

# Herramientas para el desarrollo y la mejora de experimentos de hiperpolarización con parahidrógeno

por

Lic. Santiago Bussandri Mattia

A presentar ante la Facultad de Matemática, Astronomía, Física y

Computación

como parte de los requerimientos para la obtención del grado de

Doctor en Física

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Noviembre de 2021

FAMAF-UNC

---

Dirigida por:

Dr. Rodolfo H. Acosta

---

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución No Comercial Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.





# Resumen

La espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN) es posiblemente el método analítico más poderoso y versátil disponible para analizar núcleos que poseen momentos dipolares magnéticos y, respectivamente, momentos angulares de espín. Las aplicaciones de la RMN en ciencia y tecnología incluyen a la química, biología, medicina, control de calidad de alimentos, estudios ambientales de plantas y suelos, entre otras. A pesar de todo el impacto de la RMN, su mayor desventaja es la baja sensibilidad de la señal que puede ser detectada, la cual se origina de un pequeño desbalance en la población de estados nucleares de espín en presencia de campos magnéticos. La estrategia más común para sobreponerse a esta pequeña polarización es el uso de altos campos magnéticos o bajas temperaturas, pero que conllevan a costos demasiado altos o dificultan el estudio de sistemas biológicos.

Desde hace varios años se han comenzado a aplicar diversas estrategias con el objetivo de aumentar la polarización, llevando al sistema a un estado metaestable (de no-equilibrio), donde se aumenta externamente la diferencia de población, es decir, se hiperpolariza el sistema. Una de ellas es la técnica denominada PHIP (por sus siglas en inglés, ParaHydrogen Induced Polarization), la cual involucra una reacción química, donde los protones provenientes de una molécula de parahidrógeno son depositados en una molécula a reaccionar antes de la adquisición de la señal de RMN, resultando en una molécula producto con un sitio específicamente hiperpolarizado. La hidrogenación puede llevarse a cabo al mismo campo magnético donde el experimento de RMN se realiza, lo que es comúnmente llamado como PASADENA (por sus siglas, Parahydrogen and Synthesis Allow Dramatically Enhanced Nuclear Alignment). La principal característica del espectro adquirido bajo estas condiciones es la aparición de picos en antifase. Estos picos asociados a la señal de PHIP son particularmente sensibles al ensanchamiento de las líneas introducido por las inhomogeneidades de campo magnético y por interferencias dadas por la presencia de líneas de resonancias provenientes de una gran cantidad de espines térmicamente polarizados. Estos efectos imponen una limitación en la detección de la señal hiperpolarizada, así como a las configuraciones experimentales debido a que cualquier ensanchamiento producirá una cancelación parcial de la señal obtenida.

Una manera simple de superar estos impedimentos consiste en adquirir la señal con un tren de pulsos de refocalización en vez de un único pulso de radiofrecuencia. De esta manera, se aprovechan dos aspectos principales: por un lado, la cancelación de la señal se elimina gracias al aumento en la resolución del espectro (en este caso, denominado espectro- $J$ ); y, por otro lado, la evolución del operador densidad que proviene de PHIP bajo esta secuencia multipulso difiere sustancialmente de aquellos operadores que surgen

de polarizaciones térmicas. Esto resulta en una separación de frecuencias de ambos tipos de señales, incluso en situaciones donde una resonancia de espines térmicamente polarizados se superpone con aquellos hiperpolarizados. Este método se conoce como PhD-PHIP (Parahydrogen Discriminated - PHIP). En esta tesis, se presentarán distintos ejemplos donde esta adquisición multipulso, muestra su potencialidad en mejorar la información relacionada a espines hiperpolarizados, aplicada a una muestra donde los núcleos que formaban el parahidrógeno son parte de una red de acoplamientos compleja.

