

JOSÉ AUGUSTO CALDEIRA PEREIRA
LICENCIADO EM BIOQUÍMICA (U.P.)

*APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
AO ESTUDO DE PROCESSOS DINÂMICOS EM SOLUÇÃO*

*Dissertação para Doutoramento em Química na
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO PORTO

PORTO
1994

*APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR AO
ESTUDO DE PROCESSOS DINÂMICOS EM SOLUÇÃO*

JOSÉ AUGUSTO CALDEIRA PEREIRA
LICENCIADO EM BIOQUÍMICA (U.P.)

*APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR AO
ESTUDO DE PROCESSOS DINÂMICOS EM SOLUÇÃO*

*Dissertação para Doutoramento em Química na
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO PORTO

PORTO
1994

"Se pudéssemos (...) traduzir filosoficamente o duplo movimento que actualmente anima o espírito científico aperceber-nos-íamos de que a alternância do *a priori* e do *a posteriori* é obrigatória, que o empirismo e o racionalismo estão ligados no pensamento científico, por um estranho laço, tão forte como o que une o prazer à dor."

Gaston Bachelard, "*Filosofia do Novo Espírito Científico*"

Índice

<i>Prefácio</i>	xi
<i>Agradecimentos</i>	xiii
I Enquadramento Teórico	1
<i>1 Aspectos da química biológica dos catiões bivalentes do grupo 12</i>	<i>3</i>
1. A importância dos catiões metálicos para a vida	3
2. O papel biológico do zinco	5
3. Aspectos biológicos da química do cádmio e do mercúrio	7
4. Aspectos da química de complexação dos catiões do grupo 12	11
5. Complexos ternários mistos e a sua importância para a química biológica	12
<i>2 Ressonância Magnética Nuclear</i>	<i>15</i>
1. Aspectos básicos da descrição semi-clássica de RMN	15
1.1 Fundamentos a nível nuclear	15
1.2 Fundamentos a nível macroscópico	16
<i>Equações diferenciais de Bloch</i>	17
1.3 O desvio químico	22
1.4 Acoplamento internuclear indirecto	24
1.5 Permuta química	25
1.6 Relaxação	26
1.7 Aspectos práticos instrumentais	29
2. Formalismo de operadores para a descrição de experiências de RMN	32
2.1 Operadores de spin	32
2.2 Hamiltoniano de spin nuclear	32
2.3 O operador densidade	33
<i>Expansão do operador densidade em operadores produto</i>	34
<i>Evolução dos operadores produto</i>	35
<i>Mapas de ordem de coerência</i>	36
3. Descrição semi-clássica da relaxação em RMN	38
3.1 Teoria BPP da relaxação em RMN	38
3.2 Superoperador de relaxação	39
<i>Hamiltonianos de interacção</i>	42
4. Algumas técnicas relevantes de RMN-FT	44
4.1 Supressão do sinal do solvente	44
4.2 Espectros bidimensionais	45
4.3 Medição de T_1 e de T_2	46
<i>3 Constantes de equilíbrio químico e sua determinação por RMN</i>	<i>49</i>
1. Constantes de estabilidade de complexos	49
<i>Terminologia</i>	49
<i>Complexos ternários mistos</i>	50
<i>Aspectos termodinâmicos do equilíbrio químico</i>	51
<i>Estado de referência</i>	53

2. Cálculo de constantes de estabilidade por RMN	54
2.1 Regressão sobre os desvios químicos de RMN	55
<i>Regressão linear</i>	55
<i>Regressão não linear</i>	60
2.2 Regressão sobre as constantes de tempo de relaxação	61
II Determinação de Constantes de Estabilidade por RMN	63
<i>4 Condições experimentais gerais e métodos de cálculo</i>	65
1. Solventes e reagentes	65
2. Preparação de amostras para RMN	66
<i>Medição do pH</i>	67
3. Condições experimentais utilizadas na obtenção dos espectros de RMN	68
4. Escolha da referência interna	69
5. Os dados experimentais e o cálculo das constantes de equilíbrio	72
5.1 Os conjuntos de pontos experimentais: critérios usados na sua selecção	73
5.2 A escolha dos modelos	74
5.3 A apresentação dos valores calculados para as constantes de equilíbrio	76
5.4 O cálculo de constantes de equilíbrio para o modelo $M + L \rightleftharpoons ML$	76
5.5 Implementação do método geral de regressão não linear para o cálculo de constantes de equilíbrio	77
<i>5 Associações intermoleculares e constantes de acidez da glicilglicina e da citidina</i>	85
1. Citidina, glicilglicina e a sua interacção	85
1.1 Interpretação do espectro de RMN da citidina em H ₂ O e D ₂ O	85
1.2 Interpretação do espectro de RMN da glicilglicina em H ₂ O e em D ₂ O	88
1.3 Efeitos nos espectros de RMN da auto-associação da citidina e da interacção intermolecular entre a citidina e a glicilglicina	89
2. Constantes de acidez da citidina e da glicilglicina	90
2.1 Glicilglicina	92
<i>Definição do estado de referência para as experiências de pH variável com glicilglicina</i>	96
2.2 Citidina	98
<i>Definição do estado de referência para as experiências de pH variável com citidina</i>	99
3. Conclusão	100
<i>6 Zinco e cádmio: complexos binários e ternários mistos com citidina e glicilglicina</i>	101
1. Constantes de estabilidade para os complexos binários de Zn ²⁺ e Cd ²⁺ com citidina	102
1.1 Variação do desvio químico em função da concentração de catião metálico (pH fixo); efeito dos catiões e dos aniões	102
<i>Cálculo de constantes de estabilidade</i>	109
1.2 Variação do desvio químico em função do pH	114
2. Constantes de estabilidade para os complexos binários de Zn ²⁺ e Cd ²⁺ com glicilglicina	118
3. Constantes de estabilidade para os complexos mistos de Zn ²⁺ e Cd ²⁺ com glicilglicina e citidina	125
3.1 Variação do desvio químico em função da concentração de catião metálico (pH fixo)	127
<i>Cooperatividade na formação dos complexos ternários</i>	130
3.2 Variação do desvio químico em função do pH	132
4. Conclusão	136

<i>7 Mercúrio: formação de complexos com citidina e glicilglicina</i>	139
1. Glicilglicina	139
1.1 Estudo das espécies em solução	140
<i>Em solução aquosa</i>	140
<i>Em solução de água deuterada (D₂O)</i>	147
<i>Uma visão integrada</i>	150
1.2 Constantes de equilíbrio para o sistema Hg ²⁺ /glicilglicina	152
<i>Por medição da área de sinais em espectros de ¹H (variação do pH e das concentrações)</i>	152
<i>Por medição dos desvios químicos (variação do pH)</i>	154
2. Citidina	158
2.1 Estudo das espécies em solução	159
2.2 Constantes de equilíbrio para o sistema Hg ²⁺ /citidina	166
3. O sistema ternário Hg(NO ₃) ₂ / Citidina / Glicilglicina	174
3.1 Estudo das espécies em solução	174
4. Conclusão	175
III Cálculo Teórico e Determinação Experimental de Constantes de Relaxação Transversal em RMN	179
<i>8 Cálculo teórico e determinação de constantes de tempo de relaxação transversal, T₂</i>	181
1. Cálculo teórico de T ₂	182
1.1 Método	182
1.2 Computação	185
1.3 Resultados	186
2. Medição de T ₂ para transições de quantum nulo e quantum duplo num sistema AX	188
2.1 Condições experimentais	192
2.2 Sequências de impulsos	192
2.3 T ₂ ^{QN} e T ₂ ^{QD} para os núcleos H-5 (A) e H-6 (X) da citosina	196
<i>Apêndice</i>	199
<i>Resumo</i>	231
<i>Résumé</i>	232
<i>Abstract</i>	233
<i>Bibliografia</i>	235

Prefácio

A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) é um método instrumental privilegiado para o estudo de muitos processos dinâmicos que ocorrem em solução. Devido à escala de tempo característica desta espectroscopia, que utiliza frequências da ordem dos megahertz, é possível em muitos casos obter espectros RMN que podem fornecer, directa ou indirectamente, informação sobre equilíbrio químico, fenómenos de permuta, movimentação intramolecular e relaxação nuclear.

A criação, desenvolvimento e aplicação de técnicas de RMN para o estudo destes fenómenos são actividades de investigação vastas e ainda em grande expansão. Uma das áreas de particular interesse e dificuldade é a química biológica, nomeadamente a bioinorgânica e a química das macromoléculas, assuntos em que as técnicas instrumentais têm vindo a ganhar cada vez maior importância.

O estudo do papel dos catiões metálicos na matéria viva tem revelado a sua importância fulcral para muitos processos bioquímicos essenciais, com funções reguladoras, estruturais ou coenzimáticas. Os catiões metálicos como cofactores enzimáticos encontram-se invariavelmente coordenados a proteínas, numa grande variedade de geometrias, através dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas ou de coenzimas específicas. É portanto de grande interesse o estudo do equilíbrio de complexação dos catiões metálicos com ligandos biológicos, nomeadamente com mistura de diferentes tipos de grupos coordenantes, tendo em vista o estabelecimento de modelos para a sua actuação e considerando que a regulação da sua actividade está intimamente relacionada com aspectos do equilíbrio de associação a esse tipo de ligandos.

A estereoespecificidade e a dinâmica intramolecular são também aspectos essenciais para o funcionamento de macromoléculas como as proteínas enzimáticas ou os ácidos nucleicos e o seu estudo em solução tem-se tornado cada vez mais necessário para compreender certos aspectos do seu modo de funcionamento, uma vez que a informação estrutural obtida através da técnica de difracção de raios X está limitada ao estado sólido.

Numa tentativa para contribuir para o estudo de alguns aspectos da química biológica focados nos dois últimos parágrafos, e aproveitando as já referidas potencialidades da ressonância magnética nuclear para o estudo de processos dinâmicos em solução, foi estudado no trabalho descrito nesta dissertação o equilíbrio de complexação de dois ligandos biológicos, citidina e glicilglicina, com os catiões bivalentes do grupo 12 (Zn(II), Cd(II) e Hg(II)), metais com um papel relevante em química biológica. Foram também desenvolvidos instrumentos teóricos e práticos para o estudo da relaxação nuclear, tendo em vista a dependência daquele fenómeno da movimentação molecular e a utilização dos parâmetros de relaxação (T_1 e T_2) para o seu estudo.

Esta dissertação está dividida em três Partes; na Parte I é esboçado o quadro de referência teórico e são definidos os conceitos básicos para a compreensão e execução do trabalho experimental. Esta Parte é constituída por três Capítulos dedicados à descrição de alguns aspectos da química biológica dos catiões metálicos do grupo 12 (Capítulo 1), da espectroscopia de RMN (Capítulo 2), e da metodologia utilizada para a determinação de constantes de equilíbrio por RMN (Capítulo 3).

Na Parte II, dividida em quatro Capítulos, é apresentado o estudo da formação dos complexos binários e ternários mistos de citidina e glicilglicina com zinco(II), cádmio(II) e mercúrio(II). No Capítulo 4 são discutidos aspectos relacionados com a definição dos estados de referência, com a escolha do padrão de referência interna para os desvios químicos e com a aplicabilidade dos métodos utilizados para o cálculo das constantes de equilíbrio. Nos três Capítulos seguintes são apresentados os resultados do cálculo das constantes de acidez dos ligandos referidos (Capítulo 5) das constantes de estabilidade dos complexos formados com zinco(II) e cádmio(II) (Capítulo 6), e das constantes de estabilidade dos complexos formados com mercúrio(II), utilizando espectros de equilíbrio de cinética lenta e rápida na escala de tempo de RMN (Capítulo 7).

Na Parte III (Capítulo 8) é apresentado um método, e respectiva aplicação computacional, para o cálculo de constantes de tempo de relaxação transversal, T_2 , para um sistema com qualquer número de núcleos, e duas sequências de impulsos para a determinação experimental dessas constantes para as transições de quantum duplo e quantum nulo de um sistema de dois núcleos não acoplados ou fracamente acoplados.

Agradecimentos

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, a concessão de uma bolsa de estudo para doutoramento no País.

Ao Grupo de Química da Faculdade de Ciências do Porto, por me ter aceite como estudante de Doutoramento.

Ao Dr. Baltazar de Castro, a proposta de um tema de doutoramento da minha predilecção, e o seu apoio e orientação constantes.

To Dr. Timothy J. Norwood, its patience and generosity for trying to teach a mere biochemist the most esoteric aspects of NMR spectroscopy.

A Sandra Moura e Paula Gameiro, a sua imprescindível ajuda durante a realização deste trabalho.

A Natália Cordeiro, Alexandre Magalhães e Vitor Morais, a resolução dos meus mais variados problemas de entendimento com o UNIX.

Ao Professor Doutor Ferreira Gomes, os comentários a alguns trechos desta dissertação.

Aos Professores Doutores Carlos Corrêa, Conceição Rangel e Cristina Freire, a sua ajuda incondicional nos mais variados aspectos logísticos.

A João, Mário, Fernando, Lígia, Amélia, Arménio e outros Amigos que, com a sua boa disposição, contribuíram decisivamente para a manutenção da minha saúde mental.

À Ana e à Eva, por me terem aturado

Aos meus Pais, a quem devo tudo

I

*Enquadramento
Teórico*

NA PARTE I SÃO ABORDADOS, sob um ponto de vista essencialmente teórico, alguns tópicos com interesse para as Partes II e III onde são descritos os resultados experimentais.

No Capítulo 1 é apresentada uma breve resenha dos aspectos mais importantes da química de coordenação dos cátions de metais de transição do grupo 12. Para estes cátions são esboçadas as linhas gerais da sua associação química com moléculas biológicas e, nomeadamente, a formação de complexos ternários com essas moléculas.

No Capítulo 2 são abordados aspectos fundamentais, bem como alguns mais específicos necessários para a execução deste trabalho, da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Esta técnica constitui o fio condutor do trabalho apresentado, uma vez que foi utilizada de uma forma quase exclusiva para os estudos descritos nas Partes II e III. Optou-se por fazer uma descrição semi-clássica dos vários temas abordados por ser suficiente para descrever as aplicações utilizadas e interpretar os resultados obtidos.

Finalmente, no Capítulo 3, último desta Parte, é explicitada a terminologia utilizada na Parte II, que respeita ao estudo do equilíbrio químico, e é descrita a aplicação de técnicas de RMN à determinação de constantes de equilíbrio.

Aspectos da química biológica dos catiões bivalentes do grupo 12

NESTE CAPÍTULO SÃO FOCADOS alguns aspectos essenciais da química de coordenação dos catiões do grupo 12 com relevância para o trabalho experimental apresentado na segunda parte desta tese. Após uma introdução geral referente à importância dos catiões metálicos para a vida, com particular ênfase para os catiões zinco(II), cádmio(II) e mercúrio(II), são resumidos aspectos básicos da química biológica destes catiões metálicos com destaque para a formação de complexos ternários mistos. Uma discussão mais específica e comparativa da complexação dos catiões divalentes do grupo 12 com ligandos biológicos (aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos) é reservada para as secções introdutórias dos capítulos da Parte II desta tese.

1. A importância dos catiões metálicos para a vida

A PRESENÇA DE CATIÕES METÁLICOS na matéria viva é uma consequência natural da sua existência no meio aquoso onde a vida se iniciou e desenvolveu [1]. No decurso da evolução, alguns destes catiões metálicos foram seleccionados para desempenhar tarefas fulcrais para o funcionamento da matéria viva (elementos essenciais), onde se encontram tipicamente em muito pequena quantidade, enquanto que outros se tornaram prejudiciais para o bom funcionamento dos organismos vivos (Figura 1.1).

Os elementos metálicos essenciais encontram-se, com excepção do molibdénio e do iodo, até ao 4º período do quadro periódico dos elementos. Os catiões metálicos mais leves como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ou Mg^{2+} , cuja configuração electrónica é igual à de um gás nobre e que mantêm o seu estado de oxidação inalterado, têm uma bioquímica relacionada com a formação de ligações iónicas e interacções electrostáticas e por isso desempenham tipicamente papéis relacionados com o balanço de cargas interfacial, com mediação em cadeias de controlo de tipo hormonal ou de impulso

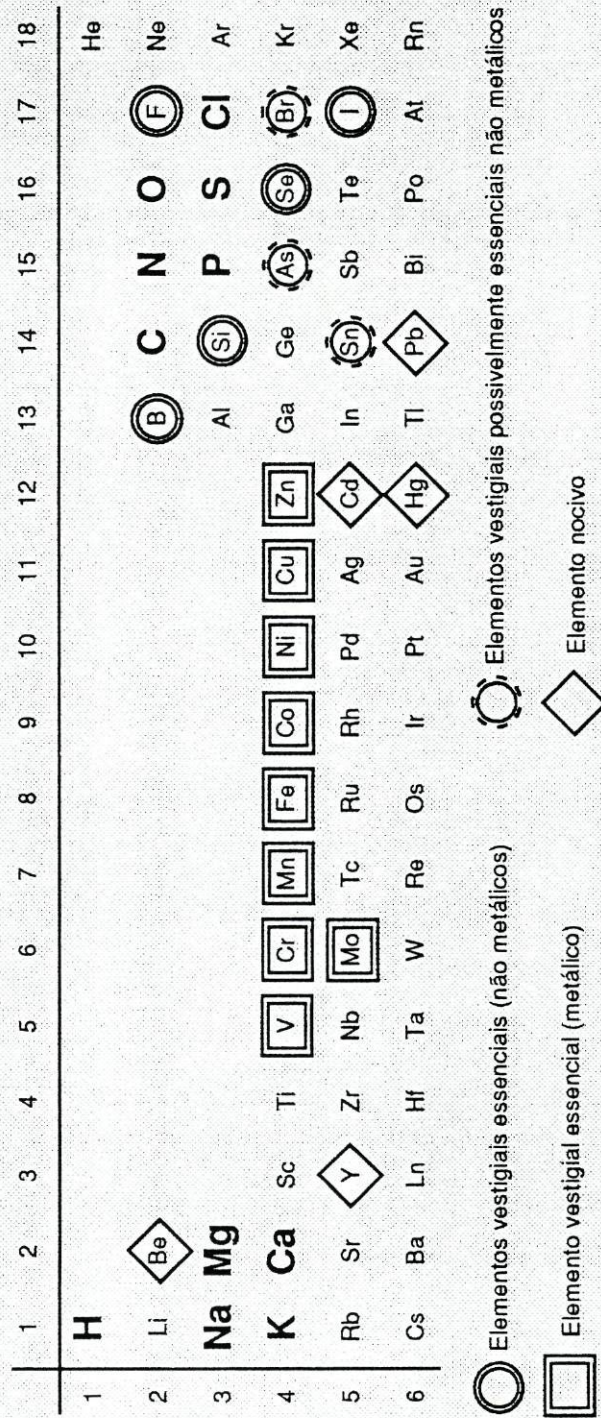


Figura 1.1 — Quadro periódico dos elementos, onde se assinala a importância de alguns elementos para os seres vivos; a corpo de letra maior estão assinalados os elementos mais abundantes que entram na sua composição.

eléctrico, ou com a estruturação a nível molecular (formação de pontes intramoleculares entre grupos carboxílicos em proteínas) e a nível macroscópico (formação da estrutura óssea).

A bioquímica dos cationes dos elementos 23 (vanádio) a 30 (zinco), grupo a que se pode juntar o molibdénio do 5º período do quadro periódico dos elementos, envolve sobretudo a coordenação a ligandos biológicos, alterando em alguns casos o seu estado de oxidação, e o seu papel principal é desempenhado nos centros activos das enzimas como cofactor na catálise de reacções orgânicas. Algumas dessas reacções biológicas catalisadas por enzimas são também catalisadas *in vitro* por complexos de cationes metálicos, sem a presença de enzimas, observando-se uma velocidade de reacção superior à reacção não catalisada mas inferior à reacção catalisada enzimaticamente [1]. A maior velocidade de reacção proporcionada pela enzima está relacionada com a especial geometria imposta pelos grupos coordenantes da proteína e que será semelhante à observada para o estado de transição (estado entático), diminuindo por essa via a energia de activação da reacção.

Tal como a concentração do catione H^+ , a concentração dos cationes metálicos essenciais é controlada de uma forma activa nos seres vivos existindo uma grande interdependência entre as suas concentrações. A sua deficiência ou excesso tem consequências graves para a saúde sendo causa de um grande número de doenças.

Os cationes de metais pesados são em geral prejudiciais por inactivarem importantes enzimas, substituindo os cationes essenciais, ou por coordenarem em grande extensão aos ácidos nucleicos (ADN e ARN), o que explica a elevada toxicidade associada, por exemplo, aos cationes Pb^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} . Por outro lado, as situações de envenenamento por esses metais são muitas vezes agravadas pela sua acumulação nos tecidos devido à ausência de mecanismos eficazes para a sua inactivação ou excreção.

2. O papel biológico do zinco

O CATIONE ZINCO(II), QUE É O ELEMENTO vestigial mais abundante depois do ferro, tem importantes funções intra- e extracelulares, e ocorre sobretudo associado a proteínas, muitas delas enzimas em que o zinco faz parte do centro activo.

A estabilidade do seu estado de oxidação +2 é suficiente para impedir um envolvimento directo em reacções de oxidação-redução e, por outro lado, a sua dureza intermédia permite que forme ligações com uma grande variedade de grupos orgânicos de uma forma pouco selectiva.

O catião zinco tem um papel essencial na organização da estrutura dos cromossomas nos eucariotas, onde se liga aos nucleotídeos do ADN, bem como na regulação da expressão genética através dos receptores/promotores dedos-de-zinco (*zinc-fingers*: coordenação do zinco a cadeias polipeptídicas e ácidos nucleicos), na síntese das bases nucleotídicas (aspartato transcarbamilase) e do ADN e ARN (ADN-polimerase e ARN-polimerase). Está assim intimamente relacionado com o crescimento e desenvolvimento celular e a sua deficiência na dieta provoca crescimento retardado (mental e físico) e malformações corporais.

Nas proteínas de armazenamento e transporte de catiões metálicos, como na metalotionina, o zinco está coordenado por quatro átomos de enxofre (resíduos de cisteína) numa geometria aproximadamente tetraédrica. Esta geometria de coordenação também se encontra em proteínas onde o zinco tem uma função estrutural ou reguladora, envolvendo átomos de azoto e enxofre como dadores (Figura 1.2).

Nas enzimas em que o zinco tem uma função catalítica (no centro activo) a esfera de coordenação é constituída por átomos de azoto (anel imidazola da histidina), oxigénio (grupos carboxílicos de vários aminoácidos) ou enxofre (cisteína), ficando sempre uma ou duas posições de coordenação livres para a ligação do substrato (geometria tetra-, penta- ou hexa-coordenada após a ligação do substrato).

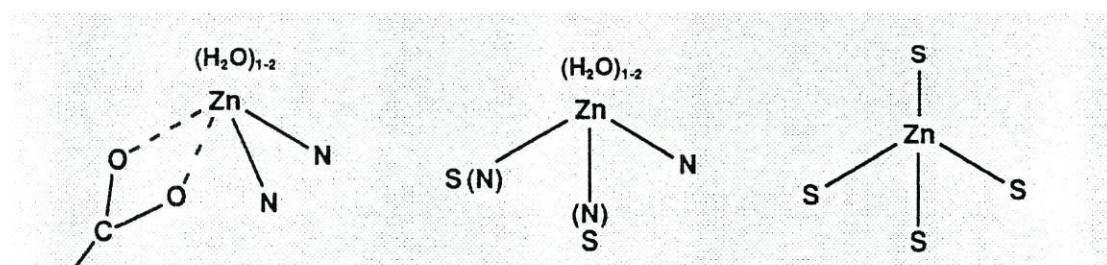


Figura 1.2 — Alguns tipos de grupos dadores e da geometria de coordenação do zinco(II) em proteínas; a geometria é condicionada sobretudo pela macromolécula quelante. N representa um resíduo de histidina e S pode representar tiolato ou um resíduo de cisteína. (Reproduzido da referência 2)

A constante de ligação de Zn^{2+} às enzimas tem um valor alto, tipicamente da ordem dos 10^9 , mas essa ligação é no entanto bastante lábil, como também o é a ligação do substrato ao catião metálico. O catião $Zn(II)$ tem uma configuração de valência $3d^{10}$, praticamente não polarizável, e assume várias geometrias de coordenação. Estas características, aliadas à não rigidez dos grupos que ligam o catião zinco às enzimas, tornam possível pequenas variações na sua geometria de coordenação que permitem aumentar a velocidade das reacções catalisadas [2].

As reacções catalisadas pelas enzimas que contêm zinco(II), que é um ácido de Lewis forte, tiram partido da sua capacidade de captação de electrões para a activação dos substratos, aumentando a sua electrofilicidade. Encontra-se assim no centro activo de enzimas intracelulares e extracelulares de degradação hidrolítica de proteínas (carboxipeptidases, aminopeptidases e colagenases) e de ligações fosfato (fosfatases) [3]; uma representação esquemática da configuração do centro activo da enzima carboxipeptidase A pode ser observado na Figura 1.3.

3. Aspectos biológicos da química do cádmio e do mercúrio

OS CATIONES CÁDMIO(II) E MERCÚRIO(II) são prejudiciais para o bom funcionamento celular sobretudo devido ao facto de poderem substituir o catião zinco(II) em muitas enzimas, substituição que reduz drasticamente ou inibe a actividade dessas enzimas por alteração da conformação, e logo da reactividade, do centro activo. Estes iões, sendo mais macios, apresentam grande tendência para se ligarem a átomos de azoto e enxofre e originam geometrias de coordenação diferentes do zinco: o catião $Cd(II)$ prefere formar complexos octaédricos enquanto que o catião $Hg(II)$ tem tendência para formar complexos lineares. Tanto o cádmio(II) como o mercúrio(II) podem coordenar à carboxipeptidase A no mesmo local que o catião zinco(II) mas, como não preservam uma geometria de coordenação tetraédrica, tornam muito pouco favorável a ligação do substrato (grupo carbonilo de um aminoácido numa proteína ou peptídeo), inactivando assim a enzima. Do mesmo modo, o catião cádmio compete favoravelmente com o catião zinco para a ligação à metalotionina desregulando o metabolismo do zinco [4].

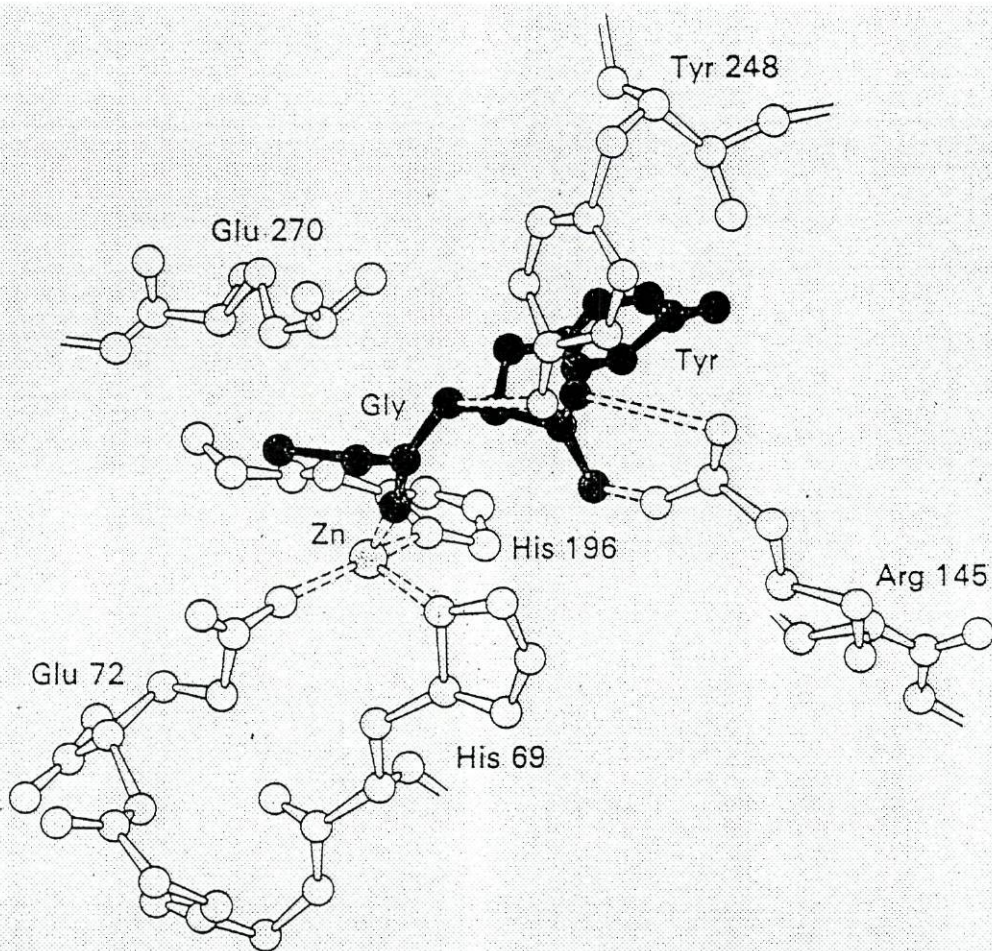


Figura 1.3 — Disposição dos grupos que coordenam o catião zinco na enzima carboxipeptidase A; a cheio é mostrado o substrato glicil-tirosina. (Reproduzido de *Biochemistry*, L. Stryer, W. H. Freeman and Company, 1981)

O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre proveniente da dissolução de minerais contendo mercúrio em cursos de água e também devido à acção do Homem, através da mineração, da combustão de combustíveis fósseis e da sua utilização na indústria e na agricultura. O catião mercúrio(II) é muitas vezes metabolizado por microorganismos e plantas a compostos de organomercúrio (R-Hg, R-Hg-R, R-Hg-X, R=alquil, aril, sendo o mais vulgar -CH₃ por transferência da metilcobalamina, X=halogeneto, acetato, etc) que, por serem compostos voláteis, se libertam desses microorganismos sob a forma de vapor (Figura 1.4). Estes compostos têm uma acção tóxica muito superior à do catião Hg²⁺ nos organismos superiores, devido às características lipossolúveis que lhes permitem atravessar facilmente as membranas celulares e serem absorvidos no intestino. Também ocorrem por vezes outros estados de oxidação do mercúrio para além do divalente, como Hg⁺ e Hg⁰, como resultado de reacções biológicas principalmente devidas a microorganismos.

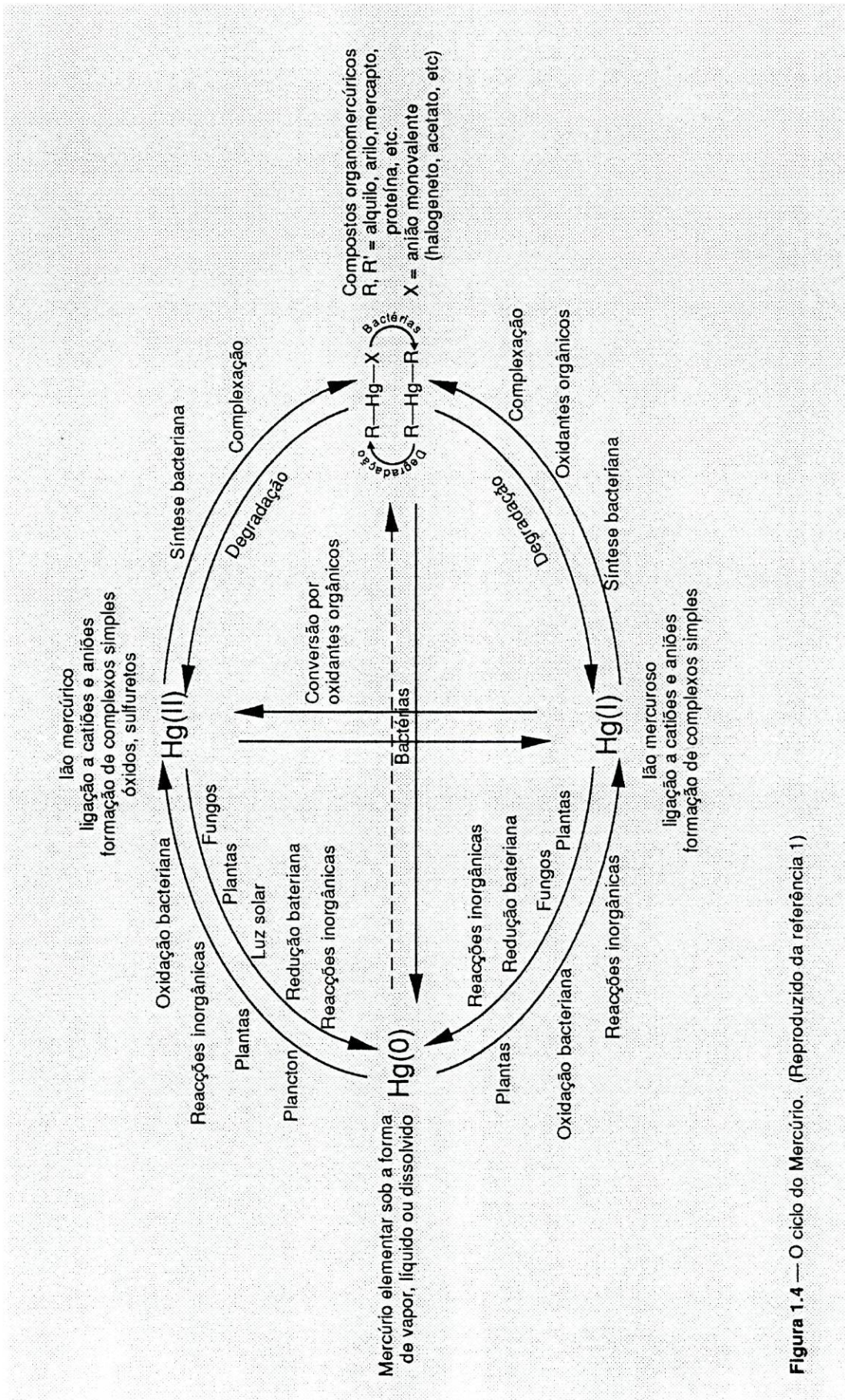


Figura 1.4 — O ciclo do Mercúrio. (Reproduzido da referência 1)

Os compostos de mercúrio têm um tempo de semi-vida de vários meses no Homem e actuam por desestabilização das membranas fosfolipídicas, por ligação a todas as proteínas com grupos -SH, destruindo a sua estrutura, bem como substituindo o catião zinco no centro activo de muitas enzimas. Liga-se também fortemente às bases e aos grupos fosfato dos ácidos nucleicos, introduzindo grandes alterações na estrutura do material genético. Todas estas acções do mercúrio e a dificuldade na sua excreção tornam-no tóxico mesmo em pequena concentração, provocando inicialmente alterações do sistema nervoso (encefalite e neurite).

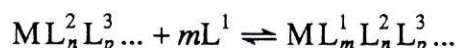
O catião mercúrio(II) pode ligar-se nos organismos vivos a hidratos de carbono [5], por exemplo, mas a sua principal acção é a ligação aos grupos amina e tiol das proteínas e ácidos nucleicos. A sua maior tendência é para a coordenação a aminoácidos que contenham átomos de enxofre disponíveis [6-9] mas a sua ligação a aminoácidos através dos seus grupos amina é também importante [10,11]. Talvez o papel mais nocivo do mercúrio nos seres vivos, normalmente sob a forma de metilmercúrio, é o seu efeito mutagénico e desnaturante sobre o ADN por via da sua ligação aos ácidos nucleicos, assunto que tem sido largamente estudado [12-16].

Os complexos de mercúrio e metilmercúrio com aminoácidos, peptídeos e moléculas análogas tem sido muito estudado desde que foi descoberto o seu efeito nocivo nos seres vivos. Tanto a química organometálica como inorgânica do mercúrio e do metilmercúrio desempenham um papel importante em aspectos relacionados com a poluição e toxicidade [17,18] e a procura de antídotos para os envenenamentos por mercúrio têm constituído uma parte importante dos estudos realizados sobre a acção destas espécies mercuriais [19].

O catião cádmio(II) ocorre em menor quantidade que o mercúrio sendo também menos absorvido a nível intestinal. Para além de provocar uma desregulação no metabolismo do Ca^{2+} e de outros catiões essenciais, tem um efeito nocivo sobre a estrutura das biomembranas, substitui o zinco como ácido de Lewis em muitas enzimas, alterando o seu funcionamento, e liga-se, tal como o mercúrio, aos grupos tiol das proteínas, provocando sintomas de alteração do funcionamento renal [20]. A propensão do catião cádmio para a ligação aos ácidos nucleicos é também bem conhecida, resultando numa acção mutagénica e desreguladora do metabolismo [1].

4. Aspectos da química de complexação dos cationes do grupo 12

AS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO, K , para a formação de um complexo de um catione metálico M com um ligando L^1 segundo a equação (as cargas estão omitidas)



onde n, p, \dots são maiores ou iguais a zero e m é maior que zero, será designada em geral como constante de associação ou constante de estabilidade. A relação desta quantidade com a energia de Gibbs (energia livre da reacção) faz com que ela traduza não só a força das ligações formadas como também a contribuição entrópica para a reacção.

Em solução aquosa os cationes metálicos possuem uma esfera de hidratação, ou seja, moléculas de água coordenada, que são substituídas pelos ligandos que entram na (primeira) esfera de coordenação por mecanismos dissociativos (S_N1) ou associativos (S_N2). Embora condicionado pelo tipo de ligandos que entram e que saem da primeira esfera de coordenação, são esperados mecanismos dissociativos, principalmente para Zn^{2+} e para Cd^{2+} , embora para o mercúrio(II) sejam possíveis também mecanismos associativos devido ao seu maior tamanho [21]. As reacções de substituição são rápidas, devido à configuração de valência d^{10} dos cationes dipositivos do grupo 12 que torna a energia de estabilização do campo do ligando nula, o que determina que as alterações na geometria de coordenação associadas à passagem para o estado de transição ocorram sem grande diferença de energia relativamente ao estado inicial. A velocidade destas reacções é essencialmente determinada pela velocidade da troca com o solvente de moléculas de água coordenada, sendo essa velocidade maior para o zinco e menor para o mercúrio [20].

Os cationes Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} são ácidos de Lewis fortes, com um grau de dureza crescente do catione mercúrio(II) para o catione zinco(II). Assim, tanto o cádmio como o mercúrio ligam-se mais fortemente (maiores constantes de equilíbrio) a átomos dadores como o azoto e o enxofre do que o zinco, que se liga mais fortemente a grupos com átomos de oxigénio do que os outros elementos do seu grupo; o catione mercúrio(II) forma ligações estáveis com átomos de carbono ao contrário do que acontece com os cationes cádmio(II) e zinco(II).

As geometrias de coordenação variam bastante ao longo do grupo: enquanto que o catião zinco forma preferencialmente complexos com geometria tetraédrica (embora também se observem complexos octaédricos deste catião) o cádmio apresenta uma coordenação octaédrica e, mais raramente, tetraédrica. O mercúrio(II) difere radicalmente dos outros catiões do grupo por preferir uma geometria linear de coordenação em complexos com ligandos biológicos, embora sejam conhecidos alguns complexos tetraédricos.

A estabilidade dos complexos é condicionada não só pelas características do metal e do ligando (a possibilidade de formação de ligações π , a carga dos ligandos e do catião, a compatibilidade entre os graus de "dureza" do metal e dos ligandos, a formação de quelatos, etc.), mas para a formação de complexos ternários mistos há que atender à contribuição de factores de estabilidade de natureza essencialmente estatística. Este tipo de complexos, formados por um catião metálico e dois ligandos diferentes, é frequentemente encontrado na química biológica e alguns dos seus aspectos mais importantes serão tratados na secção seguinte.

5. Complexos ternários mistos e a sua importância para a química biológica

A QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE CATIÕES metálicos com ligandos de origem biológica tem sido bastante estudada dada a sua importância para a química biológica. Nas secções introdutórias dos capítulos que compõe Parte II desta tese é citada e analisada a bibliografia relacionada com a química de coordenação dos catiões do grupo 12 com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos. No Capítulo 3 é dada uma perspectiva matemática da probabilidade de formação de complexos mistos e da sua estabilidade relativa.

A observação de que muitos catiões de metais de transição actuam como cofactores enzimáticos levou à procura de modelos *in vitro* que explicassem o seu modo de actuação na catálise biológica. Foi reconhecido que as esferas de coordenação desses catiões nos centros activos das enzimas, que na sua maioria podem ser designados como "macroquelatos", alguns bastante rígidos, contêm frequentemente uma mistura de diferentes grupos coordenantes e que, devido à imposição estereoquímica (entática) da macromolécula, as geometrias de coordenação são em

geral muito distorcidas relativamente às geometrias encontradas com ligandos unidentados ou bidentados *in vitro*. Um outro aspecto importante e particular é a mistura de diversos tipos de ligandos na esfera de coordenação do cátion metálico. Foi postulado que a relativa rigidez da proteína coordenante destinar-se-ia a tornar cineticamente estável o complexo de cátion metálico para compensar a instabilidade termodinâmica introduzida pela distorção da esfera de coordenação. Essa instabilidade permitiria no entanto aumentar a reactividade e labilidade das posições de coordenação disponíveis para a ligação do substrato, substrato esse que muitas vezes interacciona hidrofobicamente ou através de pontes de hidrogénio com outros resíduos de aminoácidos ou coenzimas da proteína. Põe-se assim a questão da importância da interacção entre ligandos para a formação do complexo enzimático bem como da influência dos ligandos da enzima sobre as propriedades químicas do cátion, nomeadamente acidez de Lewis e estereoespecificidade, que poderão interferir sobre a ligação de um terceiro ligando (substrato) [21].

Embora não esteja positivamente demonstrado que as características especiais de estabilidade dos complexos ternários estejam directamente relacionadas com a formação dos complexos enzimáticos, esse tipo de complexos ocorre frequentemente na química biológica.

Na Parte II é apresentado um estudo sobre a formação de complexos ternários mistos de cationes divalentes do grupo 12 com um nucleotídeo (citidina) e um dipeptídeo (glicilglicina) onde foi avaliada a sua estabilidade relativamente aos correspondentes complexos binários e a eventual presença de cooperatividade. É de realçar que nestes casos não é esperada a presença de interacções hidrofóbicas ou de empilhamento entre os ligandos para a estabilização dos complexos mistos.

Ressonância Magnética Nuclear

A TEORIA DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA nuclear de transformada de Fourier tem sido abundantemente descrita na literatura, sob os seus diversos aspectos, e o exposto neste capítulo é uma compilação e adaptação de partes de alguns livros de texto [22-27], tendo como critério a selecção dos temas e aspectos fundamentais, e também alguns mais específicos, com relevância para o trabalho experimental.

1. Aspectos básicos da descrição semi-clássica de RMN

1.1 Fundamentos a nível nuclear

Os NÚCLEOS ATÓMICOS de muitos nuclídeos possuem um momento angular intrínseco, \mathbf{a} , cuja magnitude a é dependente do número quântico de spin I :

$$a = [I(I+1)]^{1/2} h / (2\pi) \quad (2.1)$$

onde h é a constante de Planck. Sendo o momento angular uma grandeza vectorial é necessário definir, para além da sua magnitude, a sua orientação relativamente a uma determinada direcção z , orientação essa que é caracterizada pelo número quântico direccional m_I que pode tomar valores $-I, -I+1, \dots, I-1, I$, sendo

$$a_z = m_I h / (2\pi) \quad (2.2)$$

No que se segue considerar-se-á apenas o caso de núcleos que no estado fundamental possuam $I = 1/2$.

Os núcleos atómicos possuem também um momento magnético intrínseco proporcional ao seu momento angular de spin:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{a} \quad (2.3)$$

onde γ é a chamada relação magnetogírica que é característica de cada tipo de núcleo. Para os núcleos utilizados neste trabalho, ^{13}C e ^1H , γ é positivo com valores de, respectivamente, $6,7283 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $26,7519 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Na ausência de um campo de indução magnética externo, \mathbf{B}_0 (que ao longo deste texto será denominado apenas por campo magnético), ambos os estados de spin nuclear são energeticamente degenerados. A interacção dos dipolos magnéticos nucleares μ com um campo magnético externo homogéneo e estático \mathbf{B}_0 , paralelo a uma direcção z , introduz uma diferença entre as energias desses estados como resultado do alinhamento da componente μ_z paralela ou antiparalelamente com o campo magnético. As componentes μ_x e μ_y têm uma orientação aleatória (indeterminada), sendo possível considerar, recorrendo a uma analogia com a mecânica clássica, que existe precessão de μ em torno de \mathbf{B}_0 .

As energias E dos estados de spin, conhecidas por energias de Zeeman, são proporcionais ao campo de indução magnética aplicado, \mathbf{B}_0 :

$$E = -\mu \cdot \mathbf{B}_0 = -\gamma m_I h / (2\pi) \mathbf{B}_0. \quad (2.4)$$

Para $I = 1/2$ temos que:

$$\Delta E = h\nu = E_\beta - E_\alpha = E_{-1/2} - E_{+1/2} = \gamma h / (2\pi) \mathbf{B}_0. \quad (2.5)$$

Assim, a diferença de energia entre os dois estados de spin e, portanto, a frequência ν da radiação electromagnética capaz de provocar transições entre eles, é também uma função da magnitude do campo magnético aplicado e da relação magnetogírica, sendo a regra de selecção para as transições $\Delta m_I = \pm 1$.

1.2 Fundamentos a nível macroscópico

EM MECÂNICA QUÂNTICA pode ser demonstrado que o conhecimento de, por exemplo, a componente m_z para um núcleo individual introduz uma indeterminação nos valores das outras componentes do momento magnético de spin desse núcleo. No entanto, é possível conhecer com precisão todas as componentes da magnetização total de uma amostra macroscópica que resulta das contribuições dos momentos magnéticos de cada núcleo individual dessa amostra. A justificação deste facto é dada pelo teorema do limite central cujo resultado principal afirma que, independentemente do grau de incerteza relativo ao valor de uma determinada variável para um objecto individual, o seu valor total para um conjunto grande de objectos pode ser conhecido com grande precisão. O comportamento magnético a nível macroscópico de um conjunto muito grande de núcleos pode portanto ser descrito pelos meios da física clássica.

Macroscopicamente, a já referida precessão dos momentos magnéticos μ em torno de \mathbf{B}_0 implica o anulamento da resultante da soma das componentes no plano xy devido à sua distribuição aleatória (incoerência de fase). O aparecimento de uma magnetização não nula \mathbf{M} numa amostra exposta a um campo magnético \mathbf{B}_0 paralelo ao eixo dos zz só é possível se houver uma diferença entre as populações dos dois níveis de energia acessíveis para núcleos com $I = 1/2$ (α , para $m_I = -1/2$ e β , para $m_I = +1/2$) uma vez que as componentes μ_z para esses dois estados são de igual magnitude mas de sinal contrário.

A distribuição dos núcleos pelos dois níveis de energia segue uma distribuição de Maxwell-Boltzmann

$$N_\alpha/N_\beta = \exp(\Delta E/(kT)) \approx 1 + \Delta E/(kT) \quad (2.6)$$

onde k é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. A truncagem feita no exponencial baseia-se no facto de que ΔE , que é igual a $\gamma h/(2\pi) B_0$, é muito menor que a energia térmica kT a temperaturas próximas da temperatura ambiente (para núcleos de ^1H a 25°C sujeitos a um campo magnético estático de 9,4 T, a proporção $\Delta E/kT$ seria de $2,65 \times 10^{-25} \text{ J} / 4,11 \times 10^{-21} \text{ J}$). A diferença entre as duas populações é portanto dada por

$$N_\alpha - N_\beta = N \Delta E / (2kT) \quad (2.7)$$

onde $N = N_\alpha + N_\beta$. Esta diferença é muito pequena quando comparada com as que ocorrem em outras técnicas espectroscópicas (U.V./Vis. e I.V. por exemplo) o que explica a relativa baixa sensibilidade da técnica.

A absorção de energia por um sistema de spins tende a igualar as populações dos dois níveis por provocar transições de estado de spin nuclear enquanto que a relaxação do sistema de spins para o meio circundante (rede) permite repôr a diferença de população entre os dois níveis de energia.

Equações diferenciais de Bloch

A descrição macroscópica e clássica de Bloch da ressonância magnética nuclear é limitada a sistemas simples e é complementar à utilização de um Hamiltoniano de spin. É no entanto útil para a introdução de conceitos como a interacção radiação-spins, a relaxação, a forma de banda e o referencial rotativo.

A magnetização \mathbf{M} de uma amostra é o somatório dos momentos magnéticos individuais:

$$\mathbf{M} = \sum_j \mu_j = \gamma \mathbf{A} \quad (2.8)$$

onde \mathbf{A} representa o momento angular de spin nuclear total. A interacção entre \mathbf{B} e \mathbf{M} origina um binário e é descrita pela equação

$$d\mathbf{M}/dt = \gamma d\mathbf{A}/dt = -\gamma \mathbf{B} \times \mathbf{M}. \quad (2.9)$$

A solução deste sistema de equações diferenciais traduz a precessão da magnetização em torno do campo magnético, conhecida como precessão de Larmor, com uma velocidade angular $\omega_0 = -\gamma \mathbf{B}$ de frequência $\omega = \gamma \mathbf{B}/(2\pi)$, a denominada frequência de Larmor (Figura 2.1). Para campos magnéticos normalmente utilizados (2 a 12 T) a frequência de Larmor situa-se nas dezenas ou centenas de MHz, dependendo do tipo de núcleo.

A variação da magnetização originada pela aplicação do campo magnético \mathbf{B}_0 ou pela relaxação em direcção ao estado de equilíbrio, \mathbf{M}_0 , não está prevista na equação 2.9. A variação da componente longitudinal M_z implica transferência da energia do sistema de spins para a rede enquanto que a variação das componentes transversais (M_x e M_y) de \mathbf{M} podem ter origem em fenómenos diferentes, sem que ocorra transferência de energia para a rede. Bloch assumiu uma variação uni-exponencial para as componentes de \mathbf{M} mas com duas constantes de tempo diferentes: T_1 , constante de relaxação spin-rede ou longitudinal, para M_z e T_2 , constante de relaxação spin-spin ou transversal, para M_x e M_y . As equações fenomenológicas de

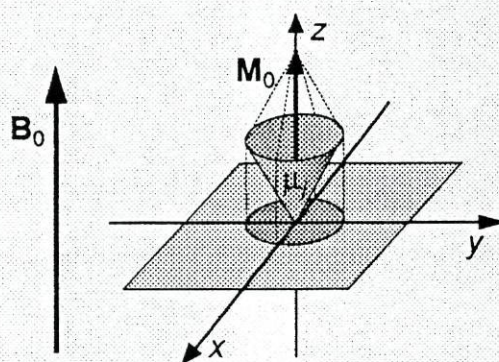


Figura 2.1 — Componentes da magnetização originada pela aplicação de um campo magnético a uma amostra macroscópica situada na origem do referencial.

Bloch contém assim a precessão de Larmor bem como termos correspondentes à relaxação:

$$d\mathbf{M}/dt = -\gamma\mathbf{B} \times \mathbf{M} - (M_z - M_0)\mathbf{k} / T_1 - (M_x \mathbf{i} + M_y \mathbf{j}) / T_2 \quad (2.10)$$

onde \mathbf{i} , \mathbf{j} e \mathbf{k} são vectores unitários nas direcções x , y e z , respectivamente.

Nas experiências de ressonância magnética nuclear é emitida radiação electro-magnética em direcção à amostra segundo, por exemplo, o eixo dos xx . A componente magnética da radiação, $2B_1\cos(\omega t)$, muito menor que \mathbf{B}_0 , oscila no plano xy podendo ser resolvida em duas componentes rodando em sentidos opostos com velocidade angular $\pm\omega$. Só a componente que roda no mesmo sentido que a frequência de Larmor, $-\omega$, poderá interferir com a magnetização. O campo magnético \mathbf{B} que actua sobre a amostra é assim dado por

$$\mathbf{B} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_1 = B_1\cos(\omega t)\mathbf{i} + B_1\sin(\omega t)\mathbf{j} + B_0\mathbf{k}. \quad (2.11)$$

A \mathbf{B}_0 podem ainda ser adicionadas pequenas contribuições resultantes do acoplamento internuclear indirecto e da protecção electrónica sobre os núcleos. Para núcleos do mesmo tipo numa determinada molécula e em função da sua vizinhança química, aquelas contribuições alteram a frequência de ressonância de núcleo para núcleo, adicionando informação preciosa aos espectros. Estas contribuições, que fazem com que o espectro de uma determinada espécie nuclear possa ser um multipletto e não um sinal único, serão analisadas com mais detalhe em secções ulteriores, mas não são consideradas explicitamente na equação 2.11.

O campo magnético \mathbf{B} é oscilante e, por não ser colinear com o eixo dos zz , o binário aplicado na magnetização gera componentes desta no plano xy que podem ser detectadas por induzirem corrente eléctrica num solenóide (Figura 2.2). Por substituição de \mathbf{B} da equação 2.11 nas equações de Bloch (equação 2.10) e separando as componentes, obtém-se:

$$dM_x/dt = \gamma[B_0M_y + B_1\sin(\omega t)M_z] - M_x/T_2 \quad (2.12)$$

$$dM_y/dt = -\gamma[B_0M_x - B_1\cos(\omega t)M_z] - M_y/T_2 \quad (2.13)$$

$$dM_z/dt = -\gamma[B_1\cos(\omega t)M_y + B_1\sin(\omega t)M_x] - (M_z - M_0)/T_1 \quad (2.14)$$

Estas equações são relativas a um referencial fixo (x , y , z) do laboratório. O efeito de \mathbf{B}_1 sobre a magnetização da amostra é melhor entendido num referencial rotativo de

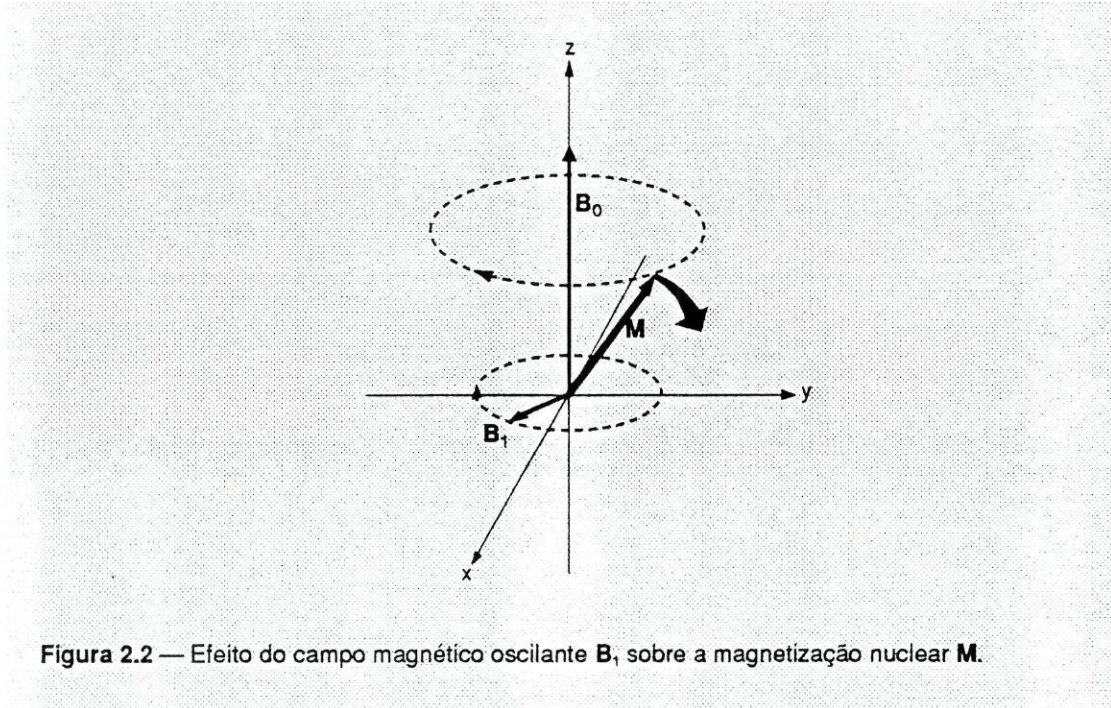


Figura 2.2 — Efeito do campo magnético oscilante B_1 sobre a magnetização nuclear M .

eixos (x', y', z) que roda solidário com o campo B_1 com uma velocidade angular $-\omega$. Neste novo referencial as componentes da magnetização, designadas por u (ao longo da semi-eixo positivo de x') e v (ao longo da semi-eixo positivo de y'), são descritas por:

$$u = M_x \cos(\omega t) - M_y \sin(\omega t) \quad (2.15)$$

$$v = M_x \sin(\omega t) + M_y \cos(\omega t) \quad (2.16)$$

e a variação destas componentes no referencial rotativo é dada por:

$$dM_z/dt = -\gamma B_1 v - (M_z - M_0)/T_1 \quad (2.17)$$

$$dM_x/dt = du/dt = (\omega_0 - \omega)v - u/T_2 \quad (2.18)$$

$$dM_y/dt = dv/dt = -(\omega_0 - \omega)u + \gamma B_1 M_z - v/T_2 \quad (2.19)$$

onde $\omega_0 = \gamma B_0$ é a frequência de Larmor. Estas equações resultam da equação 2.10 se se considerar que o campo B é um campo eficaz definido por

$$B_{\text{ef.}} = B_0 + (\omega/\gamma) + B_1 = [(\omega_0 - \omega)/\gamma] + B_1 \mathbf{i}'$$

e substituindo M_x e M_y pelas suas equivalentes no referencial rotativo, u e v . Nesse referencial a precessão efectua-se em torno de $B_{\text{ef.}}$ que se encontra no plano $x'z$ entre B_0 e B_1 , dependendo do valor de ω . Na condição de ressonância ($\omega = \omega_0$), $B_{\text{ef.}}$ é igual a B_1 (eixo x') e portanto a magnetização roda no plano $y'z$ com frequência angular $-\gamma B_1$.

Um forte impulso de radiofrequência \mathbf{B}_1 de duração τ_p (tipicamente entre 1 e 50 ms), provoca uma rotação da magnetização no referencial rotativo de um ângulo $\theta = \gamma \mathbf{B}_1 \tau_p$ (radianos); se τ_p for muito menor que as constantes de tempo de relaxação transversal e longitudinal durante o impulso não há lugar a relaxação significativa. A análise de Fourier de um impulso muito curto de radiação monocromática mostra que é composto por um intervalo de frequências cuja amplitude é dada por

$$B_1(\nu) = \text{sen}[\pi(\nu - \nu_c) \tau_p] / [\pi(\nu - \nu_c) \tau_p] \quad (2.20)$$

em que a frequência central, ν_c , é denominada frequência portadora. Um impulso de 10 ms permite irradiar simultaneamente um intervalo de frequências suficientemente largo para abranger todas as possíveis ressonâncias de ^1H (ou de ^{13}C) com uma potência praticamente constante nesse intervalo.

A excitação do sistema por meio de um impulso de radiofrequência cria componentes da magnetização no plano $x'y'$ (excepto se θ for um múltiplo de 180°) o que equivale a dizer que provoca coerência de fase dos momentos nucleares nesse plano do referencial rotativo. Um impulso de 90° iguala as populações dos dois estados de spin, tal como acontece quando se satura a amostra, mas gera também componentes observáveis da magnetização no plano $x'y'$ que têm a sua intensidade máxima para um impulso de 90° (Figura 2.2). Um impulso de 180° inverte as populações dos níveis α e β sem gerar magnetização transversal mas apenas longitudinal ao longo de $-z$.

Após um impulso de 90° a magnetização decai para o seu estado de equilíbrio seguindo idealmente as leis de relaxação exponencial com constantes T_1 para M_z e T_2 para M_y (impulso segundo xx):

$$M_z(t) - M_0 = [M_z(0) - M_0] \exp(-t / T_1) \quad (2.21)$$

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0) \exp(-t / T_2) \quad (2.22)$$

onde T_1 e T_2 são as constantes da equação de Bloch e $M_z(0) = 0$.

A detecção efectuada pelo espectrómetro mede a magnetização transversal M_{xy} que, por oscilar sob o efeito de \mathbf{B}_0 , induz num solenóide um sinal de fase variável cuja amplitude decai com o tempo com uma constante temporal T_2^* , constante que incorpora o efeito da não homogeneidade de \mathbf{B}_0 . Esta evolução de M_{xy} com o tempo é designada por FID (*free induction decay*) e é geralmente a soma de várias frequências (interferograma) devido aos efeitos já referidos de desvio químico e de acoplamento nuclear indirecto.

A captação do sinal é feita junto à amostra por um solenóide, que pode ser aquele que serve para a emissão de \mathbf{B}_1 , sinal que é depois pré-amplificado e fornecido a um detector sensível à fase que possui dois canais pelos quais o sinal é dividido. A cada canal é fornecida como referência a onda portadora: em fase num deles e desfasada de 90° no outro. Este sistema designa-se por detecção em quadratura por ter dois canais desfasados de 90° . Obtém-se na prática um referencial rotativo com frequência ν_c o que permite detectar apenas o sinal diferença entre a frequência de Larmor e a frequência portadora ($\Omega = \omega - 2\pi\nu_c$) que é de muito menor frequência que ω . O sinal detectado para um núcleo particular após um impulso de 90° será:

$$M_x(t) = M_0 \exp(-t/T_2) \cos(\Omega t) \quad (2.23)$$

$$M_y(t) = M_0 \exp(-t/T_2) \sin(\Omega t) \quad (2.24)$$

sendo a componente M_x detectada no modo de absorção e M_y no modo de dispersão.

Após a detecção os sinais são digitalizados e armazenados. Ernst e Anderson [28,29] mostraram que a transformada de Fourier de uma série de números complexos em que a parte real é $M_x(t)$ e a parte imaginária é $M_y(t)$, permite obter uma função cujo valor (intensidade) depende da frequência Ω , o espectro de RMN, e o sinal algébrico de $\Omega = \omega - 2\pi\nu_c$ fica desse modo também definido.

A transformada de uma função sinusoidal do tempo é uma função lorentziana da frequência:

$$\int \exp(-t/T_2) \cos(\omega - 2\pi\nu_c)t \, dt = T_2 / [1 + T_2^2 (\omega - 2\pi\nu_c)^2] \quad (2.25)$$

(intervalo de integração de 0 a $+\infty$), com largura de banda a meia altura dada por $1/(\pi T_2)$. Como existem contribuições para a largura de banda não "naturais", tal como a não homogeneidade de \mathbf{B}_0 , define-se uma constante de relaxação transversal efectiva T_2^* sendo a largura de banda dada por $1/(\pi T_2^*)$, muito embora o sinal possa nesse caso não ter uma forma lorentziana.

1.3 O desvio químico

EM MOLÉCULAS DIAMAGNÉTICAS, o campo magnético exterior \mathbf{B}_0 interfere com os momentos angular orbital e de spin dos electrões que rodeiam os núcleos, gerando correntes cujo campo magnético é adicionado ao externamente aplicado. Por esta razão os núcleos não sentem um campo \mathbf{B}_0 mas sim um campo:

$$\mathbf{B}' = -\sigma \mathbf{B}_0 \quad (2.26)$$

sendo σ a constante de protecção magnética que pode ser diferente de núcleo para núcleo numa mesma molécula. A constante de protecção magnética σ varia com a orientação das moléculas relativamente ao campo magnético, devido à anisotropia da distribuição dos electrões, sendo de facto uma quantidade tensorial que depende da estrutura da molécula. No entanto, em situações de rápido movimento molecular em gases e líquidos, o núcleo sente apenas o valor médio da protecção magnética o que permite obter espectros de grande resolução. Uma grande anisotropia de protecção electrónica pode no entanto ser fonte de alargamento de banda e de relaxação para alguns núcleos, mesmo em líquidos ou soluções.

Considerando uma amostra fluída, temos para um núcleo i

$$B_z^i = (1 - \sigma^i) B_0 \quad (2.27)$$

e para a condição de ressonância

$$\nu^i = |\gamma| B_z^i / (2\pi) = |\gamma| (1 - \sigma^i) B_0 / (2\pi) = \nu_0 (1 - \sigma^i) \quad (2.28)$$

Assim, uma maior protecção magnética corresponde a uma diminuição da frequência de ressonância relativamente à frequência na ausência de protecção electrónica, ν_0 .

O desvio químico é uma quantidade relativa e define-se como a diferença

$$\nu_{ij} = \nu_i - \nu_j = |\gamma| (\sigma^j - \sigma^i) B_0 / (2\pi) = \nu_0 (\sigma^j - \sigma^i) \quad (2.29)$$

entre um núcleo i e um núcleo j , que é dependente do campo B_0 . A forma mais frequente de definir desvio químico usa a expressão

$$\delta_{ij} = (\nu_i - \nu_j) / \nu_j = \sigma^j - \sigma^i \quad (2.30)$$

que é independente do campo magnético e que se exprime geralmente em partes por milhão (ppm).

Existem muitas substâncias que são utilizadas como referência interna para RMN, ou seja, substâncias que são dissolvidas na amostra e cuja frequência de ressonância serve como padrão para a medição dos desvios químicos. Estas substâncias padrão devem obedecer a determinados requisitos como por exemplo não interagirem com a substância em estudo, terem, se possível, apenas uma frequência de ressonância e serem solúveis no solvente utilizado na amostra. Em certos casos é necessário usar uma referência externa que é colocada num suporte estanque, geral-

mente um tubo capilar selado, dentro da amostra. Este procedimento não é equivalente a ter uma referência interna porque sendo $\mathbf{B}_0 = \mu \mathbf{H}_0$, a permeabilidade magnética do meio, μ , é diferente da amostra para a referência, sendo o desvio químico da referência diferente nos dois meios.

1.4 Acoplamento internuclear indirecto

O ACOPLAMENTO DIRECTO (através do espaço) médio entre os dipolos nucleares é nulo, em termos da contribuição para subdivisão dos níveis de energia, para regimes de rotação rápida e isotrópica das moléculas, proporcionando no entanto um mecanismo de relaxação. Existe, no entanto, um mecanismo indirecto de acoplamento dipolar nuclear por intermédio dos electrões das ligações químicas. Este acoplamento tem como resultado uma pequena contribuição para o campo magnético sentido pelos núcleos acoplados que se traduz no desdobramento dos seus sinais de RMN devido ao desdobramento dos níveis de energia. Os níveis de energia (em unidades de frequência) para os núcleos de uma molécula em movimento isotrópico são obtidos da equação

$$h^{-1}E = -\sum_j \nu_j m_j + \sum_{j < k} J_{jk} m_j m_k \quad (2.31)$$

onde $\nu_j = |\gamma_j| (1 - \sigma^j) B_0 / (2\pi)$ (ver a equação 2.28) e J é a constante de acoplamento escalar entre dois núcleos. O segundo termo da equação 2.31 refere-se precisamente ao acoplamento escalar, sendo as regras de selecção para as transições: $\Delta m_j = \pm 1$ e $\Delta m_k = 0$ ($k \neq j$).

Se um núcleo está acoplado com n núcleos equivalentes (com o mesmo desvio químico e as mesmas constantes de acoplamento) o seu sinal de RMN será desdobrado num multiplete com $2n + 1$ sinais de frequências diferentes. As proporções entre as intensidades desses sinais para núcleos de spin 1/2 obedece aos números do triângulo de Pascal para os coeficientes do desenvolvimento da potência n de um binómio. A distância em Hertz entre os sinais do multiplete é, aproximadamente, a constante de acoplamento, J , que é independente do campo magnético \mathbf{B}_0 . A constante de acoplamento toma valores que vão desde zero até às centenas de Hertz, podendo ser negativa ou positiva (embora isso não se reflita num espectro normal) e depende da distância entre os núcleos (número de ligações químicas entre eles) e da estrutura molecular.

A equação 2.31 é válida para espectros de 1ª ordem, ou seja, para espectros em que $\delta_i - \delta_j \gg J_{ij}$. Diz-se nesse caso que os núcleos estão fracamente acoplados e são por vezes representados simbolicamente por letras afastadas do alfabeto (ex.: AX, AMX). Os espectros que não obedecem à condição $\delta_i - \delta_j \gg J_{ij}$ dizem-se de 2ª ordem e apresentam distorções na intensidade e na composição dos sinais dos multipletos. Diz-se então que os núcleos estão fortemente acoplados e representam-se simbolicamente por letras contíguas do alfabeto: AB, A₂BC.

O desacoplamento entre núcleos ocorre naturalmente, por vezes, mas também pode ser provocado. Quando um de dois núcleos acoplados está em permuta rápida intra ou intermolecularmente (com o solvente por exemplo), o outro sente apenas o valor médio dos estados de spin do primeiro, valor esse que é sempre zero. O desacoplamento pode ser induzido artificialmente através da saturação selectiva de um dos núcleos, que se obtém irradiando um dos multipletos com uma radiofrequência contínua de baixa potência. Este desacoplamento selectivo é geralmente usado entre núcleos da mesma espécie (desacoplamento homonuclear) mas também pode ser heteronuclear. Refira-se também que o desacoplamento pode não ser selectivo, como quando se pretende desacoplar os núcleos de ¹³C de uma amostra dos núcleos de hidrogénio (desacoplamento heteronuclear).

1.5 Permuta química

O EFEITO DE PROCESSOS DINÂMICOS a nível molecular têm muitas vezes reflexo nos espectros de RMN se ocorrerem próximo da sua escala temporal (Figura 2.3). A permuta intermolecular entre locais magneticamente não equivalentes em equilíbrio termodinâmico é um desses processos e os seus efeitos nos espectros de RMN podem ser utilizados para a medição de constantes de equilíbrio, constantes de velocidade ou parâmetros termodinâmicos do processo, e, em casos favoráveis, para obter informação sobre o próprio mecanismo da permuta.

No chamado regime de troca muito lenta, cada uma das espécies em solução mostra um espectro específico, apesar de se poderem interconverter (Figura 2.4). O espectro total é apenas a soma dos espectros individuais e a largura das bandas é proporcional a $(1/T_2) + (1/T_2)_{inst}$. (largura natural da banda mais a contribuição da

não homogeneidade do campo). No regime de troca lenta, embora os espectros das diferentes espécies em troca permaneçam separados podem ser observados alargamento de banda que são proporcionais a $(1/T_2) + (1/T_2)_{\text{inst.}} + (1/T_2)_{\text{troca}}$. No regime intermédio de troca os espectros individuais das espécies que se interconvertem desaparecem para coalescer num espectro médio (desvios químicos e constantes de acoplamento médios). Próximo deste regime as larguras de banda são muito elevadas (a detecção do espectro pode mesmo desaparecer) e traduzem fundamentalmente as características cinéticas da permuta. No regime de troca rápida apenas o espectro médio é observado mas com alargamento de bandas devido à permuta, alargamento esse que desaparece no regime de troca muito rápida.

Cada núcleo de uma molécula pode ter o seu regime de troca específico no espectro de RMN, para determinadas condições, uma vez que ele é função também da diferença de desvios químicos entre as espécies que se interconvertem. É muitas vezes possível alterar o regime relativamente à escala de tempo RMN fazendo variar, por exemplo, as concentrações das espécies, a magnitude do campo magnético ou a temperatura.

1.6 Relaxação

COMO FOI JÁ REFERIDO, o trabalho efectuado por B_1 sobre a magnetização provoca um aumento da energia do sistema de spins (diminuição de M_z) devido às transições de estado de spin. Tem também como efeito aumentar a coerência de fase no plano xy

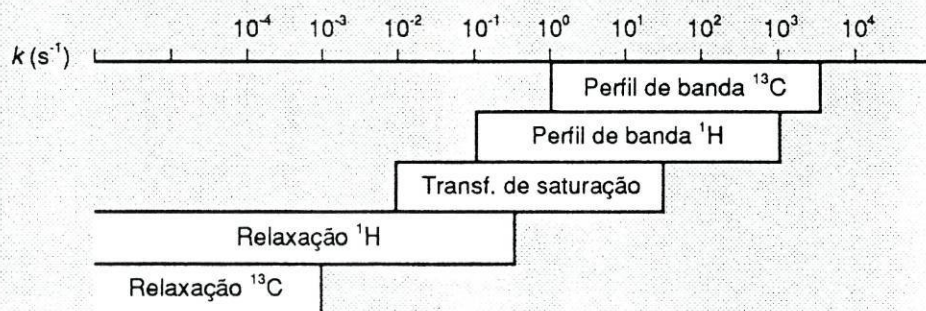


Figura 2.3 — Constantes de velocidade e métodos de RMN aplicáveis na sua medida. (Reproduzido da referência 22)

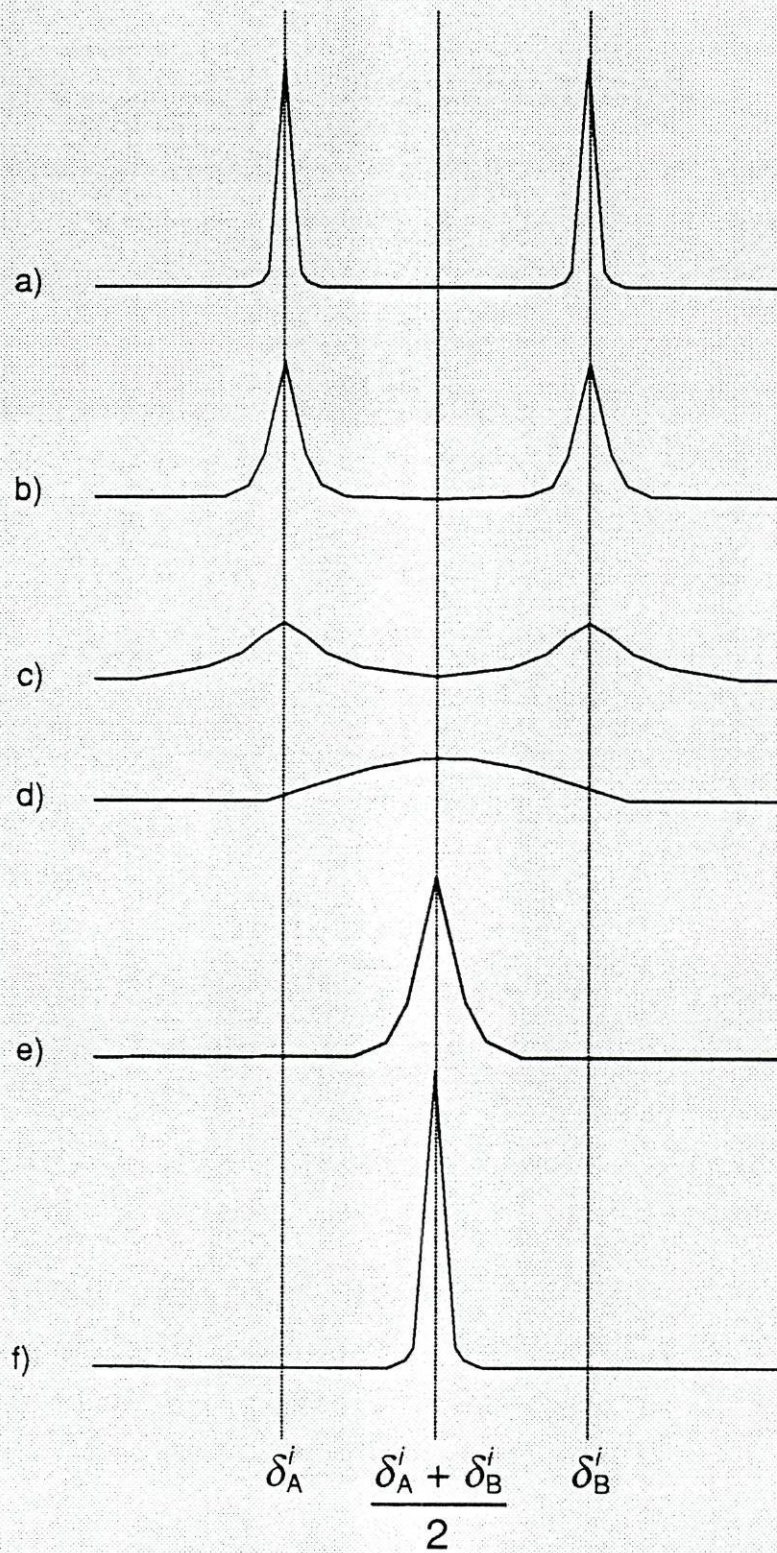


Figura 2.4 — Esquematização de um espectro de RMN de um núcleo i , sem acoplamento escalar, presente nas espécies A e B que se interconvertem; a) cinética muito lenta; b) cinética lenta; c) e d) regimes intermédios; e) cinética rápida; f) cinética muito rápida.

que se traduz no aumento de M_x e de M_y e, conseqüentemente, numa diminuição da entropia do sistema. O processo de relaxação, que conduz o sistema a uma distribuição de populações de Maxwell-Boltzmann, não ocorre por emissão espontânea de energia. As transições entre as orientações do momento magnético dos núcleos necessárias para o restabelecimento do equilíbrio são provocadas por campos magnéticos aleatórios e flutuantes que existem próximo dos núcleos.

O campo magnético isotrópico aleatório total sentido por um certo núcleo é em média nulo e provém da própria molécula ou de moléculas vizinhas em movimento Browniano. Este campo local, que depende de B_0 , é oscilante sendo composto por um certo intervalo de frequências; a sua componente no plano xy eficaz na promoção de transições é a que oscila com a frequência de Larmor. Esta é a chamada contribuição não-adiabática ou não-secular para a relaxação longitudinal e transversal. A alteração das populações provocado por este mecanismo implica a relaxação de M_z que é um processo dependente de T_1^{-1} . A incerteza introduzida no estado de spin tem como resultado o aumento da largura de banda e logo contribui para a relaxação transversal, ou seja, para T_2^{-1} .

A componente longitudinal do campo aleatório local não induz transições de spin mas soma-se a B_0 provocando assim um alargamento de banda directo por introduzir flutuações nos níveis de energia. Esta é a chamada contribuição adiabática ou secular para a relaxação transversal e conseqüentemente para T_2^{-1} .

Existem diversos tipos de mecanismos que levam à relaxação nuclear. Dentre eles, os mais importantes são as interações dipolo-dipolo (DD), a anisotropia de desvio químico (ADQ), as interações spin-rotação (SR) e as interações de acoplamento escalar (AE) (não será aqui feita referência ao efeito de núcleos com momento quadrupolar ou de espécies paramagnéticas na relaxação). Passa-se a descrever brevemente os mecanismos acima referidos; uma descrição mais detalhada será encontrada noutras secções.

