamente no fluido seminal já que maiores concentrações de citrato são ali observadas. Porém, a desvantagem é que a coleta do fluido seminal é relativamente invasiva, sendo realizada a partir de uma massagem prostática. A estratégia metabonômica poderia vencer essas duas barreiras, haja vista que poderíamos trabalhar apenas com amostras de sêmen (de fácil coleta por manipulação auto-erótica), usando as áreas relativas a um conjunto de metabólitos endógenos, e não apenas um único metabólito (no caso, o citrato).

Outro trabalho que pretendemos desenvolver, utilizando a estratégia metabonômica, seria classificar amostras de mel por florada. O Brasil é um dos grandes produtores e exportadores de mel de abelha. Uma forma de agregar valor a esse produto, além do tipo de abelha que o produz, é garantir a florada do mesmo, ou seja, o tipo de vegetação que será a fonte de alimentação das abelhas. Assim, as amostras de mel podem ser classificadas, por exemplo, como florada de eucalipto, florada de lavanda, ou mesmo mel silvestre. As questões que se impõem são: como determinar se de fato o mel pode ser assim classificado? Será que é possível vender um mel silvestre como sendo de uma determinada florada apenas acrescentando determinados compostos? É possível identificar esse tipo de adulteração? Essas determinações normalmente são realizadas utilizando métodos de cromatografia associados à espectrometria de massas [149]. Esses métodos são relativamente demorados.

Dessa forma, considerando que o mel também é um biofluido, podemos aplicar a estratégia metabonômica e classificar as amostras em função do tipo de florada, de abelha ou região aonde foi produzida.

Enfim, há uma grande variedade de problemas, passíveis de abordagem pela estratégia metabonômica, que pretendemos explorar a partir dos resultados obtidos nesta tese.

Referências Bibliográficas

1. Bloch, F., W.W. Hansen, and M. Packard, *NUCLEAR INDUCTION*. Physical Review, 1946. **69**(3-4): p. 127-127.
2. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, *RESONANCE ABSORPTION BY NUCLEAR MAGNETIC MOMENTS IN A SOLID*. Physical Review, 1946. **69**(1-2): p. 37-38.
3. Arnold, J.T., S.S. Dharmatti, and M.E. Packard, *CHEMICAL EFFECTS ON NUCLEAR INDUCTION SIGNALS FROM ORGANIC COMPOUNDS*. Journal of Chemical Physics, 1951. **19**(4): p. 507-507.
4. Proctor, W.G. and F.C. Yu, *The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency Upon Chemical Compound*. Physical Review, 1950. **77**(5): p. 717-717.
5. Dickinson, W.C., *Dependence of the F-19 Nuclear Resonance Position on Chemical Compound*. Physical Review, 1950. **77**(5): p. 736-737.
6. Gutowsky, H.S. and C.J. Hoffman, *Chemical Shifts in the Magnetic Resonance of F-19*. Physical Review, 1950. **80**(1): p. 110-111.
7. Packard, M.E. and J.T. Arnold, *A Fine Structure in Nuclear Induction Signals from Ethyl Alcohol*. Physical Review, 1951. **83**(1): p. 210-211.
8. Liddel, U. and N.F. Ramsey, *Temperature Dependent Magnetic Shielding in Ethyl Alcohol*. Journal of Chemical Physics, 1951. **19**(12): p. 1608-1608.
9. Arnold, J.T. and M.E. Packard, *Variations in Absolute Chemical Shift of Nuclear Induction Signals of Hydroxyl Groups of Methyl and Ethyl Alcohol*. Journal of Chemical Physics, 1951. **19**(12): p. 1608-1609.
10. Karplus, M., *Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(18): p. 2870-&.
11. Karplus, M., *Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments*. Journal of Chemical Physics, 1959. **30**(1): p. 11-15.
12. Patt, S.L. and J.N. Shoolery, *Attached Proton Test for C-13 Nmr*. Journal of Magnetic Resonance, 1982. **46**(3): p. 535-539.
13. Morris, G.A. and R. Freeman, *Enhancement of Nuclear Magnetic-Resonance Signals by Polarization Transfer*. Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(3): p. 760-762.

14. Burum, D.P. and R.R. Ernst, *Net Polarization Transfer Via a J-Ordered State for Signal Enhancement of Low-Sensitivity Nuclei*. Journal of Magnetic Resonance, 1980. **39**(1): p. 163-168.
15. Bendall, M.R., D.M. Doddrell, and D.T. Pegg, *Editing of C-13 Nmr-Spectra - a Pulse Sequence for the Generation of Subspectra*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(15): p. 4603-4605.
16. Aue, W.P., E. Bartholdi, and R.R. Ernst, *2-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear Magnetic-Resonance*. Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(5): p. 2229-2246.
17. Bax, A. and G.A. Morris, *An Improved Method for Heteronuclear Chemical-Shift Correlation by Two-Dimensional Nmr*. Journal of Magnetic Resonance, 1981. **42**(3): p. 501-505.
18. Muller, L., *Sensitivity Enhanced Detection of Weak Nuclei Using Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*. Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(16): p. 4481-4484.
19. Bodenhausen, G. and D.J. Ruben, *Natural Abundance N-15 Nmr by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy*. Chemical Physics Letters, 1980. **69**(1): p. 185-189.
20. Kessler, H., et al., *Assignment of Carbonyl Carbons and Sequence-Analysis in Peptides by Heteronuclear Shift Correlation Via Small Coupling-Constants with Broad-Band Decoupling in T1 (Coloc)*. Journal of Magnetic Resonance, 1984. **57**(2): p. 331-336.
21. Bax, A. and M.F. Summers, *H-1 and C-13 Assignments from Sensitivity-Enhanced Detection of Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity by 2d Multiple Quantum Nmr*. Journal of the American Chemical Society, 1986. **108**(8): p. 2093-2094.
22. Lauterbu.Pc, *Image Formation by Induced Local Interactions - Examples Employing Nuclear Magnetic-Resonance*. Nature, 1973. **242**(5394): p. 190-191.
23. Stejskal, E.O. and J.E. Tanner, *SPIN DIFFUSION MEASUREMENTS - SPIN ECHOES IN PRESENCE OF A TIME-DEPENDENT FIELD GRADIENT*. Journal of Chemical Physics, 1965. **42**(1): p. 288-&.
24. Hurd, R.E., *Gradient-Enhanced Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1990. **87**(2): p. 422-428.
25. Hurd, R.E. and B.K. John, *Gradient-Enhanced Proton-Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1991. **91**(3): p. 648-653.

26. Willker, W., et al., *Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Correlation Spectroscopy*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1993. **31**(3): p. 287-292.
27. Willker, W., et al., *Gradient-Selected E-Cosy*. Journal of Magnetic Resonance Series A, 1993. **102**(3): p. 348-350.
28. Menezes, P.H., et al., *Efficient chiral discrimination by Se-77 NMR*. Organic Letters, 2003. **5**(10): p. 1601-1604.
29. Dale, J.A., D.L. Dull, and H.S. Mosher, *Alpha-Methoxy-Alpha-Trifluoromethylphenylacetic Acid, a Versatile Reagent for Determination of Enantiomeric Composition of Alcohols and Amines*. Journal of Organic Chemistry, 1969. **34**(9): p. 2543-&.
30. Dale, J.A. and H.S. Mosher, *Nuclear Magnetic Resonance Nonequivalence of Diastereomeric Esters of Alpha-Substituted Phenylacetic Acids for Determination of Stereochemical Purity*. Journal of the American Chemical Society, 1968. **90**(14): p. 3732-&.
31. Kinns, M. and J.K.M. Sanders, *Improved Frequency-Selectivity in Nuclear Overhauser Effect Difference Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1984. **56**(3): p. 518-520.
32. Neuhaus, D., Williamson, M., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. 1989, Weinheim: VCH.
33. Leite, A.C.L., et al., *Synthesis, cruzain docking, and in vitro studies of aryl-4-oxothiazolyhydrazones against Trypanosoma cruzi*. Chemmedchem, 2007. **2**(9): p. 1339-1345.
34. Novoselsky, A. and R. Glaser, *Solid-state CP/MAS C-13 NMR studies on conformational polymorphism in sertraline hydrochloride, an antidepressant drug*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2002. **40**(11): p. 723-728.
35. Hartmann, S.R. and E.L. Hahn, *Nuclear Double Resonance in Rotating Frame*. Physical Review, 1962. **128**(5): p. 2042-&.
36. Rosalki, S.B., A.Y. Foo, and J.S. Dooley, *Benign familial hyperphosphatasaemia as a cause of unexplained increase in plasma alkaline phosphatase activity*. J Clin Pathol, 1993. **46**(8): p. 738-41.
37. WHO, *Hepatitis C: global prevalence*. Wkly Epidemiol Rec, 1997. **72**(46): p. 341-4.
38. WHO, *Hepatitis C--global prevalence (update)*. Wkly Epidemiol Rec, 2000. **75**(3): p. 18-9.

39. Alberti, A. and L. Benvegna, *Management of hepatitis C*. J Hepatol, 2003. **38 Suppl 1**: p. S104-18.
40. Farci, P., et al., *Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure*. N Engl J Med, 1996. **335**(9): p. 631-4.
41. Lopes, E.P.A., et al., *Hepatite pelo Vírus C*, in *Conduitas em Doenças Infecciosas*, H.R.L. Mel, et al., Editor. 2004, Medsi: Rio de Janeiro, Brasil. p. 493.
42. Ikeda, K., et al., *A Multivariate-Analysis of Risk-Factors for Hepatocellular Carcinogenesis - a Prospective Observation of 795 Patients with Viral and Alcoholic Cirrhosis*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 47-53.
43. Gretch, D.R., *Diagnostic tests for hepatitis C*. Hepatology, 1997. **26**(3): p. S43-S47.
44. Brandao, A.B., et al., *[Diagnosis of hepatitis C in clinical practice: review of the literature]*. Rev Panam Salud Publica, 2001. **9**(3): p. 161-8.
45. Pawlotsky, J.M., et al., *What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories?* Hepatology, 1998. **27**(6): p. 1700-1702.
46. Ferreira Filho, R.P., Lyra, L.G.C., *Hepatite Crônica pelo Vírus C*, in *Manual do Diagnóstico e Tratamento das Doenças Hepáticas*, E.R. Parise, Porta, G., Editor. 2000, Sociedade Brasileira de Hepatologia: São Paulo. p. 51.
47. Ohno, T. and J.Y.N. Lau, *The "gold-standard," accuracy, and the current concepts: Hepatitis C virus genotype and viremia*. Hepatology, 1996. **24**(5): p. 1312-1315.
48. Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell, *Genetic-Heterogeneity of Hepatitis-C Virus - Quasi-Species and Genotypes*. Seminars in Liver Disease, 1995. **15**(1): p. 41-63.
49. Simmonds, P., *Variability of Hepatitis-C Virus*. Hepatology, 1995. **21**(2): p. 570-583.
50. Odeblad, E. and U. Bryhn, *Proton Magnetic Resonance of Human Cervical Mucus during the Menstrual Cycle*. Acta Radiologica, 1957. **47**(4): p. 315-320.
51. Damadian, R., *Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance*. Science, 1971. **171**(3976): p. 1151-&.
52. Achten, E. and K. Deblaere, *Health technology assessment on the use of magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) in*

- the diagnosis of multiple sclerosis (MS) and clinically isolated syndromes (CIS)*. Eur J Radiol, 2008. **65**(2): p. 211-3.
53. Holden, C., *Cognitive science. Twins may think alike too, MRI brain study suggests*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1658.
54. Nicholson, J.K., et al., *MONITORING METABOLIC DISEASE BY PROTON NMR OF URINE*. Lancet, 1984. **2**(8405): p. 751-752.
55. Nicholson, J.K., J.A. Timbrell, and P.J. Sadler, *PROTON NMR-SPECTRA OF URINE AS INDICATORS OF RENAL DAMAGE - MERCURY-INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS*. Molecular Pharmacology, 1985. **27**(6): p. 644-651.
56. Matsushita, K., et al., *A Simple and Rapid Method for Detecting Trimethylamine in Human-Urine by Proton Nmr*. Physiological Chemistry and Physics and Medical Nmr, 1989. **21**(1): p. 3-4.
57. Liu, M.L., et al., *Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1998. **132**(1): p. 125-129.
58. Griffin, J.L., et al., *NMR spectroscopy based metabonomic studies on the comparative biochemistry of the kidney and urine of the bank vole (Clethrionomys glareolus), wood mouse (Apodemus sylvaticus), white toothed shrew (Crocidura suaveolens) and the laboratory rat*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 2000. **127**(3): p. 357-367.
59. Lindon, J.C., et al., *Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis*. Biomarkers, 2004. **9**(1): p. 1-31.
60. Lindon, J.C., E. Holmes, and J.K. Nicholson, *So whats the deal with metabonomics? Metabonomics measures the fingerprint of biochemical perturbations caused by disease, drugs, and toxins*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p. 384a-391a.
61. Robertson, D.G., *Metabonomics in toxicology: A review*. Toxicological Sciences, 2005. **85**(2): p. 809-822.
62. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(4): p. 285-294.
63. Kochhar, S., et al., *Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics*. Analytical Biochemistry, 2006. **352**(2): p. 274-281.

64. Lenz, E.M., et al., *Metabonomics with H-1-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat*. *Biomarkers*, 2005. **10**(2-3): p. 173-187.
65. Wilson, I.D., et al., *HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005. **817**(1): p. 67-76.
66. Williams, R.E., et al., *D-serine-induced nephrotoxicity: a HPLC-TOF/MS metabonomics approach*. *Toxicology*, 2004. **202**(1-2): p. 65-66.
67. Lenz, E.M., et al., *Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a H-1 NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004. **36**(4): p. 841-849.
68. Bollard, M.E., et al., *NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition*. *Nmr in Biomedicine*, 2005. **18**(3): p. 143-162.
69. Afifi, A.A. and V. Clark, *Computer-Aided Multivariate Analysis*. 3^a Ed ed. *Texts in Statistical Science*. 1998, London: Chapman & Hall. 455.
70. Kachigan, S.K., *Multivariate Statistical Analysis: A Conceptual Introduction*. 2^a ed ed. 1991, New York: Radius Press. 303.
71. Warner, E.A., *Cocaine abuse*. *Ann Intern Med*, 1993. **119**(3): p. 226-35.
72. Sagmuller, B., et al., *Identification of illicit drugs by a combination of liquid chromatography and surface-enhanced Raman scattering spectroscopy*. *Journal of Molecular Structure*, 2003. **661**: p. 279-290.
73. Cruz, A., et al., *Sequential 2nd Derivative Spectroscopy of Cocaine and Adulterants in Street Drug Samples .1. Cocaine Procaine, and Lidocaine*. *Analytical Letters*, 1994. **27**(14): p. 2663-2675.
74. Lee, G.S.H., et al., *Analysis of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA) in "Ecstasy" tablets by C-13 solid state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy*. *Journal of Forensic Sciences*, 1999. **44**(4): p. 761-771.
75. Smith, R.M., *The mass spectrum of cocaine*. *Journal of Forensic Sciences*, 1997. **42**(3): p. 475-480.
76. Hohnholz, D., S. Steinbrecher, and M. Hanack, *Applications of phthalocyanines in organic light emitting devices*. *Journal of Molecular Structure*, 2000. **521**: p. 231-237.

77. O'Neill, M. and S.M. Kelly, *Liquid crystals for charge transport, luminescence, and photonics*. *Advanced Materials*, 2003. **15**(14): p. 1135-1146.
78. Vlachos, P., et al., *Charge-transport in crystalline organic semiconductors with liquid crystalline order*. *Chemical Communications*, 2005(23): p. 2921-2923.
79. Zhang, X.B., et al., *Energy levels of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives (OXDs) and device performance using blends of MEH-PPV and the OXDs as emissive layers*. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 2007. **28**(4): p. 794-797.
80. Attias, A., et al., *Columnar mesophase from a new disclike mesogen based on a 3,5-dicyano-2,4,6-tristyrylpyridine core*. *Chemistry of Materials*, 2002. **14**(1): p. 375-384.
81. Cha, S.W., et al., *Synthesis and luminescence properties of four-armed conjugated structures containing 1,3,4-oxadiazole moieties*. *Journal of Materials Chemistry*, 2003. **13**(8): p. 1900-1904.
82. Han, J., et al., *Synthesis and mesomorphic behaviour of heterocycle-based liquid crystals containing 1,3,4-oxadiazole/thiadiazole and thiophene units*. *Liquid Crystals*, 2008. **35**(10): p. 1205-1214.
83. Gallardo, H., A.J. Bortoluzzi, and D.M.P.D. Santos, *Synthesis, crystalline structure and mesomorphic properties of new liquid crystalline 1,2,3-triazole derivatives*. *Liquid Crystals*, 2008. **35**(6): p. 719-725.
84. Vieira, A.A., et al., *Luminescent 2,1,3-benzothiadiazole-based liquid crystalline compounds*. *Journal of Molecular Structure*, 2008. **875**(1-3): p. 364-371.
85. Srivastava, R.M., et al., *Synthesis, optical properties and thermal behaviour of 1,3,4-oxadiazole-based twin dimers*. *Liquid Crystals*, 2008. **35**(6): p. 737-742.
86. Oga, S., *Fundamentos da Toxicologia*. 2^a ed ed. 1995, São Paulo: Atheneu.
87. Brock, W.J., et al., *Acute and Subchronic Toxicity of 1,1-Dichloro-1-Fluoroethane (Hcfc-141b)*. *Food and Chemical Toxicology*, 1995. **33**(6): p. 483-490.
88. Dekant, W., *Toxicology of chlorofluorocarbon replacements*. *Environmental Health Perspectives*, 1996. **104**: p. 75-83.
89. Astier, A. and F. Paraire, *Fatal intoxication with 1,1-dichloro-1-fluoroethane*. *New England Journal of Medicine*, 1997. **337**(13): p. 940-940.

90. Tong, Z., et al., *Metabolism of 1,1-dichloro-1-fluoroethane (HCFC-141b) in human volunteers*. Drug Metabolism and Disposition, 1998. **26**(7): p. 711-713.
91. Watanabe, T. and M. Morita, *Asphyxia due to oxygen deficiency by gaseous substances*. Forensic Science International, 1998. **96**(1): p. 47-59.
92. Fuke, C., et al., *A fatal case considered to be due to cardiac arrhythmia associated with butane inhalation*. Leg Med (Tokyo), 2002. **4**(2): p. 134-8.
93. Suzuki, A. and H.C. Brown, *Organic Syntheses via Boranes*. Vol. 3. 2003, Milwaukee, WI: Aldrich Chemical.
94. Brown, H.C., *Organic Syntheses via Boranes*. Vol. 1. 1997, Milwaukee, WI: Aldrich Chemical.
95. Brown, H.C. and M. Zaidlewicz, *Organic Syntheses via Boranes*. Vol. 2. 2001, Milwaukee, WI: Aldrich Chemical.
96. Molander, G.A. and N. Ellis, *Organotrifluoroborates: Protected boronic acids that expand the versatility of the Suzuki coupling reaction*. Accounts of Chemical Research, 2007. **40**(4): p. 275-286.
97. Thadani, A.N. and R.A. Batey, *A mild protocol for allylation and highly diastereoselective syn or anti crotylation of aldehydes in biphasic and aqueous media utilizing potassium allyl- and crotyltrifluoroborates*. Organic Letters, 2002. **4**(22): p. 3827-3830.
98. Duursma, A., et al., *Highly enantioselective conjugate additions of potassium organotrifluoroborates to enones by use of monodentate phosphoramidite ligands*. Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(23): p. 8045-8052.
99. Batey, R.A., et al., *Organoboron compounds as mild nucleophiles in Lewis acid- and transition metal-catalyzed C-C bond-forming reactions*. Pure and Applied Chemistry, 2002. **74**(1): p. 43-55.
100. Smoum, R., A. Rubinstein, and M. Srebnik, *Noncovalent inhibition of the serine proteases, alpha-chymotrypsin and trypsin by trifluoro(organo)borates*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2005. **3**(5): p. 941-944.
101. Oliveira, R.A., et al., *Toxicological Investigation and Antinociceptive Property of Potassium Thiophene-3-Trifluoroborate*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2009. **104**(6): p. 448-454.
102. Vedejs, E., et al., *Asymmetric memory at labile, stereogenic boron: Enolate alkylation of oxazaborolidinones*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(11): p. 2460-2470.