En primer lugar, se centrará la discusión en la búsqueda del mejor arreglo de fases para la secuencia multipulso aplicada en un sistema hiperpolarizado con parahidrógeno. Se presentará un estudio detallado de diferentes esquemas de fases en trenes de pulsos, combinando datos experimentales con simulaciones numéricas, con el objetivo de determinar la mejor alternativa para la adquisición del espectro- $J$ , manteniendo los errores al mínimo en la región de frecuencias de interés. Se demostrará que las fases relativas en los pulsos de relocalización de las secuencias multipulsos pueden compensar los errores de pulso y los efectos de espines fuera de resonancia. Se usarán sistemas de espines acoplados, en los cuales la evolución cuántica de los sistemas puede ser simulada y comparada con resultados experimentales. Con el fin de explorar detalles más finos, se recurrirá a la espectroscopía- $J$  parcial, es decir la adquisición del espectro- $J$  de un multiplete definido, el cual es adquirido con el filtro digital correspondiente. Se mostrará inequívocamente que cuando se consideran pulsos de radiofrecuencia finitos, los efectos de multipletes cercanos fuera de resonancia afectan la dinámica de los espines dentro de la ventana espectral de adquisición. De esta manera, considerando resultados simulados y experimentales en sistemas térmicamente polarizados e hiperpolarizados, se demostrará que el esquema de ciclado de fase más robusto para la configuración experimental utilizada consiste en un ciclo de cuatro pulsos, tal como fue implementada en el desarrollo original de PhD-PHIP.

En un segundo lugar, nos introduciremos en el mundo del estudio de la difusión de mezclas en estado líquido mediante métodos espectroscópicos, como la espectroscopía de difusión ordenada (DOSY, según sus siglas en inglés Diffusion Ordered Spectroscopy). Uno de los problemas para la obtención de información clara con esta técnica es la baja relación señal-ruido en mezclas muy diluidas. En este sentido, PHIP surge como una alternativa atractiva para solucionar la falta de sensibilidad en los sistemas diluidos que admiten una hidrogenación de pares. Debido a la característica única de la señal antifase, se puede obtener un beneficio adicional, ya que puede usarse como agente de contraste para resolver la difusión en mezclas de moléculas con coeficientes de difusión similares. Sin embargo, la superposición espectral todavía puede comprometer no solo la correcta interpretación de los resultados, sino también puede llegar a producir la cancelación parcial de la señal hiperpolarizada. En este marco es cuando entra en escena la adquisición parcial del espectro- $J$  en PHIP. Se utilizará una configuración especial usando tubos de Teflón para la entrega del gas enriquecido en estado *para* en experimentos de PHIP con el objetivo de realizar experimentos de difusión in-situ. Estas mismas membranas de Teflón, junto con el apropiado flujo de gas, producen una polarización constante durante una ventana de tiempo que nos permite la adquisición de datos 2D. Se estudiarán brevemente los efectos de convección inducidos por un gradiente de presión que surge cuando el gas fluye por las membranas y cómo eliminar su contribución mediante el uso apropiado de secuencias

de gradientes de campo magnético. Se recurrirá a cálculos numéricos y a experimentos para establecer los tiempos óptimos, con el objetivo de maximizar la relación señal-ruido. Finalmente, se usará la secuencia PhD-PHIP como un bloque de detección para separar señales inducidas térmicamente de aquellas hiperpolarizadas.

Por último, si bien el aumento en la señal de los experimentos de PHIP es de varios órdenes de magnitud más grande que la polarización alcanzada en muestras térmicamente polarizadas, existen ciertos factores que pueden disminuir la intensidad de la señal originada en PHIP o incluso hacerla no observable, como por ejemplo la presencia de una gran cantidad de moléculas no hidrogenadas dentro de la muestra. En este sentido, hace algunos años se introdujo una alternativa a la adquisición con un único pulso de excitación, con el objetivo de filtrar las señales que vienen de protones térmicamente polarizados y por lo tanto limpiar el espectro de PHIP. La secuencia de pulso conocida como OPSY (por su nombre en inglés, Only Parahydrogen Spectroscopy) usa un par de pulsos de gradientes de campo magnético y funciona como un filtro tal que hace que la señal de RMN, al final de la secuencia, esté formada sólo por la contribución de los espines hiperpolarizados. Por otro lado, a partir de la secuencia PhD-PHIP somos capaces de aumentar la resolución del espectro, evitando cualquier contribución que genere una cancelación parcial de la señal hiperpolarizada. Se presentará, en primer lugar, la estrategia de combinar estas dos secuencias, filtrando las señales térmicamente polarizadas por el uso de la secuencia OPSY y adquiriendo una ventana espectral específica con la alta resolución provista por la PhD-PHIP. Este método es extremadamente útil en situaciones en las cuales las moléculas reactantes están muy diluidas, el espectro resultante es muy complejo y/o el campo magnético es inhomogéneo. En segundo lugar, se presentará la idea de alcanzar el mismo resultado, pero reemplazando en el bloque de filtrado los gradientes de campo magnético estático con campos de radiofrecuencia variables linealmente en el espacio.