DD - A interação dipolar entre núcleos é muitas vezes o mecanismo mais importante de relaxação e tem origem na translação e rotação dos spins na amostra que, ao criarem campos magnéticos aleatórios locais, contribuem para a relaxação nuclear.

ADQ - Como já foi referido, a anisotropia de protecção electrónica provoca variações no campo total sentido pelos núcleos, dependendo da orientação da molécula relativamente a B_0 . Devido ao movimento molecular cria-se um campo magnético oscilante capaz de provocar transições concorrentes para a relaxação. Esta contribuição depende assim da simetria de distribuição da densidade electrónica em torno do núcleo.

SR - A rotação molecular cria um campo magnético com origem nos electrões, que acopla com o spin nuclear. O mecanismo de relaxação é proporcionado neste caso por colisões que interrompem o acoplamento e a sua eficácia depende de um tempo de correlação τ_{SR} relacionado com o tempo médio entre colisões.

AE - O acoplamento indirecto entre dois núcleos baseia-se na interacção mútua dos seus campos magnéticos e por isso a variação com o tempo de um deles cria um mecanismo de relaxação para o outro. Isto pode ocorrer por duas vias: por troca química (relaxação *AE* de primeiro tipo) ou por relaxação de um dos spins (relaxação *AE* de segundo tipo).

As constantes de velocidade de relaxação provenientes de cada mecanismo contribuem aditivamente para T_1^{-1} e T_2^{-1} .

1.7 Aspectos práticos instrumentais

NUM ESPECTRÓMETRO DE RMN-TF (transformada de Fourier) de alta resolução a amostra encontra-se dentro de uma sonda que contém os filtros, circuitos ressonantes e solenóides necessários para a emissão e recepção das ondas de radiofrequência. Contém ainda a possibilidade de aceitar um fluxo de gás e um termopar para o controlo da temperatura da amostra. A sonda encontra-se por sua vez no eixo central de um solenóide supercondutor que gera o campo magnético B_0 . Estes espectrómetros possuem também electromagnetes (*shims*) que permitem fazer variações em B_0 para a correcção da sua não homogeneidade dentro do volume de amostra a analisar. É também possível fazer rodar a amostra em torno do seu eixo vertical, por meio de um fluxo de ar, com o objectivo de minorar o efeito das variações de B_0 no plano xy sobre as formas de banda.

Pequenas variações de B_0 com o tempo (*drifting*) podem ser detectadas e controladas pelo espectrómetro através da análise da variação da frequência de um núcleo que exista abundantemente na amostra. Devido à utilização frequente de solventes deuterados, com o fim de evitar o aparecimento de fortes sinais de solvente nos espectros de ^1H , o núcleo de ^2H é frequentemente utilizado pelos espectrómetros para fazer o encravamento campo-frequência (*lock*).

O computador tem um papel central num espectrómetro de RMN-TF pois é ele que controla a temporização dos acontecimentos pré-programados pelo operador através de interfaces adequados.

Os passos para obter um espectro unidimensional simples são: 1- definir uma série de parâmetros que vão ser necessários ao computador para levar a cabo a experiência (largura espectral ou o número de aquisições por exemplo); 2- aquisição do FID (evolução e acumulação); 3- processamento do FID (apodizações, etc.); 4- transformação de Fourier do FID para obter o espectro de RMN; 5- processamento do espectro (ajuste de fase, ajuste da referência, correcção da linha de base, etc.).

No passo 1 é necessário definir o número de pontos que vão ser usados para armazenar os FID's bem como o número de pontos da transformada de Fourier, a largura espectral, a frequência do transmissor, o tempo de relaxação entre dois impulsos e o número de acumulações, entre outros parâmetros. A largura espectral é limitada pela velocidade máxima de amostragem do conversor analógico-digital, como consequência do teorema de Nyquist [30].

O passo 2 é executado automaticamente pelo espectrómetro e inclui a repetição da seguinte sequência: tempo de relaxação - excitação (impulso de radiofrequência) - tempo de espera - aquisição (detecção e armazenamento). O tempo de espera é muito curto e é em geral necessário para possibilitar aos circuitos electrónicos a comutação entre emissão e recepção. Este atraso é responsável por distorções de fase que podem ser corrigidas no passo 5.

O passo 3 destina-se a fazer modificações no FID antes da sua transformação. Em geral procede-se a uma multiplicação do FID por uma função paramétrica com o fim de aumentar a relação sinal/ruído ou aumentar a resolução do espectro.

Após a transformação de Fourier, o espectro resultante mostra quase sempre distorções de fase. Existem distorções não dependentes da frequência, ditas de primeira ordem, e dependentes da frequência (segunda ordem). Estas distorções são corrigidas automaticamente ou manualmente por ajuste numérico. É frequente também ter necessidade de corrigir a linha de base para o nível zero.

A intensidade dos sinais é o integral da sua função de frequência e a medição pode ser feita numericamente pelo computador do espectrómetro. As quantidades relativas de cada tipo de núcleo são proporcionais aos seus integrais se não houver truncagem da relaxação ou transferência de polarização por EON (efeito Overhauser nuclear) diferentes de núcleo para núcleo. Esta é uma razão pela qual é quase sempre fácil fazer essa determinação para ^1H e nem sempre o é para ^{13}C por esta última espécie de núcleo ter maiores e mais variados tempos de relaxação. Factores de erro nesta medição vêm de distorções da linha de base e sobreposição de bandas, por exemplo, sendo difícil alcançar margens de erro inferiores a 5%. Se os integrais forem utilizados para determinações analíticas torna-se necessário recorrer a várias medições para calcular uma média e o respectivo desvio padrão. A sobreposição de bandas implica fazer uma análise da sua forma (lorentziana ou gaussiana) e recorrer a um ajuste paramétrico para calcular os integrais.

O método de RMN de onda pulsada tem como vantagem relativamente ao método mais antigo de onda contínua a irradiação simultânea de todas as frequências dentro de um determinado intervalo o que permite obter espectros com maior rapidez. A digitalização e armazenamento permitem somar FID's sucessivos, obtidos com impulsos intervalados de um certo tempo para aquisição e relaxação, o que proporciona um ganho em sensibilidade. A intensidade do sinal RMN é proporcional ao número de acumulações (em condições boas de relaxação) enquanto que a intensidade do ruído é apenas proporcional à raiz quadrada desse número. Outra vantagem do método de onda pulsada é a possibilidade de controlar a orientação da magnetização das mais variadas maneiras. Isso determinou o aparecimento de sequências de impulsos que permitem obter espectros com informação que anteriormente era impossível de obter directa ou indirectamente [31].

2. Formalismo de operadores para a descrição de experiências de RMN

2.1 Operadores de spin

O MOMENTO ANGULAR DE SPIN de um núcleo ou de um conjunto de núcleos, a que corresponde o operador I , pode ser representado por três componentes com os respectivos operadores I_x , I_y e I_z , sendo que $I^2 = I_x^2 + I_y^2 + I_z^2$. Definem-se ainda os operadores de subida e descida I_+ e I_- da seguinte forma: $I_+ = I_x + iI_y$ e $I_- = I_x - iI_y$. As propriedades destes operadores na base $|\alpha\rangle$, $|\beta\rangle$ (representação simbólica para $|I, m_I\rangle$ com valores $|1/2, 1/2\rangle$ e $|1/2, -1/2\rangle$ respectivamente) podem ser resumidas pelas matrizes de Pauli, Figura 2.5.

2.2 Hamiltoniano de spin nuclear

O HAMILTONIANO DE SPIN NUCLEAR, H , para sistemas em fase líquida com movimento isotrópico, actua apenas, tal como o nome indica, sobre as variáveis do spin nuclear e pode ter várias contribuições aditivas, dependentes ou independentes do tempo. Os estados estacionários deste Hamiltoniano são obtidos por combinação linear dos produtos entre os estados de spin (α ou β) das funções de onda de todos os núcleos do sistema.

O Hamiltoniano de spin nuclear não dependente do tempo, H_0 , pode ser expresso como a soma de duas contribuições independentes: uma descrevendo a interacção do spin nuclear com \mathbf{B}_0 (interacção Zeeman) e a outra relacionada com o acoplamento escalar entre spins:

$$O \equiv \begin{bmatrix} \langle \beta | O | \beta \rangle & \langle \beta | O | \alpha \rangle \\ \langle \alpha | O | \beta \rangle & \langle \alpha | O | \alpha \rangle \end{bmatrix}$$

$$I^2 \equiv 3/4 \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad I_x \equiv \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \quad I_y \equiv \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$I_+ \equiv 1/2 \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \quad I_- \equiv 1/2i \begin{bmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \quad I_z \equiv 1/2 \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Figura 2.5 — Definição da matriz de Pauli para um operador genérico O e para os operadores de spin cartesianos e de subida e descida na base $(|\alpha\rangle, |\beta\rangle)$ definida no texto.

$$H_0 = H_Z + H_J^{\text{iso}} = -\sum_{j=1,N} v_j I_{jz} + \sum_{j=1,N} \sum_{k=j+1,N} J_{jk} \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k \quad (2.32)$$

em que $v_j = \gamma_j(1 - \sigma_j^{\text{iso}}) B_0 I_{jz}$ e N igual ao número de núcleos no espectro, sendo válida para sistemas com acoplamento forte.

A contribuição para H resultante da interacção do campo de rádio-frequência de observação \mathbf{B}_1 com o sistema de spins tem uma representação semelhante ao Hamiltoniano de Zeeman,

$$H_{r.f.}(t) = -\sum_{j=1,N} \gamma_j I_j \mathbf{B}_1(t), \quad (2.33)$$

e pode ser independente do tempo se, como é frequente, se considerar relativo a um referencial rotativo (x', y', z) com a frequência de \mathbf{B}_1 . É de notar que H_0 é invariante relativamente ao referencial fixo ou rotativo, isto é, é invariante a rotações em torno do eixo dos zz .

Para moléculas com movimentos rápidos e isotrópicos, o acoplamento dipolar directo, que é de magnitude várias ordens de grandeza superior ao acoplamento indirecto (escalar), é, em média, nulo, tendo apenas como efeito a criação de um mecanismo de relaxação. A sua contribuição, quer dependente do tempo, quer estacionária, para o Hamiltoniano de spin nuclear, bem como a de outros mecanismos de relaxação, será considerada detalhadamente em secções seguintes.

2.3 O operador densidade

CONSIDERE-SE UM SISTEMA sub-microscópico cujo estado é descrito por uma função de onda ψ e represente-se esta por uma combinação linear de funções próprias de H_0 , ϕ_i :

$$\psi = \sum_i c_i \phi_i \quad (2.34)$$

A variação de ψ é dada pela variação dos coeficientes c_i o que permite definir os elementos ρ_{nm} de um operador $\rho(t)$, operador densidade, como os produtos dos coeficientes c_i tal que:

$$\rho_{nm} = \int c_n^* \phi_n \rho(t) c_m \phi_m dq = c_n c_m^* \quad (2.35)$$

Para a descrição de uma amostra macroscópica é necessário considerar a média deste operador no volume observado.

Os coeficientes c_i , sendo números complexos, podem ser escritos na forma $c_i = |c_i| e^{i\alpha_i}$ e vem:

$$\rho_{nm} = c_n c_m^* = |c_n| |c_m| e^{i(\alpha_n - \alpha_m)} \quad (2.36)$$

Assim, na base de funções próprias de H , os elementos da matriz densidade fora da diagonal, ρ_{ij} ($i \neq j$), sendo diferentes de zero (ângulos α_i e α_j não aleatórios), descrevem coerência de fase entre dois estados correspondente à transição $n \rightarrow m$ enquanto que os elementos da diagonal, ρ_{ii} , são iguais à população relativa do estado i , se a matriz densidade estiver normalizada (funções de estado normalizadas). A matriz densidade pode descrever assim o estado de um conjunto de spins num determinado momento.

Para aplicações em RMN, uma vez que todas as observações são feitas no sistema de spins, é geralmente suficiente calcular os valores esperados de um conjunto restrito de operadores que actuam exclusivamente sobre as variáveis de spin nuclear, sendo os restantes graus de liberdade atribuídos à rede. Assim, para o cálculo desses valores, não é necessário considerar o operador densidade total ρ mas apenas um operador densidade reduzido, σ . A sua definição assenta na expressão das funções do sistema total $|\alpha\rangle$ como produtos $|fs\rangle$ onde f depende de variáveis da rede e s de variáveis do sistema de spins:

$$\langle s' | \sigma(t) | s \rangle = \sum_f \langle s' f | \rho(t) | f s \rangle \quad (2.37)$$

ou

$$\sigma(t) = \text{tr}_f \{ \rho(t) \} \quad (2.38)$$

onde tr_f significa o traço parcial com respeito às variáveis da rede. O valor esperado para uma variável Q será assim dado por

$$\langle Q \rangle = \text{tr}_s \{ Q \sigma(t) \}. \quad (2.39)$$

Expansão do operador densidade em operadores produto

Um formalismo que torna o significado físico do operador densidade mais evidente e que apresenta uma maior conveniência computacional foi introduzido por Sørensen *et al.* [32] e baseia-se na expressão do operador densidade como uma combinação linear de produtos de operadores de spin:

$$\sigma(t) = \sum_s b_s(t) 2^{(q-1)} \prod_{k=1, N} (I_\nu^k)^{a_{sk}} \quad (2.40)$$

onde N é o número de spins 1/2 no sistema; k é o índice do núcleo; $\nu = x, y$, ou z ; q é o número de operadores de um só spin e a_{sk} é igual a 1 para q núcleos e igual a zero

para os restantes $N - q$. Como exemplo, e considerando o referencial rotativo, I_z^k representa a magnetização longitudinal do spin k , enquanto que I_x^k ou I_y^k representam a magnetização transversal em-fase desse mesmo spin. Por outro lado, produtos como $I_x^k I_z^l$ representam magnetização transversal de um spin em anti-fase relativamente a um outro spin enquanto que $I_x^k I_x^l$ representa coerência de quantum duplo entre os spins k e l . É sempre possível representar operadores de transição nuclear através de combinações lineares destes operadores produto.

Os operadores correspondentes a magnetização observável são apenas I_x e I_y , ou seja, operadores transversais de um único spin em-fase.

Evolução dos operadores produto

O efeito da precessão (desvio químico), acoplamento escalar ou impulsos não selectivos de rádio-frequência pode ser representado por operadores produto, chamados operadores de evolução, que actuam sobre os operadores que descrevem o estado do sistema de spins, tendo o resultado um significado físico evidente. As duas primeiras operações (precessão e acoplamento escalar) correspondem a rotações em torno do eixo dos zz enquanto que os impulsos de rádio-frequência podem ser em torno de qualquer eixo.

Para o desvio químico relativo ao referencial rotativo, Ω_k , o operador tem a forma $\Omega_k \tau I_{kz}$, onde τ designa o intervalo de tempo durante o qual dura a precessão. A sua acção sobre o operador I_x^k é a seguinte:

$$I_x^k \xrightarrow{\Omega_k \tau I_z^k} I_x^k \cos(\Omega_k \tau) + I_y^k \text{sen}(\Omega_k \tau)$$

É visível a analogia com a decomposição de uma componente do vector magnetização no plano xy devido à sua rotação em torno do eixo dos zz .

O acoplamento escalar é representado pelo operador bilinear em operadores de spin $\pi J_{kl} \tau 2I_z^k I_z^l$, cuja acção sobre a magnetização transversal de um spin k pode ser entendida pelo seguinte exemplo para o acoplamento entre dois spins, k e l :

$$I_x^k \xrightarrow{\pi J_{kl} \tau 2I_z^k I_z^l} I_x^k \cos(\pi J_{kl} \tau) + I_y^k I_z^l \text{sen}(\pi J_{kl} \tau),$$

sendo ainda de notar que do acoplamento escalar resultam frequentemente termos em anti-fase.

Um impulso não selectivo de rádio-frequência é representado pelo operador βI_x^k (caso de transmissão de radiação com a direcção e o sentido do semi-eixo positivo dos xx) sendo β o valor do ângulo de rotação da magnetização durante o impulso. O seu efeito sobre um operador I_z^k (magnetização longitudinal) é:

$$I_z^k \xrightarrow{\beta I_x^k} I_z^k \cos\beta - I_y^k \sin\beta$$

onde o sinal negativo provém da convenção sobre as rotações dos operadores produto. Esta convenção, introduzida por Sorensen *et al.* [32], é oposta à estabelecida para a rotação da magnetização, sob o efeito de binários produzidos pelos diversos campos magnéticos, no modelo vectorial. Na Figura 2.6 é apresentado o resultado da acção de operadores de evolução sobre os operadores que descrevem o estado do sistema de spins onde essa convenção é aplicada [30].

Este formalismo permite analisar, de uma forma simples, o comportamento de um sistema de spins sujeito a uma sequência de impulsos. É de notar que as diversas transformações implícitas numa sequência de impulsos podem ser descritas por acção dos operadores de evolução numa ordem diferente da existente na sequência, para um sistema com acoplamentos fracos.

Mapas de ordem de coerência

Ao longo da fase de excitação numa experiência de RMN o sistema de spins pode percorrer vários estados, representados pelos diversos operadores produto. A ordem máxima e mínima de coerência de um operador produto é dada pelo número de operadores de spin transversais presentes nesse produto de operadores. As ordens de coerência de um operador produto podem ser obtidas substituindo os operadores transversais por operadores de subida e descida; por exemplo: $2I_x^1 I_z^2$ contém ordens de coerência $p = +1$ e $p = -1$ (lembrar que $I_x = I_+ + iI_-$), $4I_x^1 I_x^2 I_x^3$ possui $p = +3, +1, -1, -3$ e para $4I_y^1 I_x^2 I_z^3$ temos $p = +2, 0, -2$.

Um impulso não selectivo de rádio-frequência, ao contrário do que é observado para a precessão ou para o acoplamento escalar, pode provocar alterações da ordem de coerência. Esse impulso tem a capacidade de excitar todas as ordens de coerência

	I_x	I_y	I_z	S_x	S_y	S_z	$2I_zS_z$
I_x	$E/2$	$-I_z$	I_y	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$2I_yS_z$
I_y	I_z	$E/2$	$-I_x$	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$-2I_xS_z$
I_z	$-I_y$	I_x	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$E/2$
S_x	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$-S_z$	S_y	$2I_zS_y$
S_y	$E/2$	$E/2$	$E/2$	S_z	$E/2$	$-S_x$	$-2I_zS_x$
S_z	$E/2$	$E/2$	$E/2$	$-S_y$	S_x	$E/2$	$E/2$
$2I_zS_z$	$-2I_yS_z$	$2I_xS_z$	$E/2$	$-2I_zS_y$	$2I_zS_x$	$E/2$	$E/2$
$2I_xS_z$	$E/2$	$-2I_zS_z$	$2I_yS_z$	$-2I_xS_y$	$2I_xS_x$	$E/2$	I_y
$2I_yS_z$	$2I_zS_z$	$E/2$	$-2I_xS_z$	$-2I_yS_y$	$2I_yS_x$	$E/2$	$-I_x$
$2I_zS_x$	$-2I_yS_x$	$2I_xS_x$	$E/2$	$E/2$	$-2I_zS_z$	$2I_zS_y$	S_y
$2I_zS_y$	$-2I_yS_y$	$2I_xS_y$	$E/2$	$2I_zS_z$	$E/2$	$-2I_zS_x$	$-S_x$
$2I_xS_x$	$E/2$	$-2I_zS_x$	$2I_yS_x$	$E/2$	$-2I_xS_z$	$2I_xS_y$	$E/2$
$2I_xS_y$	$E/2$	$-2I_zS_y$	$2I_yS_y$	$2I_xS_z$	$E/2$	$-2I_xS_x$	$E/2$
$2I_yS_x$	$2I_zS_x$	$E/2$	$-2I_xS_x$	$E/2$	$-2I_yS_z$	$2I_yS_y$	$E/2$
$2I_yS_y$	$2I_zS_y$	$E/2$	$-2I_xS_y$	$2I_yS_z$	$E/2$	$-2I_yS_x$	$E/2$

Tabela 2.1 — Resultados da acção dos operadores de evolução (primeira linha) sobre os operadores produto que descrevem o estado do sistema (primeira coluna). (Reproduzido da referência 30)

entre $p = n$ e $p = -n$ em que n é o número de termos num operador produto. Como esta excitação não é, em geral, selectiva, abrangendo várias ordens de coerência, torna-se necessário aplicar um filtro que selecciona apenas aqueles saltos ou transferências de ordem de coerência desejados. A forma mais vulgar de o conseguir é fazendo a ciclização de fase dos impulsos da sequência, coordenando com a ciclização da fase do receptor [33].

Um ciclo de fase para um impulso caracteriza-se pelo incremento, de FID para FID, da fase desse impulso de uma quantidade $\Delta\phi$. A selectividade N de um ciclo de fase é definida como a sua capacidade para rejeitar todos os saltos de coerência (Δp) diferentes de N e dos seus múltiplos inteiros, sendo $\Delta\phi = 2\pi / N$. A fase do receptor deve ser coordenada com os incrementos $\Delta\phi_i$ de cada impulso i de uma sequência, por forma a proporcionar a adição dos sinais interessantes e a subtracção dos indesejados. A fase do detector é calculada pela expressão $\phi_{det} = -\sum \Delta p_i \Delta\phi_i$. Por convenção, é detectada a ordem de coerência $p = -1$. As Figuras 8.4 e 8.5 mostram exemplos de ciclos de fase com as tabelas que os permitiu calcular.

3. Descrição semi-clássica da relaxação em RMN

3.1 Teoria BPP da relaxação em RMN

BLOEMBERGEN, PURCELL E POUND desenvolveram uma teoria de relaxação nuclear, denominada posteriormente BPP, de que se apresentam alguns aspectos de seguida. Nesta teoria baseia-se a descrição semi-clássica da relaxação em RMN tal como foi desenvolvida e apresentada por Redfield [34], Abragam [35], Ernst [23] e McConnel [25].

O número de transições por unidade de tempo induzidas pelo campo local aleatório $B_x^L = (B_x^L)_0 f(t)$, onde $(B_x^L)_0$ é a amplitude média r.m.s. (*root-mean-square*) do campo e $f(t)$ uma função aleatória com média zero e média r.m.s. 1, sobre um sistema isolado de spins do mesmo tipo, pode ser deduzida pela teoria das perturbações como sendo expressa por

$$W_1 = (1/4) \gamma^2 (B_x^L)_0^2 J(\omega) \quad (2.41)$$

onde $J(\omega)$ representa a potência da frequência ω . J designa-se por densidade espectral e está relacionada com $f(t)$. Como se supôs que $(B_x^L)_0 = (B_y^L)_0$ e ambas contribuem de igual forma para a relaxação vem que

$$W_1 = (1/2) \gamma^2 (B_x^L)_0^2 J(\omega) \quad (2.42)$$

Como cada transição altera a diferença entre populações de 2 obtém-se

$$T_1^{-1} = 2W_1 = \gamma^2 (B_x^L)_0^2 J(\omega) \quad (2.43)$$

A função J está obviamente relacionada com a movimentação molecular e especificamente com $f(t)$ através da função de autocorrelação

$$G(\tau) = \overline{f(t)f(t+\tau)} \quad (2.44)$$

onde a linha superior indica o valor médio de um conjunto macroscópico. Assume-se que $G(\tau)$ tem um decaimento exponencial com τ

$$G(\tau) = e^{-t/\tau_c}, \quad (2.45)$$

onde τ_c é o tempo de correlação do movimento rotacional isotrópico, cuja transformada de Fourier é a chamada função de densidade espectral reduzida

$$J(\omega) = \tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2). \quad (2.46)$$

A constante T_1 está assim relacionada com o tamanho das moléculas pois τ_c é menor para moléculas menores (movimento mais rápido). Quando $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ temos a

chamada condição de *estreitamento extremo* onde $J(\omega) \approx \tau_c$ que é a situação mais vulgar para pequenas moléculas em solventes muito pouco viscosos. Para macromoléculas, no entanto, T_1 tem valores menores (relaxação mais rápida) uma vez que τ_c pode atingir valores mais elevados e a aproximação $J(\omega) \approx \tau_c$ não é válida.

Para T_2^{-1} existe contribuição secular e não secular o que permite deduzir a expressão

$$T_2^{-1} = (2T_1)^{-1} + (1/2) \gamma^2 (B_x^L)_0^2 J(0) \quad (2.47)$$

Uma vez que B_z^L não provoca transições, o último termo de 2.47 depende de $J(0)$. A teoria BPP é válida apenas no regime de colisões fracas em que $\tau_c < T_2$.

3.2 Superoperador de relaxação

Para a equação de variação de σ com o tempo é necessário usar um Hamiltoniano que seja a soma do termo da interacção de Zeeman e da interacção indirecta (acoplamento escalar) com uma componente que descreve o acoplamento do sistema de spins com a rede, conducente à relaxação.

O fenómeno da relaxação pode ser considerado como tendo origem numa perturbação aleatória e dependente do tempo que contribui uma componente estacionária $H_1(t)$ para o Hamiltoniano total: $H = H_0 + H_1(t)$. Assim temos que:

$$d \sigma / dt = -i [\overline{H_0 + H_1(t)}, \sigma] \quad (2.48)$$

O desenvolvimento do comutador permite escrever a equação 2.48 sob a forma

$$d \sigma / dt = -i [H_0, \sigma] - i [\overline{H_1(t)}, \sigma] \quad (2.49)$$

O termo $[H_0, \sigma]$ pode ser considerado como um superoperador H gerado por H_0 que tem como funções próprias combinações lineares de operadores produto (representação de σ) [36]. No caso dessas combinações representarem transições, os valores próprios serão as frequências das transições respectivas. O termo $[H_1(t), \sigma]$ representa a interacção do sistema de spins com a rede e pode igualmente ser considerado como o superoperador de relaxação Γ gerado por $H_1(t)$ que actua sobre σ e cujos valores próprios são as probabilidades de transição entre dois elementos da matriz densidade. A expressão do movimento de σ na base de H_0 permite assim obter a equação matricial

$$d \sigma / dt = (-iH - R) \sigma \quad (2.50)$$

onde \mathbf{H} é a supermatriz do Hamiltoniano independente do tempo e \mathbf{R} é a supermatriz de relaxação cujos elementos determinam o decaimento dos elementos do operador densidade para o seu valor de equilíbrio, σ_0 e que, devido à estacionaridade de $H_1(t)$, são constantes no tempo. É de notar que este decaimento pode não ser mono-exponencial, como geralmente se admite. A equação 2.50 pode muitas vezes ser simplificada se for sujeita a uma transformação unitária [37,38]

$$\mathbf{X}d\sigma/dt = \mathbf{X}(-i\mathbf{H} - \mathbf{R})\mathbf{X}^{-1}\mathbf{X}\sigma \quad (2.51)$$

que diagonaliza \mathbf{H} e transforma os produtos de operadores (na expansão de σ referida anteriormente) em operadores de transição e os elementos de \mathbf{R} nas suas velocidades de relaxação.

Para o cálculo dos elementos de \mathbf{R} podemos expandir o Hamiltoniano de interacção com a rede da seguinte forma:

$$H_1(t) = \sum_q K^{(q)} Y^{(q)}(t) V^{(q)} \quad (2.52)$$

onde $V^{(q)}$ ($V^{(q)} = V^{(q)\dagger}$) são operadores que actuam apenas no sistema de spins, $Y^{(q)}$ ($Y^{(q)}(t) = Y^{(q)*}(t)$) são funções aleatórias clássicas representando o tipo de movimento da rede e $K^{(q)}$ é uma constante de interacção. O índice q distingue as componentes dos tensores irredutíveis que definem as diversas interacções que se podem considerar. Esta forma de exprimir a interacção do sistema de spins com a rede, que traduz o carácter semi-clássico da teoria, permite definir vários tipos de mecanismos de relaxação (dois exemplos serão considerados detalhadamente mais adiante). Nesta formulação semiclássica não se consideram estados discretos na rede e o seu acoplamento com o sistema de spins, este sim descrito por operadores adequados à interacção, é dado por funções aleatórias reais dependentes do tempo.

A equação 2.48 pode ser modificada para a sua representação de interacção usando as substituições

$$\sigma^{\text{int}} = e^{iH_0 t} \sigma e^{-iH_0 t} \quad (2.53)$$

$$H_1(t)^{\text{int}} = e^{iH_0 t} H_1(t) e^{-iH_0 t} \quad (2.54)$$

obtendo-se:

$$d\sigma^{\text{int}}/dt = -i[H_1(t)^{\text{int}}, \sigma^{\text{int}}] \quad (2.55)$$

Integrando 2.55 por aproximações sucessivas até segunda ordem (variáveis t e t') e diferenciando novamente usando uma substituição de variável ($t - t' = \tau$) obtém-se:

$$d\sigma^{\text{int}}/dt = - \int_0^\infty \overline{[H_1(t)^{\text{int}}, [H_1(t-\tau)^{\text{int}}, \sigma^{\text{int}}(t) - \sigma_0]]} dt \quad (2.56)$$

onde a linha superior indica, como foi definido anteriormente, a média entre todos os sistemas da amostra macroscópica no intervalo de tempo τ . Na obtenção de 2.56 foi considerada desprezável a correlação entre $H_1(t)^{\text{int}}$ e σ^{int} ao fazer a média sobre todo o volume; σ^{int} representa agora essa média. A dedução feita para obter 2.56 é válida para $t_c \ll t, T_1, T_2$ onde t_c é o tempo de correlação dos processos aleatórios descritos por Y .

Para reescrever 2.56 na forma de operador considera-se a expansão de $H_1(t)$ na sua forma de interação:

$$H_1(t)^{\text{int}} = e^{iH_0 t} H_1(t) e^{-iH_0 t} = \sum_p \sum_q K^{(q)} Y^{(q)}(t) V_p^{(q)} e^{i\omega_p^{(q)} t} \quad (2.57)$$

Uma vez que $V_p^{(q)}$ são operadores próprios do superoperador Hamiltoniano, o índice p relaciona estes operadores com as frequências ω_p que são os valores próprios do superoperador.

A substituição de $H_1(t)^{\text{int}}$ em 2.56 implica a definição da função de auto-correlação de Y

$$g^{(q,q')}(\tau) = \overline{Y^{(q)}(t) Y^{(q')*}(t+\tau)}, \quad (2.58)$$

que é uma função real e par, bem como da função da potência de densidade espectral gerada por F , que se pode calcular fazendo a transformada de Fourier de 2.58:

$$J^{(q,q')}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} g^{(q,q')}(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (2.59)$$

Obtém-se assim uma expressão geral para o superoperador de relaxação

$$d\sigma^{\text{int}}/dt = - \sum_{q,q'} \sum_{p,p'} J^{(q,q')}(\omega_p^{(q)}) [V_p^{(q)}, [V_{p'}^{(q)}, \sigma^{\text{int}}(t) - \sigma_{\text{eq}}]] e^{i(\omega_p^{(q)} + \omega_{p'}^{(q)})t} \quad (2.60)$$

que é a equação de relaxação de σ^{int} na forma de operador. Duas simplificações nesta equação são justificáveis [35]. A primeira pressupõe que, ao fazer a média, as funções $Y^{(q)}(t)$ são estatisticamente independentes, ou seja, que

$$g^{(q,q')}(\tau) = \delta_{q,q'} g^{(q)}(\tau) \quad (2.61)$$

$$J^{(q,q')}(\omega) = \delta_{q,q'} J^{(q)}(\omega) \quad (2.62)$$

o que permite eliminar a variável q' no somatório da equação 2.60. A outra vai restringir a equação 2.60 aos termos seculares, ou seja, àqueles para os quais $\omega_p^{(q)} = -\omega_{p'}^{(q)}$ ($e^{i(\omega_p^{(q)} + \omega_{p'}^{(q)})t} = 1$). Esta condição apenas se verifica para $p = p'$, o que elimina p' do somatório em 2.60. Obtém-se assim a forma simplificada de 2.60

$$d\sigma^{\text{int}}/dt = - \sum_q \sum_p J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) [A_p^{(q)}, [A_p^{(q)}, \sigma^{\text{int}}(t) - \sigma_{\text{eq}}]] \quad (2.63)$$

Tal como H_0 , o superoperador de relaxação é invariante quanto à transformação do referencial rotativo para o referencial do laboratório.

É agora possível reescrever 2.49 como

$$d\sigma(t)/dt = -i\mathbf{H}\{\sigma(t)\} - \Gamma\{\sigma(t) - \sigma_0\} \quad (2.64)$$

onde $\mathbf{H}\{\sigma\} = [H_0, \sigma]$ e

$$\Gamma\{\sigma\} = \sum_q \sum_p J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) [V_p^{(-q)}, [V_p^{(q)}, \sigma]] \quad (2.65)$$

Estas equações formam a base da análise quântica dos espectros de RMN. A equação 2.65 foi usada para o cálculo computacional de constantes de relaxação transversal na terceira parte deste trabalho.

Representando a equação 2.56 numa base do Hamiltoniano H_0 , com funções próprias $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$, obtém-se a equação generalizada da variação da matriz densidade com o tempo, equação de Redfield [34]:

$$d\sigma_{\alpha\alpha}^{\text{int}}/dt = \sum_{\beta\beta} e^{-i(\omega_{\beta\beta} - \omega_{\alpha\alpha})t} R_{\alpha\alpha\beta\beta} (\sigma_{\beta\beta}^{\text{int}} - \sigma_{\beta\beta\text{eq}}) \quad (2.66)$$

onde $R_{\alpha\alpha\beta\beta}$ são os elementos da matriz de relaxação de Redfield. A restrição do somatório aos termos seculares ($\omega_{\beta\beta} - \omega_{\alpha\alpha} = 0$) torna 2.66 invariante quanto à mudança de referencial permitindo obter

$$d\sigma_{\alpha\alpha}/dt = -i\omega_{\alpha\alpha}\sigma_{\alpha\alpha}(t) + \sum_{\beta\beta} R_{\alpha\alpha\beta\beta} (\sigma_{\beta\beta} - \sigma_{\beta\beta\text{eq}}) \quad (2.67)$$

que é a representação matricial de 2.64.

A evolução, na representação de interacção, do valor macroscópico observado $Q(t)$ de um operador Q que actua sobre um sistema S é dada por [26]:

$$d\langle Q \rangle / dt = \text{tr} \{ Q d\sigma^{\text{int}} / dt \} = \sum_p \sum_q J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) (\langle [V_p^{(-q)}, [V_p^{(q)}, Q]] \rangle - \langle [V_p^{(-q)}, [V_p^{(q)}, Q]] \rangle_{\text{eq.}}) \quad (2.68)$$

Implícitas nas equações de Bloch (2.10) estão as relações

$$d\langle I_z \rangle / dt = -(\langle I_z \rangle - \langle I_z \rangle_{\text{eq.}}) / T_1 \quad (2.69)$$

$$d\langle I_{x,y} \rangle / dt = -\langle I_{x,y} \rangle / T_2 \quad (2.70)$$

É assim evidente que se se substituir Q por I_x , I_y ou I_z em (2.68) e a sua simplificação conduzir a (2.69) ou (2.70) as velocidades de relaxação serão os coeficientes do membro direito de (2.68) [25].

Hamiltonianos de interacção

Os elementos da expansão do Hamiltoniano de relaxação dependem do tipo de interacção e do tipo de movimento molecular. Este Hamiltoniano pode ser dividido

em várias parcelas em que cada uma representa um tipo de relaxação:

$$H_1 = H_{DD} + H_{ADQ} + H_{AE} + \dots \quad (2.71)$$

Para a energia potencial mútua de interação entre dois dipolos magnéticos temos classicamente:

$$U = \{(\boldsymbol{\mu}_k \cdot \boldsymbol{\mu}_l)/r_{kl}^3 - 3(\boldsymbol{\mu}_k \cdot \mathbf{r}_{kl})(\boldsymbol{\mu}_l \cdot \mathbf{r}_{kl})/r_{kl}^5\} \mu_0/(4\pi) \quad (2.72)$$

onde \mathbf{r}_{kl} é o vector distância entre os dois dipolos (núcleos) k e l (ver Figura 2.6), com módulo r_{kl} , e μ_0 é a constante de permeabilidade magnética do vazio. O Hamiltoniano correspondente é obtido fazendo a substituição $\boldsymbol{\mu} = \gamma(h/(2\pi)) \mathbf{I}$:

$$H_{DD} = r_{kl}^{-3} \gamma_k \gamma_l (h/(2\pi))^2 \mu_0/(4\pi) \{(\mathbf{I}_k \cdot \mathbf{I}_l) - 3(\mathbf{I}_k \cdot \mathbf{r}_{kl})(\mathbf{I}_l \cdot \mathbf{r}_{kl})/r_{kl}^2\} \quad (2.73)$$

Expandindo os produtos escalares em coordenadas polares, Figura 2.2, e generalizando para um número N de spins, obtém-se a expressão deste Hamiltoniano em termos de um tensor esférico irreduzível de operadores [25]:

$$H_{DD_{kl}} = \sum_{k=1, N-1; l=2, N; k < l} \sum_{q=-2, 2} D_{kl} Y_{2,kl}^{(q)}(\theta_{kl}(t), \varphi_{kl}(t)) V_{kl}^{(q)} \quad (2.74)$$

com $V_{kl}^{(0)} = I_z^k I_z^l - (1/4)(I_+^k I_-^l + I_-^k I_+^l)$, $V_{kl}^{(\pm 1)} = -(3/2)(I_z^k I_{\pm}^l + I_{\pm}^k I_z^l)$ e $V_{kl}^{(\pm 2)} = -(3/4) I_{\pm}^k I_{\pm}^l$ onde θ_{kl} e φ_{kl} são os ângulos formados pelo vector internuclear \mathbf{r}_{kl} e a direcção do eixo dos z (ver Figura 2.2) e em que $D_{kl} = r_{kl}^{-3} \gamma_k \gamma_l (h/(2\pi))^2 \mu_0/(4\pi)$ é por vezes designada constante de acoplamento dipolar.

O Hamiltoniano H_{DD} é flutuante devido ao movimento molecular rotacional, considerado neste trabalho como aleatório e isotrópico, que modula as funções $Y_{2,kl}^{(q)}$ que possuem valor médio 0 e média r.m.s. 1. A potência do campo magnético

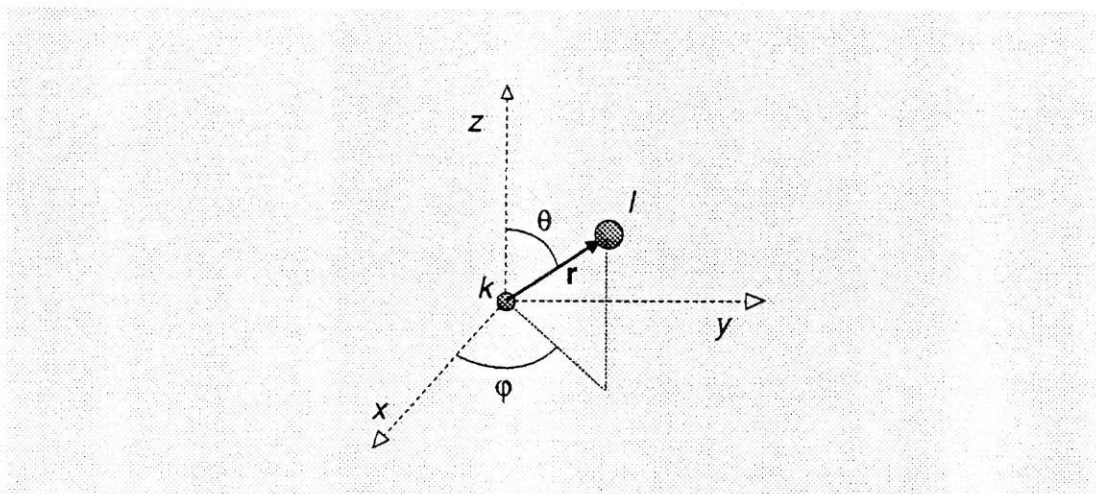


Figura 2.6 — Definições geométricas para a interação dipolo-dipolo entre dois núcleos k e l .

aleatório gerado por este movimento para interações intramoleculares pode ser relacionado com o seu tempo de correlação rotacional τ_c , sendo proporcional a $J(\omega)$ tal como foi definido em 2.46.

O Hamiltoniano de relaxação por anisotropia de desvio químico é por natureza intramolecular e flutuante, gerado pela reorientação molecular da molécula relativamente ao campo magnético B_0 . Relativamente ao referencial do laboratório, este Hamiltoniano, à semelhança de H_{DD} , pode escrever-se da seguinte forma

$$H_{ADQ_k} = \sum_{k=1,N} \sum_{q=-1,1} C_k Y_{2,k}^{(q)}(\theta_k(t), \varphi_k(t)) V_k^{(q)} \quad (2.75)$$

com $V_k^{(0)} = 2 I_z^k$, $V_k^{(1)} = (6^{-1/2}/2) I_+^k$ e $V_k^{(-1)} = (6^{-1/2}/2) I_-^k$. Para uma simetria cilíndrica do campo de protecção magnética gerado pelos electrões que envolvem o núcleo k , C_k é definido por $\gamma_k B_0 \Delta\zeta_k$ onde $\Delta\zeta_k$ é a diferença entre a protecção electrónica transversal e longitudinal relativamente ao único eixo de simetria do tensor de anisotropia.

A parte geométrica de H_{ADQ} , funções $Y_{2,k}^{(q)}(\theta_k(t), \varphi_k(t))$, é semelhante à do Hamiltoniano de interacção dipolar, envolvendo dois ângulos que definem a orientação do eixo de simetria cilíndrico relativamente ao campo magnético B_0 . As características de frequência destas funções, para rotação aleatória e isotrópica, dependem também de τ_c e são proporcionais a $J(\omega)$ [38].

4. Algumas técnicas relevantes de RMN-FT

4.1 Supressão do sinal do solvente

A SUPRESSÃO DO SINAL DO SOLVENTE é muitas vezes necessária devido à grande diferença de intensidade entre os sinais da amostra e o sinal do solvente. Esta diferença faz com que os sinais do soluto desapareçam ou fiquem com uma intensidade muito menor que o esperado (mesmo tendo uma concentração razoável) devido à limitação da resolução e da gama dinâmica do conversor analógico-digital.

Na maioria das experiências deste trabalho o solvente utilizado foi a água por ser mais económica que o correspondente óxido de deutério e por possibilitar a observação de sinais de prótons em regime de troca com o solvente. Para a supressão do sinal da água podem ser utilizados métodos de pré-saturação ou de relaxação diferencial (WEFT, WATR [39]) mas o método escolhido foi a excitação selectiva devido ao seu bom desempenho no espectrómetro utilizado [40].

A sequência de impulsos utilizada é conhecida por $1-\overline{3}-3-\overline{1}$ devido à proporção entre os tempos dos quatro impulsos que a compõem (o superlinhado significa um desvio de fase de 180°): $\alpha - t - 3\alpha - t - 3\alpha - t - \alpha$ - aquisição, onde $8\alpha = 90^\circ$. A utilização de atenuação na potência do transmissor permite alcançar melhores resultados. O espectro resultante mostra um ponto de excitação nula no centro do espectro, que se faz coincidir com a frequência do sinal da água, e uma distância até ao máximo de excitação igual a $1/(2t)$. O espectro alterna de fase 180° após cada nulo.

4.2 Espectros bidimensionais

OS ESPECTROS BIDIMENSIONAIS são conseguidos usando dois domínios de tempo (t_1 e t_2) em vez de um (t_2) nas sequências de impulsos que os produzem, sendo feitas portanto duas transformações de Fourier para cada um desses domínios.

Um dos espectros bidimensionais usados neste trabalho para elucidação de atribuição foi do tipo de correlação de desvio químico heteronuclear. Este tipo de experiência baseia-se na transferência de coerência entre ^1H e ^{13}C (partindo de uma sequência DEPT ou INEPT [31 e referências aí contidas]). Durante t_1 os sinais dos núcleos de ^{13}C são modulados com a frequência dos prótons a eles adjacentes, devido ao seu acoplamento, estabelecendo-se assim a correlação entre os seus desvios químicos. O resultado são sinais de correlação entre a dimensão f_1 (transformada de t_1), onde teremos os desvios químicos de ^1H , e f_2 , onde se encontram os desvios químicos do espectro de ^{13}C .

Noutros espectros bidimensionais, usadas para a medição de tempos de relaxação de quantum nulo, decorrido o tempo t_1 dá-se a transferência de coerência homonuclear entre coerências de quantum zero e quantum único através do acoplamento homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$. Estes espectros foram adquiridos usando o método TPPI (time proportional phase incrementation) que consiste no incremento de 90° da fase do primeiro impulso da sequência para cada incremento de t_1 [41]. Após a transformada de Fourier real dos pontos da dimensão t_1 , o espectro obtido é equivalente à execução de detecção em quadratura nas duas dimensões (se for usada a detecção em quadratura usual em t_2). Neste modo de detecção torna-se necessário preservar, através dos ciclos de fase apropriados, tanto as coerências de sinal positivo como as de sinal negativo.

4.3 Medição de T_1 e de T_2

UM IMPULSO DE 180° COLOCA a magnetização em $-z$ o que permite a existência de relaxação puramente longitudinal. Após um tempo t a variação de M_z devida à relaxação pode ser medida aplicando um impulso de 90° para colocar a magnetização no plano xy e medir a sua intensidade. Este é o chamado método da inversão-recuperação uma vez que se baseia na inversão da magnetização e respectiva relaxação de volta ao equilíbrio. O seu decaimento é essencialmente exponencial seguindo a expressão 2.21 para $M_z(0) = -M_0$:

$$M_z(t) - M_0 = -2 M_0 e^{-t/T_1} \quad (2.76)$$

Para a medição de T_2 , a magnetização deve ser colocada no eixo dos yy por intermédio de um impulso de 90°_x . A dissipação da coerência da magnetização no plano xy do referencial rotativo como resultado da relaxação transversal tem duas contribuições, como já foi referido: a falta de homogeneidade de \mathbf{B}_0 e os processos aleatórios que criam os campos magnéticos oscilantes responsáveis pela chamada "relaxação natural". A aplicação de um impulso de 180°_y após um tempo t produz, t segundos depois, uma refocagem dos vectores (eco de spin de Hahn [42]) que se dispersaram devido a terem diferentes frequências por experimentarem diferentes campos magnéticos causados pela inhomogeneidade de \mathbf{B}_0 . Esta refocagem dos desvios químicos também elimina os efeitos da relaxação longitudinal que entretanto ocorre bem como imperfeições na duração dos impulsos. Ao fim de um tempo $2t$ a intensidade do vector magnetização em y é menor que após o impulso inicial de 90° devido à relaxação natural irreversível. Mais sequências de eco podem ser aplicadas em série para obter tempos de relaxação variáveis, experiência que é conhecida por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) [43]. A intensidade dos ecos é dada por

$$M_y'(2nt) = M_y'(0) e^{-2nt/T_2} \quad (2.77)$$

onde n é o número de ecos de spin efectuados.

Se a largura das bandas for proporcional apenas a $1/T_2$, ou seja, quando não existe apreciável contribuição da falta de homogeneidade do campo magnético ou de troca química, é possível medir a constante de tempo de relaxação transversal através da medição da largura das bandas. Inversamente, os valores teóricos para T_2 podem ser usados para fazer a simulação dos sinais de um espectro de RMN.

A medição da constante de tempo transversal para coerências de quantum múltiplo pode ser executada da mesma forma, substituindo o impulso de excitação de 90°_x pela sequência $90^\circ_x - t - 180^\circ_x - t - 90^\circ_x$ que produz termos não observáveis de quantum múltiplo. Após a sequência CPMG, durante a qual esses termos diminuem de intensidade devido à relaxação, essa componente da magnetização pode ser observada por transferência de coerência para termos observáveis (quantum único).

Deve ser referido que, embora os desvios químicos sejam refocados pela sequência de impulsos CPMG o mesmo não acontece com a evolução do acoplamento escalar, o que se traduz em distorções de fase no espectro observado que serão tanto maiores quanto maior for $2nt$. Isto aplica-se a todas as ordens de coerência afectadas de acoplamento.

Constantes de equilíbrio químico e sua determinação por RMN

NESTE CAPÍTULO SÃO PRECISADOS alguns conceitos relacionados com o equilíbrio químico, nomeadamente no que respeita à formação de complexos de metais de transição, bem como alguns termos do vocabulário utilizado. Em seguida pretende-se dar uma panorâmica geral sobre as técnicas e os métodos de determinação de constantes de equilíbrio utilizando a espectroscopia de RMN, sendo descritas algumas técnicas gráficas e computacionais para essa determinação.

1. Constantes de estabilidade de complexos

Terminologia

A terminologia, as definições e os conceitos usados neste trabalho são correntes na área do estudo do equilíbrio químico. Vale a pena no entanto precisar o significado de alguns termos que são largamente utilizados ao longo do texto.

O termo "espécie" é utilizado para designar uma molécula ou ião molecular que exista em solução. Em muitas equações químicas serão utilizadas abreviaturas que permitam identificar as diferentes espécies facilmente; essas designações serão clarificadas no texto quando necessário. O termo "forma" é usado relativamente a uma molécula para designar uma espécie que contém essa molécula. Como exemplo pode ser considerado o caso de uma solução de citidina (Cit) e nitrato de zinco ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) em água; aí serão exemplos de espécies Cit, HCit^+ , ZnCit^{2+} , $\text{Zn}^{2+}_{(\text{aq.})}$, ZnOH^+ , $\text{NO}_3^-_{(\text{aq.})}$, H_2O , H_3O^+ e OH^- ; Cit, HCit^+ , ZnCit^{2+} são formas de citidina, ZnCit^{2+} , $\text{Zn}^{2+}_{(\text{aq.})}$, ZnOH^+ , são formas de zinco(II) e ZnOH^+ , H_2O , H_3O^+ e OH^- são formas de água.

Grande parte do presente estudo incidiu sobre um tipo de reacções químicas relativamente bem definido, ou seja, a associação molecular através da formação de

uma ou mais ligações dativas entre moléculas que fornecem os electrões de uma sua orbital não ligante, os ligandos, a outras moléculas, catiões metálicos (simbolizados pela letra M) ou moléculas que os contêm, e que recebem essa densidade electrónica numa das suas orbitais ou combinação de orbitais (nesta última categoria são considerados os catiões H^+ e D^+). A este tipo de associação molecular será chamado neste trabalho "complexação" sendo o seu resultado o "complexo". A expressão "constante de estabilidade" (símbolo geral K) é utilizada para designar a constante de equilíbrio para a formação de um complexo ligando-metal, com as concentrações sempre expressas em mol dm^{-3} (M).

Um "complexo binário" resulta da coordenação de um único ligando a um catião metálico enquanto que um "complexo ternário" envolve um catião metálico e dois ligandos a ele coordenados. No caso desses ligandos serem diferentes o complexo designa-se por "ternário misto".

Complexos ternários mistos

A formação preferencial dos complexos ternários mistos MAB relativamente aos complexos MA_2 e MB_2 numa solução equimolar de A e B tem em primeiro lugar uma explicação estatística, uma vez que o complexo misto tem maior probabilidade de se formar [44], mas, no entanto, os complexos mistos são ainda mais estáveis do que o que seria previsível estatisticamente.

Experiências com ligandos pequenos e catiões metálicos do primeiro período dos metais de transição permitiram concluir que a neutralização de carga e a pequena perturbação estérica entre os ligandos são factores que favorecem a formação de complexos ternários mistos. Foi possível também observar que o primeiro ligando a coordenar-se ao catião metálico tem muitas vezes um poder discriminatório sobre o segundo ligando que entra na primeira esfera de coordenação [45], ou seja, existe um efeito de cooperatividade entre os ligandos que por vezes envolve uma interacção directa entre eles.

No mecanismo de formação dos complexos ternários foi demonstrado que o passo limitante da velocidade da reacção é a libertação de moléculas de água da primeira esfera de coordenação do catião metálico quando o átomo coordenante do

ligando não está protonado; no caso dos catiões do grupo 12, a velocidade de troca de moléculas de água é maior para zinco e cádmio que para o mercúrio. Por outro lado, quando o ligando está protonado, a sua desprotonação é o passo limitante da reacção [45].

A estabilidade adicional de um complexo ternário pode ser quantificada através da diferença

$$\Delta \log K = \log K_{MAB}^{MA} - \log K_{MB}^M,$$

ou seja, avaliando a tendência relativa que um ligando B tem para se ligar a um catião metálico M com um ligando A a ele coordenado. Estatisticamente, $\Delta \log K$ deve ter sempre um valor negativo uma vez que B tem menos locais de coordenação disponíveis em MA que em M. Se, por exemplo, M formar complexos octaédricos e A e B forem ligandos monodentados, então $\Delta \log K$ deve ser igual a

$$\Delta \log K = \log(5/6) - \log(6/6) = -0,079.$$

Se $\Delta \log K$ for maior que este valor teórico estaremos perante um fenómeno de cooperatividade originado por alguns dos factores de estabilidade já referidos para os complexos ternários.

Aspectos termodinâmicos do equilíbrio químico

A formação dos complexos estudados neste trabalho é espontânea (e rápida) bastando para tal misturar os reagentes em solução aquosa, sendo as constantes de estabilidade desses complexos uma medida da afinidade do ligando para o ião metálico nas condições experimentais usadas. Esta última afirmação tem uma implicação e uma justificação termodinâmica que se passam a expor.

A condição de equilíbrio para uma reacção química descrita pela equação generalizada

$$\sum v_i M_i = 0$$

é

$$\sum v_i \mu_i = 0 \quad (3.1)$$

em que M_i representa as várias espécies presentes na reacção, v_i os coeficientes estequiométricos e μ_i os potenciais químicos das espécies.

Numa solução real temos como válida a relação termodinâmica

$$\mu_i = \mu_i^\ominus + RT \ln a_i \quad (3.2)$$

que define μ_i , a energia livre molar (potencial químico) da espécie i , em função da sua actividade, a_i . Esta quantidade está relacionada com a concentração molar, c_i , pela expressão:

$$a_i = \gamma_i c_i$$

onde γ_i , o coeficiente de actividade da espécie i , é igual a 1 numa solução ideal; μ_i^\ominus é o potencial químico padrão, ou seja, o potencial químico para $a_i = 1$, que se define como o *estado padrão*. Existe portanto uma dependência entre μ_i^\ominus e o coeficiente de actividade γ_i . Por outro lado, é escolhido como *estado de referência* o estado do sistema para o qual o coeficiente de actividade, que é uma função da composição do sistema, é igual a 1.

Substituindo 3.2 em 3.1 obtém-se a expressão

$$\sum v_i \mu_i^\ominus + RT \sum v_i \ln \gamma_i c_i = 0$$

ou

$$\sum v_i \mu_i^\ominus = -RT \ln \left[\prod (\gamma_i c_i)^{v_i} \right]$$

que pode ser expressa como

$$\Delta G^\ominus = -RT \ln K$$

com ΔG^\ominus representando a diferença de energia livre entre produtos e reagentes no estado padrão, $\sum v_i \mu_i^\ominus$, e a constante $K = \prod (\gamma_i c_i)^{v_i}$ definida como a constante de equilíbrio termodinâmica.

Para uma equação química geral



a constante de equilíbrio termodinâmica é assim definida por

$$K = a_A^a a_B^b \dots a_M^{-m} a_N^{-n}$$

donde facilmente se conclui que

$$K = (\gamma_A^a \gamma_B^b \dots \gamma_M^{-m} \gamma_N^{-n})(c_A^a c_B^b \dots c_M^{-m} c_N^{-n}) = K_\gamma K_c$$

A constante de equilíbrio K_c é a chamada constante de equilíbrio de concentração ou estequiométrica. Neste trabalho as quantidades medidas por RMN ou com o eléctrodo de pH são concentrações ou actividades, respectivamente, e portanto as constantes

calculadas não são, em primeira análise, verdadeiras constantes termodinâmicas, estando dependentes dos níveis de concentração usados para a sua determinação, podendo, nomeadamente, variar com a força iónica do meio.

Estado de referência

Para poder avaliar o significado de uma constante de equilíbrio é necessário definir o seu estado de referência. Este estado de referência pode ser definido para uma solução muito diluída (concentrações da ordem de 10^{-4} mol dm^{-3}), considerada muito próxima do estado ideal e, nesse caso, K_c é calculada para diferentes composições do sistema (a baixa concentração) e K_γ é estimada, por exemplo, pela equação de Debye-Hückel para a força iónica e os coeficientes de actividade. Outra solução seria extrapolar para o estado de referência os valores de K_c determinados a concentrações elevadas, embora essa operação exija o conhecimento teórico da variação dos coeficientes de actividade com a concentração e as sua intercorrelação.

Neste trabalho, a baixa sensibilidade característica da ressonância magnética nuclear impôs a utilização de concentrações que não podem ser muito inferiores a 10^{-2} mol dm^{-3} , e, por outro lado, a utilização de soluções com sais de metais torna a força iónica bastante elevada. A solução adoptada nestes casos baseia-se na definição do estado de referência ao nível das concentrações usadas para as experiências, onde, por definição, se considera assim K_γ igual a 1 e portanto $K = K_c$. Esta aproximação é tanto menos válida quanto mais variável for, ao longo da experiência, a composição das soluções usadas para o cálculo das constantes de equilíbrio.

Dois tipos de experiências foram usados para a determinação de constantes de estabilidade: um em que é variado o pH e são mantidas constantes as outras concentrações e outra em que o pH é constante e é variada a concentração de ião metálico. Em ambos os casos as constantes são determinadas pela análise da variação dos desvios químicos do(s) ligando(s). Isto implica que a definição do estado de referência para os diversos sistemas estudados possa ser simplesmente a definição das condições em que são medidos os desvios químicos do(s) ligando(s) nas soluções de referência: desvios químicos de referência. As soluções de referência são aquelas em

que as condições de concentrações totais, temperatura, referência interna e força iônica das experiências são reproduzidas mas que não contêm catião metálico complexante.

Para as experiências de pH variável, as concentrações e a força iônica não variam apreciavelmente e portanto o estado de referência é facilmente definido pela descrição das concentrações usadas e força iônica do meio. No caso das experiências de pH fixo há necessariamente grandes variações de concentração de catião metálico (e respectivo contra-ião) e assim optou-se por definir como estado de referência os desvios químicos dos ligandos em soluções em que a força iônica é estabelecida por sais não complexantes, sendo as constantes de equilíbrio referidas portanto a força iônica próxima de zero.

Na segunda parte deste texto, a definição dos estados de referência será discutida para cada caso particular. Procurou-se sempre obter constantes cujos valores fossem comparáveis, isto é, relativas a estados de referência semelhantes, uma vez que se pretendeu fazer um estudo comparativo entre as afinidades dos ligandos para os catiões H^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , e Hg^{2+} .

2. Cálculo de constantes de estabilidade por RMN

A APLICAÇÃO DE PROGRAMAS de computador para o cálculo de constantes de equilíbrio a partir de dados de equilíbrio obtidos de uma grande variedade de fontes, tornou essa operação quase de rotina [46-48]. No entanto, também permitiu que fossem obtidos valores por vezes sem significado por aplicação de programas cálculo de uma forma pouco crítica. Este problema foi tido em conta durante a execução do trabalho experimental descrito na Parte II onde é discutido detalhadamente o modo de obtenção e o significado das constantes calculadas.

O procedimento geral para o cálculo de constantes de estabilidade é baseado frequentemente no mesmo princípio, qualquer que seja a técnica instrumental usada para obter os dados do equilíbrio. Trata-se de ajustar, pelo método dos mínimos quadrados, uma função paramétrica aos dados experimentais. Os parâmetros (constantes de equilíbrio e outras variáveis características do equilíbrio) são alterados até ser encontrado um mínimo absoluto para a função. Para cada tipo de técnica existem

métodos próprios para criar essas funções, baseadas em modelos de equilíbrio com estequiometria postulada ou conhecida.

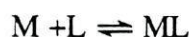
Os métodos instrumentais mais utilizados são fundamentalmente em dois tipos diferentes: electroquímicos e espectroscópicos. No primeiro grupo integram-se a potenciometria (talvez o método mais usado para o estudo de complexos), a polarografia e a voltametria. As técnicas espectroscópicas mais comuns são as espectrofotometrias electrónicas (ultravioleta / visível) e de infravermelho e a espectrometria de ressonância magnética nuclear, acerca da qual será feita seguidamente uma exposição mais detalhada.

2.1 Regressão sobre os desvios químicos de RMN

Regressão linear

Os métodos de regressão linear utilizando os desvios químicos de RMN foram utilizados, por um lado, para estabelecer a estequiometria das reacções de complexação e, por outro, para a determinação de constantes de estabilidade [49], muitos derivados de métodos já conhecidos para estudos de espectroscopia electrónica [50-52]. A alteração dos desvios químicos devida à formação de complexos pode dar uma indicação sobre o local, ou locais, de coordenação uma vez que a alteração da densidade electrónica é, pelo menos para moléculas lineares, maior junto a esse local, diluindo-se o efeito para núcleos mais longínquos (para moléculas cíclicas ou heterocíclicas isso pode não ser inteiramente verdade). A análise da magnitude da variação dos desvios químicos pode por isso fornecer indicação sobre o tipo de complexos que se formam e os locais de coordenação.

As determinações quantitativas, nomeadamente de constantes de estabilidade, baseiam-se, como já foi referido, na análise da variação dos desvios químicos por ajuste de uma função que traduz o equilíbrio. Para o caso clássico da formação de um complexo 1:1 com a equação química



em que

$$K_{11} = [ML]/([M] [L]), \quad (3.3)$$

o desvio químico do ligando, δ , num equilíbrio rápido, é dado teoricamente pela equação 3.4

$$\delta = f_L \delta_L + f_{ML} \delta_{ML} \quad (3.4)$$

com $f_L = [L]/L_t$, $f_{ML} = [ML]/L_t$ e $L_t = [L] + [ML]$, e onde δ_L e δ_{ML} são os desvios químicos das formas L e ML. A equação 3.4 pode ser reescrita como

$$\delta = f_{ML} (\delta_{ML} - \delta_L) + \delta_L. \quad (3.5)$$

Se se redefinir os desvios químicos relativamente a δ_L através das relações

$$\Delta = \delta - \delta_L \quad \Delta_{ML} = \delta - \delta_{ML}$$

é obtida a seguinte expressão para a equação 3.5:

$$\Delta = f_{ML} \Delta_{ML}. \quad (3.6)$$

Usando a expressão da constante de equilíbrio K_{11} na equação 3.3 obtém-se para a equação 3.6 a forma

$$\Delta = \Delta_{ML} K_{11} [M] / (1 + K_{11} [M]). \quad (3.7)$$

Esta equação pode ser linearizada de três formas:

linearização de Benesi-Hildebrand

$$1/\Delta = 1/(\Delta_{ML} K_{11} [M]) + 1/\Delta_{ML} \quad (3.8a)$$

linearização de Scott

$$[M]/\Delta = [M]/\Delta_{ML} + 1/(\Delta_{ML} K_{11}) \quad (3.8b)$$

e linearização de Scatchard

$$\Delta/[M] = -K_{11} \Delta + \Delta_{ML} K_{11} \quad (3.8c)$$

Para qualquer destas equações, a regressão linear sobre os pontos experimentais fornece os valores de Δ_{ML} e de K_{11} a partir do declive e da ordenada na origem, ver Figura 3.1. Em geral, estas equações aplicam-se quando a concentração total de M (M_t) é muito maior que a concentração de L, o que permite substituir $[M]$ por M_t . Como pode ser observado nos gráficos da Figura 3.1, as três linearizações referidas não são equivalentes no que respeita à distribuição dos pontos experimentais no gráfico e por essa razão a aquisição dos valores experimentais deve prever esse facto para não valorizar um determinado intervalo de concentrações em detrimento de outros.

Quando a aproximação $[M] = M_t$ não é válida, é possível usar a regressão linear iterativamente, tal como foi proposto por Nakano *et al.* [46]. O método de Nakano é um método iterativo de regressão linear, inicialmente desenvolvido sob

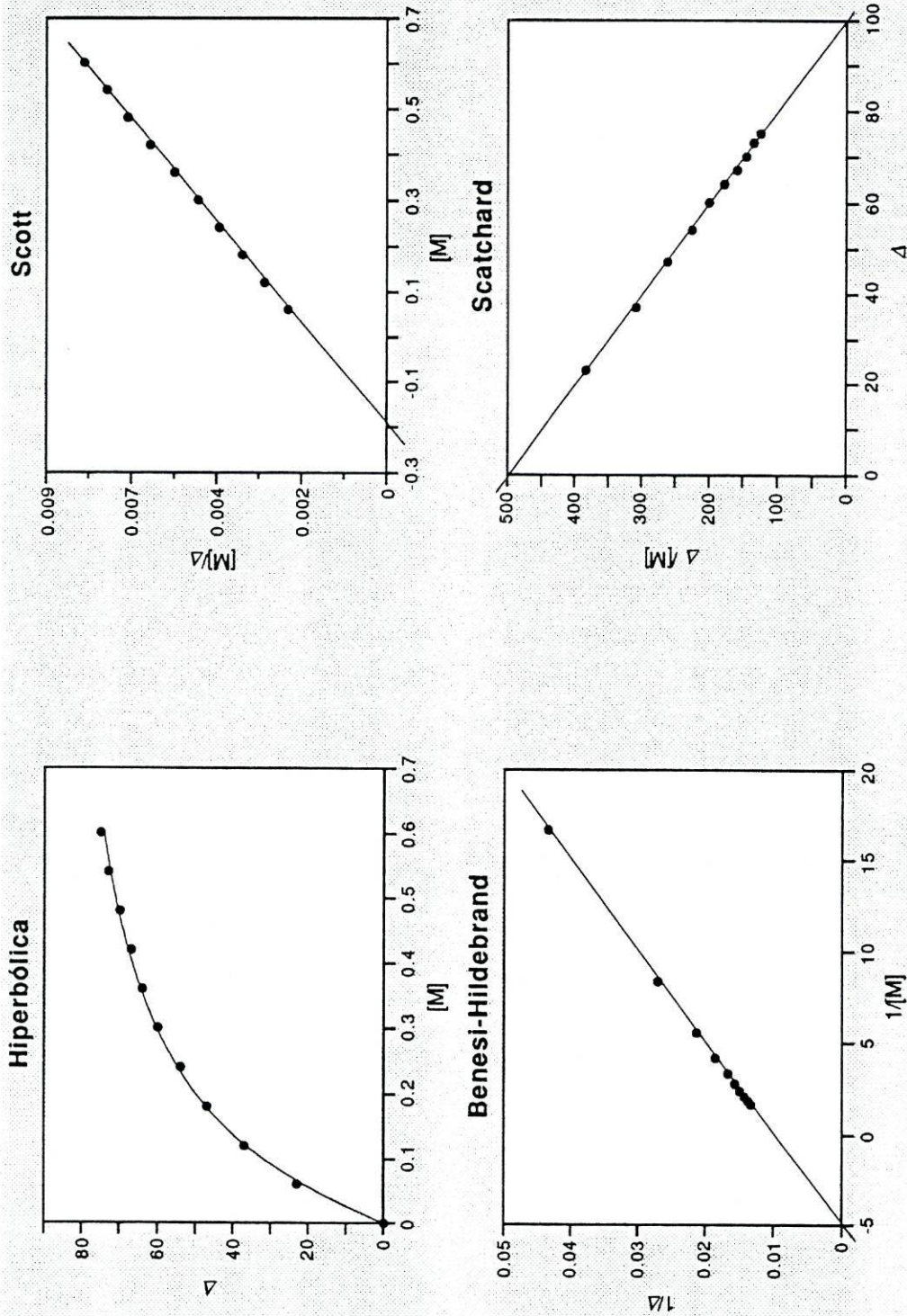


Figura 3.1 — Representações gráficas típicas das equações 3.7 (hiperbólica), 3.8a (linearização de Benesi-Hildebrand), 3.8b (linearização de Scott) e 3.8c (linearização de Scatchard).

forma gráfica, para estudar a formação de complexos 1:1. Quando K_{11} é menor que $1 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ a aproximação $K_{11}[M] \ll 1$ (equivalente a dizer que $M_t \gg [L]$) lineariza a função do ajuste e a regressão linear fornece directamente o valor dos parâmetros desejados. O método de Nakano é baseado na execução iterativa da regressão linear para abranger os casos em que não é possível fazer essa aproximação e os seus traços gerais serão delineados seguidamente.

Da equação da constante de equilíbrio e dos balanços materiais

$$K_{11} = [ML]/([M][L]) \quad (3.9a)$$

$$M_t = [M] + [ML] \quad (3.9b)$$

$$L_t = [L] + [ML] \quad (3.9c)$$

pode ser deduzida, por substituição na equação 4.1, a equação

$$M_t/\Delta = (M_t + L_t - [ML])/\Delta_{ML} + 1/(\Delta_{ML}K_{11}) \quad (3.10)$$

onde M_t e L_t são, respectivamente, a concentração total de catião metálico e de ligando, $[ML]$ é a concentração de complexo no equilíbrio e Δ_{ML} é igual a $\delta_{ML} - \delta_L$.

As experiências executadas são do tipo de variação da concentração de ião metálico onde, portanto, L_t é mantida constante e M_t é variada, sendo os dados experimentais constituídos pelos pares (M_t, Δ) . Um gráfico de M_t/Δ em função de $(M_t + L_t)$ fornece uma primeira estimativa de Δ_{ML} (recíproco do declive), valor este que é usado para calcular $[ML] = L_t(\Delta/\Delta_{ML})$ para cada ponto experimental. A repetição da regressão linear sobre os pontos $(M_t/\Delta; M_t + L_t - [ML])$, em que $[ML]$ é calculado para cada iteração pela fórmula apresentada atrás, fornece, por seu turno e de acordo com a equação 3.10, sucessivos valores de Δ_{ML} (declive) que convergirão para um valor constante até ao nível de precisão requerido. Depois de atingido esse valor, K_{11} é calculado a partir da ordenada na origem da função 3.10. Todo este processo de cálculo está exemplificado esquematicamente na Figura 3.2.

Os cálculos de constantes de estabilidade pelo método de Nakano mostraram uma elevada rapidez de convergência do processo iterativo mas este método revelou instabilidade ou não convergência para casos em que os erros aleatórios relativos dos pontos experimentais são elevados.

Os métodos de regressão linear foram aplicados a casos mais complexos que a associação 1:1 [49,53,54] mas os métodos de regressão não linear são muitas vezes

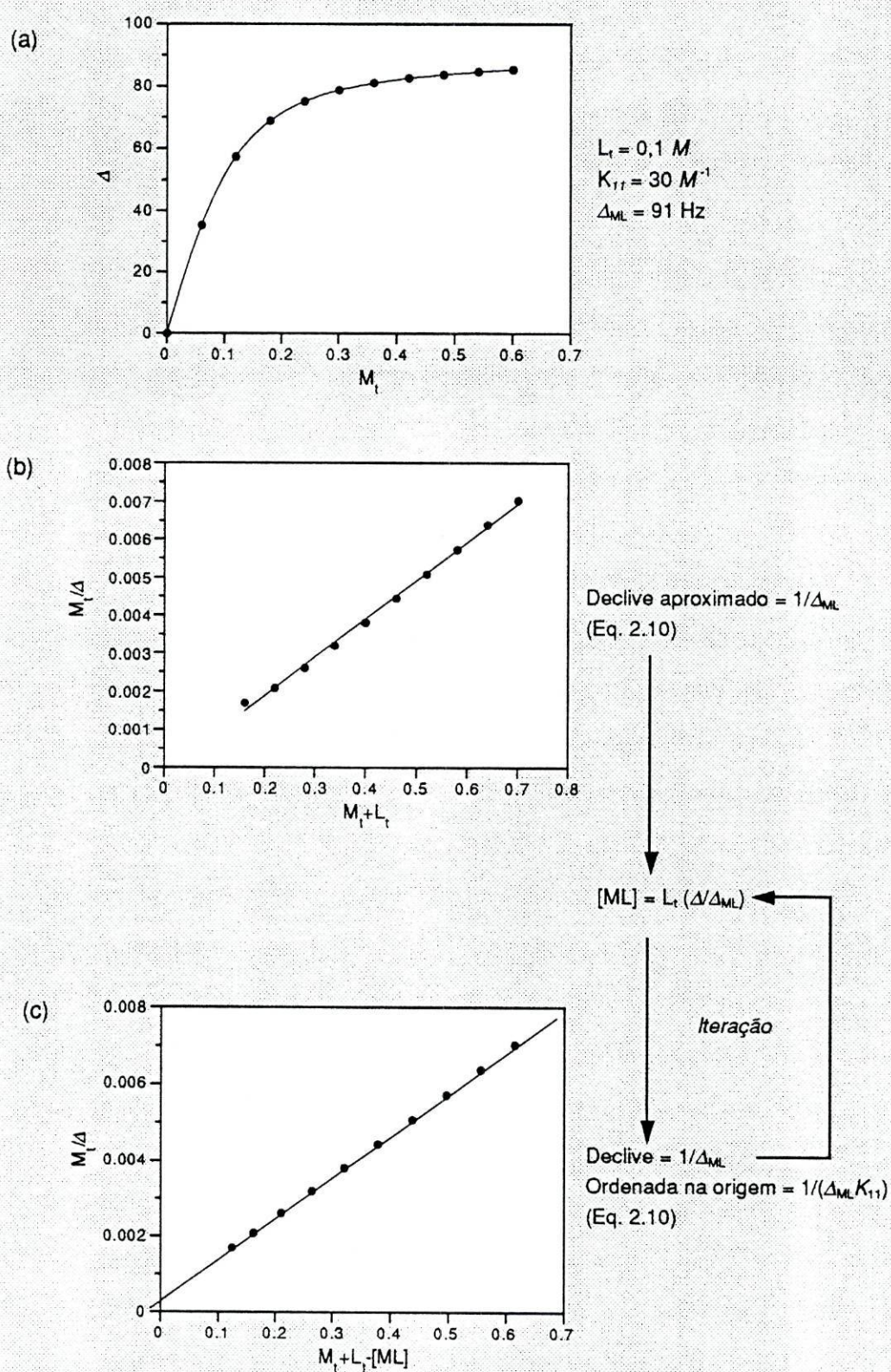


Figura 3.2 — Esquema de utilização do método de regressão linear iterativa (método de Nakano) descrito no texto. a) Simulação de uma experiência de variação de concentração de cátion metálico; b) Gráfico utilizado para a primeira estimativa de Δ_{ML} ; c) Resultado após a primeira iteração com base na regressão linear da equação 2.10.

mais convenientes para esses sistemas ou para os casos em que não se podem fazer as aproximações que conduzem à linearização das funções de desvio químico.

Regressão não linear

Este método tem a vantagem da generalidade uma vez que a função a ajustar é derivada das equações de desvio químico e balanços materiais sem ser necessário qualquer aproximação. Seguidamente é exemplificada a dedução da função de desvio químico para o caso 1:1. Das equações 3.9, e por substituição na equação 4.1 aplicada a um sistema 1:1, obtém-se

$$\Delta = \delta - \delta_L = ([L]/L_t)\Delta_L + ([ML]/L_t)\Delta_{ML} \quad (3.11)$$

Atendendo a que $\Delta_L = \delta_L - \delta_L = 0$, obtém-se, por resolução da equação de 2º grau,

$$\Delta = (M_t + L_t + 1/K_{11} - ((M_t + L_t + 1/K_{11})^2 - 4M_tL_t)^{1/2})\Delta_{ML}/2L_t \quad (3.12)$$

que é a equação do desvio químico em função de quantidades conhecidas e dos dois parâmetros a calcular, K_{11} e Δ_{ML} , onde é evidente a dependência não linear de Δ com K_{11} . O cálculo dos parâmetros é feito por regressão não linear desta função sobre os dados experimentais (M_t, Δ), que pode ser implementada num programa comercial para microcomputador.

Nos casos de equilíbrios mais complexos, em que o sistema em equilíbrio é descrito por um maior número de equações e de espécies (ver, por exemplo, o caso da Figura 4.3), o ajuste pelo método dos mínimos quadrados do conjunto de funções não linearmente dependentes que resulta desses sistemas, torna necessária a resolução de equações de 3º grau ou de grau superior ou mesmo de equações irracionais. Por uma questão de flexibilidade e de generalidade é conveniente optar, nesses casos, por um método iterativo de resolução desses sistemas de equações não lineares, que ocorrem sistematicamente nos cálculos de concentrações em equilíbrio quando a descrição do sistema contém mais que uma equação. Assim, um primeiro processo iterativo é utilizado para o cálculo das concentrações em equilíbrio, a partir dos quais é calculado o desvio químico; uma segunda iteração ajusta os parâmetros do equilíbrio para minimizar a diferença entre os desvios calculados e os observados. O programa descrito no Capítulo 4 para o cálculo de constantes de equilíbrio para qualquer sistema baseia-se nesta metodologia.

2.2 Regressão sobre as constantes de tempo de relaxação

Tal como acontece com os desvios químicos, a variação dos tempos de relaxação devido à complexação pode dar indicações qualitativas e quantitativas. Os tempos de correlação t_c do movimento nuclear em cada núcleo de uma molécula são obviamente sensíveis à formação de complexos; em princípio, a maior alteração será junto da zona de coordenação, cuja mobilidade diminuirá, conduzindo a um aumento de t_c . Estas alterações de mobilidade podem ser medidas através dos valores de T_1 e T_2 devido à sua dependência de t_c . De um ponto de vista quantitativo, a determinação das constantes de equilíbrio pode ser feita, tal como para os desvios químicos, por ajuste de uma função do equilíbrio à variação dos tempos de relaxação T , ou velocidades de relaxação, $R = 1/T$, com a variação da concentração de uma espécie. No caso de um equilíbrio rápido de estequiometria de complexação 1:1 é válida a expressão análoga a (3.4)

$$R = f_L R_L + f_{ML} R_{ML} \quad (3.13)$$

que com as substituições

$$\Delta R = R - R_L$$

$$\Delta R_{ML} = R - R_{ML}$$

permite obter

$$\Delta R = \Delta R_{ML} K_{11} [M] / (1 + K_{11} [M]) \quad (3.14)$$

que é análoga à equação 3.7. As técnicas já descritas para a linearização de (3.7) são aplicáveis a esta equação que, alternativamente, pode também ser usada para um ajuste não linear.

II

*Determinação de Constantes de
Estabilidade por RMN*

NA PARTE II DESTA DISSERTAÇÃO são apresentados os resultados experimentais referentes ao cálculo de constantes de equilíbrio por ressonância magnética nuclear para os sistemas compostos pelos catiões do Grupo 12, Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} , e por ligandos biológicos, principalmente citidina e glicilglicina.