103. Metz, K.R., M.M. Lam, and A.G. Webb, *Reference deconvolution: A simple and effective method for resolution enhancement in nuclear magnetic-resonance spectroscopy*. Concepts in Magnetic Resonance, 2000. **12**(1): p. 21-42.
104. Oliveira, R.A., et al., *H-1, C-13, F-19 and B-11 NMR spectral reference data of some potassium organotrifluoroborates*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2009. **47**(10): p. 873-878.
105. Donaldson, L.J. and M.G. Fletcher, *The WHO World Alliance for Patient Safety: towards the years of living less dangerously*. Med J Aust, 2006. **184**(10 Suppl): p. S69-72.
106. Genaro, A.R., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20^a ed ed. 2000, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
107. Pinto, T.J.A., T.M. Kaneko, and M.T. Ohara, *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2^a ed ed. 2003, São Paulo: Atheneu.
108. Bugay, D.E., *Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **48**(1): p. 43-65.
109. Rothchild, R., K. Sanders, and K.S. Venkatasubban, *Nmr-Studies of Drugs - Use of Lanthanide Shift-Reagents in Polar-Solvent with Thalidomide*. Spectroscopy Letters, 1993. **26**(4): p. 597-619.
110. Trefi, S., et al., *Quality assessment of fluoxetine and fluvoxamine pharmaceutical formulations purchased in different countries or via the Internet by 19F and 2D DOSY 1H NMR*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **46**(4): p. 707-22.
111. Zoppi, A., M. Linares, and M. Longhi, *Quantitative analysis of enalapril by H-1 NMR spectroscopy in tablets*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005. **37**(3): p. 627-630.
112. Waitzberg, D.L., *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 3^a ed ed. 2002, São Paulo: Atheneu.
113. McKee, R., *Artificial Nutrition and Nutritional Support in Hospital*. Medicine, 2006. **34**(12).
114. Arizmendi, A.M., N.C. Monleón, and O.C. Gallego, *Conceptos Básicos de la Nutrición Enteral y Parenteral. Otros Abordajes Terapéuticos de la malnutrición*. Medicine, 2002. **8**: p. 4700-4708.
115. Brasil, *Portaria 272 de 08/04/1998*. 1998, DOU - Diário Oficial da União: Brasília. p. 1.

116. Driscoll, D.F., *Compounding TPN admixtures: then and now*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003. **27**(6): p. 433-8; quiz 439.
117. Allwood, M.C. and M.C. Kearney, *Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures*. Nutrition, 1998. **14**(9): p. 697-706.
118. Lumpkin, M.M., *Safety alert: hazards of precipitation associated with parenteral nutrition*. Am J Hosp Pharm, 1994. **51**(11): p. 1427-8.
119. Reedy, J.S., J.E. Kuhlman, and M. Voytovich, *Microvascular pulmonary emboli secondary to precipitated crystals in a patient receiving total parenteral nutrition: a case report and description of the high-resolution CT findings*. Chest, 1999. **115**(3): p. 892-5.
120. Marks, K.E. and C.M. Crill, *Calcium and Phosphorous in Pediatric Parenteral Nutrition*. Journal of Pharmacy Practice, 2004. **17**: p. 432.
121. Galembeck, F., J.D. Brito, and J. De Brito, *Aluminum phosphate composition for paints, plastics, varnishes, or printing inks, includes particles, when in powder form, having average of closed void(s) per particle*. 2006, Galembeck F; Brito J D; Bunge Fertilizantes Sa; Univ Estadual Campinas; Unicamp Univ Estadual Campinas.
122. Silva, R.O., *Discriminação Quiral por RMN de Se-77, Caracterização da Transição Sol-Gel por DOSY P-31 e Extensão da DOSY para Se-77 e Te-125*, in *Departamento de Química Fundamental*. 2004, UFPE: Recife. p. 101p.
123. Pereira, J.C.B., *Estudo Físico-Químico do Polifosfato de Sódio Visando sua Aplicação em Formulações para Nutrição Parenteral*, in *Ciências Farmacêuticas*. 2007, Universidade Federal de Pernambuco: Recife. p. 100p.
124. Rashchi, F. and J.A. Finch, *Polyphosphates: A review their chemistry and application with particular reference to mineral processing*. Minerals Engineering, 2000. **13**(10-11): p. 1019-1035.
125. Greenfield, S. and M. Clift, *Analytical Chemistry of the Condensed Phosphates*. International Series in Analytical Chemistry. Vol. 57. 1974, New York: Pergamon Press.
126. de Barros, R.A. and W.M. de Azevedo, *Polyaniline/silver nanocomposite preparation under extreme or non-classical conditions*. Synthetic Metals, 2008. **158**(21-24): p. 922-926.
127. Lacroix, M. and B. Ouattara, *Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products - a review*. Food Research International, 2000. **33**(9): p. 719-724.

128. Brow, R.K., *Review: the structure of simple phosphate glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2000. **263**(1-4): p. 1-28.
129. Bhadra, S., et al., *Progress in preparation, processing and applications of polyaniline*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**(8): p. 783-810.
130. Jing, X.L., et al., *Sonochemical synthesis of polyaniline nanofibers*. Ultrasonics Sonochemistry, 2007. **14**(1): p. 75-80.
131. Apfel, R.E., in *Methods of Experimental Physics: Ultrasonics*, P. Edmonds, Editor. 1981, Academic Press: New York. p. 355.
132. Sahin, Y., K. Pekmez, and A. Yildiz, *Electrochemical preparation of soluble sulfonated polymers and aniline copolymers of aniline sulfonic acids in dimethylsulfoxide*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **90**(8): p. 2163-2169.
133. de Azevedo, W.M., J.M. de Souza, and J.V. de Melo, *Semi-interpenetrating polymer networks based on polyaniline and polyvinyl alcohol-glutaraldehyde*. Synthetic Metals, 1999. **100**(3): p. 241-248.
134. Cao, Y., P. Smith, and A.J. Heeger, *Spectroscopic Studies of Polyaniline in Solution and in Spin-Cast Films*. Synthetic Metals, 1989. **32**(3): p. 263-281.
135. Stilwell, D.E. and S.M. Park, *Electrochemistry of Conductive Polymers .5. Insitu Spectroelectrochemical Studies of Polyaniline Films*. Journal of the Electrochemical Society, 1989. **136**(2): p. 427-433.
136. Nekrasov, A.A., V.F. Ivanov, and A.V. Vannikov, *Analysis of the structure of polyaniline absorption spectra based on spectroelectrochemical data*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2000. **482**(1): p. 11-17.
137. Wolszczak, M., J. Kroh, and M.M. AbdelHamid, *Effect of ionizing radiation on polyaniline solutions*. Radiation Physics and Chemistry, 1996. **47**(6): p. 859-867.
138. de Azevedo, W.M., et al., *The effect of ultrasonic waves in conducting polymer solution*. Ultrason Sonochem, 2006. **13**(5): p. 433-7.
139. Fyfe, C.A., M. Cocivera, and S.W.H. Damji, *High-Resolution Nuclear Magnetic-Resonance Studies of Chemical-Reactions Using Flowing Liquids - Investigation of Kinetic and Thermodynamic Intermediates Formed by Attack of Methoxide Ion on 1-X-3,5-Dinitrobenzenes*. Journal of the American Chemical Society, 1975. **97**(20): p. 5707-5713.
140. Crampton, M.R. and H.A. Khan, *Stabilities of Meisenheimer Complexes .4. Methoxide Adducts from 1-X-3,5-Dinitrobenzenes*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 1973(6): p. 710-715.

141. Crampton, M.R. and C. Greenhalgh, *The Stabilities of Meisenheimer Complexes .42. Kinetic-Studies of the Reactions of Methyl 3,5-Dinitrobenzoate and of Methyl 4-Chloro-3,5-Dinitrobenzoate with Hydroxide Ions in Dimethylsulfoxide Water Mixtures - Competitive Nucleophilic-Attack at Aryl and Carbonyl Carbon-Atoms*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 1986(6): p. 873-878.
142. Silva, C.C., et al., *Investigation of Unexpected Reaction Intermediates in the Alkaline Hydrolysis of Methyl 3,5-Dinitrobenzoate*. Journal of Chemical Education, 2009. **86**(4): p. 484-487.
143. Winstead, M.B. and H.W. Heine, *Identification of Amines .1. N-(Arylamino-Methyl)-Phthalimides*. Journal of the American Chemical Society, 1955. **77**(7): p. 1913-1914.
144. Shapiro, B.L., R.M. Kopchik, and S.J. Ebersole, *PROTON NMR STUDIES OF CHDO AND CH2O*. Journal of Chemical Physics, 1963. **39**(11): p. 3154-&.
145. Sena, V.L.M., et al., *Conventional and microwave-assisted reaction of N-hydroxymethylphthalimide with arylamines: Synthesis of N-(Arylaminomethyl)-phthalimides*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2007. **18**(6): p. 1224-1234.
146. Godoy, M.M., et al., *Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics*. J Viral Hepat.
147. Kline, E.E., et al., *Citrate concentrations in human seminal fluid and expressed prostatic fluid determined via H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy outperform prostate specific antigen in prostate cancer detection*. Journal of Urology, 2006. **176**(5): p. 2274-2279.
148. Kline, E.E., et al., *Analysis of citrate in human seminal fluid by 1H NMR spectroscopy distinguishes prostate cancer from normal/BPH*. Journal of Urology, 2005. **173**(4): p. 59-59.
149. Castro-Vazquez, L., et al., *Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis*. Food Chemistry, 2009. **112**(4): p. 1022-1030.

Apêndice I

Curriculum Vitae e artigos publicados no período

Artigos diretamente ligados à tese

1. The effect of ultrasonic waves in conducting polymer solution. Ultrasonics Sonochemistry **13**(5): 433-437, 2006.
Ricardo O. Silva, Walter Mendes de Azevedo, Eliete de Fátima V. B. N. Silva e Alexandre J. H. de Oliveira Luna.
2. Conventional and microwave-assisted reaction of N-hydroxymethylphthalimide with arylamines: Synthesis of N-(Arylaminomethyl)-phthalimides. Journal of the Brazilian Chemical Society **18**(6): 1224-1234, 2007.
Ricardo O. Silva, Rajendra M. Srivastava, Vera L. M. Sena, Simone M. C. Gonçalves, Carlos A. de Simone e Mariano A. Pereira.
3. Investigation of Unexpected Reaction Intermediates in the Alkaline Hydrolysis of Methyl 3,5-Dinitrobenzoate. Journal of Chemical Education **86**(4): 484-487, 2009.
Ricardo O. Silva, Marcelo Navarro, Daniela M. A. F. Navarro e Clésia C. Silva.
4. ^1H , ^{13}C , ^{19}F and ^{11}B NMR spectral reference data of some potassium organotrifluoroborates. Magnetic Resonance in Chemistry, 47 (10), 873-878, 2009.
Ricardo O. Silva, Paulo H. Menezes, Gary A. Molander e Roberta A. Oliveira.
5. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. J. Viral Hepatitis, 2010
Ricardo O. Silva, Michele M. G. Godoy, Edmundo P. A. Lopes, Fernando Hallwass, Simone M. C. Gonçalves, Alfredo M. Simas, Luisa C. A. Khoury e Izolda M. Moura

Artigos não ligados à tese

1. Synthesis, cruzain docking, and in vitro studies of aryl-4-oxothiazolylhydrazones against Trypanosoma cruzi." Chemmedchem **2**(9): 1339-1345, 2007.
Ana Cristina L. Leite, Diogo R. M. Moreira, Marcos V. O. Cardoso, Marcelo Z. Hernandez, Valéria R. A. Pereira, Ricardo O. Silva, Alice C. Kiperstock, Milena da S. Pinto e Milena B. P. Soares.
2. Cana de Mel, Sabor de Fel – Capitania de Pernambuco: Uma Intervenção Pedagógica com Caráter Multi e Interdisciplinar. Quím. Nova na Escola, (aceito para publicação), 2010.
Ricardo O. Silva.

Apêndice II

Dados espectrais utilizados na construção do modelo metabonômico para investigação de infecção pelo vírus da hepatite C

Amostra	Diagnostico	8.7	8.8	8.7	8.7	8.6	8.6	8.5	8.4	8.3	8.2	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7			
AM 1	NEGATIVO	-0.47043	-0.39631	-0.52651	-0.54631	-0.54631	-0.52980	-0.40526	-0.44698	-0.47106	-0.54580	-0.53975	-0.33241	-0.50680	-0.49765	-0.41383	-0.44598	-0.32724	-0.42619	-0.34552	-0.49236	-0.04452	-0.23152	-0.38663
AM 2	NEGATIVO	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175
AM 3	NEGATIVO	-0.59542	-0.76259	-0.76259	-0.76259	-0.76259	-0.76141	-0.68126	-0.67191	-0.62788	-0.66287	-0.58468	-0.03700	-0.69175	-0.76259	-0.73839	-0.63939	-0.69477	-0.69904	-0.73238	-0.63061	-0.18195	-0.61751	-0.76259
AM 4	NEGATIVO	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282
AM 5	NEGATIVO	-0.41788	-0.45956	-0.54481	-0.54481	-0.51640	-0.44062	-0.36484	-0.50503	-0.31114	-0.43872	-0.52208	-0.49745	-0.36282	-0.38189	-0.50503	-0.40652	-0.35347	-0.36294	-0.48987	-0.52018	-0.05395	-0.15236	-0.47282
AM 6	NEGATIVO	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763
AM 7	NEGATIVO	-0.37701	-0.50678	-0.58239	-0.57611	-0.54790	-0.46440	-0.36894	-0.51186	-0.50164	-0.54085	-0.42973	-0.49321	-0.51544	-0.46715	-0.38407	-0.37809	-0.30415	-0.31186	-0.40517	-0.42913	-0.17982	-0.00475	-0.53445
AM 8	NEGATIVO	-0.64962	-0.60848	-0.66725	-0.66725	-0.62024	-0.57910	-0.58498	-0.58498	-0.43219	-0.61436	-0.64962	-0.57322	-0.64962	-0.56735	-0.37930	-0.49663	-0.30291	-0.34404	-0.47920	-0.60261	-0.04434	-0.01442	-0.49095
AM 9	NEGATIVO	-0.51212	-0.45286	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.57138	-0.26522	-0.52529	-0.54633	-0.60101	-0.59442	-0.59113	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.48908	-0.41994	-0.40678	-0.40678	-0.44628	-0.62114	-0.84748	-0.55621
AM 10	NEGATIVO	-0.29622	-0.55112	-0.65972	-0.64695	-0.61036	-0.48288	-0.32246	-0.58306	-0.56022	-0.58965	-0.53290	-0.50222	-0.52127	-0.50566	-0.35454	-0.33310	-0.30242	-0.26095	-0.34095	-0.22844	-0.08846	-0.27498	-0.50292
AM 11	NEGATIVO	-0.51695	-0.52490	-0.52490	-0.52490	-0.52490	-0.24669	-0.21643	-0.49561	-0.47768	-0.52490	-0.52490	-0.52490	-0.37742	-0.51492	-0.52490	-0.48369	-0.35984	-0.49716	-0.49631	-0.49469	-0.77012	-0.76473	-0.51261
AM 12	NEGATIVO	-0.40560	-0.48094	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.38288	-0.42234	-0.49258	-0.44023	-0.47827	-0.50978	-0.50978	-0.22539	-0.47428	-0.49185	-0.39816	-0.17909	-0.42514	-0.46817	-0.48537	-0.01030	-0.01118	-0.48099
AM 13	NEGATIVO	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.48809	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.21538	-0.41715	-0.41669	-0.48963	-0.50233	-0.25273	-0.30092	-0.50233
AM 14	NEGATIVO	-0.43806	-0.54874	-0.53568	-0.54910	-0.50141	-0.49501	-0.47063	-0.47846	-0.41547	-0.45355	-0.48522	-0.40265	-0.34429	-0.47116	-0.42454	-0.24126	-0.42152	-0.40568	-0.47259	-0.36105	-0.21066	-0.46226	-0.54910
AM 15	NEGATIVO	-0.37363	-0.35806	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363
AM 16	NEGATIVO	-0.51239	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.48267	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.40835	-0.49753	-0.51735	-0.51982	-0.51982	-0.02019	-0.08459	-0.51982
AM 17	NEGATIVO	-0.39375	-0.49815	-0.53183	-0.53183	-0.51192	-0.32173	-0.38438	-0.47419	-0.44469	-0.50507	-0.49367	-0.46301	-0.38489	-0.45998	-0.46327	-0.31113	-0.09993	-0.35101	-0.46148	-0.45538	-0.27415	-0.10959	-0.45439
AM 18	NEGATIVO	-0.60427	-0.60427	-0.60427	-0.60427	-0.60427	-0.60385	-0.48090	-0.59619	-0.55564	-0.60427	-0.60427	-0.60164	-0.60427	-0.60427	-0.29159	-0.40327	-0.34485	-0.48467	-0.60427	-0.05825	-0.15236	-0.54121	-0.60427
AM 19	NEGATIVO	-0.47269	-0.51885	-0.57344	-0.57344	-0.57344	-0.57094	-0.50781	-0.57344	-0.57344	-0.57344	-0.56646	-0.57344	-0.47372	-0.57344	-0.50531	-0.33549	-0.36056	-0.54601	-0.57344	-0.29877	-0.29216	-0.57344	-0.57344
AM 20	NEGATIVO	-0.40585	-0.52226	-0.69669	-0.72355	-0.64725	-0.59128	-0.42506	-0.60826	-0.53755	-0.62673	-0.63009	-0.61143	-0.60098	-0.59949	-0.55616	-0.17601	-0.32675	-0.34055	-0.40342	-0.43924	-0.55616	-0.13088	-0.56908
AM 21	NEGATIVO	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.37309	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.54913	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.60854	-0.31334	-0.38156	-0.60854
AM 22	NEGATIVO	-0.31169	-0.39768	-0.43454	-0.41763	-0.39187	-0.34623	-0.26404	-0.31688	-0.27276	-0.27479	-0.07759	-0.38603	-0.34017	-0.00243	-0.60854	-0.23800	-0.12523	-0.08318	-0.22280	-0.11442	-0.10114	-0.20672	-0.33299
AM 23	NEGATIVO	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43108	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.39588	-0.41042	-0.39189	-0.43336	-0.43336	-0.29489	-0.16829	-0.43336
AM 24	NEGATIVO	-0.45713	-0.51657	-0.56404	-0.56321	-0.55708	-0.51518	-0.47759	-0.45059	-0.45309	-0.47843	-0.41745	-0.48441	-0.43336	-0.33337	-0.17481	-0.37124	-0.22423	-0.33198	-0.36970	-0.44502	-0.31124	-0.42368	-0.47425
AM 25	NEGATIVO	-0.33952	-0.49346	-0.51876	-0.52582	-0.49641	-0.40600	-0.39620	-0.42914	-0.37561	-0.45150	-0.38621	-0.36011	-0.41090	-0.36639	-0.21284	-0.26304	-0.23108	-0.32874	-0.30089	-0.30913	-0.10044	-0.18244	-0.39031
AM 26	NEGATIVO	-0.53300	-0.55170	-0.62962	-0.66391	-0.64832	-0.61092	-0.49249	-0.54235	-0.51119	-0.57975	-0.26808	-0.55542	-0.60469	-0.34912	-0.67236	-0.50495	-0.36782	-0.40833	-0.45235	-0.65767	-0.22445	-0.36158	-0.51742
AM 27	NEGATIVO	-0.43611	-0.48970	-0.56272	-0.56013	-0.54789	-0.43075	-0.30348	-0.39085	-0.37752	-0.01155	-0.47487	-0.49517	-0.45662	-0.30858	-0.47054	-0.36830	-0.31022	-0.27043	-0.43312	-0.47855	-0.09635	-0.21636	-0.46602
AM 28	NEGATIVO	-0.50657	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.51541	-0.48198	-0.52236	-0.46272	-0.52236	-0.49073	-0.50523	-0.51809	-0.52236	-0.31576	-0.41951	-0.40491	-0.50433	-0.47156	-0.08953	-0.17333	-0.52236	-0.52236	-0.52236
AM 29	NEGATIVO	-0.39944	-0.43632	-0.44670	-0.44670	-0.42060	-0.26751	-0.15774	-0.39134	-0.32470	-0.44670	-0.40703	-0.36157	-0.27734	-0.43168	-0.43345	-0.32415	-0.24971	-0.33015	-0.36357	-0.31097	-0.71401	-0.22398	-0.44197
AM 30	NEGATIVO	-0.29257	-0.39643	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.36777	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.40344	-0.19581	-0.41275	-0.48700	-0.48700	-0.09174	-0.14900	-0.48700
AM 31	NEGATIVO	-0.68163	-0.73827	-0.76576	-0.76576	-0.76053	-0.66790	-0.69683	-0.70861	-0.60603	-0.72496	-0.70550	-0.66605	-0.58345	-0.66540	-0.68381	-0.22853	-0.36728	-0.53736	-0.62669	-0.48853	-0.02083	-0.21972	-0.62716
AM 32	NEGATIVO	-0.55051	-0.61670	-0.61625	-0.60986	-0.56286	-0.43765	-0.50030	-0.53750	-0.51196	-0.54710	-0.46758	-0.43471	-0.53299	-0.49853	-0.35639	-0.44616	-0.36119	-0.40952	-0.41653	-0.46098	-0.16446	-0.11944	-0.51617
AM 33	POSITIVO	-0.36060	-0.46020	-0.52632	-0.52576	-0.50013	-0.44232	-0.41900	-0.47769	-0.41063	-0.40732	-0.44100	-0.43002	-0.47401	-0.43220	-0.41263	-0.17960	-0.21319	-0.38231	-0.41319	-0.22269	-0.00150	-0.13060	-0.46044
AM 34	POSITIVO	-0.49649	-0.54472	-0.54920	-0.53697	-0.50703	-0.42299	-0.39704	-0.42679	-0.34125	-0.45231	-0.45974	-0.43438	-0.37491	-0.18772	-0.44276	-0.34590	-0.27316	-0.25693	-0.38232	-0.32829	-0.13647	-0.21609	-0.38180
AM 35	POSITIVO	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547	-0.79547
AM 36	POSITIVO	-0.62642	-0.66156	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492	-0.69492
AM 37	POSITIVO	-0.36392	-0.42330	-0.48556	-0.45469	-0.45644	-0.37288	-0.31278	-0.37133	-0.36845	-0.40210	-0.31535	-0.32214	-0.36392	-0.32296	-0.24949	-0.20761	-0.13104	-0.06127	-0.13598	-0.17715	-0.44020	-0.21226	-0.27810
AM 38	POSITIVO	-0.44432	-0.44632	-0.44141	-0.45671	-0.44359	-0.42848	-0.43176	-0.388															