**Palabras Clave:** RMN, hiperpolarización, difusión, parahidrógeno, espectroscopía- $J$

**Clasificación:** 76.60-k Nuclear magnetic resonance and relaxation. 76.60 Lz Spin echoes. 67.57 Lm Spin dynamics. 82.56 b Nuclear Magnetic Resonance. 82.56 Jn Pulse sequences in NMR.



# Agradecimientos

Quiero aprovechar esta sección para agradecer a todos los que a su manera contribuyeron para que pueda cerrar esta etapa de mi vida. Si bien, en cierta manera, este es un logro personal, claramente hubiera sido imposible de llevar a cabo sin la contención, ayuda, enseñanza de todas estas personas e instituciones.

En primer lugar quiero agradecer a Rodi, quien como mi director de tesis me acompañó durante todos estos años. Fue un gran mentor que con su paciencia, confianza y calidez humana supo sacar lo mejor de mí.

Agradecer también a la facultad y a CONICET por otorgarme la beca que me permitió realizar el doctorado.

A todos mis compañeros del LANAIS, con los cuales disfruté y aprendí en cada momento que nos tocó compartir. Principalmente quiero agradecer a Lichi y a Pablo, con quienes trabajé muy estrechamente todos estos años. Fueron una fuente inmensa de constante enseñanza y estuvieron siempre presente cuando los necesité.

A mis amigos del laboratorio, Leo, Santi, Cheva y Lu. Gracias a ustedes las jornadas eran mucho más llevaderas. Crearon un ambiente de trabajo tan lindo y ameno que durante la pandemia extrañé todos los días.

A toda mi familia, que son una parte fundamental de todo lo que soy. A mi mamá y papá que todos los días me enseñan algo desde el ámbito científico a la vida misma. Son mi modelo a seguir, siempre. A mis hermanos Fran, Pedro, Valen y Oli que son mi alegría de todos los días. A mis abuelos, tías, tíos, primos y a la familia de Mery que me adoptó como uno más.

Y finalmente a Mery, mi compañera de vida que estuvo y está siempre dándome tranquilidad, apoyo y ganas de superarme. Fuiste la compañera ideal de oficina todos estos días y estoy seguro que gran parte de lo que soy es gracias a vos. Gracias, gracias!



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Polarización inducida por parahidrógeno</b>	<b>5</b>
2.1. Introducción . . . . .	5
2.2. Isómeros de espín de la molécula de hidrógeno . . . . .	8
2.3. Formalismo de operadores densidad aplicados a PHIP . . . . .	11
2.3.1. Hamiltoniano molecular . . . . .	14
2.4. Aumento de la señal de RMN con $pH_2$ enriquecido . . . . .	17
2.5. Método experimental . . . . .	18
2.5.1. Preparación del gas enriquecido en parahidrógeno . . . . .	18
2.5.2. Hidrogenación . . . . .	19
2.6. Adquisición de la señal de PHIP . . . . .	22
2.6.1. CPMG y espectroscopía- $J$ . . . . .	23
2.6.2. Espectroscopía- $J$ parcial. Filtro digital . . . . .	25
2.6.3. PhD-PHIP . . . . .	27
<b>3. Optimización de las fases en los trenes de pulsos</b>	<b>31</b>
3.1. Introducción . . . . .	31
3.2. CPMG o CP . . . . .	32
3.3. Ciclados de fases alternativos . . . . .	35
3.4. Sistemas de espín polarizados térmicamente . . . . .	36
3.4.1. Espines desacoplados . . . . .	36
3.4.2. Sistemas de espines acoplados . . . . .	36
3.5. Sistemas de espín hiperpolarizados con PHIP . . . . .	42
3.6. Detalles experimentales . . . . .	44
3.7. Conclusiones . . . . .	44
<b>4. Medición de difusión asistida por PhD-PHIP</b>	<b>47</b>
4.1. Introducción . . . . .	47
4.2. Difusión molecular y RMN . . . . .	49
4.2.1. Eco de espín con gradientes pulsados . . . . .	50
4.2.2. Eco de espín con doble gradientes pulsados . . . . .	51
4.3. Cámara de reacción . . . . .	52
4.4. Monitoreo de la reacción química . . . . .	53

