

 <p>Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Dept. de Química - FFCLRP-USP</p>	<p>Procedimento operacional padrão (POP)</p>	<p>Pág. 1 de 3</p>
	<p><i>Título: Pesagem e preparo de amostras</i></p>	<p>Rev. 001</p>
<p>Código: POP_005</p>	<p>Data de emissão: 20/11/2024</p>	

1. Objetivo

Este POP descreve as etapas necessárias para o preparo adequado de amostras de RMN, visando garantir a qualidade dos espectros obtidos, assegurar a precisão das análises e prevenir problemas operacionais nos equipamentos.

2. Materiais Necessários

- Tubo de RMN de 7" (altura padrão);
- Pipeta tipo Pasteur;
- Algodão;
- Solventes deuterados específicos;
- Parafilm M para vedação (opcional para solventes voláteis);
- Sonicador (para dissolução de amostras difíceis);
- Nitrogênio gasoso ou ar comprimido de alta pureza.

3. Procedimento

3.1 Quantidade de Material

1. Para amostras de RMN de ^1H , utilize entre 5 e 10 mg do composto. Para RMN de ^{13}C , a quantidade recomendada é de 20 a 30 mg.
2. As quantidades indicadas são apenas sugestões. É essencial considerar o limite de solubilidade do composto, pois material precipitado ou em suspensão no solvente compromete a qualidade do espectro, resultando em linhas largas e baixa resolução.
3. As amostras devem ser previamente pesadas em balança analítica e sua quantidade informada ao laboratório de análise de RMN.
4. A amostra deve ser pesada com precisão para permitir a programação adequada do tempo de cada experimento. O espectrômetro utiliza o sinal de RMN produzido pelos hidrogênios do analito em solução para estimar sua concentração, que pode variar de extremamente alta a extremamente baixa. Esse reconhecimento é feito por meio do parâmetro *rg* (*receiver gain*, ou ganho do receptor). Um valor alto de *rg* indica que o receptor precisa amplificar muito o sinal, sugerindo baixa concentração de hidrogênios do analito na solução. Já um valor baixo de *rg* sugere uma alta concentração.

3.2 Adição de Solvente

1. Utilize aproximadamente 500 μL de solvente deuterado, de modo a preencher o tubo de RMN até uma altura mínima de 3,5 cm e máxima de 4,5 cm.
2. Atenção à interface solvente-ar: amostras que não alcançam a altura mínima de solvente apresentam homogeneidade de campo magnético prejudicada, impossibilitando o *shimming* adequado, o que resulta em espectros de baixa qualidade.
3. Exceder a altura máxima de solvente causa dificuldades adicionais no *shimming* e desperdiça solvente deuterado.

	Procedimento operacional padrão (POP)	Pág. 2 de 3
Código: POP_005	<i>Título: Pesagem e preparo de amostras</i>	Rev. 001
	Data de emissão: 20/11/2024	

3.3 Remoção de Partículas Sólidas

1. Amostras com partículas sólidas, precipitadas ou em suspensão devem ser filtradas ou centrifugadas, pois a presença de partículas altera a homogeneidade do campo magnético.
2. Opções para filtrar: aspirar o líquido através de um pequeno pedaço de algodão em uma pipeta Pasteur ou utilizar filtros de seringa apropriados ao volume e solvente.
3. Em casos de solubilidade reduzida, utilize um sonicador para dissolver o composto e melhorar a homogeneidade da solução.
4. Lembre-se que a temperatura da sonda, geralmente entre 20 e 22°C, também influencia a solubilidade.

3.4 Identificação da Amostra

1. Nunca cole adesivos nos tubos de RMN e não utilize tintas ou canetas para marcação.
2. A amostra deve conter as seguintes informações:
 - Nome do docente responsável
 - Nome do solicitante ou aluno responsável
 - Identificação da amostra
 - Quantidade de amostra
 - Solvente deuterado
 - Demais parâmetros espectrais caso necessário, como, por exemplo, D1, NS, AQ, etc.
 - Caso pertinente, enfatizar a possível degradação da amostra

3.5 Limpeza e Verificação dos Tubos

1. Realize a limpeza dos tubos com acetona, diclorometano ou outro solvente adequado para a amostra. A secagem deve ser feita a vácuo ou com jato de ar seco. Se o solvente for DMSO, substitua-o por metanol. Em seguida, lave o tubo com acetona de boa qualidade e seque-o com nitrogênio ou ar comprimido de boa qualidade.
2. Nunca utilize estufa para secar os tubos, pois isso compromete a integridade do tubo, podendo resultar em problemas durante o *shimming* e danos na sonda.
3. Verifique a integridade dos tubos (sem bordas quebradas) e garanta que estejam no comprimento adequado de 7”.