Amostra	Diagnostico	7.2	7.6	7.6	7.57	7.52	7.47	7.42	7.37	7.32	7.27	7.22	7.17	7.12	7.07	7.02	6.97	6.92	6.87	6.82	6.77	6.72	6.67	6.62
AM 1	NEGATIVO	-0.44371	-0.22124	-0.18721	0.43231	-0.01893	-0.25048	-0.15355	0.07711	-0.14611	0.03211	0.01157	-0.14271	-0.24254	-0.22956	-0.01667	0.16711	0.37660	0.59856	0.77190	1.04602	1.36945	1.78919	2.12774
AM 2	NEGATIVO	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175
AM 3	NEGATIVO	-0.65974	-0.47561	-0.42259	-0.11116	-0.46010	-0.32673	-0.02387	0.20515	-0.07720	0.17022	0.05252	-0.08948	-0.03661	0.17057	0.34276	0.49635	0.62072	0.69544	0.71460	0.71362	0.71348	0.73640	0.71903
AM 4	NEGATIVO	-0.40282	0.40282	-0.40282	-0.26553	-0.40282	-0.40282	-0.34919	0.02776	-0.40282	-0.40282	-0.30812	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282
AM 5	NEGATIVO	-0.45767	-0.10150	-0.17918	0.49716	-0.22086	-0.40462	-0.28527	-0.05225	-0.16213	-0.30042	-0.01625	-0.37999	-0.43493	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282
AM 6	NEGATIVO	-0.41763	0.41249	-0.41763	-0.35348	-0.41763	-0.41763	-0.28718	0.04629	-0.28091	-0.40672	-0.20146	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.40871	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763
AM 7	NEGATIVO	-0.44611	-0.05939	-0.18503	0.46284	-0.31623	-0.36058	-0.03626	0.26693	-0.30810	-0.23691	-0.15753	-0.53678	-0.53027	-0.57605	-0.49829	-0.51532	-0.50217	-0.47050	-0.47928	-0.51132	-0.57097	-0.54587	-0.55400
AM 8	NEGATIVO	-0.53209	-0.22651	-0.32054	0.43753	-0.17950	-0.22064	0.40815	0.67827	-0.09723	-0.13936	0.17309	-0.40281	-0.41456	-0.37930	-0.33229	-0.30291	-0.30291	-0.14424	0.16134	0.44341	0.49042	0.70795	0.78424
AM 9	NEGATIVO	-0.53187	0.07386	-0.03478	1.32153	-0.07758	-0.37715	-0.13025	0.27467	-0.30472	-0.18292	-0.15329	-0.56809	-0.57796	-0.60101	-0.60101	-0.58455	-0.52858	-0.54833	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101
AM 10	NEGATIVO	-0.23334	0.36087	0.31803	1.20910	-0.15909	-0.23124	0.17158	0.40736	-0.17660	-0.15961	0.06873	-0.36897	-0.33310	-0.41899	-0.35440	-0.36995	-0.32890	-0.36993	-0.43398	-0.43609	-0.42362	-0.37065	-0.36533
AM 11	NEGATIVO	-0.47994	0.19670	0.13769	1.37810	-0.04009	-0.41926	-0.25462	0.03463	-0.25754	-0.27628	-0.24363	-0.40739	-0.52490	-0.52490	0.48947	0.47715	0.49152	-0.49553	-0.52490	-0.52490	-0.52490	-0.52490	-0.52490
AM 12	NEGATIVO	-0.45205	-0.14369	-0.20902	0.36471	-0.17651	-0.23818	0.18469	0.52926	-0.13960	-0.14533	0.23369	-0.16291	-0.18309	-0.13507	-0.03165	0.01299	0.10661	0.20235	0.25632	0.23410	0.28273	0.40696	0.56767
AM 13	NEGATIVO	-0.47311	-0.36478	-0.39747	-0.18604	-0.39047	-0.40881	-0.19444	0.01379	-0.31572	-0.34232	-0.24253	-0.16531	-0.47680	-0.42776	0.48437	0.48685	-0.45395	-0.45369	-0.49180	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233
AM 14	NEGATIVO	-0.38201	-0.31564	-0.30835	-0.11119	-0.39892	-0.31315	-0.01279	0.04166	-0.41315	-0.33593	-0.24713	-0.60106	-0.54910	-0.45639	-0.51369	-0.39554	-0.39892	-0.35265	-0.39838	-0.47027	-0.49198	-0.44589	-0.38984
AM 15	NEGATIVO	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	0.46198	-0.27275	-0.10207	0.59636	0.05461	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363
AM 16	NEGATIVO	-0.51982	-0.26220	-0.31670	0.44130	-0.25973	-0.42322	-0.31422	-0.08881	-0.34643	-0.27211	-0.20523	-0.36881	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982
AM 17	NEGATIVO	-0.37647	-0.00877	-0.01097	0.60925	-0.07796	-0.05308	0.48668	0.82558	-0.11261	-0.09538	-0.08043	-0.29866	-0.43126	-0.38477	-0.34181	-0.34762	-0.33830	-0.32959	-0.30433	-0.40181	-0.44897	-0.43760	-0.42247
AM 18	NEGATIVO	-0.56557	-0.20434	-0.30170	0.47163	-0.11641	-0.27134	0.39679	1.15035	0.01224	0.00599	0.47453	-0.25967	-0.42706	-0.48803	-0.46117	-0.49445	-0.44842	-0.40162	-0.45398	-0.51348	-0.58573	-0.59173	-0.60427
AM 19	NEGATIVO	-0.54373	-0.28715	-0.15607	0.02808	-0.31378	-0.24328	0.33818	0.67848	-0.14093	-0.15272	0.03456	-0.47399	-0.53609	-0.57344	-0.57344	-0.57344	-0.57344	-0.56156	-0.57344	-0.57344	-0.57344	-0.57344	-0.57344
AM 20	NEGATIVO	-0.39465	0.11987	0.12640	0.81461	-0.22843	-0.23384	0.23908	0.53253	-0.33365	-0.30566	-0.11482	-0.30595	-0.58830	-0.57337	-0.56744	-0.54073	-0.57654	-0.44502	-0.47804	-0.44110	-0.43513	-0.33561	-0.22134
AM 21	NEGATIVO	-0.56468	-0.36760	-0.39007	-0.05343	-0.29881	-0.29614	-0.01391	0.26269	0.26549	0.16099	0.43318	0.10055	0.02036	0.08634	0.18697	0.25021	0.35216	0.36825	0.33437	0.31352	0.29206	0.29542	0.26561
AM 22	NEGATIVO	-0.08460	-0.11119	-0.10368	0.30396	0.37266	0.19155	0.51915	0.10288	0.00676	0.31259	0.20342	-0.31590	-0.40281	-0.39010	-0.33890	-0.32798	-0.21757	-0.15172	-0.25073	-0.28081	-0.28067	-0.28665	-0.27116
AM 23	NEGATIVO	-0.43336	-0.39008	-0.43336	-0.17368	-0.37152	-0.43336	-0.22669	0.18507	-0.32519	-0.29237	-0.26498	-0.32368	-0.43336	-0.43336	-0.41117	-0.26881	-0.11251	-0.10167	-0.03691	-0.00513	0.07941	0.12676	0.12676
AM 24	NEGATIVO	-0.35049	-0.42386	-0.41815	-0.27170	-0.18233	-0.01959	0.36546	0.66532	-0.22145	-0.22507	0.22180	-0.15365	-0.38335	-0.44168	-0.40548	-0.37820	-0.15017	-0.05119	-0.31193	-0.32432	-0.31848	-0.33769	-0.32001
AM 25	NEGATIVO	-0.25912	-0.08773	-0.14773	1.38568	-0.21284	-0.15146	0.12544	0.24702	-0.13969	-0.08694	0.02170	-0.33344	-0.31540	-0.27304	-0.27265	-0.20186	-0.06321	-0.07322	-0.13342	-0.15224	-0.16440	-0.09636	-0.11146
AM 26	NEGATIVO	-0.51119	-0.23380	-0.09978	-0.07173	-0.43015	-0.22756	0.14021	0.15580	-0.15276	-0.06267	-0.65649	-0.62027	-0.67326	-0.66391	-0.62650	-0.67040	-0.67326	-0.67326	-0.67326	-0.67326	-0.67326	-0.67326	-0.67326
AM 27	NEGATIVO	-0.43228	-0.10876	-0.11474	0.52563	-0.14050	-0.39555	-0.08541	0.19016	0.28478	-0.13624	0.02317	-0.35139	-0.46737	-0.52541	-0.48719	-0.48617	-0.43636	-0.40025	-0.47571	-0.50756	-0.53660	-0.51940	-0.52133
AM 28	NEGATIVO	-0.47473	-0.29173	-0.33056	0.11228	-0.31770	-0.37178	-0.06115	0.24800	-0.34358	-0.26297	-0.18525	-0.34953	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236	-0.52236
AM 29	NEGATIVO	-0.33059	0.18809	0.11266	0.88213	-0.25222	-0.39474	-0.19399	-0.02530	-0.24997	-0.17616	-0.29617	-0.43372	-0.44670	-0.44670	-0.44670	-0.41257	-0.43836	-0.44670	-0.44670	-0.44670	-0.44670	-0.44670	-0.44670
AM 30	NEGATIVO	-0.45928	0.00069	0.10265	0.65113	-0.03528	-0.07035	0.34125	0.61744	0.17923	0.36068	0.35660	-0.03232	-0.23528	-0.20761	-0.18133	-0.16809	-0.09795	-0.09544	-0.13332	-0.20086	-0.24713	-0.22368	-0.26396
AM 31	NEGATIVO	-0.46452	-0.34564	-0.35458	0.21225	-0.06512	-0.21754	0.33094	0.94915	0.03695	0.31101	0.71949	0.83851	0.23320	0.41595	0.52968	0.65147	0.93851	1.28464	1.15915	1.20950	1.34887	1.54952	1.79023
AM 32	NEGATIVO	-0.34246	-0.10672	-0.14389	0.34603	-0.22730	-0.27242	-0.04490	0.23019	-0.27416	-0.09137	-0.02932	-0.37129	-0.34090	-0.34405	-0.21887	-0.01650	0.27517	0.39260	0.54407	0.62121	0.74809	0.91813	1.07052
AM 33	POSITIVO	-0.30019	-0.25120	-0.20600	0.10062	-0.21019	-0.36963	-0.20001	0.09711	-0.33569	-0.30969	-0.20989	-0.27260	-0.45500	-0.46500	-0.42419	-0.42269	-0.42225	-0.42163	-0.47000	-0.50907	-0.51251	-0.47521	-0.47400
AM 34	POSITIVO	-0.23513	-0.04969	-0.05807	0.20711	-0.22532	-0.13840	0.10947	0.26932	-0.12676	-0.15002	0.10077	-0.32492	-0.45699	-0.44452	-0.41609	-0.35261	-0.16864	-0.26161	-0.38602	-0.41403	-0.40585	-0.37074	-0.34904
AM 35	POSITIVO	-0.79547	-0.62321	-0.57509	-0.19034	-0.51559	-0.32605	0.09403	0.36573	-0.10529	0.00290	0.22076	-0.16437	-0.07716	0.03921	0.10995	0.23188	0.30234	0.39717	0.44986	0.41118	0.40098	0.44068	0.46017
AM 36	POSITIVO	-0.69492	-0.34341	-0.39900	0.56939	-0.33780	-0.56206	-0.09857	0.35390	-0.44990	-0.37393	-0.29548	-0.59859	-0.68000	-0.54757	-0.31698	-0.01582	0.17008	0.39899	0.53535	0.68599	0.76430	0.92413	1.08720
AM 37	POSITIVO	-0.16202	0.11676	0.04184	0.53631	0.00253	-0.00004	0.34521	0.75057	0.06109	0.18669	0.30580	-0.12116	-0.14144	-0.07866	-0.03287	-0.08618	-0.07928	-0.08772	-0.03699	-0.06035	-0.06251	-0.03421	-0.02422
AM 38	POSITIVO	-0.19500	-0.22469	-0.25892	-0.13563	-0.15949	-0.18262	-0.18007	0.00406	-0.10540	0.08816	0.13992	-0.01106	-0.14182	-0.06881	-0.01907	-0.05094	0.14811	-0.06278	-0.08791	-0.09058	-0.07753	-0.18690	0.14757
AM 39	POSITIVO	-0.70879	-0.33914	-0.32990	0.32474	-0.16507	0.22540	1.15174	1.61845	0.00238	0.22314	0.63284	0.21024	-0.04494	0.07350	0.10613	0.15522	0.38199	0.45311	0.26019	0.12218	0.04982	0.00396	-0.03674
AM 40	POSITIVO	-0.46326	-0.14997	-0.21072	0.43125	-0.20268	-0.29932	0.11428	0.49228	-0.15572	-0.18913	0.23520	-0.34575	-0.49442	0.49744	-0.43408	-0.42137	-0.38624	-0.38455	-0.45339	-0.51117	-0.58847	-0.52380	-0.56046
AM 41	POSITIVO	-0.56802	-0.29981	-0.37404	0.43873	-0.48113	-0.55802	-0.29075	-0.02532	-0.46374	-0.09446	-0.23126	-0.55802	-0.55802	-0.55									