No Capítulo 4 são descritas as condições experimentais comuns a todas as experiências executadas no que se refere a reagentes, preparação de amostras, condições de obtenção dos espectros, programas de cálculo e critérios de apresentação de resultados. É discutida também a escolha da referência interna para os desvios químicos.

Nos Capítulos 5 a 7 são expostos e comentados os resultados obtidos para o cálculo de constantes de equilíbrio em vários sistemas. O Capítulo 5 é dedicado ao estudo das interações intermoleculares entre os ligandos (citidina e glicilglicina) e entre estes e o catião H^+ .

No Capítulo 6 estão reunidos os resultados do estudo dos sistemas contendo os catiões mais leves do grupo 12, Zn^{2+} e Cd^{2+} , com citidina e/ou glicilglicina (incluindo os complexos ternários mistos) devido à semelhança de resultados obtidos para esses catiões. No Capítulo 6 são também discutidas a influência da força iónica e dos aniões sobre os desvios químicos observados para os ligandos, as condições de aplicabilidade das técnicas de pH fixo e pH variável e a escolha do estado de referência.

No Capítulo 7 são apresentados os resultados do estudo qualitativo e quantitativo dos sistemas contendo nitrato de mercúrio, citidina e/ou glicilglicina. Para esse estudo foram utilizados métodos para obter condições de equilíbrio de cinética lenta e rápida nos espectros de RMN com o objectivo de recolher mais informação sobre as espécies presentes em solução.

Condições experimentais gerais e métodos de cálculo

NESTE CAPÍTULO SÃO DESCRITAS AS CONDIÇÕES GERAIS DE OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS, É EXPLICADA A APLICAÇÃO DOS MÉTODOS COMPUTACIONAIS QUE SERVIRAM PARA O SEU PROCESSAMENTO E SÃO DEFINIDOS OS CRITÉRIOS PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS RESULTADOS. AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ESPECÍFICAS USADAS EM CADA EXPERIÊNCIA SERÃO DESCRITAS, EM PORMENOR, NOS CAPÍTULOS SEGUINTE REFERENTES AOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS.

1. Solventes e reagentes

OS SOLVENTES UTILIZADOS FORAM ÓXIDO DE DEUTÉRIO (D_2O), COM PUREZA ISOTÓPICA DE 99,9% (Aldrich), E ÁGUA DESIONIZADA E BIDESEILADA EM QUARTZO, COM UMA RESISTIVIDADE SUPERIOR A 4×10^6 OHM CM. OS ESPECTROS DE RMN DA ÁGUA NÃO MOSTRARAM NENHUM SINAL PROVENIENTE DE IMPUREZAS, PELO MENOS ATÉ AO NÚMERO MÁXIMO DE ACUMULAÇÕES NORMALMENTE USADO NOS ENSAIOS; O D_2O APRESENTOU APENAS O SINAL DE HOD.

Todos os reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem qualquer purificação adicional, excepto quando especificamente mencionado nas secções seguintes.

Os aminoácidos e derivados (glicina, glicilglicina, acetilglicina e glicilsarcosina) foram obtidos na Merck (*pro analysi*, p.a.), enquanto que a citidina (anidra) foi obtida na Aldrich.

Os sais referidos seguidamente foram obtidos na Aldrich, com uma pureza igual ou superior a 98%: KNO_3 , KCl , KBr , $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CaBr_2 \cdot 2H_2O$, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $ZnCl_2$, $ZnBr_2$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $CdCl_2$ e $CdBr_2 \cdot 4H_2O$. Os percloratos $Ca(ClO_4)_2$, $Zn(ClO_4)_2 \cdot 2H_2O$ e $Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ foram obtidos na Johnson Matthey/Alfa Products (Alfa) com um grau de pureza igual ou superior a 99,9%. O sal anidro $Hg(NO_3)_2$ (97%) foi obtido na Fluka.

Foram preparadas soluções aquosas aproximadamente 1 M dos sais referidos no parágrafo anterior, e o título foi determinado por complexometria de EDTA (Merck Titrisol) [55], com a exceção das soluções de KNO_3 , KCl e KBr , que foram preparadas por pesagem e dissolução rigorosas dos sólidos condicionados (triturados e mantidos durante 12 horas em estufa a 110°C).

O ajuste de pH das soluções aquosas foi feito utilizando quer soluções de um dos seguintes ácidos concentrados (Merck, p.a.): HNO_3 65%, HCl 37%, HBr 47%, HClO_4 70%-72%, quer uma solução aquosa a 10% p/p de NaOH (Pronalab) descarbonatada. O ajuste de pD foi feito com soluções, em D_2O , de DNO_3 65% p/p e de NaOD 40% p/p, ambas com pureza isotópica de 99% e adquiridas na Aldrich.

Como referência interna para RMN foram utilizados *tert*-butanol (Merck, p.a.; bidestilado e seco sobre sódio), *p*-dioxano (Merck, p.a.) e nitrato de tetrametilamônio (TMA; Alfa, 99%).

2. Preparação de amostras para RMN

TODAS AS SOLUÇÕES AQUOSAS destinadas a serem estudadas por RMN foram preparadas em balões volumétricos classe A de $2,00 \pm 0,02 \text{ cm}^3$, a partir dos volumes necessários de soluções 0,50 M de glicilglicina e/ou de citidina (preparadas na altura da utilização); para os estudos que envolvem cátions metálicos foi também adicionada uma toma de um volume rigoroso (seringa Hamilton de 500 μl) de uma solução de concentração conhecida de um sal desse catião. Foi adicionada a todas as soluções, antes da medição do pH final, uma referência interna para RMN, normalmente *tert*-butanol, na quantidade mínima possível (concentração sempre inferior a 0,05 M) que permitisse a detecção do seu sinal nos espectros de ^{13}C com uma relação sinal/ruído melhor que 5:1 para o número de acumulações normalmente utilizado (ver secção 4.3). Finalmente, após o ajuste do pH da solução (com ácido ou base concentrados) para um valor próximo do valor requerido, o volume foi completado com água e foi medido o pH final da solução.

As soluções em D_2O , usadas apenas no estudo dos sistemas com Hg^{2+} , foram preparadas em balões volumétricos de $2,00 \pm 0,02 \text{ cm}^3$, como descrito no parágrafo anterior, por dissolução de uma quantidade pesada rigorosamente de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e

da(s) quantidade(s) requerida(s) de ligando(s) (citidina, glicilglicina, acetilglicina, glicilsarcosina e glicina) também pesadas rigorosamente. Foi adicionada uma quantidade mínima de *tert*-butanol como substância de referência para RMN, seguindo o processo descrito acima para as soluções aquosas, e o volume foi completado com D₂O, após o ajuste do pD para um valor próximo do pretendido, com ácido ou base deuterados concentrados. Finalmente foi medido o pD final da solução.

Medição do pH

A medição do pH foi feita num decimilivoltímetro Metrohm 654 usando um eléctrodo combinado de vidro de marca Ingold, referência U402. A calibração foi efectuada com soluções padrão (Merck Titrisol); foram usados padrões com valores de pH 1,00, 3,00, 6,00, 7,00 e 9,00. Os balões volumétricos de 2 cm³ foram mantidos a 25°C por imersão num banho termostaticado.

Devido ao modo como foi executada a calibração do sistema de medição do pH, os valores de pH medidos correspondem à chamada "escala prática de pH" [56], em que os valores de pH medidos foram usados directamente (sem conversão para a "escala de actividade" ou para a "escala de concentração" [56]) nos cálculos das constantes de equilíbrio.

Em todas as medições efectuadas em D₂O considerou-se que [57]

$$pD = pD^* + 0,4, \quad (4.1)$$

onde pD* é o valor lido no decimilivoltímetro calibrado com os padrões já referidos. Sempre que foi necessário utilizar valores de constantes de acidez em estudos efectuados em D₂O, estes foram estimados a partir dos valores determinados em água recorrendo à fórmula de conversão [58]

$$pK_D = 0,32 + 1,044 pK_H \quad (4.2)$$

onde K_D é a constante de acidez calculada para D₂O e K_H é a constante de acidez determinada em água. Esta fórmula foi deduzida a partir do ajuste de uma função linear a mais de 100 pares de valores de constantes de acidez de aminas, aminoácidos (entre os quais a glicilglicina), etc., determinadas em água e em D₂O [58].

3. Condições experimentais utilizadas na obtenção dos espectros de RMN

Os ESPECTROS DE RMN foram obtidos num espectrómetro Bruker AC200 utilizando tubos de 5 mm de diâmetro externo e um volume de cerca de $0,5 \text{ cm}^3$ de soluções recém-preparadas a analisar. Os espectros foram obtidos com uma frequência de rotação da amostra de 20 s^{-1} que se verificou não provocar o aparecimento de bandas laterais de rotação com intensidade significativa. Todas as experiências foram efectuadas a temperatura constante; normalmente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, excepto quando especificado diferentemente no texto. A regulação de campo-frequência foi baseada na frequência de ressonância do deutério, fornecida quer pelo solvente em soluções em D_2O , quer por D_2O contido num tubo capilar de vidro selado imerso nas amostras das soluções aquosas.

A resolução digital utilizada foi de 0,15 Hz por ponto para espectros de ^{13}C e de 0,10 Hz por ponto para espectros de ^1H . Os desvios químicos foram medidos em hertz relativamente ao sinal fornecido pela referência interna, utilizando uma função automática do espectrómetro para esse efeito. Esta função permite minimizar os erros provenientes da digitalização, pois ao fazer o ajuste de uma função lorentziana aos pontos experimentais de cada banda do espectro, permite assim encontrar o desvio químico para o qual a intensidade dos sinais é máxima. Ao longo deste trabalho verificou-se que os desvios químicos para diferentes espectros de uma mesma amostra são reprodutíveis dentro de um intervalo normalmente inferior a 0,2 Hz para ^1H e inferior a 0,3 Hz para ^{13}C . A incerteza no desvio químico provocada pelo espectrómetro está portanto próxima dos limites da digitalização, embora para os sinais mais fracos a contribuição proveniente do ruído da linha de base seja importante, nomeadamente para os espectros de ^{13}C .

Os espectros de ^{13}C foram obtidos a 50,32 MHz com desacoplamento de ^1H pelo método de impulsos compostos, tendo normalmente sido acumulados entre 200 a 500 varrimentos. A relação sinal/ruído dos sinais situou-se num valor típico de 7:1 para um tempo de aquisição não superior a 40 minutos. Foi sempre efectuado o número de acumulações necessário para que a relação sinal/ruído do pico menos intenso do espectro fosse melhor que 2:1.

Os espectros de ^1H foram obtidos a 200,13 MHz com 24 ou 32 acumulações, com um tempo total máximo de aquisição de 2 minutos. A aquisição dos espectros das amostras em D_2O foi executada pelo processo normal com excitação por pulso único, enquanto que os espectros de ^1H em água foram obtidos por excitação selectiva do intervalo de frequências a observar, por meio de uma sequência de impulsos do tipo $1-\bar{3}-3-\bar{1}$, representada na Figura 4.1(a), com o objectivo de eliminar o sinal da água [40]. A curva de excitação, representada na Figura 4.1(b), foi obtida medindo a intensidade de um mesmo sinal singuleto que foi deslocado, por variação da frequência central de irradiação em passos de 50 Hz, ao longo da largura espectral normalmente utilizada para os espectros de ^1H . A frequência central da irradiação, onde a excitação é nula, foi feita coincidir com a frequência do sinal da água para assim se obter a sua eliminação. A curva de excitação permite compreender o tipo de dependência entre a posição no espectro de um sinal e a sua intensidade observada.

4. Escolha da referência interna

A UTILIZAÇÃO DE REFERÊNCIAS externas eliminaria todos os problemas resultantes da interacção directa das substâncias usadas como referência com os solutos. No entanto, a correcção de susceptibilidade magnética que é necessário introduzir para soluções com concentrações elevadas de iões metálicos é bastante complexa e pouco

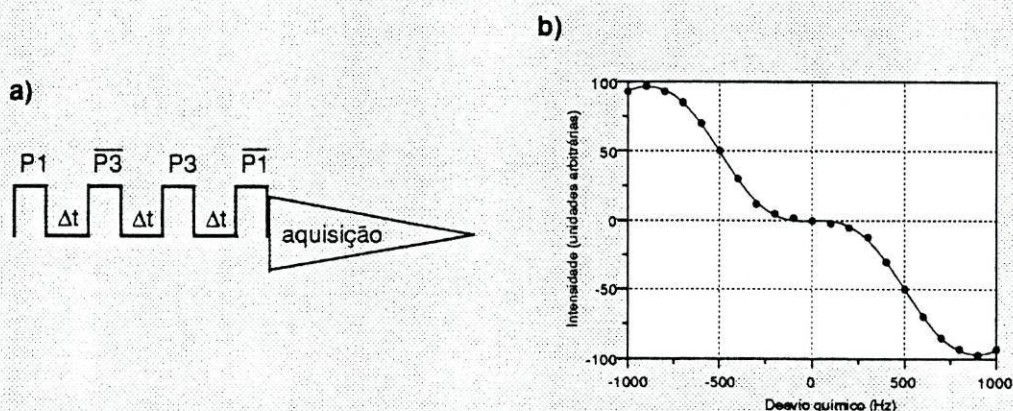


Figura 4.1 — (a) Sequência de impulsos $1-\bar{3}-3-\bar{1}$ para remoção do sinal do solvente; a duração de P1 e $\bar{P1}$ é de $120 \mu\text{s}$ e a de P3 e $\bar{P3}$ é de $360 \mu\text{s}$ (a barra superior indica um desvio de fase de 180°); $\Delta t = 0,2 \text{ ms}$. A potência do transmissor foi atenuada em 20dB relativamente à potência normal de um impulso não selectivo. (b) Curva de excitação da sequência de impulsos representada em (a).

fiável [59], embora Rabenstein et al. [60] tenham verificado para espectros de ^1H que em soluções 10 mmol dm^{-3} em glicil-L-histidil-L-lisina, 20 mmol dm^{-3} em nitrato de zinco e $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ em nitrato de sódio a alteração de susceptibilidade magnética devida à variação do pD entre 2 e 12 é desprezável, não tendo usado nenhuma correcção nos desvios químicos medidos relativamente a uma referência externa.

Neste trabalho optou-se por utilizar referências internas, embora importe referir que todas elas estão sujeitas a interacções fracas com outras moléculas em solução, nomeadamente moléculas aromáticas e/ou iões metálicos, sobretudo aos níveis de concentrações de substâncias ionizáveis em solução que foram utilizadas neste trabalho [61]. No que se segue resumem-se alguns dados publicados acerca do comportamento das substâncias mais usadas como padrão de desvio químico em soluções aquosas, quando em presença de substâncias aromáticas e de iões.

Foi observado que a utilização dos iões trimetilsililpropanosulfonato, trimetilsililpropanoato e o acetonitrilo como referência interna é afectada pela coordenação ao catião zinco em solução aquosa e a mesma observação foi feita para o *p*-dioxano [61]. Por essa razão, estas referências ocorrem a menor frequência na presença de zinco, não sendo, portanto, uma escolha apropriada no presente trabalho.

Os desvios químicos do *tert*-butanol e do *p*-dioxano são influenciados por concentrações elevadas de compostos aromáticos em solução [59]. Por outro lado, o ião tetrametilamónio não mostrou ser afectado por este último tipo de interferência, nem pela presença de Zn^{2+} e Na^{2+} até concentrações de $2,0 \text{ M}$, embora seja afectado pela presença de GG^- a pH elevado [59].

Esta última observação desaconselha a escolha de TMA como referência interna no presente trabalho pois, embora o seu desvio químico seja praticamente independente da força iónica do meio, há a necessidade de observar os desvios químicos da glicilglicina a pH elevado. Por outro lado, o *tert*-butanol pode interactuar hidrofobicamente com a citidina, já que esta apresenta um carácter aromático. Foi assim necessário avaliar o comportamento relativo das referências *tert*-butanol, *p*-dioxano e ião tetrametilamónio (TMA) em amostras preparadas neste trabalho. Foram executados alguns ensaios com cada uma dessas referências isoladamente; esses ensaios são em tudo semelhantes entre si com a excepção da mudança da

referência interna. Os desvios químicos relativamente às várias referências foram analisados entre si e foram calculadas constantes de equilíbrio. Alguns dos resultados destes ensaios são apresentados nos Capítulos 5 e 6 mas a conclusão geral aponta para que, em estudos com a citidina, quer o *tert*-butanol quer o TMA apresentam sempre resultados muito idênticos entre si mas diferentes dos resultados com *p*-dioxano, sobretudo em soluções com elevada concentração de iões Zn^{2+} e Cd^{2+} . Em soluções de glicilglicina, as referências *tert*-butanol e *p*-dioxano forneceram resultados idênticos, excepto quando se usaram elevadas concentrações de ião metálico; os resultados obtidos com TMA a pH alto divergiram sistematicamente dos resultados obtidos com as outras duas referências.

Uma forma de controlar o comportamento de uma referência será comparar os desvios químicos obtidos com os fornecidos usando como referência o desvio químico de um núcleo da própria molécula em estudo, ou seja, usando uma referência intramolecular [59,62]. Esta análise foi possível no caso da citidina pois os núcleos da ribose estão longe das posições de coordenação; os resultados obtidos revelaram-se concordantes com os obtidos com TMA (a pH menor que 8) e com *tert*-butanol.

Tanto estas últimas observações como as obtidas por comparação de diferentes referências internas corroboram os resultados da literatura citados acima e apoiam a utilização de *tert*-butanol como referência interna de desvios químicos neste trabalho. De facto, a concentração relativamente baixa de citidina usada (0,1 M) parece não interferir apreciavelmente com o desvio químico do *tert*-butanol, pois tem um comportamento semelhante ao TMA nessas soluções; por outro lado não mostrou ser afectado por variação de pH dentro do intervalo utilizado, contrariamente ao TMA na presença de glicilglicina. Nas secções referentes aos resultados experimentais é discutido, sempre que necessário, o comportamento da referência interna.

A escolha da referência interna é apenas um aspecto da definição do conjunto de condições utilizado na recolha dos dados experimentais. Em última análise, os valores das constantes de equilíbrio são dependentes dessas condições. Em geral, tentou-se sempre encontrar um estado de referência (combinação de força iónica, anião e referência interna) que permitisse isolar o efeito da coordenação dos catiões metálicos (ou do catião H^+) sobre os desvios químicos dos núcleos dos ligandos.

5. Os dados experimentais e o cálculo das constantes de equilíbrio

NESTE TRABALHO, OS DADOS experimentais assumiram a forma de pares de valores do tipo (pH, δ_{obs}) ou ($[M]_{\text{t}}$, δ_{obs}), ou seja, o desvio observado em função do pH ou da concentração total de catião metálico, correspondendo aos dois tipos de experiências executadas. No primeiro, as concentrações totais de todos os reagentes são mantidas constantes, excepto a concentração de H^+ que é variada (experiências com pH variável). No segundo tipo de experiência, o valor de pH é mantido constante e varia-se a concentração total de um dos reagentes, geralmente a do catião metálico (experiências com pH constante).

As experiências com pH variável têm a vantagem de estar associadas a pequenas variações da força iónica entre os pontos de uma mesma experiência e grandes variações nos valores de desvio químico, permitindo também o estudo de um maior número de equilíbrios devido ao grande intervalo de concentração de catião H^+ passível de ser utilizado. Este tipo de experiências foi utilizada para o cálculo de todas as constantes de acidez e, também, de todas as constantes de complexação com catiões metálicos, uma vez que os locais de coordenação dos ligandos usados neste trabalho são comuns aos catiões metálicos e ao catião H^+ . Como os desvios químicos são uma função das concentrações de todas as formas em solução do composto observado, a variação da concentração de H^+ provoca variações dos desvios químicos observados uma vez que altera a concentração das espécies de citidina ou de glicilglicina protonadas, desprotonadas e coordenadas ao catião metálico. A análise destas variações utilizando modelos adequados, que serão descritos nos capítulos seguintes, está na base do cálculo das constantes de equilíbrio.

Nas experiências com pH constante fez-se variar, geralmente, a concentração de catião metálico (mantendo constante a concentração do ligando), o que origina variações significativas na força iónica e na concentração de aniões entre os pontos de uma mesma experiência. O desvio químico observado no equilíbrio depende das concentrações totais usadas, pois estas condicionam as concentrações das diversas formas do composto estudado. O processo de análise dos desvios é idêntico ao utilizado para o método de variação de pH mas, neste caso, aplicado a um conjunto de pontos que representam a variação do desvio químico observado em função da

concentração inicial de catião metálico. Este tipo de experiências foi usado no cálculo de algumas constantes de complexação, nomeadamente com a citidina. Foram também usadas para avaliar o efeito da variação da força iónica e da presença de aniões (concentração e tipo) sobre (a) os desvios químicos da citidina e (b) o valor calculado para as suas constantes de complexação com catiões metálicos. No estudo da complexação da glicilglicina por variação de concentração de ião metálico não foi observada coerência interna entre os valores das constantes de equilíbrio calculadas a partir dos desvios químicos de cada um dos seus núcleos. Esta observação, que será discutida mais adiante, impediu a utilização de experiências de pH constante para o estudo dos sistemas com glicilglicina.

5.1 Os conjuntos de pontos experimentais: critérios usados na sua selecção

O ALGORITMO QUE É UTILIZADO pelo programa geral de cálculo descrito na secção 4.5.5 (método de regressão não linear), exige a utilização de um número de pontos experimentais superior, em pelo menos uma unidade, ao número de parâmetros a otimizar [63]; neste trabalho, o número de pontos experimentais utilizado foi sempre, pelo menos, triplo do número de parâmetros contidos na função que representa o modelo (constantes de equilíbrio e desvios limite).

Em todas as experiências com pH variável procurou-se que os pontos experimentais se situassem essencialmente na zona de pH onde a concentração das espécies intervenientes nas reacções do modelo fosse elevada, ou seja, onde era esperada uma maior contribuição das espécies contidas no modelo para o desvio químico observado.

Para tentar minimizar os erros sistemáticos, os resultados experimentais, constituídos por pares de valores concentração-desvio químico ou pH-desvio químico, foram obtidos em pelo menos duas experiências independentes, ou seja, realizadas em alturas diferentes, a partir de diferentes soluções iniciais preparadas independentemente e fazendo uma recalibração do sistema de medição de pH [64]. Os conjuntos de pontos experimentais assim obtidos foram comparados entre si através (a) da sua representação gráfica, que permitiu detectar eventuais diferenças grosseiras, e (b) por um ajuste da função modelo a cada um dos conjuntos, para avaliar sobre a sua concordância. Os conjuntos concordantes foram integrados num só conjunto para

execução dos cálculos e obtenção dos valores finais dos parâmetros do modelo. O grupo de desvios químicos de cada núcleo observado do ligando vai constituir um conjunto de dados experimentais. Os espectros de ^{13}C e de ^1H dos ligandos estudados neste trabalho apresentam vários sinais, com frequências diferentes, cujos desvios químicos podem, em princípio, ser utilizados para o cálculo de constantes de equilíbrio; no entanto, por razões que serão explicadas seguidamente, só um subconjunto desses núcleos, que pode variar de caso para caso, foi utilizado.

Como regra geral foram excluídos os núcleos pouco sensíveis, em termos de variação de desvio químico, à presença do próton e/ou do catião coordenante, essencialmente aqueles que estão distantes, em termos do número de ligações químicas, da posição de coordenação antecipada como a mais provável. Núcleos situados longe dessa posição mas que exibiam desvios consideráveis, foram também eliminados por fornecerem em geral valores pouco concordantes com aqueles núcleos que se situam na proximidade da posição de coordenação. Estes critérios permitiram obter subconjuntos de núcleos para os quais os valores calculados de constantes de equilíbrio formam um conjunto homogéneo, e ao mesmo tempo eliminar dos desvios químicos perturbações não relacionadas directamente com a coordenação do catião, permitindo, assim, obter uma menor dispersão dos resultados.

Nas secções seguintes, respeitantes aos resultados experimentais, são discutidas as condições particulares utilizadas para cada experiência e referentes, quer à obtenção dos pontos experimentais, quer à escolha do subconjunto de núcleos que foram utilizados para efectuar os cálculos de constantes de equilíbrio.

5.2 A escolha dos modelos

NESTE TRABALHO O CONCEITO de modelo é interpretado como o conjunto de equações químicas que pretende descrever o comportamento do sistema em solução; na sua definição procurou-se que o número de espécies fosse igual à soma do número de constantes de equilíbrio linearmente independentes (derivadas das equações químicas do modelo) com o número de balanços materiais (derivados das concentrações totais conhecidas).

No espectro de RMN de um ligando L, o desvio químico de um núcleo *i* relativamente a uma referência interna, em regime de equilíbrio rápido na escala de tempo de RMN entre as suas diferentes formas L^e , podem ser simulados recorrendo à equação geral

$$\delta_{\text{calc}}^i = \sum_{e=1,n} ([L^e] / L_t) \delta_{L^e}^i \quad (4.1)$$

designada por equação de desvio químico, onde *n* é o número de formas do ligando L em solução, com desvios químicos $\delta_{L^e}^i$ (desvios limite). A utilização da equação 4.1 implica conhecer, ou estimar, os valores de $\delta_{L^e}^i$ e das concentrações das espécies L^e em equilíbrio. Estas concentrações podem ser calculadas, para um determinado conjunto de constantes de equilíbrio (conhecidas e/ou ajustáveis) e de concentrações totais, resolvendo o sistema de equações não lineares definido pelas equações das constantes de equilíbrio e pelos balanços materiais. As constantes de equilíbrio e os desvios limite de valor não conhecido vão formar um conjunto de parâmetros ajustáveis na minimização da função soma dos quadrados dos resíduos para cada núcleo

$$S = \sum_{k=1,m} (\delta_{\text{obs}}^k - \delta_{\text{calc}}^k)^2 \quad (4.2)$$

onde *m* é o número de pontos experimentais e δ_{obs}^k é o desvio químico observado.

A qualidade de um ajuste iterativo, e, conseqüentemente, do modelo, poderia ser medida através do valor da função *S*, de que se procura o mínimo absoluto, e do valor da variância dos parâmetros ajustáveis no fim da iteração, que se espera seja o menor possível. No entanto, o cálculo da variância de parâmetros calculados por regressão não linear não tem uma base teórica sólida, uma vez que apenas pode ser estimado [65], e o valor dessa variância não pode ser interpretado de uma forma rigorosa [66]. Por outro lado, o nível de ajuste de uma função modelo a um conjunto de pontos experimentais aumenta com o número de parâmetros usado, independentemente da qualidade do modelo. Assim, os modelos não foram utilizados para provar a existência de espécies em solução, nem a qualidade dos ajustes foi usada para provar a validade de um modelo. A escolha dos modelos foi baseada sempre em considerações relacionadas com o tipo de ligando e de metal, e de informação publicada sobre os seus comportamentos como base/ácido de Lewis [67-70,71,72], por forma a utilizar um número de parâmetros ajustáveis correspondente ao número mínimo de equações químicas necessário para descrever as principais características do sistema em

solução [46]. Nesse sentido, não se aumentou o tamanho do modelo (número de parâmetros) para encontrar um melhor ajuste aos pontos experimentais (menor soma do quadrado das diferenças) quando esse aumento não foi considerado corresponder ao comportamento esperado do sistema nas condições usadas nas experiências.

Nas secções seguintes, respeitantes aos resultados experimentais, serão discutidos os modelos aplicáveis a cada caso.

5.3 A apresentação dos valores calculados para as constantes de equilíbrio

O RESULTADO FINAL de um processo iterativo de cálculo por regressão não linear foi aceite sempre que um mínimo foi atingido e que o vector final dos parâmetros (valores das constantes de equilíbrio e dos desvios limite) se mostrou independente do vector de parâmetros usado para iniciar os cálculos (na secção 4.5.5 estão indicados os critérios usados pelo programa de regressão não linear para indicar a localização de um mínimo na função soma e interromper as iterações). Os valores das constantes de equilíbrio obtidas neste trabalho são apresentadas de duas formas distintas, dependendo da dispersão dos valores obtidos para os núcleos observados para cada ligando. No caso em que os valores calculados para o subconjunto de núcleos mostram uma pequena dispersão, será apresentada a média aritmética desses valores e o intervalo que traduz os limites dentro dos quais eles se encontram [73].

Por outro lado, para além dos erros aleatórios acumulados ao longo da prossecução de cada experiência, os factores que condicionam os desvios químicos de cada núcleo nas moléculas estudadas intervêm nos valores obtidos para as constantes de equilíbrio de uma forma que pode ser sistematicamente diferente de núcleo para núcleo. Quando o modelo usado na simulação dos desvios dos pontos experimentais fornece valores para cada um dos diferentes núcleos observados com uma dispersão maior do que 0,5 unidades logarítmicas, considera-se que estes refletem influências que não estão incluídas no modelo e por essa razão procurar-se-à apresentar e discutir esses valores individualmente para cada núcleo.

5.4 O cálculo de constantes de equilíbrio para o modelo $M + L \rightleftharpoons ML$

O MODELO ASSOCIADO à equação química $M + L \rightleftharpoons ML$, com $K_{11} = [ML]/([M][L])$ (M é o catião metálico, L é o ligando não complexado e ML o complexo), é o mais

simples que foi utilizado neste trabalho e permite a dedução analítica de uma função resolvente. Foram usados dois métodos iterativos para o cálculo de K_{11} , cujos princípios foram apresentados no Capítulo 3: um método de regressão linear (método de Nakano) e um método de regressão não linear. Estes métodos, por serem aplicados a um modelo simples que permite a dedução de uma função analítica dos desvios químicos, foram implementados em programas comerciais para microcomputador.

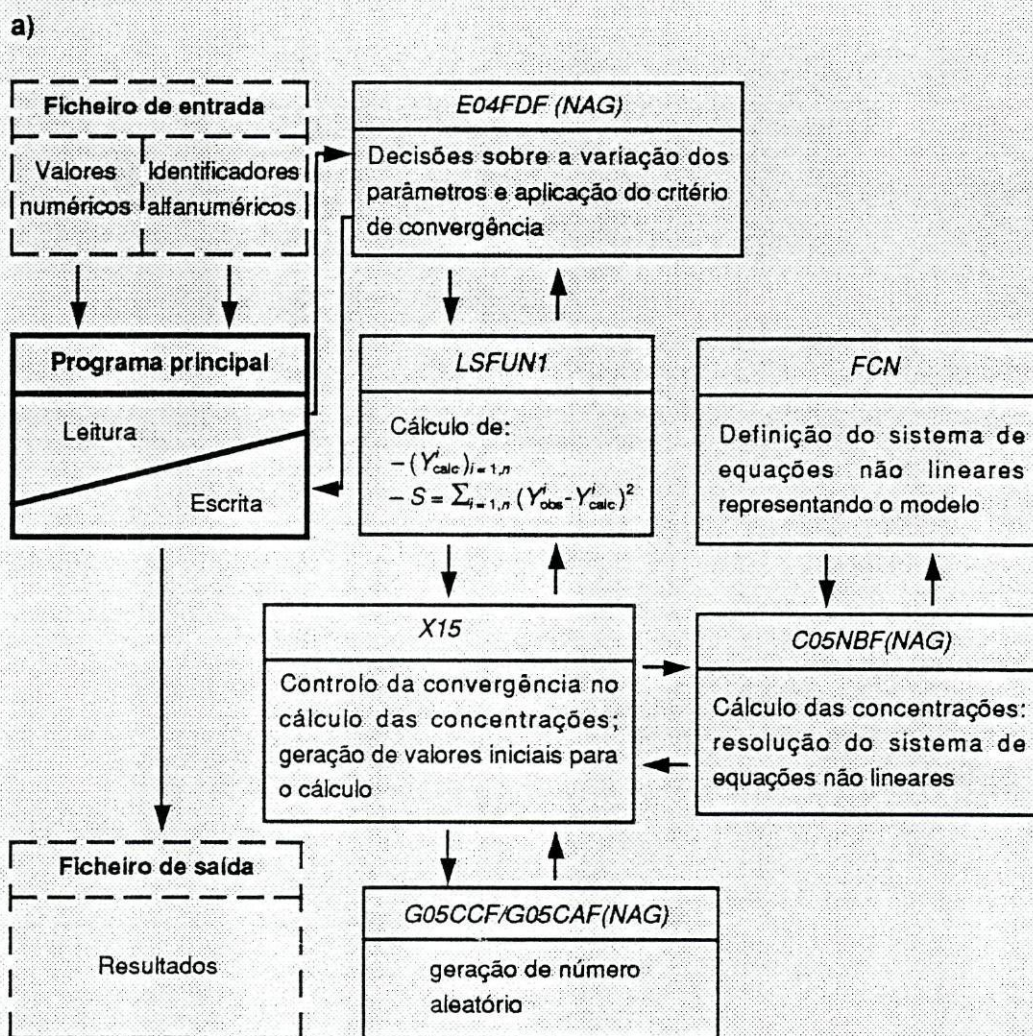
5.5 Implementação do método geral de regressão não linear para o cálculo de constantes de equilíbrio

A ESTRATÉGIA PARA CONSEGUIR calcular, por regressão não linear, as constantes de equilíbrio para um sistema com um número arbitrário de equações químicas foi delineado na secção 3.2.1 e seguidamente expõe-se a sua implementação computacional.

Na Figura 4.2(a) é apresentado o esquema geral do programa utilizado para a execução dos cálculos onde cada unidade do esquema representa uma subrotina com uma função específica, com destaque para os processos de iteração que foram executados com subrotinas da biblioteca NAG (Numerical Algorithms Group) [63]. Este programa foi escrito em Fortran 77 e executado no computador Cyber 830 do Centro de Informática da Universidade do Porto.

No ficheiro de entrada, exemplificado na Figura 4.3(a), é fornecido ao programa o conjunto dos pontos experimentais $(X_i, \delta_{\text{obs}}^i)_{i=1,n}$, onde n é igual ao número de pontos experimentais, X_i é o pH ou uma concentração inicial de catião metálico e δ_{obs}^i o valor experimental do desvio químico, em Hz, para o ponto i . São ainda fornecidos (a) um conjunto de c parâmetros constantes, $C_k, k=1,c$, que são os valores das concentrações totais e das constantes de equilíbrio conhecidas e (b) um vector contendo valores iniciais para p parâmetros ajustáveis, $P_{j,j=1,p}$. O ficheiro de entrada contém ainda todos os identificadores alfanuméricos dos valores nele contidos bem como uma constante D , que é o último valor na lista do ficheiro de entrada e cuja finalidade será explicada mais adiante.

Todos estes valores são introduzidos na subrotina E04FDF que utiliza, directa ou indirectamente, todas as outras subrotinas representadas na Figura 4.2 para calcular o conjunto de pontos $(X_i, \delta_{\text{calc}}^i)$ e depois o valor da função $S = \sum_i (\delta_{\text{obs}}^i - \delta_{\text{calc}}^i)^2_{i=1,n}$, a minimizar. A subrotina E04FDF, utiliza o método de Gauss [74] para minimizar a



b)

```

SUBROUTINE FCN (NEQU, CONC, ZERO, IFLAG)
C-----
COMMON HMS (30), HOM (30), DOBS (30), DCAL (30), CONS (30), DIV, CONT,
* CW, NCON
COMMON PR (10), CONS (30), IE
DIMENSION ZERO (20), CONC (20)
C-----
ZERO (1) = CONS (6) * CONC (1)**2 - CONC (2)**2 * HMS (IE)
ZERO (2) = CONS (7) * CONC (2)**2 - CONC (3)**2 * HMS (IE)
ZERO (3) = 10.**PR (1) * CONC (7)**2 * CONC (3)**2 - CONC (5)**2
ZERO (4) = 10.**PR (2) * CONC (5)**2 * CONC (3)**2 -
* CONC (6)**2 * HOM (IE)
ZERO (5) = CONS (8) * CONC (4)**2 * HOM (IE) - CONC (7)**2
ZERO (6) = CONS (9) * CONC (4)**2 * HOM (IE)**2 - CONC (8)**2
ZERO (7) = CONC (1)**2 + CONC (2)**2 + CONC (3)**2 + CONC (5)**2
* + 2.*CONC (6)**2 - CONS (5)
ZERO (8) = CONC (4)**2 + CONC (5)**2 + CONC (6)**2 + CONC (7)**2
* + CONC (8)**2 - CONS (4)
C-----
RETURN
END

```

Figura 4.2 — a) Esquema das subrotinas do programa de ajuste não linear a um modelo arbitrário; b) Exemplo da subrotina FCN para o caso definido nos ficheiros de entrada e saída da Figura 4.3

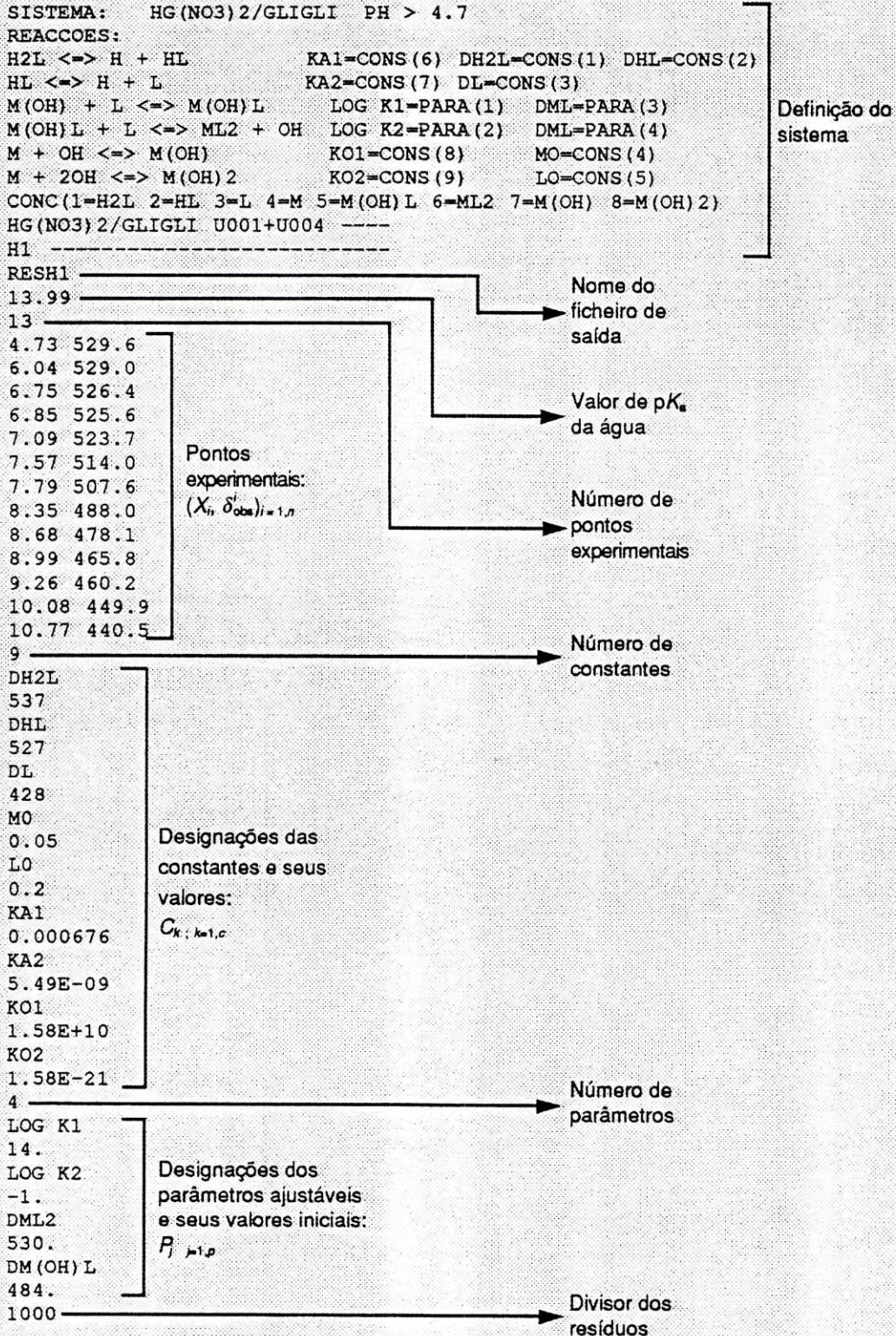


Figura 4.3(a) — Exemplo de um ficheiro de entrada para o programa de cálculo de constantes por regressão não linear. A tradução computacional do sistema de equações para este ficheiro é a transcrita na Figura 4.2(b)

```

----- HG(NO3)2/GLIGLI U001+U004 -----
----- H1 -----

SISTEMA:  HG(NO3)2/GLIGLI  PH > 4.7

REACCIONES:

H2L <=> H + HL          KA1=CONS(6)      DH2L=CONS(1)  DHL=CONS(2)
HL <=> H + L            KA2=CONS(7)      DL=CONS(3)
M(OH) + L <=> M(OH)L    LOG K1=PARA(1)  DM(OH)L=PARA(3)
M(OH)L + L <=> ML2 + OH LOG K2=PARA(2)  DML2=PARA(4)
M + OH <=> M(OH)        KO1=CONS(8)      MO=CONS(4)
M + 2OH <=> M(OH)2     KO2=CONS(9)      LO=CONS(5)

CONC(1=H2L 2=HL 3=L 4=M 5=M(OH)L 6=ML2 7=M(OH) 8=M(OH)2)

PK HIDROLISE DA AGUA= 13.99
----- CONSTANTES
DH2L      = 537.
DHL       = 527.
DL        = 428.
M0        = .05
L0        = .2
KA1       = .000676
KA2       = 5.49E-9
KO1       = 1.58E+10
KO2       = 1.58E+21
----- PARAMETROS
LOG K1    = 8.502360911418
LOG K2    = -5.125843440164
DM(OH)L   = 541.4165262882
DML2      = 534.503579933
DML       = 556.3523664319
DESV.PADR.= 1.211847173177      IFAIL= 0

      PH          DES.OBS.      DES.CALC.      RESIDUOS
      4.73        529.600      529.667        .067
      6.04        529.000      527.667       -1.333
      6.75        526.400      525.845       -0.555
      6.85        525.600      525.295       -0.305
      7.09        523.700      523.399       -0.301
      7.57        514.000      515.673        1.673
      7.79        507.600      509.636        2.036
      8.35        488.000      488.096        0.096
      8.68        478.100      475.383       -2.717
      8.99        465.800      466.300        0.500
      9.26        460.200      460.819        0.619
      10.08       449.900      450.402        0.502
      10.77       440.500      440.141       -0.359

DIVISOR DOS RESIDUOS (JA CONSIDERADO)= 1000.
434.911 CP SECONDS EXECUTION TIME

```

Figura 4.3(b) — Exemplo de um ficheiro de saída do programa de regressão não linear para o cálculo de constantes de equilíbrio; o seu conteúdo corresponde ao ficheiro de entrada listado na Figura 4.3(a).

soma do quadrado das diferenças (S) através da modificação dos parâmetros variáveis do modelo (constantes de equilíbrio e desvios químicos limite a calcular) e não requer a expressão analítica da primeira derivada do conjunto de funções em causa, fazendo a sua aproximação numérica; isto evita ter de definir para cada caso a expressão analítica das referidas funções [63]. O valor da primeira derivada da função S , em ordem a cada parâmetro P_j , é utilizado para decidir sobre a alteração a introduzir em cada um desses parâmetros. O valor da função S é novamente calculado e o ciclo repete-se até que os critérios definidos internamente na subrotina para terminar a iteração sejam atingidos.

Como a subrotina E04FDF funciona melhor quando o valor de S se encontra entre 0 e 1, é utilizado um divisor D dos resíduos, introduzido através do ficheiro de entrada, com o fim de tentar colocar S na zona óptima. O valor de D é determinado a partir de um cálculo preliminar de S para o vector inicial de parâmetros ajustáveis (usando D igual a 1 e zero iterações neste cálculo). Para o cálculo dos parâmetros que minimizam S usa-se assim D igual ao valor de S obtido no cálculo preliminar; assumindo que S irá diminuir no decurso do cálculo dos parâmetros ajustáveis, o seu valor será sempre menor que 1. A utilização da forma logarítmica das constantes de equilíbrio dos parâmetros ajustáveis provou ser bastante eficiente por diminuir o intervalo de valores usado pela subrotina e por evitar o aparecimento de valores negativos para as constantes durante a iteração. A subrotina E04FDF não estima os valores das variâncias que afectam os valores dos parâmetros calculados.

O ficheiro de saída do programa, de que se mostra um exemplo na Figura 4.3(b), contém portanto os valores finais dos parâmetros e uma indicação sobre a convergência do processo iterativo, codificada no valor da variável IFAIL. Os resultados só foram aceites quando essa variável indicou que um mínimo da função S tinha sido atingido, sendo os parâmetros ajustados até ao limite de resolução do computador

Para obter o valor de δ_{calc}^i é necessário conhecer as concentrações em equilíbrio para cada vector P_j , que são calculadas por um subprocesso iterativo por forma a não ser necessário deduzir expressões analíticas para cada caso (o que por vezes é impossível) e a cumprir o objectivo de generalidade de aplicação do programa a qualquer

sistema químico em equilíbrio. O sistema de equações que constituem o modelo é representado na subrotina FCN, ver exemplo em 4.2(b), sob a forma de um sistema de equações das constantes de equilíbrio e dos balanços materiais que lhe correspondem. Para um dado conjunto de constantes de equilíbrio e de concentrações totais, a subrotina C05NBF resolve esse sistema de equações não lineares para obter as concentrações em equilíbrio, que por sua vez são utilizadas para calcular S .

O subprocesso iterativo de cálculo das concentrações em equilíbrio, levado a cabo pela subrotina C05NBF, condiciona o prosseguimento da iteração principal (cálculo dos parâmetros ajustáveis) e por isso deve convergir sempre e ser o mais possível eficiente. É de notar que o valor das constantes de equilíbrio do vector de parâmetros ajustáveis usadas para o cálculo das concentrações pode abranger um intervalo muito alargado dependendo do decurso da iteração principal, o que é desfavorável às condições de convergência e de eficácia referidas acima como essenciais para o bom funcionamento do subprocesso de cálculo das concentrações. Devido à dificuldade e à morosidade de estimar um bom vector de concentrações iniciais para o subprocesso iterativo recorreu-se a uma função de números aleatórios, G05CCF/G05CAF (NAG), como fonte para esses valores que foram limitados a um intervalo entre zero e as concentrações máximas esperadas. Desta forma diversos valores iniciais são tentados até ser atingida a convergência. Tal como na subrotina E04FDF, em C05NBF existe um parâmetro cujo valor no ficheiro de saída qualifica a convergência atingida.

Só uma das soluções do sistema de equações não lineares contém as concentrações requeridas, sendo frequente o aparecimento de vectores resultado com valores negativos para as concentrações. Este problema foi obviado utilizando não concentrações mas as suas raízes quadradas: esta alteração de variáveis, para além de aumentar as soluções possíveis para o sistema e concomitantemente a eficiência do processo iterativo, assegura que os vectores resultado são positivos, o que se revelou, também, muito eficiente na prática. Por outro lado, o uso de valores absolutos ou da raiz quarta não mostrou ser mais eficiente.

Este programa é aplicável a qualquer sistema químico, bastando para tal escrever as equações pertinentes na subrotina FCN e, obviamente, preparar um ficheiro de

entrada conveniente. Por uma questão de rapidez de cálculo, optou-se por modificar directamente a subrotina FCN em vez de definir o sistema de equações simbolicamente num ficheiro de entrada, já que o tempo de recompilação é insignificante quando comparado com o tempo de computação para um qualquer sistema típico e o tempo ou a dificuldade de realizar um ficheiro de entrada é semelhante ao necessário para modificar a subrotina FCN.

O tempo de computação gasto pelo programa está directamente relacionado com (1) o número de equações do sistema de equilíbrios; (2) o número de parâmetros a otimizar; (3) o número de pontos experimentais; (4) a qualidade dos valores iniciais dos parâmetros e (5) a rapidez de convergência dos dois processos iterativos combinados no programa. A optimização do funcionamento está condicionada à escolha dos pontos iniciais e à eficiência do processo iterativo (pontos 4 e 5), já que dos três primeiros pontos depende a qualidade dos resultados que não pode ser prejudicada em favor da rapidez de computação. Dependendo da complexidade do sistema, o resultado pode ser atingido num intervalo de tempo compreendido entre poucos segundos até várias horas no computador acima referido. A escolha de um bom conjunto de pontos iniciais depende ainda em boa parte da experiência e intuição do experimentador e baseou-se em valores da literatura obtidos para casos semelhantes aos que foram estudados neste trabalho.

Associações intermoleculares e constantes de acidez da glicilglicina e da citidina

NESTE CAPÍTULO APRESENTAM-SE alguns estudos sobre o comportamento em solução aquosa de citidina e glicilglicina necessários para o cálculo das constantes de estabilidade destas moléculas com catiões metálicos. Nomeadamente, discute-se a atribuição dos sinais nos espectros de ^1H e ^{13}C da citidina e da glicilglicina, bem como os efeitos da auto-associação da citidina e de interações intermoleculares entre a citidina e a glicilglicina sobre os desvios químicos observados. Por fim, são apresentados os resultados do estudo das protólises da glicilglicina e da citidina e é discutida a definição dos estados de referência para os desvios químicos e a sua influência sobre as constantes de estabilidade.

1. Citidina, glicilglicina e a sua interacção

1.1 Interpretação do espectro de RMN da citidina em H_2O e D_2O

A ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS dos espectros de ^1H e de ^{13}C da citidina é conhecida em DMSO [75-78], D_2O e H_2O [79,80], tendo-se verificado que a posição relativa dos sinais é a mesma em qualquer destes solventes.

Na Figura 5.1(a) está representada a fórmula de estrutura da citidina e na Figura 5.1(b) e (c) os seus espectros típicos de ^1H e ^{13}C em H_2O a pH (pD) ácido, onde também são descritas as condições da sua obtenção. Não existem diferenças entre os espectros obtidos em H_2O e D_2O , excepto no que diz respeito ao não aparecimento dos sinais do grupo $-\text{NH}_2$ no espectro em D_2O , devido à permuta de átomos de hidrogénio do grupo amina por átomos de deutério. Como irá ser visto adiante, os desvios químicos dos núcleos da base pirimidínica da citidina dependem

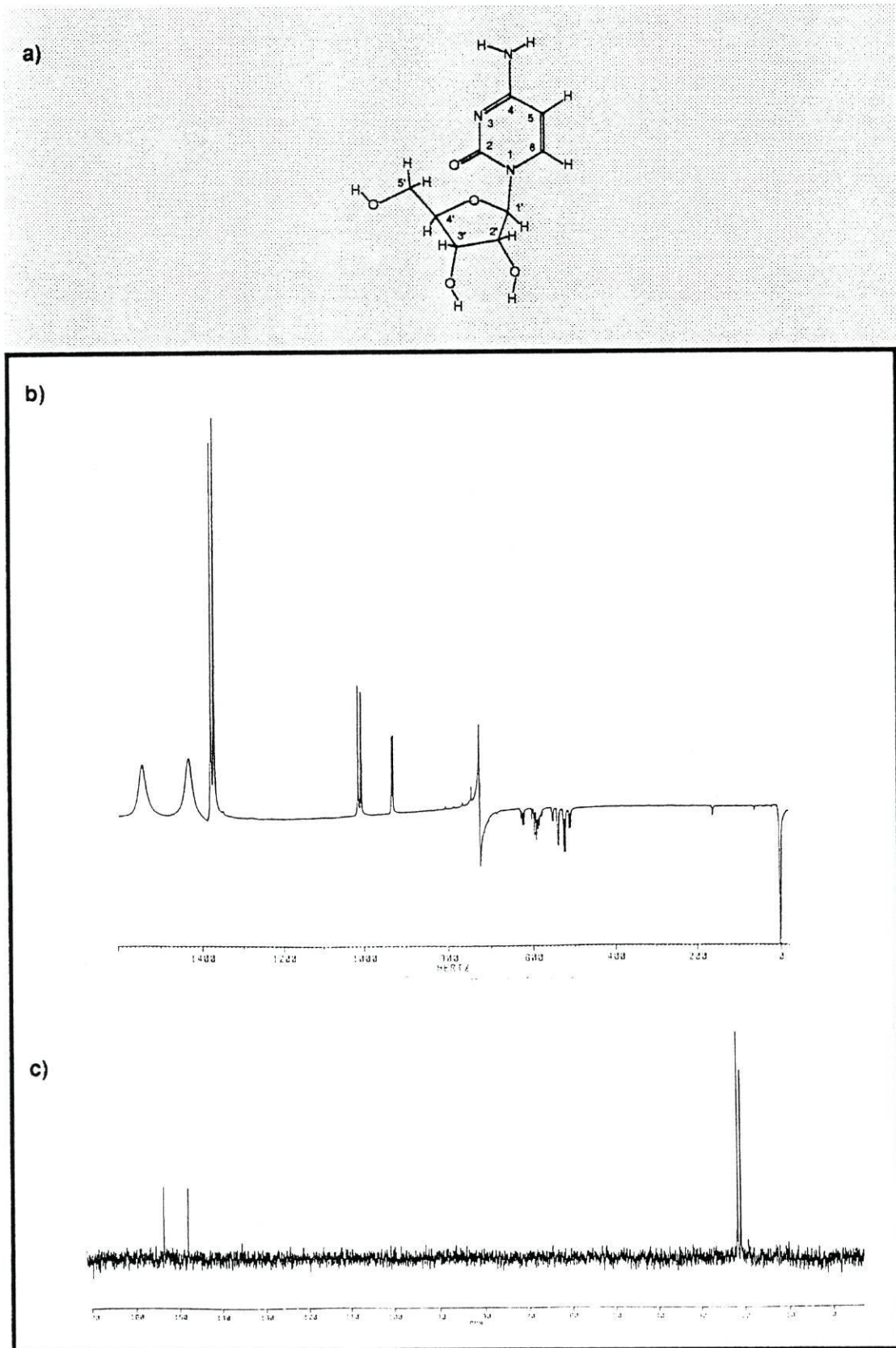


Figura 5.1 — a) Fórmula estrutural da molécula de citidina; b) espectro de ^1H de uma solução aquosa de citidina 0,1 M e 0,2 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a pH 2 obtido por excitação selectiva (condições da legenda da Figura 4.1); referência interna: *tert*-butanol; c) espectro de ^{13}C da mesma solução

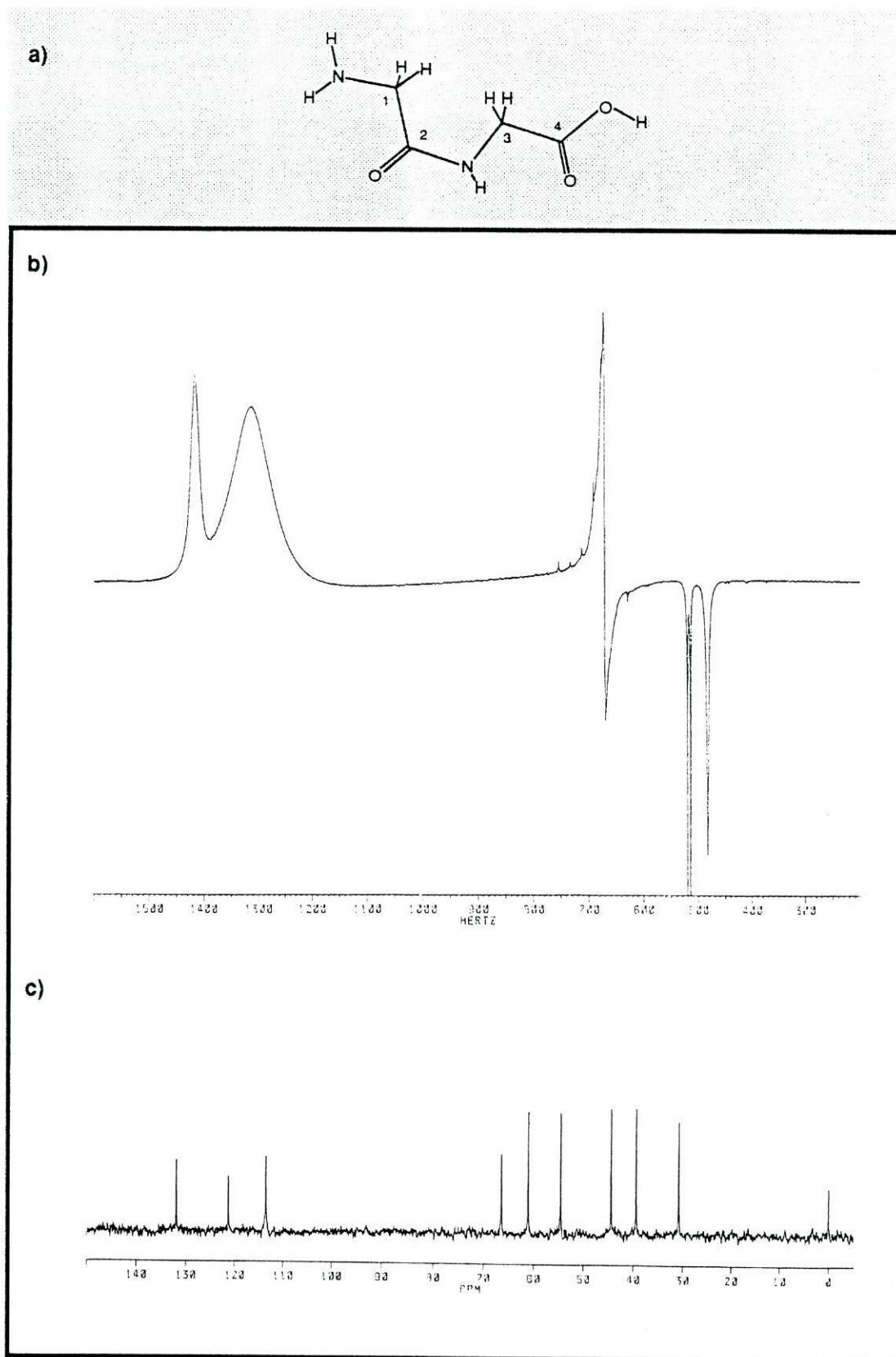


Figura 5.2 — a) Fórmula estrutural da molécula de glicilglicina; b) Espectro de ^1H de uma solução aquosa de glicilglicina 0,2 M e 0,6 M de KNO_3 a pH 1,5 obtido por excitação selectiva (condições da legenda da Figura 4.1); referência interna: *tert*-butanol; c) Espectro de ^{13}C da mesma solução.

do pH (pD) da solução e da concentração de cátions metálicos, mas as suas posições relativas no espectro não são alteradas.

Neste trabalho, a atribuição dos sinais do espectro de ^1H da citidina foi confirmada em H_2O e em D_2O por desacoplamento homonuclear selectivo. O espectro de ^{13}C foi atribuído através de um espectro bidimensional de correlação de desvio químico heteronuclear. No espectro de ^1H foi observado que os dois dobletos que ocorrem a maior frequência formam um sistema AX e foram atribuídos por correlação heteronuclear aos núcleos H-6 e H-5, em que H-5 é o que ocorre a menor frequência. O sinal próximo de H-5 e a menor frequência que este é o terceiro doubleto esperado para a citidina e que é portanto atribuído a H-1'. Os sinais a menor frequência que o sinal da água são provenientes do fragmento ribosilo da citidina onde são identificáveis os quatro sinais dos dois núcleos de hidrogénio ligados a C-5' no extremo a menor frequência do espectro que, por desacoplamento selectivo, se verifica estarem acoplados com os sinais imediatamente a menor frequência que o sinal do HDO, que por isso podem ser atribuídos a H-4'. As bandas situadas entre as de H-4' e H-5' são pois provenientes dos núcleos H-2' e H-3'. Devido à sobreposição destes sinais, a correspondência para o espectro de ^{13}C não é inequívoca, embora a atribuição desses núcleos não seja importante para o presente trabalho.

1.2 Interpretação do espectro de RMN da glicilglicina em H_2O e em D_2O

NA FIGURA 5.2(A) ESTÁ REPRESENTADA a fórmula de estrutura da glicilglicina e na Figura 5.2(b) e (c) os espectros típicos de ^1H e ^{13}C da glicilglicina em H_2O , a pH ácido. O espectro de ^1H em H_2O a pH 1,3 revela dois sinais largos no extremo a maior frequência correspondentes aos núcleos do grupo $-\text{NH}_3^+$, o mais largo, e ao núcleo de hidrogénio da ligação peptídica, $-\text{NH}-$. Estes sinais não são observáveis em D_2O devido à deuteração daqueles grupos por permuta com o solvente. Os dois sinais a menor frequência correspondem aos dois grupos $-\text{CH}_2-$ da glicilglicina, sendo o doubleto atribuído a H-3 (acoplamento com $-\text{NH}-$) e o singuleto a H-1. Estas atribuições são facilmente confirmadas pela variação dos desvios químicos da glicilglicina com o pH (Figura 5.3(a)), porque os núcleos mais próximos das posições de coordenação do ião H^+ são os que devem apresentar maior variação dos desvios

químicos em função do pH, dado que a glicilglicina é uma molécula com topologia linear. Os núcleos H-1 mostram uma maior sensibilidade à protonação do grupo amina que à protonação do grupo carboxílico, a pH próximo de 3, enquanto que o sinal de H-3 é apenas um pouco mais sensível à protonação do grupo carboxílico que à protonação do grupo amina. A atribuição do espectro de ^{13}C foi efectuada da mesma forma, por análise dos desvios químicos do espectro de ^{13}C da glicilglicina no intervalo de pH de 1 a 12.

1.3 Efeitos nos espectros de RMN da auto-associação da citidina e da interacção intermolecular entre a citidina e a glicilglicina

A INTERACÇÃO ENTRE NUCLEOTÍDEOS pode ocorrer pelo menos por duas formas distintas: interacções hidrofóbicas de empilhamento e interacção por ponte de hidrogénio [81,82], estando ambos na base do conhecido emparelhamento em hélice α das cadeias de ADN. A auto-associação da citidina por empilhamento hidrofóbico provoca variações do desvio químico dos seus núcleos para menor frequência com o aumento da sua concentração em solução; este efeito foi detectado em $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$ [83,84] e em DMSO [85], embora se tenha verificado que ocorre em menor extensão neste solvente pois é favorecida a formação de ligações por ponte de hidrogénio entre moléculas de citidina.

Ts'o et al. [83] calcularam um valor de 0,878 para o coeficiente de actividade molal da citidina em soluções aquosas $0,10 \text{ mol Kg}^{-1}$ em citidina, o que foi interpretado como evidência da presença de auto-associação da citidina e determinaram uma constante para a sua auto-associação de $0,9 \text{ mol}^{-1} \text{ Kg}$. Scheller *et al.* [86] calcularam por RMN uma constante de auto-associação (empilhamento) da citidina de $1,1 \pm 0,3 \text{ M}^{-1}$, com base nos desvios químicos dos núcleos de H-5 e de H-6.

A auto-associação por empilhamento da citidina ocorre portanto em pequena extensão (numa solução $0,1 \text{ M}$, mais de 85% da citidina está na forma não associada) e não interfere significativamente com os locais de coordenação dos catiões. Por estas razões, a(s) equação(equações) da auto-associação da citidina não foi(foram) incluída(s) nos modelos de simulação dos desvios químicos pois verificou-se que os desvios químicos e os valores das constantes calculadas não são afectados pelos efeitos da auto-associação.

A influência da interacção glicilglicina / citidina sobre os desvios químicos da citidina foi estudada neste trabalho, uma vez que esses desvios vão ser utilizados em outras experiências para calcular as constantes de estabilidade dos complexos mistos, embora não fosse de esperar uma interacção significativa em água entre estes dois ligandos. Assim, compararam-se os desvios químicos da citidina numa solução contendo $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ de citidina com os de uma outra contendo também $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ de glicilglicina e em que foi utilizado, em ambos os casos, *tert*-butanol como referência interna e pH 6,8. A este pH a glicilglicina encontra-se na sua forma de ião dipolar (*zwitterion*) e a citidina não está protonada em N-3.

As diferenças observadas foram pequenas, menores que 0,5 Hz (0,0025 ppm), para os sinais de ^1H e menores que 1,2 Hz (0,025 p.p.m.) para os sinais de ^{13}C . Estes resultados permitem desprezar a interacção intermolecular glicilglicina / citidina em água para o cálculo das constantes de formação dos complexos mistos.

Na secção 5.2.1 será discutido o efeito da interacção glicilglicina / glicilglicina em solução aquosa (hipoteticamente de cariz iónico) sobre o valor das suas constantes de acidez.

2. Constantes de acidez da citidina e da glicilglicina

AS CONSTANTES DE ACIDEZ da citidina e da glicilglicina têm sido bastante estudadas, em vários solventes e por várias técnicas [73,79,87,88]. Uma vez que todos os cálculos de constantes de formação foram feitos em água e os catiões metálicos coordenantes competem com o ião H^+ para as posições de coordenação na citidina e na glicilglicina, os desvios químicos destes ligandos vão ser uma função da coordenação dos catiões metálicos e da coordenação de H^+ . A determinação prévia das constantes de acidez para a citidina e a glicilglicina permite introduzi-las como constantes conhecidas, e não como parâmetros ajustáveis, nos cálculos das constantes de complexação daquelas moléculas com catiões metálicos. Este facto impõe que sejam determinadas em condições que reproduzam as condições de força iónica e tipo de referência que existirão nas experiências onde estão presentes catiões metálicos coordenantes. Algumas tentativas foram feitas por outros autores para criar modelos que descrevam o efeito de electrólitos sobre as constantes de acidez [89]

mas, neste trabalho, pretende-se apenas determinar essas constantes nas condições mais próximas possíveis daquelas que serão encontradas nas experiências para o estudo da complexação dos cátions metálicos Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} , ou seja, procurar um estado de referência que inclua as protólises da citidina e/ou da glicilglicina em condições bem definidas de força iónica e referência interna.

A determinação de constantes de protólise por RMN é uma técnica bem desenvolvida e que tem sido largamente aplicada [90-92]. O primeiro passo para a determinação de constantes de acidez (constantes de dissociação de H^+) por RMN consiste em recolher pontos experimentais constituídos pelos desvios químicos correspondentes aos núcleos do ligando em causa em função do pH da solução (pH, δ); experiências do tipo pH variável. Estes desvios químicos são simulados teoricamente, para cada núcleo i , pela equação seguinte, deduzida a partir da equação 4.1

$$\delta^i = ([L]/L_t)\delta_L^i + \sum_n ([H_nL]/L_t)\delta_{H_nL}^i \quad (5.1)$$

onde L representa o ligando completamente desprotonado e H_nL as formas protonadas do ligando. A transformação das concentrações da equação 5.1 em quantidades dependentes apenas dos valores de pK_a e do pH, através do uso das expressões que definem as constantes de acidez e dos balanços materiais, permite concluir que, no caso ideal, em que não se considera a auto-associação do ligando ou outras interacções intermoleculares, os desvios químicos são independentes da concentração inicial de ligando. O ajuste desta equação aos pontos experimentais pelo método de regressão não linear pode ser feito muitas vezes optimizando apenas os valores de pK_{a_n} (K_{a_n} são as constantes de acidez para as dissociações $H_nL \rightleftharpoons H_{n-1}L + H^+$) desde que δ_L^i e $\delta_{H_nL}^i$ possam ser medidos directamente, situação que está representada na Figura 5.3.

Nesta Figura é mostrada a variação de desvio químico para os núcleos de 1H e ^{13}C da glicilglicina e da citidina. A interpretação da variação destes desvios é trivial uma vez que os desvios observados são directamente proporcionais às concentrações das espécies protonadas e não protonadas, constituindo assim curvas de titulação de ácido/base, em que os pontos de inflexão das curvas dão uma indicação gráfica dos valores de pK_a .

2.1 Glicilglicina

NA FIGURA 5.3(A) PODEM SER OBSERVADAS CURVAS TÍPICAS DA VARIAÇÃO DO DESVIO QUÍMICO DOS NÚCLEOS DA GLICILGLICINA EM FUNÇÃO DO pH; OS VALORES DE pK_{a1} E pK_{a2} EM DIVERSAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS SÃO APRESENTADOS NA TABELA 5.1.

A protonação da glicilglicina num dos seus grupos extremos provoca grandes desvios na direcção de maior frequência, menor protecção electrónica, nos núcleos de ^{13}C próximos do local de protonação, sobretudo nos núcleos que não estão ligados a átomos de hidrogénio, como é o caso de C-2 e C-4. Esta observação aparece como consequência da já esperada transferência de densidade electrónica para o ião H^+ . Pelo contrário, os núcleos de hidrogénio H-1 e H-3 apresentam desvios para menor frequência. Os núcleos mais distantes de uma determinada zona de protonação podem apresentar desvios positivos ou negativos que, no entanto, são sempre de menor amplitude.

a)

[KNO ₃]	l	[GG]				Ref.
		0,20		0,005		
		pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}	
0	<0,1			$3,14 \pm 0,08^1$	$8,15 \pm 0,01$	t-B
0,1	0,1-0,2			$3,29 \pm 0,03$	$8,18 \pm 0,02$	t-B
0	0,2-0,4	$3,20 \pm 0,03$	$8,20 \pm 0,03$			t-B
0,6	0,8-0,9	$3,28 \pm 0,04^2$	$8,23 \pm 0,04^2$			t-B/p-D
0,6	0,8-0,9	$3,23 \pm 0,03$	$8,32 \pm 0,02$			TMA

¹ Valores individuais: C-1: 3,12; C-2: 3,10; C-3: 3,17; C-4: 3,16; H-1: 3,08; H-3: 3,19.

² Os valores individuais de cada núcleo para este caso são apresentados na Tabela 4.3.

b)

pK_{a1}	pK_{a2}	l	T (°C)	ref.	método
$3,13 \pm 0,05$	$7,98 \pm 0,01$	0,1	20	[88]	potenciometria
$3,05 \pm 0,01$	$8,08 \pm 0,03$	0,1	25	[93]	potenciometria
$3,15 \pm 0,01$	$8,12 \pm 0,01$	0,6	25	[93]	potenciometria
3,13	8,21	0,6	25	[73]	RMN ¹

¹ 0,2M em glicilglicina; referência interna: TMA; os valores de pK_{a1} e de pK_{a2} foram obtidos a partir dos desvios químicos do núcleo H-1 e H-3 respectivamente.

Tabela 5.1 — a) Valores médios de pK_{a1} e de pK_{a2} da glicilglicina calculados neste trabalho em diversas condições experimentais (concentrações em mol dm⁻³) a partir dos desvios químicos dos núcleos C-1, C-2, C-3, C-4, H-1 e H-3 (o intervalo de erro compreende todos os valores obtidos); b) Valores publicados na literatura para essas constantes.

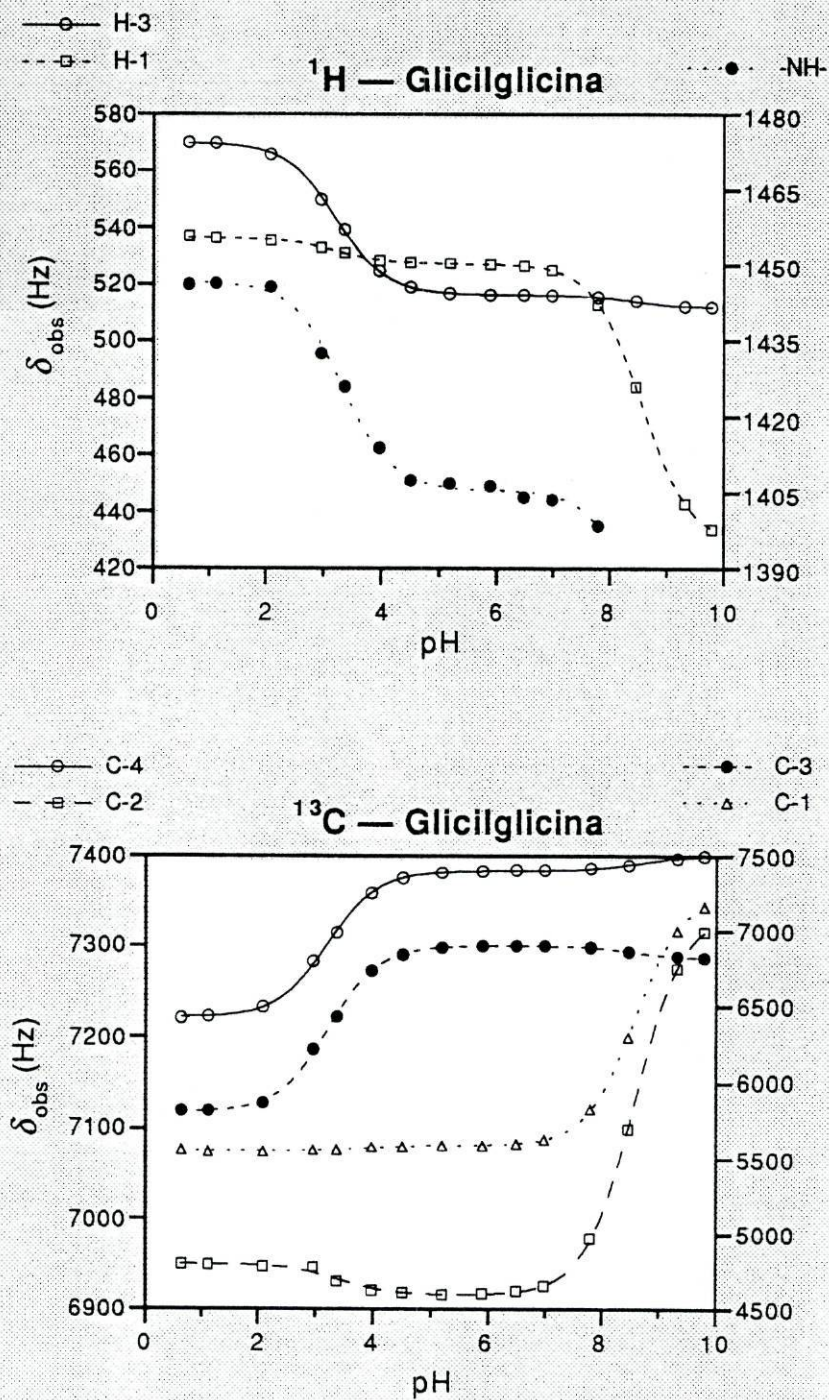


Figura 5.3(a)—Variação típica dos desvios químicos da glicilglicina com o pH nas condições do estado de referência (ver texto e tabela 5.2).

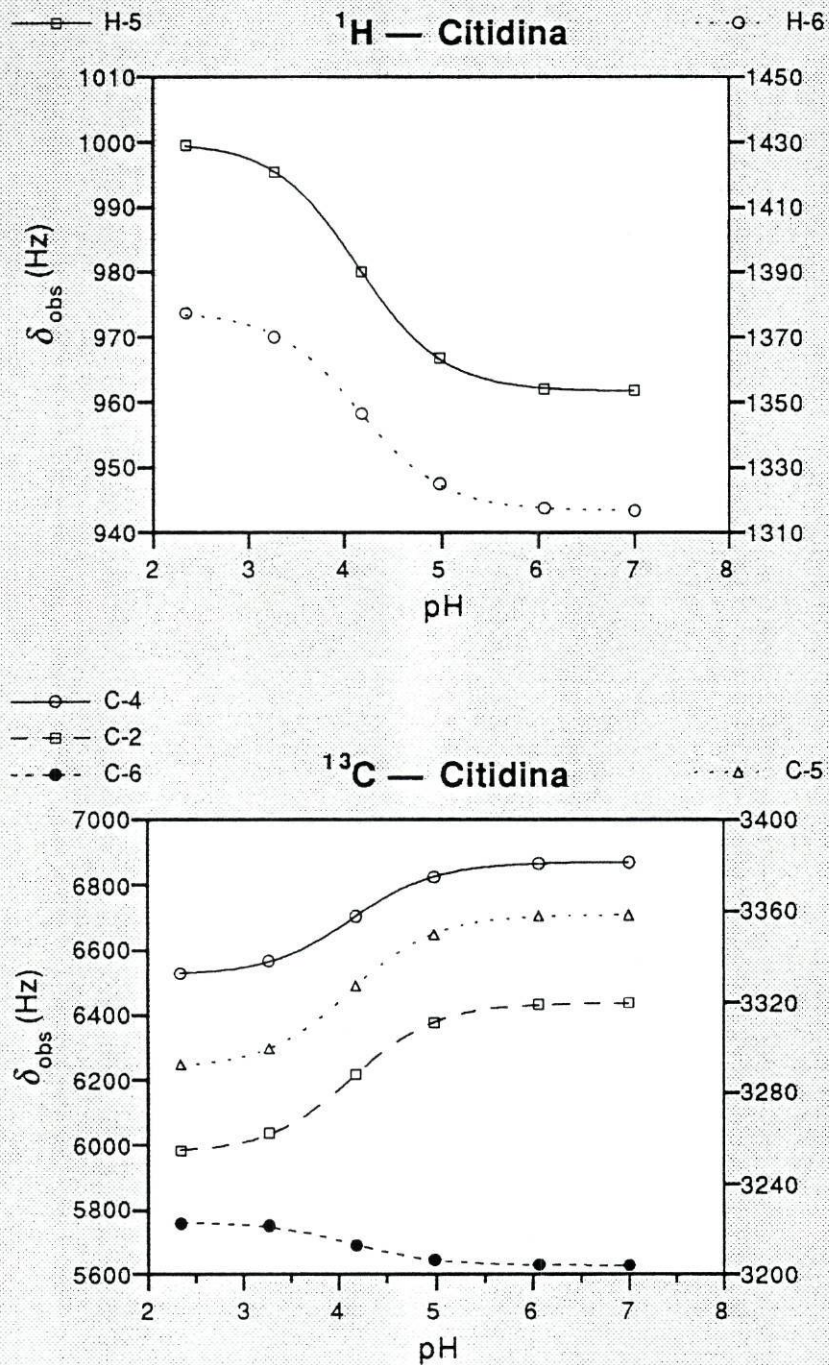


Figura 5.3(b) —Variação típica dos desvios químicos da citidina com o pH nas condições do estado de referência (ver texto e Tabela 5.4).