4.5. Difusión de un sistema térmico con acoplamiento- $J$ . . . . .	54
4.6. Difusión de moléculas hiperpolarizadas . . . . .	57
4.7. Detalles experimentales . . . . .	59
4.8. Conclusiones . . . . .	59
<b>5. Aumento de la resolución y sensibilidad de PHIP</b>	<b>61</b>
5.1. Introducción . . . . .	61
5.2. Filtrado con gradientes de campo magnético . . . . .	62
5.2.1. Base teórica . . . . .	62
5.2.2. Resultados Experimentales . . . . .	66
5.2.3. Detalles Experimentales . . . . .	67
5.3. Filtrado de señales térmicas con r.f. inhomogénea . . . . .	68
5.3.1. Evolución de espín durante la irradiación de una r.f. inhomogénea intensa . . . . .	69
5.3.2. Diseño de la secuencia de pulso . . . . .	74
5.3.3. Experimentos con PHIP . . . . .	76
5.4. Conclusiones . . . . .	77
<b>6. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>81</b>

# Capítulo 1

## Introducción

La espectroscopía por RMN es posiblemente el método analítico más poderoso y versátil disponible para analizar núcleos que poseen momentos dipolares magnéticos y, respectivamente, momentos angulares de espín. Sus aplicaciones en ciencia y tecnología son muy variadas e incluyen, entre otros, a la química,<sup>1-3</sup> la biología,<sup>4,5</sup> control de calidad de alimentos<sup>6-8</sup> y estudios ambientales de plantas y suelos.<sup>9,10</sup> Su utilización para la determinación de estructuras porosas, la hace una técnica fundamental y de gran impacto en la industria petrolera.<sup>11,12</sup> Más aún, la aplicación de la RMN al campo de la medicina con las imágenes por resonancia magnética (IRM) proveyó a los clínicos una herramienta de diagnóstico muy poderosa para sus pacientes.<sup>13-15</sup> El hecho que el núcleo actúa en sí mismo como un barómetro del ambiente electrónico y molecular en el cual se encuentra, sumado a su naturaleza no invasiva es lo que hace a la RMN e IRM tan poderosa para el diagnóstico. A pesar de sus ventajas ampliamente reconocidas, la RMN se caracteriza por una sensibilidad extremadamente baja debido a las señales que pueden ser detectadas en equilibrio térmico con un campo magnético externo. Este problema se origina no en la cantidad de núcleos magnéticamente activos presentes, sino en la medida en la que los momentos angulares de espín de esos núcleos interactúan con el campo magnético, aún cuando éste sea extremadamente intenso. Distintos métodos han sido implementados para obtener estados metaestables con niveles de polarización que pueden ser varios órdenes de magnitud superior que en equilibrio térmico. Entre estos métodos, llamados de hiperpolarización, la hidrogenación de sustratos con parahidrógeno ha crecido significativamente en los últimos años. La polarización inducida por parahidrógeno, involucra una reacción química en la cual las moléculas del gas hidrógeno enriquecido en su estado *para* son depositados en una molécula a reaccionar, previo a la adquisición de la señal de RMN.<sup>16,17</sup>

La polarización inducida con parahidrógeno es un método de hiperpolarización ampliamente usado debido a los relativamente bajos requerimientos de hardware. La adaptabilidad de esta técnica a distintos campos relacionados a la RMN como la física, química, e ingeniería entre otros, puede ser encontrada en la gran cantidad de aplicaciones reportadas en las últimas décadas. La lista de experimentos y usos de PHIP en distintos contextos es constantemente actualizada, reflejando su importancia en la RMN actual.

Uno de los protocolos originales presentado en 1987 es conocido como PASADE-

NA (por sus siglas en inglés, Parahydrogen And Synthesis Allow Dramatically Enhanced Nuclear Alignment).<sup>18</sup> En este procedimiento, esta hidrogenación de a pares con gas hidrógeno enriquecido en estado *para* ocurre al mismo campo magnético al cual el experimento de RMN se lleva cabo. La señal hiperpolarizada resultante presenta el siguiente patrón: dos multipletes en antifase proveniente de los protones del parahidrógeno en la molécula producto. La forma de estos multipletes depende fuertemente de la red de interacciones que tengan estos protones con otros dentro de la molécula producto. Esta red de acoplamientos (denominados acoplamientos- $J$ ) produce espectralmente muchas líneas de fases opuestas, separadas por unos pocos Hz. En esta situación, cualquier pequeño grado de inhomogeneidad en el campo magnético externo producirá una pérdida de la información a través de la cancelación parcial de la señal. Adicionalmente, la presencia de líneas de resonancia de una gran cantidad de espines térmicamente polarizados en la vecindad de los multipletes hiperpolarizados pueden también interferir en la detección de señales de PHIP. Para solucionar esto, se diseñó en el año 2007 una secuencia de pulsos, conocida como OPSY (por sus siglas en inglés, Only Parahydrogen Spectroscopy), para filtrar señales no deseadas originadas en protones térmicamente polarizados