Amostra	Diagnostico	6.57	6.52	6.47	4.17	4.12	4.07	4.02	3.97	3.92	3.87	3.82	3.77	3.72	3.67	3.62	3.57	3.52	3.47	3.42	3.37	3.32	3.27	3.22
AM 1	NEGATIVO	2.32286	2.54142	2.85276	-0.54631	-0.54631	4.34375	-0.06482	1.14497	0.01964	0.14291	0.93006	0.76091	0.66965	1.49878	0.47781	0.55999	-0.13490	-0.23863	-0.54631	2.87733	1.08371	0.72045	0.40117
AM 2	NEGATIVO	0.65437	0.60887	0.57241	-0.60701	-0.01494	3.74887	0.46917	1.23069	1.49988	1.16479	2.02549	2.11994	1.72373	1.85443	1.67446	1.39988	0.63626	0.62255	0.48531	0.43981	1.04893	1.38793	1.00554
AM 3	NEGATIVO	0.39570	0.37341	0.42319	0.17443	0.52578	4.07372	1.35949	1.63799	0.89191	1.00937	3.58993	1.88146	1.36966	1.98998	0.99571	0.87996	0.59807	0.62689	0.50169	0.71094	1.96592	2.36068	1.20637
AM 4	NEGATIVO	-0.40282	-0.40282	-0.40282	1.32962	1.56805	5.28976	1.09977	1.87390	1.22267	1.58001	1.97504	2.21469	1.74212	1.98178	1.8834	1.46508	0.62292	0.37437	0.15596	0.46090	0.69853	0.95788	0.48041
AM 5	NEGATIVO	-0.52018	-0.51071	-0.50692	0.21488	0.50284	5.30347	1.01246	2.20220	0.96841	1.37241	2.00138	2.04686	1.81383	2.05443	1.23222	1.23790	0.52747	0.41948	0.18263	0.22066	1.22464	1.44440	0.96509
AM 6	NEGATIVO	-0.41763	-0.41763	-0.41763	0.11847	0.39722	5.37435	0.77631	1.49159	1.00241	1.41799	1.97741	2.05619	1.60456	1.94268	0.92470	0.72533	0.37901	0.42192	0.23427	0.04874	0.42369	1.12371	0.80374
AM 7	NEGATIVO	-0.55627	-0.54814	-0.51945	0.47760	0.47608	5.46619	1.26455	2.17089	0.96360	1.21393	1.76507	2.09472	1.53042	2.44438	1.24823	1.00126	0.58836	0.43833	0.18890	0.19231	0.42919	1.79114	0.81095
AM 8	NEGATIVO	1.19560	1.17209	1.51293	0.53743	0.63733	4.63334	1.07219	2.21810	0.87239	1.18972	1.50705	1.83026	1.55994	2.62946	1.35426	0.81950	0.18484	0.09669	-0.07372	2.16522	0.62598	4.77437	0.81363
AM 9	NEGATIVO	-0.60101	-0.60101	-0.60101	1.24910	1.25240	4.75180	1.67706	3.22431	1.32611	1.39724	2.08198	1.67706	1.50917	2.13795	1.34457	1.01537	0.54132	0.62691	0.22529	0.69934	1.70011	1.68365	0.63590
AM 10	NEGATIVO	-0.36841	-0.33577	-0.26477	0.53110	1.02555	4.37420	1.41422	2.59003	1.02401	1.27663	1.96541	1.98913	1.79602	2.33601	1.32553	1.67777	0.52101	0.47604	-0.05723	0.31365	1.60617	2.10333	0.90520
AM 11	NEGATIVO	-0.52490	-0.52490	-0.52490	-0.28102	-0.06038	5.43754	1.26330	2.14188	0.74837	1.07802	1.42131	1.61827	1.44237	1.70270	0.96957	0.93633	0.36462	0.06039	-0.15932	-0.04588	1.41675	0.80072	0.39844
AM 12	NEGATIVO	0.63125	0.73097	0.79053	-0.02213	0.04717	5.74102	0.77028	1.77686	0.71507	0.93771	1.52243	1.53571	1.36217	2.19121	0.92096	0.88783	0.08501	0.16325	-0.09254	-0.14257	0.59368	2.03131	0.86879
AM 13	NEGATIVO	-0.50233	-0.50233	-0.50233	0.47709	1.03694	5.10036	1.13243	1.53593	0.92173	1.18887	1.61547	1.70293	1.47559	1.67601	1.08175	1.24223	0.54802	0.41805	0.26675	0.30076	0.94267	2.49286	1.11035
AM 14	NEGATIVO	-0.32667	-0.33628	-0.16101	2.24903	2.36825	5.38382	1.96468	1.97855	1.06073	1.36768	1.87179	2.20365	1.30095	1.66716	0.90468	1.23227	0.62905	0.74688	0.51552	0.70218	1.27589	3.08791	0.94739
AM 15	NEGATIVO	-0.37363	-0.37363	-0.12309	-0.37363	-0.37363	3.02822	-0.37363	0.32865	-0.28664	-0.37363	-0.28624	-0.00376	0.00220	0.66686	-0.17106	6.53655	0.36711	0.19592	0.19026	0.31783	0.55113	1.13771	0.24935
AM 16	NEGATIVO	-0.51982	-0.51982	-0.51982	0.47102	0.67414	5.13790	1.41480	2.30904	1.09773	1.11259	1.94738	1.66004	1.42223	1.67242	0.97388	1.34896	0.40118	0.02665	0.02026	0.61560	3.13876	0.84398	
AM 17	NEGATIVO	-0.43469	-0.41202	-0.40911	0.46642	1.53082	4.78020	1.04691	1.63326	0.78960	1.31638	1.66675	1.60883	1.65560	2.19713	0.89988	0.54878	0.23623	0.12951	-0.09579	0.06315	0.86060	0.74736	0.49878
AM 18	NEGATIVO	-0.60427	-0.60427	-0.60427	0.30613	0.06870	4.71316	1.19428	2.35472	0.88988	1.10835	1.70764	1.59697	1.27465	2.25230	0.99607	1.36819	0.34896	0.40118	0.02665	0.02026	0.61560	3.13876	0.84398
AM 19	NEGATIVO	-0.57344	-0.57344	-0.57344	0.50657	0.57501	5.06330	1.13802	1.90266	1.01034	1.25253	1.77560	1.86932	1.70237	2.41474	1.34116	1.20066	0.75818	0.54575	0.21215	0.22149	2.4654	2.17071	1.06204
AM 20	NEGATIVO	-0.21089	-0.21593	-0.12135	1.14276	1.24835	4.63883	1.60561	2.91598	1.27951	1.44144	1.96656	2.06454	1.91492	1.68620	1.57128	0.66424	0.76797	0.38795	0.75696	1.44536	1.84925	0.99146	
AM 21	NEGATIVO	0.21984	0.19855	0.19026	-0.47443	0.04263	4.93304	0.67123	1.14764	0.37252	0.66505	1.82013	1.59921	1.10167	1.60836	0.86762	0.10330	0.34850	0.39501	0.35594	0.27526	1.13459	2.32642	0.96114
AM 22	NEGATIVO	-0.26703	-0.24232	-0.19852	0.53134	0.65709	5.48266	0.89961	0.86623	0.35439	0.67226	2.05550	0.90208	0.41672	1.27789	0.22232	-0.05662	-0.07248	0.09638	-0.03028	0.34009	0.92188	1.88577	0.82726
AM 23	NEGATIVO	0.19066	0.25448	0.33077	0.36612	0.23281	5.96689	0.81241	1.36780	0.55630	0.88999	1.53575	1.31089	0.88384	1.56899	0.58329	0.97705	0.18107	0.28437	0.11121	0.09251	0.37622	1.72260	0.72023
AM 24	NEGATIVO	-0.28952	-0.26265	-0.24038	0.81511	1.59858	4.88561	1.28272	1.54916	0.96003	1.19710	1.27276	1.45408	1.27214	1.85111	0.91687	0.86175	0.41349	0.72170	0.27915	0.38579	1.04161	2.15682	1.50201
AM 25	NEGATIVO	-0.08086	-0.04556	-0.00026	0.64942	1.33657	5.15057	1.04634	1.46776	0.74120	1.33637	1.85408	1.76348	1.55915	1.94096	1.10223	1.02892	0.41743	0.28683	-0.01713	0.20917	0.68962	0.95907	0.45567
AM 26	NEGATIVO	-0.67326	-0.67326	-0.67326	0.55474	0.46747	4.60053	1.31211	1.87312	1.26224	1.59261	3.12605	2.17856	1.91675	2.64919	1.61755	2.08817	0.92251	0.70746	0.16826	0.28358	1.59261	2.64919	1.02317
AM 27	NEGATIVO	-0.54509	-0.54028	-0.53539	0.02102	1.07633	5.34798	1.45249	2.00366	0.77346	1.26892	3.15825	2.05594	1.71063	2.24814	1.08579	0.99554	0.41767	0.34239	0.24091	0.20757	1.10088	1.37554	0.92201
AM 28	NEGATIVO	-0.52236	-0.52236	-0.52236	0.64739	0.88224	5.41553	1.24860	1.74905	0.89515	1.15941	1.70719	1.74225	1.54320	2.02999	1.09524	1.05070	0.51767	0.39068	0.26772	0.37628	0.80194	1.10448	0.63617
AM 29	NEGATIVO	-0.44670	-0.44670	-0.44670	-0.04455	0.94302	5.02538	0.94664	2.01895	0.76042	1.10845	1.63635	1.45567	1.44673	1.90011	0.95282	0.69213	0.21359	0.18967	-0.03480	-0.05440	0.84166	0.85454	0.34157
AM 30	NEGATIVO	-0.30032	-0.30386	-0.30684	-0.24770	0.24279	4.99425	0.93784	1.50972	0.37063	0.72082	1.40471	1.10296	0.83734	1.36129	0.67849	1.12628	0.05401	0.36037	-0.00506	0.16591	2.78545	1.40381	0.96784
AM 31	NEGATIVO	1.94673	2.11381	2.28860	-0.40743	-0.48718	4.17614	0.66852	1.50866	0.38967	0.63698	1.52585	1.49993	0.96979	2.18430	0.95674	1.40525	0.01586	0.24249	-0.29885	0.30081	0.38972	2.13945	0.92355
AM 32	NEGATIVO	1.17493	1.29848	1.41986	0.65873	1.05691	5.15007	1.10571	2.00205	0.70922	0.94896	1.57825	1.38993	1.24953	1.74213	0.72103	0.25838	0.29517	0.26259	1.15490	1.93849	3.01535	0.60526	
AM 33	POSITIVO	-0.40944	-0.47907	-0.45425	0.26415	0.52541	5.40912	1.02440	1.69470	1.11430	1.12701	1.52203	1.74015	1.45752	2.17990	1.10607	0.92501	0.60142	0.40391	0.20065	0.26104	0.73006	2.47250	0.02340
AM 34	POSITIVO	-0.32941	-0.26560	-0.18415	1.12809	1.33340	4.65602	1.01949	1.54459	1.20682	1.73595	2.08166	2.00997	1.89138	1.23837	1.17279	0.67927	0.27433	0.18872	-0.21465	-0.18608	0.54962	0.96733	0.63172
AM 35	POSITIVO	0.47441	0.50251	0.53559	0.18117	0.33771	3.90685	0.60125	1.11312	0.57811	0.92522	1.16782	1.33894	1.30552	2.04751	1.30533	1.11822	0.77172	0.37724	0.51221	0.53178	0.73567	1.49765	1.29208
AM 36	POSITIVO	1.21452	1.39706	1.58615	0.82513	0.70201	5.10012	1.30360	2.95815	1.13664	1.33703	1.78280	1.67429	1.37240	2.39078	1.26104	0.91033	0.58175	0.43811	0.16338	0.53943	0.48999	1.05961	1.03489
AM 37	POSITIVO	-0.04985	0.02651	0.07518	-0.61018	-0.45644	5.09996	0.44843	1.19544	0.44246	0.95782	1.71841	2.55022	1.69258	2.57560	1.34867	0.46716	0.09986	-0.09554	-0.40581	-0.26081	0.16790	1.02852	0.29757
AM 38	POSITIVO	0.13209	0.17452	0.15086	0.02445	0.39507	5.31539	0.43878	0.77570	0.31985	0.64075	2.13321	1.75987	1.20750	1.52586	0.69884	0.59030	1.30088	0.18017	0.35737	0.14829	0.83306	1.51801	0.60760
AM 39	POSITIVO	-0.09377	-0.12161	-0.13411	-0.24872	-0.25660	4.29183	0.66814	1.21361	0.32643	0.80710	1.30830	1.25073	0.88582	2.60064	1.18137	0.78006	0.28455	0.86704	0.31837	0.08395	0.92124	2.53820	1.42513
AM 40	POSITIVO	-0.58039	-0.58616	-0.56477	0.32737	0.44441	4.98213	1.11391	2.06768	1.20121	1.33845	2.04519	1.79295	1.64125	2.28844	1.33919	2.61104	0.38968	0.31428	-0.03153	0.01478	0.94660	1.71331	0.87864
AM 41	POSITIVO	-0.55802	-0.55802	-0.55802	0.82956	1.17188	4.78636	1.76132	2.39013	1.11421	1.31649	2.69217	1.90885	1.70000	2.20249	1.16730	1.14350	0.6						

Amostra	Diagnostico	3.17	3.12	3.07	3.02	2.97	2.92	2.87	2.82	2.77	2.72	2.67	2.62	2.57	2.52	2.47	2.42	2.37	2.32	2.27	2.22	2.17	2.12	2.07
AM 1	NEGATIVO	-0.11070	0.01043	7.91927	-0.03091	-0.49236	-0.54631	-0.44398	-0.39913	-0.27144	-0.03998	-0.44346	-0.47055	-0.37514	-0.22691	-0.15973	-0.26964	-0.02864	-0.13578	-0.02196	-0.03242	0.09614	0.27904	0.48726
AM 2	NEGATIVO	1.04731	0.56938	7.32473	2.03196	1.17333	1.11651	0.97076	0.92044	0.93025	1.26578	1.03258	0.57462	0.95668	0.75409	0.55978	0.32754	0.26699	0.05622	0.01174	-0.15348	-0.13327	-0.14803	0.08928
AM 3	NEGATIVO	0.77074	0.92841	7.44523	1.47462	0.66506	0.66357	0.44446	0.43038	0.37916	0.64734	0.32578	0.02566	0.32658	0.12347	-0.03903	-0.16259	-0.02228	-0.14856	0.07050	-0.20790	-0.12328	-0.04196	0.17880
AM 4	NEGATIVO	0.77554	0.64774	8.58893	-0.13558	-0.40282	-0.39332	-0.32437	-0.20791	-0.08073	0.27048	0.01642	-0.03997	0.13666	0.11758	0.09610	-0.10586	0.25393	0.00892	0.20980	0.07434	0.14790	0.25700	0.43260
AM 5	NEGATIVO	0.49905	0.76428	8.36118	0.46305	-0.13371	-0.09382	-0.09014	-0.02572	-0.02951	0.40622	0.09174	-0.19244	0.23003	0.21488	0.20162	0.05763	0.11826	0.07668	0.11447	0.13152	0.28118	0.18457	0.61083
AM 6	NEGATIVO	0.47033	0.27208	9.10893	0.30439	-0.26915	-0.19488	-0.08645	-0.14246	-0.06791	0.37308	-0.11957	-0.22580	0.00213	0.07402	0.14218	0.03231	0.14774	0.08669	0.17888	0.12187	0.18126	0.32144	0.83356
AM 7	NEGATIVO	0.64265	0.15746	8.02071	0.98522	0.06577	-0.01151	-0.08694	0.02030	0.08251	0.78453	0.59894	-0.13739	0.62673	0.41018	0.22186	0.04211	0.35357	0.08120	0.36780	0.07964	0.11807	0.19602	0.78363
AM 8	NEGATIVO	0.23185	0.10257	6.33752	-0.06197	-0.32054	-0.19125	-0.35579	-0.31466	-0.24414	0.49042	0.40815	-0.42044	0.42578	0.06144	-0.08785	0.17897	0.17897	-0.13249	0.45516	-0.12073	-0.06785	0.02618	0.31412
AM 9	NEGATIVO	0.70921	0.50511	7.20105	-0.09404	-0.32118	-0.18950	-0.19280	-0.07099	0.09361	0.75530	0.87052	0.05081	0.87052	0.44256	0.11994	0.15296	0.37343	0.03764	0.29442	-0.05453	0.13970	0.21870	0.75201
AM 10	NEGATIVO	0.62596	0.59009	7.47864	0.17676	-0.28575	-0.26459	-0.27370	-0.14073	-0.03761	0.80052	0.93308	-0.18473	1.18934	0.66631	0.12562	-0.03579	0.25186	0.05767	0.27694	0.16345	0.25943	0.09437	0.64467
AM 11	NEGATIVO	0.20001	0.35292	8.67906	1.10371	0.11661	-0.01892	-0.16042	-0.07826	-0.07586	0.51183	0.36579	-0.09692	0.50380	0.40869	0.23510	-0.00722	0.19079	0.14073	0.24505	0.26120	0.39172	0.19043	0.48439
AM 12	NEGATIVO	0.34511	-0.17938	8.75704	-0.10675	-0.50978	-0.34157	-0.37671	-0.36347	-0.28467	0.19569	-0.13577	-0.50978	0.05197	-0.01993	-0.13459	-0.14058	0.01324	-0.05821	0.22966	-0.07559	-0.01899	-0.01225	0.35781
AM 13	NEGATIVO	0.80116	0.94565	8.45436	-0.04288	-0.18346	-0.07851	-0.14721	-0.06365	0.03111	0.57153	0.53186	-0.01453	0.67513	0.40397	0.19822	0.03620	0.19550	0.04489	0.19944	0.11431	0.25553	0.24849	0.49741
AM 14	NEGATIVO	0.83955	0.81233	7.20985	-0.06546	-0.24215	-0.05140	-0.09357	-0.02471	-0.07880	0.28651	0.26480	-0.00976	0.17637	0.06871	0.00430	-0.12542	0.13010	0.03846	0.21694	-0.15745	0.08971	0.12512	0.33438
AM 15	NEGATIVO	0.37777	-0.33678	6.63081	0.59101	0.02105	0.40552	0.84432	-0.27386	-0.37363	-0.01210	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	0.69937	0.06381	-0.03924	0.34088	0.16782	0.36625	0.21804	0.69755	
AM 16	NEGATIVO	0.56615	0.75589	8.00640	0.40166	0.04991	0.20349	-0.02440	0.06477	0.03753	0.41339	0.35212	-0.09624	0.48093	0.34469	0.23322	0.11679	0.21340	0.07716	0.16386	0.10936	0.28028	0.30010	0.64937
AM 17	NEGATIVO	0.57893	0.73672	9.17445	-0.04255	-0.31894	-0.24448	-0.22466	-0.13038	0.17080	0.45621	-0.08262	-0.11675	0.33812	0.19081	0.02647	-0.00069	0.26164	0.26697	0.42042	0.03948	0.17803	0.27541	0.49919
AM 18	NEGATIVO	0.48312	0.25667	7.93653	0.58603	-0.05138	0.03897	-0.11491	-0.06988	-0.10860	0.64387	0.59598	-0.05444	0.62591	0.41561	0.30062	0.20828	0.79936	0.41634	0.96762	0.19331	0.40979	0.54584	0.78709
AM 19	NEGATIVO	0.52216	0.29377	8.01724	0.91531	0.21541	0.15617	0.08920	0.12056	0.10904	0.37039	0.10300	-0.05868	0.10519	0.08701	0.13093	0.01245	0.51899	0.29319	0.76712	0.32464	0.24625	0.32125	0.73214
AM 20	NEGATIVO	0.51910	0.65361	6.77266	0.18442	-0.25212	-0.18478	-0.23944	-0.36760	0.03853	0.48123	0.48963	-0.17526	0.52121	0.35668	0.15625	0.10028	0.42937	0.17379	0.50231	0.17080	0.31072	0.45325	0.98195
AM 21	NEGATIVO	0.63375	0.43559	8.85445	1.63860	0.40730	0.34730	0.25043	0.23856	0.27813	0.68898	0.34031	-0.03447	0.34789	0.24874	0.16224	-0.01632	0.02357	-0.07085	0.02607	-0.13904	-0.02316	0.01405	0.38652
AM 22	NEGATIVO	0.56153	0.33788	9.60426	1.13952	-0.27769	-0.14987	-0.23502	-0.15114	-0.07117	0.22116	-0.18430	-0.29569	-0.13996	-0.09261	-0.11304	-0.13731	0.06101	0.03147	0.44557	-0.06344	0.00927	0.11173	0.56615
AM 23	NEGATIVO	0.38371	0.18045	9.08390	0.00988	-0.27971	-0.13722	-0.19461	-0.09408	-0.07600	0.92252	1.15048	-0.19222	1.21647	0.62165	0.05389	0.02486	0.11025	0.01706	0.22986	-0.07183	0.05514	0.14280	0.45810
AM 24	NEGATIVO	0.56272	0.76249	8.76010	1.13089	-0.06762	-0.11718	-0.09560	-0.07862	0.17897	-0.16910	-0.24163	-0.00748	0.08384	0.34096	0.00073	0.00213	0.07786	0.37145	0.01145	0.28778	0.28895	0.61395	
AM 25	NEGATIVO	0.47744	0.44567	9.05949	0.19505	-0.24951	-0.21715	-0.23931	-0.10812	-0.05439	0.36155	0.14544	-0.15401	0.22839	0.10916	0.08249	-0.10302	0.19721	0.02680	0.16368	0.08602	0.25114	0.20564	0.66550
AM 26	NEGATIVO	0.60461	0.19320	6.53576	0.77603	-0.00627	-0.09666	-0.02809	-0.07173	0.72304	0.80408	-0.16523	0.90381	0.62642	0.38643	0.11840	0.25865	0.14333	0.44565	0.69188	0.34280	0.27735	0.97550	
AM 27	NEGATIVO	0.32140	0.17846	7.89002	1.50845	0.09961	0.00747	-0.12807	-0.15547	-0.16958	0.24443	-0.04107	-0.26005	-0.03666	-0.06389	-0.00565	-0.12756	0.12993	-0.01323	0.16367	0.00080	0.17424	0.14986	0.48274
AM 28	NEGATIVO	0.48966	0.60706	8.59482	0.48450	-0.00076	0.05084	-0.04143	0.06972	0.06003	0.66715	0.65136	-0.04759	0.72819	0.46220	0.14515	0.10304	0.33536	0.16626	0.38314	0.16497	0.23097	0.05149	
AM 29	NEGATIVO	0.14640	-0.01408	9.47742	0.49908	-0.11204	-0.15058	-0.23365	-0.16877	-0.07297	0.24037	-0.17887	-0.26207	-0.02686	-0.01996	-0.02687	-0.10391	0.03554	-0.05370	0.02602	0.06713	0.08825	0.05368	0.70955
AM 30	NEGATIVO	0.30148	0.30440	9.38046	-0.09808	-0.33897	-0.18563	-0.23762	-0.21445	-0.01380	0.20390	-0.30200	-0.20771	0.00993	0.03097	0.21111	-0.10945	0.33387	0.11443	0.32440	0.21081	0.38915	0.22924	0.43092
AM 31	NEGATIVO	0.13655	-0.19029	6.78970	0.33150	-0.37369	-0.26689	-0.46519	-0.42713	-0.51728	0.47389	0.73727	-0.55109	0.79612	0.41275	0.08870	-0.07098	0.32742	-0.05155	0.32251	-0.22892	0.03311	0.08638	0.31175
AM 32	NEGATIVO	0.22486	0.88599	7.62044	-0.09264	-0.37883	-0.37056	-0.36936	-0.26948	-0.38779	0.20592	-0.02236	-0.37742	0.11338	0.08286	-0.09405	-0.20094	0.01433	-0.04313	0.18640	0.09701	0.20572	0.08216	0.38076
AM 33	POSITIVO	0.07300	0.41366	0.55070	0.43672	-0.07910	0.01100	-0.14724	-0.11274	-0.12999	0.47434	0.20070	-0.21212	0.37222	0.24709	0.14400	-0.02205	0.17952	0.04650	0.13227	0.12520	0.22025	0.15790	0.49047
AM 34	POSITIVO	0.59115	0.75208	8.78205	0.66006	-0.08013	-0.00192	-0.16730	-0.18183	0.02354	0.78329	0.67148	-0.09940	0.81778	0.47302	0.10194	-0.06363	0.18440	0.07796	0.16444	0.05384	0.12959	0.24439	0.73696
AM 35	POSITIVO	0.87398	0.95407	7.56995	1.51253	0.66304	0.44110	0.31018	0.27794	0.24966	0.73004	0.63453	0.19415	0.53878	0.34247	0.22701	0.39325	0.96477	1.13988	2.33835	0.80884	0.40231	0.24791	0.48064
AM 36	POSITIVO	0.36285	0.12538	7.08232	0.60069	0.02145	0.08118	0.05420	0.06014	0.02004	0.42210	0.03989	-0.16451	0.04002	0.00982	0.06748	-0.04407	0.50004	0.15772	0.37394	0.19121	0.20399	0.18201	0.76052
AM 37	POSITIVO	0.05069	-0.18713	9.02599	0.41684	-0.32574	-0.39191	-0.44254	-0.31278	-0.39325	0.37372	0.10554	-0.42268	0.22419	0.13006	-0.06271	-0.11417	0.17809	0.01756	0.27133	0.09391	0.11048	0.07333	0.66402
AM 38	POSITIVO	0.36247	0.35081	9.53090	-0.12124	-0.35272	-0.04220	-0.30209	-0.28715	-0.36565	0.60232	0.83288	-0.32722	0.89389	0.45753	0.12262	-0.18644	-0.15002	-0.17424	-0.09647	-0.11778	0.05013	-0.07444	0.41109
AM 39	POSITIVO	0.67290	0.11129	7.82912	1.63915	0.62349	0.46651	0.37612	0.34975	0.28975	0.05240	1.20892	0.19061	0.01697	0.76572	0.66115	0.19928	0.51354	0.45372	0.07364	0.06064	0.15762	0.23976	0.58770
AM 40	POSITIVO	0.30578	0.04838	7.83038	0.25357	-0.23556	-0.05853	-0.17446	-0.17906	-0.08609	0.77933	0.93597	-0.18795	0.09767	0.63876	0.31243	0.06187	0.44126	0.16541	0.39139	0.11543	0.41982	0.38939	0.78955
AM 41	POSITIVO	0.62545	0.42500	7.68951	0.52588	0.26025	0.20981	0.09092	0.11106	-0.00244	0.40395	0.25110	0.00031	0.18245	0.14309	0.18245	0.08360	0.44056	0					