Os valores de pK_a obtidos por RMN para a glicilglicina são significativamente mais altos que os obtidos por potenciometria [93], havendo normalmente uma diferença maior que 0,1 entre os valores publicados de pK_a obtidos por essas duas técnicas. Esta diferença entre constantes de equilíbrio determinadas por RMN e por potenciometria parece ser uma observação geral quando altas concentrações de espécies carregadas, nomeadamente catiões metálicos, existem em solução. Uma explicação possível pode residir na diferença entre o que é observado num e noutra caso: os métodos potenciométricos reflectem alterações na actividade de H^+ (ou indirectamente na concentração desse ião, se a força iónica estiver controlada) ou de outros iões em solução, enquanto que em métodos de RMN baseados na variação do pH são detectadas alterações nos desvios químicos induzidos pela remoção do protão. Na presença de altas concentrações de iões metálicos ou outras espécies carregadas em solução, a eventual ocorrência de efeitos de carga nos desvios químicos da forma carregada do ligando protonado / desprotonado podem mascarar o efeito da remoção do protão.

Os valores das constantes de acidez da glicilglicina determinadas por RMN mostram também uma marcada dependência com a força iónica, como acontece em geral com os aminoácidos e com outras espécies iónicas em solução [89,94], embora o valor de pK_{a_2} seja menos sensível que o do pK_{a_1} a essas variações (Tabela 5.1). O sal usado para controlar a força iónica nestas experiências foi o KNO_3 já que o ião Ca^{2+} tem uma grande tendência a ligar-se à glicilglicina através do grupo carboxílico [95] e por isso não pode ser incluído no estado de referência.

A pH baixo, a importância da concentração de glicilglicina e de outras espécies carregadas em solução sobre o equilíbrio entre os estados de protonação ácido carboxílico / carboxilato é evidente se se reparar que: a) o pK_{a_1} determinado por RMN para soluções contendo só glicilglicina ($0,20 \text{ mol dm}^{-3}$), 3,20, é demasiado alto quando comparado com o valor potenciométrico: 3,13 [88]; b) o pK_{a_1} (RMN) para uma solução de $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ em glicilglicina é de apenas 3,14; e que c) este valor aumenta para 3,29 quando KNO_3 está presente em solução com a concentração de $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$. Da mesma forma, uma solução $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ de glicilglicina e

0,60 mol dm⁻³ de KNO₃ apresenta um valor para o pK_{a1} de 3,28, em contraste com o valor de 3,20 obtido para uma solução contendo apenas glicilglicina 0,20 mol dm⁻³, indicando claramente o efeito da concentração do sal.

Estas observações mostram que em soluções puras de glicilglicina e a concentrações elevadas do dipeptídeo as interações intermoleculares entre os grupos -COO⁻ e -NH₃⁺ são importantes e que os desvios químicos induzidos são menores porque passam a ser a média pesada dos desvios limites das formas protonada/desprotonada/associada, o que conduz à determinação de um valor menor para a constante de acidez do grupo carboxílico. Para baixas concentrações de glicilglicina (0,005 mol dm⁻³) a extensão da associação é menor e o valor da constante de acidez aproxima-se do valor medido potenciometricamente. Como já foi referido, a adição de um sal não coordenante, KNO₃ 0,10 mol dm⁻³, a estas soluções diluídas de glicilglicina provoca um aumento do pK_{a1} de 3,14 para 3,29; esta diferença é demasiado grande para ser atribuída somente à pequena variação de força iónica entre as duas soluções, o que permite postular a existência de uma interacção iónica entre o sal e a glicilglicina, que se reflecte sobre os desvios químicos observados.

A valores de pH elevados ocorre uma situação semelhante envolvendo uma neutralização parcial da carga do grupo amina protonado por um grupo carboxílico ou por algum anião presente na solução. Isso explica os elevados valores de pK_{a2} observados para soluções de glicilglicina 0,20 mol dm⁻³ na ausência (8,20) e na presença (8,23) de elevadas concentrações de iões, nomeadamente KNO₃ 0,60 mol dm⁻³ (o valor potenciométrico para o pK_{a2} da glicilglicina é de 8,08 ± 0,03 para força iónica 0,1 M [88]). A importância da concentração de glicilglicina é evidenciada pelo facto de que, em soluções 0,005 mol dm⁻³ de glicilglicina o pK_{a2} determinado é de apenas 8,15; na presença de KCl ou KNO₃ (0,1 mol dm⁻³) o valor de pK_{a2} apenas sofre uma ligeira alteração (8,18).

Definição do estado de referência para as experiências de pH variável com glicilglicina

Sendo a determinação de constantes de estabilidade afectada em grande medida pelos valores de pK_a e pelos desvios limite usados nos cálculos, a escolha das

condições em que estes valores são obtidos, ou seja, a escolha do estado de referência, é crítica quando elevadas concentrações de metal estão presentes.

Os valores de constantes de acidez medidos em soluções cuja referência interna é TMA são diferentes dos obtidos para *p*-dioxano ou *tert*-butanol (Tabela 5.1), de acordo com o que já tinha sido referido na secção 4.4 sobre a sensibilidade do desvio químico do TMA à presença de glicilglicina a pH elevado, pelo que esta referência interna foi posta de parte.

A já referida tendência do ião Ca^{2+} para coordenar à glicilglicina impediu que fosse considerado na definição do estado de referência, embora tivesse a vantagem sobre o ião K^+ de ter carga eléctrica igual e tamanho mais próximo dos iões Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} . Também no que respeita à concentração dos aniões no estado de referência teria sido preferível usar o sal $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ em vez de KNO_3 por razões óbvias. O anião nitrato foi o único a ser usado nos estudos relacionados com a glicilglicina descritos no Capítulo 6 e portanto foi incluído no estado de referência.

Numa tentativa para reduzir o efeito dos iões metálicos em interacções que não a coordenação, foram usadas as constantes de acidez aparentes da glicilglicina em soluções $0,60 \text{ mol dm}^{-3}$ em KNO_3 . Isto equivale a considerar esse tipo de solução como o estado de referência para RMN relativamente às experiências realizadas para o cálculo de constantes de associação da glicilglicina com catiões metálicos, descritas no capítulo seguinte. Na Tabela 5.2 são apresentados os valores de $\text{p}K_{a_1}$, $\text{p}K_{a_2}$, $\delta_{\text{H}_2\text{L}}$, δ_{HL} e δ_{L} calculados para cada núcleo da glicilglicina e que foram usados no cálculo das constantes de equilíbrio de coordenação dos catiões metálicos Zn^{2+} e Cd^{2+} .

Núcleo	$\text{p}K_{a_1}$	$\text{p}K_{a_2}$	$\delta_{\text{H}_2\text{L}}$	δ_{HL}	δ_{L}
H-1	3,17	8,26	537	527	428
H-3	3,22	8,00	570	516	512
C-1	3,49	8,28	5554	5590	7258
C-2	3,39	8,27	6951	6916	7339
C-3	3,22	8,24	5812	6900	6817
C-4	3,21	8,34	7221	7383	7400

Tabela 5.2 — Parâmetros de RMN para o estado de referência relativamente às experiências de pH variável com glicilglicina: $[\text{glicilglicina}] = 0,20 \text{ mol dm}^{-3}$; $[\text{KNO}_3] = 0,6 \text{ M}$; referência interna = *tert*-butanol; 25° C .

2.2 Citidina

NA FIGURA 5.3(B) ESTÃO REPRESENTADAS AS VARIAÇÕES TÍPICAS DOS DESVIOS QUÍMICOS PARA OS NÚCLEOS DE ^1H E ^{13}C DA CITIDINA COM O pH (TODOS OS DESVIOS QUÍMICOS FORAM MEDIDOS RELATIVAMENTE A *tert*-BUTANOL). A PROTONAÇÃO DO ÁTOMO DE AZOTO N-3 TEM UM EFEITO SOBRE OS NÚCLEOS DA BASE DA CITIDINA SEMELHANTE AO OBSERVADO PARA A GLICILGLICINA, APESAR DE SEREM MOLÉCULAS MUITO DIFERENTES. OS NÚCLEOS QUE APRESENTAM MAIORES ALTERAÇÕES NOS DESVIOS QUÍMICOS SÃO C-2 E C-4, OS MAIS PRÓXIMOS DE N-3, DESVIOS ESSES QUE OCORREM PARA MAIOR FREQUÊNCIA. POR OUTRO LADO, O NÚCLEO DE C-6, O ÁTOMO DE ^{13}C DA BASE PIRIMIDÍNICA QUE FICA MAIS DISTANTE DE N-3, TEM UM DESVIO MENOR E PARA MENOR FREQUÊNCIA. OS NÚCLEOS DE H-5 E H-6 APRESENTAM TAMBÉM DESVIOS PARA MENOR FREQUÊNCIA.

Na Tabela 5.3 estão indicados os valores para o $\text{p}K_a$ da citidina (protonação em N-3) em várias condições experimentais. Tal como no caso da glicilglicina, o valor do $\text{p}K_a$ determinado para a citidina por RMN é maior que o potenciométrico [93]. Os valores mencionados na literatura para o $\text{p}K_a$ desta molécula situam-se entre 4,09 e

a)				
Sal	concentração	$\text{p}K_a$		
—	—	4,10 ± 0,01		
KNO_3	0,60	4,36 ± 0,02		
KCl	0,60	4,36 ± 0,02		
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,20	4,15 ± 0,02		

b)				
$\text{p}K_a$	<i>l</i>	<i>T</i> (°C)	ref.	método
4,07 ± 0,01	0,1	25	[93]	potenciometria
4,12 ± 0,04	0,6	25	[93]	potenciometria
4,09 ± 0,02	0,1	20	[87]	potenciometria
4,23 ± 0,005	1	20	[88]	potenciometria
4,20 ± 0,04	0,5	25	[113]	UV
4,15	<0,2	32	[79]	RMN ¹

¹ 0,2M em citidina; referência interna: *tert*-butanol; o valor de $\text{p}K_a$ foi obtido a partir dos desvios químicos dos núcleos H-5 e H-6.

Tabela 5.3 — a) Valores médios de $\text{p}K_a$ da citidina calculados neste trabalho em diversas condições experimentais (concentrações em mol dm^{-3}) a partir dos desvios químicos dos núcleos C-2, C-4, C-5, C-6, H-5 e H-6 (o intervalo de erro compreende todos os valores obtidos). Referência interna: *tert*-butanol; [Citidina] = 0,10 mol dm^{-3} ; b) Valores publicados na literatura para essa constante.

4,23 a 20°C e para valores da força iônica compreendidos entre 0,1 e 1,0 M, determinados sobretudo por métodos potenciométricos [96]. Para uma temperatura de 25°C foram obtidos potenciometricamente os valores 4,07 e 4,12 para valores de força iônica 0,1 e 0,6 M [93]. Por RMN, um valor de 4,15 foi publicado para uma solução aquosa pura de citidina na concentração 0,20 mol dm⁻³ a 32°C [79]. Neste trabalho, para uma solução de citidina 0,10 mol dm⁻³ e força iônica inferior a 0,1 mol dm⁻³, na ausência de sais adicionados, calculou-se um valor de pK_a de 4,09 ± 0,01 (Tabela 5.3). No entanto, o valor de pK_a calculado para uma solução de citidina 0,10 mol dm⁻³ a que foi adicionado KNO₃ ou KCl (concentração final 0,6 mol dm⁻³) é bastante maior: 4,34 ± 0,02. A influência do anião cloreto sobre a constante de acidez, relativamente à formação de um quelato inverso com a citidina discutido no Capítulo 6, é aqui semelhante à influência do anião nitrato, bem como a sua influência sobre os desvios limite δ_{HL} e δ_L, que são idênticos dentro da margem do erro experimental.

A presença em solução de Ca(NO₃)₂ 0,20 mol dm⁻³ permite obter um valor de 4,15 para o pK_a do azoto N-3 da citidina, valor que é ainda ligeiramente superior ao que foi obtido por estudos potenciométricos, 4,12 ± 0,04 [93], tal como se verificou para a glicilglicina.

Definição do estado de referência para as experiências de pH variável com citidina

A utilização de *p*-dioxano, TMA ou dos desvios dos núcleos da região ribosilo da citidina como referência para os desvios dos núcleos da região pirimidínica, nas experiências com KNO₃ e Ca(NO₃)₂, resultam na obtenção de valores que não diferem dos calculados usando *tert*-butanol, o que apoia a utilização desta substância no

Núcleo	pK _a	δ _{HL}	δ _L
H-5	4,15	1000	962
H-6	4,15	1378	1316
C-2	4,15	5977	6438
C-4	4,15	6525	6869
C-5	4,13	3292	3359
C-6	4,14	5763	5629

Tabela 5.4 — Parâmetros de RMN para o estado de referência em experiências com pH variável com citidina: [citidina] = 0,10 mol dm⁻³; [Ca(NO₃)₂] = 0,2 M; referência interna = *tert*-butanol; 25° C

estado de referência. Os sinais de *p*-dioxano e TMA não apresentam desvios relativamente a *tert*-butanol quando misturados em baixa concentração nas soluções observadas, dentro do intervalo de pH estudado.

Como o catião Ca^{2+} demonstrou não ser coordenante relativamente à citidina em solução aquosa [97] as soluções de citidina contendo nitrato de cálcio foram escolhidas como estado de referência por haver uma compensação da força iónica dentro dos limites esperados e que é feita por um catião bivalente, tal como acontece em soluções de Zn^{2+} ou de Cd^{2+} (ver na Tabela 5.4 os valores dos parâmetros individuais para cada núcleo no estado de referência).

3. Conclusão

A ESPECTROSCOPIA DE RMN constitui uma forma prática para a determinação de constantes de acidez para equilíbrios rápidos em solução, embora seja afectada pelas concentrações de espécies carregadas em solução e também pela escolha da referência interna. Embora o valor do $\text{p}K_a$ da citidina, por exemplo, para soluções sem sal adicionado (força iónica aproximadamente igual a 0,1 M) seja muito próxima do valor medido potenciométricamente, a presença de iões em solução tem um efeito muito mais marcado sobre as constantes de acidez medidas por RMN do que o que acontece em casos análogos em que a medição é feita por potenciometria. Um exemplo deste "efeito iónico" é a inadequação do TMA como referência interna a pH alto, e a sua influência sobre o valor de $\text{p}K_{a_2}$ da glicilglicina, devido à sua carga positiva. Estas observações são provavelmente uma consequência da grande sensibilidade do RMN às variações da densidade electrónica em torno dos núcleos, variações essas que definem em última análise os desvios químicos observados.

Neste trabalho a determinação das constantes de acidez dos ligandos serve como passo intermédio para a posterior determinação das constantes de equilíbrio com os catiões metálicos Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} em solução aquosa e por essa razão optou-se por tentar obter um valor para as constantes de acidez que possa reflectir as condições em que as constantes de complexação serão calculadas.

*Zinco e cádmio:
complexos binários e ternários mistos
com citidina e glicilglicina*

COMPLEXOS DE ZINCO e cádmio com nucleotídeos, nucleosídeos e derivados [98-102] têm sido estudados por RMN, bem como complexos desses cátions com aminoácidos e peptídeos [103-107]. O estudo dos complexos ternários mistos de zinco, cádmio ou de outros cátions metálicos, com as formas fosfatadas ou não fosfatadas de nucleotídeos ou nucleosídeos, assim como o estudo de complexos ternários envolvendo aminoácidos ou peptídeos, tem sido uma área de grande aplicação da espectroscopia de RMN [75,108-110]. Devido à predominância de condições de equilíbrio rápido com estes cátions e ligandos, os métodos de cálculo das constantes de equilíbrio, embora diferentes de autor para autor, baseiam-se sempre na análise da variação dos desvios químicos dos ligandos ou do cátion metálico no equilíbrio, como função das condições iniciais e das condições no equilíbrio. A espectroscopia de RMN tem sido usada não só para calcular as constantes de equilíbrio mas também para avaliar a influência das diversas interações que contribuem para a estabilidade deste importante tipo de complexos, nomeadamente as interações hidrofóbicas e de empilhamento entre os ligandos.

Neste trabalho, o cálculo de constantes de estabilidade de complexos foi executado recorrendo a duas formas de fazer variar os desvios químicos dos ligandos: variar a concentração total de cátion metálico e variar o pH da solução no equilíbrio. O primeiro método foi usado com o objectivo central de avaliar o efeito de alguns cátions e aniões sobre os desvios químicos da citidina e, conseqüentemente, a sua interacção com esse nucleotídeo. Foram calculadas algumas constantes de equilíbrio para complexos binários e ternários mistos de citidina com base neste método que, por manter o pH fixo, permitiu reduzir a complexidade dos modelos e assim usar

métodos computacionais mais simples, embora, por outro lado, os resultados sejam afectados pela variação da força iónica e da concentração de aniões, cujos efeitos se tentaram avaliar e compensar.

A utilização do método baseado na variação de pH, que foi aplicado para a citidina e para a glicilglicina, permitiu calcular constantes de equilíbrio para as suas associações binárias e ternárias mistas com os catiões Zn^{2+} e Cd^{2+} . Como foi já evidenciado anteriormente, este método permite manter a força iónica praticamente constante ao longo da experiência, exigindo no entanto a utilização de modelos mais complexos, pois é necessário atender aos equilíbrios de protólise dos ligandos. As constantes de estabilidade para os complexos mistos de glicilglicina e citidina foram calculadas com base nos desvios químicos da citidina, por razões que serão apresentadas de seguida, e foi avaliada a importância da cooperatividade na formação desses complexos.

1. Constantes de estabilidade para os complexos binários de Zn^{2+} e Cd^{2+} com citidina

1.1 Variação do desvio químico em função da concentração de catião metálico (pH fixo); efeito dos catiões e dos aniões

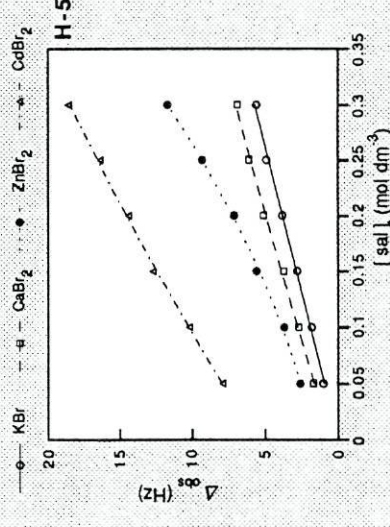
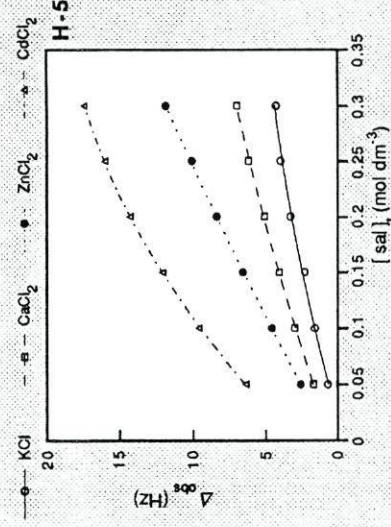
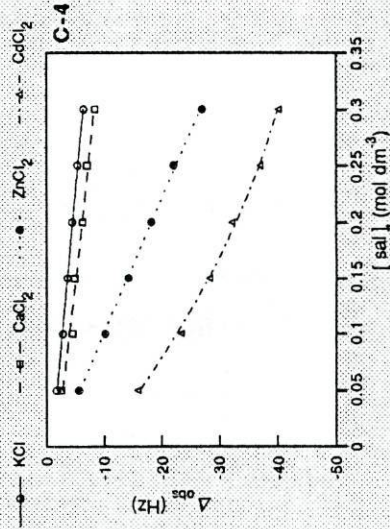
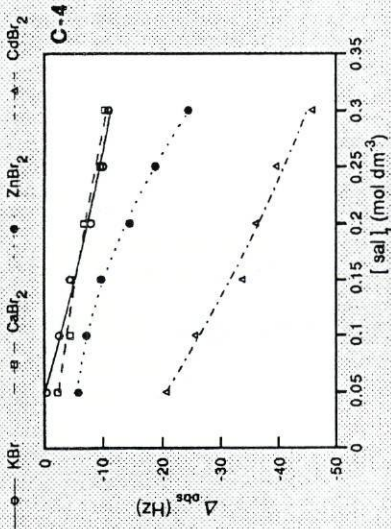
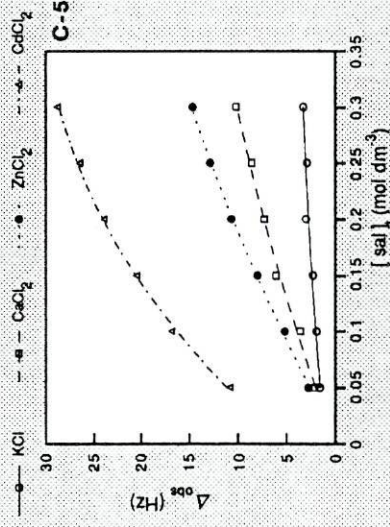
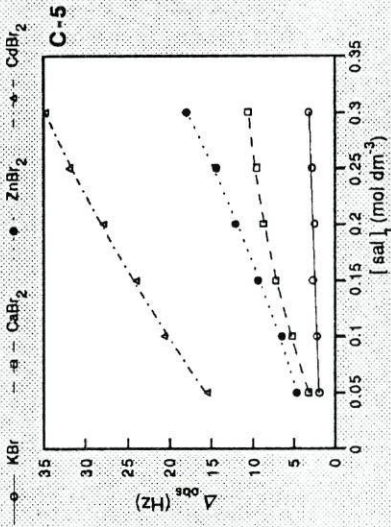
A SENSIBILIDADE DA ESPECTROSCOPIA de ressonância magnética nuclear permite estudar interacções extremamente fracas em solução aquosa [111]. Com o objectivo de determinar o efeito sobre os desvios químicos de 1H e ^{13}C da citidina provocado pela interacção fraca em solução aquosa de alguns iões com aquele nucleotídeo, foram utilizadas soluções de sais de K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} com os aniões NO_3^- , ClO_4^- , Cl^- e Br^- ($KClO_4$ não foi usado por ser muito pouco solúvel em água à temperatura ambiente), para tentar isolar e quantificar as influências individuais de cada um desses iões sobre os desvios químicos dos núcleos da citidina. Pretendeu-se simultaneamente avaliar a influência da força iónica do meio sobre o valor das constantes de estabilidade calculadas para as possíveis associações entre aqueles iões e a citidina. O método utilizado consistiu em manter a concentração total de citidina constante, com um valor de $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, e fazer variar a concentração de sal de metal. Para os sais de catiões bivalentes foram utilizadas as concentrações 0,05; 0,10; 0,15; 0,20;

0,25 e 0,30 mol dm⁻³, com a exceção das soluções de Cd(ClO₄)₂ e de Zn(ClO₄)₂ em que, devido à sua baixa solubilidade em água, apenas foram usadas concentrações de 0,05 e 0,10 mol dm⁻³ para o perclorato de cádmio e de 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20 mol dm⁻³ para perclorato de zinco. Para KNO₃ foram usadas as concentrações de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 e 0,60 mol dm⁻³, para assegurar a correspondência de força iônica e de concentração de aniões entre as soluções destes sais e as soluções de sais de catiões bivalentes. O valor de pH usado foi 6,15 ± 0,05, para o qual a citidina se encontra completamente desprotonada em N-3 (pK_a ≅ 4,15) e também para evitar a formação de precipitados de hidróxidos dos metais.

Na Figura 6.1 são apresentados, para todos os aniões e catiões estudados, os desvios químicos observados, relativamente a *tert*-butanol, para os núcleos H-5, C-4 e C-5 da citidina, referidos aos (ou seja, subtraídos dos) desvios químicos observados para uma solução 0,10 mol dm⁻³ em citidina com pH 6,15, que se considera para já como o estado de referência. A qualidade desta referência foi testada comparando, para cada núcleo, os valores obtidos para os desvios químicos da citidina nas soluções de referência, com os valores obtidos extrapolando, para todos os casos, as curvas dos desvios químicos de cada núcleo da citidina para [sal] = 0,00. As extrapolações foram realizadas por ajuste da função 6.1, descrita mais adiante nesta secção, aos pontos experimentais. Em todos os casos as curvas de desvios químicos convergiram, para cada núcleo e para cada sal utilizado, para valores com uma amplitude máxima de 3 Hz centrada no valor médio das extrapolações. Verificou-se que os valores de referência da citidina se encontravam invariavelmente dentro destes limites e perto da média, tal como pode ser verificado na Tabela 6.1.

	H-5	H-6	C-2	C-4	C-5	C-6
δ_{extrap}	960 ± 0,5	1318 ± 1	6429 ± 2	6868 ± 2	3351 ± 1	5634 ± 1
δ_{t}	959,5 ± 0,2	1317,2 ± 0,2	6430,2 ± 0,2	6869,7 ± 0,2	3350,3 ± 0,2	5634,4 ± 0,2

Tabela 6.1 — Valores das extrapolações para [sal] = 0 (δ_{extrap}) dos gráficos da Figura 6.1 e valores dos desvios químicos para os núcleos de ¹H e ¹³C da base da citidina em soluções puras 0,10 M, relativamente a *tert*-butanol (δ_{t}), a pH 6,15.



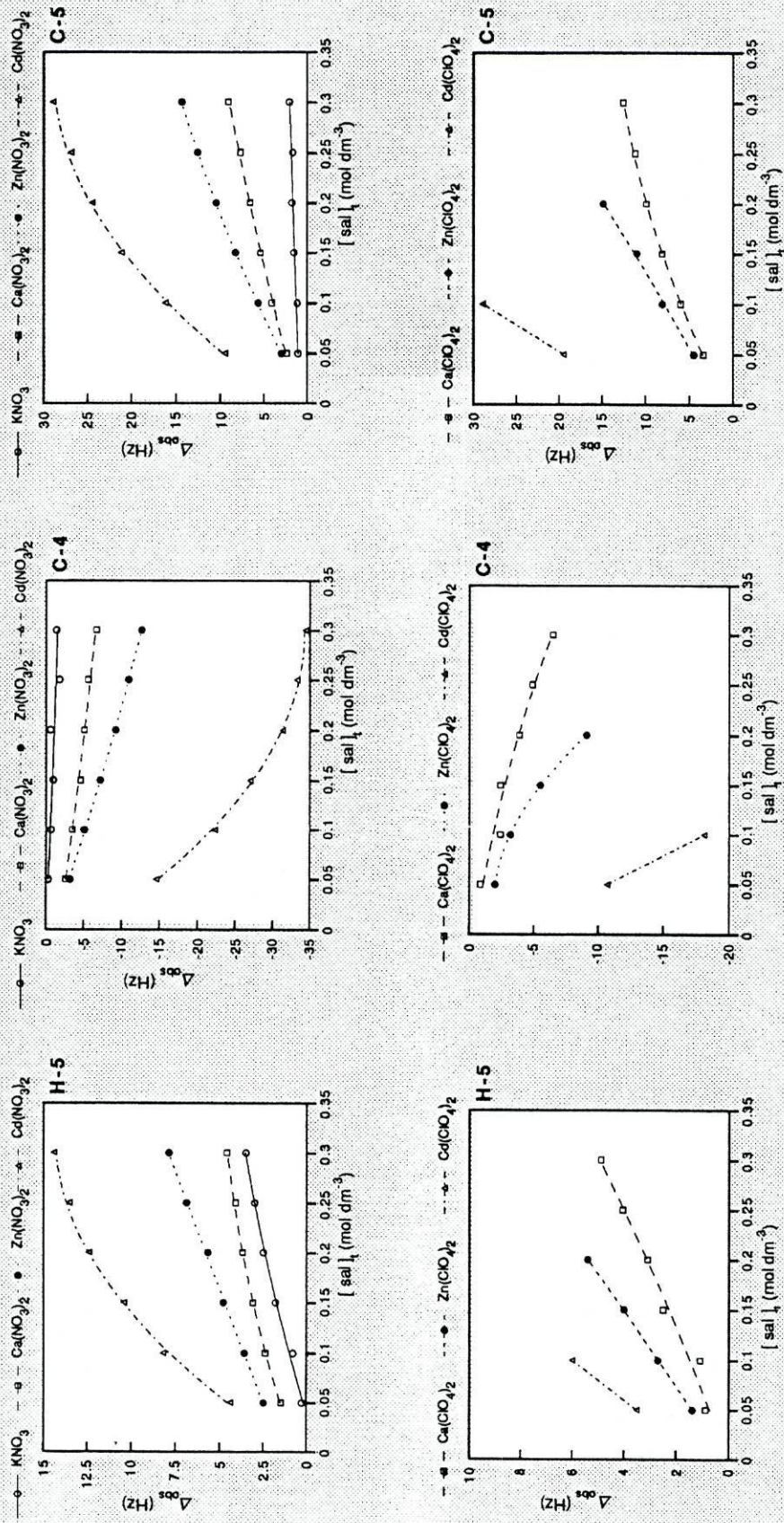
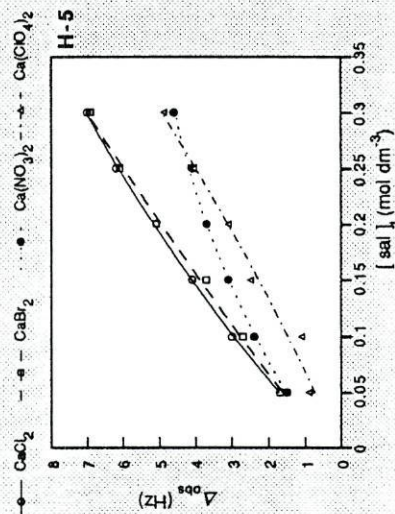
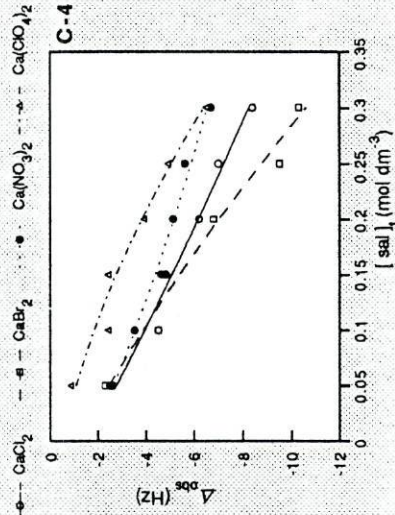
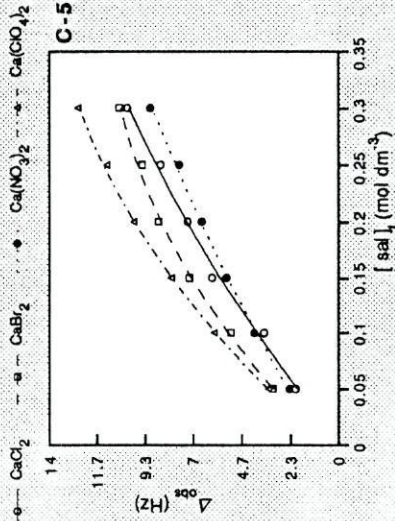
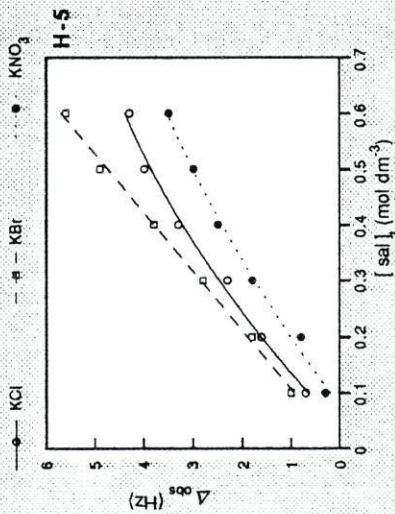
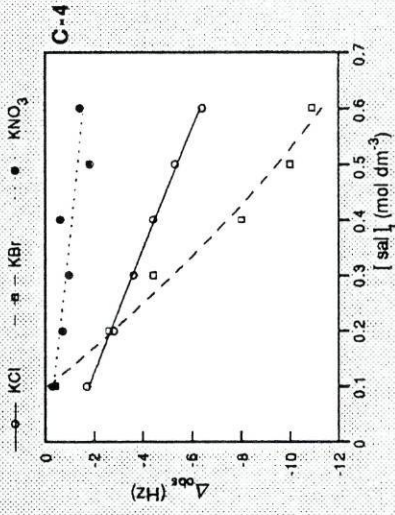
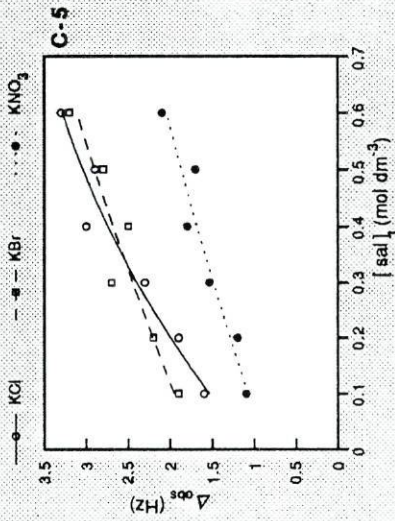


Figura 6.1(a) — Desvios químicos para os núcleos H-5, C-4 e C-5 da citidina 0,1 M para concentração variável de diversos de sais, referidos aos desvios químicos da citidina pura em H₂O a pH 6,15 (referência interna: *tert*-butanol). Efeito comparativo dos sais de K⁺ são duplas das correspondentes na escala das abcissas destes gráficos)



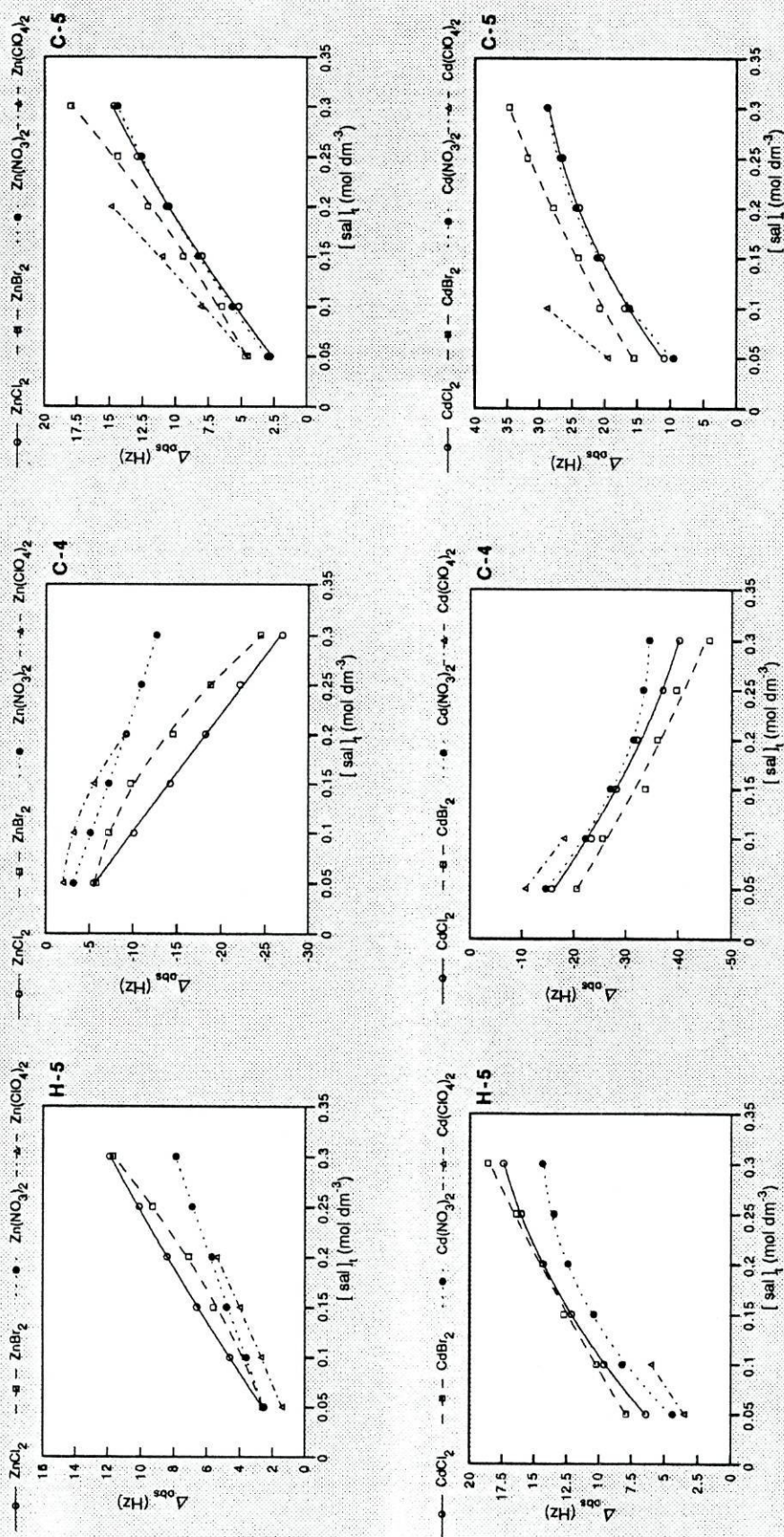
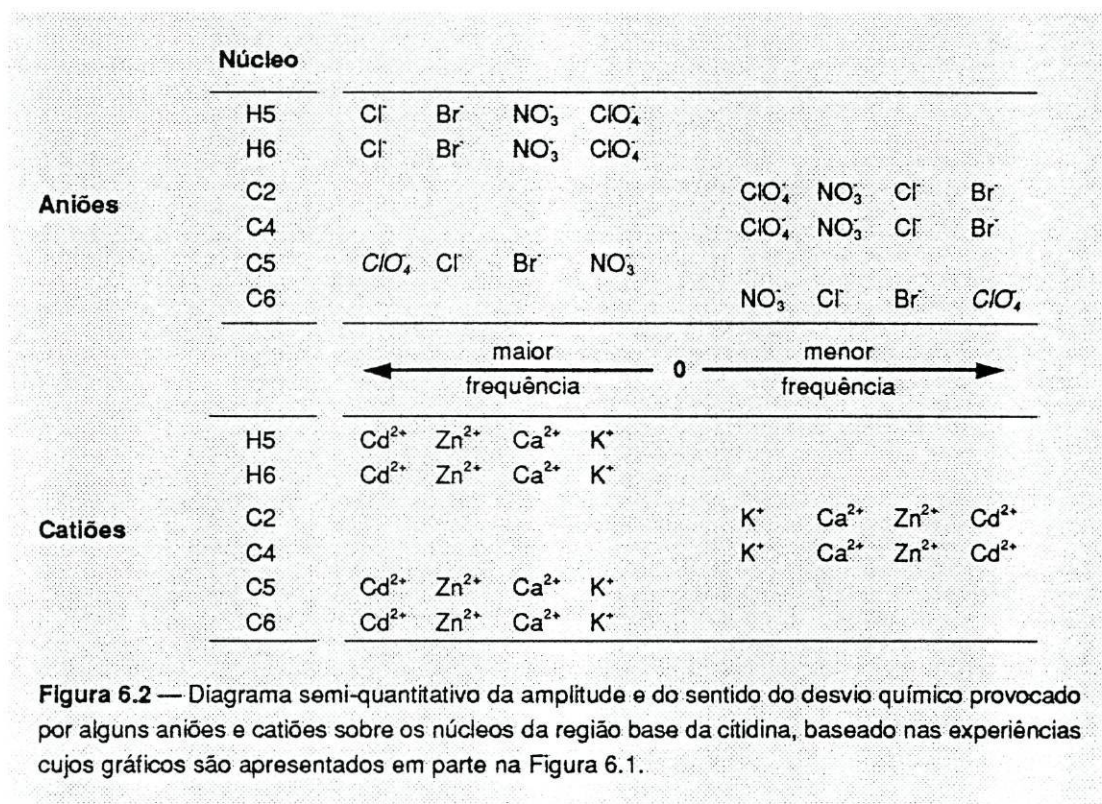


Figura 6.1(b) — Desvios químicos para os núcleos H-5, C-4 e C-5 da citidina 0,1 M para concentração variável de sais referidos aos desvios químicos da citidina pura em H₂O a pH 6,15 (referência interna: *tert*-butanol). Efeito comparativo dos ânions.

Da observação da Figura 6.1(a) é possível concluir que os cátions se ordenam da seguinte forma relativamente à amplitude, em valor absoluto, dos desvios provocados: $Cd > Zn > Ca > K$. Esta ordenação é observada para todos os núcleos de 1H e ^{13}C da base da citidina e, por outro lado, é independente do anião, uma vez que foi verificada para os quatro aniões utilizados. A influência dos aniões nos desvios químicos, embora de pequena amplitude, é visível nos gráficos da figura 6.1(b), onde estão apresentados os desvios químicos resultantes de experiências que partilham um cátion comum. Com base nestes desvios foi elaborado um diagrama semi-quantitativo da influência relativa de cátions e aniões sobre os desvios químicos de 1H e ^{13}C da base da citidina, apresentado na Figura 6.2. As sequências obtidas são independentes do contra-íon e têm como referência os desvios químicos da citidina pura em solução aquosa a pH 6,15.

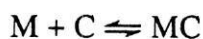
A sequência dos cátions é comum a todos os núcleos o que constitui uma indicação de um só local de coordenação (ou de ligação fraca) à citidina, local esse que provavelmente será a região (C-2)O-(N-3) [112,114]. Convém, no entanto, referir que os desvios provocados por K^+ e Ca^{2+} são pequenos quando comparados com os provocados por Zn^{2+} e Cd^{2+} .



O estabelecimento de uma sequência para os aniões baseada nos desvios químicos provocados não é tão fácil como para os catiões, devido provavelmente à ocorrência de interações mais fracas e menos localizadas com a citidina. Os iões cloreto e brometo ocorrem sempre juntos nas séries da Figura 6.2, não havendo diferença clara entre o efeito produzido por cada um. O efeito destes aniões nos desvios químicos da citidina é maior para os núcleos de H-5, H-6, C-2 e C-4 e o segundo maior para C-5 e C-6, o que os permite classificar como os menos inertes para estudos em RMN. É nítida na Figura 6.2 a posição anômala do ião perclorato, que aparentemente apenas estende a sua influência à região C-5 / C-6 da citidina. Apesar dos iões nitrato e perclorato terem sido considerados como os menos interferentes com a citidina por Marzilli et al. em estudos por RMN em DMSO [97], os gráficos da Figura 6.1 mostram inequivocamente a não inerticidade do perclorato relativamente a esses núcleos da citidina, e que é independente do catião presente em solução. O ião nitrato mostra-se, no conjunto dos resultados, pouco interferente relativamente aos núcleos considerados, embora os desvios químicos provocados por este anião sejam ligeiramente superiores aos provocados pelo perclorato, com exceção dos núcleos C-5 e C-6. Uma apreciação global do diagrama da Figura 6.2 permite concluir, atendendo à diferente ordem por que se distribuem para cada núcleo (ao contrário do observado para os catiões), que os aniões não devem ter um único local de associação com a citidina e que a sua interação com esse nucleotídeo é menos específica e mais fraca do que no caso dos catiões Zn^{2+} e Cd^{2+} .

Cálculo de constantes de estabilidade

A comparação do valor absoluto dos desvios químicos não indica todavia só por si a extensão da associação molecular presente, que, em rigor, só pode ser avaliada pela determinação da constante de equilíbrio dessa associação. O cálculo de constantes de equilíbrio é, em princípio, possível a partir dos desvios da Figura 6.1 e para isso foi postulado o modelo simples de associação 1:1



em que M representa um catião (ou um anião, em estudos de coordenação de aniões a citidina) e C a citidina. Como foi mostrado nos Capítulos 3 e 4, é possível, para

este modelo, deduzir uma equação para o desvio químico, que assume a forma

$$\Delta_{\text{obs}}^i = (M_t + C_t + 1/K_{11} - ((M_t + C_t + 1/K_{11})^2 - 4 M_t L_t))^{-1/2} \Delta_{\text{MC}}^i / 2C_t \quad (6.1)$$

a partir da qual é feito um ajuste iterativo (regressão não linear) aos pontos experimentais para cada núcleo, otimizando os parâmetros desconhecidos K_{11} e Δ_{MC} . Na equação 6.1, M_t representa a concentração total do catião metálico (ou do anião), C_t a concentração total de citidina, K_{11} a constante de formação do complexo 1:1 ($K_{11} = [\text{MC}] / ([\text{M}][\text{C}])$), Δ_{obs}^i o desvio observado para o núcleo i para um conjunto de valores de M_t e C_t ($\Delta_{\text{obs}}^i = \delta_{\text{obs}}^i - \delta_0^i$ onde δ_0^i é o desvio químico do núcleo i do ligando no estado de referência), e Δ_{MC}^i o desvio químico do complexo 1:1 ($\Delta_{\text{MC}}^i = \delta_{\text{MC}}^i - \delta_0^i$). Foi também utilizado para o cálculo da constante K_{11} o método de Nakano, descrito em detalhe no Capítulo 3.

Um aspecto a considerar nas experiências em que é variada a concentração de catião metálico é a existência de grandes variações de força iônica entre os pontos experimentais, o que torna menos claro o significado das constantes obtidas por variação dos desvios químicos. Por outro lado, a variação dos desvios químicos tal como está apresentada na Figura 6.1 é afectada simultaneamente pelo efeito dos catiões e dos aniões e por isso não poderia ser estritamente aplicado um modelo de associação 1:1. Embora de pequena amplitude, o efeito dos aniões altera a forma das curvas de desvios e, logo, interfere no valor das constantes obtidas a partir do modelo de associação 1:1 catiões / citidina.

Para tentar minimizar o efeito da variação da força iônica e neutralizar os desvios provocados pelos aniões, foram calculadas novas variações de desvios químicos como (a) a diferença ponto a ponto entre os obtidos nas experiências com Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} e os obtidos nas experiências com K^+ e em que o anião era o mesmo e (b) diferenças entre os desvios das experiências com Zn^{2+} e Cd^{2+} e os desvios das experiências com Ca^{2+} , também partilhando um mesmo anião. Os desvios químicos de referência, δ_0^i , passam a ser os desvios químicos dos núcleos de citidina nas soluções com K^+/A^- ou $\text{Ca}^{2+}/2\text{A}^-$, onde A^- representa um dos aniões Cl^- , Br^- , NO_3^- (o anião ClO_4^- não pôde ser usado para estes cálculos devido à limitada solubilidade em água dos percloratos de potássio, cádmio e zinco). Esta operação de

subtracção é plausível porque a associação entre os aniões e a citidina é de natureza muito fraca e ocorre em extensão previsivelmente reduzida. O efeito da força iónica não é porém completamente compensado pela utilização dos estados de referência mencionados devido à possível interacção localizada de K^+ ou Ca^{2+} com a citidina e à interacção K^+ /aniões e Ca^{2+} /aniões. Devido à diferença de carga entre o ião potássio e os catiões do grupo 12, é necessário usar uma concentração dupla de sais de potássio, e logo concentração dupla de catiões potássio, para simular as condições de força iónica nas soluções com os catiões bivalentes. Este facto pode constituir uma objecção ao uso das soluções de sais de potássio no estado de referência. Com base nas referências mencionadas acima foi tentado o cálculo dos valores de K_{11} para todos os catiões bivalentes com citidina.

As pequenas variações nos desvios químicos provocados pelo ião Ca^{2+} relativamente ao K^+ não permitiram calcular uma constante de equilíbrio para a sua associação à citidina, mas para Cd^{2+} e Zn^{2+} foram obtidos os valores de K_{11} indicados na Tabela 6.2. Os resultados obtidos por regressão linear, segundo o método de Nakano, foram sempre muito próximos dos obtidos por regressão não linear e encontram-se dentro das margens de erro apresentadas para as constantes. O método de Nakano revelou instabilidade na convergência, em especial para o zinco, já que este catião produz pequenos desvios químicos e apresenta uma constante de estabilidade muito pequena.

As grandes variações encontradas para os valores de K_{11} estão provavelmente relacionadas com a associação entre aniões e catiões, para além da influência dos erros experimentais nas concentrações, na medição dos desvio químico e na medição do pH, agravados pela soma dos erros associada com a operação de subtracção de desvios químicos. Apesar da dispersão dos resultados, pode ser verificado que a constante de formação do complexo binário com o catião zinco é consistentemente inferior à do cádmio. Os valores da Tabela 6.2 permitem estimar um valor de $0,6 \pm 0,4 M^{-1}$ para K_{11} no sistema Zn^{2+} /citidina e de $10 \pm 6 M^{-1}$ para K_{11} no sistema Cd^{2+} /citidina. Foi possível calcular mais valores individuais para K_{11} no sistema com o cádmio devido às maiores variações nos desvios químicos provocados pelo catião cádmio e à maior constante de estabilidade para a sua coordenação à citidina.

Núcleo	K_{11}						
	H-5	H-6	C-2	C-4	C-5	C-6	
Desvios							
$\delta_{ZnCl_2} - \delta_{KCl}$	—	2,2	—	0,2	0,8	0,3	Zinco
$\delta_{ZnCl_2} - \delta_{CaCl_2}$	—	—	—	—	—	—	
$\delta_{ZnBr_2} - \delta_{KBr}$	—	—	—	—	—	—	
$\delta_{ZnBr_2} - \delta_{CaBr_2}$	—	—	—	—	—	—	
$\delta_{Zn(NO_3)_2} - \delta_{KNO_3}$	—	—	—	0,7	0,9	—	
$\delta_{Zn(NO_3)_2} - \delta_{Ca(NO_3)_2}$	0,9	0,8	0,5	0,5	0,7	0,4	
<hr/>							
$\delta_{CdCl_2} - \delta_{KCl}$	—	—	—	5,1	6,9	12,1	Cádmio
$\delta_{CdCl_2} - \delta_{CaCl_2}$	10,0	3,6	—	4,8	14,5	9,1	
$\delta_{CdBr_2} - \delta_{KBr}$	3,5	5,7	6,1	—	—	17	
$\delta_{CdBr_2} - \delta_{CaBr_2}$	—	—	3,6	—	—	2,5	
$\delta_{Cd(NO_3)_2} - \delta_{KNO_3}$	—	14,3	5,9	14,3	11,1	8,1	
$\delta_{Cd(NO_3)_2} - \delta_{Ca(NO_3)_2}$	8,7	11,5	7,0	11,0	12,5	8,0	

Tabela 6.2 — Valores da constante K_{11} (M^{-1}) calculada para a associação entre os cátions cádmio(II) e zinco(II) e a citidina usando como referência os desvios químicos de soluções de cátion potássio(I) e cálcio(II). São assinalados com um traço os casos em não foi possível calcular um valor para K_{11} .

Para os sistemas com o anião nitrato (ao contrário de sistemas com os outros aniões) foi possível ajustar a função teórica aos desvios de todos os núcleos e calcular a respectiva constante K_{11} . Os valores médios obtidos para as constantes de estabilidade dos complexos binários são $0,65 \pm 0,20 M^{-1}$ para o nitrato de zinco e $9,8 \pm 2,8 M^{-1}$ para o nitrato de cádmio, com base nos valores de K_{11} apresentados para cada núcleo na Tabela 6.2. Estes valores são quase idênticos às médias totais referidas no parágrafo anterior. Para a constante de estabilidade do complexo binário zinco/citidina obtiveram-se valores maiores para os núcleos C-5, H-5 e H-6 (0,75, 0,87 e $0,79 M^{-1}$, respectivamente) do que para os restantes núcleos de ^{13}C , cujo valor se situou próximo dos $0,5 M^{-1}$. No caso do cádmio a dispersão dos valores foi relativamente homogênea dentro do intervalo de erro especificado para a constante tendo sido obtidos valores desde $12,5 M^{-1}$ para C-5 até $7,0 M^{-1}$ para C-2. A dispersão dos valores de K_{11} de núcleo para núcleo no caso do sais de nitrato foi menor que nos sais de cloreto e brometo, factor que, juntamente com o que já foi discutido sobre a posição do anião nitrato nas séries do diagrama semi-quantitativo da Figura 6.2,

contribuiu para escolher este anião para as experiências de pH variável descritas nas secções seguintes.

Os valores médios obtidos para K_{11} nos sistemas Zn(II)/citidina e Cd(II)/citidina concordam em certa medida com os valores obtidos por potenciometria para os mesmos casos por Kinjo *et al.* [113], $1,58 \pm 0,40 M^{-1}$ e $8,12 \pm 1,31 M^{-1}$ respectivamente, para soluções a 25 °C e força iónica 0,5 M (NaNO₃).

Relativamente à escolha do catião para o estado de referência, verificou-se que a utilização para esse fim dos desvios químicos da citidina em soluções com cálcio ou potássio permitem obter aproximadamente os mesmos resultados, com excepção dos cloretos e dos brometos de cálcio, os quais não funcionaram bem como referência para os cloretos e brometos de zinco (ver Tabela 6.2), devido talvez, por um lado, a uma maior interacção destes aniões com a citidina (efeito do quelato invertido, ver a seguir) e, por outro, aos pequenos desvios causados pelo catião zinco quando comparados com os causados pelo catião cádmio.

Utilizando o princípio de subtracção já referido, foi possível isolar também o efeito dos aniões sobre os desvios químicos da citidina. Esse efeito não é superior a 2 Hz para a maioria dos aniões, relativamente aos desvios provocados pelo anião menos interferente para cada núcleo (nitrato ou perclorato), o que à partida não permite o cálculo de constantes de equilíbrio com boa precisão.

É difícil de prever um modelo para a interacção da citidina com os aniões, dado o desconhecimento da forma e do local dessa interacção, embora para o anião cloreto tenha sido observado em DMSO e em misturas H₂O : DMSO (até 26% : 74%) que este anião afecta os desvios químicos da região H-1 / NH₂ da guanosina, possivelmente pela formação de um quelato entre aquele anião e o nucleotídeo [114,115] (Figura 6.3). Dado que essa região é análoga à região H-5 / NH₂ da citidina e que os desvios químicos de H-5 para soluções com anião cloreto são maiores que os para soluções de nitrato, poder-se-á supor a presença de um quelato semelhante no caso da citidina, esquematizado na Figura 6.3., servindo de apoio ao cálculo da constante de equilíbrio para essa associação. Foi possível estimar um valor médio de $1,2 \pm 0,8 M^{-1}$ para a constante de estabilidade do quelato invertido formado entre a citidina e o anião cloreto, calculado com base nas diferenças entre os desvios químicos de H-5 nas soluções de

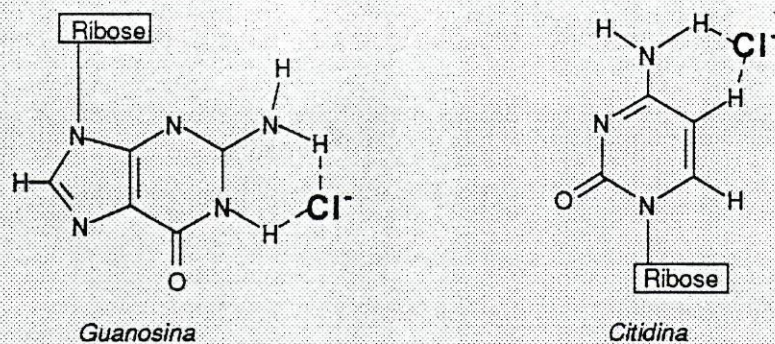


Figura 6.3 — Quelato invertido formado entre os nucleotídeos guanosina e citidina e o anião cloreto.

cloretos e de percloratos, para todos os cátions usados. Embora os desvios químicos provocados pelo anião cloreto sejam um pouco menores que os causados pelo cátion zinco, o valor da constante de estabilidade do quelato invertido é superior ao da coordenação entre o zinco e a citidina.

Dada a semelhança entre os comportamentos dos aniões cloreto e brometo, foi postulada a existência de quelato invertido também no caso do ião brometo com citidina e foi calculado um valor de $1,3 \pm 0,7 M^{-1}$ para a constante K_{11} dessa associação molecular, nas condições já referidas para o ião cloreto. Tanto este valor como o obtido para a associação cloreto/citidina explicam a dificuldade em calcular K_{11} para o complexo binário zinco/citidina ($\approx 0,6 M^{-1}$) usando os desvios da citidina causados pelo cloreto de zinco e pelo brometo de zinco, mesmo tendo como referência os desvios químicos da citidina em soluções de cloreto ou brometo de cálcio (potássio).

De acordo com o que foi exposto até agora, é possível concluir que o método de variação de concentração de cátion metálico não permite o cálculo preciso de constantes de equilíbrio muito pequenas em solução aquosa, embora possa fornecer valores indicativos para essas constantes e permita estabelecer uma ordem semi-quantitativa para os efeitos relativos de espécies iônicas sobre os desvios químicos de uma espécie observada.

1.2 Variação do desvio químico em função do pH

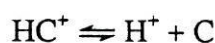
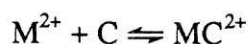
TAL COMO FOI REFERIDO NA SECÇÃO ANTERIOR, ao analisar os resultados de experiências em que o pH é mantido num valor fixo e é variada a concentração de uma espécie

iônica, é essencial encontrar um estado de referência para os desvios químicos que reproduza a variação da força iônica ao longo dessas experiências, o que, tal como foi observado, nem sempre é possível. A vantagem do método da variação do pH relativamente ao da variação da concentração de catião metálico reside no facto de que a força iônica é mantida dentro de limites estreitos sem ser necessário recorrer ao seu controlo específico. Convém referir que esse controlo, tal como é feito por exemplo em potenciometria, em que, devido à sensibilidade do método, as espécies em estudo [sal de catião metálico / ligando(s)] se encontram em reduzida concentração ($< 10^{-3} M$) e a força iônica é originada quase totalmente por um sal inerte, exigiria a utilização de concentrações muito baixas de reagentes em solução e tornaria pouco prática a obtenção dos espectros de RMN, sobretudo os de ^{13}C .

A citidina apresenta apenas uma posição de coordenação para os catiões Zn^{2+} e Cd^{2+} : o átomo de azoto endocíclico (imínico) N-3 [112,114], embora o envolvimento do átomo de oxigénio ligado a C-2 na coordenação ao catião metálico tenha sido postulado em DMSO [101].

Na Figura 6.4 estão representados em função do pH os desvios químicos relativos a *tert*-butanol dos núcleos H-5, C-4 e C-5 de soluções $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ em citidina e $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ em nitrato de cálcio, nitrato de zinco ou nitrato de potássio. O gráfico de desvios de C-2 é idêntico ao de C-4 e os gráficos de C-6 e H-6 são idênticos ao de H-5, ou seja, a distribuição das três curvas nesses gráficos segue o mesmo padrão para C-2 e C-4 e para H-5, H-6 e C-6. O valor de pH máximo utilizado foi 6,3 devido à formação de hidróxidos dos metais acima de pH 7.

Na zona de pH usada existem proporções variáveis de citidina protonada e não protonada, uma vez que o pK_a da citidina tem um valor próximo de 4,2. Assim, o modelo de equilíbrio que foi considerado adequado para descrever o comportamento do sistema foi o seguinte:



(com constantes de equilíbrio K_{11} e K_a respectivamente) onde M^{2+} representa Zn^{2+} ou Cd^{2+} , C representa a citidina neutra e HC^+ a citidina protonada em N-3 e MC^{2+}

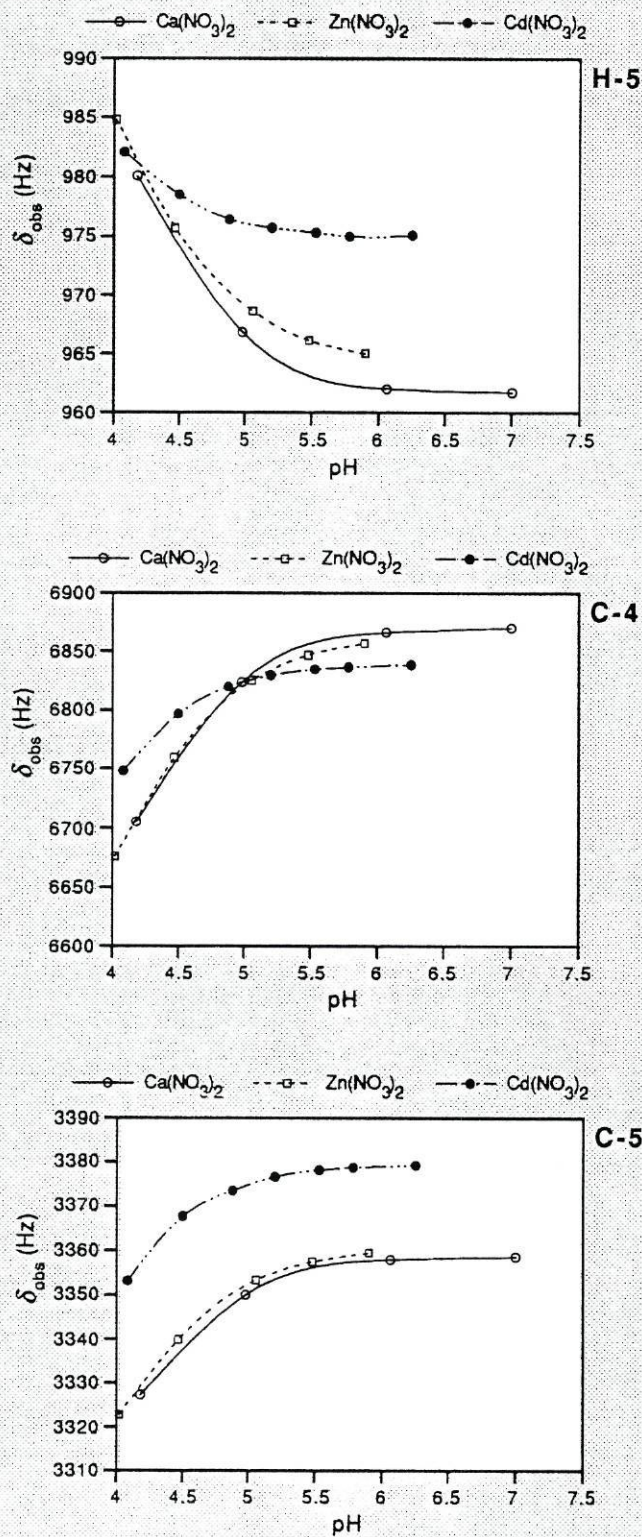


Figura 6.4 — Efeito do pH sobre os desvios químicos dos núcleos H-5, C-4 e C-5 em soluções aquosas de citidina 0,1 M com nitrato de cálcio, nitrato de zinco e nitrato de cádmio 0,2 M.

representa o complexo binário. O desvio químico para um núcleo i da citidina será portanto dado por:

$$\delta_{\text{obs}}^i = ([\text{HC}^+] \delta_{\text{HC}}^i + [\text{C}] \delta_{\text{C}}^i + [\text{MC}^{2+}] \delta_{\text{MC}^{2+}}^i) / C_i \quad (2)$$

onde C_i representa a concentração total de citidina, $\delta_{\text{MC}^{2+}}^i$ representa o desvio químico da espécie coordenada ao catião metálico e δ_{HC}^i e δ_{C}^i representam os desvios químicos da citidina protonada e não protonada em N-3, respectivamente. Os parâmetros desconhecidos na equação 6.3 são portanto dois: K_{11} e $\delta_{\text{MC}^{2+}}^i$.

Foram usados para os cálculos como parâmetros conhecidos os valores de pK_a e de desvios limite ($\delta_{\text{HC}^+}^i$ e δ_{C}^i) apresentados na Tabela 5.3(b), obtidos em soluções 0,10 mol dm⁻³ em citidina e 0,20 mol dm⁻³ em Ca(NO₃)₂ com *tert*-butanol como referência interna; os desvios químicos da citidina nestas soluções estão representados na Figura 6.4 para comparação.

Os valores obtidos para K_{11} são apresentados na Tabela 6.3. A constante média calculada para o catião zinco, $0,38 \pm 0,23 M^{-1}$, é mais pequena que a calculada para o catião cádmio, $11,8 \pm 2,5 M^{-1}$, e menor que a constante determinada em DMSO, para a qual é apontado um valor de $4,1 M^{-1}$ [114], embora os desvios químicos do complexo da citidina com o zinco sejam bastante mais afastados dos da referência do que os correspondentes desvios para o complexo com o cádmio (ver Tabela 6.3). Os dois catiões provocam desvios exactamente com o mesmo sentido nos núcleos da citidina (sentido de maior frequência, logo, maior desprotecção electrónica) mas o catião zinco provoca alterações maiores na distribuição dos electrões na molécula,

Núcleo	Zn ²⁺		Cd ²⁺		Ca ²⁺
	K_{11}	$\delta_{\text{MC}^{2+}}^i$	K_{11}	$\delta_{\text{MC}^{2+}}^i$	$\delta_{\text{HC}^+}^i$
H-5	0,24	1095	14,3	983	1000
H-6	0,50	1362	10,0	1334	1378
C-2	0,33	6392	11,8	6405	5977
C-4	0,35	6726	12,1	6821	6525
C-5	0,61	3443	10,6	3399	3292
C-6	0,29	5698	12,0	5639	5763

Tabela 6.3 — Constantes de equilíbrio e desvios limite para a formação dos complexos binários zinco / citidina e cádmio / citidina; desvios limite para a citidina nas soluções de referência (referência interna: *tert*-butanol).

talvez devido ao envolvimento na ligação do átomo de oxigênio em C-2 [101] ou ao seu menor tamanho, e conseqüente maior proximidade à citidina. A comparação dos valores de δ_{HC^+} e $\delta_{\text{MC}^{2+}}$ da Tabela 6.3 permite verificar que o efeito de desproteção provocado pelos cátions bivalentes nos núcleos C-2 e C-4 é menor que o provocado pelo íon H^+ , sendo no entanto maior para os núcleos mais distantes de N-3, possivelmente devido à maior carga dos cátions bivalentes.

Os valores de K_{11} obtidos pelo método da variação de pH são bastante semelhantes aos obtidos pelo método de variação de concentração de cátion metálico, em especial se se considerar os valores médios obtidos por este último método para os nitratos: $0,6 \pm 0,3 M^{-1}$ para o zinco e $9,8 \pm 2,8 M^{-1}$ para o cádmio (ver Tabela 6.2).

O bom ajuste do modelo aos desvios químicos experimentais sugere que, nas condições da experiência usadas, não deve ocorrer formação de complexos com uma estequiometria diferente de 1:1 em quantidade significativa.

2. Constantes de estabilidade para os complexos binários de Zn^{2+} e Cd^{2+} com glicilglicina

O ESTUDO DA FORMAÇÃO de complexos entre a glicilglicina e Zn^{2+} ou Cd^{2+} foi já estudada por RMN [73,105] e por potenciometria [87,93]. Os resultados de RMN sugerem a existência de dois locais de coordenação na glicilglicina quer para o zinco quer para o cádmio. Um deles é o grupo carboxílico, através dos seus átomos de oxigênio, e o outro é o grupo amina através do seu átomo de azoto. A participação do átomo de oxigênio ou do átomo de azoto da ligação peptídica da glicilglicina na coordenação a cátions metálicos já coordenados aos grupos amina ou carboxílico formando um quelato bidentado também foi proposto como possível [73] (ver Figura 7.6 para o caso do cátion mercúrio(II)). Estudos em D_2O permitiram pôr de parte a coordenação do cátion cádmio no átomo de azoto da ligação peptídica, deslocando para a solução um íon H^+ [106], e neste trabalho não foi encontrada evidência para tal associação através da análise dos desvios químicos.

Os locais de coordenação dos cátions metálicos são também locais de coordenação do íon H^+ , como já foi referido, e existe portanto uma competição entre os íons metálicos e o íon H^+ na formação de complexos com o dipeptídeo. Esta competição

permite usar o método em que as concentrações totais de ligando e de catião metálico são mantidas constantes enquanto é variada a concentração de H^+ , cujo valor no equilíbrio pode ser medido com bastante precisão através da medição do pH da solução. Novamente, a análise da variação dos desvios químicos do ligando em função do pH permite extrair o valor das constantes de equilíbrio.

Na Figura 6.5 estão representados em função do pH os desvios químicos relativamente ao *tert*-butanol dos núcleos de glicilglicina em soluções $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$, na presença de nitrato de potássio $0,60 \text{ mol dm}^{-3}$, nitrato de zinco $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ e nitrato de cádmio $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$. Em toda a análise subsequente, os desvios químicos das soluções de glicilglicina com nitrato de potássio foram utilizadas como referência. Os valores de pK_{a1} , pK_{a2} , δ_{HGGH^+} , δ_{HGG^\pm} e δ_{GG^-} usados para os cálculos são os que constam, para cada núcleo, na Tabela 5.3(a) onde H_2L representa $HGGH^+$ (glicilglicina protonada no grupo amina e no grupo carboxílico); HL representa HGG^\pm (glicilglicina protonada só no grupo amina); e L representa GG^- (glicilglicina desprotonada no grupo amina e no grupo carboxílico).

O intervalo de pH utilizado esteve compreendido entre 1 e 6 para os estudos com o zinco e de 2 a 7 para os estudos com o cádmio; nestes intervalos de pH não ocorre associação significativa entre o anião hidróxido e Zn^{2+} ou Cd^{2+} [73]. Não foi também detectado para estes catiões metálicos o efeito do anião hidróxido sobre os desvios químicos observados para a glicilglicina, ao contrário do que aconteceu com o catião mercúrio, cujos resultados são discutidos no capítulo seguinte.

Tal como já havia sido observado para a citidina, os catiões zinco e cádmio comportam-se de forma muito semelhante relativamente ao efeito provocado sobre os desvios químicos dos núcleos da glicilglicina, como pode ser observado na Figura 6.5. É visível em quase todos os núcleos e para as soluções contendo Zn^{2+} e Cd^{2+} o deslocamento para menor pH da zona de maior declive das curvas de desvio químico, tanto na região de pK_{a1} como na região de pK_{a2} , sendo mais notório para os núcleos H-1, C-2 e C-4. A transposição das curvas para menor pH é causada pelo deslocamento do ião H^+ pelos catiões metálicos em ambos os locais de coordenação. O deslocamento da curva de variação de desvios químicos provocado pelos catiões na zona de pH da primeira protólise, é menor que o afastamento exibido na zona da

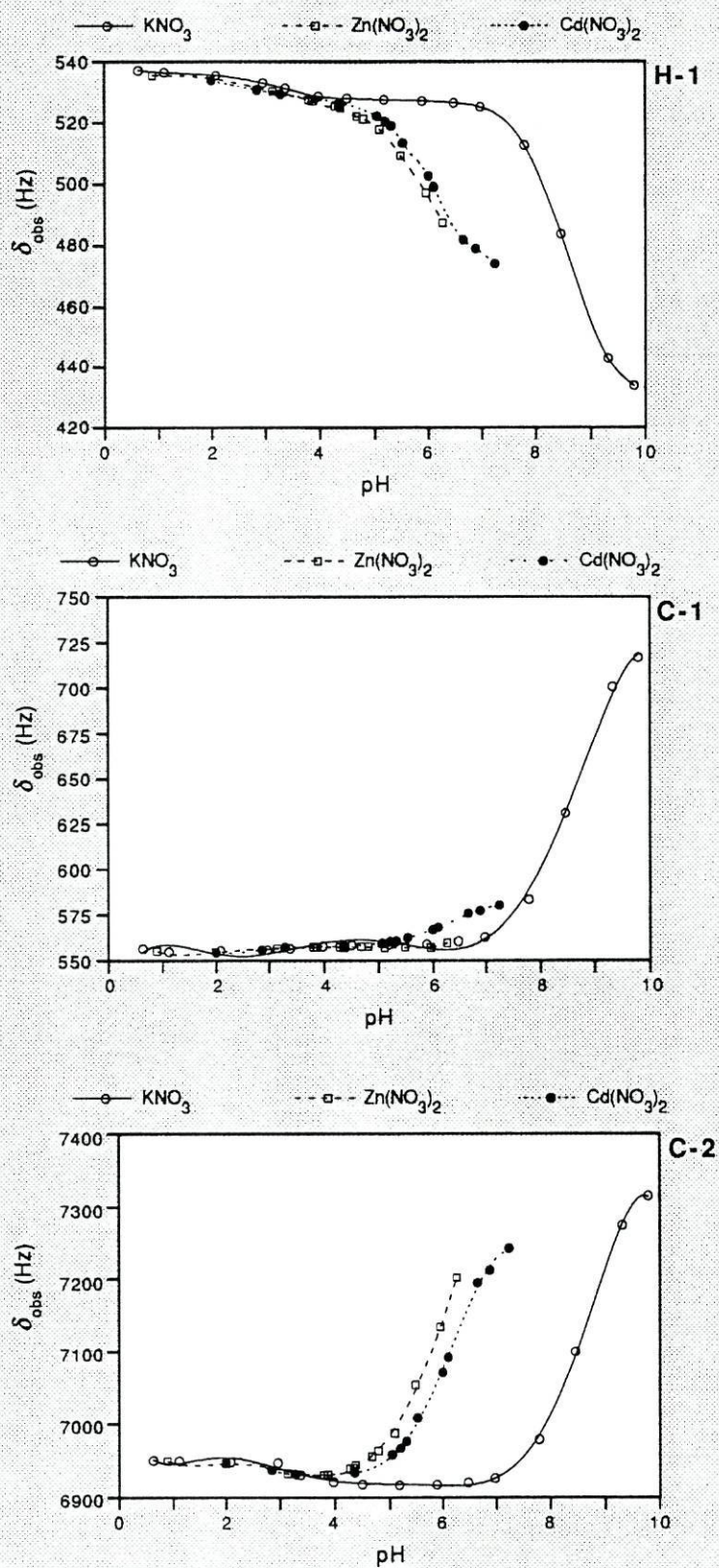


Figura 6.5 — Efeito do pH sobre os desvios da glicilglicina 0,2 M em soluções aquosas com nitrato de potássio, nitrato de zinco e nitrato de cádmio 0,2 M, para os núcleos H-1, C-1 e C-2.

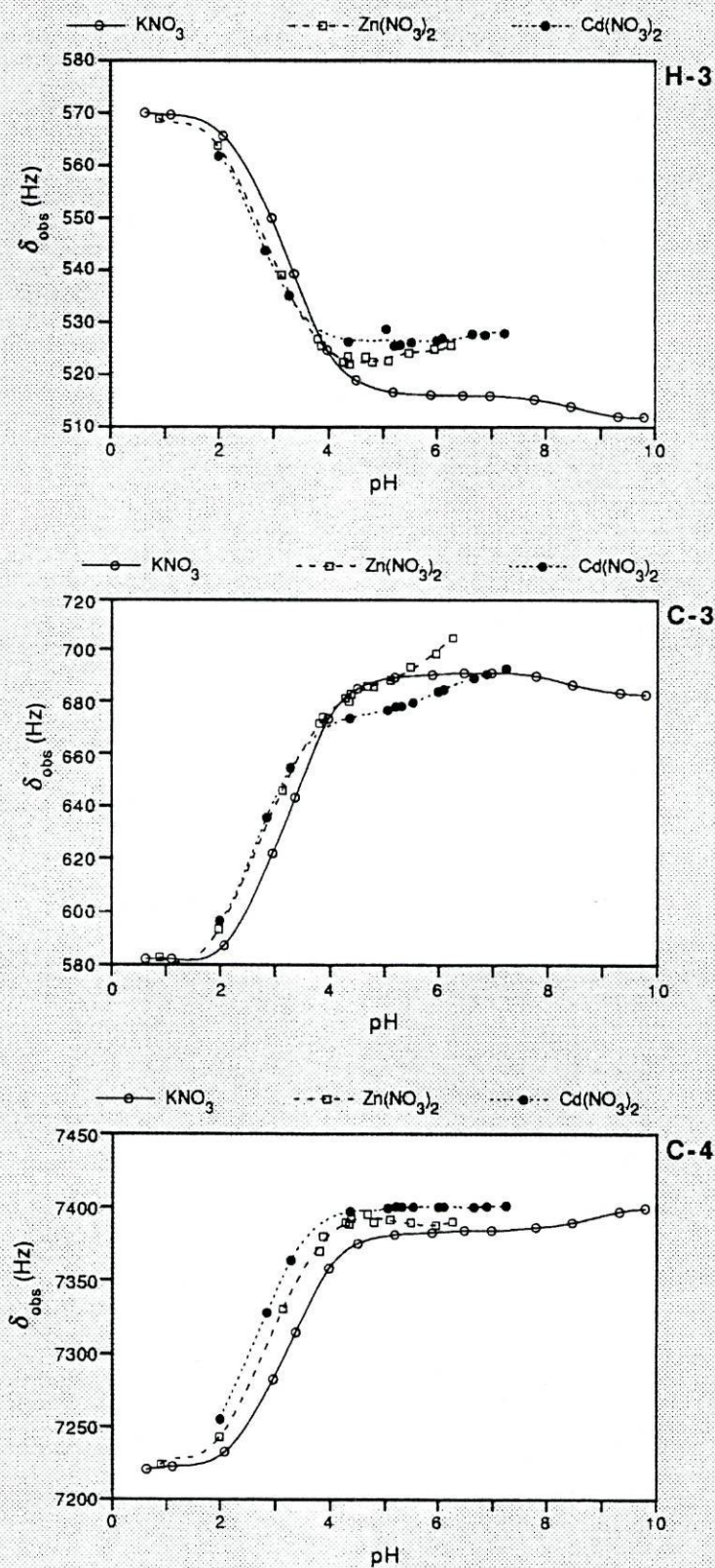
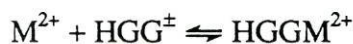


Figura 6.5 (cont.) — Efeito do pH sobre os desvios da glicilglicina 0,2 M em soluções aquosas com nitrato de potássio, nitrato de zinco e nitrato de cádmio 0,2 M, para os núcleos H-3, C-3 e C-4.

segunda protólise, o que permite prever uma constante maior para a coordenação ao grupo amina que ao grupo carboxílico. Os desvios de C-1 apresentam um comportamento invulgar uma vez que devia ser o núcleo mais sensível à coordenação no grupo amina; mas, pelo contrário, mostra desvios quase nulos até pH 6, relativamente aos desvios de referência, tanto para Zn^{2+} como para Cd^{2+} . Uma possível explicação para esta observação assume que o desvio de C-1 da glicilglicina coordenada por um catião metálico no grupo amina é muito semelhante ao desvio de C-1 para a glicilglicina não protonada no mesmo grupo o que implica que a coordenação do catião não provoque variações apreciáveis nos desvios químicos. A quase sobreposição dos desvios químicos causados pelos catiões zinco e cádmio com os desvios químicos do estado de referência não permitiu o cálculo de constantes para este núcleo.