La espectroscopía- $J$ ,<sup>19</sup> por otro lado, aparece como una alternativa para evitar los efectos negativos asociados a inhomogeneidades de campo magnético. En muestras térmicamente polarizadas, el defasaje originado en inhomogeneidades de campo magnético se evita al recolectar los datos en el centro de los sucesivos ecos en un tren de pulsos con ciertas condiciones específicas.<sup>20,21</sup> El espectro- $J$ , obtenido al aplicar la transformada de Fourier numérica a la señal temporal, consiste de multipletes muy bien resueltos centrados a frecuencia cero. En la década del 70, se introdujo una variante muy astuta a la espectroscopía- $J$ , donde el uso de un filtro digital durante la adquisición permite la selección de un multiplete particular.<sup>20,21</sup> Más aún, durante el tren de pulsos de refocalización, la señal asociada a PHIP se comporta diferente a su contraparte térmica. Este comportamiento diferente, combinado con propiedades del algoritmo de la transformada de Fourier, provee un mecanismo que fácilmente separa las señales térmicas e hiperpolarizadas independientemente del uso del filtro digital. Este efecto, denominado PhD-PHIP (por sus siglas en inglés, Parahydrogen Discriminated-PHIP),<sup>21,22</sup> representa una alternativa natural para atacar ambos problemas simultáneamente: prevenir la cancelación parcial debido al ensanchamiento de las líneas del espectro y/o a la presencia de una gran cantidad de moléculas térmicamente polarizadas como, por ejemplo, en el caso de solventes no deuterados, los cuales poseen señales de RMN.

Estas propiedades enumeradas sugirieron la posibilidad de considerar la secuencia PhD-PHIP como un bloque de adquisición, en reemplazo de un único pulso de r.f. habitualmente usado en señales de PHIP. Distintas publicaciones han mostrado la potencialidad de esta secuencia en variadas situaciones mejorando la información relacionada a espines hiperpolarizados. Prina et. al.<sup>22</sup> mostraron la utilidad del método para limpiar la señal de PHIP, es decir, para eliminar cualquier contribución térmica a la señal de PHIP. Ellos prepararon una mezcla de una muestra hiperpolarizada con otra térmicamente polarizada, de tal forma que esta última contaminara en gran medida el espectro de RMN en los picos que son de interés. Observaron que si la señal se adquiere luego de un pulso tradicional de r.f., la señal térmica aparece entre los picos hiperpolarizados distorcionando el carácter de

antifase de la señal hiperpolarizada. Sin embargo, cuando se usa la secuencia PhD-PHIP la señal térmica es automáticamente desplazada a los bordes del espectro- $J$  parcial, mientras que la señal hiperpolarizada aparece en el centro. También mostraron la posibilidad de aprovechar la secuencia PhD-PHIP incluso a campo bajo.<sup>23</sup> En este régimen, los espines están fuertemente acoplados entre sí y eso modifica la forma del espectro- $J$  obtenido, ya que se introducen modulaciones que dependen del tiempo entre los pulsos. A pesar de estas dificultades, parte de la señal hiperpolarizada sigue apareciendo exclusivamente en el centro de la ventana espectral, como en el caso a campo alto. Para demostrar esto monitorearon la hidrogenación en un determinado sustrato, evidenciando que cuando se burbujeaba parahidrógeno dentro de la muestra aparecía señal en el centro del espectro- $J$ , pero cuando se dejaba de fluir esta señal desaparecía.

Estas dos aplicaciones motivaron el estudio de las posibles aplicaciones de esta secuencia en otros escenarios. En esta tesis se presenta una explicación del mecanismo detrás de PHIP y de la secuencia PhD-PHIP, incluyendo detalles de su implementación y posibles limitaciones. Se muestran experimentos realizados con esta secuencia a campo magnético alto donde se evalúa su rendimiento y potencialidad. Finalmente, se incluyen ejemplos donde la PhD-PHIP es combinada con secuencias existentes previamente para aumentar la resolución y la sensibilidad ampliando de esta manera su campo de aplicación.