Amostra	Diagnostico	2.02	1.97	1.92	1.87	1.82	1.77	1.72	1.67	1.62	1.57	1.52	1.47	1.42	1.37	1.32	1.27	1.22	1.17	1.12	1.07	1.02	0.97	0.92
AM 1	NEGATIVO	0,11719	-0,00608	1,42870	-0,18779	-0,22199	-0,25741	-0,21872	-0,19002	-0,21708	-0,22817	-0,24405	-0,20762	-0,22290	-0,06355	-0,04591	0,42449	0,62919	-0,13490	-0,43161	-0,49274	-0,45442	-0,28602	-0,23258
AM 2	NEGATIVO	-0,06477	-0,24223	-0,09715	-0,35672	-0,35180	-0,24171	-0,32778	-0,26977	-0,31630	-0,31463	-0,24673	-0,15120	-0,23812	-0,16160	-0,14184	-0,03527	-0,01456	-0,12131	-0,15060	-0,30538	-0,42416	-0,39146	-0,31600
AM 3	NEGATIVO	0,06470	0,01584	-0,02336	-0,13834	-0,18843	-0,18961	-0,13397	-0,16336	-0,22501	-0,23775	-0,26086	-0,25932	-0,29318	-0,16140	-0,16243	0,02519	0,12671	-0,04144	-0,28481	-0,37826	-0,44551	-0,36639	-0,27494
AM 4	NEGATIVO	0,14636	0,02378	-0,07950	-0,15949	-0,10524	-0,11934	-0,21894	-0,12241	-0,25419	-0,27717	-0,14662	-0,20485	-0,23856	-0,03445	-0,09758	-0,03844	-0,14815	-0,28851	-0,35563	-0,36930	-0,40282	-0,31517	-0,28391
AM 5	NEGATIVO	0,26034	0,01027	0,12015	-0,08445	-0,04656	-0,00299	0,40433	-0,02572	-0,12045	-0,08256	0,00459	0,06000	-0,11950	0,01974	-0,00488	0,19972	0,14478	-0,17349	-0,23980	-0,29863	-0,39325	-0,22464	-0,16781
AM 6	NEGATIVO	0,31422	0,12814	0,10817	-0,05343	-0,01249	-0,00941	-0,06168	-0,05363	-0,05306	-0,00771	0,00721	0,03891	-0,03778	0,11429	0,14686	0,48214	0,27235	-0,01275	-0,20647	-0,25646	-0,28613	-0,12215	-0,01346
AM 7	NEGATIVO	0,40301	0,18962	0,17414	0,02411	0,02698	0,04318	-0,04666	-0,00147	-0,10577	-0,14851	-0,12245	-0,03666	-0,02298	0,06273	-0,03374	0,15938	0,17271	-0,04562	-0,11545	-0,21264	-0,32776	-0,23189	-0,11019
AM 8	NEGATIVO	0,02618	-0,00906	-0,10311	-0,25589	-0,25589	-0,29703	-0,31466	-0,33229	-0,42044	-0,29703	-0,27352	-0,31466	-0,23239	0,00267	-0,24414	-0,04434	0,10845	-0,10898	-0,43806	-0,44394	-0,52621	-0,43806	-0,26177
AM 9	NEGATIVO	0,46561	0,27138	0,01131	-0,12366	-0,09733	-0,03149	0,10348	-0,12366	-0,09404	-0,14342	-0,25205	-0,18621	-0,18292	0,25162	0,08069	0,18578	0,08702	-0,17304	-0,38702	-0,48249	-0,47920	-0,33106	-0,37366
AM 10	NEGATIVO	0,23140	0,07476	0,08117	-0,12084	-0,13563	-0,13709	0,17396	-0,12462	-0,22130	-0,25262	-0,20392	-0,11509	-0,12252	0,08120	-0,09127	0,01423	-0,05695	-0,23769	-0,33254	-0,43174	-0,47903	-0,37261	-0,25422
AM 11	NEGATIVO	0,20203	0,09879	0,10443	-0,02731	-0,01462	0,02832	0,01590	0,01803	-0,06513	-0,09404	-0,03667	-0,01021	-0,14349	0,07689	0,08871	0,48746	0,27259	-0,00997	-0,09026	-0,21028	-0,25984	-0,14436	-0,03622
AM 12	NEGATIVO	0,02895	-0,04065	-0,04818	-0,26208	-0,27905	-0,27563	-0,26906	-0,22653	-0,15190	-0,14796	-0,11226	-0,06012	-0,19030	0,10255	0,09745	0,19330	0,05171	-0,18156	-0,38359	-0,40395	-0,45556	-0,22305	-0,02635
AM 13	NEGATIVO	0,21117	0,04121	0,09039	-0,06510	-0,01447	0,04326	-0,00893	0,11611	-0,07274	-0,07957	0,01352	-0,18083	-0,10835	0,14156	0,12927	0,28951	0,35981	-0,04687	-0,26119	-0,36407	-0,38261	-0,19600	-0,17057
AM 14	NEGATIVO	0,04078	-0,03503	0,07196	-0,09393	-0,19606	-0,15389	-0,12680	-0,16831	-0,20621	-0,20816	-0,18846	-0,15407	-0,21368	-0,11617	-0,17738	-0,09585	-0,02755	-0,13645	-0,27916	-0,32472	-0,38682	-0,28379	-0,18984
AM 15	NEGATIVO	0,24743	0,28806	6,10286	0,38263	0,26441	0,24409	0,03889	0,21109	0,11061	0,00811	-0,10500	-0,10919	-0,09087	0,14862	0,24783	0,28190	0,12911	0,01337	-0,06755	0,00624	-0,21964	0,04900	0,18011
AM 16	NEGATIVO	0,19111	0,01771	0,06230	-0,08137	-0,06899	-0,09624	-0,10367	-0,05165	-0,14578	-0,14826	-0,05165	-0,04917	-0,15569	0,05734	-0,05165	0,05962	0,04000	-0,17303	-0,25477	-0,28945	-0,32661	-0,17551	-0,11368
AM 17	NEGATIVO	0,13895	0,14168	0,06792	-0,09758	-0,06685	-0,06504	-0,08916	-0,13026	-0,17718	-0,13200	-0,07752	-0,05511	-0,12479	0,05422	0,04123	0,48015	0,22457	-0,08974	-0,24731	-0,36246	-0,38453	-0,25179	-0,09274
AM 18	NEGATIVO	0,39563	0,27377	0,27440	-0,02186	-0,06628	-0,01082	-0,05864	-0,07997	-0,03114	-0,07217	-0,06630	-0,12692	0,03931	0,06332	0,27446	0,48655	-0,06521	-0,26330	-0,29825	-0,36056	-0,22537	-0,08532	-0,02635
AM 19	NEGATIVO	0,37111	0,23413	0,24677	0,07647	-0,00194	-0,03902	-0,03138	0,00043	-0,04072	-0,05922	-0,06056	-0,03402	-0,07217	0,07236	-0,00426	0,14531	0,16095	-0,06065	-0,20240	-0,27518	-0,33907	-0,19275	-0,01521
AM 20	NEGATIVO	0,48291	0,22173	0,32625	0,08125	-0,00307	-0,09411	-0,03217	-0,04726	-0,15362	-0,22694	-0,17414	-0,13608	-0,02127	-0,05493	-0,11799	0,12827	0,09095	-0,27134	-0,33402	-0,43215	-0,45099	-0,33561	-0,27731
AM 21	NEGATIVO	0,12280	-0,08787	0,04410	-0,15975	-0,23096	-0,18889	-0,11172	-0,19326	-0,24796	-0,21811	-0,14223	-0,06297	-0,23442	-0,09670	-0,12661	0,00772	0,10472	-0,15835	-0,33036	-0,37692	-0,45956	-0,33367	-0,20650
AM 22	NEGATIVO	0,20498	0,06311	0,09486	-0,10687	-0,11946	-0,11798	-0,14457	-0,12393	-0,17233	-0,16300	-0,19025	-0,18347	-0,15941	-0,06874	-0,12941	0,00288	-0,07476	-0,18379	-0,27751	-0,26227	-0,35581	-0,26576	-0,09918
AM 23	NEGATIVO	0,08614	0,00856	0,01364	-0,14358	-0,13193	-0,11400	-0,07475	-0,13722	-0,17416	-0,19430	-0,11695	-0,11223	-0,17930	-0,04384	-0,10238	0,05843	-0,05717	-0,24471	-0,28801	-0,28098	-0,31929	-0,23604	-0,19435
AM 24	NEGATIVO	0,16430	0,11294	0,12644	-0,11384	-0,15407	-0,12149	-0,10256	-0,15602	-0,19903	-0,19764	-0,03755	-0,02349	-0,15170	0,13103	-0,04729	0,11962	-0,00720	-0,20001	-0,24511	-0,29091	-0,38585	-0,23634	-0,14182
AM 25	NEGATIVO	0,22741	0,06190	0,08033	-0,02635	-0,03674	-0,06831	-0,08518	-0,03988	-0,15166	-0,16107	-0,13303	-0,05988	-0,18009	-0,06596	-0,04713	0,14230	0,22310	-0,07733	-0,25441	-0,33619	-0,39051	-0,26853	-0,13942
AM 26	NEGATIVO	0,63577	0,24930	0,24930	0,07476	0,09346	-0,01874	-0,04367	0,00619	-0,08108	-0,12783	0,05606	0,03736	-0,02609	0,14645	0,19008	0,13710	0,39267	-0,07173	-0,22756	-0,24626	-0,35847	-0,23691	-0,17044
AM 27	NEGATIVO	0,27695	0,13376	0,30293	0,00091	-0,07178	-0,01410	0,02729	-0,08129	-0,14101	-0,14928	-0,04092	0,05895	-0,11572	0,12006	0,01989	0,48580	0,67472	0,28369	-0,09346	-0,28708	-0,36480	-0,23327	-0,08264
AM 28	NEGATIVO	0,27845	0,16705	0,47238	-0,00761	-0,02142	-0,06333	-0,07043	-0,04088	-0,11726	-0,10669	-0,04680	-0,05588	-0,08498	0,02929	0,01466	0,27994	0,24577	-0,07108	-0,20825	-0,25523	-0,32217	-0,24202	-0,13067
AM 29	NEGATIVO	0,28756	0,22803	0,03806	-0,06743	-0,06770	-0,08122	-0,10325	-0,07805	-0,12220	-0,13817	-0,07903	-0,01955	-0,14405	-0,01453	0,12882	0,36659	0,24654	0,05337	-0,13002	-0,19697	-0,23911	-0,14059	-0,05089
AM 30	NEGATIVO	0,00680	-0,03176	-0,03698	-0,21637	-0,27690	-0,23255	-0,21603	-0,19641	-0,21781	-0,17627	-0,07974	-0,06627	-0,18830	0,07471	-0,01162	0,08557	-0,06724	-0,24566	-0,34215	-0,39019	-0,38797	-0,18769	-0,10170
AM 31	NEGATIVO	-0,05569	-0,11739	0,96702	-0,23465	-0,33932	-0,29614	-0,26713	-0,37472	-0,44932	-0,39106	-0,03464	0,15137	-0,30302	0,00539	0,02091	0,48018	0,18150	-0,16345	-0,35626	-0,30526	-0,58142	-0,46034	-0,25117
AM 32	NEGATIVO	-0,00331	-0,03674	0,41157	-0,25239	-0,26076	-0,26497	-0,28349	-0,24029	-0,33336	-0,37003	-0,33460	-0,30181	-0,34984	-0,10659	-0,18188	-0,02407	0,13462	-0,16495	-0,36090	-0,43088	-0,49341	-0,39327	-0,27501
AM 33	POSITIVO	0,12471	0,00714	0,05200	-0,06105	0,15903	0,31503	0,03614	0,17622	-0,02061	-0,04829	-0,04589	-0,02174	-0,09136	0,09009	0,12940	0,32640	0,13071	-0,06630	-0,22010	-0,20042	-0,32901	-0,21193	-0,11906
AM 34	POSITIVO	0,23166	0,08385	0,09448	-0,05643	-0,07911	-0,10732	-0,12535	-0,11766	-0,15850	-0,12820	-0,13847	-0,09920	-0,10997	0,01058	0,10479	0,33362	0,25014	-0,08939	-0,26141	-0,33981	-0,35248	-0,17964	-0,06478
AM 35	POSITIVO	0,14565	0,03708	-0,02063	-0,23575	-0,31684	-0,30526	-0,28041	-0,27797	-0,29076	-0,25155	-0,36012	-0,36317	-0,38966	-0,27013	-0,12033	0,18338	1,90471	0,33287	-0,12612	-0,22879	-0,27786	-0,19251	-0,11032
AM 36	POSITIVO	0,30440	0,09116	0,19693	-0,02313	-0,06371	-0,07872	-0,14417	-0,11927	-0,11318	-0,10362	-0,15641	-0,10222	-0,11556	-0,03696	-0,03427	0,02559	-0,00133	-0,17590	-0,33518	-0,41398	-0,47073	-0,32593	-0,19246
AM 37	POSITIVO	0,22378	0,09402	0,31527	-0,01620	-0,01867	-0,06745	-0,04820	-0,13485	-0,17560	-0,17766	-0,16984	-0,09688	-0,18497	0,06890	0,02311	0,14104	0,25260	0,01673	-0,19186	-0,35157	-0,41291	-0,27275	-0,10490
AM 38	POSITIVO	0,13518	-0,08482	-0,07298	-0																			

Amostra	Diagnostico	0.87	0.82	0.77	0.72	0.67	0.62	0.57	0.52	0.47	0.42	0.37	0.32	0.27	0.22	0.17	0.12	0.07	
AM 1	NEGATIVO	-0.35812	-0.54354	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631	-0.54631
AM 2	NEGATIVO	-0.35834	-0.52726	-0.59885	-0.63640	-0.66742	-0.68985	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.69175	-0.68806	-0.68672	-0.67898	-0.68310	-0.68187	-0.68175	-0.69175
AM 3	NEGATIVO	-0.34866	-0.49267	-0.54245	-0.56778	-0.59619	-0.61124	-0.61057	-0.61293	-0.63277	-0.64032	-0.64869	-0.66344	-0.69698	-0.71389	-0.72894	-0.74697	-0.76259	-0.76259
AM 4	NEGATIVO	-0.39884	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282	-0.40282
AM 5	NEGATIVO	-0.24927	-0.44251	-0.44630	-0.48608	-0.51640	-0.53155	-0.51450	-0.52208	-0.51261	-0.54481	-0.53155	-0.52776	-0.52966	-0.54292	-0.54102	-0.52966	-0.54481	-0.54481
AM 6	NEGATIVO	-0.07778	-0.37421	-0.40888	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763	-0.41763
AM 7	NEGATIVO	-0.18885	-0.40457	-0.46296	-0.47008	-0.50373	-0.51431	-0.53660	-0.54892	-0.54742	-0.56529	-0.54896	-0.57013	-0.57755	-0.58143	-0.59619	-0.60169	-0.60193	-0.60193
AM 8	NEGATIVO	-0.40281	-0.57910	-0.59673	-0.66725	-0.62611	-0.59673	-0.66725	-0.60261	-0.66725	-0.66725	-0.64962	-0.59085	-0.61436	-0.57910	-0.66725	-0.66725	-0.59673	-0.59673
AM 9	NEGATIVO	-0.51212	-0.60101	-0.59442	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.59442	-0.60101	-0.60101	-0.60101	-0.59113	-0.60101	-0.60101
AM 10	NEGATIVO	-0.43707	-0.63686	-0.67259	-0.67455	-0.72401	-0.74265	-0.72808	-0.74265	-0.72219	-0.74111	-0.74265	-0.74265	-0.74265	-0.74265	-0.73270	-0.74265	-0.74265	-0.74265
AM 11	NEGATIVO	-0.13369	-0.33254	-0.37860	-0.41909	-0.44512	-0.46183	-0.47248	-0.48708	-0.49496	-0.49412	-0.49373	-0.50454	-0.51236	-0.51345	-0.51905	-0.52490	-0.52490	-0.52490
AM 12	NEGATIVO	-0.22357	-0.50448	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978	-0.50978
AM 13	NEGATIVO	-0.32354	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50233	-0.50074
AM 14	NEGATIVO	-0.32810	-0.46049	-0.47614	-0.47597	-0.50426	-0.54465	-0.49963	-0.50408	-0.54768	-0.53611	-0.53914	-0.50924	-0.54910	-0.54910	-0.54857	-0.54910	-0.54910	-0.54910
AM 15	NEGATIVO	0.00766	-0.30924	-0.30307	-0.37292	-0.37363	-0.35311	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37246	-0.35018	-0.35290	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.37363	-0.36084
AM 16	NEGATIVO	-0.28698	-0.46037	-0.49505	-0.49753	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51735	-0.51487	-0.50248	-0.49753	-0.51982	-0.51239	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.51982	-0.50496
AM 17	NEGATIVO	-0.33984	-0.51465	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53183	-0.53094
AM 18	NEGATIVO	-0.29431	-0.51030	-0.52601	-0.56015	-0.57685	-0.59056	-0.59056	-0.59617	-0.60427	-0.59786	-0.59538	-0.59711	-0.60139	-0.60427	-0.60054	-0.60427	-0.60427	-0.60427
AM 19	NEGATIVO	-0.19423	-0.43165	-0.47533	-0.48802	-0.50017	-0.52095	-0.52560	-0.54342	-0.53980	-0.54936	-0.55155	-0.55351	-0.57031	-0.57344	-0.57344	-0.56410	-0.57344	-0.57344
AM 20	NEGATIVO	-0.42954	-0.64016	-0.64520	-0.66945	-0.68755	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355	-0.72355
AM 21	NEGATIVO	-0.24661	-0.47259	-0.51699	-0.52442	-0.54258	-0.54969	-0.54969	-0.54550	-0.55366	-0.54704	-0.54044	-0.54770	-0.56556	-0.57557	-0.57957	-0.59614	-0.60854	-0.60854
AM 22	NEGATIVO	-0.20215	-0.40261	-0.43966	-0.45664	-0.47892	-0.48860	-0.48860	-0.49546	-0.50990	-0.50566	-0.50127	-0.49782	-0.50616	-0.50990	-0.50990	-0.50522	-0.50896	-0.50896
AM 23	NEGATIVO	-0.30177	-0.43078	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336	-0.43336
AM 24	NEGATIVO	-0.33671	-0.52590	-0.53077	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56404	-0.56251	-0.56404	-0.56293	-0.56293
AM 25	NEGATIVO	-0.31050	-0.51974	-0.51366	-0.55366	-0.57759	-0.59642	-0.59975	-0.61485	-0.60505	-0.60975	-0.61622	-0.61936	-0.63564	-0.62270	-0.63740	-0.64034	-0.64034	-0.64034
AM 26	NEGATIVO	-0.07796	-0.49872	-0.51119	-0.57352	-0.55482	-0.58959	-0.64521	-0.63274	-0.65144	-0.66391	-0.62650	-0.67326	-0.67326	-0.66079	-0.67326	-0.67326	-0.66767	-0.66767
AM 27	NEGATIVO	-0.20393	-0.43436	-0.50410	-0.52333	-0.54323	-0.56316	-0.56860	-0.57566	-0.57875	-0.58287	-0.58389	-0.57904	-0.58786	-0.58932	-0.58932	-0.58750	-0.58925	-0.58925
AM 28	NEGATIVO	-0.24783	-0.41628	-0.44037	-0.45904	-0.47409	-0.49773	-0.48874	-0.50776	-0.50448	-0.51238	-0.49697	-0.50235	-0.51317	-0.51188	-0.51069	-0.52236	-0.52236	-0.52236
AM 29	NEGATIVO	-0.12086	-0.31722	-0.35544	-0.38022	-0.40695	-0.41995	-0.42732	-0.43856	-0.43791	-0.44006	-0.43632	-0.44353	-0.44138	-0.44670	-0.44670	-0.44606	-0.44520	-0.44520
AM 30	NEGATIVO	-0.34239	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48700	-0.48421
AM 31	NEGATIVO	-0.41672	-0.64991	-0.68983	-0.70090	-0.73037	-0.76429	-0.74818	-0.75732	-0.75756	-0.75068	-0.76473	-0.76576	-0.76576	-0.76576	-0.76423	-0.76576	-0.75947	-0.75947
AM 32	NEGATIVO	-0.40569	-0.57632	-0.59649	-0.63728	-0.65534	-0.66202	-0.65999	-0.65999	-0.67702	-0.66358	-0.67272	-0.66462	-0.66244	-0.67702	-0.66762	-0.67672	-0.67702	-0.67702
AM 33	POSITIVO	-0.19256	-0.42075	-0.46063	-0.46032	-0.40000	-0.49601	-0.51051	-0.52244	-0.51000	-0.51369	-0.52232	-0.52719	-0.51157	-0.52101	-0.52532	-0.53307	-0.53702	-0.53702
AM 34	POSITIVO	-0.20558	-0.44263	-0.49073	-0.51033	-0.52316	-0.58848	-0.58843	-0.60114	-0.60902	-0.61498	-0.61782	-0.62617	-0.63618	-0.63720	-0.62934	-0.64819	-0.65097	-0.65097
AM 35	POSITIVO	-0.21580	-0.40177	-0.45971	-0.49435	-0.52619	-0.56066	-0.59455	-0.62317	-0.63939	-0.66048	-0.66969	-0.69996	-0.72310	-0.75215	-0.76269	-0.78485	-0.79547	-0.79547
AM 36	POSITIVO	-0.29926	-0.55670	-0.58477	-0.61412	-0.63872	-0.62819	-0.67933	-0.66399	-0.65808	-0.68944	-0.68171	-0.68280	-0.67367	-0.69139	-0.69492	-0.68864	-0.69492	-0.69492
AM 37	POSITIVO	-0.22068	-0.47846	-0.52940	-0.54134	-0.56953	-0.59804	-0.58466	-0.60792	-0.61018	-0.60899	-0.60390	-0.58456	-0.60174	-0.61018	-0.58836	-0.61018	-0.61018	-0.61018
AM 38	POSITIVO	-0.30810	-0.47346	-0.46454	-0.51225	-0.50715	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.51225	-0.50897
AM 39	POSITIVO	-0.18882	-0.41896	-0.50154	-0.52046	-0.57706	-0.61579	-0.64259	-0.66140	-0.68873	-0.69385	-0.69661	-0.69704	-0.70879	-0.70045	-0.70869	-0.70743	-0.70879	-0.70879
AM 40	POSITIVO	-0.26386	-0.51593	-0.54483	-0.55832	-0.57813	-0.59883	-0.60329	-0.61226	-0.61316	-0.60487	-0.59006	-0.61353	-0.61353	-0.61353	-0.61237	-0.61344	-0.61197	-0.61197
AM 41	POSITIVO	-0.27702	-0.45917	-0.48754	-0.48571	-0.52781	-0.51134	-0.52232	-0.52507	-0.55344	-0.53330	-0.56802	-0.56802	-0.54520	-0.55161	-0.55710	-0.54612	-0.56802	-0.56802
AM 42	POSITIVO	-0.25902	-0.37908	-0.41326	-0.44049	-0.46689	-0.48051	-0.48387	-0.49897	-0.51259	-0.51314	-0.50691	-0.52626	-0.52654	-0.53271	-0.54048	-0.55520	-0.55459	-0.55459
AM 43	POSITIVO	-0.26863	-0.49236	-0.52213	-0.52749	-0.54786	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57669	-0.57529
AM 44	POSITIVO	-0.13953	-0.33015	-0.36579	-0.38795	-0.41138	-0.42712	-0.43308	-0.45104	-0.45590	-0.45229	-0.45350	-0.46033	-0.46650	-0.47081	-0.47106	-0.47782	-0.47968	-0.47968
AM 45	POSITIVO	-0.30716	-0.58915	-0.60806	-0.60788	-0.62646	-0.64440	-0.64040	-0.64960	-0.64960	-0.64960	-0.63612	-0.64461	-0.64960	-0.64960	-0.64960	-0.64960	-0.64899	-0.64899
AM 46	POSITIVO	-0.27782	-0.50485	-0.54592	-0.54670	-0.57197	-0.59712	-0.59959	-0.61232	-0.61445	-0.60286	-0.60271	-0.61597	-0.62433	-0.62865	-0.62790	-0.63090	-0.63565	-0.63565
AM 47	POSITIVO	-0.42141	-0.56073	-0.55798	-0.56073	-0.56073	-0.56073	-0.56073	-0.56073	-0.56073	-0.56073	-0.56816	-0.56829	-0.55392	-0.56073	-0.55932	-0.56073	-0.56002	-0.56002
AM 48	POSITIVO	-0.19414	-0.35994	-0.41508	-0.44363	-0.46737	-0.48395	-0.49091	-0.50691	-0.52629	-0.54115	-0.53918	-0.57313	-0.58667	-0.60864	-0.61296	-0.60914	-0.62709	-0.62709
AM 49	POSITIVO	-0.58968	-0.63223	-0.63223	-0.62754	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.63223	-0.61972	-0.62910	-0.63223	-0.63223	-0.63223
AM 50	POSITIVO	-0.54777	-0.66678	-0.70376	-0.70298	-0.73137	-0.75793	-0.74986	-0.76965	-0.77902	-0.76965	-0.75871	-0.77512	-0.77225	-0.77121	-0.77746	-0.78423	-0.78085	-0.78085
AM 51	POSITIVO	-0.20907	-0.50838	-0.55266	-0.58571	-0.62818	-0.66011	-0.66693	-0.69610	-0.71120	-0.69903	-0.68626	-0.71069	-0.71310	-0.71051	-0.72544	-0.72147	-0.73140	-0.73140
AM 52	POSITIVO	-0.28358																	