Para simular estes resultados experimentais foram usados modelos constituídos por subconjuntos do seguinte grupo de equações:



onde se assume a formação de duas espécies de complexos em solução: MGG^{+} (coordenação em $-NH_2$), com constante de equilíbrio

$$K_N = [MGG^{+}] / ([M^{2+}] [GG^{-}]),$$

e $HGGM^{2+}$ (coordenação em $-COO^{-}$), com constante de equilíbrio

$$K_O = [HGGM^{2+}] / ([M^{2+}] [HGG^{\pm}]).$$

A possibilidade de coordenação simultânea de dois iões metálicos às duas posições de coordenação da glicilglicina não mostrou constituir um melhoramento ao modelo uma vez que não se obteve um valor inequívoco para a constante de tal equilíbrio; para além disso, a consideração desse equilíbrio nos modelos não provocou alteração nos valores calculados para K_O e K_N . Pela mesma razão não se considerou a coordenação simultânea de duas moléculas de glicilglicina por um único catião metálico. Estes resultados não significam que estas espécies não existam em solução mas apenas que, nas condições experimentais usadas, não se formaram em concentrações

suficientemente elevadas para contribuírem de forma significativa para os desvios químicos observados.

O núcleo C-1 não apresenta, como já foi referido, desvios relativamente ao estado de referência que permitam a sua inclusão na execução dos cálculos. Os núcleos H-1 e C-2 são sobretudo sensíveis à coordenação em $-NH_2$ e por isso os seus desvios foram simulados com um modelo contendo apenas as equações correspondentes às constantes K_N e K_{a_2} , usando os pontos em que pH é superior a 4. Isto corresponde a usar a seguinte equação de desvio químico para esses núcleos da glicilglicina:

$$\Delta_{obs}^i = ([GG^-]/GG_t) \Delta_{GG^-}^i + ([HGG^\pm]/GG_t) \Delta_{HGG^\pm}^i + ([MGG^+]/GG_t) \Delta_{MGG^+}^i \quad (6.3)$$

O núcleo C-3 permitiu calcular simultaneamente K_N e K_O devido à sua posição intermédia na molécula que o torna sensível à coordenação em ambos os extremos. Como no caso de C-3 se usou todo o intervalo de pH disponível, foram incluídos no modelo os equilíbrios de protonação para os dois grupos extremos:

$$\Delta_{obs}^i = ([GG^-]/GG_t) \Delta_{GG^-}^i + ([HGG^\pm]/GG_t) \Delta_{HGG^\pm}^i + ([HGGH^+]/GG_t) \Delta_{HGGH^+}^i + ([HGGM^{2+}]/GG_t) \Delta_{HGGM^{2+}}^i + ([MGG^+]/GG_t) \Delta_{MGG^+}^i \quad (6.4)$$

O núcleo de C-4 é sobretudo sensível à coordenação no grupo carboxílico e por essa razão foram usados para a simulação unicamente os pontos experimentais obtidos a pH menor que 4 e os equilíbrios de K_O e K_{a_1} . Para este núcleo, na zona de pH referida, foi usada a seguinte equação de desvio químico:

$$\Delta_{obs}^i = ([HGG^\pm]/GG_t) \Delta_{HGG^\pm}^i + ([HGGH^+]/GG_t) \Delta_{HGGH^+}^i + ([HGGM^{2+}]/GG_t) \Delta_{HGGM^{2+}}^i \quad (6.5)$$

Ao contrário do observado para C-3, para o núcleo de H-3 não foi possível encontrar um ajuste bom com os dois equilíbrios de coordenação e por isso o cálculo foi executado nas condições usadas para o núcleo de C-4 (equação 6.5).

Na Tabela 6.4 estão sumarizados os valores obtidos para as constantes de estabilidade K_O e K_N , com valores médios de, respectivamente, $0,74 \pm 0,16$ e $3,47 \pm 0,45$ para o catião zinco e de $1,18 \pm 0,10$ e $2,89 \pm 0,17$ para o catião cádmio. Os desvios dos núcleos de hidrogénio permitiram calcular valores que estão de

acordo com os valores publicados por Rabenstein e Libich utilizando RMN de ^1H [73], nomeadamente no caso do nitrato de zinco. Por outro lado, os valores de K_{O} e K_{N} fornecidos pelos núcleos de ^{13}C neste trabalho estão mais de acordo com os resultados obtidos por potenciometria [88,93,105] a força iónica mais baixa que a usada neste trabalho que é de aproximadamente 0,7 M. Os valores obtidos a partir dos espectros de ^{13}C são sistematicamente maiores que os obtidos dos espectros de ^1H , tanto no caso do zinco como no do cádmio, embora a diferença seja mais acentuada no valor da constante K_{N} para o zinco. Os valores desta constante mostraram ser bastante sensíveis a variação no valor da constante de acidez usado nos cálculos, o que pode ser uma explicação para a sua dispersão. A utilização de um valor de constante de acidez único para todos os núcleos apenas acentuou as diferenças entre os valores de K_{N} calculados para cada núcleo. Se por um lado a constante de acidez deva ter um só valor, deve ser no entanto considerado que o estado de referência não inclui somente os efeitos nos desvios químicos relativos à coordenação do próton em $-\text{NH}_2$ mas também outros efeitos, como o da força iónica, cuja influência se traduz numa alteração do valor calculado para o $\text{p}K_{\text{a}}$ de cada núcleo.

Equação	Núcleo	Zn^{2+}		Cd^{2+}	
		$\log K_{\text{O}}$	$\log K_{\text{N}}$	$\log K_{\text{O}}$	$\log K_{\text{N}}$
6.3	H-1	—	3,02	—	2,73
6.5	H-3	0,64	—	1,08	—
—	C-1	—	—	—	—
6.3	C-2	—	3,81	—	3,05
6.4	C-3	0,90	3,58	1,26	2,90
6.5	C-4	0,67	—	1,19	—
Referência					
[73] ¹	—	$0,64 \pm 0,24$	$3,13 \pm 0,09$	$1,04 \pm 0,18$	$2,76 \pm 0,17$
[105] ²	—	—	3,43	—	2,95
[93] ³	—	—	$3,40 \pm 0,04$	—	$3,02 \pm 0,05$
[88] ⁴	—	—	$3,44 \pm 0,01$	—	$2,90 \pm 0,05$

¹RMN; $\mu=0,6$ M; ²Potenciometria; $\mu=0,15$ M; ³Potenciometria; $\mu=0,15$ M; ⁴Potenciometria; $\mu=0,15$ M

Tabela 6.4 — Valores das constantes de equilíbrio para a coordenação dos cationes cádmio e zinco aos grupos carboxílico (K_{O}) e amina (K_{N}) da glicilglicina; valores da literatura para essas constantes.

Os valores das constantes K_O são pouco sensíveis à variação do valor de pK_{a1} , e são bastante mais pequenos que K_N , como era esperado. Ao contrário do que acontece com K_N , onde o zinco mostra maior tendência de coordenação que o cádmio, os valores de K_O são ligeiramente maiores no caso do cádmio que no caso do zinco. Mesmo neste caso a diferença é relativamente pequena e os dois cátions comportam-se de forma muito semelhante relativamente à glicilglicina.

3. Constantes de estabilidade para os complexos mistos de Zn^{2+} e Cd^{2+} com glicilglicina e citidina

A EXISTÊNCIA DO COMPLEXO ternário misto citidina/ Zn^{2+} /glicilglicina foi proposta por Li *et al.* [79] com base na diferença dos desvios químicos do próton H-5 da citidina observada entre soluções de citidina ($0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) e cloreto de zinco ($0,6 \text{ mol dm}^{-3}$), na presença e na ausência de glicilglicina ($0,2 \text{ mol dm}^{-3}$). Estes autores observaram a) que a constante de estabilidade do complexo de glicilglicina com zinco, medida potenciométricamente, tinha o mesmo valor na presença e na ausência de citidina em solução, e b) que os desvios químicos do núcleo H-5 da citidina, em soluções com concentração variável de $ZnCl_2$ e pH fixo (foram executadas diferentes experiências entre pH 4,7 e pH 5,3) são sempre maiores quando a glicilglicina está presente em solução. Com base nestas observações concluíram que, em soluções equimolares de citidina e glicilglicina, só existe o complexo ternário.

Como foi mostrado na secção anterior, a constante de estabilidade da citidina com o catião zinco é tão pequena que é pouco provável que seja possível detectar o seu efeito sobre o valor calculado para a constante de estabilidade do zinco com a glicilglicina, que, como já foi mostrado atrás, é três ordens de grandeza superior. Por outro lado, o desvio químico do núcleo H-5 depende não só da concentração de iões mas também do pH da solução. Na Figura 6.6 são mostrados os desvios químicos do núcleo de H-5 para soluções contendo concentração variável de $Zn(NO_3)_2$ ou de $ZnCl_2$, com citidina $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ ou com citidina $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ e glicilglicina na mesma concentração, a pH 5 e a pH 6. A pH 5 os desvios químicos de H-5 são maiores no caso do sistema misto do que para o sistema binário, tanto para o cloreto de zinco como para o nitrato de zinco; no entanto a pH 6, com a citidina praticamente

desprotonada em N-3, os desvios químicos de H-5 nas soluções com cloretos são maiores no caso do complexo binário que no caso do complexo misto. Para o nitrato, no entanto, a tendência mantém-se para os dois valores de pH o que permite concluir que a diferença de comportamento é causada pelo anião. Uma possível explicação para esta observação reside na hipótese de que a quantidade de ião cloreto livre para a formação do quelato invertido com a citidina aumenta com a presença de glicilglicina em solução que, ao coordenar-se ao zinco em grande extensão, provoca uma diminuição da quantidade de pares iônicos Zn^{2+}/Cl^- em solução, favorecendo a associação do anião cloreto à região (H-5)- NH_2 da citidina.

O exposto atrás mostra que o cálculo da constante de estabilidade do complexo misto deve ser executado com base nos desvios químicos da citidina e não nos da glicilglicina. Por outro lado, o controlo do pH das soluções é também, como seria de esperar, importante para a definição do modelo a aplicar, dada a existência de um equilíbrio entre o catião H^+ e a citidina. O anião nitrato, como mostrado anteriormente e como referido na literatura [97], tem uma reduzida influência sobre os desvios químicos da citidina e por isso foi seleccionado para as experiências em que se tentou obter um valor para a constante de estabilidade dos complexos mistos com

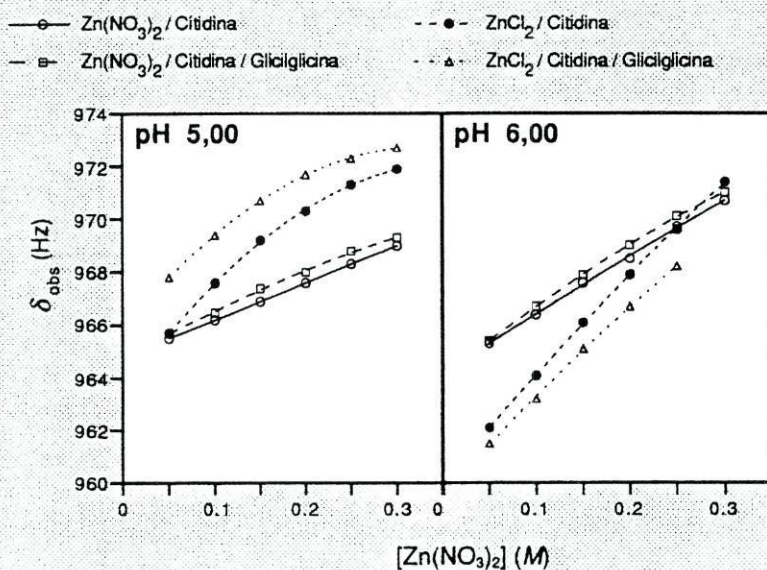


Figura 6.6 — Desvios químicos em solução aquosa do núcleo de H-5 da citidina: 0,1 M, em experiências com e sem glicilglicina 0,2 M, obtidos por variação da concentração dos sais $Zn(NO_3)_2$ e $ZnCl_2$ 0,2 M a a) pH 5,00 e b) pH 6,00.

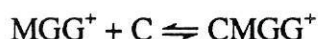
Zn^{2+} e Cd^{2+} . Nas duas secções seguintes irá ser apresentado o cálculo das constantes de estabilidade dos complexos mistos de citidina e glicilglicina com Zn^{2+} e Cd^{2+} pelos métodos de pH variável e pH fixo.

3.1 Variação do desvio químico em função da concentração de catião metálico (pH fixo)

PARA O CÁLCULO DE CONSTANTES de estabilidade de complexos mistos de citidina e glicilglicina com os catiões Zn^{2+} e Cd^{2+} pelo método de pH fixo, partiu-se de soluções com concentrações iguais às utilizadas para o cálculo de K_{11} para a associação catião metálico/citidina (ver secção 6.1.1) mas com uma concentração de glicilglicina igual à de sal de nitrato de zinco ou nitrato de cádmio. Os desvios químicos de referência foram obtidos a partir dos espectros de soluções com concentração de $Ca(NO_3)_2$ 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mol dm^{-3} e concentração de citidina 0,10 mol dm^{-3} (Figura 6.1), com *tert*-butanol como referência interna. Embora o catião cálcio mostre uma pequena tendência para coordenar à citidina em DMSO [114] é de esperar que em água ocorra em reduzida extensão já que a solvatação do catião é maior [97]. O valor de pH escolhido para estas experiências foi o utilizado para o estudo dos complexos binários: $6,15 \pm 0,05$.

Com o objectivo de simplificar o modelo a aplicar no cálculo das constantes de estabilidade dos complexos mistos pelo método de variação de concentração de catião metálico foram feitas algumas aproximações, justificadas com base no valor de pH das experiências e nos diferentes valores das constantes de estabilidade dos complexos binários: a) a pH 6,15 tanto o catião zinco como o catião cádmio estão coordenados ao grupo amina da glicilglicina numa extensão superior a 85%, de acordo com as constantes apresentadas na secção anterior para essa associação, o que permite considerar a aproximação de que todos os catiões metálicos se encontram coordenados à glicilglicina; b) a quantidade de citidina coordenada a catiões não complexados com a glicilglicina é muito pequena, como pode ser inferido dos baixos valores das respectivas constantes de formação, o que torna possível não incluir este equilíbrio de complexação no modelo; e c) foi considerado que o complexo ternário em que o catião metálico se liga à glicilglicina através do grupo carboxílico não existe em solução, o que é justificado com base na pequena constante de estabilidade

desse complexo binário relativamente à constante da formação do complexo através do grupo amina. Assim, o modelo fica apenas constituído pelo equilíbrio da formação do complexo ternário misto $CMGG^+$:



com constante de equilíbrio K_m^N , onde o índice m indica que a constante se refere a um complexo ternário misto e o índice N indica que o catião metálico se encontra ligado à glicilglicina através do seu grupo amina. Este modelo é análogo à formação de um complexo 1:1, que está na base da equação 6.1, e é aplicável aos dados experimentais obtidos em experiências em que se varia a concentração de catião metálico, aqui considerado como o complexo MGG^+ .

Pelas razões já discutidas anteriormente para complexos binários, os desvios químicos observados para as soluções com complexos mistos foram subtraídos dos desvios químicos das soluções de referência (já mencionadas no início desta secção); os desvios diferença, nos quais foram baseados os cálculos de K_m^N , são apresentados nos gráficos da Figura 6.7 para os núcleos de 1H e ^{13}C da região da base da citidina. É possível observar que todos os núcleos apresentam desvios maiores quando a glicilglicina está presente em solução, tanto no caso do zinco como no caso do cádmio, com a maior diferença observada para C-4.

A utilização de nitrato de cálcio nas soluções de referência utilizadas para o cálculo das constantes de complexos mistos, impediu que nelas fosse incluída a glicilglicina, devido à coordenação daquele catião ao dipeptídeo. Os resultados obtidos utilizando os desvios químicos de soluções de nitrato de potássio e citidina como referência (sem glicilglicina) foram de pior qualidade em termos da dispersão dos valores obtidos. É importante notar que, para soluções com a mesma força iónica e o mesmo anião, a concentração de catiões metálicos é duas vezes maior nas soluções de sais de potássio do que em soluções de catiões bivalentes, o que introduz uma diferença adicional entre o estado de referência e as soluções que contêm o sistema a estudar. A presença de glicilglicina nas soluções de referência, embora formalmente requerida, não é essencial pois, como já foi referido, aquele dipeptídeo não influencia os desvios químicos da citidina (secção 5.1.3).

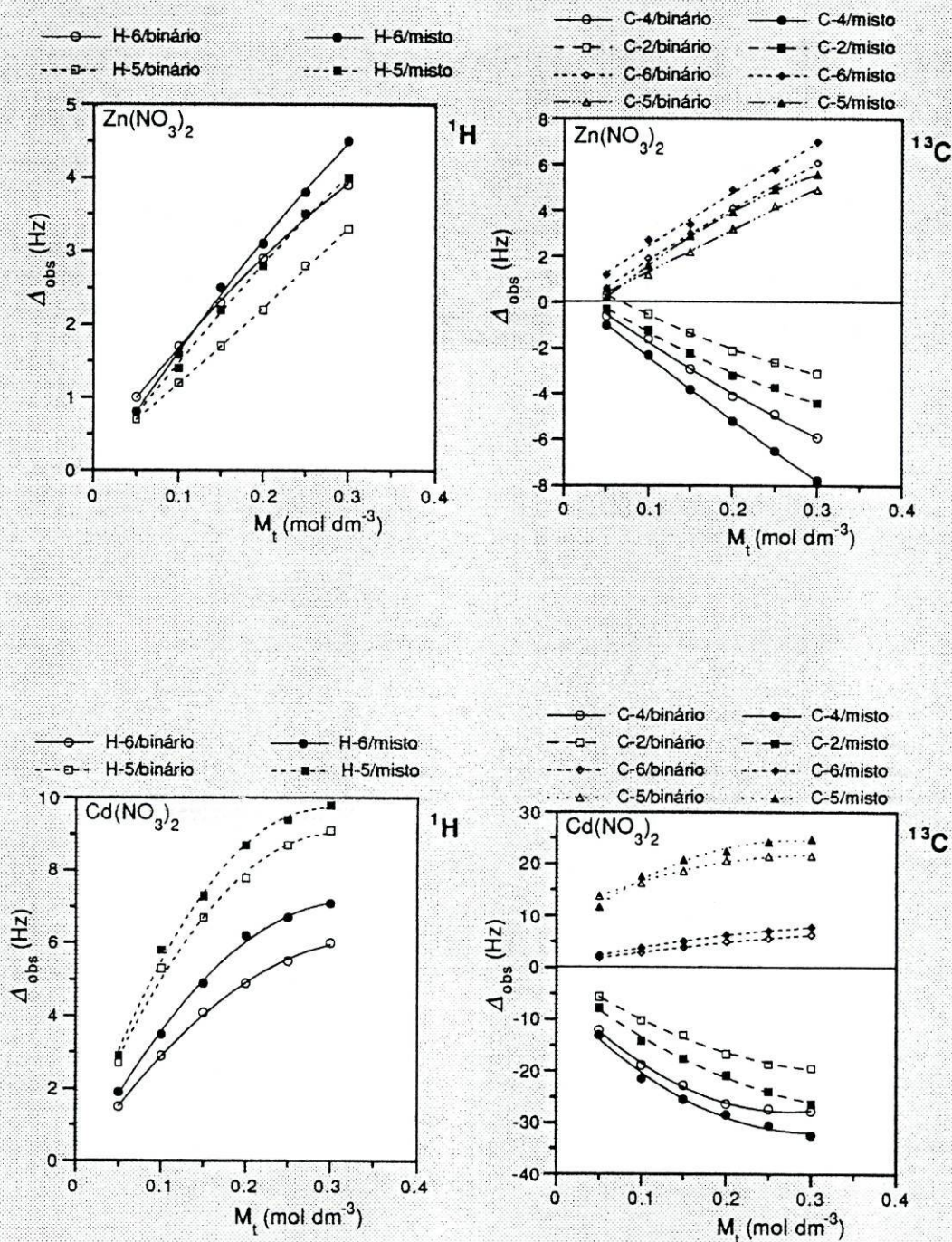


Figura 6.7 — Desvios químicos da citidina em soluções de sistemas binários iguais aos apresentados na Figura 6.1 e em soluções de sistemas ternários com citidina 0,1 M, nitrato de zinco ou nitrato de cádmio em concentração variável e glicilglicina na mesma concentração que os cátions metálicos, a pH 6,15 e tendo como referência interna *tert*-butanol. Os desvios químicos apresentados são relativos às soluções de referência mencionadas no texto, compostas por citidina e nitrato de cálcio (ver Figura 6.1).

Na Tabela 6.5 estão apresentados os valores obtidos para as constantes de associação dos complexos binários e ternários mistos. Verifica-se que as constantes calculadas para os complexos mistos com catião zinco são maiores que as dos complexos binários em todos os núcleos. Para este catião obteve-se uma média de $2,2 \pm 0,8$ enquanto que para o cádmio se obteve um valor médio pouco superior ao do complexo binário, $10,8 \pm 4,0 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Resultados semelhantes, embora com maior dispersão de valores, foram obtidos usando como referência os desvios químicos de soluções contendo KNO_3 , citidina e glicilglicina.

Com a exceção dos núcleos C-2 e C-6, para os quais as constantes calculadas foram menores que as dos binários (os gráficos apresentam maiores desvios químicos, menor curvatura e maior desvio limite, ver Figura 6.7), todos os outros núcleos forneceram valores maiores para o complexo ternário com catião cádmio. A dispersão dos resultados é mais elevada para o caso dos complexos ternários que para o caso dos binários devido, provavelmente, à dificuldade de obter um bom estado de referência quando a quantidade de espécies em solução é maior.

Cooperatividade na formação dos complexos ternários

Uma forma de medir o grau de cooperatividade na formação de complexos ternários consiste em usar o método de $\Delta \log K$, no qual é comparada a diferença entre os logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos binários e dos complexos

Núcleo	Zn^{2+}		Cd^{2+}	
	K_{11}	K_m^N	K_{11}	K_m^N
H-5	0,87	1,37	8,7	13,1
H-6	0,79	2,79	11,5	11,9
C-2	0,50	2,95	7,0	6,6
C-4	0,52	1,42	11,0	12,9
C-5	0,75	2,75	12,5	13,2
C-6	0,47	1,77	8,0	7,2
Média	0,65	2,2	9,8	10,8

Tabela 6.5 — Constantes de estabilidade calculadas pelo método de variação de concentração de catião metálico para os complexos binários (K_{11}) e ternários mistos (K_m^N) de citidina e glicilglicina com zinco e cádmio (nitratos), obtidas para cada núcleo da região base da citidina.

ternários, com um valor crítico deduzido estatisticamente a partir dos potenciais locais de coordenação dos catiões metálicos e dos ligandos [116]. Este método é referido na primeira parte desta tese em mais pormenor, secção 3.1. A Tabela 6.6 mostra as hipóteses teóricas para os casos em estudo em que os ligandos são a glicilglicina e a citidina. Assume-se um número de coordenação de quatro para o zinco, tal como se verifica em muitos complexos com nucleosídeos e seus derivados, e de seis para o cádmio [117]. Como já foi referido, tanto a citidina como a glicilglicina podem ter características ambidentadas na coordenação a catiões metálicos e esse facto também foi considerado na elaboração dos valores de $\Delta \log K$ teóricos da Tabela 6.6.

Para o caso do zinco temos que $\log K_{11} = -0,20 \pm 0,15$ e $\log K_m^N = 0,32 \pm 0,20$, o que permite calcular um valor experimental para $\Delta \log K$ de $0,52 \pm 0,35$, onde os erros das duas parcelas foram somados para obter o erro do resultado. Analogamente, para o cádmio temos que $\log K_{11} = 0,98 \pm 0,15$ e $\log K_m^N = 1,02 \pm 0,20$ donde se obtém $\Delta \log K = 0,04 \pm 0,35$. A comparação dos $\Delta \log K$ teóricos e experimentais permite

a)

ligando		geometria	proporção	$\Delta \log K$
A	B			
bi	bi	Tetraédrica	1/6	-0,78
bi	bi	Quadrada	1/4	-0,60
bi	mono	Tetraédrica	2/6	-0,48
bi	mono	Quadrada	2/4	-0,30
mono	mono	Tetraédrica	3/4	-0,12
mono	mono	Tetraédrica	3/4	-0,12

b)

ligando		geometria	proporção	$\Delta \log K$
A	B			
bi	bi	Octaédrica	5/12	-0,38
bi	mono	Octaédrica	4/12	-0,48
mono	mono	Octaédrica	5/6	-0,08

Tabela 6.6 — Valores teóricos de $\Delta \log K$ para vários casos de complexos ternários formados por dois ligandos A e B; a) Número de coordenação 4; geometria tetraédrica ou quadrada; b) Número de coordenação 6; geometria octaédrica. *bi* - ligando bidentado, *mono* - ligando monodentado.

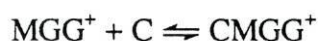
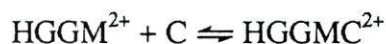
concluir que de facto a formação do complexo ternário é favorecida no caso do catião zinco, cujo valor de $\Delta \log K$ experimental é superior a qualquer um dos teóricos. Por outro lado, no caso do cádmio essa conclusão não é tão óbvia devido ao erro que afecta o seu valor de $\Delta \log K$. No limite inferior, este parâmetro toma o valor de -0,31 e, nesse caso, apenas se ambos os ligandos forem monodentados não se verifica a presença de cooperatividade.

3.2 Variação do desvio químico em função do pH

NAS EXPERIÊNCIAS CUJOS RESULTADOS vão ser seguidamente apresentados foi usado o método da variação da concentração de pH para determinar as constantes de estabilidade dos complexos mistos de citidina e glicilglicina com zinco e cádmio.

Para este estudo foram usadas soluções com um valor de pH entre 4,9 e 7,5 para o nitrato de zinco e entre 4,4 e 7,4 para o nitrato de cádmio, devido a problemas de precipitação fora destes limites. As concentrações usadas foram $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ para os sais de zinco ou cádmio, $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ para a citidina e $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ para a glicilglicina. Na Figura 6.8 são comparados os desvios químicos dos núcleos de H-5, C-4 e C-5 da citidina nestas soluções com os desvios químicos da citidina em sistemas binários nitrato de zinco/citidina e nitrato de cádmio/citidina, com as concentrações referidas em 6.1.2, e com os desvios químicos da citidina no estado de referência, que é idêntico ao usado para o estudo dos complexos binários por variação do pH. Tal como para os sistemas binários, os desvios químicos do núcleo de C-2, para as três curvas apresentadas nos gráficos da Figura 6.8, seguem o mesmo padrão de variação que os de C-4 e os desvios químicos de C-6 e H-6 seguem o padrão de variação de H-5.

Pretendeu-se assim calcular as constantes de estabilidade K_m^O e K_m^N definidas respectivamente pelos seguintes equilíbrios:



em que HGGMC^{2+} , com constante de formação K_m^O , é a espécie mista em que o catião se encontra coordenado ao grupo carboxílico da glicilglicina. Como já foi referido, a grande diferença entre as constantes de estabilidade para os complexos

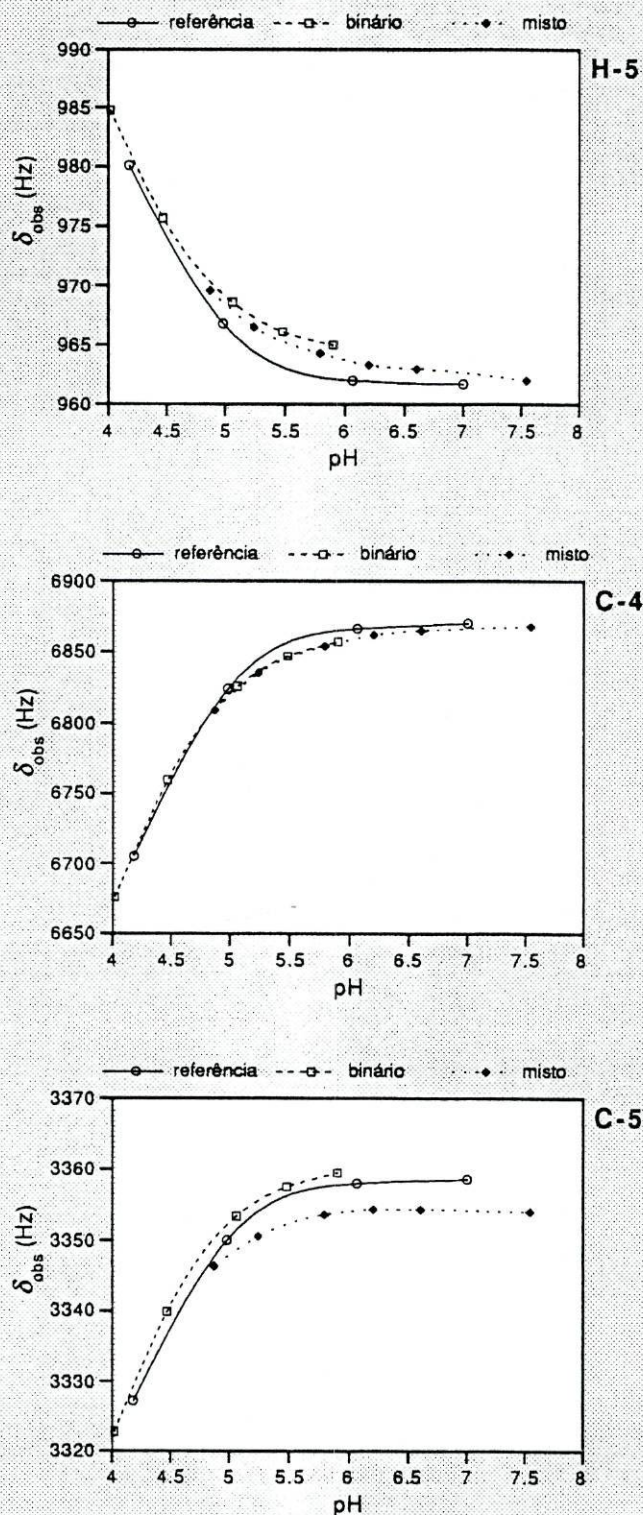


Figura 6.8(a) — Efeito do pH sobre os desvios químicos da citidina 0,1 M em soluções aquosas com nitrato de zinco 0,2 M (sistema binário) e com nitrato de zinco 0,2 M e glicilglicina 0,2 M (sistema ternário); referência interna: *tert*-butanol. Os desvios de referência são de soluções de citidina 0,1 M e nitrato de cálcio 0,2 M.

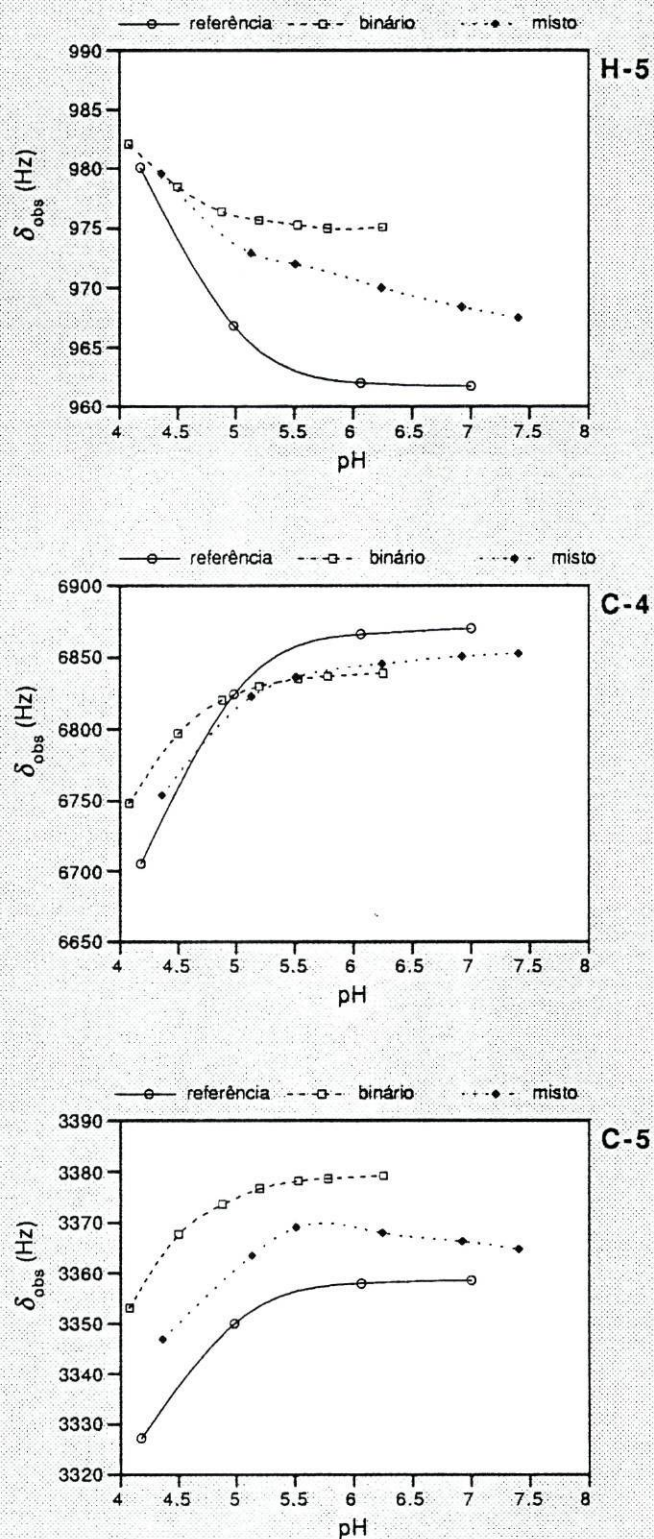


Figura 6.8(b) — Efeito do pH sobre os desvios químicos da citidina 0,1 M em soluções aquosas com nitrato de cádmio 0,2 M (sistema binário) e com nitrato de cádmio 0,2 M e glicilglicina 0,2 M (sistema ternário); referência interna: *tert*-butanol. Os desvios de referência são de soluções de citidina 0,1 M e nitrato de cálcio 0,2 M.

binários de zinco ou cádmio com glicilglicina e com citidina impede que sejam detectadas alterações nos valores das constantes de complexação da glicilglicina ao catião zinco e ao catião cádmio devidos à presença em solução de citidina. Por essa razão, o cálculo das constantes de estabilidade dos complexos mistos foi executado apenas com base nos desvios da citidina.

A espécie $HGGMC^{2+}$ só poderá existir a pH inferior a 3, devido à diferença entre as constantes de coordenação de ambos os catiões aos dois extremos da glicilglicina. Como o intervalo de pH disponível para o sistema misto é superior a esse valor, foi apenas considerado o equilíbrio caracterizado por K_m^N . O modelo fica completo com as equações correspondentes às constantes de acidez da citidina e da glicilglicina e com as equações de formação dos complexos binários, já definidas atrás, cujos parâmetros são conhecidos (ver as Tabelas 6.3 e 6.4). Nos cálculos baseados nos desvios químicos de núcleos para os quais não foi possível calcular a constante K_O ou K_N , o valor introduzido para essas constantes foi a média calculada a partir dos valores apresentados na Tabela 6.4 para este trabalho. Os valores das constantes de acidez e respectivos desvios limites da citidina e da glicilglicina utilizados para os cálculos são os que constam na Tabela 5.3 e 6.4.

Na Tabela 6.7 são apresentados os logaritmos dos valores médios obtidos para as constantes K_m^N e os respectivos intervalos da dispersão dos valores obtidos para cada núcleo. São também apresentados para comparação os logaritmos do valor médio de K_{11} obtido nas experiências de pH variável bem como os valores de $\Delta \log K$. É patente que o resultado obtido é muito semelhante ao das experiências da secção anterior (pH fixo), e indica uma marcada cooperatividade na formação do complexo de zinco e aponta para uma menor cooperatividade no caso da formação complexo

	Zn ²⁺	Cd ²⁺
log K_{11}	-0,42±0,11	1,07±0,05
log K_m^N	0,54±0,20	1,09±0,30
$\Delta \log K$	0,96±0,30	0,02±0,35

Tabela 6.7 —Logaritmo das constantes de estabilidade calculadas para a formação dos complexos binários (citidina), K_{11} , e ternários mistos (citidina e glicilglicina), K_m^N , com catião zinco e catião cádmio (nitratos), pelo método da variação do pH; valores experimentais de $\Delta \log K$.

ternário de cádmio. Dados potenciométricos para a constante de estabilidade destes catiões fornecem um resultado idêntico ao obtido neste trabalho por RMN [93].

É de notar que o método de variação de pH não proporcionou uma dispersão de valores melhor que a obtida pelo método de pH fixo, embora a média dos valores das constantes seja semelhante. É provável que este resultado seja uma consequência de ter sido considerado um modelo relativamente complicado (todos os equilíbrios de acidez e de complexação para complexos binários para a citidina e a glicilglicina), exigindo a utilização de muitos parâmetros conhecidos (calculados previamente) mas também afectados por um erro experimental que por vezes pode ser elevado.

4. Conclusão

OS RESULTADOS OBTIDOS nas experiências com variação da concentração de catião metálico mostraram resultados muito idênticos àqueles que se obtiveram por variação do pH das soluções, o que foi conseguido usando como referência os desvios químicos de sistemas com força iónica e concentração de aniões iguais aos das soluções em estudo. Tanto o papel da força iónica como dos aniões pôde ser posto em foco, tendo um peso importante sobre os desvios químicos da citidina. Mesmo assim, nem sempre foi possível obter um bom acordo entre os resultados fornecidos para alguns núcleos das moléculas estudadas, indicando a presença de factores variáveis de núcleo para núcleo que não foi possível controlar.

Este estudo demonstrou que os desvios químicos podem ser afectados por uma grande variedade de factores que é necessário controlar para ser possível obter resultados válidos para o cálculo de constantes de equilíbrio usando métodos de RMN. O método da variação da concentração de catião metálico (pH fixo) é em geral mais eficaz se as constantes tiverem um valor elevado ou se grandes concentrações de catião metálico poderem ser atingidas, como, por exemplo, em DMSO [85]. A grande variação da força iónica, devida à variação da concentração de sal metálico, constitui a maior desvantagem deste tipo de experiências. É no entanto um método muito sensível e capaz de fornecer o valor de constantes muito pequenas como, por exemplo, para o sistema Zn^{2+} / citidina.

Neste trabalho foi possível determinar a pequena constante de estabilidade de complexação Zn-citidina, tendo sido mesmo obtidos valores concordantes para essa constante por dois métodos diferentes. Algumas das constantes de estabilidade calculadas têm valores bastante baixos, sendo legítimo questionar se correspondem de facto à formação de um complexo ou simplesmente à ocorrência estatisticamente controlada de pares de contacto, onde colisões casuais provocam uma momentânea transferência de carga entre o catião (ou anião) inorgânico e o ligando biológico. Este tipo de influência foi detectado em espectros de ultravioleta utilizados para estudos de complexação [46] mas é fácil de prever que tal transferência de carga momentânea tenha efeitos a nível dos desvios químicos observados em espectros de RMN. Orgel e Mulliken [118] estudaram o caso do contacto aleatório bimolecular (1:1) entre duas espécies diferentes e concluíram que este tipo de "associação" não interfere no cálculo de constantes de equilíbrio utilizando os desvios químicos de RMN. É no entanto provável que esse tipo de interacção seja responsável pela influência da força iónica sobre os desvios químicos através de interacções fracas e deslocalizadas dos aniões (secção 6.1.1) e dos catiões (não coordenantes) sobre o ligando.

Como era esperado, dada a acumulação dos erros experimentais ao longo das experiências, os valores das constantes calculadas para a formação dos complexos mistos são mais imprecisos que os valores dos complexos binários e estes mais imprecisos que os valores das constantes de acidez, devido à sua interdependência. O cálculo simultâneo de todas as constantes exige a utilização de elevado poder de cálculo, para além de exigir uma grande quantidade de dados em diferentes condições, o que nem sempre é possível de atingir devido a condicionalismos experimentais, como as solubilidades, e que torna mais moroso o processo de computação dos resultados. Foi demonstrado, por exemplo, na determinação das constantes de estabilidade dos complexos mistos, que é por vezes vantajoso fazer simplificações ao modelo com base em condições experimentais criteriosamente escolhidas em lugar de aplicar modelos mais completos mas que contêm parâmetros cujo valor é afectado de um erro experimental significativo. Por outro lado, foi também possível concluir que não é lícito tirar conclusões sobre as grandezas das constantes de equilíbrio

apenas a partir da grandeza dos desvios químicos, como já foi tentado na literatura [79], uma vez que estes dependem não só dos desvios limite pertinentes mas também do estabelecimento de um correcto estado de referência.

Apesar das limitações foi possível detectar a presença de cooperatividade entre a citidina e a glicilglicina na formação do complexo ternário. Foi possível também demonstrar que a espectrometria de RMN permite, com igual facilidade, quer a determinação de constantes muito pequenas, quer muito grandes em espectros de equilíbrio rápido.

Mercúrio: formação de complexos com citidina e glicilglicina

NESTE CAPÍTULO SÃO APRESENTADOS OS RESULTADOS DO ESTUDO POR RMN DA QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DO CATIÃO MERCÚRIO(II) À GLICILGLICINA E À CITIDINA. PARA ALÉM DA RELEVÂNCIA QUE TEM O ESTUDO DA QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE MERCÚRIO A LIGANDOS DE INTERESSE BIOLÓGICO É TAMBÉM IMPORTANTE COMPARAR A COORDENAÇÃO DESTES CATIÃO COM A DOS CATIÕES Zn^{2+} E Cd^{2+} PARA OS LIGANDOS REFERIDOS E JÁ ESTUDADOS NO CAPÍTULO ANTERIOR. A POSSIBILIDADE DE ESCOLHER CONDIÇÕES DE CINÉTICA LENTA OU DE CINÉTICA RÁPIDA NA ESCALA DE TEMPO DO RMN, QUER PARA SISTEMAS BINÁRIOS NITRATO DE MERCÚRIO/GLICILGLICINA E NITRATO DE MERCÚRIO/CITIDINA, QUER PARA O SISTEMA TERNÁRIO NITRATO DE MERCÚRIO/GLICILGLICINA/CITIDINA, ATRAVÉS DO CONTROLO DA TEMPERATURA, DO pH E DA CONCENTRAÇÃO DE OUTRAS ESPÉCIES EM SOLUÇÃO, PERMITIU UM ESTUDO DETALHADO DA FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES MERCURADAS DOS LIGANDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS RESPECTIVOS ESPECTROS DE RMN.

DEVIDO À DEPENDÊNCIA DO DESVIO QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA COM A TEMPERATURA [119], NÃO FORAM INTERPRETADAS EM TERMOS DE CONCENTRAÇÕES (CÁLCULO DE CONSTANTES) AS VARIAÇÕES DE DESVIO QUÍMICO NAS EXPERIÊNCIAS COM TEMPERATURA VARIÁVEL. TAMBÉM COMO NOTA PRÉVIA DEVE SER REFERIDO QUE AS MEDIÇÕES DE VALORES DE pH OU pD MENORES QUE 3 FORAM REALIZADAS COM O SISTEMA DE MEDIÇÃO DE pH CALIBRADO COM OS TAMPÕES 1,00; 3,00 E 7,00 JÁ REFERIDOS NO CAPÍTULO 4.

1. Glicilglicina

DADOS CRISTALOGRAFICOS SOBRE A COORDENAÇÃO DA GLICILGLICINA AO CATIÃO METILMERCÚRIO MOSTRAM QUE, DEPENDENDO DA PROPORÇÃO ENTRE OS REAGENTES, OCORRE QUER FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE UMA MOLÉCULA DE METILMERCÚRIO E O GRUPO AMINA TERMINAL DA GLICILGLICINA, COM PROBABILIDADE DE FORMAÇÃO DE UM QUELATO ENVOLVENDO O ÁTOMO DE OXIGÊNIO

da ligação peptídica, quer ligação simultânea de duas moléculas de metilmercúrio a uma mesma molécula de glicilglicina através do grupo amina e do grupo carboxílico. No entanto, nunca foi encontrada evidência para o estabelecimento de ligação entre o ião metilmercúrio e o grupo carboxílico da glicilglicina em solução aquosa [120].

A aplicação de métodos de RMN e de potenciometria ao estudo de sistemas contendo mercúrio(II) e glicina em solução aquosa mostrou que este catião metálico tem tendência a formar complexos lineares (duas ligações colineares *sp* ou *sp + sd* [121]) com duas moléculas de glicina e com constantes de estabilidade elevadas; as moléculas de glicina estão coordenadas através do grupo amina e em nenhum caso foi detectada participação do grupo carboxílico [122,123]. Li *et al.* descreveram a formação de um complexo 1:1 em D₂O entre o catião Hg²⁺ e glicilglicina, coordenada pelo grupo amina e em que mais uma vez não foi encontrada evidência para a coordenação através dos átomos de oxigénio do grupo carboxílico [79].

Neste trabalho procurou-se determinar quais as espécies mais importantes presentes em soluções aquosas de nitrato de mercúrio(II) e glicilglicina e calcular as constantes de estabilidade dessas espécies, recorrendo à análise de espectros de RMN de ¹H e ¹³C, quer de equilíbrio lento, quer de equilíbrio rápido, obtidos num intervalo de pH alargado.

1.1 Estudo das espécies em solução

Em solução aquosa

Na Figura 7.1 estão representados os espectros de RMN de ¹H de a) uma solução pura de glicilglicina 0,20 mol dm⁻³ a 25°C a pH 1,3; e, também, os de uma solução aquosa de glicilglicina 0,10 mol dm⁻³ e Hg(NO₃)₂ 0,1 mol dm⁻³, a 25°C e b) pH 1,3 e (c) pH ≈ 0,5. No espectro de glicilglicina pura são visíveis na região de campo baixo sinais dos prótons do azoto peptídico (A) e do grupo amina (B) e em que áreas se encontram aproximadamente na razão de 1:3 como esperado para catião glicilglicínio. Contrariamente ao observado para os catiões Zn²⁺, Cd²⁺ e H⁺, os espectros obtidos para soluções de glicilglicina/Hg²⁺ nas condições referidas em b) são também de permuta lenta, e é patente o desdobramento de todos os sinais do espectro (à semelhança do que acontece em soluções de Hg(NO₃)₂ e glicina [123]),

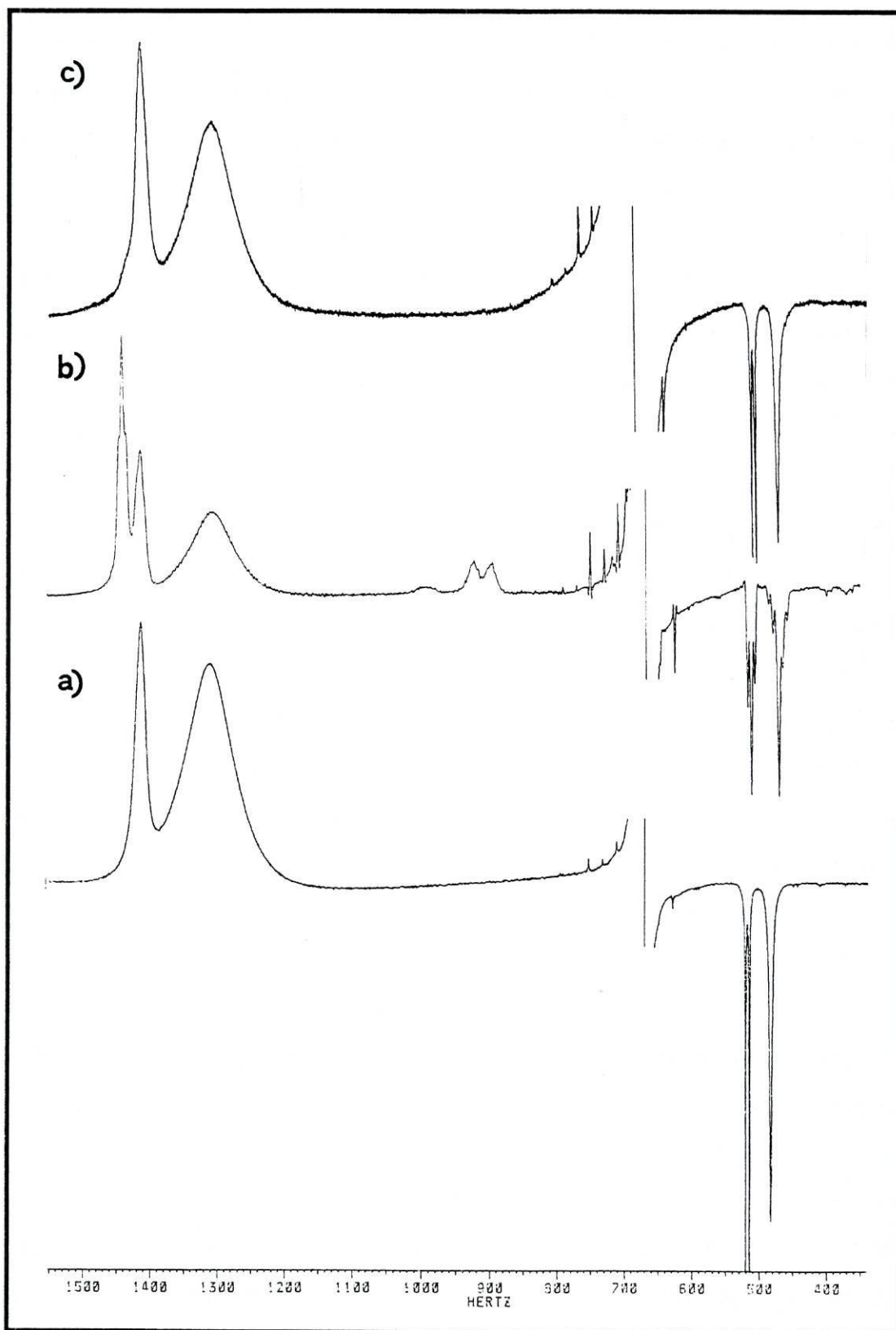


Figura 7.1 — Espectros de glicilglicina obtidos em H₂O com excitação selectiva; desvios químicos em Hertz relativamente a *tert*-butanol. (a) 0,2 M glicilglicina, pH = 1,3; (b) 0,1 M glicilglicina, 0,1 M Hg(NO₃)₂, pH = 1,3; (c) 0,1 M glicilglicina, 0,1 M Hg(NO₃)₂, pH ≈ 0,5.

pelo que estes espectros de permuta lenta fornecem informação sobre as espécies presentes em solução a pH ácido e provam a existência de complexos mercurados de glicilglicina. É importante, no entanto, referir que os espectros de soluções de glicilglicina/nitrato de mercúrio a 25°C e a pH menor que 0,8 são idênticos aos de soluções puras de glicilglicina, em que se observam apenas os sinais da glicilglicina livre (não coordenada a mercúrio mas quase totalmente protonada), deixando de se observar os sinais que pertencem a espécies coordenadas ao catião mercúrio [Fig.7.1(c)], devido ao aumento de concentração de H^+ que vai deslocar o catião Hg^{2+} , fruto da sua competição para as mesmas posições de coordenação.

O valor de pH a que ocorre a transição de equilíbrio rápido para equilíbrio lento na escala de tempo de RMN, para uma temperatura de 25 °C e para soluções aquosas de equimolares de glicilglicina/ $Hg^{2+} \approx 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$, está situado entre 2 e 3 e depende, para cada núcleo em observação, da diferença entre os desvios químicos para as diferentes espécies em equilíbrio e das suas concentrações e tem origem na diminuição da quantidade de glicilglicina desprotonada devida ao aumento da concentração do catião H^+ [123]. A transição entre regimes de equilíbrio rápido e de equilíbrio lento também pode ser provocada, no caso em análise, por diminuição da temperatura de 25 °C para $\approx 1^\circ\text{C}$, como se documenta na Figura 7.2 para os espectros de ^1H e ^{13}C , em que mesmo para um pH maior que 3 e uma razão molar glicilglicina/ Hg^{2+} maior do que um, é observado um regime de equilíbrio lento. No espectro de ^1H , a separação dos sinais do átomo de hidrogénio da ligação peptídica e dos sinais do grupo amina é já visível, devido à diferença dos seus desvios químicos, enquanto que isso ainda não se observa para H-1 e H-3; note-se também o desaparecimento do sinal do grupo amina a valores de pH superiores a ≈ 4 devido à cinética de permuta de catiões H^+ com a água. No espectro de ^{13}C a 25° C apenas é possível detectar um banda por átomo de carbono, embora com ligeiro alargamento de alguns sinais, enquanto que a 1 °C algumas bandas apresentam-se desdobradas e em que os sinais do núcleo do carbono C-2 constituem o caso mais nítido.

A dependência com o pH dos espectros obtidos a 25 °C e nas condições experimentais descritas está representada na Figura 7.3 e pode ser sumariada da seguinte forma: a) para valores de pH maiores que 3 o espectro da glicilglicina

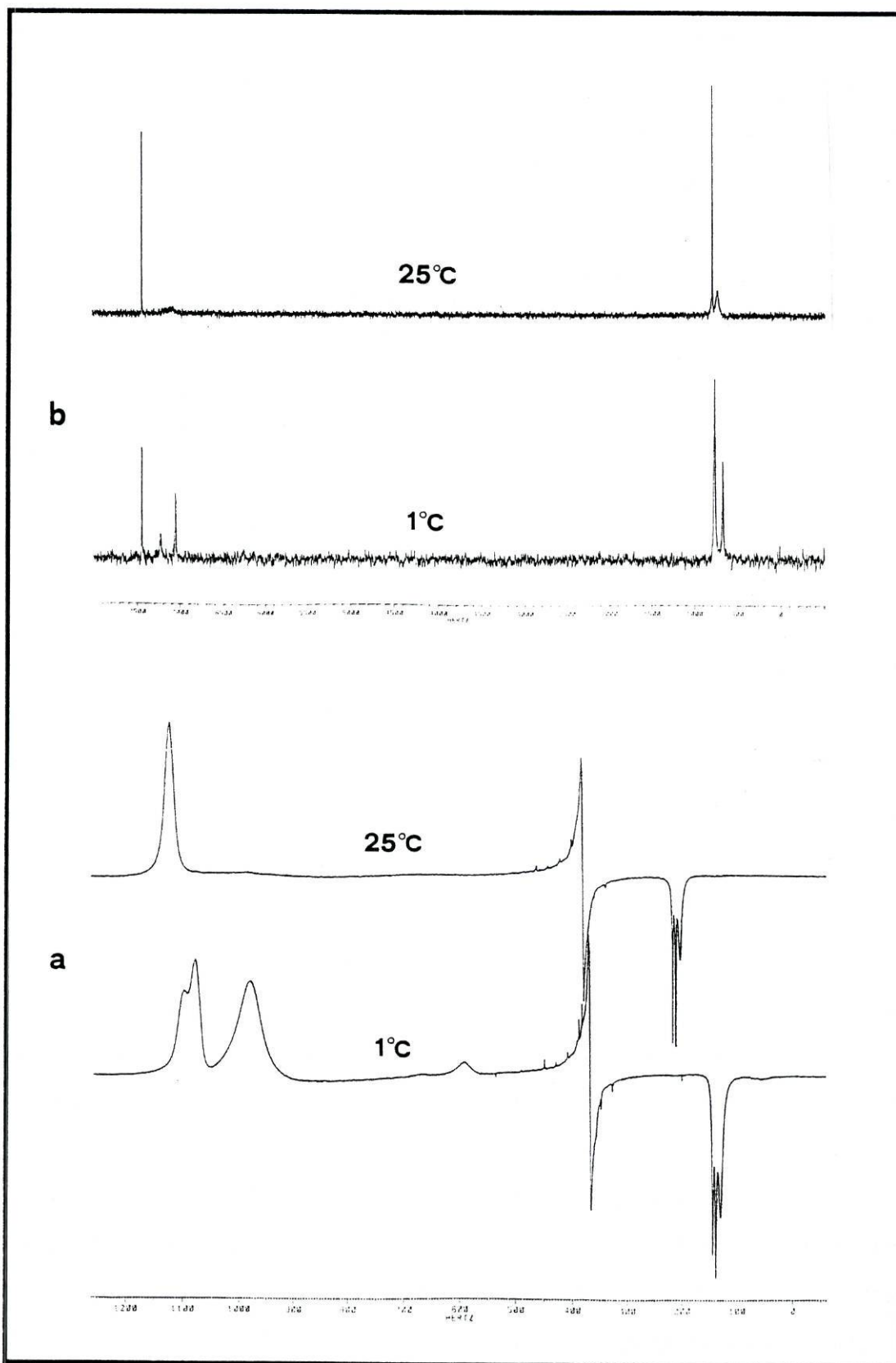


Figura 7.2 — Espectros de ^1H (a) e ^{13}C (b) da glicilglicina, a 1°C e 25°C, de uma solução aquosa 0,20 M de glicilglicina e 0,05 M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; pH = 1,9.

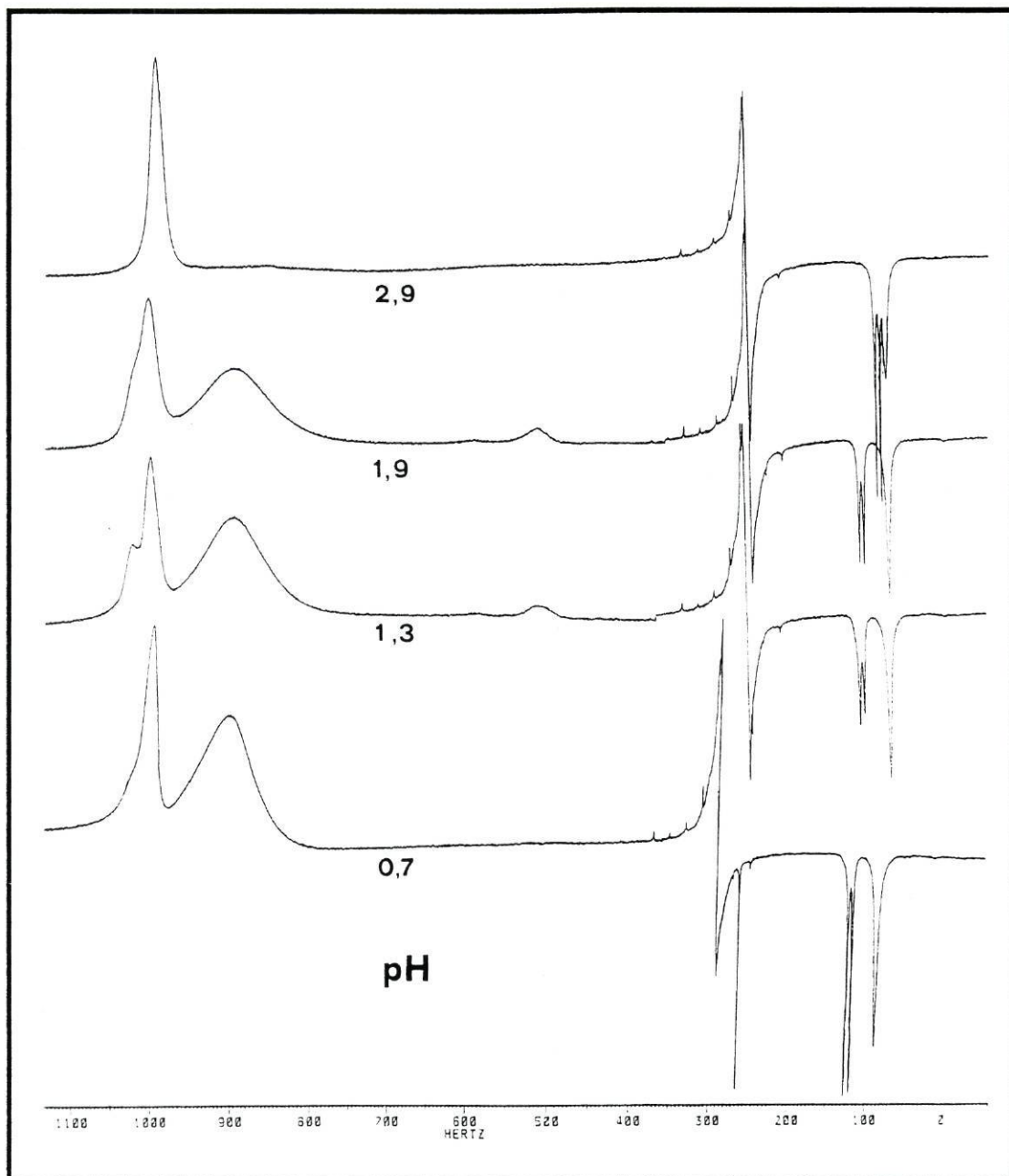


Figura 7.3 — Espectro de ^1H da glicilglicina a 25°C em soluções aquosas $0,20\text{ M}$ em glicilglicina e $0,05\text{ M}$ em $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; pH variável.

pressupõe a existência de um equilíbrio rápido entre as diversas espécies em solução; b) entre pH 2 e 3 ocorre a transição entre equilíbrio rápido e equilíbrio lento entre as espécies coordenadas e não coordenadas ao catião metálico; c) entre pH 0,8 e 2 são observados sinais diferenciados para as espécies de glicilglicina coordenada e não coordenada a Hg^{2+} , mas em equilíbrio rápido com o íon H^+ ; d) a pH menor que 0,8 observa-se apenas o espectro da glicilglicina em equilíbrio rápido entre as espécies protonada e não protonada.

Após esta breve descrição dos regimes de permuta dos sistemas glicilglicina/nitrato de mercúrio vai ser feita a análise dos espectros de equilíbrio lento obtidos nas respectivas soluções. Recorde-se que a molécula de glicilglicina, que na sua forma completamente desprotonada (GG^-) pode ser representada como



possui, como já foi referido, duas posições com maior aptência para a coordenação de iões metálicos: o grupo amina e o grupo carboxílico. O catião Hg^{2+} , por seu lado, tem tendência para formar complexos lineares e apresenta uma marcada preferência por átomos “macios” como o enxofre, embora possa coordenar ao grupo amina (preferencialmente) ou ao grupo carboxílico da glicilglicina, com substituição de um ião H^+ quando estes grupos estão protonados [122].

Uma solução aquosa de glicilglicina $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 1,3 [Figura 7.1(a)] apresenta um espectro de 1H com dois singuletos largos a maior frequência que o sinal da água: um, mais estreito, atribuído ao protão do grupo $-NH-$ (banda com 19 Hz de largura a meia altura) e outro, mais largo, devido aos protões equivalentes do grupo $-NH_3^+$ (banda com 81 Hz de largura a meia altura); note-se que a razão entre as áreas destas duas bandas é de 1:3, como esperado. O espectro da Figura 7.1(a) apresenta ainda um dobleto e um singuleto a menor frequência que o sinal da água e que correspondem, respectivamente, (i) aos núcleos dos átomos de hidrogénio metilénicos (H-3) acoplados com o protão peptídico $-NH-$ e com constante de acoplamento de cerca de 5,5 Hz) e (ii) aos núcleos de H-1, para os quais não é observado acoplamento com os protões $-NH_3^+$, embora estes, devido à permuta com o solvente, originem um visível alargamento do sinal de H-1.

Na Figura 7.1(b) está representado o espectro de 1H de uma solução aquosa $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ em $Hg(NO_3)_2$ e em glicilglicina a pH 1,3 e em que são visíveis novas bandas quando comparado com o de soluções puras de glicilglicina. Na região de campo baixo são observados dois sinais para o núcleo de hidrogénio do grupo $-NH-$, de largura aproximadamente igual a 17 Hz (depois de aumento de resolução em 3 Hz no processamento), afastados entre si de 26 Hz; destes sinais, o que se situa a maior frequência apresenta um desdobramento em tripleto devido ao acoplamento com os protões H-3 e com constante de acoplamento de aproximadamente 5 Hz, enquanto

que o sinal a menor frequência, com uma estrutura fina de tripleto muito pouco marcada e apenas ligeiramente visível com o aumento da resolução do espectro no processamento do FID, corresponde ao sinal observado para o grupo -NH- no espectro de soluções puras de glicilglicina. Os núcleos de hidrogénio do grupo -NH_3^+ apresentam um sinal largo (77 Hz após um aumento de resolução de 3 Hz no processamento) idêntico ao observado para a glicilglicina; observam-se ainda dois grupos de dois sinais, separados por 25 Hz em cada grupo e a menor frequência que o grupo -NH_3^+ da espécie não coordenada a mercúrio (e afastados 210 Hz e 730 Hz deste sinal, respectivamente) e que são hipoteticamente atribuídos ao grupo amina coordenado ao catião mercúrio – o aparecimento de dois sinais em cada um dos grupos pode indicar que a coordenação do ião mercúrio(II) ao grupo amina torna os seus dois núcleos de hidrogénio não equivalentes. Observa-se ainda um outro sinal muito largo e pouco intenso (a 813 Hz relativo ao do grupo -NH_3^+) e que pode estar relacionado com outra forma de glicilglicina complexando o catião Hg^{2+} . O sinal dos núcleos H-3 mostra uma estrutura em tripleto que poderá corresponder a dois doubletos sobrepostos, cada um com constante de acoplamento de aproximadamente 5,3 Hz. O sinal dos núcleos H-1 apresenta uma estrutura complicada com cinco picos de intensidades não regulares que, como será visto a seguir, parecem corresponder a três sinais diferentes.

O espectro de ^{13}C de uma solução de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ e glicilglicina $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 1,9 apresentado na Figura 7.2(b) mostra apenas um sinal para cada núcleo da glicilglicina a 298K, mas a 1°C é evidente o desdobramento de C-1 e de C-2 em dois sinais (um dos sinais C-1 aparece quase sobreposto com o de C-3).

Numa tentativa para confirmar o número de espécies de glicilglicina com mercúrio, observou-se o espectro de ^{199}Hg com e sem glicilglicina a pH 1,5. Sem glicilglicina, pode ser observado um sinal na posição esperada para o nitrato de mercúrio em solução aquosa [124] mas ao adicionar apenas pequenas quantidades de glicilglicina à solução esse sinal sofre um grande alargamento e torna-se indetectável. Este fenómeno foi atribuído à grande anisotropia de desvio químico característica do núcleo de ^{199}Hg e ao seu acoplamento com os átomos de hidrogénio [124,125,126]. Esta dificuldade só poderia ser contornada pela utilização de um campo magnético

mais baixo ou de temperatura mais alta ou ainda pela utilização de detecção inversa de ^{199}Hg através do seu acoplamento com os átomos de ^1H , processo já usado para um estudo deste tipo [127]. Não se obteve sucesso neste trabalho com a elevação da temperatura até aos 90°C , provavelmente devido a problemas de relaxação [128].

Para verificar que os sinais atribuídos ao grupo amina da glicilglicina têm de facto essa origem, e não no grupo $-\text{NH}-$, foi obtido o espectro de ^1H de uma solução aquosa a pH 1,3 de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ e glicilsarcosina (GS^-) $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ cuja molécula pode ser representada por:



Esta molécula é semelhante à glicilglicina com a diferença de que possui um grupo metilo a substituir o átomo de hidrogénio na ligação peptídica. O resultado obtido, apresentado na Figura 7.4(a), confirma a atribuição da banda a campo mais baixo ao grupo amina uma vez que o espectro é igual ao das soluções de glicilglicina com $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ nas mesmas condições, com a excepção dos sinais de $-\text{NH}-$, que a glicilsarcosina não apresenta, e com o aparecimento do sinal do grupo metilo $=\text{N}-\text{CH}_3$ que aparece desdobrado nos sinais dos dois isómeros conformacionais da glicilsarcosina.

O espectro de ^1H de uma solução equimolar ($0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) de acetilglicina (aG^-)



e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ [Figura 7.4(b)] não exhibe desdobramento do sinal do átomo de hidrogénio da ligação peptídica. A ausência do grupo amina terminal na acetilglicina (substituído por um átomo de hidrogénio por comparação com a glicilglicina) permite concluir definitivamente que os sinais observados para o grupo amina e para o grupo $-\text{NH}-$ da glicilglicina têm origem na coordenação do catião Hg^{2+} ao grupo amina terminal. Nenhum sinal do espectro de ^1H das soluções com acetilglicina e nitrato de mercúrio mostra desdobramento no intervalo de pH 1-3 nem diferenças significativas em termos de desvios químicos relativamente ao espectro da acetilglicina livre. Este resultado permite também excluir a presença de forte coordenação na ligação peptídica.

Em solução de água deuterada (D_2O)

No espectro de uma solução em D_2O de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ e glicilglicina $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ a pD 1,9 (Figura 7.5), podem ser observados três sinais para H-1, dois

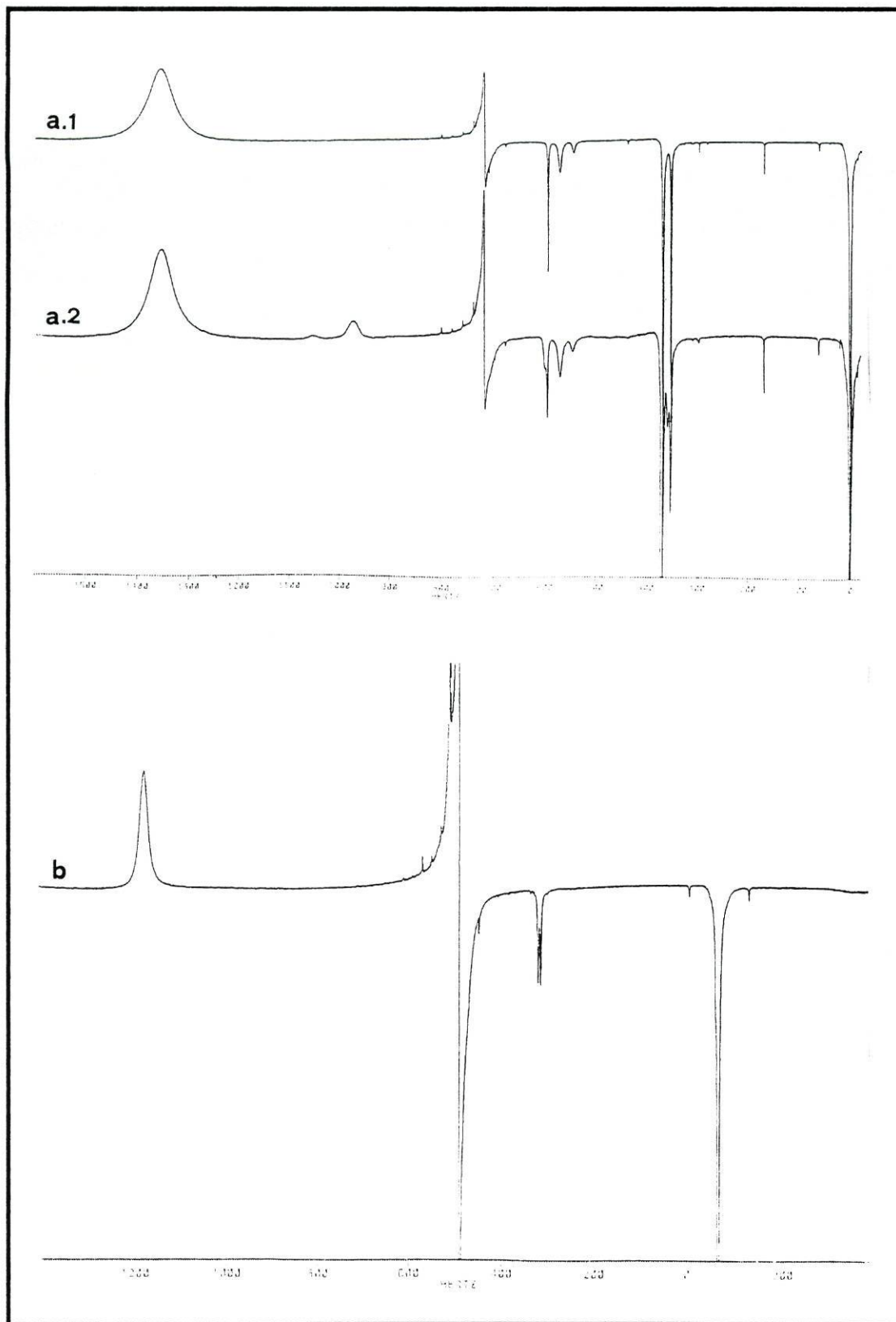


Figura 7.4 — (a) Espectro de ^1H da glicilsarcosina, a 25°C , em soluções aquosas de (a.1) $0,2\text{ M}$ em glicilsarcosina e (a.2) $0,2\text{ M}$ em glicilsarcosina e $0,2\text{ M}$ em $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; $\text{pH} = 1,25$. (b) Espectro de ^1H da acetilglicina em solução aquosa com $0,05\text{ M}$ acetilglicina e $0,05\text{ M}$ de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; $\text{pH} = 1,30$.

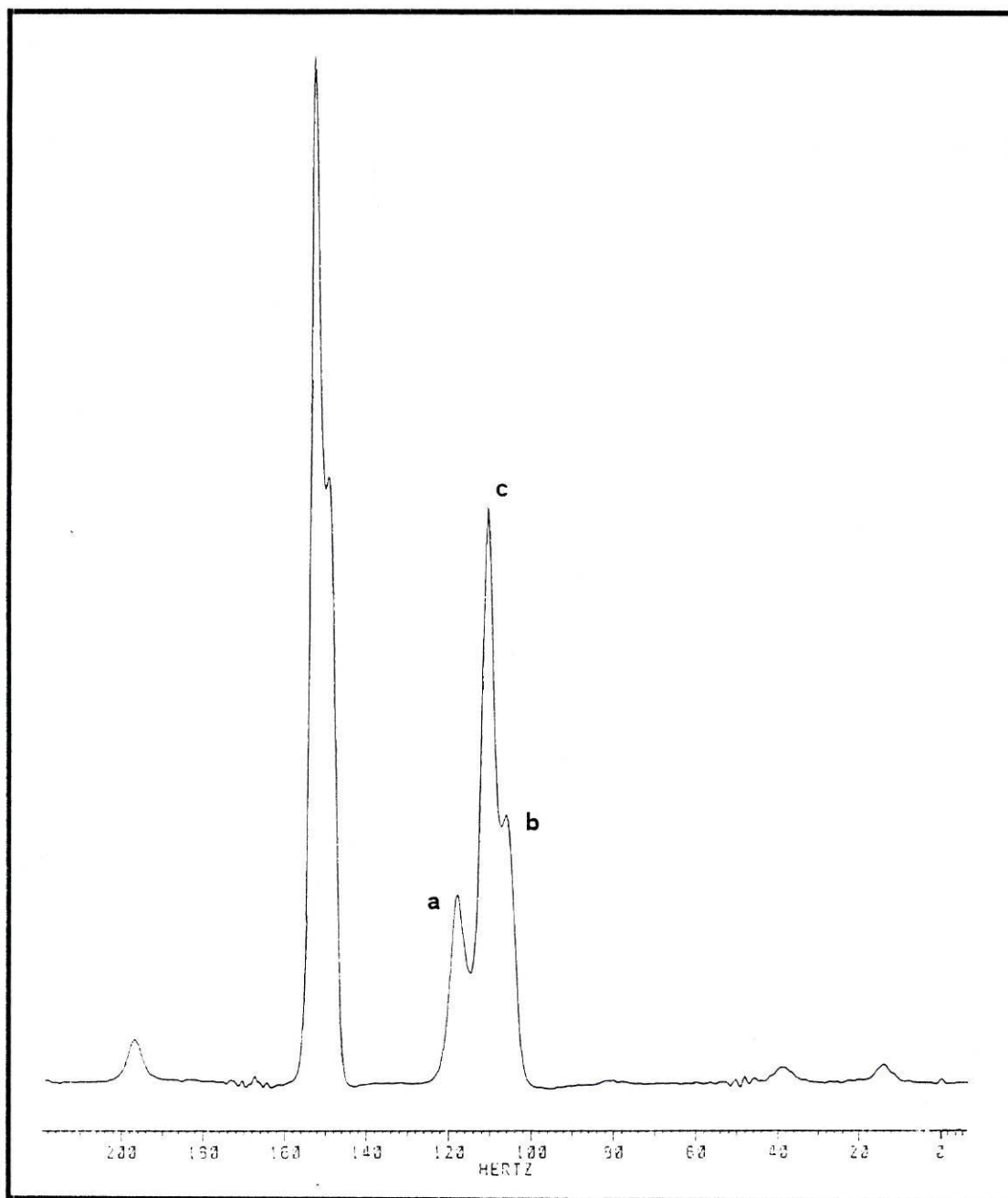


Figura 7.5 — Região dos prótons metilênicos do espectro de ^1H da glicilglicina em D_2O com 0,1 M de glicilglicina e 0,1 M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, a 25°C e pD 1,9. A 14, 39 e 196 Hz são visíveis os satélites de acoplamento desses prótons com o núcleo de ^{199}Hg .

dos quais apresentam satélites de acoplamento com o núcleo ^{199}Hg , representando como esperado cerca de 17% da área total (percentagem da ocorrência natural desse isótopo de mercúrio) com constante de acoplamento de 159 Hz para o sinal a maior frequência, designado por *a*, e 182 Hz para o outro sinal, designado por *b*. São também observados dois sinais para H-3, embora nenhum apresente satélites de acoplamento com ^{199}Hg , o que vem suportar a hipótese que aponta para o não

envolvimento quer do grupo -NH- quer do grupo carboxílico em equilíbrios de complexação com o catião Hg^{2+} . Reid *et al.* estudaram o sistema glicina/ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ em D_2O e mostraram que numa mistura de ligando e metal na razão 1:1 se observam, a pD menor que 3, três sinais singuletos para os prótons metilénicos. Mostraram ainda que dois desses sinais apresentam satélites de acoplamento com ^{199}Hg , tendo sido atribuídos à presença das espécies ML e ML_2 em solução [123]. Não obstante os espectros obtidos neste trabalho serem muito semelhantes aos obtidos por Reid *et al.*, é pouco provável que a pD inferior a 2 a espécie ML_2 esteja presente na quantidade indicada pelos integrais das bandas da Figura 7.5, pois: a) forneceriam valores para as constantes de formação dos complexos de mercúrio substancialmente diferentes dos calculados neste trabalho por análise da variação dos desvios químicos nos espectros de equilíbrio rápido, para a formação das espécies ML e ML_2 (ver adiante); e b) os valores das constantes de formação calculadas a partir da utilização dos integrais da Figura 7.5 não são satisfatórios pois é obtido um valor maior para a constante de formação do complexo ML_2 do que para a formação do complexo ML. Este resultado mantém-se se forem usados os espectros de soluções com outros valores de pD e outras proporções Hg^{2+} /glicilglicina, onde é observado que as duas bandas associadas a formas de glicilglicina mercurada são sempre aproximadamente iguais em área.