# Capítulo 2

## Polarización inducida por parahidrógeno

### 2.1. Introducción

Tradicionalmente, la RMN se ha ocupado de la excitación y la detección de los momentos angulares de los espines nucleares en equilibrio térmico con el campo magnético estático externo. Los momentos angulares de espín se relacionan con el momento magnético gracias a la constante de proporcionalidad  $\gamma$ . La distribución de poblaciones de los estados está gobernada por la estadística de Boltzmann. Para espines nucleares  $1/2$ , en presencia de un campo magnético externo  $B_0$ , existe una diferencia de energía en los niveles de los dos posibles estados nucleares de espín que surgen de la separación Zeeman. La intensidad de la señal de RMN es proporcional a la diferencia de población de estos estados que resulta de la diferencia de energía en los niveles y que está dada por  $\gamma B_0/k_B T$ , donde  $\gamma$  es la razón giromagnética nuclear,  $T$  es la temperatura absoluta y  $k_B$  es la constante de Boltzmann. Para tomar dimensión de la diferencia de población entre niveles observamos que en un campo magnético de 9.4 T, a 300 K, existe una diferencia de población de solo 1 en 31.000 protones. Los núcleos de  $^1\text{H}$  poseen una de las razones giromagnéticas más grandes y debido a su abundancia del 100 % son los núcleos activos de RMN más fáciles de observar por este método. Sin embargo, existen otros núcleos activos para la RMN como el  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y el  $^{31}\text{P}$  entre los más comunes, aunque con menor  $\gamma$  y menor abundancia natural.

Con el objetivo de mejorar la señal de RMN en varios órdenes de magnitud, las primeras técnicas utilizadas fueron los métodos de polarización basados básicamente en aumentar la intensidad de los campos magnéticos o bajar drásticamente la temperatura. Sin embargo, esto no solo aumenta considerablemente los costos de los equipos de RMN, sino que trabajar a bajas temperaturas inhabilita el estudio de muchos sistemas físicos o biológicos. Un enfoque distinto para aumentar la polarización es llevar al sistema a un estado metaestable (de no-equilibrio), donde se aumenta externamente la diferencia de población, es decir, se hiperpolariza el sistema. En la Fig. 2.1 se muestran algunas técnicas de hiperpolarización como la polarización inducida por parahidrógeno (PHIP),<sup>16-18,24</sup> la polarización nuclear dinámica (DNP),<sup>25-28</sup> la polarización nuclear dinámica induci-

da químicamente (CIDNP),<sup>29-31</sup> el bombeo óptico de gases nobles polarizados,<sup>32,33</sup> la cross-polarización de Hartmann-Hann,<sup>34,35</sup> la polarización nuclear óptica (ONP),<sup>36,37</sup> entre otras. Cualquiera de estas técnicas genera una configuración de hiperpolarización pero acotada temporalmente, ya que siempre el sistema intentará volver a la configuración de baja energía, es decir, al equilibrio térmico de Boltzmann. Estos métodos son de gran importancia, por ejemplo, en la física de gases, ya que debido a su baja densidad hace que las señales sean muy bajas comparadas con el estado líquido. Distinto trabajo en gases hiperpolarizados con helio<sup>38,39</sup> o xenón<sup>40,41</sup> tienen aplicaciones en el área médica ya que son gases que pueden inhalarse o inyectarse en el torrente sanguíneo y ser utilizado para obtener información detalladas de los tejidos.