Apêndice III

***Coeficientes das Componentes Principais – Modelo
Metabonômico para Investigação de Infecção pelo Vírus da
Hepatite C.***

Amostra	Diagnóstico	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18	PC19	PC20	PC21	PC22	PC23	PC24
AM 1	NEGATIVO	-0.9361	-12.71528	0.95457	3.85201	5.09189	-2.72621	-3.82927	0.31919	-1.95603	-1.76933	1.46990	1.65736	0.76300	1.22877	-1.64657	-0.73569	1.12368	-2.35961	0.28092	-0.15336	-1.61049	-0.20688	-0.70811	-0.08393
AM 2	NEGATIVO	12.23992	-1.91861	-13.55990	-1.86125	1.62950	0.10554	4.23963	3.55539	2.11600	-0.17782	-1.63167	2.58719	-1.51021	-2.82675	0.79507	-1.53236	-0.21590	-1.20218	-2.54615	-0.19062	0.10377	1.72382	0.17484	-0.67475
AM 3	NEGATIVO	11.21821	-2.71222	-6.76006	-0.90009	1.52994	2.23709	0.74840	2.07072	4.52856	2.26217	2.57152	2.87607	2.43072	3.33420	0.95037	1.34148	-1.52564	0.40589	1.99928	-1.06065	-0.57574	-0.63322	-0.63883	-0.33211
AM 4	NEGATIVO	-9.40913	-0.45371	-1.40059	-5.89086	-0.20343	-2.09607	-2.71402	-0.81177	-0.47508	1.35974	-1.02434	1.86600	0.45149	-0.73286	0.99468	0.71846	0.41026	-0.01605	0.11490	1.09827	0.09893	1.24852	0.18646	0.18349
AM 5	NEGATIVO	-2.78161	2.68659	1.23030	-0.46207	0.83156	-1.13552	0.79518	1.34347	-0.15502	1.56461	1.33108	-0.12235	0.36608	-0.54502	-1.75871	0.81862	-0.53825	-0.59638	-1.57674	-0.18685	0.39427	0.84259	1.75541	-0.81419
AM 6	NEGATIVO	-10.08910	2.33218	-1.32890	1.44038	0.74362	-2.80740	0.12068	-1.23136	-0.72249	1.48153	1.27104	0.57303	-0.69066	0.47571	0.30303	0.11025	-0.70632	-0.16157	0.93646	-0.91048	0.80387	-1.32189	0.08352	
AM 7	NEGATIVO	-0.71568	3.97208	1.29717	0.49682	0.84838	2.04891	1.71434	-1.12415	-0.20282	-0.41986	-0.03358	-0.28510	1.18120	-1.44589	1.28970	0.41016	-0.28790	-0.35360	-0.45761	-0.53315	0.23970	-0.48501	0.73190	-0.05911
AM 8	NEGATIVO	7.33787	-6.78054	0.91754	-2.09979	2.12836	-1.32024	-2.37784	-1.34019	-1.98579	-1.86459	-2.44066	1.43980	1.73135	2.39163	-0.83591	1.13795	1.66106	-2.81664	-2.26658	-0.20359	-0.51395	-0.36198	-1.49112	
AM 9	NEGATIVO	2.98610	3.73958	4.19154	-3.90640	1.04819	0.46982	-1.76989	3.60726	-2.49643	-0.89852	-0.54321	0.70112	-1.97089	1.72104	0.33662	1.22805	0.36940	-1.50709	-0.66601	0.24377	-0.72956	0.37197	0.43930	0.19096
AM 10	NEGATIVO	7.62020	0.58389	7.17148	-3.18897	1.16653	1.79910	2.19003	1.83824	1.00589	-1.80010	-1.96981	-1.35438	-2.05080	-0.86160	-1.09804	1.21130	0.11168	-0.98199	0.46737	-0.48907	-0.23051	-1.34063	0.87362	-0.64376
AM 11	NEGATIVO	-4.77485	2.71462	1.13921	1.81433	0.36637	1.38992	1.28557	2.89434	-2.82214	-1.59240	4.04357	0.45567	-0.77820	-0.76389	-2.33498	-1.17161	-0.63971	1.07456	-0.30463	-1.43320	1.01209	-0.59265	0.36969	0.65653
AM 12	NEGATIVO	-3.29274	-6.94871	0.64563	-0.00377	1.57441	-3.10323	-0.48149	-0.34724	-1.10106	0.91787	1.95743	-1.97479	-0.92900	0.05119	0.80997	-0.88951	-0.90841	1.17743	0.25439	0.36954	-0.50940	0.15735	-0.01130	-0.63966
AM 13	NEGATIVO	-3.74075	3.10834	-1.11260	-0.36782	0.72093	-2.34904	-0.17094	0.55524	-0.26945	1.48677	-1.72776	0.25973	-0.48544	0.84433	-1.40402	2.11036	0.19028	0.12444	0.12214	-0.10049	0.63646	0.21557	-0.19377	-0.70385
AM 14	NEGATIVO	-1.79605	0.99055	-0.69094	4.67915	1.87320	0.41269	-2.60765	-2.04262	2.11077	2.77194	-1.51959	0.02732	-0.31706	0.07450	0.16603	0.98887	-1.12649	2.10435	-0.11217	-0.81194	0.93545	-0.09412	0.39915	0.38945
AM 15	NEGATIVO	-15.87921	0.41086	-1.86174	12.94133	1.49991	2.96765	-6.44362	6.95966	4.16371	-0.83449	-3.16631	-1.45338	0.10670	-1.07859	0.69752	0.30337	1.11936	2.00475	0.31654	1.08911	-0.66628	-0.05398	-0.05668	-0.14418
AM 16	NEGATIVO	-2.50817	3.04049	-1.64102	-1.43962	0.51241	-0.02689	1.52248	-0.57740	1.57536	-0.22839	-1.18262	-0.47252	0.61648	-0.61107	0.34758	0.06065	-0.27174	-0.53999	-1.27366	0.27235	-0.01295	-0.43264	0.71015	
AM 17	NEGATIVO	-2.83831	-0.31034	3.12476	-0.34125	-0.94420	-0.34036	-0.20673	-0.14581	-0.79871	0.87740	0.85116	1.63613	-1.27319	-0.88809	-1.21879	-0.68606	-0.00256	1.10220	-0.03334	1.71902	0.48043	-0.29375	-1.03093	-2.03639
AM 18	NEGATIVO	2.84198	3.07969	1.26855	3.05344	-2.78527	0.96142	0.01051	-0.12017	-3.11973	1.05634	-0.95288	-1.54776	-0.43669	1.28721	0.88836	0.91689	1.47333	-0.70737	-1.10628	-0.40362	0.55953	-0.79921	-1.45983	-0.52814
AM 19	NEGATIVO	0.10993	4.83101	-0.34902	1.94011	-1.34305	0.47829	-1.08061	-0.50162	-0.10774	1.75141	1.19142	-0.82544	0.93818	-0.13690	1.33469	-0.64410	0.03923	-0.99305	-0.45968	-0.03012	-0.13792	-0.29980	0.35033	-1.16071
AM 20	NEGATIVO	8.65582	3.47422	-6.25115	-1.77019	0.81887	0.94031	-1.80448	-0.38687	-0.38607	-0.42833	-1.32650	0.38038	-1.51847	-0.36431	1.78545	-0.84244	-1.64993	-0.15476	0.57083	-0.69113	0.02000	0.44499	-0.29182	
AM 21	NEGATIVO	3.43810	-4.60488	-6.39930	0.76933	-0.21865	0.17711	1.99869	2.26942	0.73522	2.34942	0.83004	0.34200	-0.17207	0.59635	0.07050	0.19542	-1.24427	-0.85767	-0.45768	0.01373	-0.70721	-1.21220	0.75761	-0.75989
AM 22	NEGATIVO	-8.75514	-5.04906	4.26805	0.36094	0.24421	3.47472	0.78420	-2.21642	3.13775	3.25238	-0.77122	0.61434	-0.99717	0.63048	0.86614	-1.17739	1.71346	-0.41936	0.03940	0.51115	-0.39319	-0.83438	1.17333	1.33766
AM 23	NEGATIVO	-7.99051	-2.31081	-3.00164	-1.89802	1.14373	-0.63094	0.61228	0.23419	-2.74069	-0.28006	-2.82874	0.28492	0.36675	0.94595	0.05270	-0.29875	0.46572	-0.25002	1.05959	-0.21792	0.60270	-0.41163	0.90263	1.00808
AM 24	NEGATIVO	-1.14157	-0.42426	0.97749	-0.42857	0.13536	-0.65144	-0.59018	-2.37007	1.91362	4.11794	-1.53604	-1.02167	-0.12991	-0.35591	1.98443	-0.21420	-0.58554	-0.15042	-0.05468	-0.15042	0.23494	-0.98835	-0.99175	
AM 25	NEGATIVO	-0.41322	-1.80294	3.87209	0.05160	1.67041	0.27679	1.32056	-1.54195	1.89735	0.70449	-0.70463	1.45569	0.03359	-2.16057	-0.30151	0.73386	0.37338	-0.73861	0.27209	0.19331	0.24797	-0.51324	-0.29173	0.01161
AM 26	NEGATIVO	4.56848	7.44744	1.98765	1.56349	-0.28483	-0.27439	2.11884	-0.59126	0.00286	-0.23663	-0.69471	-2.33423	2.75616	1.03920	2.19222	-0.13989	0.79751	-1.29619	0.16950	-0.09911	-2.29635	2.09359	1.45908	1.03978
AM 27	NEGATIVO	-1.62046	1.85227	3.04553	1.90871	1.51501	0.23355	2.33344	-0.49705	1.95261	0.29457	4.63356	-0.45667	1.36888	0.47712	0.07483	1.08271	0.61848	1.00010	-3.36175	0.77696	0.61011	0.85732	-0.10849	0.32796
AM 28	NEGATIVO	-3.10649	3.41446	-1.09210	0.15226	-0.36799	0.06899	-0.00624	0.05705	-1.44572	0.32897	-0.75750	1.01887	-0.48867	-0.43935	-0.24538	-0.11302	0.46375	-0.33113	0.03199	0.19591	0.26136	0.54866	0.11930	-0.09403
AM 29	NEGATIVO	-9.98529	0.22406	2.16891	0.77042	1.33610	1.10361	0.13209	0.52150	-0.92213	-0.68849	3.86956	0.97726	-0.29949	-1.30222	-0.14713	-0.71997	-1.30572	0.75294	0.44860	-1.05934	-0.08923	1.29381	-0.28940	-0.42050
AM 30	NEGATIVO	-4.95705	-4.67761	0.80435	-0.60805	-1.85275	0.18810	0.82507	0.98905	0.05357	0.93015	2.20236	-1.95640	-3.71451	2.21462	-2.20668	-1.25255	-0.84841	-0.88122	0.50164	0.54835	-0.99503	0.39946	0.96665	-1.23643
AM 31	NEGATIVO	14.87087	-12.68192	-0.24689	4.48143	2.21664	-3.48567	2.46626	0.41623	-1.64737	-0.68837	-1.50196	-2.71009	0.71674	0.03984	-1.37978	1.24346	-2.26898	2.06217	0.76436	1.65129	1.73696	1.46631	0.13973	0.66597
AM 32	NEGATIVO	6.20916	-7.75090	1.60718	-2.20451	4.22379	-0.19136	-2.69798	-1.85625	1.36661	-0.19824	-0.32363	-0.20892	0.31550	0.42252	-0.94201	-0.02072	0.80214	1.13515	0.22885	-1.72850	0.12159	-0.84721	0.21055	0.95149
AM 33	POSITIVO	-4.34722	2.96205	0.91200	0.69932	1.77175	-1.00050	1.09340	0.64246	0.76052	1.05347	-0.46135	0.40703	0.50193	-0.76003	-0.30010	1.76062	-0.19755	0.57790	-0.00142	-0.01091	1.42140	-0.00050	0.61102	-0.54900
AM 34	POSITIVO	0.31177	0.90503	3.19663	-0.03458	0.62095	0.46406	3.54864	-1.62572	0.91618	-0.63244	-0.52008	1.12462	0.22666	-3.20122	-1.03378	-0.82320	1.20066	0.67543	0.52164	0.49805	-0.82036	0.18546	-1.62189	0.18142
AM 35	POSITIVO	15.04336	0.56798	-11.11616	5.80110	-2.91648	3.30223	-2.35266	-4.90166	-1.71748	-1.69231	2.27209	1.32995	-2.46594	-0.99145	-0.43246	0.62396	2.20127	1.79195	0.35080	0.26320	-0.02200	0.25681	1.82738	-0.08140
AM 36	POSITIVO	10.25470	-0.90348	-1.35562	1.35304	3.70131	-1.95549	-3.52414	1.02052	-2.51835	0.41043	1.13610	0.29990	-2.14209	-1.52468	1.48730	-1.87346	-0.20079	-1.19252	0.44514	-0.44744	0.04560	-0.09404	0.98414	0.91848
AM 37	POSITIVO	-3.03620	-5																						