Uma visão integrada

O conjunto de resultados descrito até agora é compatível com a ocorrência, a pH (pD) menor que 2, da espécie ML tal como está apresentada na Figura 7.6. Este “quelato” torna os núcleos de H_a e H_b não equivalentes (assim como os núcleos de hidrogénio, ou deutério, do grupo amina), levando ao aparecimento de dois sinais de H-1 para a espécie mercurada. Refira-se que um quelato semelhante foi observado no estado sólido para o complexo formado pela coordenação de CH_3Hg^+ ao grupo amina da glicilglicina [120] e, também, que são conhecidos vários exemplos de complexos em que o mercúrio e o metilmercúrio de apresentam números de coordenação superiores a 2 [129]. As duas bandas atribuídas a H-1 que apresentam acoplamento com ^{199}Hg seriam assim atribuídas a H_a e H_b o que explicaria a observação da igualdade das suas áreas.

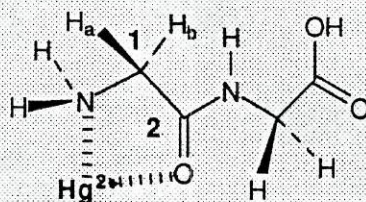


Figura 7.6 — Quelato formado pela glicilglicina na sua coordenação ao catião mercúrio a pH ácido.

A não equivalência de H_a e H_b implica o aparecimento do seu acoplamento escalar mútuo, de constante aproximadamente 7 Hz, visível no espectro da Figura 7.1(b). Este acoplamento não se observa nos espectros em D_2O devido ao acoplamento de H-1 com os núcleos de deutério do grupo amina em permuta com o solvente, mas que contribui para o alargamento das bandas e consequente perda de resolução da estrutura fina dos sinais.

Para os núcleos H-3 e $-NH-$ são observados no espectro da Figura 7.1(b) apenas dois sinais para cada grupo: um para a forma mercurada e outro para a forma não mercurada da glicilglicina, devido à sua posição distante do local de coordenação; notar que os dois sinais de H-3 encontram-se parcialmente sobrepostos formando um tripleto aparente. De grande interesse são os sinais observados para os núcleos de hidrogénio do grupo amina, em que dois deles são bastante mais intensos: um a 1315 Hz (ver legenda da Figura 7.1) e que corresponde à forma não mercurada e já observado no espectro da Figura 7.1(a) e outro, com duas bandas, a 920 Hz e correspondente ao complexo ML. O desvio deste último para menor frequência está de acordo com a diminuição da carga média dos átomos de hidrogénio, relativamente a $-NH_3^+$; por outro lado, o facto de aparecer desdobrado em duas bandas vem corroborar a formação do quelato já referido (Figura 7.6). São, também, visíveis dois outros sinais muito menos intensos a 390 Hz e a 1000 Hz (não esquecer que a excitação selectiva utilizada para obter estes espectros, vai fazer diminuir a intensidade dos sinais próximos da frequência de excitação) e que pela largura de banda devem corresponder a sinais do grupo amina de outras formas de glicilglicina coordenada a mercúrio (os complexos ML_2 e M_2L são espécies plausíveis).

A interpretação dos espectros de equilíbrio lento em termos da formação do quelato da Figura 7.6 é, também, apoiada através dos cálculos da constante de equilíbrio de formação da espécie ML partindo das áreas dos sinais de ^1H em espectros de soluções de H_2O e D_2O , cálculos que serão apresentados nas duas secções seguintes.

1.2 Constantes de equilíbrio para o sistema Hg^{2+} /glicilglicina

Por medição da área de sinais em espectros de ^1H (variação do pH e das concentrações)

O cálculo de constantes de equilíbrio a partir da área dos sinais dos espectros de ^1H obtidos em água por excitação selectiva implica a correcção dos valores medidos para essas áreas por intermédio da curva de excitação utilizada. É no entanto um método sujeito a um erro apreciável, que é tanto maior quanto mais afastados estiverem os sinais e quanto mais diferirem os seus tempos de relaxação; é portanto conveniente, para ter significado a comparação entre as áreas de vários sinais, que estes ocorram a frequências próximas. Os dois sinais de $-\text{NH}-$ da glicilglicina nos espectros obtidos em água (Figura 7.1(b)) são, devido à sua proximidade e localização no espectro, os únicos cujas áreas podem ser utilizadas para estimar a constante de equilíbrio da formação da espécie ML, apesar de estarem parcialmente sobrepostos. A normalização das suas áreas foi efectuada utilizando a curva de excitação obtida mediante um ajuste de uma função polinomial de 2º grau às intensidades do sinal de HDO em D_2O medidas para diversas frequências próximas do desvio químico dos sinais a analisar.

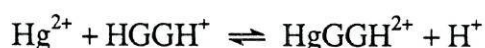
Uma simulação do espectro como uma soma de curvas lorentzianas ajustadas pelo método da regressão não linear (a simples medição dos integrais foi impossibilitada pela extensa sobreposição das bandas) permitiu calcular um valor indicativo para a constante de formação do complexo ML a pH (pD) ácido (sem a intervenção do anião hidróxido no modelo). Os valores de pH (pD) foram condicionados pela solubilidade das soluções de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e glicilglicina usadas.

O cálculo das constantes de equilíbrio por este método é trivial uma vez que a área das bandas é proporcional à concentração das espécies no equilíbrio. A fórmula utilizada para simular cada uma das bandas foi:

$$Y = I / (a\pi(1+((\nu-\mu)/a)^2)) \quad (7.1)$$

onde Y é a altura da banda para cada valor de frequência, I é o seu integral, μ é a frequência da banda para a sua intensidade máxima (igual a $I / (a\pi)$), $2a$ é a largura da banda a meia altura e ν é a frequência. O ajuste foi feito em microcomputador pelo método dos mínimos quadrados otimizando os parâmetros I , μ e a tendo sido utilizada uma soma de três bandas para simular os sinais de H-1 e uma soma de duas para simular os sinais de -NH-. A grande sobreposição dos sinais de H-3 impediu a sua simulação na maioria dos casos. No entanto, foi possível observar em situações favoráveis que a razão entre os integrais das duas bandas observadas para o núcleo H-3 é sempre igual à razão entre a soma dos integrais das duas bandas relacionadas com espécies coordenadas a mercúrio e o integral da banda correspondente à glicilglicina livre do núcleo H-1.

Como modelo para o sistema em solução ácida foi considerado apenas o seguinte equilíbrio:



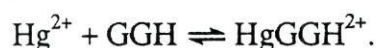
(substituir H por D para as experiências em D_2O) com constante K_e , onde o catião Hg^{2+} desloca um ião H^+ do grupo $-\text{NH}_3^+$ terminal da glicilglicina. A pH menor ou igual a 1,9, apenas 5% dos grupos carboxílicos da glicilglicina não estão protonados ($\text{p}K_{a1} \approx 3,20$) pelo que se assume que toda a glicilglicina livre se encontra sob a forma HGGH^+ e que toda a glicilglicina complexada se encontra protonada no grupo carboxílico (HgGGH^{2+}). Assume-se ainda que a esse pH a formação das espécies $\text{Hg}(\text{OH})^+$ e $\text{Hg}(\text{OH})_2$ com constantes de formação aproximadas de respectivamente $1,58 \times 10^{10}$ e $1,58 \times 10^{20}$ [88] é negligenciável (< 1%), o que pode ser facilmente verificado pelo seu diagrama de distribuição em função do pH.

Considerando as concentrações totais, as concentrações no equilíbrio (deduzidas dos valores dos integrais) e todas as equações derivadas do modelo é possível calcular o valor de K_e . Estas constantes são dependentes do valor da constante de estabilidade K'_{a2} para a reacção hipotética



que corresponde à desprotonação do grupo amina *mantendo o grupo carboxílico protonado*, cujo valor é desconhecido já que a protólise no grupo amina só ocorre a um pH mais elevado que a protólise do grupo carboxílico. Considerou-se como boa

aproximação para pK'_{a_2} , o valor de pK_{a_2} da glicilglicina, aproximadamente 8,23 (valores da Tabela 5.2), determinado em H_2O numa secção anterior deste trabalho; em D_2O foi utilizado o valor de pK'_{a_2} de 8,91 determinado a partir do valor usado para as experiências em água, (8,23) e usando a equação 4.2. A soma $\log K_e + pK'_{a_2}$ fornece o valor da constante de $\log K_1'$ para equação



A partir dos integrais dos sinais de $-NH-$ da glicilglicina em espectros obtidos de soluções aquosas, um valor de 8,0 foi calculado para $\log K_1'$ utilizando a razão entre os integrais dos sinais da espécie não mercurada e da espécie mercurada de 24/36, valores médio de vários ensaios.

Os valores obtidos para $\log K_1'$ em D_2O são apresentados na Tabela 7.1 para cada experiência com média $7,9 \pm 0,1$ (desvio padrão da amostra) e que são da ordem de grandeza esperada para coordenação de Hg^{2+} a grupos amina de moléculas pequenas [130]. Este valor, embora não estritamente comparável, é ligeiramente inferior ao calculado em solução aquosa neste trabalho, considerando a ligação do anião hidróxido ao mercúrio, a partir dos desvios de espectros de equilíbrio rápido, cujos resultados são apresentados a seguir.

Por medição dos desvios químicos (variação do pH)

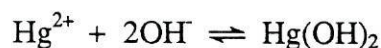
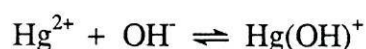
Para um cálculo mais completo das constantes de estabilidade que caracterizam este sistema foi utilizada a zona de pH onde o equilíbrio é rápido na escala de tempo

$[Hg(NO_3)_2]_h / [GG]_k$	pD	$I_{H_c}^2$	$I_{H_a} + I_{H_{-1b}}$	$\log K_e$	$\log K_1'$
0,10M / 0,05M	1,4	75,0	25,0	-0,20	8,03
	1,6				
	1,9				
0,10M / 0,10M	1,4	83,7	16,3	-1,15	7,80
	1,6	70,5	29,5	-0,30	7,93
	1,9	60,0	40,0	-0,39	7,84
0,05M / 0,10M	1,4	87,6	12,4	-0,27	7,96
	1,6	85,1	14,9	-0,37	7,86
	1,9				

¹ Bandas designadas como na Figura 7.8; ² Em percentagem do integral total de H-1

Tabela 7.1 — Áreas dos os sinais de H-1 da glicilglicina em D_2O para diversas condições experimentais; valores obtidos para a constante de equilíbrio K_1'

de RMN (25°C; pH > 3). Nesta zona o desvio químico de cada sinal é a média pesada dos desvios químicos de todas as espécies que para ele contribuem. É assim possível retirar informação sobre os parâmetros de equilíbrio que regem o sistema registando o valor do desvio químico dos núcleos da glicilglicina para cada valor de pH. Os valores das constantes de estabilidade são obtidas mediante um ajuste não linear de mínimos quadrados de uma função modelo a esses dados. Em todos os modelos discutidos seguidamente foram considerados: (a) as reacções de hidrólise do catião mercúrio traduzidos pelas equações



com constantes de equilíbrio, respectivamente, de $K_{O_1} = 1,58 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ e de $K_{O_2} = 1,58 \times 10^{20} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6$; e (b) as reacções de protonação da glicilglicina, caracterizadas pelos valores de $\text{p}K_a$ inseridos na Tabela 5.2.

Na Figura 7.7 está representada a variação do desvio químico para os núcleos H-1, C-1 e C-2 da glicilglicina em função do pH, para soluções de glicilglicina $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ e na presença de KNO_3 $0,60 \text{ mol dm}^{-3}$ ou de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Apenas os núcleos C-1 e C-2 apresentam diferenças significativas no desvio químico provocado pelo ião metálico e foi sobre esses desvios que foram baseados os cálculos das constantes de estabilidade; os desvios foram medidos em soluções com valores de pH compreendidos entre aproximadamente 3 e 9. Atendendo ao intervalo de pH utilizado foram consideradas as seguintes espécies como as mais importantes em solução: HGGH^+ , HGG^\pm (protonação somente em NH_2) e GG^- ; Hg^{2+} , $\text{Hg}(\text{OH})^+$, $\text{Hg}(\text{OH})_2$; HgGG^+ , $(\text{OH})\text{HgGG}$ e $\text{Hg}(\text{GG})_2$. Note-se que todas as espécies envolvendo catião metálico referem-se à coordenação no grupo amina terminal da glicilglicina, pois não foram consideradas espécies em que a coordenação ocorria pelo grupo carboxílico já que esse tipo de coordenação, embora possível, ocorre em muito menor extensão [130]; por outro lado neste intervalo de pH a inclusão de HgGG^+ não afecta os valores das outras constantes de formação. Uma vez que o pH das experiências é maior que 3 foi assumido que o catião mercúrio encontra-se sempre ligado pelo menos a um ião hidróxido, devido às elevadas constantes de formação

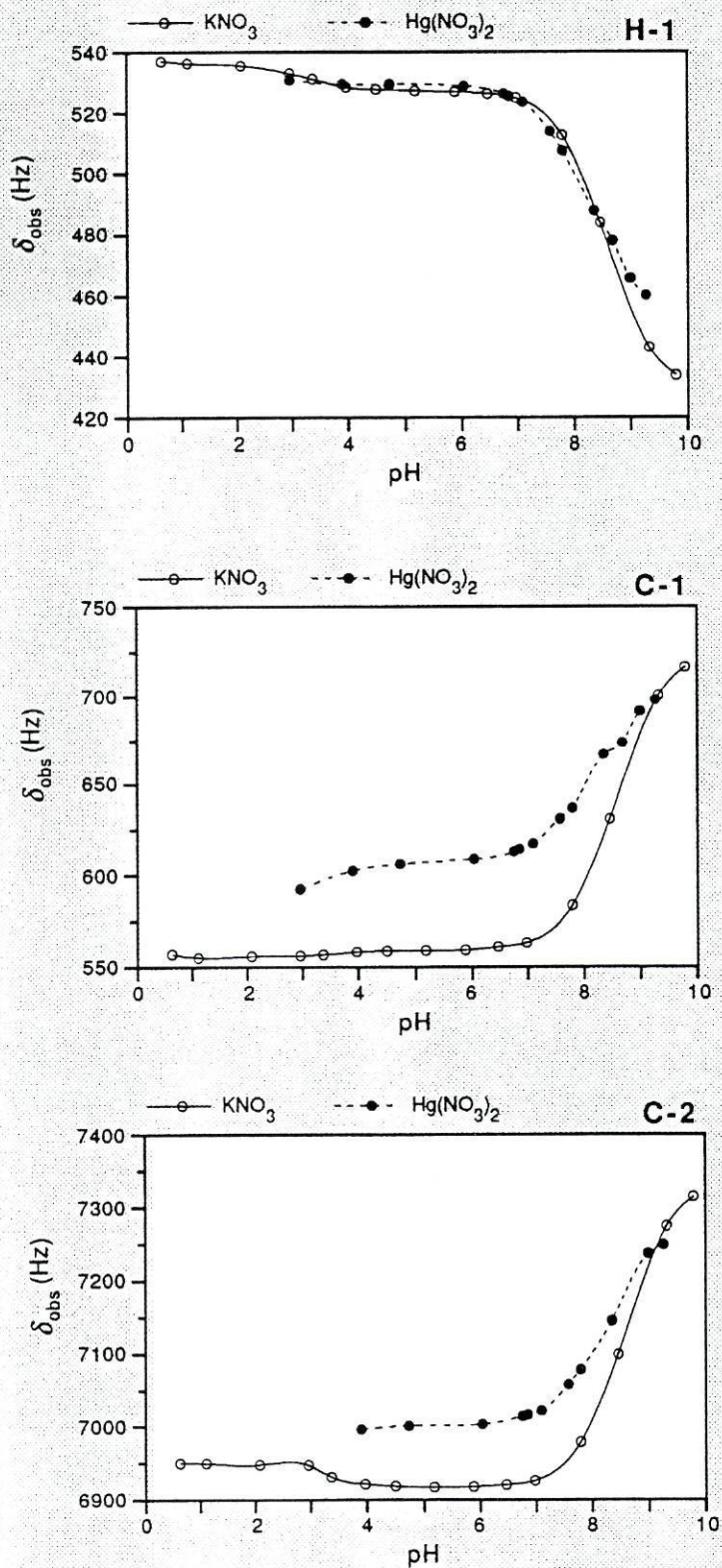
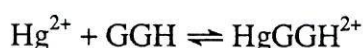


Figura 7.7 — Variação do desvio químico para os núcleos H-1, C-1 e C-2 da glicilglicina em função do pH, para soluções de glicilglicina $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ e na presença de KNO_3 $0,60 \text{ mol dm}^{-3}$ ou de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

dos hidróxidos de mercúrio. Por essa razão foram consideradas no modelo apenas as seguintes reacções de complexação mercúrio/glicilglicina



com constantes de equilíbrio, respectivamente, K_1 e K_2 . Os valores obtidos foram 8,04 e -5,29 para C-1 e 8,18 e -5,07 para C-2, com médias de $8,1 \pm 0,1$ e $-5,2 \pm 0,2$ para K_1 e K_2 respectivamente. Saliente-se que o valor de K_1 é bastante semelhante ao valor de cerca 8,0 calculado para a reacção



o que sugere não só uma certa independência, no que respeita à coordenação, entre os grupo amina e carboxílico, mas também que a ligação de um anião hidróxido não vai afectar significativamente a capacidade do catião mercúrio coordenar o grupo amina da glicilglicina. Esta segunda aproximação é importante se se pretender estimar a constante de estabilidade K_2' da reacção



já que o seu cálculo pressupõe o conhecimento da constante de dissociação do ião hidróxido da espécie monocoordenada, que não pôde ser calculada com base nos desvios observados, uma vez que a inclusão dessa equação no modelo não alterou o ajuste, impedindo assim a obtenção de um valor para essa constante. No entanto, o valor desta constante de dissociação do ião hidróxido deve ser próximo da formação de Hg(OH)^- ($\log K_{O_1} = 10,2$) pelas razões apontadas atrás, o que implica um valor de aproximadamente 5 para $\log K_2'$.

Não se obtiveram ajustes satisfatórios quando foram considerados no modelo apenas a formação do complexo $(\text{OH})\text{HgGG}$ ou do complexo $\text{Hg}(\text{GG})_2$. Não encontramos na bibliografia determinações de valores para as constantes K_1 e K_2 . No entanto, comparando com valores da literatura obtidos para mercúrio e metilmercúrio com aminoácidos e peptídeos, pode-se verificar que aqueles valores estão dentro do intervalo normal para este tipo de coordenação [130].

2. Citidina

Os COMPLEXOS DE CITIDINA ou citosina com Hg^{2+} ou com CH_3Hg^+ têm também sido estudados em várias condições experimentais e utilizando diversos métodos. Estudos em DMSO estabeleceram para a citidina dois locais preferenciais de coordenação: o grupo amina ligado a C-4 (o átomo de azoto é designado por N-4) e o átomo de azoto endocíclico N-3 (Figura 7.8). Este último local de coordenação pode, tal como foi observado para o catião zinco(II), envolver uma ligação fraca com o átomo de oxigénio ligado em C-2 [131]. Para a 1-metilcitosina foi detectada no estado sólido uma espécie coordenada simultaneamente nos dois locais a metilmercúrio [132].

Em espectros de RMN de soluções de citidina ou de citosina com Hg^{2+} em DMSO observa-se o desdobramento do sinal correspondente ao grupo amina, facto que foi interpretado como tendo origem no aumento do carácter duplo da ligação entre C-4 e N-4 devido à coordenação em N-3 de catião mercúrio [133,134] e que dificultaria a rotação do grupo $-\text{NH}_2$. É importante salientar, também, que neste solvente e para sistemas metilmercúrio/citidina a coordenação no átomo de azoto exocíclico parece mais favorecida que a ligação a N-3 [135].

Em solução aquosa e para sistemas citidina/ Hg^{2+} , foi determinado através da utilização de espectrofotometria electrónica e de potenciometria que a forma predominante de citidina entre pH 3 e 5 é aquela que está coordenada simultaneamente a dois iões Hg^{2+} (em N-3 e N-4), enquanto que para valores de pH menores do que 3 a forma predominante é a monocoordenada apenas em N-3 [136,137]; observações semelhantes foram feitas para o catião metilmercúrio [138]. McConnel determinou os tempos de relaxação longitudinal para os núcleos de ^1H da citidina e da citosina,

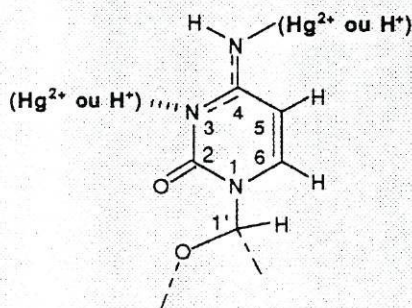


Figura 7.8 — Locais de coordenação do catião Hg^{2+} (ou $\text{CH}_3\text{Hg}^{2+}$) à citidina.

com coordenação ou não a metilmercúrio, através da obtenção de condições de equilíbrio lento por ajuste do pH das soluções [80,139] e os resultados obtidos permitiram estimar a cinética de mercuração do grupo amina da citidina e da citosina.

Neste trabalho, toda a informação já disponível sobre estes sistemas foi complementada com dados de RMN de ^{13}C e com o cálculo de constantes de equilíbrio para o sistema Hg^{2+} /citidina em solução aquosa. A observação do espectro de ^{199}Hg em soluções com citidina foi tentada sem êxito, devido provavelmente a condições desfavoráveis de relaxação, embora existam resultados para este tipo de experiências com nucleotídeos [140].

2.1 Estudo das espécies em solução

NA FIGURA 7.9 ESTÁ APRESENTADO o efeito da concentração de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ sobre o espectro de ^1H da citidina em D_2O a 25°C e pD 2. É visível nestes espectros a presença de um regime de troca lenta, observando-se o aparecimento de novos sinais atribuíveis a espécies de citidina coordenadas a mercúrio, com saliência para o núcleo de H-6 que exhibe os maiores desvios químicos entre as espécies coordenadas e não coordenadas. Os núcleos de H-5 e H-1', bem como os núcleos de hidrogénio da ribose, mostram também novos sinais. Estes novos sinais apresentam satélites provenientes de acoplamento com ^{199}Hg com valores de constantes de acoplamento de aproximadamente 70 Hz para H-5, 35 Hz para H-6 e 20 Hz para H-1', valores que permitem concluir que o mercúrio se deve coordenar à citidina em N-3 ou N-4. Como pode ser observado na Figura 7.9 todos os sinais que apresentam satélites de ^{199}Hg surgem em pares para cada núcleo o que, como já foi referido, é atribuído a um impedimento na rotação do grupo amina que produz dois isómeros conformacionais e que é provocado pela coordenação de H^+ ou Hg^{2+} no átomo de azoto endocíclico N-3 [80] em espécies coordenadas por mercúrio no grupo amina (Figura 7.8). Os valores para os parâmetros espectrais relacionados com os rotâmeros são apresentados na Tabela 7.2. É interessante verificar que o núcleo H-6 é aquele que apresenta maior diferença de desvio químico entre espécies coordenadas e não coordenadas no grupo amina, apesar de se encontrar mais afastado desse grupo do que H-5, ocorrência também observada para o caso do catião metilmercúrio [80].

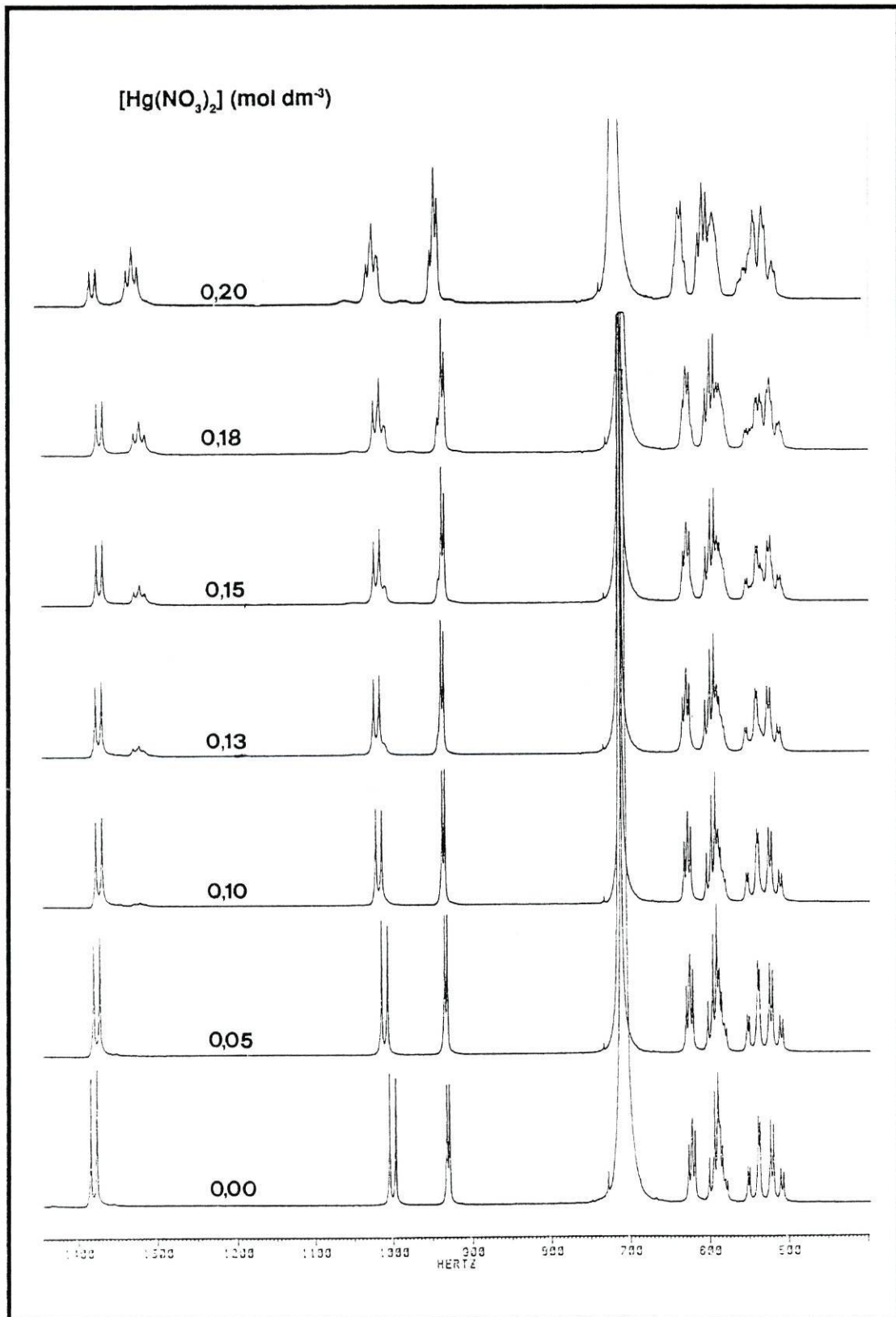


Figura 7.9 — Espectros de ¹H de citidina obtidos em soluções de D₂O 0,20 M de citidina e concentração variável de Hg(NO₃)₂, a 25°C e pD = 2,00 ± 0,05; desvios químicos relativamente a *tert*-butanol.

A coordenação ao grupo amina, cujo pK_a tem um valor próximo de 14, tem uma cinética mais lenta que a coordenação em N-3 (pK_a próximo de 4) e por essa razão a espécie com coordenação exclusivamente em N-3 está em equilíbrio rápido com a citidina não coordenada a mercúrio. O sinal resultante desse equilíbrio é um dobleto para H-5, H-6 ou H-1' e não apresenta satélites de ^{199}Hg devido ao desacoplamento de troca química (Figura 7.9).

Algumas experiências de desacoplamento homonuclear mostraram as relações de acoplamento entre os sinais de soluções equimolares de citidina e nitrato de mercúrio em D_2O e pD 2,5. A saturação dos sinais de H-5 provoca a transformação em singletos dos dobletos de H-6: após o desacoplamento, podem ser observados três sinais para esse núcleo, o que indica a existência de três espécies em equilíbrio lento em solução, 2 rotâmeros amino-coordenados e outra não coordenada no grupo amina.

Na Figura 7.10 está representado o efeito do pH nos espectros de ^1H e de ^{13}C de soluções aquosas de citidina na presença de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Para além das características já observadas nos espectros da Figura 7.9, são agora visíveis também os sinais dos prótons do grupo amina, na região de maior frequência do espectro. Embora seja referido na literatura que foi possível observar satélites de acoplamento com ^{199}Hg nos sinais RMN do próton do grupo amina em complexos mercurados de 1-metilcitosina coordenada a platina [141], isso não foi observado em nenhuma das experiências executadas neste trabalho. Do conjunto de sinais do grupo amina, o dobleto largo situado a maior frequência, que coalesce e desaparece com o aumento do pH, é atribuído às espécies sem coordenação no grupo amina e em equilíbrio

Núcleo	$\Delta\delta$	Δ_{rot}
C-2	27	4
C-4	21	8
C-5	188	15
C-6	148	17
H-5	8	3
H-6	48	8

Tabela 7.2 — Diferença de desvio químico entre os sinais RMN de espécies coordenadas (média dos rotâmeros) e não coordenadas no grupo amina da citidina, $\Delta\delta$, e entre os sinais dos seus rotâmeros, Δ_{rot} .

rápido de coordenação em N-3 (H^+ e Hg^{2+}), uma vez que segue o padrão de intensidade do dobleto de H-6 atribuído a essas espécies. Os sinais de 1H do grupo amina da citidina ligado a um átomo de mercúrio são bem visíveis no espectro a pH 2,40 sob a forma de dois singuletos, mais estreitos que os de $-NH_2$, um para cada orientação desse grupo [142].

A alteração dos espectros de ^{13}C com o pH, Figura 7.10(b), é semelhante ao patenteado pelos espectros de 1H . Para cada núcleo são observados três sinais: um para as espécies sem coordenação no grupo amina e dois para as espécies amino-coordenadas. Estes últimos aumentam de intensidade com o pH, tal como acontece nos espectros de próton, indicando o aumento da quantidade das espécies amino-coordenadas em prejuízo das espécies com o grupo amina completamente protonado.

Também para os espectros de ^{13}C se observa para alguns núcleos distantes dos locais de coordenação, nomeadamente C-6 e C-5, uma maior diferença de desvio químico entre os sinais das espécies amino-coordenadas e não amino-coordenadas que para os núcleos mais próximos, C-4 e C-2. De forma semelhante à dos espectros de 1H , também a diferença de frequência entre os sinais dos isómeros não segue a ordem da distância dos respectivos núcleos às posições de coordenação (Tabela 7.2).

Na Figura 7.11 está representada a evolução com o pH do espectro de uma solução $0.125 \text{ mol.dm}^{-3}$ de $Hg(NO_3)_2$ e $0.200 \text{ mol.dm}^{-3}$ citidina em H_2O em que é visível a coalescência progressiva dos sinais devida ao aumento da velocidade da reacção motivada pelo aumento da concentração da citidina desprotonada em N-3. Na Figura 7.12 está ilustrado a evolução com o pH dos sinais de H-6, mas para soluções mais diluídas, para assegurar a obtenção de condições de equilíbrio lento num intervalo de pH mais amplo; as concentrações são neste caso de 2 mmol.dm^{-3} de $Hg(NO_3)_2$ e 1 mmol.dm^{-3} de citidina e a transição para o regime de equilíbrio rápido é atingida para um pH um pouco superior ao valor do pK_a da citidina.

Nos espectros da Figura 7.13 é possível observar que a coordenação do mercúrio em N-3 implica uma diminuição na diferença de frequência entre os dois sinais do grupo amina, o que pode ser explicado com base na diferença de dureza dos dois catiões: $H^+ > Hg^{2+}$. Com a diminuição de concentração de citidina entre as amostras

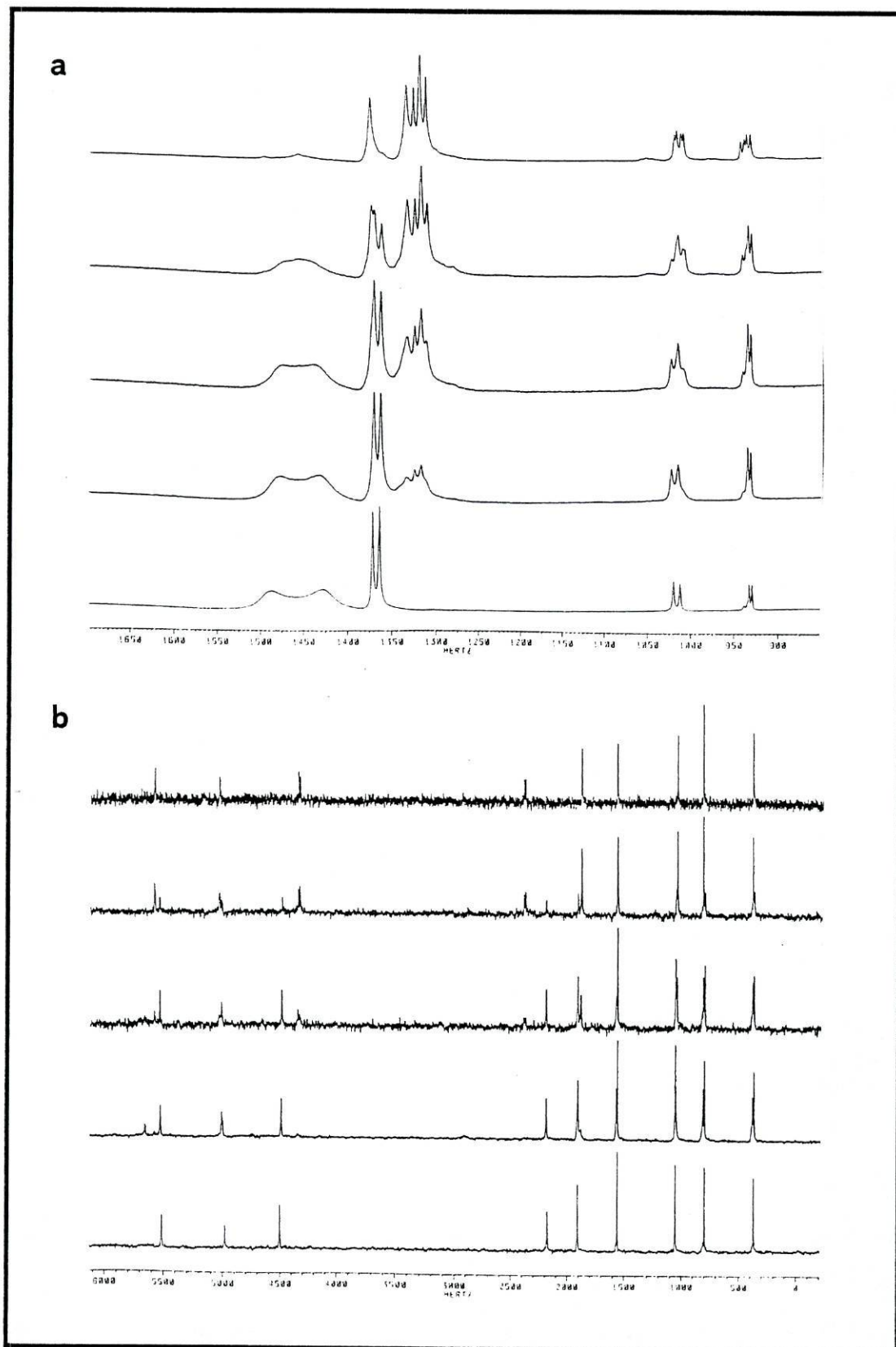


Figura 7.10 — Espectros a 25°C de ^1H (a) e ^{13}C (b) da citidina em soluções de D_2O 0,20 M em citidina e em $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e pH variável com os valores de 0,6 (espectro inferior); 1,0; 1,2; 1,6 e 2,4 (espectro superior); desvios químicos relativos a *tert*-butanol.

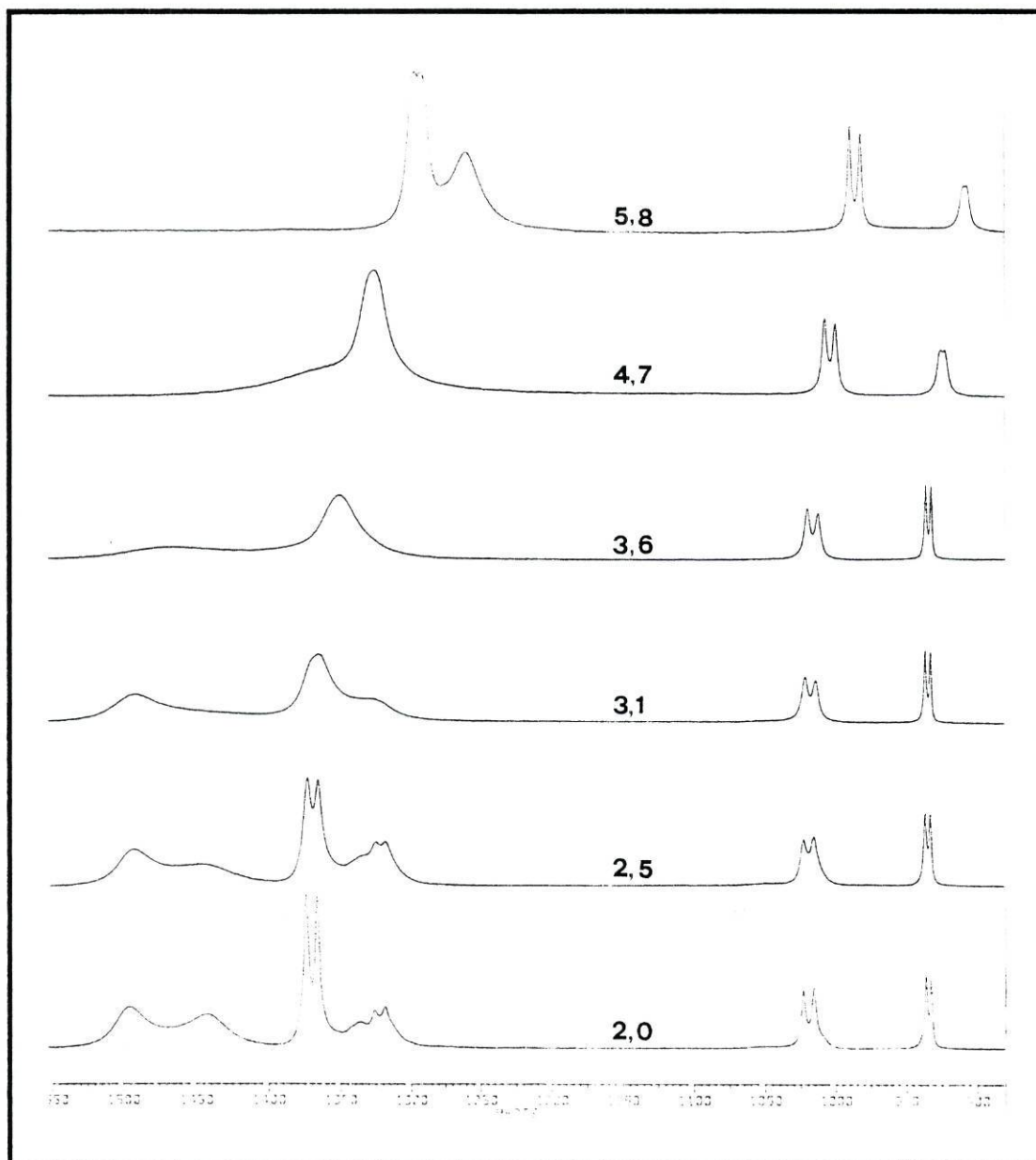


Figura 7.11 — Espectros de ^1H obtidos em soluções aquosas de 0,20 M de citidina e 0,125 M de nitrato de mercúrio a 298K e a vários valores de pH (indicados nos espectros); desvios químicos relativos a *tert*-butanol.

dos espectros a.2 e b.2 e as dos espectros a.3 e b.3, surgem bandas devidas às espécies amino-coordenadas; a diminuição da temperatura de obtenção destes últimos espectros de 25°C para 1°C permite aumentar a sua resolução através do abaixamento da velocidade da troca química entre espécies. Por outro lado, o aumento da temperatura provoca a coalescência dos sinais de citidina (Figura 7.14), que é especialmente visível para os sinais do núcleo H-6, o que prova de forma inequívoca que se está em presença de um equilíbrio lento a 25°C.

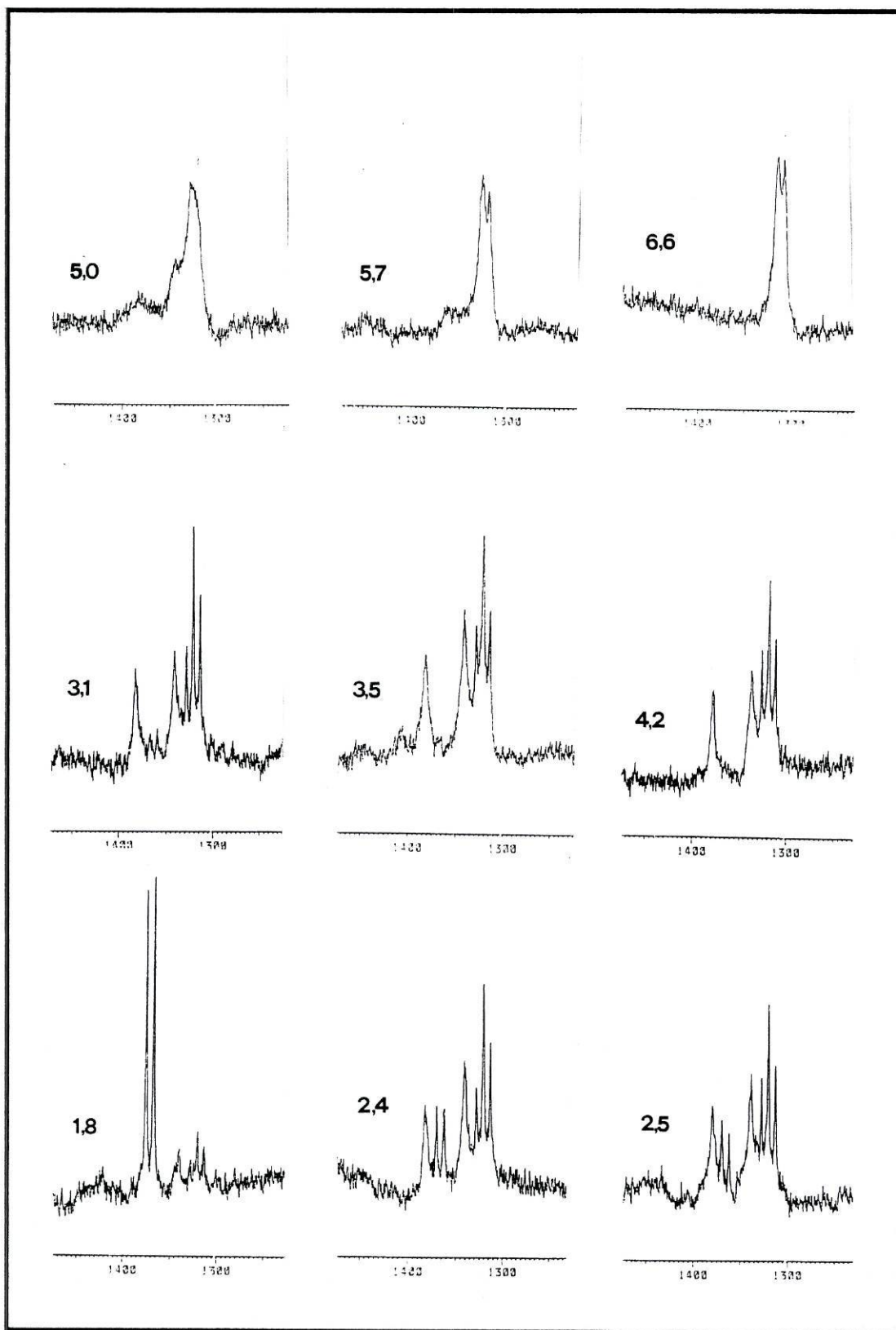


Figura 7.12 — Espectros de ^1H obtidos em soluções aquosas de citidina $0,001\text{ M}$ e nitrato de mercúrio $0,002\text{ M}$ a 298 K e a vários valores de pH (indicados nos espectros); zona dos sinais dos núcleos de H-6 e (N-4)-H (1225 a 1475 Hz relativamente a *tert*-butanol).

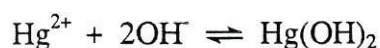
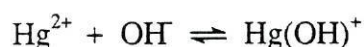
Na Figura 7.15(a) estão representadas as espécies que, com base nos espectros apresentados nesta secção, podem existir em solução aquosa e para valores de pH compreendidos entre 1 e 2. Para valores de pH superiores a 4 é previsível que existam espécies de citidina não coordenadas em N-3, Figura 7.15(b), e também espécies em que o catião Hg^{2+} coordenado à citidina é substituído pelo catião HgOH^+ , Figura 7.15(c).

É importante referir, no entanto, que a existência em solução de várias espécies que contribuem para as bandas observadas nos espectros em regime de equilíbrio lento em soluções de D_2O de citidina e nitrato de mercúrio impede o cálculo directo de constantes de equilíbrio a partir das suas áreas. Optou-se assim por utilizar condições de equilíbrio rápido para esse cálculo, por ajuste iterativo da equação de desvio químico adequada.

2.2 Constantes de equilíbrio para o sistema Hg^{2+} /citidina

NA FIGURA 7.16 SÃO APRESENTADOS OS GRÁFICOS DA VARIAÇÃO DOS DESVIOS QUÍMICOS DA CITIDINA EM FUNÇÃO DO pH EM ESPECTROS DE EQUILÍBRIO RÁPIDO OBTIDOS PARA SOLUÇÕES DE $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ e citidina $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ abrangendo um intervalo de valores de pH entre aproximadamente 1 e 8. A valores de pH superiores a 8 ocorre a formação de $\text{Hg}(\text{OH})_2$ que precipita devido à sua baixa solubilidade em água.

O desvio químico dos diversos sinais é determinado pela quantidade relativa das espécies em solução que contribuem para cada sinal e que depende do valor de pH, o que torna possível o cálculo das constantes de equilíbrio do sistema pelo método já utilizado em secções anteriores. A reacção de protólise da citidina foi incluída em todos os modelos referidos a seguir, com as constantes apresentadas na Tabela 5.4; no entanto, as equações de hidrólises do catião mercúrio



com constantes de equilíbrio $K_{O_1} = 1,58 \times 10^{10}$ e $K_{O_2} = 1,58 \times 10^{20}$, apenas foram consideradas nos modelos utilizados para a análise dos desvios químicos de espectros de soluções com pH superior a 4.

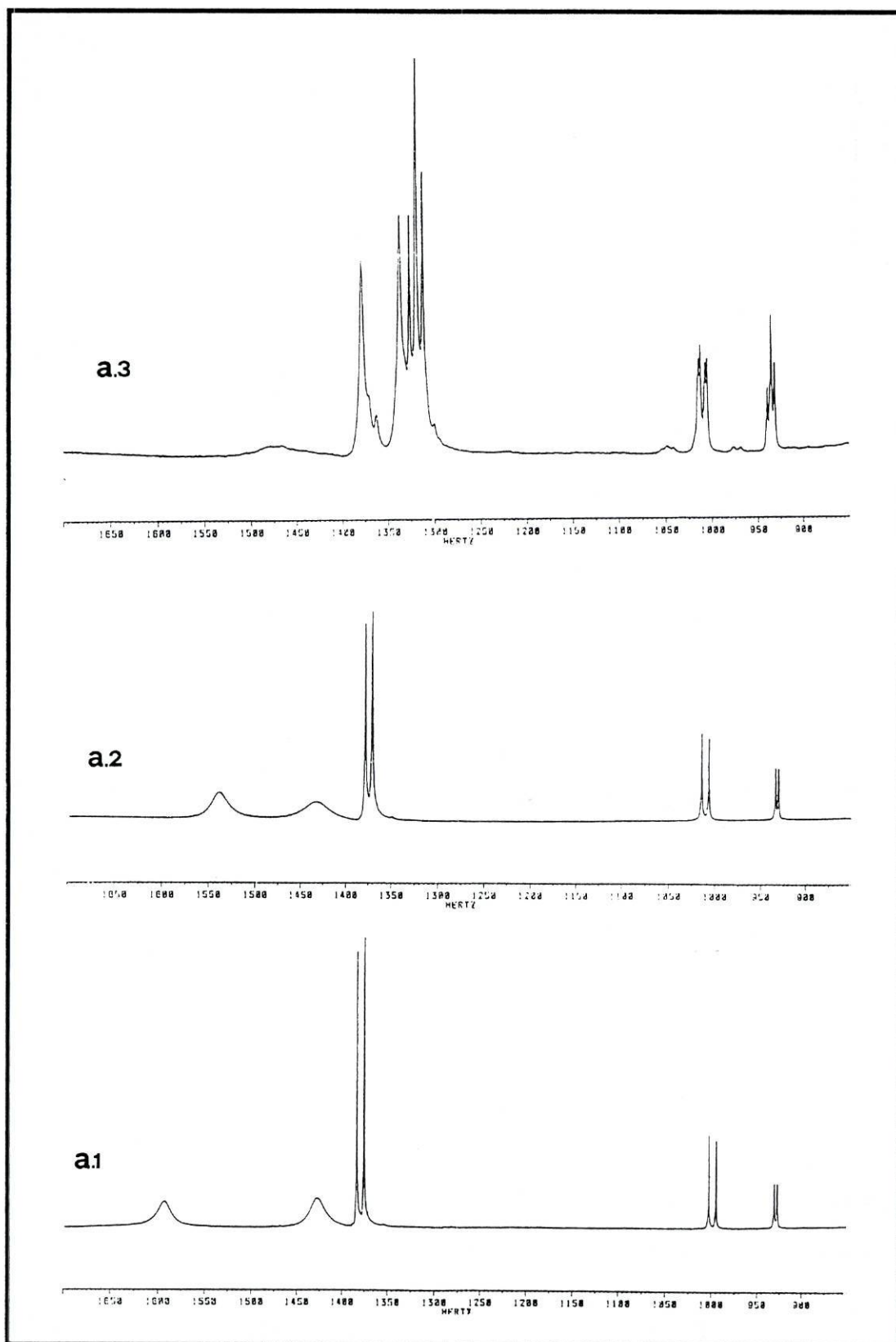


Figura 7.13(a) — Espectros de ^1H de citidina obtidos em soluções aquosas com 0,05 M de citidina (a.1), 0,20 M de citidina e 0,05 M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (a.2) e 0,20 M de citidina e 0,05 M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (a.3), a pH $2,15 \pm 0,05$ e a 25°C .

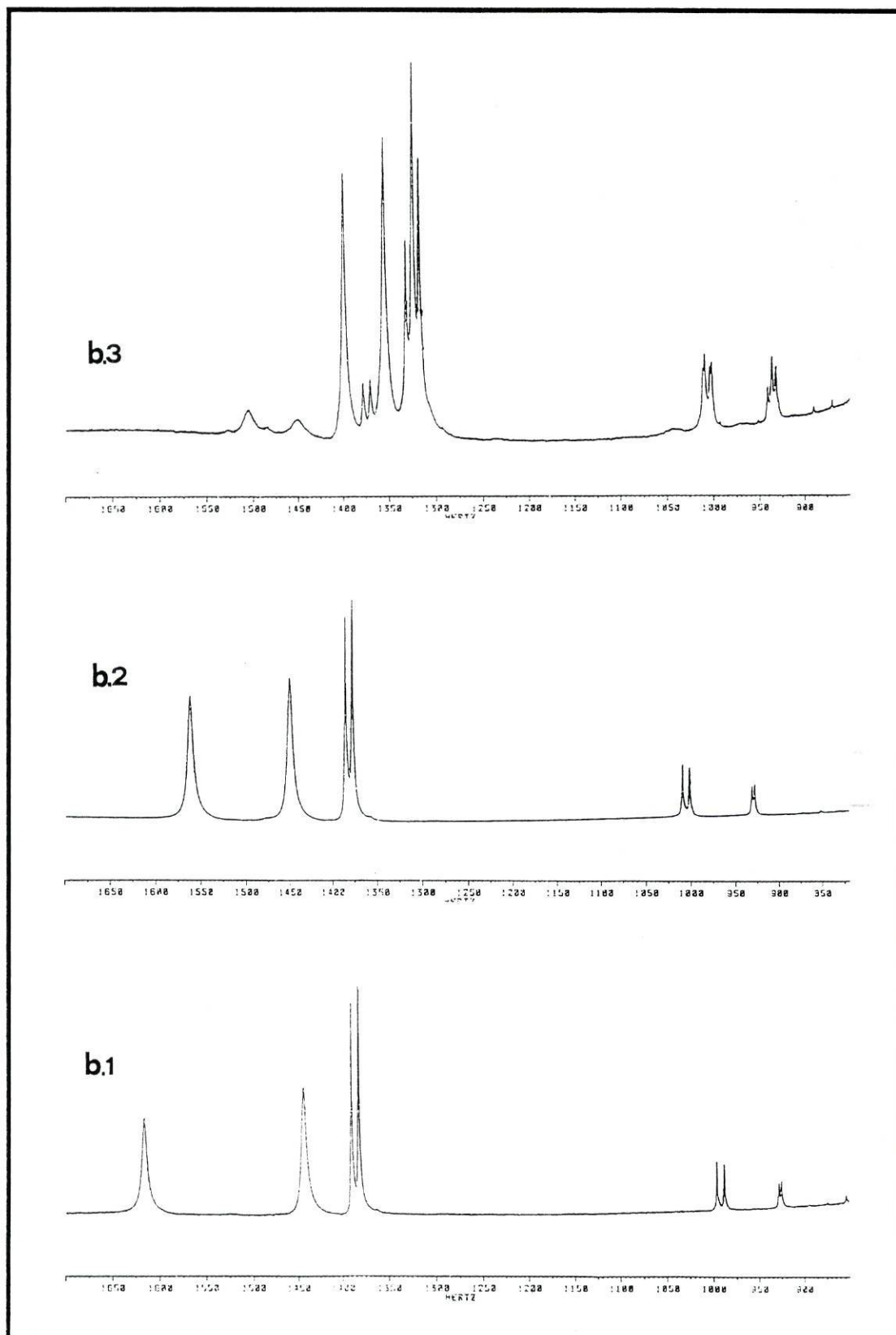


Figura 7.13(b) — Espectros de ^1H de citidina obtidos em soluções aquosas com 0,05 M de citidina (b.1), 0,20 M de citidina e 0,05 M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (b.2) e 0,20 M de citidina e 0,05 M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (b.3), a pH $2,15 \pm 0,05$ e a 1°C .

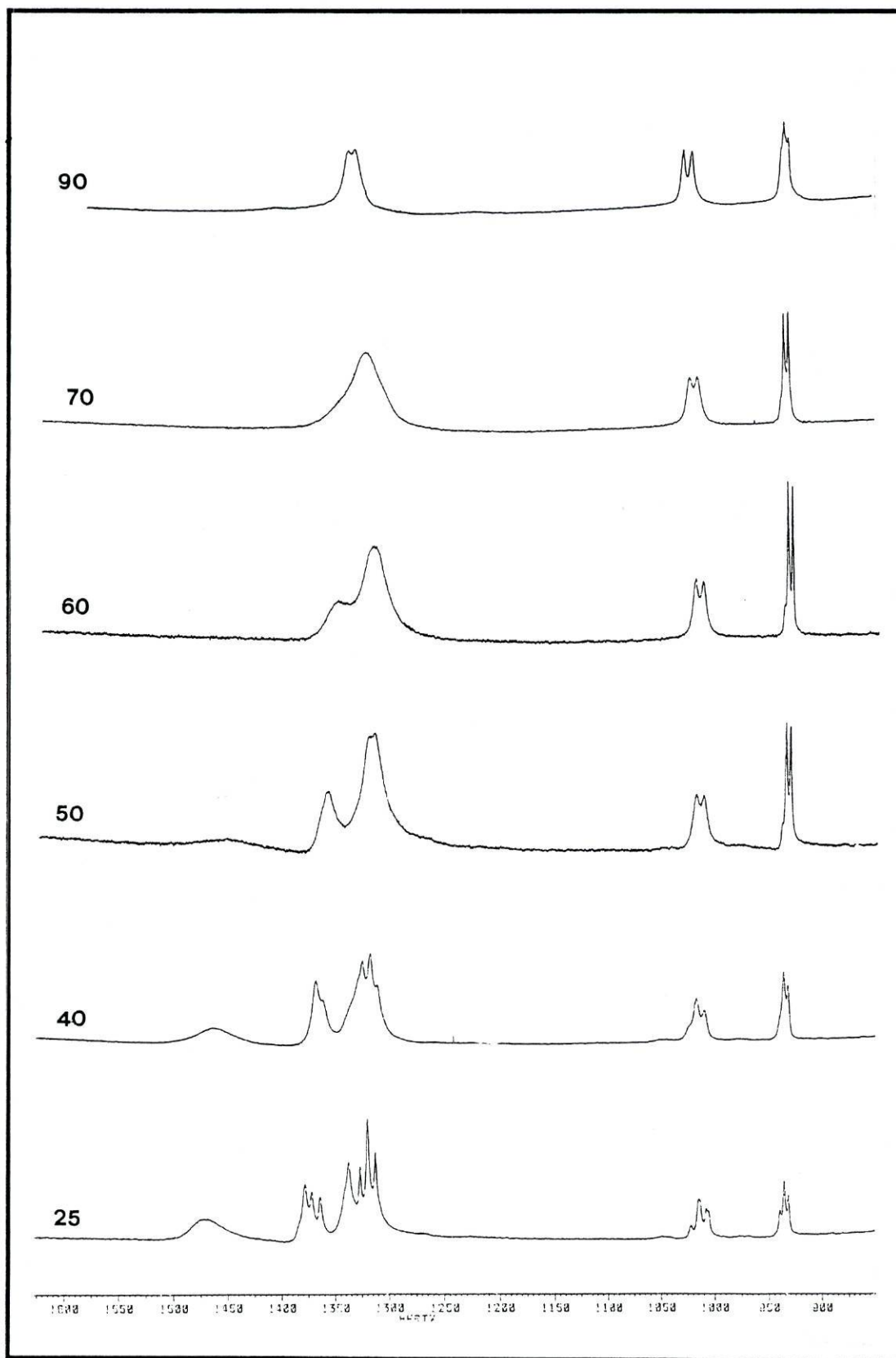


Figura 7.14 — Espectros de ¹H (núcleos H-5 e H-6) obtidos em soluções aquosas de 0,05 M de citidina e de Hg(NO₃)₂ a pH 2,15 ± 0,05 e a temperatura variável (indicada nos espectros em graus centígrados); desvios químicos relativos a *tert*-butanol)

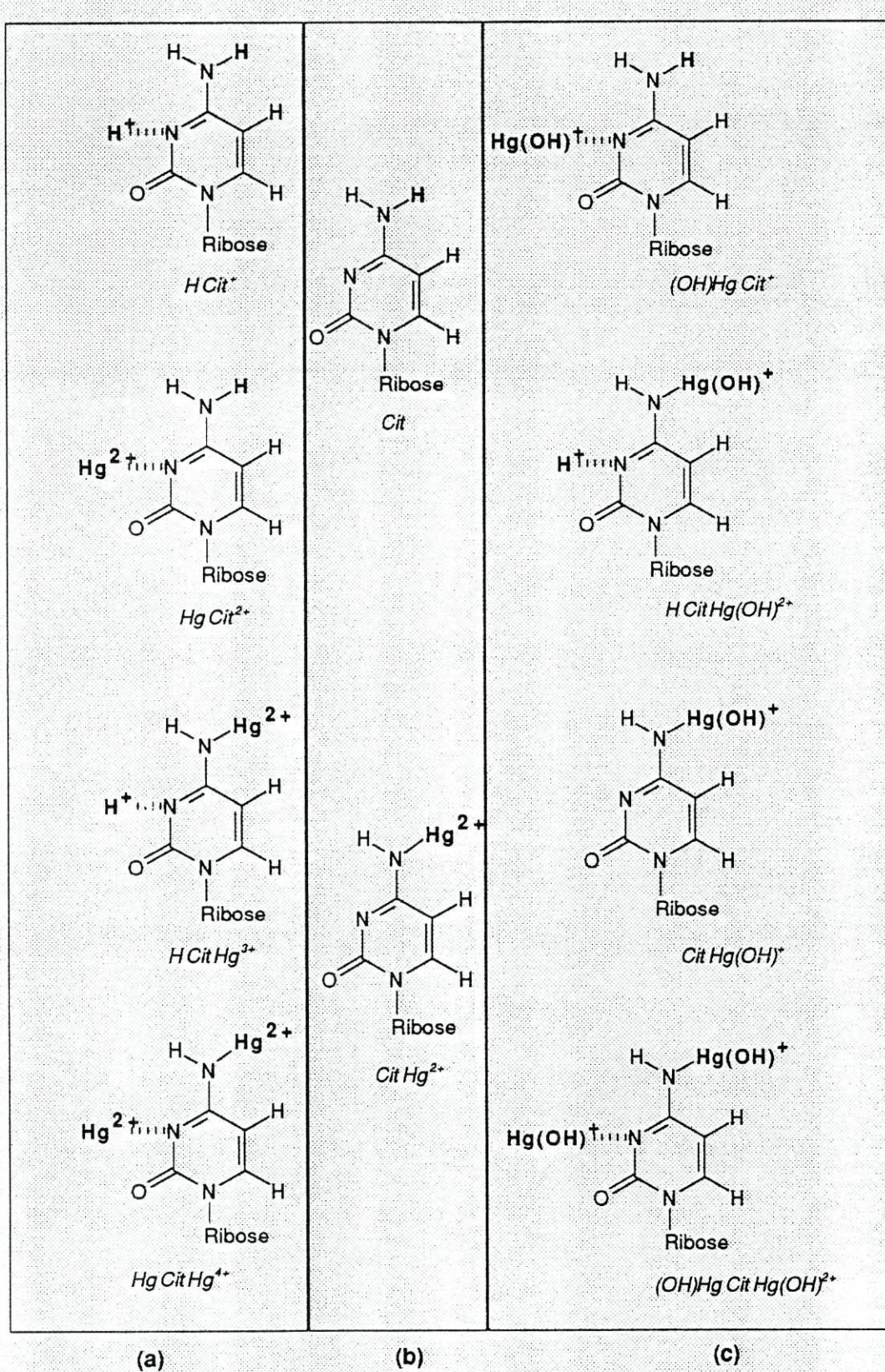


Figura 7.15 — Formas de citidina possivelmente presentes em soluções aquosas de nitrato de mercúrio e citidina e suas designações. (a) Formas com coordenação em N-3; (b) Formas não coordenadas em N-3; (c) Formas em que o catião mercúrio coordena também o anião hidroxilo.

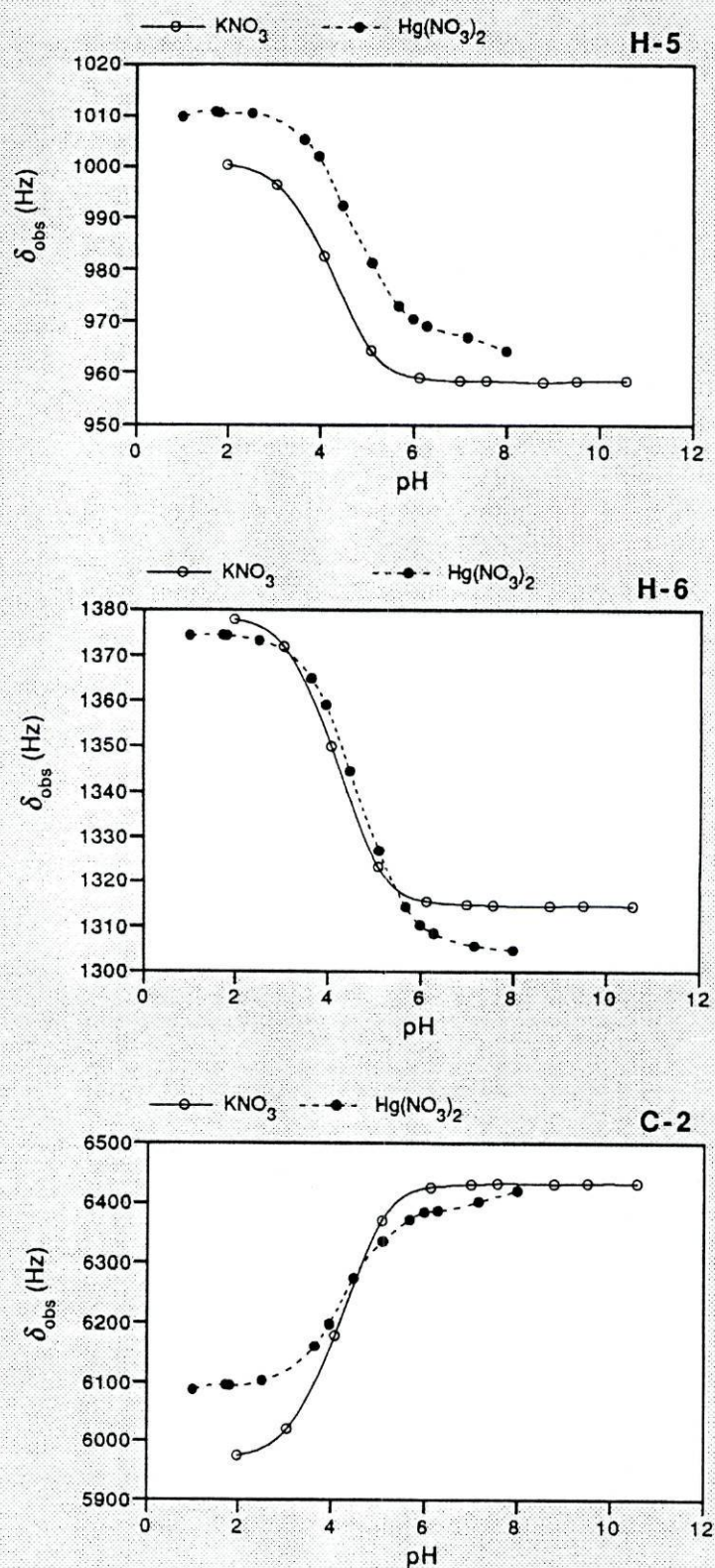


Figura 7.16 — Variação dos desvios químicos dos núcleos de 1H e ^{13}C da base da citidina com o pH, relativamente a *tert*-butanol. $[Hg(NO_3)_2] = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$; $[citidina] = 0,20 \text{ mol dm}^{-3}$.

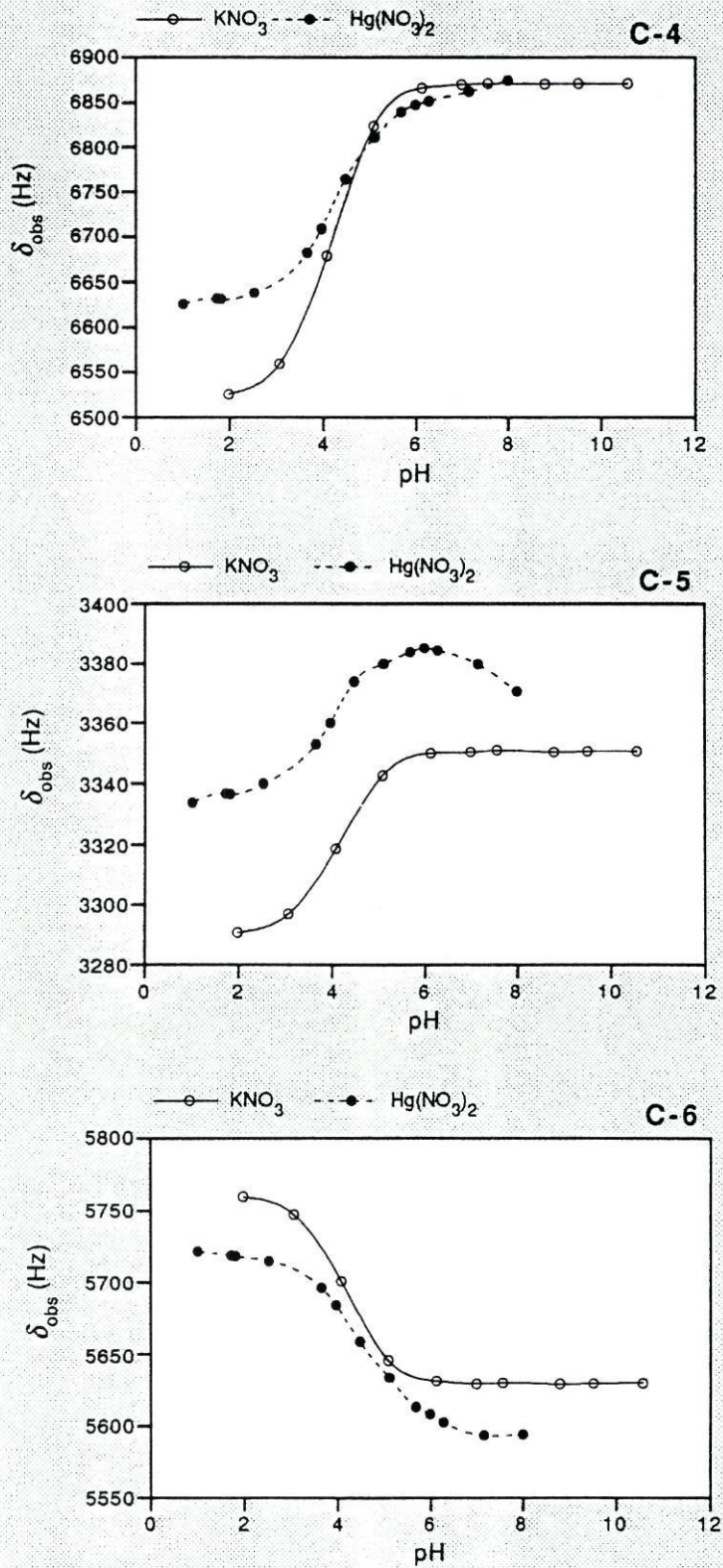
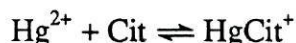
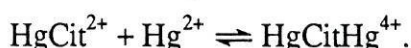


Figura 16 (cont.) — Variação dos desvios químicos dos núcleos de ^1H e ^{13}C da base da citidina com o pH, relativamente a *tert*-butanol. $[\text{Hg}(\text{NO}_3)_2] = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$; $[\text{citidina}] = 0,20 \text{ mol dm}^{-3}$.

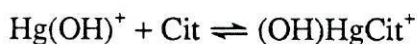
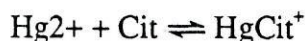
No intervalo de pH entre 1 e 2,5 foi possível efectuar o ajuste dos desvios químicos da Figura 7.16 utilizando o modelo simples



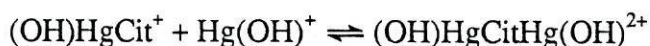
e foi determinado um valor para o logaritmo da constante desta reacção de $5,2 \pm 0,3$. A utilização nas experiências de uma razão molar citidina/ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ de 4:1 e de um meio bastante ácido ($\text{pH} < 2,5$) proporciona uma larga predominância de espécies monocoordenadas (N-3) em detrimento das bicoordenadas (N-3, $-\text{NH}_2$), tornando dispensável a inclusão no modelo da reacção



Para valores de pH superiores a 2,5 é necessário considerar a presença em solução do anião hidróxido que actua como ligando para o mercúrio. No entanto, o modelo construído utilizando, como reacção de complexação, apenas a que envolve a coordenação de $\text{Hg}(\text{OH})^+$ não permite um ajuste aos pontos experimentais obtidos para valores de pH inferiores a 4, pelo que foi necessário utilizar um modelo que incluísse as duas equações de complexação



com constantes de equilíbrio K_1 e K_1' , respectivamente. Este modelo não permitiu ainda a correcta simulação da variação dos pontos experimentais obtidos no intervalo de pH de 1 a 8, no entanto a inclusão no modelo da reacção



com constante de equilíbrio K_2 , permite a simulação das curvas de desvios químicos para todos os núcleos no intervalo de pH de 1 a 8, tendo sido obtidos os valores apresentados na Tabela 7.3. A espécie $\text{HCitHg}(\text{OH})^{2+}$ é pouco importante no intervalo de pH em que foram realizadas as experiências, devendo ser predominante apenas para valores de pH próximos do valor de $\text{p}K_a$ do grupo amina da citidina [138].

Os valores médios calculados para K_1 e K_2 neste trabalho são próximos dos obtidos por Simpson [136] (5,5 para $\log K_1$ e -0,4 para $\log K_2$) utilizando métodos espectrofotométricos. A maior diferença observada para K_1 , determinada naquele trabalho no intervalo de pH entre 2 e 4, pode ter origem na não inclusão da constante K_1' no modelo usado por Simpson.

3. O sistema ternário $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ / Citidina / Glicilglicina

NA SEQUÊNCIA DO ESTUDO já apresentado dos complexos de citidina e glicilglicina com os cátions cádmio e zinco procurou-se determinar se em soluções de nitrato de mercúrio/citidina/glicilglicina ocorre a formação do complexo ternário misto e se a sua estabilidade é superior à dos complexos binários. Num trabalho anterior, Li *et al.* encontraram evidência para a não existência do complexo misto analisando a variação dos desvios químicos do núcleo de H-5 da citidina em experiências com pH fixo e concentração de nitrato de mercúrio variável [79].

Neste trabalho não foi possível o cálculo das constantes de formação dos complexos mistos devido à grande dimensão dos modelos a utilizar para a simulação dos desvios químicos. No entanto, com o objectivo de obter informações sobre a formação do complexo ternário misto, foram analisados qualitativa e semi-quantitativamente os espectros de equilíbrio lento e de equilíbrio rápido de sistemas ternários $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ /glicilglicina/citidina em solução aquosa.

3.1 Estudo das espécies em solução

OS ESPECTROS DE ALGUMAS EXPERIÊNCIAS executadas a pH 1,6, em condições de equilíbrio lento, são apresentadas na Figura 7.17. O aspecto mais saliente das sequências de espectros em que a concentração de glicilglicina é variável e as concentrações de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e citidina são fixas é a diminuição da intensidade dos sinais de formas de citidina amino-coordenada à medida que é aumentada a concentração de glicilglicina, que é patente tanto nos espectros de ^1H como de ^{13}C (Figura 7.17(a) e (b), respectivamente). Não se verifica o aparecimento de novos sinais para além dos já

	Núcleo						Média
	C-2	C-4	C-5	C-6	H-5	H-6	
$\log K_1'$	5,27	5,11	5,30	5,00	5,06	4,79	$5,1 \pm 0,3$
$\log K_1$	4,70	4,56	4,90	4,53	4,52	4,31	$4,6 \pm 0,3$
$\log K_2$	-0,18	-0,29	0,01	-0,11	0,11	-0,46	$-0,2 \pm 0,3$

Tabela 7.3 — Valores para as constantes de equilíbrio do sistema nitrato de mercúrio / glicilglicina entre pH 1 e 7,15 (ver o texto para as definições de K_1' , K_1 e K_2).

observados nos espectros dos sistemas binários discutidos em secções anteriores. Assim, a formação de espécies de glicilglicina coordenada a catião mercúrio, cujos sinais para o grupo amina são visíveis nos espectros da Figura 7.17, ocorre, pelo menos em parte, à custa da desmercuração do grupo amina da citidina. É portanto pouco provável que se formem complexos ternários envolvendo mercúrio e glicilglicina através de ligação a esse grupo funcional.

É também possível observar que nenhuma das bandas do núcleo H-6 da citidina apresenta desvio, dentro da margem de erro experimental, provocado pela adição de glicilglicina às soluções equimolares de nitrato de mercúrio e citidina. Esta observação permite concluir que não deve ocorrer formação de compostos ternários através de ligação do catião mercúrio ao azoto endocíclico N-3 da citidina e que a glicilglicina não desloca catiões mercúrio que estejam ligados a esse átomo.

4. Conclusão

O CATIÃO Hg^{2+} DIFERE marcadamente dos elementos mais leves do grupo 12 na sua coordenação aos ligandos estudados, glicilglicina e citidina. Embora os locais de coordenação sejam os mesmos para os três catiões metálicos, com a excepção do grupo amina da citidina ao qual os catiões Zn^{2+} e Cd^{2+} não coordenam apreciavelmente, as constantes de equilíbrio refletem o carácter mais macio do catião mercúrio pois são mais elevadas para a coordenação aos grupos amina e insignificantes para a coordenação ao grupo carboxílico da glicilglicina, embora este tipo de coordenação tenha sido observado noutras situações [143,144]. As elevadas constantes de formação de Hg^{2+} com o grupo amina da glicilglicina tornou impossível avaliar a estabilidade da ligação ao grupo carboxílico desse dipeptídeo.

Tanto no caso da glicilglicina como no da citidina, os resultados obtidos para o estudo dos complexos com mercúrio(II) concordam com os publicados até agora por outros autores no que se refere aos locais de coordenação e às constantes de equilíbrio determinadas por outros métodos. Por outro lado, ao contrário dos catiões zinco(II) e cádmio(II), o catião mercúrio(II) parece não formar o complexo ternário com a citidina e a glicilglicina em água, pelo menos para valores de pH menores que 2.