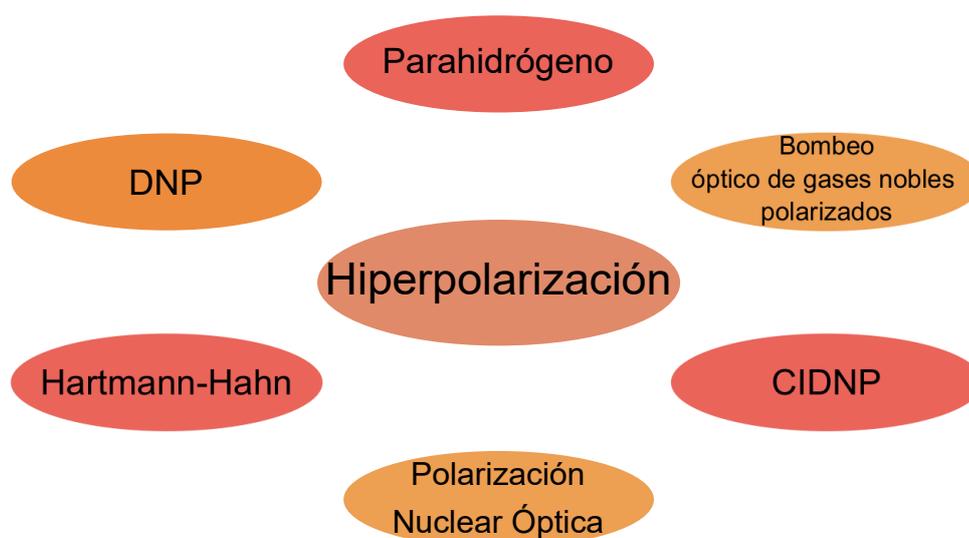


Figura 2.1: Algunos de los métodos de hiperpolarización conocidos

En 1986, Bowers y Weitekamp predijeron que el uso de dihidrógeno enriquecido en su estado *para* en reacciones de hidrogenación resultaría en polarizaciones de espín del orden de la unidad, comparadas a  $10^{-5}$  alcanzadas en equilibrio térmico.<sup>17</sup> Las bases de sus predicciones fueron:

- los principios de simetría en la mecánica cuántica establecen que el parahidrógeno molecular existe en estado puro;
- esta simetría del parahidrógeno debe ser destruida a partir de la adherencia de los protones en sitios distintos de la molécula producto, con el objetivo de lograr su visibilización en experimentos de RMN;
- ambos protones de la molécula de parahidrógeno deben ser adheridos al sustrato en un tiempo más rápido comparado con cualquier otra reacción que pueda competirle;
- la polarización del estado de espín nuclear debe ser creada por una reacción química y no por irradiación de radio frecuencia (r.f.).

Esta polarización nuclear de espín de equilibrio no-térmico creada en el sustrato sería luego detectada en un espectro de RMN de protones o transferida a otros espines usando secuencias de pulsos adecuadas.

Nueve meses más tarde, en septiembre de 1987, Bowers y Weitekamp obtuvieron una verificación experimental de sus predicciones en un artículo llamado “Parahydrogen and Synthesis Allow Dramatically Enhanced Nuclear Alignment (PASADENA)”.<sup>18</sup> Mostraron una técnica a partir de la cual obtuvieron señales de RMN con intensidades 100 veces más grandes que aquellas en equilibrio térmico a temperatura ambiente. Este fenómeno de polarización se llevó a cabo durante la reacción, la cual ocurrió dentro del campo magnético del espectrómetro y se ha hecho conocido como el efecto PASADENA o método PASADENA.

Unos meses más tarde, en el mismo año, un trabajo independiente de Eisenschmid et al., reportó aumentos similares en dos reacciones de hidrogenación distintas.<sup>24</sup> El título “Polarización Inducida por ParaHidrógeno” (o PHIP según sus siglas en inglés) representó el comienzo de un acrónimo mundialmente conocido para todo tipo de experimentos que involucren parahidrógeno enriquecido.

Al año siguiente (1988), otra contribución importante fue publicada por Pravica y Weitekamp.<sup>16</sup> En este caso, la reacción se llevó a cabo a campo bajo y posteriormente la muestra fue trasladada adiabáticamente (donde la adiabaticidad refiere a la mecánica cuántica y no a la termodinámica) a campo magnético alto dentro del espectrómetro para realizar el experimento de RMN. El espectro resultante era marcadamente diferente a aquel obtenido por PASADENA. Llamaron a este efecto ALTADENA (Adiabatic Longitudinal Transport After Dissociation Engenders Net Alignment).