3.6 Uso de Referência Interna/Externa

1. A referência interna ou externa tem como principal função assegurar a qualidade da medida espectroscópica e não apenas a referenciar o espectro (“zerar” o espectro).

TMS (Tetrametilsilano – (CH₃)₄Si): o TMS é um padrão interno usado em quase todos os solventes, exceto D₂O, pois não é solúvel em água.

DSS (Trimetilsililpropanossulfonato de sódio) e TMSP-d₄ (ou TSP-d₄) - (Deutero-Trimetilsililpropionato de sódio): esses padrões são adequados para soluções aquosas e também permitem a calibração. Por serem sólidos cristalinos e estáveis em solução, DSS e TMSP-d₄ também podem ser usados para quantificação (qNMR), desde que a massa exata adicionada na solução seja conhecida.

Caso opte por utilizar um padrão interno para quantificação, como DSS ou TMSP-d₄, este padrão deve ser rigorosamente pesado e misturado à amostra antes do preparo. Para informações detalhadas sobre os materiais de referência certificados, consulte o documento "QUANTITATIVE NMR

 <p>Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Dept. de Química - FFCLRP-USP</p>	<p>Procedimento operacional padrão (POP)</p>	<p>Pág. 3 de 3</p>
	<p><i>Título: Pesagem e preparo de amostras</i></p>	<p>Rev. 001</p>
<p>Código: POP_005</p>	<p>Data de emissão: 20/11/2024</p>	

Technical Details and TraceCERT® Certified Reference Material" (https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/101/854/qnmr-brochure-rjo.pdf?srsltid=AfmBOoprP4L3BfZZ1wHYCWsVnAGroKEZfVr292oSapOblMCp_Nw2dD4a).

Alternativamente, a técnica ERETIC (*Electronic REference To access In vivo Concentration*) pode ser empregada para quantificação sem necessidade de padrão interno.

A quantificação por RMN pode ser realizada utilizando ambas as metodologias (com e sem padrão interno) de maneira complementar. É importante lembrar que para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados, experimentos de quantificação de analitos devem obedecer rigorosamente aos critérios estabelecidos para controle de qualidade e consistência dos dados.

Referência: Holzgrabe, U. (2010). *Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 57, 229-240.

Leitura Complementar: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/calibracao-em-rmnq-guia-inmetro-2019.pdf>

3.7 Concentração e Preparação da Amostra

1. Evite amostras superconcentradas, especialmente em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), pois a redução do sinal de deutério pode reduzir significativamente o sinal de *lock* do deutério, dificultando a calibração e levando a espectros com baixa resolução, além de interferências na linha de base e nos padrões de multiplicidade dos sinais.
2. Para amostras que requerem cuidados especiais, como aquelas sensíveis à luz, temperatura ou que precisam de análise prolongada, comunique-se com o químico responsável previamente.
3. Seque bem a amostra, eliminando água e solventes residuais de síntese. Recomenda-se o uso de uma bomba de alto vácuo para esse processo.
4. Não pegue na parte debaixo do tubo para não engordurar.

3.8 Preparo em Tubo Shigemi

1. Para tubos Shigemi, dissolva entre 300 e 400 μL de solvente deuterado. A distância entre a base interna do tubo e o início do êmbolo deve ser de 2 cm.
2. Certifique-se de que não haja bolha de ar entre o êmbolo e a amostra, pois isso compromete a resolução espectral.

4. Razões Comuns para Falhas no Preparo de Amostras

1. Baixa solubilidade do soluto ou utilização de solvente inadequado.
2. Frasco de tamanho inadequado para a amostra.
3. Evaporação do solvente durante a análise, principalmente em amostras com solventes voláteis.

5. Considerações Finais

Este POP deve ser seguido rigorosamente para garantir a confiabilidade dos resultados de RMN. Para dúvidas adicionais ou preparação de amostras complexas, consulte a equipe técnica responsável.

Emitido por Viviani Nardini Takahashi em 20 de novembro de 2024.