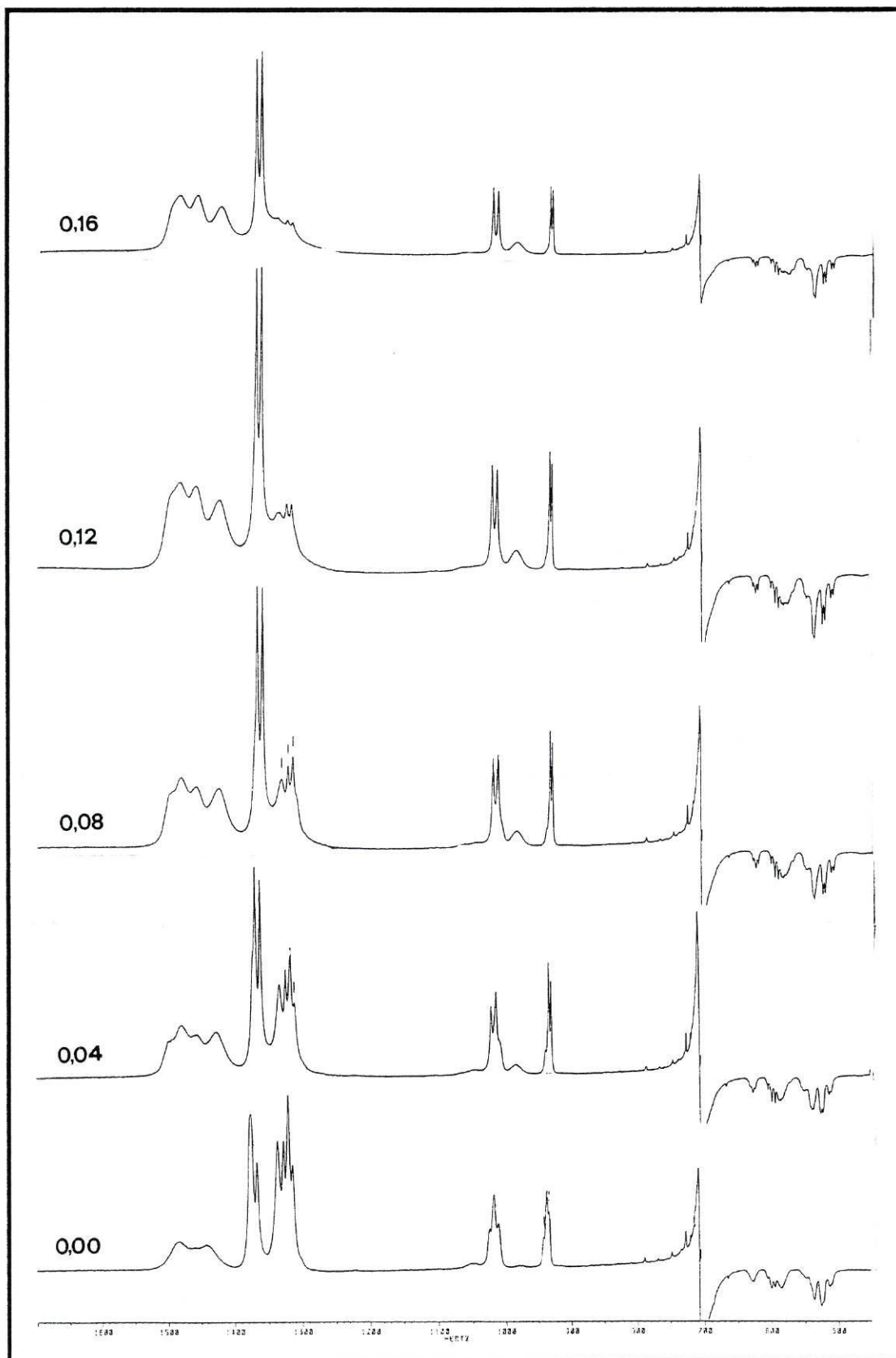


Figura 7.17(a) — Espectros de ¹H de soluções aquosas 0,16 M em Hg(NO₃)₂, 0,16 M em citidina e concentração variável de glicilglicina (referida nos espectros), a pH = 1,6 ± 0,05 e 25°C; desvios químicos relativos a *tert*-butanol.

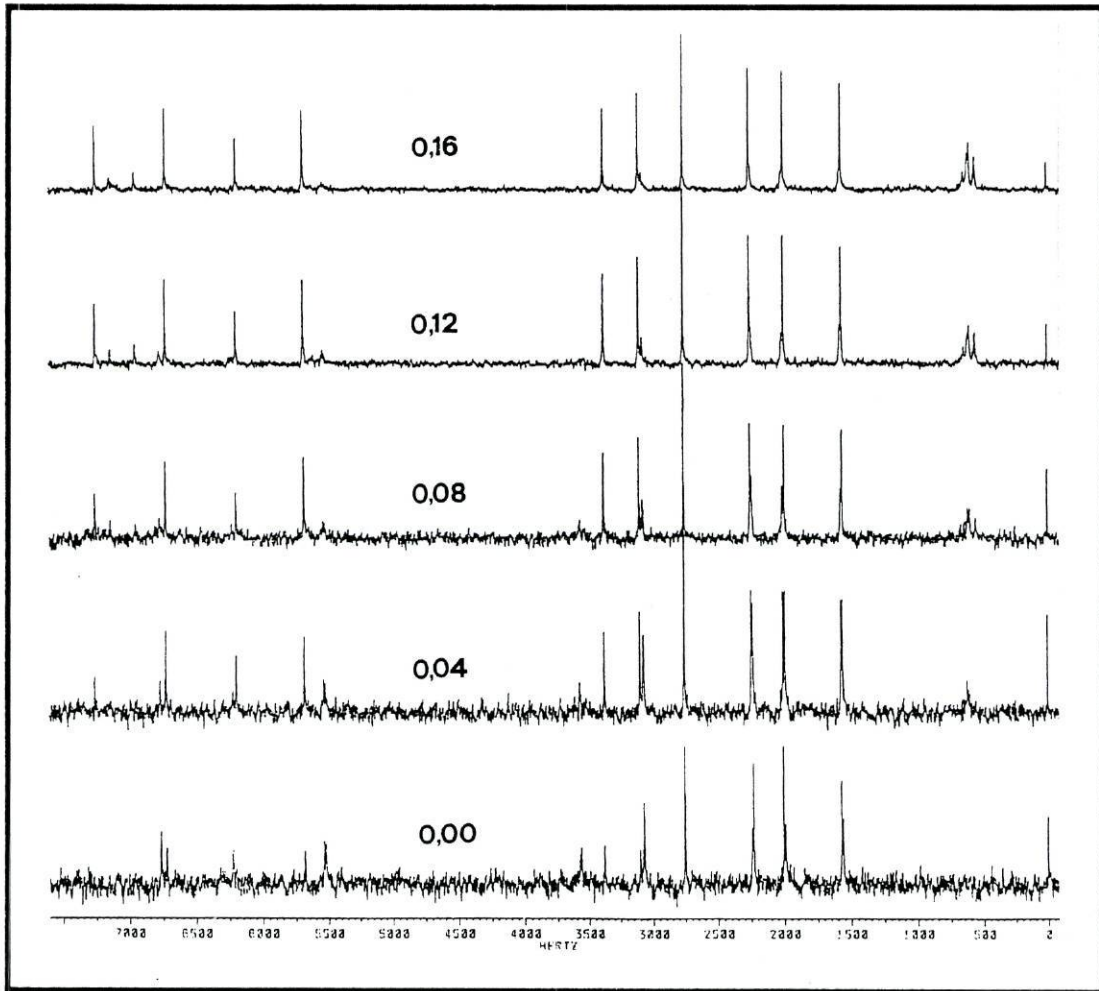


Figura 7.17(b) — Espectros de ^{13}C de soluções aquosas $0,16\text{ M}$ em $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $0,16\text{ M}$ em citidina e concentração variável de glicilglicina (referida nos espectros), a $\text{pH} = 1,6 \pm 0,05$ e 25°C ; desvios químicos relativos a *tert*-butanol.

III

*Cálculo Teórico e
Determinação Experimental de
Constantes de Relaxação Transversal
em RMN*

NA PARTE III DESTA TESE são sistematizados os resultados do cálculo teórico de T_2 para diversas ordens de coerência positivas existentes num sistema composto por 5 núcleos de número quântico de spin 1/2, fracamente acoplados, assumindo a existência de mecanismos de relaxação por acoplamento dipolar directo e indirecto e por anisotropia de desvio químico. Destes resultados podem ser deduzidos os correspondentes a sistemas compostos por de 2 a 4 núcleos. É também descrita a utilização de recursos computacionais para o cálculo das matrizes de relaxação da equação de Redfield. Na secção 8.2 são aplicadas duas sequências de impulsos para a determinação de constantes de tempo de relaxação transversal das coerências de quantum nulo e quantum duplo para um sistema AX de primeira ordem.

Cálculo teórico e determinação de constantes de tempo de relaxação transversal, T_2

O ESTUDO DA RELAXAÇÃO em RMN tem tido uma importância fundamental na compreensão de fenômenos tão diversos como a formação de complexos e determinação das suas constantes de equilíbrio [46], a dinâmica conformacional de moléculas [145,146] e o cálculo de distâncias internucleares através da medição do efeito Overhauser nuclear (EON), sendo este último aspecto o mais importante para o estudo da estrutura de proteínas em solução com peso molecular até cerca de 15 KDa.

A dependência da eficácia dos mecanismos de relaxação com o tipo de movimento molecular, nomeadamente através das suas funções de correlação e respectivas funções de densidade espectral, possibilitam o estudo de modelos de movimento molecular através da simulação dos tempos de relaxação nucleares [147]. O estudo dos tempos de relaxação pode também fornecer informação importante sobre a extensão da formação de complexos bem como sobre os locais de coordenação. Foi também reconhecido que a relaxação proporciona um mecanismo de transferência de coerência entre núcleos sem que exista acoplamento escalar [148]. As técnicas de impulsos permitiram observar, embora indirectamente, transições "proibidas" o que estimulou o cálculo teórico e a medição experimental das constantes de relaxação para essas transições [38,149].

A teoria semi-clássica da matriz densidade para a relaxação nuclear tem sido usada desde longa data para obter informações sobre a dinâmica molecular [150,151]. O mecanismo de relaxação dipolar é o mais importante para líquidos ou soluções com movimento isotrópico, mas a interferência de outros mecanismos, como a relaxação devida à anisotropia de desvio químico (*ADQ*) e o acoplamento escalar (*AE*) não são desprezáveis em muitos casos [152,153]. O cálculo teórico de

constantes de tempo de relaxação transversal, T_2 , para várias ordens de coerência observáveis em RMN, foi executado para sistemas com 2, 3 e 4 núcleos de spin 1/2, não acoplados ou fracamente acoplados [37,38,154].

Neste Capítulo é apresentado o algoritmo de cálculo da supermatriz de relaxação para sistemas de spins de número quântico de spin 1/2 com interações dipolares e de anisotropia de desvio químico e também os resultados do cálculo teórico de T_2 para alguns casos. São ainda descritos os resultados preliminares de duas sequências de impulsos utilizadas para a determinação das constantes de tempo de relaxação transversais para as transições de quantum nulo e de quantum duplo num sistema de dois núcleos de spin 1/2 com acoplamento fraco (sistema AX).

1. Cálculo teórico de T_2

1.1 Método

ESTE CÁLCULO É BASEADO na aplicação do superoperador de relaxação, equações 2.65, 2.68 e 2.70, a operadores que representam transições RMN de que se pretende calcular as constantes de tempo de relaxação.

Por uma questão de organização dos resultados da secção 8.1.3, os núcleos serão designados pelas letras A, I, M, S e X. O sistema de dois núcleos é designado por AI, o de três por AIM, o de quatro por AIMS e o de cinco por AIMSX. Esta notação não pretende simbolizar o tipo de espectro pois em todos os cálculos efectuados foi assumida a presença de acoplamento fraco ou nulo entre os spins e, portanto, de espectros de primeira ordem.

Para precisar o método de cálculo, é apresentado a seguir o exemplo do cálculo explícito da matriz de relaxação para ordem de coerência $p = +1$ do núcleo A de um sistema AI. É calculada a matriz de relaxação para os operadores produto do spin do núcleo A, I_+^A e $2I_+^A I_z^I$, substituindo H_1 por $H_{DD_k} + H_{ADQ_m}$ na equação 2.63. Os coeficientes numéricos dos factores $V^{(q)}$ destes Hamiltonianos foram transferidos para os factores geométricos, e logo, para as funções de densidade espectral, tendo os cálculos sido executados com coeficientes unitários. No entanto, os operadores $I_+^k I_-^l$ e $I_-^k I_+^l$ de $V_k^{(q)}$ do Hamiltoniano H_{DD_k} foram usados com coeficiente -1/4 para normalizar as funções de densidade espectral para as quais $q = 0$.

O primeiro passo do cálculo consiste na aplicação da equação 2.68 que implica o desenvolvimento do comutador duplo

$$\sum_q \sum_p J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) [A_p^{(-q)}, [A_p^{(q)}, \sigma^{\text{int}}(t) - \sigma_{\text{eq}}]].$$

No estado de equilíbrio (fim da relaxação) a magnetização transversal é nula e por isso $\sigma_{\text{eq}} = 0$. É assim necessário proceder à simplificação da seguinte expressão de comutadores para $Q = I_+^A$, em que foi utilizada a igualdade $J(\omega) = J(-\omega)$:

$$\begin{aligned} & J^{(0)}(0) [D_{AI_z}^A I_z^I + C_A I_z^A + C_I I_z^I, [D_{AI_z}^A I_z^I + C_A I_z^A + C_I I_z^I, I_+^A]] + \\ & J^{(0)}(\omega_A - \omega_I) \{ [D_{AI}(-1/4) I_+^A I_+^I, [D_{AI}(-1/4) I_+^A I_+^I, I_+^A]] + \\ & \quad [D_{AI}(-1/4) I_+^A I_+^I, [D_{AI}(-1/4) I_+^A I_+^I, I_+^A]] \} + \\ & J^{(1)}(\omega_A) \{ [D_{AI} I_+^A I_z^I + C_A I_+^A, [D_{AI} I_+^A I_z^I + C_A I_+^A, I_+^A]] + \\ & \quad [D_{AI} I_+^A I_z^I + C_A I_+^A, [D_{AI} I_+^A I_z^I + C_A I_+^A, I_+^A]] \} + \\ & J^{(1)}(\omega_I) \{ [D_{AI} I_+^I I_z^A + C_I I_+^I, [D_{AI} I_+^I I_z^A + C_I I_+^I, I_+^A]] + \\ & \quad [D_{AI} I_+^I I_z^A + C_I I_+^I, [D_{AI} I_+^I I_z^A + C_I I_+^I, I_+^A]] \} + \\ & J^{(2)}(\omega_A + \omega_I) \{ [D_{AI} I_+^A I_+^I, [D_{AI} I_+^A I_+^I, I_+^A]] + [D_{AI} I_+^A I_+^I, [D_{AI} I_+^A I_+^I, I_+^A]] \} \end{aligned} \quad (8.1)$$

Seguidamente, é também calculada uma expressão semelhante para $Q = 2I_+^A I_+^I$, mas que não será aqui apresentada.

As funções de densidade espectral representadas por $J^{(q)}(\omega)$ funcionam aqui apenas como uma referência relativamente à frequência a que a parcela diz respeito para facilitar a realização dos cálculos. De facto, e de acordo com a equação 2.56, aquelas funções resultam da média estatística e temporal dos produtos das funções $Y_{2,\mu}^{(q)}$ e/ou $Y_{2,m}^{(q)}$ de H_1 , omitidas na expressão 8.1, e são portanto dependentes do tipo de núcleos e das interações em causa, sendo facilmente regeneradas a partir dos índices das constantes C e D que afectam os produtos de operadores resultantes da simplificação. A aplicação da equação 2.63 (de que é derivada a equação usada no cálculo, 2.68) a sistemas com diferente número de núcleos e usando uma soma de diferentes Hamiltonianos de interacção, origina diversas funções de densidade espectral. De seguida é sumarizada a notação usada neste trabalho para essas funções:

$$J_{ij\mu}^{(q)}(\omega) = (1/2) D_{ij} D_{\mu} \int \overline{Y_{2,ij}^{(q)}(0) Y_{2,\mu}^{(-q)}(\tau)} e^{(-i\omega\tau)} d\tau \quad (8.2a)$$

$$J_{ij}^{(q)}(\omega) = (1/2) C_i C_j \int \overline{Y_{2,i}^{(q)}(0) Y_{2,j}^{(-q)}(\tau)} e^{(-i\omega\tau)} d\tau \quad (8.2b)$$

$$J_{i\mu}^{(q)}(\omega) = (1/2) C_i D_{\mu} \int \overline{Y_{2,i}^{(q)}(0) Y_{2,\mu}^{(-q)}(\tau)} e^{(-i\omega\tau)} d\tau \quad (8.2c)$$

onde os integrais se estendem de menos infinito a mais infinito; notar que as funções de correlação são estacionárias e que dependem apenas de τ , pelo que a variável t da equação 2.58 pode ser substituída por zero.

Para a simplificação da expressão 2.1 é usada a propriedade comutativa entre os operadores que correspondem a núcleos diferentes, e são aplicadas as seguintes igualdades quando os operadores correspondentes ao mesmo núcleo:

$$\begin{array}{lll} I_z I_+ = (1/2)I_+ & I I_+ = 1/2 - I_z & I_+ I_z = -(1/2)I_+ \\ I_z I_- = -(1/2)I_- & I_+ I_- = 1/2 + I_z & I I_z = (1/2)I_- \\ I I_- = 0 & I_+ I_+ = 0 & I_+ I_z = 1/4 \end{array}$$

Estas regras foram integradas na subrotina de simplificação das expressões de operadores calculadas pelo programa RELAX, descrito na secção seguinte.

Os resultados da simplificação de 2.1 para os operadores produto I_+^A e $2I_+^A I_z^I$ podem ser expressos sob a forma de matriz, a que chamaremos \mathbf{R}_{op} , com os elementos $d_{e.f.}$, $d_{a.f.}$ e c :

$$\begin{bmatrix} d\langle I_+^A \rangle / dt \\ d\langle 2I_+^A I_z^I \rangle / dt \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} d_{e.f.} & c \\ c & d_{a.f.} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \langle I_+^A \rangle \\ \langle 2I_+^A I_z^I \rangle \end{bmatrix} \quad (8.3)$$

em que

$$\begin{aligned} d_{e.f.} &= J_{AA}^{(0)}(0) + (1/4)J_{AIAI}^{(0)}(0) + (1/16)J_{AIAI}^{(0)}(\omega_A - \omega_I) + \\ &\quad 2J_{AA}^{(1)}(\omega_A) + (1/2)J_{AIAI}^{(1)}(\omega_A) + J_{AIAI}^{(1)}(\omega_I) + J_{AIAI}^{(2)}(\omega_A + \omega_I) \\ d_{a.f.} &= J_{AA}^{(0)}(0) + (1/4)J_{AIAI}^{(0)}(0) + (1/16)J_{AIAI}^{(0)}(\omega_A - \omega_I) + \\ &\quad 2J_{AA}^{(1)}(\omega_A) + (1/2)J_{AIAI}^{(1)}(\omega_A) + 4J_{II}^{(1)}(\omega_I) + J_{AIAI}^{(2)}(\omega_A + \omega_I) \\ c &= J_{AAI}^{(0)}(0) + 2J_{AAI}^{(1)}(\omega_A). \end{aligned}$$

Seguidamente, por aplicação de uma operação unitária à equação 8.3 análoga à utilizada na equação 2.51, com \mathbf{X} definido por

$${}^2\mathbf{X} = 2^{-1/2} \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}$$

é obtida a matriz de relaxação de Redfield ${}^{2U}\mathbf{R}$ para os operadores de transição $I_\alpha^{A+} = I_+^A + 2I_+^A I_z^I$ e $I_\beta^{A+} = I_+^A - 2I_+^A I_z^I$ onde os índices inferiores, α e β , se referem ao estado de spin do núcleo I:

$$\begin{bmatrix} d\langle I_\alpha^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_\beta^{A+} \rangle / dt \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} {}^{2U}D_\alpha & {}^{2U}C_{1,2} \\ {}^{2U}C_{2,1} & {}^{2U}D_\beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \langle I_\alpha^{A+} \rangle \\ \langle I_\beta^{A+} \rangle \end{bmatrix} \quad (8.4)$$

com

$${}^{2U}\mathbf{R} = \begin{bmatrix} {}^{2U}D_\alpha & {}^{2U}C_{1,2} \\ {}^{2U}C_{2,1} & {}^{2U}D_\beta \end{bmatrix}$$

e

$$\begin{aligned} {}^{2U}D_\alpha &= J^{(0)}_{AA}(0) + (1/4)J^{(0)}_{AIAI}(0) + J^{(0)}_{AAI}(0) + (1/16)J^{(0)}_{AIAI}(\omega_A - \omega_I) + \\ & 2J^{(1)}_{AA}(\omega_A) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_A) + 2J^{(1)}_{AAI}(\omega_A) + \\ & 2J^{(1)}_{II}(\omega_I) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_I) + J^{(2)}_{AIAI}(\omega_A + \omega_I) \\ {}^{2U}D_\beta &= J^{(0)}_{AA}(0) + (1/4)J^{(0)}_{AIAI}(0) - J^{(0)}_{AAI}(0) + (1/16)J^{(0)}_{AIAI}(\omega_A - \omega_I) + \\ & 2J^{(1)}_{AA}(\omega_A) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_A) - 2J^{(1)}_{AAI}(\omega_A) + \\ & 2J^{(1)}_{II}(\omega_I) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_I) + J^{(2)}_{AIAI}(\omega_A + \omega_I) \\ {}^{2U}C_{1,2} &= {}^{2U}C_{2,1} = (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_I) - 2J^{(1)}_{II}(\omega_I). \end{aligned}$$

Os elementos da diagonal principal de ${}^{2U}\mathbf{R}$ correspondem a $(1/T_2)_{|\alpha\alpha\rangle \rightarrow |\beta\alpha\rangle}$ e a $(1/T_2)_{|\alpha\beta\rangle \rightarrow |\beta\beta\rangle}$ para I_α^{A+} e I_β^{A+} , respectivamente, se o acoplamento estiver bem resolvido. No caso da constante de acoplamento J_{AI} ser nula então a resolução de 8.4 para este sistema envolve os elementos fora da diagonal da matriz de relaxação, cálculo que pode sempre ser feito por diagonalização numérica dessa matriz [37].

Para a transição de quantum nulo deste sistema ($p = 0$), cuja magnetização pode ser representada por I_+^{AI} , teremos a equação

$$d\langle I_+^{AI} \rangle / dt = {}^{2N}D \langle I_+^{AI} \rangle \quad (8.5)$$

com

$$\begin{aligned} {}^{2N}D &= (1/T_2)_{|\alpha\beta\rangle \rightarrow |\beta\alpha\rangle} = J^{(0)}_{AA}(0) + J^{(0)}_{II}(0) - 2J^{(0)}_{AI}(0) + 2J^{(0)}_{AIAI}(\omega_A - \omega_I) + \\ & 2J^{(1)}_{AA}(\omega_A) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_A) + 2J^{(1)}_{II}(\omega_I) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_I). \end{aligned}$$

De forma análoga, para a transição de quantum duplo ($p = +2$), cuja magnetização pode ser representada por $I_+^A I_+^I$, teremos a equação

$$d\langle I_+^A I_+^I \rangle / dt = {}^{2D}D \langle I_+^A I_+^I \rangle \quad (8.6)$$

com

$$\begin{aligned} {}^{2D}D &= (1/T_2)_{|\alpha\alpha\rangle \rightarrow |\beta\beta\rangle} = J^{(0)}_{AA}(0) + J^{(0)}_{II}(0) + 2J^{(0)}_{AI}(0) + 2J^{(1)}_{AA}(\omega_A) + \\ & (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_A) + 2J^{(1)}_{II}(\omega_I) + (1/2)J^{(1)}_{AIAI}(\omega_I) + 2J^{(2)}_{AIAI}(\omega_A + \omega_I). \end{aligned}$$

1.2 Computação

PARA A EXECUÇÃO DOS CÁLCULOS foi escrito o programa RELAX em FORTRAN de precisão dupla (16 dígitos). Este programa executa todas as manipulações determi-

nadas pelo cálculo usando várias matrizes tridimensionais, onde são representados através de um código de três dígitos os operadores, as constantes C_m e D_{ij} e as constantes numéricas.

Na Figura 8.1 está representada a sequência simplificada das operações executadas por RELAX sendo necessários dois ficheiros de entrada: um deles contém os operadores produto relevantes para o sistema em causa e também informação sobre o tipo de relaxação requerida para cada núcleo: ADQ (anisotropia de desvio químico) e DD (dipolo-dipolo); ou só DD . O segundo ficheiro contém a matriz X que servirá para calcular a matriz de relaxação R (ver exemplo na Figura 8.2).

Depois da leitura dos dados, o programa gera uma expressão equivalente a 8.1 para cada operador produto, faz a expansão dos comutadores e a sua simplificação. Estas operações são executadas em memória RAM pelo que, por uma questão de economia de espaço, são realizadas por partes: é calculado isoladamente o resultado correspondendo a cada $J^{(q)}$ e, para cada $J^{(q)}$, é feita separadamente a expansão e a simplificação de cada um dos comutadores.

O resultado deste primeiro cálculo, a matriz R_{op} , é armazenado num ficheiro temporário que servirá como ficheiro de entrada para o cálculo de R . Para este cálculo o programa calcula o inverso de X , X^{-1} , e executa a operação $XR_{op}X^{-1}$, seguida da respectiva simplificação e apresentação sob a forma de ficheiro de saída. Esta segunda fase do cálculo requer a utilização de grande quantidade memória, não tendo sido possível implementá-la em memória RAM, o que implica a execução de numerosas operações de leitura e escrita no disco rígido.

1.3 Resultados

OS RESULTADOS DA MATRIZ de relaxação para todas as ordens de coerência dos sistemas de 2 e 3 núcleos e para as transições de quantum único no sistema de 4 núcleos estão já publicados [37,38,154] e foram reproduzidos por RELAX, concordando com esses trabalhos.

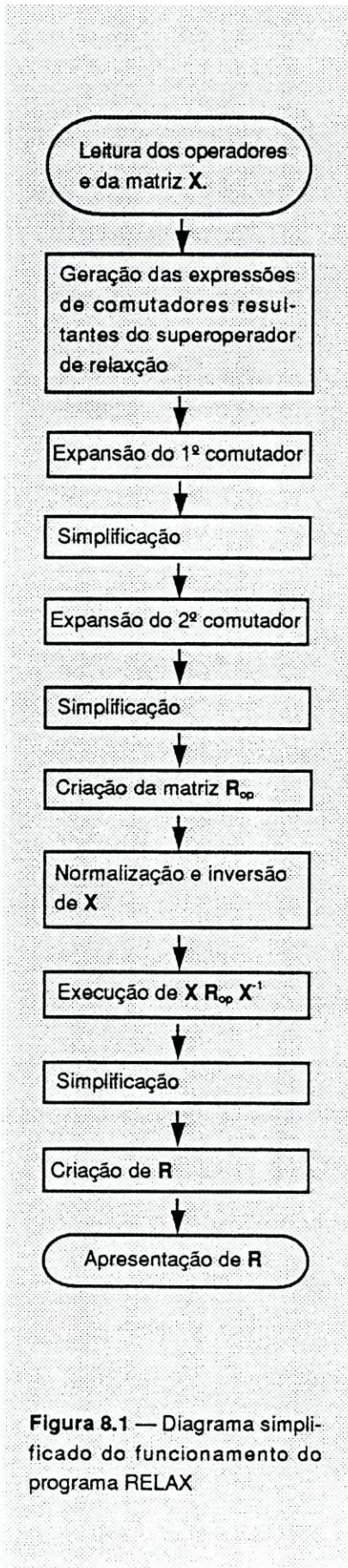


Figura 8.1 — Diagrama simplificado do funcionamento do programa RELAX

(a) numero de spins
 4
 numero de spins com adq e suas etiquetas
 4
 1
 2
 3
 4
 e.m.d. zero quantum
 ~
 1.
 ~
 +
 1
 i-
 2
 +
 ~
 2.
 ~
 +
 1
 i-
 2
 iz
 3
 +
 ~
 2.
 ~
 +
 1
 i-
 2
 iz
 4
 +
 ~
 4.
 ~
 +
 1
 i-
 2
 iz
 3
 iz
 4
 fim

(b) 1 1 1 1
 1 1 -1 -1
 1 -1 1 -1
 1 -1 -1 1

Figura 8.2 — Exemplo de ficheiros de entrada para RELAX; a) Operadores produto para o caso do sistema de 4 núcleos e para as transições de quantum nulo; b) Matriz X para o mesmo caso.

São apresentadas na Figura 8.3 as definições dos operadores produto e das equações diferenciais de relaxação para as coerências de ordem 0, 1, 2, 3, 4 e 5 de um sistema de 5 núcleos de número quântico de spin 1/2 e na Figura 8.4 a definição das matrizes X utilizadas; os elementos das matrizes de relaxação R estão compilados no Apêndice (pág. 199). O formato em que são apresentados esses elementos é o que resulta directamente de RELAX, para evitar erros de transcrição, e pode ser facilmente convertido no formato das equações 8.2 (ver Apêndice). Os cálculos foram executados considerando que todos os núcleos do sistema relaxam devido a anisotropia de desvio químico, já que as constantes C_i correspondentes a núcleos que não relaxam por esse mecanismo são nulas, anulando por consequência as funções de densidade espectral que as contêm.

Os elementos das matrizes de relaxação dos sistemas com 4 núcleos ou menos estão contidos nas matrizes de relaxação do sistema de 5 núcleos. Para os deduzir é necessário eliminar as funções que contêm constantes de acoplamento correspondentes a núcleos que não fazem parte do sistema, eliminando também nos operadores de transição os índices correspondentes aos núcleos não presentes no sistema.

2. Medição de T_2 para transições de quantum nulo e quantum duplo num sistema AX

A UTILIZAÇÃO DOS ESPECTROS de quantum múltiplo, tal como a de quantum único, pode fornecer informação valiosa sobre vários parâmetros moleculares. A medição das constantes de tempo de relaxação de coerências de quantum múltiplo tem sido executada por vários métodos e com diversas aplicações [155,156,157].

Neste trabalho são propostas e testadas duas sequências de impulsos de fácil aplicação para a medição de tempos de relaxação de quantum nulo e quantum duplo num sistema nuclear AX (acoplamento fraco). Para estas duas transições não existe acoplamento escalar não havendo o problema levantado pela modulação de intensidade durante o tempo de eco de spin. Para a medição de T_2 para as quatro transições de quantum único para um sistema AX com acoplamento existem algumas técnicas publicadas [158,159].

Quantum nulo

$$\begin{bmatrix} I_{\alpha\alpha\alpha}^{A+I} \\ I_{\alpha\alpha\beta}^{A+I} \\ I_{\alpha\beta\alpha}^{A+I} \\ I_{\alpha\beta\beta}^{A+I} \\ I_{\beta\alpha\alpha}^{A+I} \\ I_{\beta\alpha\beta}^{A+I} \\ I_{\beta\beta\alpha}^{A+I} \\ I_{\beta\beta\beta}^{A+I} \end{bmatrix} = {}^8\mathbf{X} \begin{bmatrix} I_+^A I_z^I \\ 2I_+^A I_z^M \\ 2I_+^A I_z^S \\ 2I_+^A I_z^X \\ 4I_+^A I_z^M I_z^S \\ 4I_+^A I_z^M I_z^X \\ 4I_+^A I_z^S I_z^X \\ 8I_+^A I_z^M I_z^S I_z^X \end{bmatrix} \begin{bmatrix} d\langle I_{\alpha\alpha\alpha}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\alpha\beta}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\alpha}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\beta}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\alpha}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\beta}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\alpha}^{A+I} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\beta}^{A+I} \rangle / dt \end{bmatrix} = {}^{5N}\mathbf{R} \begin{bmatrix} \langle I_{\alpha\alpha\alpha}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\alpha\alpha\beta}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\alpha}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\beta}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\alpha}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\beta}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\alpha}^{A+I} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\beta}^{A+I} \rangle \end{bmatrix}$$

Quantum único

$$\begin{bmatrix} I_{\alpha\alpha\alpha\alpha}^{A+} \\ I_{\alpha\alpha\alpha\beta}^{A+} \\ I_{\alpha\alpha\beta\alpha}^{A+} \\ I_{\alpha\alpha\beta\beta}^{A+} \\ I_{\alpha\beta\alpha\alpha}^{A+} \\ I_{\alpha\beta\alpha\beta}^{A+} \\ I_{\alpha\beta\beta\alpha}^{A+} \\ I_{\alpha\beta\beta\beta}^{A+} \\ I_{\beta\alpha\alpha\alpha}^{A+} \\ I_{\beta\alpha\alpha\beta}^{A+} \\ I_{\beta\alpha\beta\alpha}^{A+} \\ I_{\beta\alpha\beta\beta}^{A+} \\ I_{\beta\beta\alpha\alpha}^{A+} \\ I_{\beta\beta\alpha\beta}^{A+} \\ I_{\beta\beta\beta\alpha}^{A+} \\ I_{\beta\beta\beta\beta}^{A+} \end{bmatrix} = {}^{16}\mathbf{X} \begin{bmatrix} I_+^A \\ 2I_+^A I_z^I \\ 2I_+^A I_z^M \\ 2I_+^A I_z^S \\ 2I_+^A I_z^X \\ 4I_+^A I_z^M I_z^I \\ 4I_+^A I_z^M I_z^S \\ 4I_+^A I_z^M I_z^X \\ 4I_+^A I_z^S I_z^I \\ 4I_+^A I_z^S I_z^S \\ 4I_+^A I_z^S I_z^X \\ 8I_+^A I_z^M I_z^S I_z^I \\ 8I_+^A I_z^M I_z^S I_z^X \\ 8I_+^A I_z^S I_z^S I_z^X \\ 16I_+^A I_z^M I_z^S I_z^S I_z^X \end{bmatrix} \begin{bmatrix} d\langle I_{\alpha\alpha\alpha\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\alpha\alpha\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\alpha\beta\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\alpha\beta\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\alpha\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\alpha\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\beta\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\beta\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\alpha\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\alpha\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\beta\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\beta\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\alpha\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\alpha\beta}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\beta\alpha}^{A+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\beta\beta}^{A+} \rangle / dt \end{bmatrix} = {}^{5U}\mathbf{R} \begin{bmatrix} \langle I_{\alpha\alpha\alpha\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\alpha\alpha\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\alpha\beta\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\alpha\beta\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\alpha\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\alpha\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\beta\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\beta\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\alpha\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\alpha\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\beta\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\beta\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\alpha\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\alpha\beta}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\beta\alpha}^{A+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\beta\beta}^{A+} \rangle \end{bmatrix}$$

Figura 8.3 — Operadores produto e equações diferenciais de relaxação para as transições de quantum nulo e triplo num sistema de 5 núcleos. Os índices dos operadores de transição correspondem ao estado de spin dos núcleos M, S e X para quantum nulo e i, M, S e X para quantum único.

Quantum duplo

$$\begin{bmatrix} I_{\alpha\alpha}^{A+I+} \\ I_{\alpha\beta}^{A+I+} \\ I_{\beta\alpha}^{A+I+} \\ I_{\alpha\beta\beta}^{A+I+} \\ I_{\beta\alpha\alpha}^{A+I+} \\ I_{\beta\alpha\beta}^{A+I+} \\ I_{\beta\beta\alpha}^{A+I+} \\ I_{\beta\beta\beta}^{A+I+} \end{bmatrix} = {}^8\mathbf{X} \begin{bmatrix} I_+^A I_+^I \\ 2I_+^A I_+^I M \\ 2I_+^A I_+^I S \\ 2I_+^A I_+^I X \\ 4I_+^A I_+^I M S \\ 4I_+^A I_+^I M X \\ 4I_+^A I_+^I S X \\ 8I_+^A I_+^I M S X \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} d\langle I_{\alpha\alpha}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta\beta}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\alpha}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha\beta}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\alpha}^{A+I+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta\beta}^{A+I+} \rangle / dt \end{bmatrix} = {}^{5D}\mathbf{R} \begin{bmatrix} \langle I_{\alpha\alpha}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta\beta}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\alpha}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha\beta}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\alpha}^{A+I+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta\beta}^{A+I+} \rangle \end{bmatrix}$$

Quantum triplo

$$\begin{bmatrix} I_{\alpha\alpha}^{A+I+M+} \\ I_{\alpha\beta}^{A+I+M+} \\ I_{\beta\alpha}^{A+I+M+} \\ I_{\beta\beta}^{A+I+M+} \end{bmatrix} = {}^4\mathbf{X} \begin{bmatrix} I_+^A I_+^I M \\ 2I_+^A I_+^I M S \\ 2I_+^A I_+^I M X \\ 4I_+^A I_+^I M S X \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} d\langle I_{\alpha\alpha}^{A+I+M+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\alpha\beta}^{A+I+M+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\alpha}^{A+I+M+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta\beta}^{A+I+M+} \rangle / dt \end{bmatrix} = {}^{5T}\mathbf{R} \begin{bmatrix} \langle I_{\alpha\alpha}^{A+I+M+} \rangle \\ \langle I_{\alpha\beta}^{A+I+M+} \rangle \\ \langle I_{\beta\alpha}^{A+I+M+} \rangle \\ \langle I_{\beta\beta}^{A+I+M+} \rangle \end{bmatrix}$$

Quantum quadruplo

$$\begin{bmatrix} I_{\alpha}^{A+I+M+S+} \\ I_{\beta}^{A+I+M+S+} \end{bmatrix} = {}^2\mathbf{X} \begin{bmatrix} I_+^A I_+^I M S \\ 2I_+^A I_+^I M S X \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} d\langle I_{\alpha}^{A+I+M+S+} \rangle / dt \\ d\langle I_{\beta}^{A+I+M+S+} \rangle / dt \end{bmatrix} = {}^{5Q}\mathbf{R} \begin{bmatrix} \langle I_{\alpha}^{A+I+M+S+} \rangle \\ \langle I_{\beta}^{A+I+M+S+} \rangle \end{bmatrix}$$

Quantum quintuplo

$$I_{\alpha}^{A+I+M+S+X+} = I_+^A I_+^I M S X \quad d\langle I_{\alpha}^{A+I+M+S+X+} \rangle / dt = {}^{5P}\mathbf{R} \langle I_{\alpha}^{A+I+M+S+X+} \rangle$$

Figura 8.3 (cont.) — Operadores produto e equações diferenciais de relaxação para as transições de quantum duplo, triplo, quádruplo e quántuplo num sistema de 5 núcleos. Os índices dos operadores de transição correspondem ao estado de spin dos núcleos M, S e X para quantum duplo, S e X para quantum triplo e X para quantum quádruplo.

$${}^1\mathbf{X} = 1$$

$${}^2\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}$$

$${}^4\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 \end{bmatrix}$$

$${}^8\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \end{bmatrix}$$

$${}^{16}\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 \end{bmatrix}$$

Figura 8.4 — Matrizes X usadas para o cálculo dos operadores de transição a partir dos operadores produto para um determinado sistema

2.1 Condições experimentais

A CITOSINA FOI ADQUIRIDA na Aldrich (99%, anidra) e foi usada sem nenhuma purificação adicional. Foram utilizadas soluções não desoxigenadas de citosina aproximadamente 0,2 M em D₂O (Aldrich, 99,9% em deutério), não tendo sido adicionada nenhuma substância de referência para os desvios químicos.

Os espectros de RMN foram adquiridos a 303 K, sem rotação da amostra, num espectrómetro Bruker AM500 com sonda multinuclear. Detalhes específicos sobre os parâmetros da aquisição serão referidos nas secções seguintes e nas Figuras 6 e 7.

Os ajustes dos pontos experimentais à função monoexponencial de decaimento por relaxação foi executado num programa comercial de microcomputador.

2.2 Sequências de impulsos

Quantum nulo

Para esta medição foi escolhido um método bidimensional devido à dificuldade em separar, numa experiência unidimensional, coerências de quantum nulo e magnetização longitudinal [160]. Num espectro de quantum múltiplo em duas dimensões esses sinais aparecem separados, uma vez que durante t_1 a magnetização longitudinal não precessa, aparecendo na dimensão f_1 com a frequência 0.

A sequência e o ciclo de fase usados são apresentados na Figura 8.5 juntamente com o diagrama de operadores e o mapa de transferência de coerência. A sequência de três impulsos usada para a excitação das coerências de quantum múltiplo tem forçosamente que conter um impulso menor que 90° porque de outra forma, num sistema AX, a magnetização de quantum nulo não existe no fim da sequência de excitação. A magnetização de quantum nulo resultante, contida no termo $2I_x^A I_x^X$, decai durante um tempo t com o factor $e^{-t/(\rho_{\text{QN}} T_2)}$, sendo o desvio químico refocado pelo impulso de 180° aplicado a meio deste período. No período seguinte, t_1 , a coerência de quantum nulo evolui com a frequência $\pm(\Omega_A - \Omega_X)$ no referencial rotativo, obtendo-se $I_y^A I_y^X$, após o que um impulso de 90°_x provoca a transferência de coerência de A para X, condição essencial para a obtenção de correlação de frequência. O termo

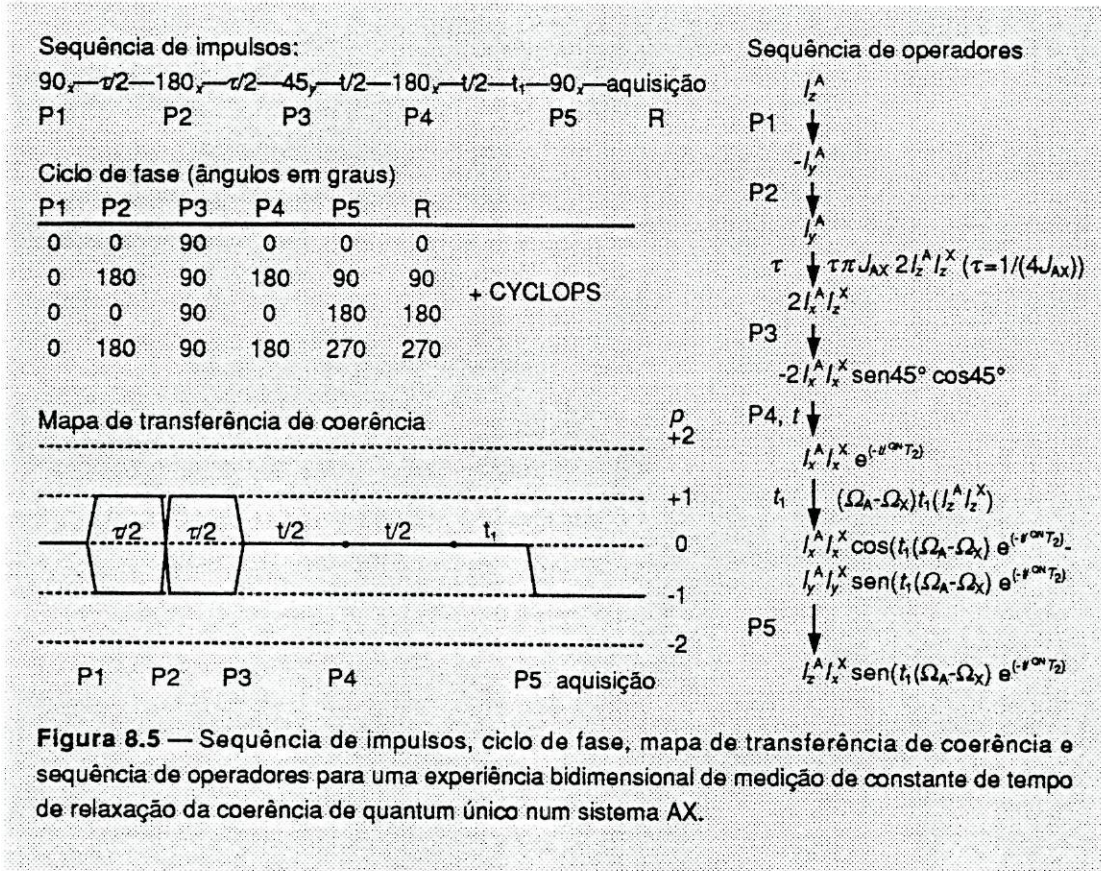


Figura 8.5 — Sequência de impulsos, ciclo de fase, mapa de transferência de coerência e seqüência de operadores para uma experiência bidimensional de medição de constante de tempo de relaxação da coerência de quantum único num sistema AX.

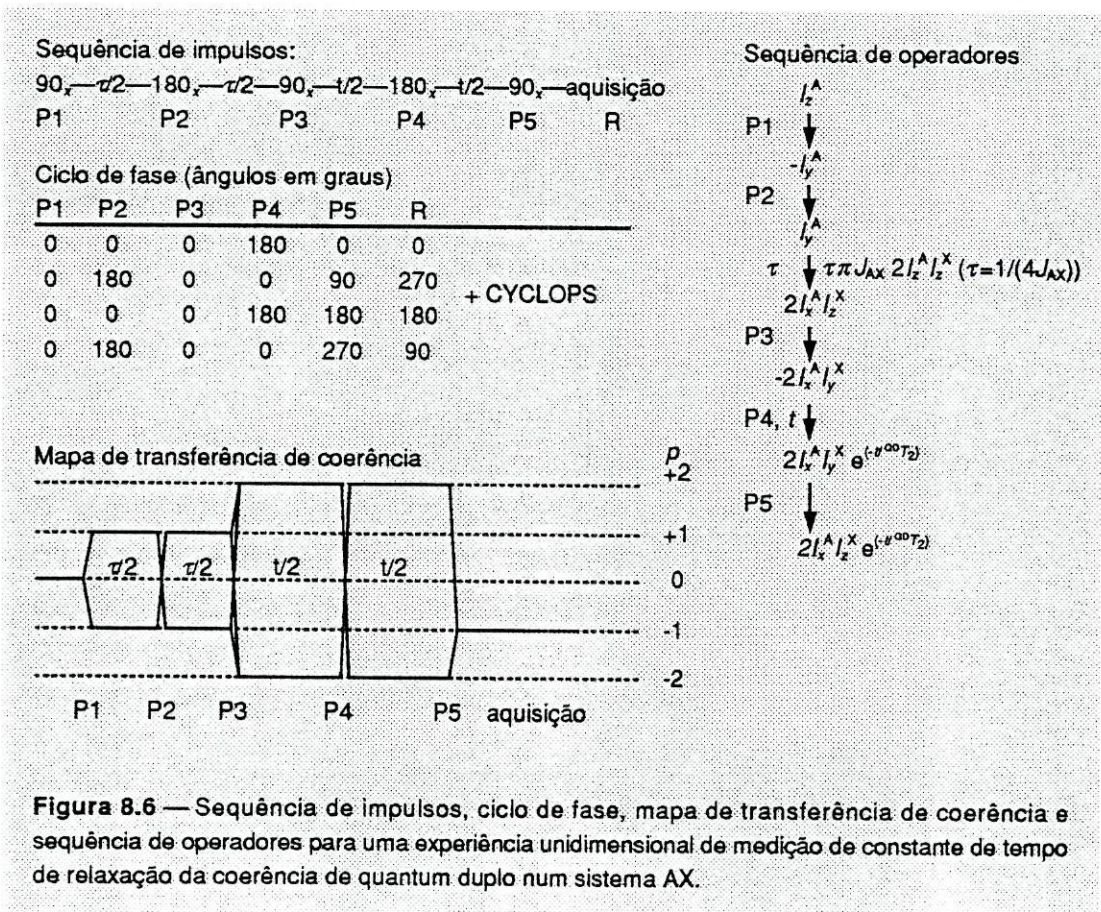


Figura 8.6 — Sequência de impulsos, ciclo de fase, mapa de transferência de coerência e seqüência de operadores para uma experiência unidimensional de medição de constante de tempo de relaxação da coerência de quantum duplo num sistema AX.

$I_z^A I_x^X$ evolui durante t_2 para termos em fase, observáveis, devido ao acoplamento escalar. Os sinais em f_2 têm acoplamento e estão em anti-fase, enquanto que em f_1 são singuletos em fase com frequência $\pm(\Omega_A - \Omega_X)$; a sua intensidade é portanto proporcional à função exponencial $e^{-i(\Omega_A - \Omega_X)t_2}$ (Figura 8.7). Devido à impossibilidade de obter espectros bidimensionais de quantum nulo em modo de absorção pura por ciclização de fase (TPPI), os espectros foram obtidos em modo de magnitude, (parte imaginária)² + (parte real)². Esta técnica, embora oferecendo espectros com menor resolução (devido à contribuição do sinal em modo de dispersão da parte imaginária), torna desnecessário o ajuste de fase no espectro bidimensional.

Quantum duplo

Para a medição das constantes de tempo de relaxação da transição de quantum duplo optou-se por uma experiência unidimensional baseada num filtro de quantum duplo (Figura 8.6). A sequência inicial, $90^\circ_x - \tau/2 - 180^\circ_x - \tau/2 - 90^\circ_x$ cria coerências de quantum duplo que relaxam durante um tempo t ; o impulso de 180° aplicado a $t/2$ reverte a precessão do desvio químico, criando um eco de Hahn. O último impulso antes da aquisição transfere essa magnetização para coerências de quantum simples; o seu ciclo de fase selecciona saltos de ordem de coerência $\Delta p = -3$ e $\Delta p = +1$. Como o termo que dará origem a magnetização observável é $2I_x^A I_z^X$, os sinais observados serão com acoplamento e em anti-fase (Figura 8.8).

O sucesso da eliminação das coerências de ordem 1 e -1 que evoluem durante t_1 foi controlada através da eliminação do sinal de HDO do solvente. Este sinal apresentou uma diminuição para menos de 1% da sua intensidade num espectro normal sem filtro de quantum duplo, o que permite concluir que os sinais observados num sistema AX têm uma contribuição desprezável da magnetização de quantum simples durante t_1 . A utilização de incrementos de 90° simultânea em todos os impulsos no ciclo de fase (CYCLOPS) contribuiu decisivamente para a qualidade de filtragem.

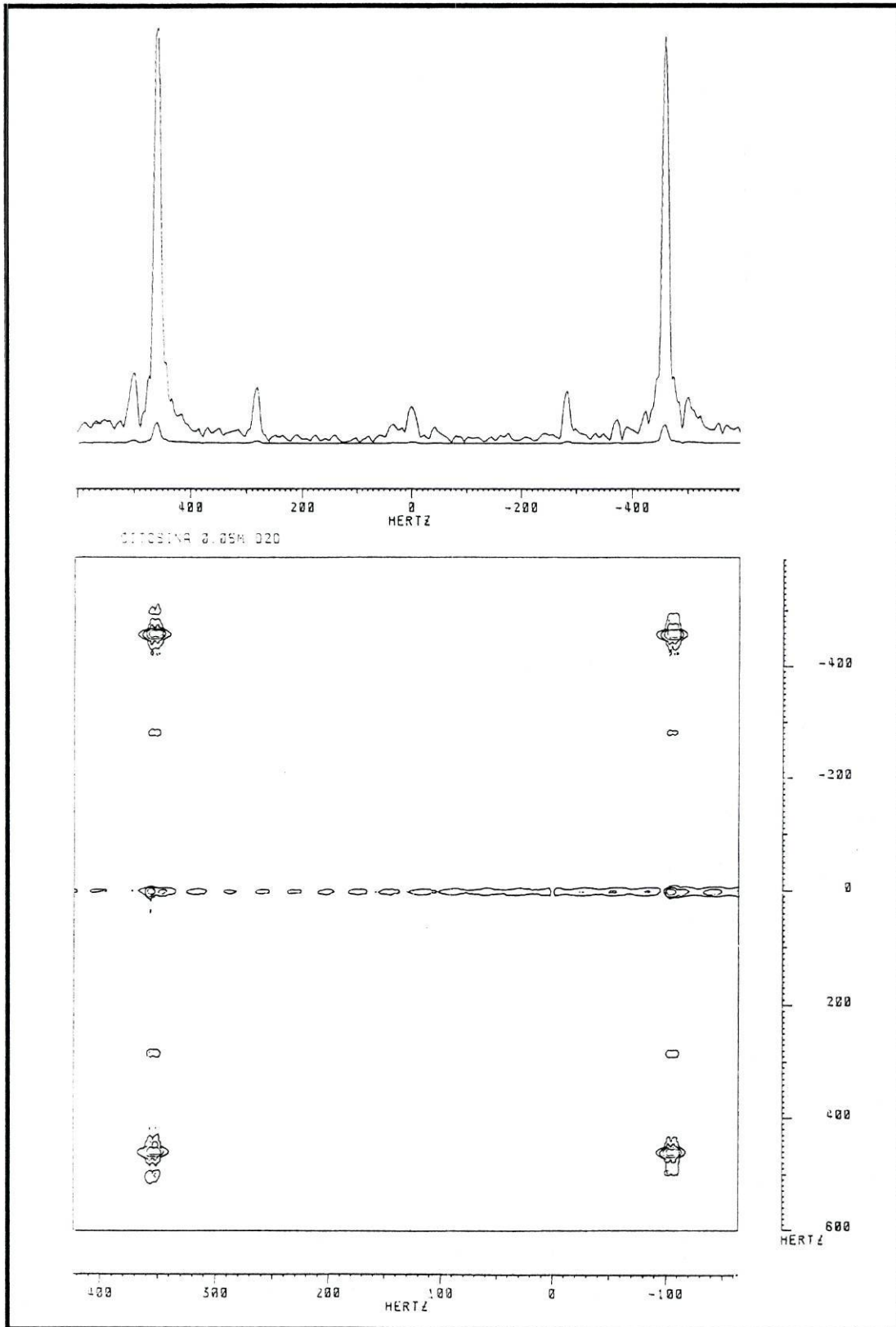


Figura 8.7 — Espectro bidimensional de quantum nulo da citosina 0,05 M em D_2O obtido com a sequência de impulsos e parâmetros apresentados na Figura 8.5; traçado de uma coluna desse espectro onde se encontram as ressonâncias mais intensas. Número de acumulações: 4; varrimentos prévios: 2; resolução digital em f_1 : 1,17 Hz/ponto; em f_2 : 1,28 Hz/ponto. Desvios químicos de H-5 (-105 Hz) e de H-6 (+355) em f_2 .

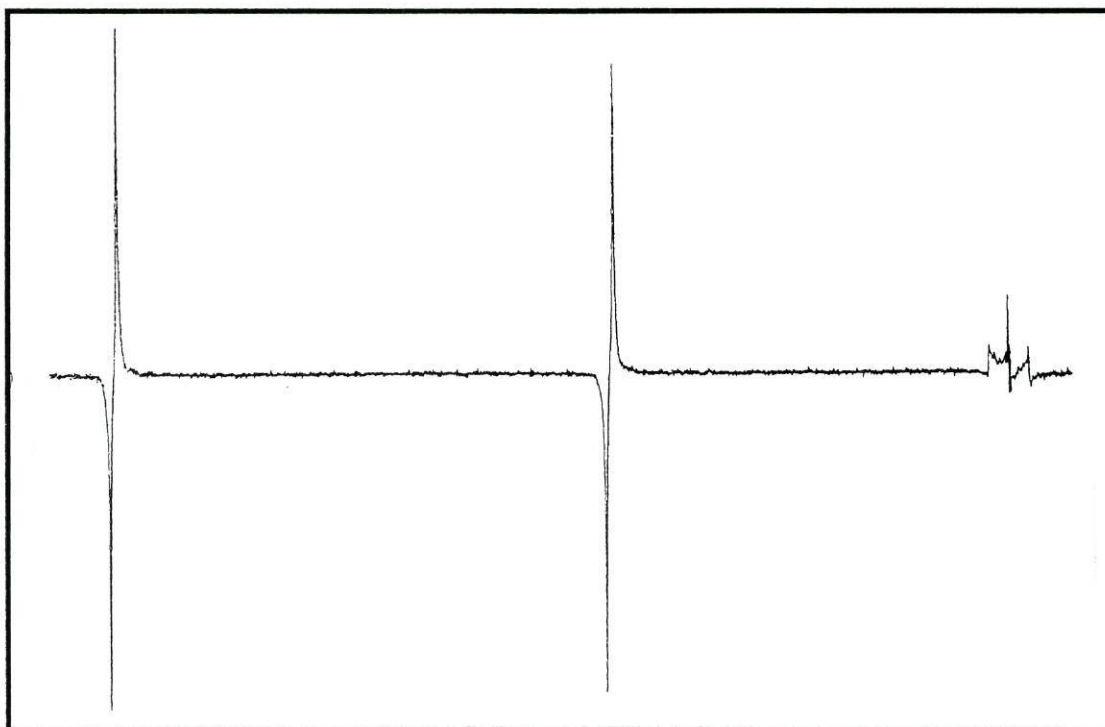


Figura 8.8 — Espectro em D_2O da citosina 0,05 M com filtragem de quantum duplo obtido com a sequência de impulsos e parâmetros apresentados na Figura 8.6; sinais de H-5, H-6 e sinal residual de HDO; largura espectral apresentada de 942 Hz.

2.3 T_2^{QN} e T_2^{QD} para os núcleos H-5 (A) e H-6 (X) da citosina

A FIGURA 8.10(A) MOSTRA o decaimento típico da intensidade dos sinais de correlação dos núcleos H-5 e H-6 da citosina no espectro representado na Figura 8.7 e em que a função $I = I_0 e^{-t/T_2}$ foi ajustada aos pontos experimentais. Foram calculadas as constantes de tempo de relaxação $^{QN}T_2$ para os oito sinais de H-5 e H-6 de três amostras distintas de citosina 0,05 M (notar que todos estes sinais devem fornecer o mesmo valor, uma vez que a sua intensidade está codificada pela relaxação da única transição de quantum nulo) e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 8.1.

Na Figura 8.10 está representada a variação típica da intensidade dos sinais resultantes da sequência de impulsos da Figura 8.6 (espectro da Figura 8.8), onde é

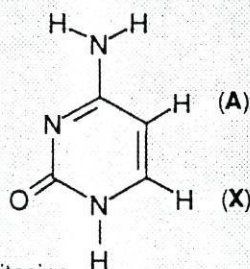


Figura 8.9 — Fórmula de estrutura da citosina

patente uma maior precisão relativamente à obtida para o quantum nulo. Os valores obtidos para ${}^{QD}T_2$ estão apresentados na Tabela 8.1 e é visível que o valor obtido para ${}^{QD}T_2$ é menor que o observado para ${}^{QN}T_2$.

Para um sistema AX é possível calcular uma razão entre ${}^{QD}T_2$ e ${}^{QN}T_2$ de 8:18 no regime de estreitamento extremo onde $J(\omega) = J(0)$ (que aqui se aplicaria por ser uma molécula pequena num solvente pouco viscoso), enquanto que no regime de alargamento extremo essa razão seria de 2:0, para relaxação intramolecular que ocorre por um mecanismo puramente dipolar. A razão experimental de 8:14,2, calculada a partir dos valores médios apresentados na Tabela 8.2 sugere um ligeiro afastamento do regime de estreitamento extremo e/ou a presença de outros tipos de relaxação.

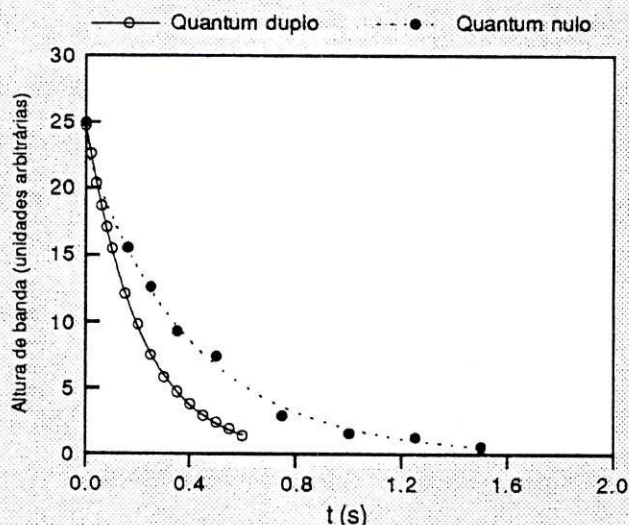


Figura 8.10 — Curvas de decaimento para uma das bandas observadas no espectro da citosina utilizando as seqüências de impulsos descritas no texto para a medição da constante de tempo de relaxação transversal para as coerências de quantum nulo e quantum duplo do sistema AX composto pelos núcleos de H-5 e H-6.

Tubo	${}^{QN}T_2$	${}^{QD}T_2$
1	$0,373 \pm 0,006$	$0,212 \pm 0,001$
2	$0,367 \pm 0,005$	$0,212 \pm 0,001$
3	$0,380 \pm 0,006$	$0,199 \pm 0,002$
Média ¹	$0,373 \pm 0,006$	$0,207 \pm 0,007$

¹ Média e desvio padrão da amostra (três valores)

Tabela 8.1 — Valores obtidos para ${}^{QN}T_2$ e ${}^{QD}T_2$ em três amostras semelhantes de citosina. cada valor desta Tabela corresponde à média e desvio padrão dos valores obtidos do decaimento de todos os sinais de H-5 e H-6 (oito para ${}^{QN}T_2$ e quatro para ${}^{QD}T_2$)

Apêndice

NESTE APÊNDICE SÃO APRESENTADAS os elementos das matrizes de relaxação para as várias ordens de coerência do sistema de 5 núcleos descrito na secção 8.1.3. Para cada elemento, a soma total de funções de densidade espectral está dividida em parcelas, encabeçadas pela designação da densidade espectral com a frequência correspondente; cada uma destas parcelas é constituída por uma soma de funções que podem ser facilmente convertidas na forma das equações 8.2, partindo dos índices das constantes de acoplamento dipolar e de anisotropia de desvio químico.

Quantum nulo, ^{5N}R

R(1,1)	1,00000 $D_{AM} D_{AS}$				-2,00000 $C_M D_{MX}$
	1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_I)$			-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
$J^{(0)}(0)$	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	R(1,2)		
1,00000 $C_A C_A$				$J^{(1)}(\omega_X)$	
-2,00000 $C_A C_I$	$J^{(1)}(\omega_I)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	R(1,6)
-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	2,00000 $C_I C_I$			0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$			-2,00000 $C_X C_X$	
-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	2,00000 $C_I D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		-2,00000 $C_X D_{MX}$	
1,00000 $C_I C_I$	2,00000 $C_I D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		-2,00000 $C_X D_{SX}$	
0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	2,00000 $C_I D_{IX}$			-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	R(1,7)
0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$			$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
0,25000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$			-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$				
-1,00000 $C_A D_{IM}$		$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$			
-1,00000 $C_I D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	R(1,3)		
1,00000 $C_I D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$			$J^{(1)}(\omega_S)$	
1,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$		-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	
-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	R(1,8)
-1,00000 $C_I D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$			0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	0
1,00000 $C_I D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
1,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		-2,00000 $C_S C_S$	
-1,00000 $C_A D_{IX}$	2,00000 $C_M D_{MS}$			-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
-1,00000 $C_I D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$		-2,00000 $C_S D_{MS}$	
1,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-2,00000 $C_S D_{SX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{AS}$				-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	R(2,2)
-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$			$J^{(0)}(0)$
-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$			1,00000 $C_A C_A$
0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$				-2,00000 $C_A C_I$
0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$			0,25000 $D_{AM} D_{AM}$
-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	R(1,4)		-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$
-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	2,00000 $C_S C_S$			$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$
0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{MS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$			0,25000 $D_{AX} D_{AX}$
-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$				-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$
-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$			1,00000 $C_I C_I$
0,50000 $D_{IS} D_{IX}$		1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	R(1,5)		0,25000 $D_{IM} D_{IM}$
	$J^{(1)}(\omega_X)$				0,25000 $D_{IS} D_{IS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$			0,25000 $D_{IX} D_{IX}$
2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(1)}(\omega_M)$	1,00000 $C_A D_{AM}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$			-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	-1,00000 $C_A D_{IM}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $C_I D_{AM}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $C_I D_{IM}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_X C_X$			-2,00000 $C_M C_M$	1,00000 $C_I D_{IM}$
2,00000 $C_A D_{AM}$	2,00000 $C_X D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $C_A D_{AS}$
2,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_A D_{IS}$
2,00000 $C_A D_{AX}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$			-2,00000 $C_M D_{MS}$	

-1,00000 $C_1 D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$
1,00000 $C_1 D_{IS}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		1,00000 $C_A D_{IS}$
-1,00000 $C_A D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$			1,00000 $C_1 D_{AS}$
1,00000 $C_A D_{IX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		-1,00000 $C_1 D_{IS}$
1,00000 $C_1 D_{AX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	R(2,6)	1,00000 $C_A D_{AX}$
-1,00000 $C_1 D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$			-1,00000 $C_A D_{IX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$J^{(1)}(\omega_M)$	-1,00000 $C_1 D_{AX}$
-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $C_1 D_{IX}$
-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{AM} D_{IS}$
-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_M C_M$	0,50000 $D_{AS} D_{IM}$
0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$
0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AM} D_{AX}$
-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$
-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		2,00000 $C_M D_{MX}$	-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$
0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	0,50000 $D_{IM} D_{IX}$
0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$
-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$			0,50000 $D_{AS} D_{IX}$
	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		0,50000 $D_{AX} D_{IS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	R(2,7)	-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$
2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	0	$J^{(1)}(\omega_A)$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		2,00000 $C_A C_A$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{MX}$			0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{SX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
2,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		R(2,8)	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
2,00000 $C_A D_{AS}$		R(2,3)		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_A)$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	2,00000 $C_A D_{AM}$
1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$
-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		2,00000 $C_A D_{AX}$
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$			-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$
	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		R(3,3)	1,00000 $D_{AM} D_{AX}$
$J^{(1)}(\omega_A)$				-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	R(2,4)		
2,00000 $C_1 C_1$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega_A)$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	-2,00000 $C_A C_1$	2,00000 $C_1 C_1$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
2,00000 $C_1 D_{IM}$		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
2,00000 $C_1 D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
-2,00000 $C_1 D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_S C_S$	-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	2,00000 $C_1 D_{IM}$
1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_1 D_{IS}$
-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	2,00000 $C_1 D_{IX}$
-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $C_1 C_1$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
		1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		0,25000 $D_{IX} D_{IX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		R(2,5)	1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$		-1,00000 $C_A D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$
2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		-1,00000 $C_1 D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	1,00000 $C_1 D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$

2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	0	1,00000 $C_A D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$			1,00000 $C_I D_{AX}$	
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		-1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$
2,00000 $C_M D_{MX}$			0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	R(3,7)	0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(1)}(\omega_S)$		$J^{(1)}(\omega_M)$	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$
-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	2,00000 $C_S D_{MS}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-2,00000 $C_M C_M$	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$	
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	2,00000 $C_M D_{MS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$
2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$		2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	R(3,8)	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{MX}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	2,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$	
2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \alpha)$
2,00000 $C_X D_{MX}$			-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$
-2,00000 $C_X D_{SX}$			-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	
-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		R(4,4)	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$
	R(3,4)	$J^{(0)}(0)$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$
$J^{(0)}(\omega_A - \alpha)$		1,00000 $C_A C_A$	$J^{(1)}(\alpha)$	
2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	-2,00000 $C_A C_I$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,25000 $D_{AS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	2,00000 $C_I D_{IM}$	
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_X C_X$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$
	-2,00000 $C_X D_{MX}$	-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	2,00000 $C_X D_{SX}$	1,00000 $C_I C_I$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$
		0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$		0,25000 $D_{IX} D_{IX}$		
1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	R(3,5)	1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$
		-1,00000 $C_A D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$		-1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	
1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$
	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$		1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$
	R(3,6)	-1,00000 $C_I D_{IS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$		-1,00000 $C_A D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$	

$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$	
	2,00000 $C_M D_{MS}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	2,00000 $C_M D_{MX}$	-2,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	2,00000 $C_A D_{AS}$		R(5,6)
		2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$		-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$
	R(5,5)	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$			1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega_A)$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	-2,00000 $C_A C_I$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_X C_X$
1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		2,00000 $C_X D_{MX}$
	-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	-2,00000 $C_I D_{IM}$		
	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega - \omega_M)$	
$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	
2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $C_I C_I$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		R(5,7)
	0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega - \omega_S)$	
	0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
	0,25000 $D_{IX} D_{IX}$			-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$
R(4,5)	-1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega - \omega_X)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
	1,00000 $C_A D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
0	1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
	-1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	-2,00000 $C_S C_S$
	1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
	-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		2,00000 $C_S D_{MS}$
	-1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$
R(4,6)	1,00000 $C_I D_{IS}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
	1,00000 $C_A D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MX}$		
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	-1,00000 $C_A D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	
-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-1,00000 $C_I D_{AX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	
	1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		R(5,8)
	-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	
	0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
R(4,7)	0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
	-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	
-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		
	0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	R(6,6)
	-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	
	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		$J^{(0)}(0)$
R(4,8)	-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	1,00000 $C_A C_A$
	-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-2,00000 $C_A C_I$
$J^{(1)}(\omega_M)$	0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$		0,25000 $D_{AM} D_{AM}$
-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$
-2,00000 $C_M C_M$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$

-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_S C_S$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
1,00000 $C_I C_I$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	2,00000 $C_S D_{MS}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	-2,00000 $C_A D_{AM}$
0,25000 $D_{IX} D_{IX}$			-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$
-1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		2,00000 $C_A D_{AX}$
1,00000 $C_A D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AS}$
1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		R(7,7)	-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$
-1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$		-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$
1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega)$
-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
-1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	-2,00000 $C_A C_I$	2,00000 $C_I C_I$
1,00000 $C_I D_{IS}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
-1,00000 $C_A D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
1,00000 $C_A D_{IX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
1,00000 $C_I D_{AX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	-2,00000 $C_I D_{IM}$
-1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$
-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$
0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	0,25000 $D_{IX} D_{IX}$	
-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$
-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	1,00000 $C_A D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$
0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		-1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$
0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$		1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-1,00000 $C_I D_{IS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $C_A D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MX}$
2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-1,00000 $C_A D_{IX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-1,00000 $C_I D_{AX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AS}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	R(6+7)	-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
-2,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
2,00000 $C_A D_{AS}$			0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_A)$		-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$
-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
1,00000 $D_{AM} D_{AX}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$
	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
$J^{(1)}(\omega)$		R(6,8)	0,50000 $D_{AS} D_{IX}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
-2,00000 $C_I D_{IM}$		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		

2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
-2,00000 $C_X D_{MX}$		-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
-2,00000 $C_X D_{SX}$		0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$
1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	
$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	R(7,8)	-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
		0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		-1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
		0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $C_A C_A$	
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
		-2,00000 $C_X C_X$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_X C_X$
		2,00000 $C_X D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		2,00000 $C_X D_{SX}$	-2,00000 $C_A D_{AM}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
			-2,00000 $C_A D_{AX}$	
$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_M)$			1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$
1,00000 $D_{IM} D_{IM}$			1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$
			1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	
$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_S)$	R(8,8)			$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$
1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(0)$			1,00000 $D_{AM} D_{AM}$
		1,00000 $C_A C_A$	$J^{(1)}(\omega_1)$	
$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_X)$		-2,00000 $C_A C_I$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
		-0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$		0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
		0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_I D_{IM}$	
$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		-0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_M)$
2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		1,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$
		0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_S)$
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		0,25000 $D_{IX} D_{IX}$		1,00000 $D_{IS} D_{IS}$
		-1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_X)$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$		1,00000 $C_A D_{IM}$	-1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	
		-1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		-1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
		1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_M)$		-1,00000 $C_I D_{IS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
1,00000 $D_{IM} D_{IM}$		-1,00000 $C_A D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$	
		1,00000 $C_A D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_S)$		1,00000 $C_I D_{AX}$		1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		-1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	
		0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_M)$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_X)$		-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$
1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	
		0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_S)$
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$		0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$

Quantum único, ^{5U}R

R(1,1)	$J^{(1)}(\omega_M)$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$			
	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$				
$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	R(1,3)		R(1,7)
1,00000 $C_A C_A$	2,00000 $C_M C_M$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$			$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(1)}(\omega_S)$		-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_M D_{IM}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MS}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		
1,00000 $C_A D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-2,00000 $C_S C_S$		R(1,8)
1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		0
1,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$		-2,00000 $C_S D_{IS}$		
1,00000 $C_A D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-2,00000 $C_S D_{MS}$		
0,50000 $D_{AI} D_{AM}$		1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$		
0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$		
0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		R(1,9)
0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} C_{IS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		
0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$				$J^{(1)}(\omega)$
0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$			0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$			-2,00000 $C_I C_I$
$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_S D_{IS}$		R(1,4)		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
2,00000 $C_A C_A$	2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$			-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$		-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		-2,00000 $C_I D_{IM}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$			-2,00000 $C_I D_{IS}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$			-2,00000 $C_I D_{IX}$
2,00000 $C_A D_{AI}$					-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
2,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	R(1,5)		-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$			-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$		$J^{(1)}(\omega_M)$		
1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		
1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		
1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X C_X$		-2,00000 $C_M C_M$		R(1,10)
1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		
1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	R(1,2)	-2,00000 $C_M D_{IM}$		-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$
	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$		-2,00000 $C_M D_{MS}$		
$J^{(1)}(\omega)$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$		
2,00000 $C_I C_I$		-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$		R(1,11)
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$			$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$		-2,00000 $C_X C_X$			-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$
2,00000 $C_I D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	-2,00000 $C_X D_{IX}$			
2,00000 $C_I D_{IS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$	R(1,6)		
2,00000 $C_I D_{IX}$		-2,00000 $C_X D_{SX}$			
1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$		R(1,12)
1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		0
1,00000 $D_{IS} D_{IX}$		-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$			
	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$				

	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$			
	2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$		
R(1,13)	2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		R(2,7)
	2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$			0
-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$			
	1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$	R(2,3)		
	-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$			
	1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		
R(1,14)	-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		R(2,8)
	-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$			
0		1,00000 $D_{MX} D_{SX}$			$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
	$J^{(1)}(\omega_A)$				-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_A)$	R(2,4)		
	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$			
R(1,15)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$		
	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		R(2,9)
0	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		
	2,00000 $C_I D_{IM}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	
	2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-2,00000 $C_S C_S$	-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	
	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		
R(1,16)	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		-2,00000 $C_S D_{IS}$		
	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-2,00000 $C_S D_{MS}$		
0	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$		R(2,10)
			-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$		
	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	
	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	
R(2,2)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$			-2,00000 $C_I C_I$	
	2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	
1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		R(2,5)	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	
0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		-2,00000 $C_I D_{IM}$	
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$	
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_A)$		-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	
1,00000 $C_A D_{AI}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$		1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	
1,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$			1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	
1,00000 $C_A D_{AS}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	RR(2,6)		
-1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$			
0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		$J^{(1)}(\omega_M)$		
0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		R(2,11)
-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		
0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$		-2,00000 $C_M C_M$	0	
-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		
-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		
	2,00000 $C_S D_{MS}$		-2,00000 $C_M D_{IM}$		
$J^{(1)}(\omega_A)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-2,00000 $C_M D_{MS}$		R(2,12)
2,00000 $C_A C_A$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	2,00000 $C_M D_{MX}$		
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		

	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		
	2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	
R(2,13)	2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	R(3,8)
	-2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		
0	2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
	1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$		-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
	-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$	R(3,4)	
	1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$		
R(2,14)	-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	
	1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	R(3,9)
$J^{(2)}(\omega + \omega_M)$	-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	
-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$		-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega - \omega_S)$
	$J^{(1)}(\omega_A)$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$
	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_I)$	-2,00000 $C_X C_X$	
	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$	
R(2,15)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		-2,00000 $C_X D_{MX}$	
	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	2,00000 $C_X D_{SX}$	R(3,10)
0	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	
	2,00000 $C_I D_{IM}$		1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	0
	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	
	2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		
R(2,16)	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$			
	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		R(3,11)
0	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	R(3,5)	
	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	$J^{(1)}(\omega)$
	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
R(3,3)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$			-2,00000 $C_I C_I$
	2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		R(3,6)	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		-2,00000 $C_I D_{IM}$
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	0	2,00000 $C_I D_{IS}$
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_M D_{MX}$			-2,00000 $C_I D_{IX}$
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$		1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
1,00000 $C_A D_{AI}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$		-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
1,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		R(3,7)	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
-1,00000 $C_A D_{AS}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		
1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	
0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	R(3,12)
-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M C_M$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{IM}$	
	2,00000 $C_S D_{MS}$		2,00000 $C_M D_{MS}$	
$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-2,00000 $C_M D_{MX}$	R(3,13)
2,00000 $C_A C_A$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	0
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IX} D_{IX}$		

R(3,14)	-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$		$J^{(0)}(\omega - \omega_X)$
	-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$	0	-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$
	-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$		
0	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$		
		-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		
	$J^{(1)}(\omega_A)$		R(4,6)	R(4,12)
	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$		
R(3,15)	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	$J^{(1)}(\omega)$
	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		-2,00000 $C_I C_I$
-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
	2,00000 $C_I D_{IM}$			-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	R(4,7)	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-2,00000 $C_I D_{IM}$
R(3,16)	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	2,00000 $C_I D_{IS}$
	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$
0	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
				1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
				-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		
	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	R(4,8)	
R(4,4)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$			
	2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$J^{(1)}(\omega_M)$	
$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	R(4,13)
1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	-2,00000 $C_M C_M$	0
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-2,00000 $C_M D_{IM}$	
1,00000 $C_A D_{AI}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	R(4,14)
1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		2,00000 $C_M D_{MX}$	
-1,00000 $C_A D_{AS}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	0
-1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	
-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		
-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		R(4,15)
-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$			
-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	R(4,9)	0
0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		
	2,00000 $C_S D_{MS}$		0	
	-2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		
$J^{(1)}(\omega_A)$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		R(4,16)
2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$			
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	R(4,10)	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		2,00000 $D_{IM} D_{IM}$		-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		$J^{(0)}(\omega - \omega_S)$	
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	
2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		
2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			
-2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$			R(5,5)
-2,00000 $C_A D_{AX}$	2,00000 $C_X C_X$			
1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X D_{IX}$			$J^{(0)}(0)$
-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$	R(4,5)	R(4,11)	1,00000 $C_A C_A$

0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-2,00000 $C_S D_{IS}$	-2,00000 $C_I D_{IX}$
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_M D_{MX}$		2,00000 $C_S D_{MS}$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
1,00000 $C_A D_{AI}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
-1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	
1,00000 $C_A D_{AS}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	
1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		
-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$			R(5,14)
0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	R(5,8)	-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$
-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$			
-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	
0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	
	-2,00000 $C_S D_{MS}$			
$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$		R(5,15)
2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$		
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		R(5,9)	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega - \omega_M)$	
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	
2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$		
-2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		R(5,16)
2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			
2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		R(5,10)	0
-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$			
1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$		0	
1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$	R(5,6)		
-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$			R(6,6)
-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		
1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	R(5,11)	$J^{(0)}(0)$
	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$		1,00000 $C_A C_A$
$J^{(1)}(\omega)$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		0,25000 $D_{AM} D_{AM}$
2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_X C_X$		0,25000 $D_{AS} D_{AS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		-2,00000 $C_X D_{IX}$		0,25000 $D_{AX} D_{AX}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	2,00000 $C_X D_{MX}$	R(5,12)	1,00000 $C_A D_{AI}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$		-1,00000 $C_A D_{AM}$
-2,00000 $C_I D_{IM}$		1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	0	1,00000 $C_A D_{AS}$
2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$		-1,00000 $C_A D_{AX}$
2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$
-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$				0,50000 $D_{AI} D_{AS}$
-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		R(5,13)	-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$
1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$			-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$
		R(5,7)	$J^{(1)}(\omega)$	0,50000 $D_{AM} D_{AX}$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega - \omega_M)$		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	-2,00000 $C_I C_I$	
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(1)}(\omega_A)$
2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $C_A C_A$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-2,00000 $C_S C_S$	2,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$