Amostra	PC25	PC26	PC27	PC28	PC29	PC30	PC31	PC32	PC33	PC34	PC35	PC36	PC37	PC38	PC39	PC40	PC41	PC42	PC43	PC44	PC45	PC46	PC47	PC48	PC49
AM 1	0.61816	-0.51566	-1.17837	-0.28125	-1.03747	0.33251	-0.35037	0.10858	-0.69767	0.44092	-0.55792	-0.24877	-0.54711	-0.35206	-0.31402	0.23575	-0.15292	0.14057	0.20492	0.04778	0.20287	0.20842	0.36582	0.10012	0.36420
AM 2	0.15104	0.32345	-0.55932	-0.37909	0.46661	1.06736	-0.52899	-0.26945	0.33933	0.06688	0.43267	0.58118	-0.53090	0.36635	0.30642	-0.03309	0.01884	0.21573	0.17323	-0.15111	-0.00585	0.04061	0.01697	0.00455	0.18028
AM 3	0.05076	0.41613	-0.05504	-0.01375	-0.24429	0.76899	-0.29521	1.13705	0.09173	-0.54612	-0.53122	0.61550	0.55271	0.16676	-0.03516	-0.24214	0.16163	0.26712	-0.08533	-0.23463	-0.27404	-0.02960	0.01289	-0.08956	-0.44714
AM 4	0.79735	0.85677	-0.31011	0.60706	-0.28951	-0.91666	-0.07415	-0.78679	-1.13629	-0.10784	-0.84231	-0.36209	-0.47735	0.57703	0.39633	0.19391	0.06375	-0.13128	-0.32747	-0.46359	-0.22597	-0.23486	0.26407	0.05956	-0.16178
AM 5	-0.20513	0.46309	-0.31870	0.23755	0.73357	-0.38633	1.05020	0.54535	-0.32237	-0.12627	-1.18413	0.36286	0.37816	0.05667	1.12588	-0.61041	0.06646	-0.14558	-0.39586	-0.46743	0.14726	0.29286	0.15305	-0.15883	0.75095
AM 6	0.94981	-0.38492	0.08613	-0.04944	0.65397	0.76716	0.92291	0.55796	-0.24421	-0.31626	0.44382	0.23381	0.20630	0.14636	0.23133	0.08622	0.28593	0.46964	-0.01810	-0.26773	0.33510	0.14816	0.48811	-0.61523	-0.44219
AM 7	0.68671	-0.38981	-0.18478	-0.41560	-0.18072	-0.35756	-0.49357	0.08219	0.34152	-0.30150	0.14759	0.13733	0.32095	0.00049	-0.66838	0.38624	0.78452	-0.18870	0.22696	-0.33556	-0.22281	0.15891	0.38074	-0.13788	-0.13692
AM 8	0.00663	-0.25334	1.09069	1.13411	0.49170	0.48710	-0.36621	0.36646	-0.61101	-0.28597	0.01891	-0.01903	0.16769	0.34478	-0.01197	-0.12463	-0.22104	-0.17558	0.44300	0.42758	-0.10609	-0.18016	-0.38614	0.19626	0.04320
AM 9	-1.49511	-0.91776	0.07823	-0.10586	1.61421	-0.20863	-0.49160	0.91749	-0.86180	0.53949	-0.19664	0.42278	-0.19378	0.27434	-0.19985	0.36687	0.23138	-0.40054	0.14972	0.03956	-0.57203	-0.54799	0.19372	-0.26490	-0.34661
AM 10	-0.04142	0.86474	-0.71885	-0.04415	0.55939	-0.44823	0.48277	0.63319	0.70063	-0.27540	-0.24055	0.54491	0.01976	-0.33571	0.27784	0.01017	0.29765	0.03263	0.40205	0.54168	0.42318	-0.09400	-0.04386	0.15448	-0.30081
AM 11	0.14574	-0.64874	0.33006	0.87283	0.10336	0.67812	-0.48752	-0.23319	0.30621	-0.11640	-0.45418	-0.24403	-0.21589	-0.61530	-0.01143	0.00203	-0.09034	-0.28997	0.09229	-0.68818	-0.38627	-0.11188	0.03347	0.20105	-0.24528
AM 12	0.31844	0.58152	1.63669	-0.96208	0.85557	-0.66485	0.08442	-0.32372	0.14487	0.42446	0.01678	0.58945	0.09409	-0.10662	-0.00928	0.78549	-0.22697	0.64654	-0.01189	-0.12498	-0.40663	0.27158	0.35759	0.13606	0.34801
AM 13	0.17621	-1.05360	0.69219	-0.40707	-0.46843	0.80830	0.16922	-0.50290	-0.09382	0.06148	0.21615	0.46268	-0.30046	0.45455	0.17862	0.18395	-1.22281	-0.33317	0.43410	0.34881	0.52007	-0.04923	0.24657	-0.26080	-0.15709
AM 14	-0.72365	0.66311	0.05689	0.16141	-0.59106	-1.16278	-0.60489	0.26571	-0.66728	0.33950	0.05728	-0.00377	-0.49469	-0.03702	-0.38803	-0.19970	0.15247	-0.13190	1.28835	-0.38525	-0.25311	0.09839	-0.05990	-0.25702	0.21338
AM 15	-0.25599	0.43397	-0.15479	0.30370	0.18268	0.14456	-0.02174	-0.15447	0.05714	-0.04077	-0.02526	0.07397	0.02151	-0.04654	0.05546	0.01754	0.19949	-0.06137	-0.09261	-0.04132	-0.03267	-0.08388	-0.01894	-0.05657	0.00748
AM 16	0.31131	-0.03565	0.32811	0.48133	-0.23842	0.41620	0.71145	0.04977	0.44683	-0.36252	0.54221	-0.53818	0.17041	-0.07415	-0.00674	-0.77605	-0.59298	0.18876	0.18511	0.43712	-0.23937	0.12622	0.49813	-0.34764	0.11124
AM 17	-0.32607	-0.84032	0.54054	-0.19018	0.28864	0.41067	-1.18529	0.33869	0.37610	-0.80424	0.43735	0.86263	0.22086	-0.00468	0.23574	-0.11789	0.03028	0.21126	0.44663	-0.17143	-0.01471	-0.16298	-0.00495	-0.12956	0.35649
AM 18	0.25079	0.71523	1.63669	-0.96208	0.85557	-0.66485	0.08442	-0.32372	0.14487	0.42446	0.01678	0.58945	0.09409	-0.10662	-0.00928	0.78549	-0.22697	0.64654	-0.01189	-0.12498	-0.40663	0.27158	0.35759	0.13606	0.34801
AM 19	0.52320	0.11179	0.49745	-0.36132	-0.10256	-0.14785	0.12251	0.29021	0.60307	0.18586	0.18968	0.31839	-0.36457	0.03340	0.22627	0.04945	-0.10211	-0.44352	0.35557	-0.32596	0.21765	-0.63800	-0.00345	0.49573	-0.13967
AM 20	0.24305	-0.33709	-0.42588	0.24071	-1.42785	0.03329	-0.32896	0.51849	-1.12420	-0.08659	1.43595	0.22077	0.18263	0.72347	-1.12684	-0.03777	-0.01681	0.02726	-0.87168	-0.35907	-0.22053	0.46623	-0.03362	0.17249	
AM 21	-0.80555	-0.00912	0.95267	0.90200	0.12046	-1.31161	0.87632	-0.95555	0.31738	0.01997	-0.25674	0.14508	0.73156	0.39193	-0.92559	0.36334	-0.01133	0.08038	-0.24471	0.19845	0.42756	0.18689	0.10101	0.37584	-0.10282
AM 22	-0.67960	-1.61716	0.18384	-0.92014	0.57332	-0.64408	-0.38797	0.50777	0.64811	-0.41844	0.40137	-0.81464	-0.40341	0.06255	0.10376	-0.66820	-0.74179	0.11901	-0.09354	-0.14671	-0.26536	0.58526	0.00217	0.24683	-0.03715
AM 23	-0.56608	0.15435	-0.17451	-0.18342	0.60567	0.38177	0.26186	0.54156	-0.01406	0.61015	0.58588	0.81944	0.15262	0.53378	0.54867	0.50752	0.15587	0.72638	0.26030	0.20134	-0.09432	0.13687	-0.16408	0.04917	-0.05903
AM 24	0.32263	-1.35402	-2.20895	0.10784	0.68911	-0.06535	-0.12038	-0.66363	0.52272	0.13426	-0.51786	-0.23131	1.36247	-0.24731	-0.11572	0.32188	0.01341	0.18696	-0.21213	0.08328	-0.42356	-0.34864	0.22986	0.30431	-0.24742
AM 25	0.37073	0.84733	-0.64400	0.00453	0.10947	-0.05812	-1.34236	-0.58298	-0.52561	-0.28257	-0.19410	0.38417	0.22064	-0.06275	-0.77119	-0.05187	-0.02067	0.06167	0.25688	0.75350	0.29171	0.00289	0.06593	0.14482	0.31007
AM 26	0.74849	-0.67713	0.96091	0.86743	-0.29579	0.06729	-0.55717	0.11546	0.88815	-1.06807	-0.55112	0.16404	-0.15743	-0.26888	-0.11058	0.58644	0.00019	0.10044	0.47712	0.15691	-0.07662	-0.19578	0.03604	-0.11270	0.29308
AM 27	-2.64393	-0.21058	-1.23735	0.05780	-0.98738	0.16576	0.80098	-0.06808	-0.49973	0.13493	0.41650	0.44161	-0.24364	-0.29120	-0.23465	0.15194	0.15402	0.08442	-0.00136	0.26177	-0.12544	0.30317	-0.09419	0.04140	-0.13831
AM 28	-0.33786	-0.38349	0.14147	0.48540	-0.34020	0.29356	-0.29889	0.64677	0.55786	0.21001	0.61598	0.56005	0.10892	0.09127	0.10542	-0.05963	-0.04422	-0.49192	0.01675	-0.26144	0.07944	-0.11483	-0.26580	0.17362	0.25769
AM 29	0.19630	-0.17777	0.19665	1.03632	0.99056	-0.80402	-0.74196	0.52503	0.39158	-0.12689	0.82986	-0.14070	-0.05169	0.33331	-0.34181	-0.00464	0.17974	0.00132	-0.40089	0.50190	0.53160	0.16653	0.36070	-0.29594	-0.12477
AM 30	0.48770	0.02185	0.13549	-0.26747	-1.23962	0.21885	-0.54665	-0.80686	-0.32060	0.11367	0.48512	-0.52211	0.27352	0.13841	-0.03908	-0.05211	0.20613	-0.32836	-0.04523	0.06631	-0.24806	-0.13473	0.64458	-0.04334	-0.21334
AM 31	0.37499	-0.53426	-0.74400	-0.18032	0.51129	-0.68798	0.25234	0.84213	0.33404	-0.58196	-0.18058	-0.47850	-0.27023	0.27664	-0.21717	-0.37310	-0.09857	-0.43441	0.10035	-0.12689	0.14632	-0.09899	0.20129	0.28028	-0.08152
AM 32	-0.11782	0.14691	-0.21417	1.37798	0.14241	0.42188	-0.78808	-1.18447	0.30498	-0.30316	0.24566	-0.20472	-0.11202	-0.12923	0.85383	0.38700	0.67890	0.03609	0.06665	-0.33394	0.51229	0.45788	-0.26159	-0.31854	-0.25973
AM 33	1.60100	-1.62015	1.31957	-2.00074	-0.30073	0.00752	0.19130	-0.23410	-0.68923	-0.07240	-0.51001	-0.50667	-0.44047	-0.19042	-0.00054	0.02947	0.96626	-0.11454	-0.42296	0.52010	-0.06365	0.33479	-0.06076	-0.13061	-0.15112
AM 34	-0.80927	0.16287	1.24647	0.64298	-0.21358	-0.23423	-0.34953	0.57980	-0.19322	0.53655	-0.92671	-0.20615	0.56304	0.54387	-0.10273	-0.67989	0.00690	-0.30367	-0.28424	0.10664	0.00369	0.08185	0.02853	0.00452	0.28316
AM 35	0.21746	0.42666	0.38906	-0.28340	0.16580	-0.07061	0.15926	0.40653	-0.40585	-0.15566	0.32605	-0.47956	0.86201	-0.10307	0.09502	0.23768	-0.09778	0.08959	0.09390	0.18352	-0.05015	0.11058	0.09817	0.13269	-0.04827
AM 36	0.13721	0.03344	-0.27786	-1.34364	0.53390	-0.26199	-0.05169	-0.11901	0.05241	0.86339	0.20208	0.93907	0.82140	0.18400	-0.34060	-0.67401	-0.09599	0.61655	0.12883	-0.16764	-0.07944	0.07959	-0.04153	-0.05730	-0.24636
AM 37	1.76637	1.13081	0.02328	0.57614	0.19872	-0.35997	-0.03351	0.15898	-0.32250	0.54939	0.40494	0.10121	-0.59191	-0.94490	0.51889	-0.20501	0.71363	0.15459	0.21598	-0.05421	-0.52669	-0.08459	-0.15408	-0.01565	-0.44228
AM 38	0.01351	-0.29096	1.09682	1.03477	-0.17515	0.79057	0.30686	-0.36115	-0.46090	0.19400	0.80337	0.28539	0.32839	-0.72583	-0.18269	-0.24430	0.37401	0.32895	-0.55971	-0.50018	-0.01347	-0.60088	0.50792	0.36529	0.22775
AM 39	0.22946	-1.89047	-0.56387	0.83433	-0.63149	-0.63845	-0.16295	-0.31823	-1.18423	0.39724	-0.29970	0.8241													

Amostra	PC50	PC51	PC52	PC53	PC54	PC55	PC56	PC57	PC58	PC59	PC60	PC61	PC62	PC63	PC64	PC65
AM 1	0,05761	-0,08076	-0,03292	-0,13222	0,14685	-0,13263	-0,08153	0,17055	-0,00470	0,16684	-0,06582	-0,10195	0,04271	-0,03430	0,05228	0,00013
AM 2	0,23104	-0,06819	0,00001	-0,05421	-0,01603	0,11411	0,03681	0,07784	-0,15139	-0,01136	0,03697	-0,04683	-0,04165	0,00010	-0,00037	-0,00337
AM 3	0,02441	-0,01592	-0,12394	-0,07521	-0,10932	-0,18745	-0,05518	-0,10827	-0,06931	-0,10330	0,00621	0,00458	-0,08701	0,04265	0,00395	-0,00936
AM 4	-0,38908	0,24115	-0,55455	-0,41727	0,15249	-0,10174	0,16168	-0,00537	0,08965	-0,04049	-0,02265	0,07874	0,06493	0,01374	0,05645	-0,02184
AM 5	-0,15296	-0,21844	0,31736	0,21040	-0,10166	0,07906	-0,00774	0,00605	0,06201	-0,20522	-0,07985	-0,02013	-0,07348	-0,01506	-0,03521	-0,02184
AM 6	0,10841	-0,40778	0,24132	0,03966	0,06594	0,14846	0,20954	-0,06656	-0,08332	0,37565	0,42087	-0,09856	0,01621	0,08457	-0,04334	0,10974
AM 7	-0,53930	-0,08672	0,28482	-0,31300	-0,06020	-0,04388	-0,39965	0,28678	0,09328	-0,22550	0,30580	-0,33786	0,02248	-0,31227	0,06999	-0,06020
AM 8	-0,27685	-0,35431	-0,15431	-0,01664	0,00927	0,19455	0,06234	0,03376	0,01393	0,04051	0,10138	-0,11138	-0,03933	-0,00006	-0,01129	-0,01869
AM 9	0,27326	0,12213	0,24684	0,14546	-0,11065	-0,35535	0,02015	-0,01778	0,15887	0,03252	0,01314	0,05652	-0,04193	0,00631	-0,11721	0,05242
AM 10	0,20391	-0,14523	-0,60739	-0,61783	0,05219	0,17066	0,17069	0,10436	-0,11193	0,14818	0,06964	0,04454	0,06912	-0,04948	-0,03007	0,06237
AM 11	-0,18971	0,22927	-0,30284	0,11153	-0,06754	0,34514	0,12354	-0,20729	-0,08671	0,14613	0,31283	-0,10945	0,04847	0,25022	-0,02237	-0,07837
AM 12	0,51840	0,49133	-0,11700	-0,29854	-0,17592	-0,04991	-0,02056	0,08418	-0,21047	-0,10530	0,16503	0,04802	-0,26947	-0,02111	-0,08042	-0,03810
AM 13	-0,07589	-0,00034	0,18789	-0,24267	0,20452	0,16199	-0,31332	0,11566	0,02976	-0,32375	0,25405	0,13445	0,17243	0,17890	-0,14549	-0,08559
AM 14	0,29385	-0,21096	0,01018	0,20293	-0,07213	0,51424	-0,13008	0,07635	-0,16276	0,15699	-0,17842	-0,08481	0,02387	0,03604	-0,01827	0,03989
AM 15	-0,00698	0,02631	-0,00697	0,02083	-0,04468	0,04190	-0,00301	0,02234	0,00089	-0,02771	0,02156	0,00541	0,00873	0,00142	-0,01106	-0,00089
AM 16	-0,41954	0,59609	0,02304	-0,02789	-0,05069	0,00768	0,04229	0,06743	0,00998	0,22914	0,01043	0,05604	-0,16134	-0,16433	0,14755	0,37680
AM 17	-0,10140	0,03207	-0,42360	0,44239	0,43654	-0,31210	0,01844	-0,06010	0,14173	0,10236	-0,08425	-0,04268	0,14812	-0,26742	-0,02896	0,02366
AM 18	0,15359	-0,21363	-0,15813	0,07140	-0,15157	-0,29341	0,14247	-0,17825	-0,22798	-0,24098	-0,03821	0,19081	0,00157	0,05897	0,14403	-0,08331
AM 19	0,38956	0,25598	0,39842	-0,26690	0,26351	0,07068	0,42990	-0,16061	0,39115	-0,10328	-0,18380	-0,31158	-0,10202	0,10682	0,06174	0,11583
AM 20	0,38896	0,32081	-0,36585	0,22400	-0,24454	0,13525	-0,24857	-0,23398	0,07928	0,00057	0,07505	-0,04504	0,01798	0,13441	0,03299	-0,00522
AM 21	-0,09621	0,11411	0,08743	0,33903	-0,00517	-0,11104	-0,13122	0,00169	0,17362	0,40402	0,02730	0,05109	0,26739	-0,02062	0,08915	-0,04599
AM 22	-0,01742	-0,28180	-0,10137	-0,21690	0,04899	-0,12259	0,09971	-0,05887	0,11628	-0,04791	0,07771	-0,02029	-0,00365	0,04417	-0,02185	-0,07077
AM 23	-0,48926	0,30363	0,06677	0,18971	0,01309	-0,07725	0,27064	0,05472	-0,24517	-0,14078	-0,17991	-0,27488	0,21298	0,18476	0,22451	-0,06993
AM 24	-0,03569	0,24890	0,18345	0,08073	0,16461	0,33279	-0,12282	-0,10026	-0,18053	0,12999	-0,17586	-0,00862	0,02277	0,03948	-0,01967	-0,10273
AM 25	-0,40723	0,12109	0,16235	0,30928	-0,42326	-0,18581	0,43257	-0,00092	0,20079	-0,03528	0,20106	-0,04378	-0,25073	0,22824	-0,14662	0,01416
AM 26	0,04396	-0,06937	-0,03755	0,31229	0,00284	0,04689	0,15982	-0,04161	-0,24496	-0,05665	-0,05985	0,18303	0,08021	-0,03302	-0,01453	-0,03439
AM 27	-0,07104	0,05177	-0,16378	-0,08976	0,22826	-0,07614	0,22099	0,06828	-0,06282	-0,20139	0,02402	0,11218	-0,05628	-0,03401	0,03110	0,02801
AM 28	-0,25918	0,05397	0,32506	-0,48719	-0,15237	-0,07729	0,10793	0,17546	-0,06238	0,54241	-0,09756	0,37837	-0,28276	-0,08553	0,06851	-0,31474
AM 29	-0,14597	-0,16842	0,06676	-0,33100	-0,13408	0,19502	-0,08830	-0,22165	-0,01036	-0,21340	-0,51549	0,02999	0,05416	0,08101	-0,05959	0,01887
AM 30	-0,29077	-0,28944	0,17353	-0,04102	-0,25755	-0,09792	0,16296	0,16321	-0,25058	-0,18901	0,04429	0,06994	0,08790	-0,07772	0,04145	0,04006
AM 31	-0,06913	0,09712	0,13578	0,06368	0,04788	-0,17720	0,04919	-0,05372	0,00141	-0,11293	0,03483	-0,04936	-0,05220	-0,02599	0,01390	0,05158
AM 32	0,32495	0,40717	0,42425	-0,01676	0,25213	-0,19849	0,00415	-0,14997	0,15559	-0,07715	0,03260	0,11203	-0,03265	-0,13151	-0,05643	-0,01672
AM 33	0,20770	-0,02200	-0,00600	0,12032	0,07696	-0,05160	0,10945	-0,02255	-0,11960	0,00966	-0,24429	0,06240	-0,06770	0,00691	0,00004	-0,02407
AM 34	0,47434	0,39572	0,15574	0,08487	-0,05684	0,27270	0,20494	0,42185	-0,02501	-0,19984	0,08781	0,05601	0,18768	-0,09495	0,19076	-0,03744
AM 35	-0,06587	0,05597	-0,00591	0,02060	0,12531	0,10066	0,00302	0,02778	0,11858	0,09844	-0,01703	0,02110	0,03133	0,02994	-0,01919	-0,00219
AM 36	-0,10632	-0,17272	-0,25963	0,15551	0,22013	0,13256	0,12300	0,00776	0,02934	-0,07840	-0,03713	0,32498	0,07695	-0,04613	-0,03664	0,08607
AM 37	-0,13038	0,11357	0,19284	0,24894	0,05094	-0,29130	-0,35354	0,01181	-0,16805	0,03312	-0,16013	0,12609	0,07879	0,05993	0,05434	0,00349
AM 38	-0,01781	-0,47528	-0,02597	-0,06729	0,15591	0,04406	0,16545	-0,03239	0,11523	-0,04379	0,04547	0,00249	0,07036	-0,08169	-0,07680	0,10636
AM 39	-0,04974	0,07906	-0,11837	-0,16978	-0,09051	0,01474	0,09041	-0,07706	0,07897	-0,11643	-0,00581	0,01844	-0,03808	0,04001	0,01609	-0,03981
AM 40	-0,24348	-0,26899	0,00016	-0,16807	0,43514	0,04260	-0,24393	-0,13104	0,47716	0,11993	-0,13291	-0,00689	-0,19270	0,12766	0,00910	-0,06288
AM 41	0,27577	0,36205	-0,05954	-0,17048	0,34711	-0,18993	0,02121	-0,03276	0,08959	-0,10072	0,14528	-0,12642	0,25189	-0,00602	-0,09340	-0,27043
AM 42	0,12025	-0,28697	0,37301	-0,05086	0,26703	-0,20275	0,34205	-0,03930	-0,27847	-0,05119	0,26559	0,27615	0,06010	0,18931	0,03002	0,20659
AM 43	-0,03320	-0,26068	0,12630	-0,02098	0,29056	0,28403	0,16535	0,00243	0,00412	-0,07809	-0,09781	0,03544	0,02452	-0,01517	-0,02105	0,01173
AM 44	-0,19620	0,33443	-0,20197	0,17825	-0,25434	0,17088	-0,06908	0,26829	0,02400	-0,09652	-0,16918	0,09272	-0,00968	-0,20973	-0,47630	0,04665
AM 45	-0,04130	0,08084	0,03624	-0,00281	-0,46101	0,09645	-0,32681	-0,02217	0,04780	0,19819	-0,04829	-0,01967	0,12807	0,13761	-0,01151	-0,07374
AM 46	-0,02500	-0,29972	-0,31127	-0,12429	-0,38914	-0,32264	-0,02376	0,02182	-0,11775	-0,04994	-0,05008	-0,24564	-0,04822	-0,01029	0,03695	0,00753
AM 47	-0,19782	0,16514	0,09863	-0,13906	-0,40195	0,47580	-0,23978	-0,42536	0,07656	-0,14500	-0,04293	-0,03047	0,01198	-0,13468	0,08326	0,08711
AM 48	0,18127	-0,20382	0,20158	-0,02060	-0,02589	0,04693	-0,04401	0,06833	0,13239	0,05775	-0,14669	0,00899	0,01490	-0,02112	-0,01128	-0,02035
AM 49	0,03932	-0,11126	-0,05491	-0,01786	-0,05201	0,07465	-0,03217	0,13237	-0,02428	0,04164	-0,04575	-0,08873	0,01070	-0,01836	-0,02333	-0,01483
AM 50	-0,12359	-0,23177	0,13776	-0,05134	-0,11664	-0,08007	0,09114	-0,19609	-0,03008	-0,16011	-0,02085	0,06160	-0,05177	0,00370	-0,05553	-0,00469
AM 51	-0,28971	-0,10217	-0,00577	0,14395	-0,04078	-0,21907	-0,02576	-0,14895	0,01677	0,08994	-0,03942	-0,07993	-0,03845	-0,07189	-0,07032	-0,09683
AM 52	0,09380	-0,05748	-0,31369	0,35859	0,34098	-0,13125	-0,32920	0,61736	-0,11482	-0,06173	-0,13728	-0,22334	-0,41561	0,22518	-0,01635	-0,00161
AM 53	-0,52434	0,14135	-0,05708	0,29127	0,23008	0,00061	0,09200	-0,14884	-0,01125	-0,02912	0,13668	0,12308	0,02912	0,03021	-0,03689	-0,01627
AM 54	0,05998	0,14104	0,00408	-0,07712	0,11910	0,17050	-0,02274	0,09914	-0,05738	0,18465	0,09942	0,00378	-0,01077	0,00014	-0,00366	0,11545
AM 55	0,13073	-0,15018	0,17258	0,00965	-0,03394	-0,18079	-0,01950	0,22268	-0,02361	-0,05384	-0,07234	-0,05229	-0,00452	-0,07962	0,14028	0,01149
AM 56	0,30485	0,00158	0,06654	0,03422	0,03326	0,04518	0,02901	-0,06594	0,00049	-0,06346	-0,02264	0,04970	-0,08586	0,04937	-0,03217	-0,01027
AM 57	0,04306	0,13056	-0,20956	-0,30380	0,14346	-0,33489	-0,37246	-0,42561	-0,28055	0,12667	-0,03519	-0,14486	-0,04025	-0,01846	0,01521	0,14167
AM 58	0,44155	-0,35283	-0,34284	0,45600	-0,20852	0,13803	-0,14314	-0,22306	0,36759	-0,12819	0,19722	0,10220	-0,20673	-0,23901	0,22487	-0,11444
AM 59	-0,01141	0,09618	-0,00107	0,00683	-0,04845	-0,09007	-0,01660	-0,07774	0,01822	-0,05138	-0,02753	0,05611	-0,00401	0,06470	-0,02110	0,00920