0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IS} D_{IS}$		1,00000 $C_A D_{AX}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$			-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$
2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$
-2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	R(6, 13)	0,50000 $D_{AI} D_{AX}$
2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AS}$
-2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$
-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$		-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$
1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$	R(6,7)		
-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$			$J^{(1)}(\omega_A)$
-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		2,00000 $C_A C_A$
1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	R(6,14)	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$			0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_A)$	R(6,8)	-2,00000 $C_I C_I$	2,00000 $C_A D_{AI}$
2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_A D_{AM}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $C_A D_{AX}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $C_I D_{IM}$	-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$
-2,00000 $C_I D_{IM}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$
2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-2,00000 $C_S C_S$	2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AI} D_{AX}$
-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AS}$
-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		-2,00000 $C_S D_{IS}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$
1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	2,00000 $C_S D_{MS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$
-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$		
		1,00000 $D_{IS} D_{MS}$		$J^{(1)}(\omega_A)$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	R(6,15)	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		2,00000 $C_I C_I$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$			0	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$			0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$			0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		R(6,9)		-2,00000 $C_I D_{IM}$
2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$			-2,00000 $C_I D_{IS}$
2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		R(6, 16)	2,00000 $C_I D_{IX}$
-2,00000 $C_M D_{MX}$				1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	R(6, 10)	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		
	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_A)$	-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_M)$
$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$			R(7,7)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$			2,00000 $C_M C_M$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	R(6,11)	$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
2,00000 $C_S C_S$			1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{IM}$
2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$
-2,00000 $C_S D_{MS}$			0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_M D_{MX}$
-2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$
-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	R(6, 12)	1,00000 $C_A D_{AI}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$
-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$			-1,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0	-1,00000 $C_A D_{AS}$	

$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{IM}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$			0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$
2,00000 $C_S C_S$		R(7, 12)	1,00000 $C_A D_{AI}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$		-1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0	-1,00000 $C_A D_{AS}$	
-2,00000 $C_S D_{MS}$			-1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		R(7, 13)	-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$
	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
$J^{(1)}(\omega_X)$		-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{IS}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$			-2,00000 $C_S D_{MS}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(1)}(\omega_A)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		R(7, 14)	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$
2,00000 $C_X C_X$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
2,00000 $C_X D_{IX}$	R(7, 8)	0	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	
-2,00000 $C_X D_{MX}$			0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
-2,00000 $C_X D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$		-2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	R(7, 15)	-2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_A)$	-2,00000 $C_X C_X$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{IX}$
1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$	-2,00000 $C_I C_I$	-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$
	2,00000 $C_X D_{MX}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	2,00000 $C_X D_{SX}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$
	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	2,00000 $C_I D_{IM}$		1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-2,00000 $C_I D_{IX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_A)$
		-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	R(7, 9)	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$
			0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	0		-2,00000 $C_I D_{IM}$	
2,00000 $D_{IM} D_{IM}$		R(7, 16)	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
			-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$			1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	
2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	R(7, 10)	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
		-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	0			
2,00000 $D_{MX} D_{MX}$			$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$
			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$
$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		R(8, 8)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	R(7, 11)		2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
		$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_A)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	

$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_x)$	$R(8, 13)$	-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0	0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_1)$		0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_x)$
1,00000 $D_{AI} D_{AI}$		0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
			2,00000 $C_S D_{MS}$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$R(8, 14)$	$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_S)$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_x)$
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_x)$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_x)$		-2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_x)$
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	$R(8, 15)$	2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
		2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_x)$	2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	$R(9, 10)$
		-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$	
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_x)$		-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_x)$
2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
	$R(8, 16)$	1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
$J^{(2)}(\omega_S + \omega_x)$		1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_1)$		1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(1)}(\omega_1)$		-2,00000 $C_X C_X$
$R(8, 9)$	-2,00000 $C_I C_I$	2,00000 $C_I C_I$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_1)$	2,00000 $C_X D_{IX}$
0	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$
	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$
	2,00000 $C_I D_{IM}$	2,00000 $C_I D_{IM}$		1,00000 $D_{IX} D_{SX}$
	2,00000 $C_I D_{IS}$	2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
	2,00000 $C_I D_{IX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	
$R(8, 10)$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		
0	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_x)$	$R(9, 11)$
	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	
	$R(9, 9)$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_M)$	$J^{(1)}(\omega_S)$
$R(8, 11)$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
0	$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
	1,00000 $C_A C_A$	2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_S)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-2,00000 $C_S C_S$
	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_x)$	2,00000 $C_S D_{IS}$
	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$
$R(8, 12)$	0,25000 $C_A D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{MX}$		-2,00000 $C_S D_{SX}$
	-1,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_1)$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$
$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_M)$	1,00000 $C_A D_{AS}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$
-2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
	1,00000 $C_A D_{AX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	
	-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	
	-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		
		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$R(9, 12)$

$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	-1,00000 $C_A D_{AI}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	
-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$
	1,00000 $C_A D_{AS}$			$R(10, 14)$
	-1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(1)}(\omega_M)$
	-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
	-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
$R(9, 13)$	0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_M C_M$
	0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(1)}(\omega_M)$	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		2,00000 $C_S D_{MS}$		2,00000 $C_M D_{IM}$
-2,00000 $C_M C_M$	$J^{(1)}(\omega_A)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-2,00000 $C_M D_{MS}$
-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MX}$
-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		1,00000 $D_{IM} D_{MS}$
2,00000 $C_M D_{IM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$
-2,00000 $C_M D_{MS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
-2,00000 $C_M D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		
1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	-2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	
1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	
-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		$R(10, 15)$
	-2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		0
	-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$		
	-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$	$R(10, 11)$	
$R(9, 14)$	1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$		
	1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	$R(10, 16)$
-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
		1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
	$J^{(1)}(\omega)$			
	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	$R(10, 12)$	
$R(9, 15)$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$		
	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$	
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	$R(11, 11)$
-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	
	2,00000 $C_I D_{IM}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(0)}(0)$
	2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	-2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $C_A C_A$
	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$
$R(9, 16)$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		2,00000 $C_S D_{IS}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$
	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$
0	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$
			1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	-1,00000 $C_A D_{AI}$
	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{AM}$
	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$
$R(10, 10)$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$			1,00000 $C_A D_{AX}$
	2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$		-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$
$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{AI} D_{AS}$
1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		$R(10, 13)$	-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$
0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$		-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$
0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	0,50000 $D_{AM} D_{AX}$
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		

$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-2,00000 $C_M D_{MX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	2,00000 $C_I C_I$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$		1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$			2,00000 $C_I D_{IM}$
-2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	R(11, 16)	-2,00000 $C_I D_{IS}$
2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		-2,00000 $C_I D_{IX}$
-2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	R(11, 12)		1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$			
-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		$J^{(1)}(\omega_M)$
-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	R(12, 12)	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$		0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(0)}(0)$	2,00000 $C_M C_M$
	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(1)}(\omega)$		-2,00000 $C_X C_X$	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	2,00000 $C_X D_{IX}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	-2,00000 $C_M D_{IM}$
2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		2,00000 $C_X D_{SX}$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-1,00000 $C_A D_{AI}$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$
2,00000 $C_I D_{IM}$		1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$
-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		-1,00000 $C_A D_{AX}$	
2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$			0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	R(11, 13)	0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
			-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega - \omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		-2,00000 $C_S D_{IS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$				2,00000 $C_S D_{MS}$
2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega - \omega_X)$		$J^{(1)}(\omega_A)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	R(11, 14)	2,00000 $C_A C_A$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$
-2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	0	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	
2,00000 $C_M D_{MX}$			0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	R(11, 15)	-2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$			-2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
	$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	$J^{(1)}(\omega_M)$	-2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-2,00000 $C_M C_M$	1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{MX}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
2,00000 $C_S C_S$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$
-2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_M D_{IM}$		-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
2,00000 $C_S D_{MS}$		2,00000 $C_M D_{MS}$	$J^{(1)}(\omega)$	

$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	
1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$
	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $D_{IM} D_{IM}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		-2,00000 $C_A D_{AI}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
		-2,00000 $C_A D_{AM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	R(12, 15)	2,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		2,00000 $C_A D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
		1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{IX}$	R(13, 14)
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$	
		-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	
$J^{(0)}(\omega - \omega_M)$		-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	R(12, 16)	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
			-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
				-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(1)}(\omega)$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	-2,00000 $C_X C_X$
	-0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_X D_{IX}$
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-2,00000 $C_M C_M$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		2,00000 $C_X D_{MX}$
2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{IX} D_{MX}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	2,00000 $C_M D_{IM}$	-2,00000 $C_I D_{IM}$		1,00000 $D_{IX} D_{SX}$
1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
	2,00000 $C_M D_{MX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	
	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$				R(13, 15)
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega - \omega_S)$	
		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	R(13, 13)	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		2,00000 $C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega - \omega_X)$	-0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
		0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-2,00000 $C_S C_S$
2,00000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $C_A C_A$	-2,00000 $C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
	0,25000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	2,00000 $C_S D_{IS}$
	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_M D_{MX}$		2,00000 $C_S D_{MS}$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-2,00000 $C_S D_{SX}$
2,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $D_{IS} D_{MS}$
	-1,00000 $C_A D_{AI}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$		1,00000 $D_{IS} D_{SX}$
$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	-1,00000 $C_A D_{AM}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{AS}$		1,00000 $D_{AI} D_{AI}$	
	1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		
	0,50000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		
	-0,50000 $D_{AI} D_{AS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	
R(12, 13)	-0,50000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	R(13, 16)
	-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	2,00000 $C_S C_S$		
0	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-2,00000 $C_S D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
		-2,00000 $C_S D_{MS}$		
	$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	
R(12, 14)	2,00000 $C_A C_A$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	

$R(14, 14)$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$				
$J^{(0)}(0)$	$2,00000 C_M C_M$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$		$J^{(1)}(\omega_M)$	
$1,00000 C_A C_A$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$2,00000 D_{MS} D_{MS}$		$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	
$0,25000 D_{AI} D_{AI}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$		$R(15, 15)$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$	
$0,25000 D_{AM} D_{AM}$	$-2,00000 C_M D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		$2,00000 C_M C_M$	
$0,25000 D_{AS} D_{AS}$	$2,00000 C_M D_{MS}$	$2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$J^{(0)}(0)$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	
$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$-2,00000 C_M D_{MX}$		$1,00000 C_A C_A$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	
$-1,00000 C_A D_{AI}$	$-1,00000 D_{IM} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	$0,25000 D_{AI} D_{AI}$	$-2,00000 C_M D_{IM}$	
$-1,00000 C_A D_{AM}$	$1,00000 D_{IM} D_{MX}$	$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	$0,25000 D_{AM} D_{AM}$	$-2,00000 C_M D_{MS}$	
$1,00000 C_A D_{AS}$	$-1,00000 D_{MS} D_{MX}$		$0,25000 D_{AS} D_{AS}$	$2,00000 C_M D_{MX}$	
$-1,00000 C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$1,00000 D_{IM} D_{MS}$	
$0,50000 D_{AI} D_{AM}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$-1,00000 C_A D_{AI}$	$-1,00000 D_{IM} D_{MX}$	
$-0,50000 D_{AI} D_{AS}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$-1,00000 C_A D_{AM}$	$-1,00000 D_{MS} D_{MX}$	
$0,50000 D_{AI} D_{AX}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$-1,00000 C_A D_{AS}$		
$-0,50000 D_{AM} D_{AS}$	$2,00000 C_S C_S$		$1,00000 C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	
$0,50000 D_{AM} D_{AX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,50000 D_{AI} D_{AM}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	
$-0,50000 D_{AS} D_{AX}$	$-2,00000 C_S D_{IS}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$0,50000 D_{AI} D_{AS}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	
	$-2,00000 C_S D_{MS}$		$-0,50000 D_{AI} D_{AX}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	
$J^{(1)}(\omega_A)$	$-2,00000 C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$0,50000 D_{AM} D_{AS}$	$2,00000 C_S C_S$	
$2,00000 C_A C_A$	$1,00000 D_{IS} D_{MS}$	$2,00000 D_{IM} D_{IM}$	$-0,50000 D_{AM} D_{AX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	
$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$1,00000 D_{IS} D_{SX}$		$-0,50000 D_{AS} D_{AX}$	$-2,00000 C_S D_{IS}$	
$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$1,00000 D_{MS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		$-2,00000 C_S D_{MS}$	
$0,50000 D_{AS} D_{AS}$		$2,00000 D_{IX} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	$2,00000 C_S D_{SX}$	
$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$		$2,00000 C_A C_A$	$1,00000 D_{IS} D_{MS}$	
$-2,00000 C_A D_{AI}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$-1,00000 D_{IS} D_{SX}$	
$-2,00000 C_A D_{AM}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$2,00000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$-1,00000 D_{MS} D_{SX}$	
$2,00000 C_A D_{AS}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$		$0,50000 D_{AS} D_{AS}$		
$-2,00000 C_A D_{AX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$R(14, 15)$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	
$1,00000 D_{AI} D_{AM}$	$2,00000 C_X C_X$		$-2,00000 C_A D_{AI}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	
$-1,00000 D_{AI} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	$-2,00000 C_A D_{AM}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	
$1,00000 D_{AI} D_{AX}$	$-2,00000 C_X D_{MX}$	$-2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$-2,00000 C_A D_{AS}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	
$-1,00000 D_{AM} D_{AS}$	$2,00000 C_X D_{SX}$		$2,00000 C_A D_{AX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	
$1,00000 D_{AM} D_{AX}$	$1,00000 D_{IX} D_{MX}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	$1,00000 D_{AI} D_{AM}$	$2,00000 C_X C_X$	
$-1,00000 D_{AS} D_{AX}$	$-1,00000 D_{IX} D_{SX}$	$-2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$1,00000 D_{AI} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{IX}$	
	$-1,00000 D_{MX} D_{SX}$		$-1,00000 D_{AI} D_{AX}$	$-2,00000 C_X D_{MX}$	
$J^{(1)}(\omega)$		$R(14, 16)$	$1,00000 D_{AM} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{SX}$	
$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$		$-1,00000 D_{AM} D_{AX}$	$1,00000 D_{IX} D_{MX}$	
$2,00000 C_I C_I$	$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	$-1,00000 D_{AS} D_{AX}$	$1,00000 D_{IX} D_{SX}$	
$0,50000 D_{IM} D_{IM}$		$0,50000 D_{AS} D_{AS}$		$1,00000 D_{MX} D_{SX}$	
$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	$-0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega)$		
$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$-0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega)$	
$-2,00000 C_I D_{IM}$		$-2,00000 C_S C_S$	$2,00000 C_I C_I$	$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	
$2,00000 C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	$-0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$		
$-2,00000 C_I D_{IX}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$2,00000 C_S D_{IS}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	
$-1,00000 D_{IM} D_{IS}$		$2,00000 C_S D_{MS}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	
$1,00000 D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$2,00000 C_S D_{SX}$	$-2,00000 C_I D_{IM}$		
$-1,00000 D_{IS} D_{IX}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$-1,00000 D_{IS} D_{MS}$	$-2,00000 C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	
		$-1,00000 D_{IS} D_{SX}$	$2,00000 C_I D_{IX}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	$-1,00000 D_{MS} D_{SX}$	$1,00000 D_{IM} D_{IS}$		
$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 D_{IS} D_{IS}$		$-1,00000 D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	
			$-1,00000 D_{IS} D_{IX}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	

$J^{(0)}(\omega_1 - \omega_x)$	$J^{(0)}(0)$	$2,00000 C_M C_M$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
$2,00000 D_{1X} D_{1X}$	$1,00000 C_A C_A$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_x)$	$0,25000 D_{AI} D_{AI}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
$2,00000 D_{MX} D_{MX}$	$0,25000 D_{AM} D_{AM}$	$-2,00000 C_M D_{1M}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$
$J^{(0)}(\omega_S - \omega_x)$	$0,25000 D_{AS} D_{AS}$	$-2,00000 C_M D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
$2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$1,00000 D_{1M} D_{MS}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_1)$	$-1,00000 C_A D_{AI}$	$1,00000 D_{1M} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_M)$
$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	$-1,00000 C_A D_{AM}$	$1,00000 D_{MS} D_{MX}$	$2,00000 D_{1M} D_{1M}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$-1,00000 C_A D_{AS}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_S)$
$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$0,50000 C_A D_{AX}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$2,00000 D_{1S} D_{1S}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$0,50000 D_{AI} D_{AM}$	$0,50000 D_{1S} D_{1S}$	$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_X)$
$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$0,50000 D_{AI} D_{AS}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$2,00000 D_{1X} D_{1X}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,50000 D_{AI} D_{AX}$	$2,00000 C_S C_S$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$0,50000 D_{AM} D_{AS}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$2,00000 D_{MS} D_{MS}$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_S)$	$0,50000 D_{AM} D_{AX}$	$-2,00000 C_S D_{1S}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$0,50000 D_{AS} D_{AX}$	$-2,00000 C_S D_{MS}$	$2,00000 D_{MX} D_{MX}$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_X)$	$J^{(1)}(\omega_A)$	$-2,00000 C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$2,00000 C_A C_A$	$1,00000 D_{1S} D_{MS}$	$2,00000 D_{SX} D_{SX}$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_M)$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$1,00000 D_{1S} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
$2,00000 D_{1M} D_{1M}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$1,00000 D_{MS} D_{SX}$	$2,00000 D_{MX} D_{MX}$
$J^{(2)}(\omega_1 + \omega_S)$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
$2,00000 D_{1S} D_{1S}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$2,00000 D_{SX} D_{SX}$
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	$-2,00000 C_A D_{AI}$	$0,50000 D_{1X} D_{1X}$	
$2,00000 D_{MS} D_{MS}$	$-2,00000 C_A D_{AM}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	
	$-2,00000 C_A D_{AS}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	
	$1,00000 D_{AI} D_{AM}$	$2,00000 C_X C_X$	
	$1,00000 D_{AI} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{1X}$	
	$1,00000 D_{AI} D_{AX}$	$-2,00000 C_X D_{MX}$	
	$1,00000 D_{AM} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{SX}$	
	$1,00000 D_{AM} D_{AX}$	$1,00000 D_{1X} D_{MX}$	
R(15, 16)	$1,00000 D_{AS} D_{AX}$	$1,00000 D_{1X} D_{SX}$	
		$1,00000 D_{MX} D_{SX}$	
$J^{(1)}(\omega_x)$	$J^{(1)}(\omega_1)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_1)$	
$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	
$-0,50000 D_{1X} D_{1X}$	$2,00000 C_1 C_1$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	
$-0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{1M} D_{1M}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	
$-0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$0,50000 D_{1S} D_{1S}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	
$-2,00000 C_X C_X$	$0,50000 D_{1X} D_{1X}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	
$2,00000 C_X D_{1X}$	$-2,00000 C_1 D_{1M}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	
$2,00000 C_X D_{MX}$	$-2,00000 C_1 D_{1S}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	
$2,00000 C_X D_{SX}$	$-2,00000 C_1 D_{1X}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	
$-1,00000 D_{1X} D_{MX}$	$1,00000 D_{1M} D_{1S}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	
$-1,00000 D_{1X} D_{SX}$	$1,00000 D_{1M} D_{1X}$	$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	
$-1,00000 D_{MX} D_{SX}$	$1,00000 D_{1S} D_{1X}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_1)$	
	$J^{(1)}(\omega_M)$	$1,00000 D_{AI} D_{AI}$	
	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$		
R(16, 16)	$0,50000 D_{1M} D_{1M}$		

-1,00000 $C_A D_{IX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$		-1,00000 $C_I D_{IS}$
-1,00000 $C_I D_{AX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	R(2,6)	1,00000 $C_A D_{AX}$
-1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$			1,00000 $C_A D_{IX}$
0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$J^{(1)}(\omega_M)$	1,00000 $C_I D_{AX}$
0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	1,00000 $C_I D_{IX}$
0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$
0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$
-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_M C_M$	-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$
-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$
-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AM} D_{AX}$
-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	0,50000 $D_{AM} D_{IX}$
-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		2,00000 $C_M D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{IM}$
-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	0,50000 $D_{IM} D_{IX}$
-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$
-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$			-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$
	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$		-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	R(2,7)	-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$
2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$			
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	0	$J^{(1)}(\omega_A)$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		2,00000 $C_A C_A$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{MX}$			0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{SX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
2,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		R(2,8)	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
2,00000 $C_A D_{AS}$		R(2,3)		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	2,00000 $C_A D_{AM}$
1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$
-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		2,00000 $C_A D_{AX}$
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$			-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$
	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$			1,00000 $D_{AM} D_{AX}$
$J^{(1)}(\omega_I)$		R(2,4)	R(3,3)	-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega_A)$
2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$			0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $C_A C_A$	2,00000 $C_I C_I$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	2,00000 $C_A C_I$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
2,00000 $C_I D_{IM}$		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_I D_{IM}$
-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-2,00000 $C_S C_S$	0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$
1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$
-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$
-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{IM} D_{IX}$
		1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$		0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	
1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		0,25000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_M)$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$		R(2,5)	1,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$
2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	1,00000 $C_I D_{IM}$	2,00000 $C_M C_M$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$		-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
-2,00000 $C_M D_{MX}$			-1,00000 $C_I D_{AS}$	

-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$		-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$
2,00000 $C_M D_{MX}$			-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	R(3,7)	-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(1)}(\omega_S)$		$J^{(1)}(\omega_M)$	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$
1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	2,00000 $C_S D_{MS}$
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-2,00000 $C_M C_M$	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$
2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AS} D_{IX}$	
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	2,00000 $C_M D_{MS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$
2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$		2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
1,00000 $D_{AX} D_{IX}$			0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	R(3,8)	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $C_X D_{MX}$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	2,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$	
2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$		-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$
2,00000 $C_X D_{MX}$			-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$
-2,00000 $C_X D_{SX}$			-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	
-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		R(4,4)	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
	R(3,4)			1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega)$	
1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	2,00000 $C_A C_I$	2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$
	-0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	2,00000 $C_I D_{IM}$	
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_X C_X$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$
	-2,00000 $C_X D_{MX}$	0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$	2,00000 $C_X D_{SX}$	1,00000 $C_I C_I$	-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	
1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$
		0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$		0,25000 $D_{IX} D_{IX}$		
1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$
	R(3,5)	1,00000 $C_A D_{IM}$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$		1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	
1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$
	-2,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$		-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
2,00000 $D_{MS} D_{MS}$		-1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$
		-1,00000 $C_I D_{IS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$
$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	R(3,6)	-1,00000 $C_A D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$	
2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		-1,00000 $C_A D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
	0	-1,00000 $C_I D_{AX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$		-1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	

$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$-1,00000 D_{MS} D_{MX}$	$2,00000 C_A D_{AS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	$R(5,6)$
$1,00000 D_{AS} D_{AS}$		$2,00000 C_A D_{AX}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$		$-1,00000 D_{AM} D_{AS}$		$1,00000 D_{AX} D_{IX}$
$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$R(5,5)$	$-1,00000 D_{AM} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$
		$1,00000 D_{AS} D_{AX}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega_A)$		$-0,50000 D_{MX} D_{MX}$
$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	$1,00000 C_A C_A$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$-0,50000 D_{SX} D_{SX}$
	$2,00000 C_A C_I$	$2,00000 C_I C_I$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$-2,00000 C_X C_X$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$0,25000 D_{AM} D_{AM}$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$		$2,00000 C_X D_{MX}$
$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	$0,50000 D_{AM} D_{IM}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega - \omega_M)$	$-2,00000 C_X D_{SX}$
	$0,25000 D_{AS} D_{AS}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	$1,00000 D_{MX} D_{SX}$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,50000 D_{AS} D_{IS}$	$-2,00000 C_I D_{IM}$		
$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$2,00000 C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	
	$0,50000 D_{AX} D_{IX}$	$2,00000 C_I D_{IX}$	$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	
$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	$1,00000 C_I C_I$	$-1,00000 D_{IM} D_{IS}$		$R(5,7)$
$2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$0,25000 D_{IM} D_{IM}$	$-1,00000 D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$J^{(1)}(\omega_S)$
	$0,25000 D_{IS} D_{IS}$	$1,00000 D_{IS} D_{IX}$	$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{AS} D_{IS}$
	$0,25000 D_{IX} D_{IX}$			$0,50000 D_{AS} D_{AS}$
$R(4,5)$	$-1,00000 C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$
	$-1,00000 C_A D_{IM}$	$1,00000 D_{AM} D_{IM}$	$2,00000 D_{MS} D_{MS}$	$-0,50000 D_{MS} D_{MS}$
0	$-1,00000 C_I D_{AM}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$		$-2,00000 C_S C_S$
	$-1,00000 C_I D_{IM}$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	$-0,50000 D_{SX} D_{SX}$
	$1,00000 C_A D_{AS}$	$2,00000 C_M C_M$	$2,00000 D_{MX} D_{MX}$	$2,00000 C_S D_{MS}$
	$1,00000 C_A D_{IS}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$		$-2,00000 C_S D_{SX}$
$R(4,6)$	$1,00000 C_I D_{AS}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_A)$	$1,00000 D_{MS} D_{SX}$
	$1,00000 C_I D_{IS}$	$2,00000 C_M D_{MS}$	$2,00000 D_{AI} D_{AI}$	
	$1,00000 C_A D_{AX}$	$2,00000 C_M D_{MX}$		
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	$1,00000 C_A D_{IX}$	$1,00000 D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	
$-2,00000 D_{MS} D_{MS}$	$1,00000 C_I D_{AX}$		$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$R(5,8)$
	$1,00000 C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
	$-0,50000 D_{AM} D_{AS}$	$1,00000 D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$-2,00000 D_{SX} D_{SX}$
$R(4,7)$	$-0,50000 D_{AM} D_{IS}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	
	$-0,50000 D_{AS} D_{IM}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$		
	$-0,50000 D_{IM} D_{IS}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	$-0,50000 D_{AM} D_{AX}$	$2,00000 C_S C_S$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	
$-2,00000 D_{MX} D_{MX}$	$-0,50000 D_{AM} D_{IX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$		
	$-0,50000 D_{AX} D_{IM}$	$-2,00000 C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$R(6,6)$
	$-0,50000 D_{IM} D_{IX}$	$2,00000 C_S D_{SX}$	$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(0)$
$R(4,8)$	$0,50000 D_{AS} D_{AX}$	$-1,00000 D_{MS} D_{SX}$		$1,00000 C_A C_A$
	$0,50000 D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$2,00000 C_A C_I$
	$0,50000 D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	$0,25000 D_{AM} D_{AM}$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$0,50000 D_{IS} D_{IX}$	$1,00000 D_{AX} D_{IX}$		$0,50000 D_{AM} D_{IM}$
$1,00000 D_{AM} D_{IM}$		$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,25000 D_{AS} D_{AS}$
$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$0,50000 D_{AS} D_{IS}$
$0,50000 D_{IM} D_{IM}$	$2,00000 C_A C_A$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$		$0,50000 D_{AS} D_{IS}$
$-2,00000 C_M C_M$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	$0,25000 D_{AX} D_{AX}$
$-0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 C_X C_X$	$2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$0,50000 D_{AX} D_{IX}$
$-0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{MX}$		$1,00000 C_I C_I$
$2,00000 C_M D_{MS}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$2,00000 C_X D_{SX}$		$0,25000 D_{IM} D_{IM}$
$2,00000 C_M D_{MX}$	$-2,00000 C_A D_{AM}$	$-1,00000 D_{MX} D_{SX}$		$0,25000 D_{IS} D_{IS}$

0,25000 $D_{IX} D_{IX}$				-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	-2,00000 $C_A D_{AS}$
-1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$			2,00000 $C_A D_{AX}$
-1,00000 $C_A D_{IM}$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	2,00000 $D_{MS} D_{MS}$			1,00000 $D_{AM} D_{AS}$
-1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$				-1,00000 $D_{AM} D_{AX}$
-1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	$R(7,7)$		-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$
1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$			
1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega)$	
1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	
1,00000 $C_I D_{IS}$	2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_A C_I$	2,00000 $C_I C_I$	
-1,00000 $C_A D_{AX}$	-2,00000 $C_M D_{MX}$		0,25000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
-1,00000 $C_A D_{IX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	0,50000 $D_{AM} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	
-1,00000 $C_I D_{AX}$		1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	
-1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	-2,00000 $C_I D_{IM}$	
-0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	
-0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$	
-0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		1,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	
-0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	0,25000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		0,25000 $D_{IX} D_{IX}$		
0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	-1,00000 $C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	
0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $C_A D_{IM}$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	
-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$		-1,00000 $C_I D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	
-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	-1,00000 $C_I D_{IM}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	
-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$		-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	-1,00000 $C_I D_{AS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-1,00000 $C_I D_{IS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	
2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		1,00000 $C_A D_{AX}$	2,00000 $C_M D_{MX}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	1,00000 $C_A D_{IX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$	1,00000 $C_I D_{AX}$		
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$		1,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	2,00000 $C_X D_{SX}$		0,50000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	
-2,00000 $C_A D_{AM}$	-1,00000 $D_{MX} D_{SX}$		0,50000 $D_{AM} D_{IS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	
2,00000 $C_A D_{AS}$		$R(6,7)$	0,50000 $D_{AS} D_{IM}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	
-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$		0,50000 $D_{IM} D_{IS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
-1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	-0,50000 $D_{AM} D_{AX}$	2,00000 $C_S C_S$	
1,00000 $D_{AM} D_{AX}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{AM} D_{IX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		-0,50000 $D_{AX} D_{IM}$	-2,00000 $C_S D_{MS}$	
	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$		-0,50000 $D_{IM} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	
$J^{(1)}(\omega)$			-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$R(6,8)$	-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		
2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$	-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	
-2,00000 $C_I D_{IM}$		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$	-0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-2,00000 $C_S C_S$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	
-1,00000 $D_{IM} D_{IS}$		-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_X D_{MX}$	
1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$	2,00000 $C_S D_{MS}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$	
-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$	-2,00000 $C_A D_{AM}$	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	

$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	$R(7,8)$	$0,50000 D_{AS} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$0,50000 D_{AX} D_{IS}$	$1,00000 D_{AX} D_{IX}$	$2,00000 D_{MS} D_{MS}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	$1,00000 D_{AX} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$2,00000 C_A C_A$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$2,00000 D_{MX} D_{MX}$
$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$-0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 C_X C_X$	$2,00000 D_{SX} D_{SX}$
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$	$-0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$-2,00000 C_X D_{MX}$	
$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	$-2,00000 C_X C_X$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$-2,00000 C_X D_{SX}$	
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$	$2,00000 C_X D_{MX}$	$-2,00000 C_A D_{AM}$	$1,00000 D_{MX} D_{SX}$	
$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	$-1,00000 D_{MX} D_{SX}$	$-2,00000 C_A D_{AS}$		
		$-2,00000 C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_M)$	
$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$		$1,00000 D_{AM} D_{AS}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	
$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$R(8,8)$	$1,00000 D_{AM} D_{AX}$		
		$1,00000 D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	
$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	$J^{(0)}(0)$		$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	
$2,00000 D_{MX} D_{MX}$	$1,00000 C_A C_A$	$J^{(1)}(\omega_I)$		
$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	$2,00000 C_A C_I$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	
$2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$0,25000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 C_I C_I$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	
	$0,50000 D_{AM} D_{IM}$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$		
$J^{(0)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,25000 D_{AS} D_{AS}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_M)$	
$2,00000 D_{SX} D_{SX}$	$0,50000 D_{AS} D_{IS}$	$-2,00000 C_I D_{IM}$	$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	
	$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$-2,00000 C_I D_{IS}$		
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	$0,50000 D_{AX} D_{IX}$	$-2,00000 C_I D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$	
$2,00000 D_{AI} D_{AI}$	$1,00000 C_I C_I$	$1,00000 D_{IM} D_{IS}$	$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	
	$0,25000 D_{IM} D_{IM}$	$1,00000 D_{IM} D_{IX}$		
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$0,25000 D_{IS} D_{IS}$	$1,00000 D_{IS} D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$	
$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	$0,25000 D_{IX} D_{IX}$		$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	
	$-1,00000 C_A D_{AM}$	$J^{(1)}(\omega_M)$		
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$-1,00000 C_A D_{IM}$	$1,00000 D_{AM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	
$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	$-1,00000 C_I D_{AM}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 D_{AI} D_{AI}$	
	$-1,00000 C_I D_{IM}$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$		
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$-1,00000 C_A D_{AS}$	$2,00000 C_M C_M$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	
$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$-1,00000 C_A D_{IS}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$1,00000 D_{AM} D_{AM}$	
	$-1,00000 C_I D_{AS}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$		
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	$-1,00000 C_I D_{IS}$	$-2,00000 C_M D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	
$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	$-1,00000 C_A D_{AX}$	$-2,00000 C_M D_{MX}$	$1,00000 D_{AS} D_{AS}$	
	$-1,00000 C_A D_{IX}$	$1,00000 D_{MS} D_{MX}$		
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	$-1,00000 C_I D_{AX}$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	
$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	$-1,00000 C_I D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	
	$0,50000 D_{AM} D_{AS}$	$1,00000 D_{AS} D_{IS}$		
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	$0,50000 D_{AM} D_{IS}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	
$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$0,50000 D_{AS} D_{IM}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$1,00000 D_{IM} D_{IM}$	
	$0,50000 D_{IM} D_{IS}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$		
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	$0,50000 D_{AM} D_{AX}$	$2,00000 C_S C_S$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	
$2,00000 D_{MS} D_{MS}$	$0,50000 D_{AM} D_{IX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$1,00000 D_{IS} D_{IS}$	
	$0,50000 D_{AX} D_{IM}$	$-2,00000 C_S D_{MS}$		
	$0,50000 D_{IM} D_{IX}$	$-2,00000 C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	
	$0,50000 D_{AS} D_{AX}$	$1,00000 D_{MS} D_{SX}$	$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	

Quantum triplo, 5T_R

$R(1,1)$	$J^{(1)}(\omega_A)$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$	2,00000 $C_A C_I$
		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	2,00000 $C_A C_M$
$J^{(0)}(0)$		2,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
1,00000 $C_A C_A$		1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	2,00000 $C_X C_X$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$
2,00000 $C_A C_I$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_X D_{SX}$	0,50000 $D_{AS} D_{IS}$
2,00000 $C_A C_M$		0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		0,50000 $D_{AS} D_{MS}$
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$
0,50000 $D_{AS} D_{IS}$		2,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{AX} D_{IX}$
0,50000 $D_{AS} D_{MS}$		2,00000 $C_A D_{AX}$		0,50000 $D_{AX} D_{MX}$
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$		1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$R(1,2)$
0,50000 $D_{AX} D_{IX}$		1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $C_I C_I$
0,50000 $D_{AX} D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$			2,00000 $C_I C_M$
1,00000 $C_I C_I$		1,00000 $D_{AI} D_{IM}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	0,25000 $D_{IS} D_{IS}$
2,00000 $C_I C_M$		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	0,50000 $D_{IS} D_{MS}$
0,25000 $D_{IS} D_{IS}$		0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	0,25000 $D_{IX} D_{IX}$
0,50000 $D_{IS} D_{MS}$		2,00000 $C_I C_I$	1,00000 $D_{AX} D_{MX}$	0,50000 $D_{IX} D_{MX}$
0,25000 $D_{IX} D_{IX}$		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $C_M C_M$
0,50000 $D_{IX} D_{MX}$		0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	0,25000 $D_{MS} D_{MS}$
1,00000 $C_M C_M$		2,00000 $C_I D_{IS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	0,25000 $D_{MX} D_{MX}$
0,25000 $D_{MS} D_{MS}$		2,00000 $C_I D_{IX}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{AS}$
0,25000 $D_{MX} D_{MX}$		1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	-2,00000 $C_X C_X$	1,00000 $C_A D_{IS}$
1,00000 $C_A D_{AS}$			-2,00000 $C_X D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{MS}$
1,00000 $C_A D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_M)$			1,00000 $C_I D_{AS}$
1,00000 $C_A D_{MS}$		1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	1,00000 $C_I D_{IS}$
1,00000 $C_I D_{AS}$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$	1,00000 $C_I D_{MS}$
1,00000 $C_M D_{AS}$		0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	1,00000 $C_M D_{IS}$
1,00000 $C_I D_{IS}$		2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $C_M D_{MS}$
1,00000 $C_I D_{MS}$		0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$
1,00000 $C_M D_{IS}$		0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	2,00000 $D_{AM} D_{AM}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
1,00000 $C_M D_{MS}$		2,00000 $C_M D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	1,00000 $D_{AS} D_{MS}$
1,00000 $C_A D_{AX}$		2,00000 $C_M D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
1,00000 $C_A D_{IX}$		1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{MS}$
1,00000 $C_A D_{MX}$				0,50000 $D_{IS} D_{MS}$
1,00000 $C_I D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$		$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-2,00000 $C_S C_S$
1,00000 $C_M D_{AX}$		1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
1,00000 $C_I D_{IX}$		0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		-2,00000 $C_S D_{SX}$
1,00000 $C_I D_{MX}$		1,00000 $D_{AS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	-1,00000 $C_M D_{IX}$
1,00000 $C_M D_{IX}$		0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	-1,00000 $C_M D_{MX}$
1,00000 $C_M D_{MX}$		1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$
0,50000 $D_{AS} D_{AX}$		0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$
0,50000 $D_{AS} D_{IX}$		2,00000 $C_S C_S$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	-0,50000 $D_{AS} D_{MX}$
0,50000 $D_{AS} D_{MX}$		0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IS}$
0,50000 $D_{AX} D_{IS}$		2,00000 $C_S D_{SX}$		-0,50000 $D_{IS} D_{MX}$
0,50000 $D_{AX} D_{MS}$			$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	-0,50000 $D_{IX} D_{MS}$
0,50000 $D_{IS} D_{IX}$			1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MX}$
0,50000 $D_{IS} D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$			
0,50000 $D_{IX} D_{MS}$		1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	$R(2,2)$
0,50000 $D_{IX} D_{MX}$		0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(1)}(\omega_A)$
0,50000 $D_{MS} D_{MX}$		1,00000 $D_{AX} D_{MX}$	$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$
		0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $C_A C_A$	2,00000 $C_A C_A$
				1,00000 $D_{AI} D_{AM}$

0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$		1,00000 $C_A D_{AX}$	
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$	1,00000 $C_A D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$		-2,00000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $C_A D_{MX}$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$
2,00000 $C_A D_{AS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$		1,00000 $C_I D_{AX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$
-2,00000 $C_A D_{AX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$		1,00000 $C_M D_{AX}$	1,00000 $D_{AS} D_{MS}$
-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$			1,00000 $C_I D_{IX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$
	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$	R(2,4)	1,00000 $C_I D_{MX}$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$		1,00000 $C_M D_{IX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$
1,00000 $D_{AI} D_{IM}$		$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $C_M D_{MX}$	2,00000 $C_S C_S$
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	-0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	-0,50000 $D_{AS} D_{IX}$	2,00000 $C_S D_{SX}$
2,00000 $C_I C_I$		1,00000 $D_{AS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{AS} D_{MX}$	
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	-0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{AX} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$
2,00000 $C_I D_{IS}$		0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	-0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$
-2,00000 $C_I D_{IX}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	-2,00000 $C_S C_S$	-0,50000 $D_{IS} D_{MX}$	1,00000 $D_{AX} D_{MX}$
-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	-0,50000 $D_{IX} D_{MS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
		2,00000 $C_S D_{SX}$	-0,50000 $D_{MS} D_{MX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$
				0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$		0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_X C_X$
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$			2,00000 $C_A C_A$	-2,00000 $C_X D_{SX}$
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_A)$	R(3,3)	1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	
2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$		0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(0)}(0)$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	
2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{AM} D_{AM}$	2,00000 $C_A C_I$	-2,00000 $C_A D_{AS}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
-2,00000 $C_M D_{MX}$		2,00000 $C_A C_M$	2,00000 $C_A D_{AX}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	
	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{AS} D_{IS}$		$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
		0,50000 $D_{AS} D_{MS}$		1,00000 $D_{IS} D_{IS}$
$J^{(1)}(\omega_S)$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$	
1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	1,00000 $D_{AI} D_{IM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$		0,50000 $D_{AX} D_{MX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$
1,00000 $D_{AS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	1,00000 $C_I C_I$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	2,00000 $C_I C_M$	2,00000 $C_I C_I$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$
1,00000 $D_{IS} D_{MS}$		0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$
0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	0,50000 $D_{IS} D_{MS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	
2,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	0,25000 $D_{IX} D_{IX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		0,50000 $D_{IX} D_{MX}$	2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$
-2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	1,00000 $C_M C_M$	-1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	
	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	0,25000 $D_{MS} D_{MS}$		$J^{(1)}(\omega_M)$
$J^{(1)}(\omega_X)$		0,25000 $D_{MX} D_{MX}$		$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$
1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{AM} D_{IM}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-1,00000 $C_A D_{IS}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	
1,00000 $D_{AX} D_{MX}$		-1,00000 $C_A D_{MS}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_A)$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-1,00000 $C_I D_{AS}$	2,00000 $C_M C_M$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$
1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_M D_{AS}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$		-1,00000 $C_I D_{IS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
0,50000 $D_{SX} D_{SX}$		-1,00000 $C_I D_{MS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	2,00000 $D_{AM} D_{AM}$
2,00000 $C_X C_X$		-1,00000 $C_M D_{IS}$	2,00000 $C_M D_{MX}$	
2,00000 $C_X D_{SX}$	R(2,3)	-1,00000 $C_M D_{MS}$	-1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$

1,00000 $D_{AS} D_{AS}$	0,25000 $D_{IS} D_{IS}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_S)$
$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	0,50000 $D_{IS} D_{MS}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$
1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	0,25000 $D_{IX} D_{IX}$	-2,00000 $C_I D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	0,50000 $D_{IX} D_{MX}$	-2,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$
2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $C_M C_M$	1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_M)$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$	0,25000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(1)}(\omega_M)$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$
1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	0,25000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$
$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	-1,00000 $C_A D_{AS}$	-1,00000 $C_A D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	-1,00000 $C_A D_{MS}$	-1,00000 $C_I D_{AS}$	2,00000 $D_{AM} D_{AM}$
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	-1,00000 $C_I D_{AS}$	-1,00000 $C_M D_{AS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
1,00000 $D_{MS} D_{MS}$	-1,00000 $C_M D_{AS}$	-1,00000 $C_I D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	-1,00000 $C_I D_{IS}$	-1,00000 $C_I D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
1,00000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_M D_{IS}$	-2,00000 $C_M D_{MS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
$R(3,4)$	-1,00000 $C_M D_{MS}$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
$J^{(1)}(\omega_X)$	-1,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$
1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	-1,00000 $C_A D_{IX}$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	-1,00000 $C_A D_{MX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$
1,00000 $D_{AX} D_{MX}$	-1,00000 $C_I D_{AX}$	1,00000 $D_{AS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	-1,00000 $C_M D_{AX}$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$
1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	-1,00000 $C_I D_{IX}$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$
0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	-1,00000 $C_I D_{MX}$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$
-0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	-1,00000 $C_M D_{IX}$	2,00000 $C_S C_S$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
-2,00000 $C_X C_X$	-1,00000 $C_M D_{MX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$
2,00000 $C_X D_{SX}$	0,50000 $D_{AS} D_{AX}$	-2,00000 $C_S D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
	0,50000 $D_{AS} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	1,00000 $D_{MS} D_{MS}$
	0,50000 $D_{AS} D_{MX}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
	0,50000 $D_{AX} D_{IS}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{MX} D_{MX}$
	0,50000 $D_{AX} D_{MS}$	1,00000 $D_{AX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
	0,50000 $D_{IS} D_{IX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
	0,50000 $D_{IS} D_{MX}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	
	0,50000 $D_{IX} D_{MS}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
	0,50000 $D_{MS} D_{MX}$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
	$J^{(1)}(\omega_A)$	2,00000 $C_X C_X$	
	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	-2,00000 $C_X D_{SX}$	
$R(4,4)$	2,00000 $C_A C_A$	1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	
$J^{(0)}(0)$	1,00000 $D_{AI} D_{AM}$	0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_S)$
1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AS}$
2,00000 $C_A C_I$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	
2,00000 $C_A C_M$	-2,00000 $C_A D_{AS}$	1,00000 $D_{AX} D_{AX}$	
0,25000 $D_{AS} D_{AS}$	-2,00000 $C_A D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_S)$	
0,50000 $D_{AS} D_{IS}$	1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IS} D_{IS}$	
0,50000 $D_{AS} D_{MS}$	$J^{(1)}(\omega_I)$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$	
0,25000 $D_{AX} D_{AX}$	1,00000 $D_{AI} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	
0,50000 $D_{AX} D_{IX}$	0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	$J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$	
0,50000 $D_{AX} D_{MX}$	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	1,00000 $D_{IX} D_{IX}$	
1,00000 $C_I C_I$	2,00000 $C_I C_I$		
2,00000 $C_I C_M$			

Quantum quadruplo, ^{50}R

$R(1,1)$	$2,00000 C_A D_{AX}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$1,00000 D_{AX} D_{SX}$	$-1,00000 C_S D_{SX}$
$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega)$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_A)$
$1,00000 C_A C_A$	$1,00000 D_{AI} D_{IM}$	$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{IX} D_{SX}$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$
$2,00000 C_A C_I$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$		$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$2,00000 C_A C_A$
$2,00000 C_A C_M$	$1,00000 D_{AI} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$	$1,00000 D_{MX} D_{SX}$	$1,00000 D_{AI} D_{AM}$
$2,00000 C_A C_S$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$	$1,00000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$1,00000 D_{AI} D_{AS}$
$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$1,00000 D_{IM} D_{IS}$		$-2,00000 C_X C_X$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$
$0,50000 D_{AX} D_{IX}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$	$J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$		$1,00000 D_{AM} D_{AS}$
$0,50000 D_{AX} D_{MX}$	$2,00000 C_I C_I$	$1,00000 D_{SX} D_{SX}$		$0,50000 D_{AS} D_{AS}$
$0,50000 D_{AX} D_{SX}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$			$0,50000 D_{AX} D_{AX}$
$1,00000 C_I C_I$	$2,00000 C_I D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega)$	$R(2,2)$	$-2,00000 C_A D_{AX}$
$2,00000 C_I C_M$		$2,00000 D_{AI} D_{AI}$		
$2,00000 C_I C_S$	$J^{(1)}(\omega_M)$		$J^{(0)}(0)$	$J^{(1)}(\omega)$
$0,25000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{AM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	$1,00000 C_A C_A$	$1,00000 D_{AI} D_{IM}$
$0,50000 D_{IX} D_{MX}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 D_{AM} D_{AM}$	$2,00000 C_A C_I$	$0,50000 D_{AI} D_{AI}$
$0,50000 D_{IX} D_{SX}$	$1,00000 D_{AM} D_{MS}$		$2,00000 C_A C_M$	$1,00000 D_{AI} D_{IS}$
$1,00000 C_M C_M$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$2,00000 C_A C_S$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$
$2,00000 C_M C_S$	$1,00000 D_{IM} D_{MS}$	$2,00000 D_{AS} D_{AS}$	$0,25000 D_{AX} D_{AX}$	$1,00000 D_{IM} D_{IS}$
$0,25000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$		$0,50000 D_{AX} D_{IX}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$
$0,50000 D_{MX} D_{SX}$	$2,00000 C_M C_M$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	$0,50000 D_{AX} D_{MX}$	$2,00000 C_I C_I$
$1,00000 C_S C_S$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$	$1,00000 D_{AX} D_{AX}$	$0,50000 D_{AX} D_{SX}$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$
$0,25000 D_{SX} D_{SX}$	$2,00000 C_M D_{MX}$		$1,00000 C_I C_I$	$-2,00000 C_I D_{IX}$
$1,00000 C_A D_{AX}$		$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	$2,00000 C_I C_M$	
$1,00000 C_A D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$	$2,00000 D_{IM} D_{IM}$	$2,00000 C_I C_S$	$J^{(1)}(\omega_M)$
$1,00000 C_A D_{MX}$	$1,00000 D_{AS} D_{IS}$		$0,25000 D_{IX} D_{IX}$	$1,00000 D_{AM} D_{IM}$
$1,00000 C_A D_{SX}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	$0,50000 D_{IX} D_{MX}$	$0,50000 D_{AM} D_{AM}$
$1,00000 C_I D_{AX}$	$1,00000 D_{AS} D_{MS}$	$2,00000 D_{IS} D_{IS}$	$0,50000 D_{IX} D_{SX}$	$1,00000 D_{AM} D_{MS}$
$1,00000 C_M D_{AX}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$		$1,00000 C_M C_M$	$0,50000 D_{IM} D_{IM}$
$1,00000 C_S D_{AX}$	$1,00000 D_{IS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$	$2,00000 C_M C_S$	$1,00000 D_{IM} D_{MS}$
$1,00000 C_I D_{IX}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$	$1,00000 D_{IX} D_{IX}$	$0,25000 D_{MX} D_{MX}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$
$1,00000 C_I D_{MX}$	$2,00000 C_S C_S$		$0,50000 D_{MX} D_{SX}$	$2,00000 C_M C_M$
$1,00000 C_I D_{SX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$	$1,00000 C_S C_S$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$
$1,00000 C_M D_{IX}$	$2,00000 C_S D_{SX}$	$2,00000 D_{MS} D_{MS}$	$0,25000 D_{SX} D_{SX}$	$-2,00000 C_M D_{MX}$
$1,00000 C_S D_{IX}$		$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$	$-1,00000 C_A D_{AX}$	
$1,00000 C_M D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$1,00000 D_{MX} D_{MX}$	$-1,00000 C_A D_{IX}$	$J^{(1)}(\omega_S)$
$1,00000 C_M D_{SX}$	$1,00000 D_{AX} D_{IX}$		$-1,00000 C_A D_{MX}$	$1,00000 D_{AS} D_{IS}$
$1,00000 C_S D_{MX}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$		$-1,00000 C_A D_{SX}$	$0,50000 D_{AS} D_{AS}$
$1,00000 C_S D_{SX}$	$1,00000 D_{AX} D_{MX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$	$-1,00000 C_I D_{AX}$	$1,00000 D_{AS} D_{MS}$
	$1,00000 D_{AX} D_{SX}$	$1,00000 D_{SX} D_{SX}$	$-1,00000 C_M D_{AX}$	$0,50000 D_{IS} D_{IS}$
$J^{(1)}(\omega_A)$	$0,50000 D_{IX} D_{IX}$		$-1,00000 C_S D_{AX}$	$1,00000 D_{IS} D_{MS}$
$0,50000 D_{AI} D_{AI}$	$1,00000 D_{IX} D_{MX}$		$-1,00000 C_I D_{IX}$	$0,50000 D_{MS} D_{MS}$
$2,00000 C_A C_A$	$1,00000 D_{IX} D_{SX}$	$R(1,2)$	$-1,00000 C_I D_{MX}$	$2,00000 C_S C_S$
$1,00000 D_{AI} D_{AM}$	$0,50000 D_{MX} D_{MX}$		$-1,00000 C_I D_{SX}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$
$1,00000 D_{AI} D_{AS}$	$1,00000 D_{MX} D_{SX}$		$-1,00000 C_M D_{IX}$	$-2,00000 C_S D_{SX}$
$0,50000 D_{AM} D_{AM}$	$0,50000 D_{SX} D_{SX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$	$-1,00000 C_S D_{IX}$	
$1,00000 D_{AM} D_{AS}$	$2,00000 C_X C_X$	$1,00000 D_{AX} D_{IX}$	$-1,00000 C_M D_{MX}$	$J^{(1)}(\omega_X)$
$0,50000 D_{AS} D_{AS}$		$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$-1,00000 C_M D_{SX}$	$1,00000 D_{AX} D_{IX}$
$0,50000 D_{AX} D_{AX}$	$J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$	$1,00000 D_{AX} D_{MX}$	$-1,00000 C_S D_{MX}$	$0,50000 D_{AX} D_{AX}$

- 1,00000 $D_{AX} D_{MX}$
- 1,00000 $D_{AX} D_{SX}$
- 0,50000 $D_{IX} D_{IX}$
- 1,00000 $D_{IX} D_{MX}$
- 1,00000 $D_{IX} D_{SX}$
- 0,50000 $D_{MX} D_{MX}$
- 1,00000 $D_{MX} D_{SX}$
- 0,50000 $D_{SX} D_{SX}$
- 2,00000 $C_X C_X$

- $J^{(0)}(\omega_A - \omega_X)$
- 1,00000 $D_{AX} D_{AX}$

- $J^{(0)}(\omega_I - \omega_X)$
- 1,00000 $D_{IX} D_{IX}$

- $J^{(0)}(\omega_M - \omega_X)$
- 1,00000 $D_{MX} D_{MX}$

- $J^{(0)}(\omega_S - \omega_X)$
- 1,00000 $D_{SX} D_{SX}$

- $J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$
- 2,00000 $D_{AI} D_{AI}$

- $J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$
- 2,00000 $D_{AM} D_{AM}$

- $J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
- 2,00000 $D_{AS} D_{AS}$

- $J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
- 1,00000 $D_{AX} D_{AX}$

- $J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$
- 2,00000 $D_{IM} D_{IM}$

- $J^{(2)}(\omega_I + \omega_S)$
- 2,00000 $D_{IS} D_{IS}$

- $J^{(2)}(\omega_I + \omega_X)$
- 1,00000 $D_{IX} D_{IX}$

- $J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
- 2,00000 $D_{MS} D_{MS}$

- $J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
- 1,00000 $D_{MX} D_{MX}$

- $J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
- 1,00000 $D_{SX} D_{SX}$

Quantum quintuplo, $^5P^oR$

R(1,1)	1,00000 $D_{AM} D_{MX}$	
	0,50000 $D_{IM} D_{IM}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$
$J^{(0)}(0)$	1,00000 $D_{IM} D_{MS}$	2,00000 $D_{IS} D_{IS}$
2,00000 $C_A C_I$	1,00000 $D_{IM} D_{MX}$	
1,00000 $C_A C_A$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$
2,00000 $C_A C_M$	1,00000 $D_{MS} D_{MX}$	2,00000 $D_{IX} D_{IX}$
2,00000 $C_A C_S$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
2,00000 $C_A C_X$	2,00000 $C_M C_M$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_S)$
1,00000 $C_I C_I$		2,00000 $D_{MS} D_{MS}$
2,00000 $C_I C_M$	$J^{(1)}(\omega_S)$	
2,00000 $C_I C_S$	1,00000 $D_{AS} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_M + \omega_X)$
2,00000 $C_I C_X$	0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	2,00000 $D_{MX} D_{MX}$
1,00000 $C_M C_M$	1,00000 $D_{AS} D_{MS}$	
2,00000 $C_M C_S$	1,00000 $D_{AS} D_{SX}$	$J^{(2)}(\omega_S + \omega_X)$
2,00000 $C_M C_X$	0,50000 $D_{IS} D_{IS}$	2,00000 $D_{SX} D_{SX}$
1,00000 $C_S C_S$	1,00000 $D_{IS} D_{MS}$	
2,00000 $C_S C_X$	1,00000 $D_{IS} D_{SX}$	
1,00000 $C_X C_X$	0,50000 $D_{MS} D_{MS}$	
	1,00000 $D_{MS} D_{SX}$	
$J^{(1)}(\omega_A)$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$	2,00000 $C_S C_S$	
1,00000 $D_{AI} D_{AM}$		
2,00000 $C_A C_A$	$J^{(1)}(\omega_X)$	
1,00000 $D_{AI} D_{AS}$	1,00000 $D_{AX} D_{IX}$	
1,00000 $D_{AI} D_{AX}$	0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	1,00000 $D_{AX} D_{MX}$	
1,00000 $D_{AM} D_{AS}$	1,00000 $D_{AX} D_{SX}$	
1,00000 $D_{AM} D_{AX}$	0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	
0,50000 $D_{AS} D_{AS}$	1,00000 $D_{IX} D_{MX}$	
1,00000 $D_{AS} D_{AX}$	1,00000 $D_{IX} D_{SX}$	
0,50000 $D_{AX} D_{AX}$	0,50000 $D_{MX} D_{MX}$	
	1,00000 $D_{MX} D_{SX}$	
$J^{(1)}(\omega_I)$	0,50000 $D_{SX} D_{SX}$	
1,00000 $D_{AI} D_{IM}$	2,00000 $C_X C_X$	
0,50000 $D_{AI} D_{AI}$		
1,00000 $D_{AI} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_I)$	
1,00000 $D_{AI} D_{IX}$	2,00000 $D_{AI} D_{AI}$	
0,50000 $D_{IM} D_{IM}$		
1,00000 $D_{IM} D_{IS}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_M)$	
1,00000 $D_{IM} D_{IX}$	2,00000 $D_{AM} D_{AM}$	
0,50000 $D_{IS} D_{IS}$		
1,00000 $D_{IS} D_{IX}$	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_S)$	
0,50000 $D_{IX} D_{IX}$	2,00000 $D_{AS} D_{AS}$	
2,00000 $C_I C_I$		
	$J^{(2)}(\omega_A + \omega_X)$	
$J^{(1)}(\omega_M)$	2,00000 $D_{AX} D_{AX}$	
1,00000 $D_{AM} D_{IM}$		
0,50000 $D_{AM} D_{AM}$	$J^{(2)}(\omega_I + \omega_M)$	
1,00000 $D_{AM} D_{MS}$	2,00000 $D_{IM} D_{IM}$	

Resumo

O TRABALHO DESCRITO nesta dissertação teve como objectivo a utilização da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para o estudo de equilíbrios de complexação dos catiões metálicos do grupo 12 com ligandos de natureza biológica (citidina e glicilglicina) e também o estudo teórico e experimental da relaxação transversal de transições de quantum múltiplo em RMN, especificamente, o cálculo teórico e a determinação experimental de constantes de tempo de relaxação T_2 .

Foram desenvolvidos e adaptados dois métodos experimentais para o cálculo de constantes de estabilidade a partir dos desvios químicos de RMN e foram avaliadas as condições preferenciais da sua aplicação. Foi também discutida a escolha do padrão de referência interna para os desvios químicos nestas experiências e a definição dos estados de referência para o cálculo das constantes de estabilidade. Foram calculadas as constantes de estabilidade para os complexos binários formados pelos catiões H^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} com os ligandos citidina e glicilglicina e os complexos ternários mistos destes ligandos com os catiões bivalentes do grupo 12 e foi avaliada a presença de cooperatividade na formação deste último tipo de complexos.

Na Parte respeitante aos estudos sobre a relaxação nuclear foi calculada a matriz de relaxação de Redfield para as coerências de quantum nulo, simples, duplo, triplo, quádruplo e quántuplo num sistema de 5 núcleos de número quântico de spin $1/2$, não acoplados ou fracamente acoplados, que relaxam mutuamente por interacção dipolar directa e indirecta e por anisotropia de desvio químico. Foram também desenvolvidas duas sequências de impulsos simples para a determinação das constantes de relaxação T_2 das transições de quantum nulo e quantum duplo num sistema AX fracamente acoplado, que foram aplicadas ao caso dos núcleos de H-5 e H-6 da citosina em soluções de D_2O .

Résumé

LE TRAVAIL DÉCRIT dans cette dissertation a eu comme objectif l'utilisation de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) pour l'étude des équilibres de complexation des cations métalliques du groupe 12 avec des ligands biologiques (citidine et glicilglycine) et aussi l'étude théorique et expérimental de la relaxation transversal des transitions de quantum multiple, spécifiquement, le calcul théorique et la détermination expérimental des constantes de temps de relaxation, T_2 .

Deux méthodes expérimentales ont été développées et adaptées pour le calcul de constantes de stabilité avec l'utilisation de la déviation chimique en RMN. Le choix de la référence interne et l'établissement de l'état de référence pour les constantes d'équilibre a été discuté. Les valeurs des constantes d'équilibre pour les complexes binaires formés entre les cations H^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} et les ligands cytidine et glicilglycine, et aussi bien les correspondants complexes ternaires mixtes, ont été calculés. Dans le cas des complexes ternaires la présence de coopérativité a été évaluée.

Dans la dernière partie de la dissertation, est présentée la matrice de Redfield pour toutes les cohérences d'un système de cinq nucléus, faiblement couplés, avec relaxation intramoléculaire pour interaction dipôle-dipôle et anisotropie de déviation chimique. Deux séquences d'impulsions ont été développés pour la mesure de la relaxation de quantum nul et quantum double dans un système AX (cytosine).

Abstract

THE OBJECTIVE OF THE WORK described in this dissertation was to study the complexation equilibria of group 12 cations with small biological ligands (cytidine and glycylglycine) by the application of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and also the theoretical and experimental study of transverse relaxation in multiple quantum NMR transitions, namely, the theoretical calculation and experimental determination of transverse relaxation time constants, T_2 .

In Part II, two experimental methods were presented for the calculation of stability constants based on the NMR chemical shifts and the conditions of applicability of these methods were evaluated. The choice of the internal chemical shift standard for the experiments was discussed as well as the definition of the reference states for the calculated stability constants. Stability constants were calculated for binary complexes formed between the cations H^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} and the ligands cytidine and glycylglycine, and for the corresponding ternary mixed complexes; in the latter case the presence of cooperativity was evaluated.

In Part III, the Redfield relaxation matrix was calculated for all the coherences in a five $1/2$ -spin system, weakly coupled, with intramolecular relaxation by dipole-dipole and chemical shift anisotropy interactions. Two simple pulse sequences were developed for the measurement of zero and double quantum transverse relaxation in an AX system (cytosine).

Bibliografia

- [1] *The Principles of Bioinorganic Chemistry*, A. M. Fiabane, D. R. Williams, The Chemical Society Monographs for Teachers nº 31, 1977
- [2] *The Biological Chemistry of the Elements*, J. J. R. Fraústo da Silva, R. P. J. Williams, Clarendon, 1991
- [3] *Metalloproteins-Chemical Properties and Biological Effects*, S. Otsuka, T. Yamanaka, Eds., Elsevier, Cap. 9, 1988
- [4] *General Principles of the Biochemistry of the Elements*, Ei-Ichiro Ochiai, Plenum, 1987
- [5] H. A. Tajmir-Riahi, *Can. J. Chem.*, **67**, 651 (1989)
- [6] K. W. Jennette, S. J. Lippard, D. A. Ucko, *Biochim. Biophys. Acta*, **402**, 403 (1975)
- [7] D. L. Rabenstein, M. T. Fairhurst, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2086 (1975)
- [8] J. S. Casas, M. M. Jones, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **42**, 99 (1980)
- [9] A. R. Norris, R. Kumar, *Inorg. Chim. Acta*, **93**, 33 (1984)
- [10] I. Persson, B. Schneider, *Inorg. Chim. Acta*, **158**, 245 (1989)
- [11] S. Alex, R. Savoie, *Can. J. Chem.*, **65**, 491 (1987)
- [12] D.-L. Hoo, B. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7470 (1979)
- [13] S. Mansy, R. S. Tobias, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 6874 (1974)
- [14] E. Buncel, A. R. Norris, W. J. Racz, S. E. Taylor, *Inorg. Chem.*, **20**, 98 (1981)
- [15] E. Buncel, A. R. Norris, W. J. Racz, S. E. Taylor, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 562 (1979)
- [16] E. Buncel, C. Boone, H. Joly, R. Kumar, A. R. Norris, *J. Inorg. Biochem.*, **25**, 61 (1985)
- [17] D. Rehder, *Coord. Chem. Rev.*, **110**, 161 (1991)
- [18] D. L. Rabenstein, *Acc. Chem. Res.*, **11**, 100 (1978)
- [19] M. A. Basinger, J. S. Casas, M. M. Jones, A. D. Weaver, N. H. Weinstein, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **43**, 1419 (1981)
- [20] *Bioinorganic Chemistry*, Ei-Ichiro Ochiai, Allyn and Bacon, 1977
- [21] *Inorganic Aspects of Biological and Organic Chemistry*, R. P. Hanzlik, Academic, 1976
- [22] *Ressonância Magnética Nuclear*, V. M. S. Gil, C. F. G. C. Geraldês, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (1988)
- [23] *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One And Two Dimensions*, R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, Clarendon, Oxford (1987)
- [24] *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, R. K. Harris, Longman (1986)
- [25] *Nuclear Magnetic Relaxation in Liquids*, J. McConnell, Cambridge University (1987)
- [26] *Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids*, M Goldman, Clarendon, Oxford (1988)
- [27] *Principles of Magnetic Resonance*, C. P. Slichter, Harper and Row, New York (1963)
- [28] R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instrum.*, **37**, 93 (1966)
- [29] R. R. Ernst, *Adv. Magn. Reson.*, **2**, 1 (1966)
- [30] *Handbook of NMR*, R. Freeman, Longman (1988)
- [31] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 490 (1988)

- [32] O. W. Sorensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Prog. NMR Spectroscopy*, **16**, 163 (1983)
- [33] G. Bodenhausen, H. Koogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **58**, 370 (1984)
- [34] A. G. Redfield, *Adv. Magn. Reson.*, **1**, 1 (1965)
- [35] *Principles of Nuclear Magnetism*, A. Abragam, Clarendon, Oxford (1961)
- [36] C. N. Banwell, H. Primas, *Mol. Phys.*, **6**, 225 (1963)
- [37] S. Wimperis, G. Bodenhausen, *Mol. Phys.*, **66**, 897 (1989)
- [38] J. Boyd, U. Hommel, V. V. Krishnan, *Chem. Phys. Letters*, **187**, 317 (1991)
- [39] D. L. Rabenstein, G. S. Srivastava, R. W. K. Lee, *J. Magn. Reson.*, **71**, 175 (1987)
- [40] P. J. Hore, em *Basic Techniques; Methods in Enzimology*, **176**, N. J. Oppenheimer, T. L. James, Eds., Academic, London, 1989, p. 64-77.
- [41] D. Marion, K. Wütrich, *Biochem. Biophys. Res.*, **113**, 967 (1983)
- [42] E. L. Hahn, *Phys. Rev.*, **80**, 580 (1950)
- [43] H. Y. Carr, E. M. Purcell, *Phys. Rev.*, **94**, 630 (1954); S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.*, **29**, 688 (1958)
- [44] V. S. Sharma, J. Schubert, *J. Chem. Educ.*, **44**, 506 (1969)
- [45] *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 2, H. Sigel, Ed., Cap. 2 (H. Sigel) e 3 (V. S. Sharma, D. L. Leusing),
- [46] *Binding Constants*, K. A. Connors, John Wiley and Sons (1987)
- [47] *Stability Constants*, A. E. Martell, R. J. Motekaitis, VCH (1988)
- [48] *Solution Equilibria*, F. R. Hartley, C. Burgess, R. M. Alcock, Ellis Horwood (1980)
- [49] A. Beltrán-Porter, J. A. Ramirez, *Can. J. Chem.*, **61**, 1100 (1983)
- [50] *Determination of Association Constants of Electron-Donnor-Acceptor Complexes*, Roy Foster, em *Molecular Complexes* vol. 2, Paul Elek, London, pág. 107 (1974)
- [51] T. O. Maier, R. S. Drago, *Inorg. Chem.*, **11**, 1861 (1972)
- [52] H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **32**, 257 (1985)
- [53] D. A. Deranleau, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4050 (1969)
- [54] H. Stamm, W. Lamberty, J. Stafe, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1529 (1980)
- [55] *Reactivos Merck-Métodos Complexométricos de Valoración con Titriplex*, 3ª Edição, E. Merck, Darmstadt.
- [56] H. Sigel, A. D. Zuberbühler, O. Yamauchi, *Anal. Chim. Acta*, **255**, 63 (1991)
- [57] P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem.*, **64**, 188 (1960)
- [58] R. Delgado, J. J. R. Fraústo da Silva, M. T. S. Amorim, M. F. Cabral, S. Chaves, J. Costa, *Anal. Chim. Acta*, **245**, 271 (1991)
- [59] P. R. Mitchell, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1079 (1980).
- [60] S. A. Daignault, A. P. Arnold, A. A. Isab, D. L. Rabenstein, *Inorg. Chem.*, **24**, 3984 (1985)
- [61] P. R. Mitchell, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 771 (1979).
- [62] P. R. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1180 (1980).
- [63] *NAG Fortran Library Mark 13*, Numerical Algorithms Group
- [64] H. Sigel, S. S. Massoud, R. Tribolet, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6857 (1988)
- [65] *Numerical Recipes*, W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolski, W. T. Vetterling, Cambridge University, 1988

- [66] I. A. Nimmo, G. L. Atkins, *Biochem. J.*, **157**, 489 (1976)
- [67] D. Dakternieks, *Coord. Chem. Rev.*, **78**, 125 (1987)
- [68] R. B. Martin, *Acc. Chem. Res.*, **18**, 32 (1985)
- [69] R. M. Izatt, J. J. Christensen, H. Rytting, *Chem. Rev.*, **71**, 439 (1971)
- [70] R. B. Martin, *J. Chem. Educ.*, **64**, 402 (1987)
- [71] H. Pezzano, F. Podo, *Chem. Rev.*, **80**, 365 (1980)
- [72] H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
- [73] D. L. Rabenstein, S. Libich, *Inorg. Chem.*, **11**, 2960 (1972).
- [74] *Physical Sciences Data 39: Statistical Methods in Applied Chemistry*, J. Czerminski, a. Iwasiewicz, Z. Paszek, A. Sikorski, Elsevier 1990, pag. 315
- [75] A. J. Jones, D. M. Grant, M. W. Winkley, R. K. Robins, *J. Phys. Chem.*, **74**, 2684 (1970)
- [76] A. J. Jones, D. M. Grant, M. W. Winkley, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2684 (1970)
- [77] J. P. Kokko, J. H. Goldstein, L. Mandell, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2909 (1961)
- [78] L. Gatlin, J. C. Davies, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4464 (1962)
- [79] K. C. Tewari, J. Lee, N. C. Li, *Trans. Farad. Soc.*, **66**, 2069 (1970).
- [80] B. McConnel, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1723 (1982)
- [81] A. D. Brown, M. P. Schweizer, P. O. P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3612 (1967)
- [82] P. Cieplak, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3734 (1988)
- [83] P. O. P. Ts'o, I. S. Melvin, A. C. Olson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1289 (1963)
- [84] S. B. Petersen, J. J. Led, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5308 (1981)
- [85] S. M. Wang, N. C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5069 (1968)
- [86] K. H. Scheller, F. Hoffstetter, P. R. Mitchell, B. Prijs, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 247 (1991)
- [87] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*; Plenum: New York, 1982; Vol 5.
- [88] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*; Plenum: New York, 1975; Vol 2.
- [89] A. Casale, C. De Stefano, S. Sammartano and P. G. Daniele, *Talanta*, **36**, 903 (1989).
- [90] C. A. Evans, D. L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7312 (1987)
- [91] D. L. Rabenstein, T. L. Sayer, *Anal. Chem.*, **48**, 1141 (1974)
- [92] T. L. Sayer, D. L. Rabenstein, *Can. J. Chem.*, **54**, 3394 (1976)
- [93] B. de Castro, J. Pereira, P. Gameiro, J. L. F. C. Lima, *J. Inorg. Biochem.*, **45**, 53 (1992).
- [94] F. Rey, A. Varela, J. M. Antelo, F. Ace, *J. Chem. Eng. Data*, **34**, 35 (1989)
- [95] C. J. Carrell, H. L. Carrell, J. Erlebacher, J. P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8651 (1988)
- [96] R. M. Smith, A. F. Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum, New York, 1976, Vol. 4
- [97] C.-H. Chang, L. G. Marzilli, *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 3656 (1974).
- [98] H. Sigel, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **39**, 1903 (1977)
- [99] H. Sigel, K. H. Scheller, R. M. Milburn, *Inorg. Chem.*, **23**, 1933 (1984)
- [100] S. Shirotake, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 956 (1980)
- [101] L. G. Marzilli, B. Castro, J. Caradonna, R. C. Stewart, C. P. Van Vuuren, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 916 (1980)
- [102] S. M. Wang, N. C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4592 (1966)
- [103] D. L. Rabenstein, R. J. Kula, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2492 (1969)
- [104] D. L. Rabenstein, *Can. J. Chem.*, **50**, 1036 (1972)
- [105] N. C. Li, M. C. M. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5678 (1958)

- [106] S. M. Wang, R. K. Gülpin, *Talanta*, **32**, 329 (1985)
- [107] S. M. Wang, R. K. Gülpin, *Anal. Chem.*, **55**, 493 (1983)
- [108] J. B. Orenberg, B. E. Fischer, H. Sigel, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **42**, 785 (1980)
- [109] H. Sigel, R. Malini-Balakrishnan, U. K. Häring, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5137 (1985)
- [110] H. Sigel, B. E. Fischer, E. Farkas, *Inorg. Chem.*, **22**, 925 (1983)
- [111] B. de Castro, J. Pereira, *Rev. Port. Quím.*, **30**, 57 (1988).
- [112] H. Siegel, em *Metal-DNA Chemistry*; T. D. Tullius, Ed.; ACS Symposium Series 402; American Chemical Society; Washington, DC, 1989; p.159 e referências aí contidas.
- [113] Y. Kinjo, L.-N. Ji, N. A. Corfù, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, **31**, 5588 (1992)
- [114] T. Yokono, S. Shimokawa, J. Sohma, *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 3827 (1975).
- [115] A. C. Plaush, R. R. Sharp, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7973 (1976)
- [116] H. Sigel, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **14**, 394 (1975)
- [117] *Aminoacids and derivatives as ambidentate ligands, Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel, A. Sigel, Eds., Marcel Dekker, Nova Iorque 1979
- [118] L. E. Orgel, R. S. Mulliken, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4839 (1957)
- [119] R. E. Hoffman, D. B. Davies, *Mag. Res. Chem.*, **26**, 523 (1988)
- [120] S. Alex, R. Savoie, M.-C. Corbeil, A. L. Beauchamp, *Can. J. Chem.*, **64**, 148 (1986)
- [121] T. Yamane, N. Davidson, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2599 (1961)
- [122] W. E. Van Der Linden, C. Beers, *Anal. Chim. Acta*, **68**, 143 (1973)
- [123] R. S. Reid, B. Podányi, *J. Inorg. Biochem.*, **32**, 183 (1988)
- [124] J. D. Kennedy, W. J. McFarlane, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **2**, 1653 (1976)
- [125] J. Mason, *Chem. Rev.*, **87**, 1299 (1987)
- [126] R. Bein, H. Günther, A. Maercker, V. Menger, P. Schmitt, *Angew. Chem. Inter. Ed. Engl.*, **21**, 295 (1982)
- [127] D. A. Vidusek, M. F. Roberts, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5452 (1982)
- [128] R. E. Wasylishen, R.E. Lenkinski, C. Rodger, *Can. J. Chem.*, **60**, 2113 (1982)
- [129] J. J. Pesek, J. F. Schneider, *Inorg. Chem.*, **26**, 3064 (1987)
- [130] D. L. Rabenstein, R. Ozubko, S. Libich, C. A. Evans, M. T. Fairhurst, C. Suvanprakorn, *J. Coord. Chem.*, **3**, 263 (1974)
- [131] M. Authier-Martin, A. L. Beauchamp, *Can. J. Chem.*, **55**, 1213 (1977)
- [132] L. Prizant, R. Rivest, A. L. Beauchamp, *Can. J. Chem.*, **59**, 2290 (1981)
- [133] L. S. Kan, N. C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4823 (1970)
- [134] K. Gonda, S. Koga, M. Sakaguchi, Y. Miyata, H. Ogura, T. Okamoto, *Yakugaku Zasshi*, **98**, 708 (1978)
- [135] S. E. Taylor, E. Buncel, A. R. Norris, *J. Inorg. Biochem.*, **15**, 131 (1981)
- [136] R. B. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2059 (1964)
- [137] G. L. Eichorn, P. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 4020 (1963)
- [138] S. Mansy, T. E. Wood, J. C. Sprowles, R. S. Tobias, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 1762 (1974)
- [139] B. McConnel, D.-L. Hoo, *Chem.-Biol. Interactions*, **39**, 351 (1982)
- [140] A. R. Norris, R. Kumar, *Inorg. Chim. Acta*, **93**, L63 (1984)
- [141] M. Krumm, E. Zangrando, L. Randaccio, S. Menzer, A. Danzmann, D. Holthenrich, *Inorg. Chem.*, **32**, 2183 (1993)

- [142] O. Krizanovic, M. Sabat, R. Beyerle-Pfnür, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5538 (1993)
- [143] J. J. Pesek, J. F. Schneider, *J. Inorg. Biochem.*, **32**, 233 (1988)
- [144] S. Libich, D. L. Rabenstein, *Anal. Chem.*, **45**, 118 (1973)
- [145] A. G. Palmer III, M. Rance, P. E. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4371 (1991)
- [146] F. Ni, *J. Magn. Reson.*, **96**, 651 (1992)
- [147] G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4546 (1982)
- [148] S. Wimperis, G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.*, **140**, 41 (1987)
- [149] D. Jaffe, R. L. Vold, R. R. Vold, *J. Magn. Reson.*, **46**, 496 (1982)
- [150] P. S. Hubbard, *Phys. Rev.*, **109**, 1153 (1958)
- [151] R. M. Lyndon-Bell, *Mol. Phys.*, **22**, 837 (1971)
- [152] M. Goldman, *J. Magn. Reson.*, **60**, 437 (1984)
- [153] J. Boyd, U. Hommel, I. D. Campbell, *Chem Phys. Lett.*, **175**, 477 (1990)
- [154] L. G. Werbelow, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.*, **22**, 568 (1973)
- [155] C.-W. Chung, S. Wimperis, *Mol. Phys.*, **76**, 47 (1992)
- [156] V. Mlynárik, *Chem. Phys. Lett.*, **160**, 25 (1989)
- [157] J. Yang, Q. Wu, C. Ye, *Wuli Xuebao*, **355**, 74 (1986)
- [158] P. C. M. von Zijl, C. T. W. Moonen, M. von Kienlin, *J. Magn. Res.*, **89**, 29 (1990)
- [159] M. Gochin, *J. Magn. Res.*, **95**, 299 (1991)
- [160] T. J. Norwood, R. M. Cooke, *J. Magn. Reson.*, **94**, 191 (1991)