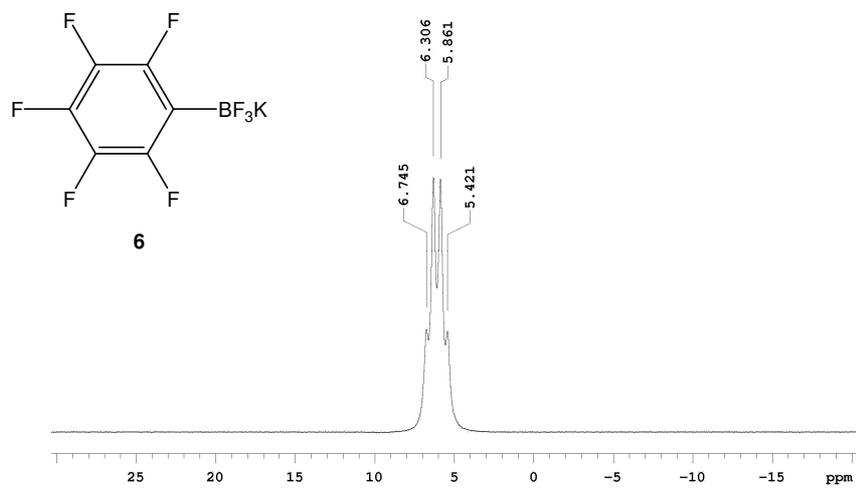
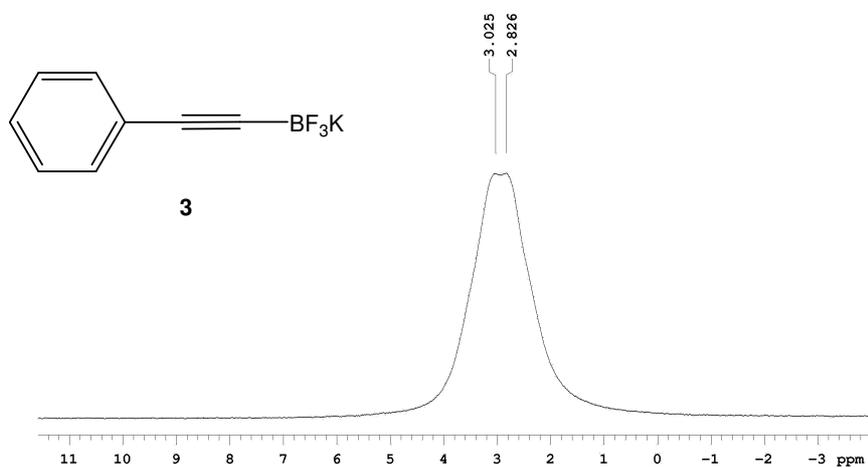
Apêndice IV

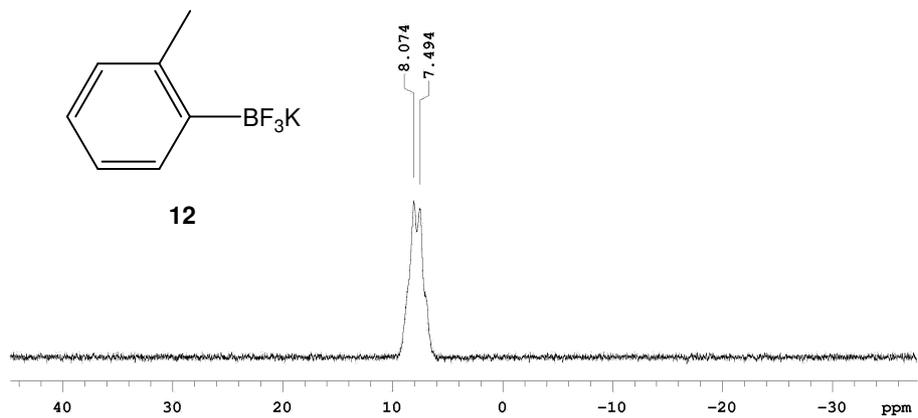
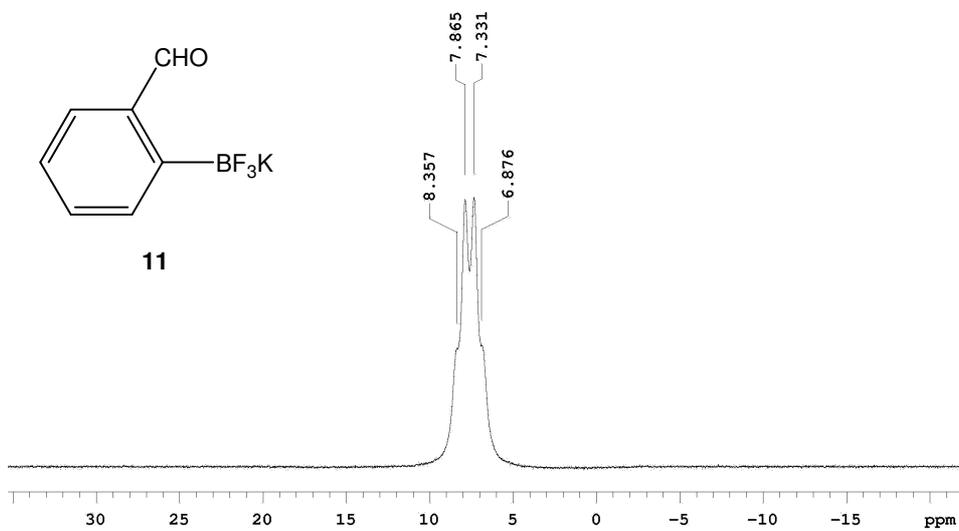
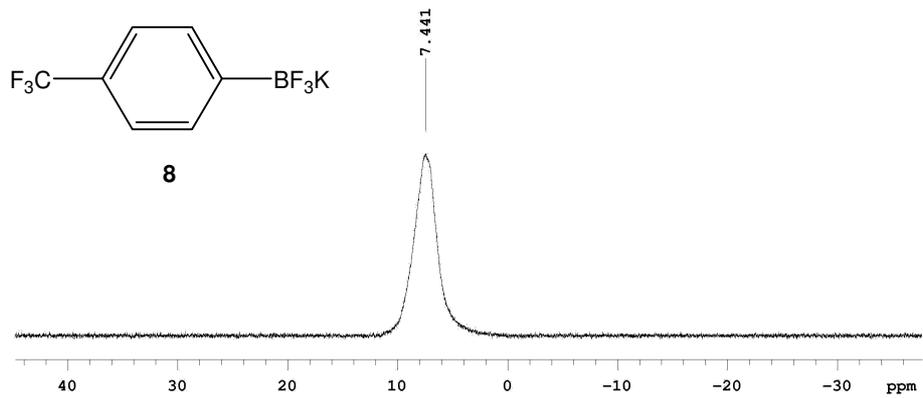
Função de Classificação para os grupos POSITIVO e NEGATIVO – Modelo Metabonômico para Investigação de Infecção pelo Vírus da Hepatite C.

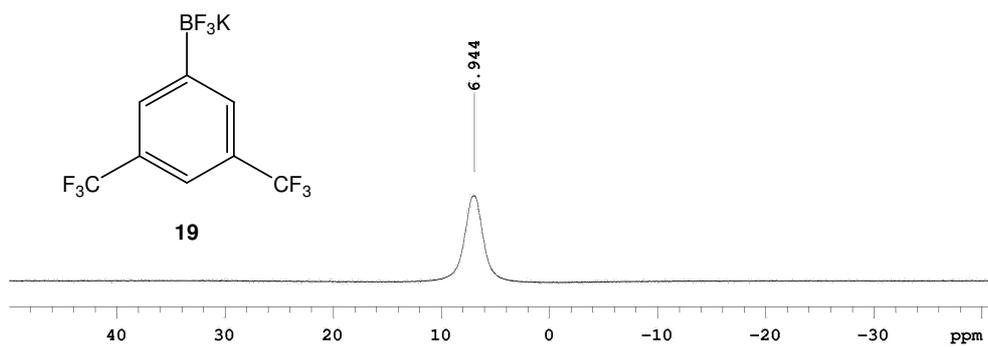
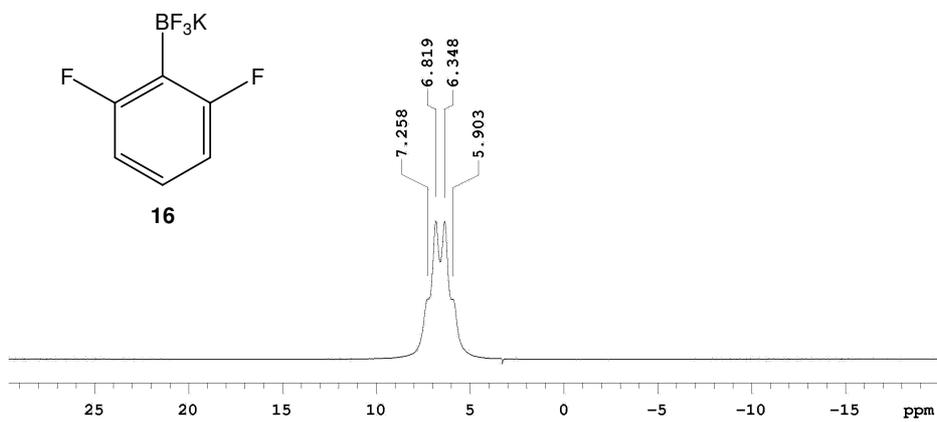
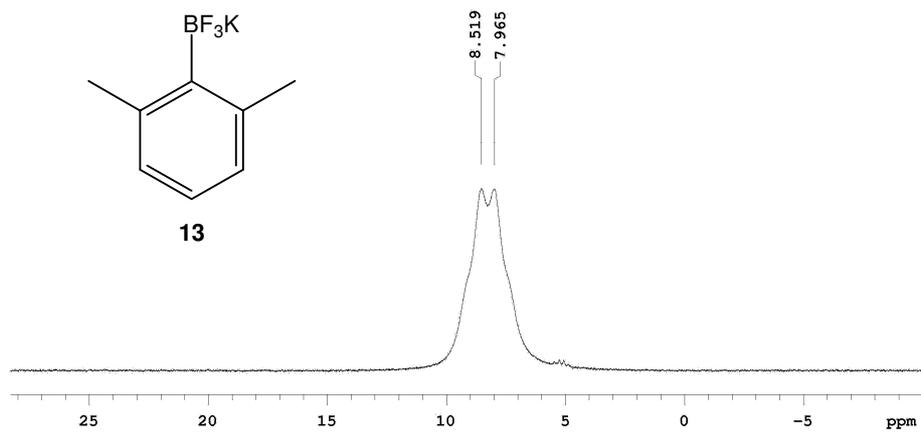
	B	PC 2	PC 5	PC 8	PC 10	PC 16	PC 19	PC 24	PC 28	PC 31	PC 32	PC 34	PC 38	PC 43	PC 44	PC 51	PC 56
NEGATIVO	-2,34424	-0,13623	0,45875	0,48867	0,82031	0,56594	-1,00284	-1,14145	1,19541	-1,43849	1,47036	-1,96137	1,87830	2,66349	-2,13680	2,75930	5,22312
POSITIVO	-2,09859	0,12821	-0,43176	-0,45992	-0,77206	-0,53265	0,94385	1,07430	-1,12510	1,35388	-1,38387	1,84599	-1,76781	-2,50682	2,01111	-2,59699	-4,91588

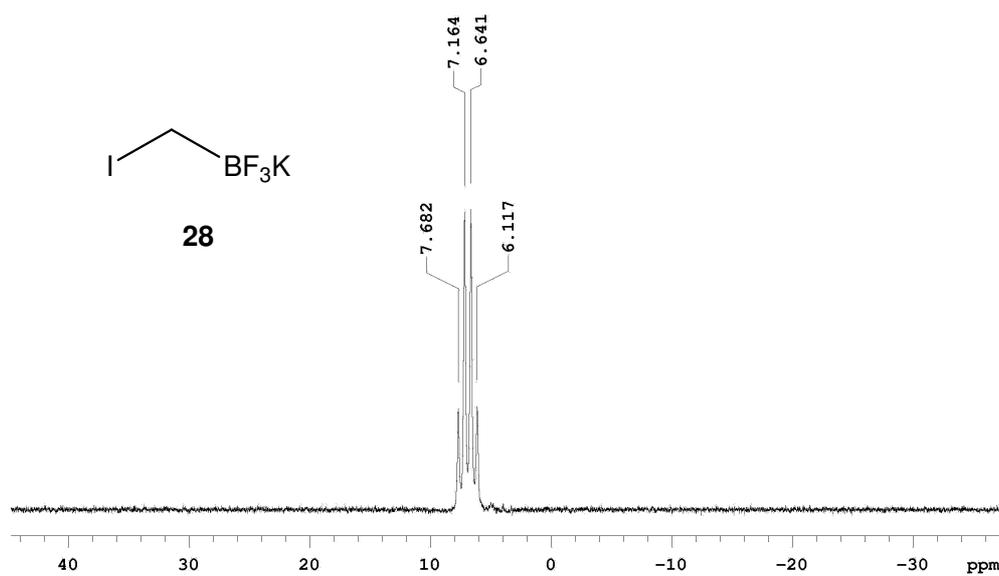
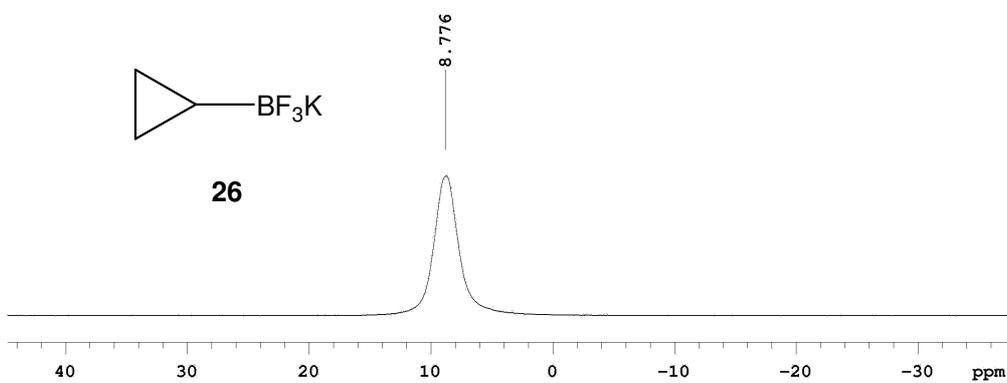
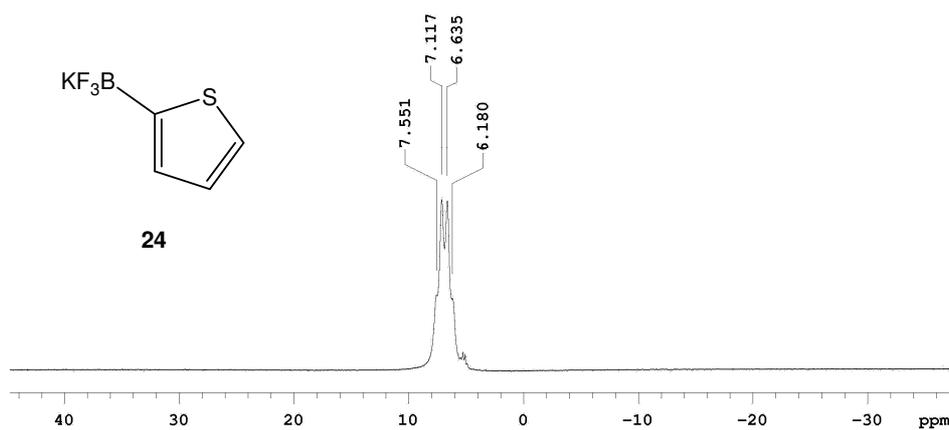
Apêndice V

Espectros de RMN de ^{11}B (96,2 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **3**, **6**, **8**, **11**, **12**, **13**, **16**, **19**, **24**, **26** e **28**.









Apêndice VI

Espectros de RMN de ^{19}F (282,2 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **3**, **6**, **8**, **11**, **12**, **13**, **16**, **19**, **24**, **26** e **28**.