Desde estas publicaciones iniciales, la hidrogenación con parahidrógeno se convirtió en una técnica muy prometedora para aumentar la baja sensibilidad de RMN. Por lo tanto, durante las últimas tres décadas y media se usó en un amplio rango de aplicaciones. En el área de medicina, por ejemplo, la polarización del parahidrógeno es transferida a otros núcleos que actúan como agentes de contraste para imágenes por resonancia magnética,<sup>42,43</sup> o es usado como un marcador biológico en el estudio del metabolismo celular.<sup>44,45</sup> PHIP es muy utilizado para el diseño y análisis de distintos catalizadores<sup>46-48</sup> o en el estudio de reacciones inorgánicas específicas.<sup>49,50</sup> Adicionalmente, ha sido implementada para lograr espectros de RMN de alta resolución,<sup>51,52</sup> junto con estudios de *long-lived states* surgidos del parahidrógeno.<sup>53-55</sup> Más allá de sus aplicaciones químicas, el particular estado de espín del parahidrógeno ha sido usado también en el contexto de procesos de información cuántica.<sup>56-58</sup> La lista de experimentos y usos de PHIP en diferentes contextos es actualizada constantemente, reflejando su importancia en la RMN actual.

Este capítulo no representa un repaso de las aplicaciones del parahidrógeno (o  $pH_2$ ) y por lo tanto la lista de referencias presentadas aquí es necesariamente incompleta. Para una discusión más completa sobre el amplio espectro de aplicaciones de PHIP se aconseja al lector el review presentado por Green et. al.<sup>59</sup> El empeño de este capítulo estará puesto en las bases teóricas de PHIP, se presentará un resumen de la física detrás del parahidrógeno. Se introducirá el formalismo del operador densidad y se explicarán las características principales de PASADENA. En la parte experimental, se explicará el método para la generación del gas hidrógeno enriquecido en su estado *para*, se mostrarán detalles de la

reacción así como del método de detección de la señal de RMN utilizado a lo largo de toda la tesis.

## 2.2. Isómeros de espín de la molécula de hidrógeno

La existencia de dos formas de hidrógeno molecular fue propuesta en los primeros días de la teoría cuántica. De hecho, su descubrimiento y explicación se destaca como uno de los grandes logros de esta nueva teoría. Ya se mencionó que en su predicción original del fenómeno de PHIP, Bowers y Weitekamp se refirieron al postulado de simetrización de la mecánica cuántica. De acuerdo a Messiah,<sup>60</sup> este postulado dice que: “Los estados de un sistema que contienen  $N$  partículas son necesariamente o todos simétricos o todos antisimétricos con respecto a las permutaciones de las  $N$  partículas”. En una molécula diatómica homonuclear (como el dihidrógeno) donde ambos átomos son indistinguibles, los requisitos del principio de Pauli definen la función estado de la molécula. La función de estado representando dos fermiones, con momentos angulares de espín  $1/2$ , tal como el  $H_2$ , debe ser antisimétrica bajo intercambio, lo que implica que la función estado cambie de signo.

A pesar de que el desarrollo completo de la molécula de hidrógeno, desde el punto de vista de la mecánica cuántica es bastante complicado, se incluye aquí un resumen de las principales propiedades (un desarrollo más detallado puede ser encontrado por ejemplo en la ref. 61). Bajo la aproximación de Born-Oppenheimer del rotor rígido, y considerando el dihidrógeno como un gas ideal el cual posee grados de libertad espaciales, electrónicos y nucleares además del de espín, es posible escribir la función de onda total del sistema como el producto de cinco funciones de ondas independientes<sup>61,62</sup> de la forma

$$\Psi_{H_2} = \Psi_e^{orb} \Psi_e^s \Psi_n^{vib} \Psi_n^{rot} \Psi_n^s, \quad (2.1)$$

donde  $\Psi_e^{orb}$  describe el movimiento orbital de los electrones,  $\Psi_e^s$  al estado de espín de los electrones,  $\Psi_n^{vib}$  y  $\Psi_n^{rot}$  el estado vibracional y rotacional nuclear respectivamente, y  $\Psi_n^s$  corresponde al estado de espín nuclear.

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo al principio de exclusión de Pauli, la función de onda  $\Psi_{H_2}$  debe ser antisimétrica con respecto a la permutación de los núcleos. La primera función de onda, correspondiente al estado de base electrónico,  $^1 \sum_g^+$ , es simétrica con respecto a intercambio de los electrones,<sup>62</sup> la segunda función de onda es antisimétrica, y el resto son independiente de las variables y simetrías electrónicas. Esto hace que la función de onda entera sea antisimétrica en los dos electrones, como requiere el principio de Pauli. Por otro lado,  $\Psi_e^{orb}$  es simétrica con respecto a los núcleos, al igual que  $\Psi_e^s$  ya que es independiente de las coordenadas nucleares.  $\Psi_n^{vib}$  es simétrica ya que la posición de los núcleos puede ser intercambiada sin afectar el estado vibracional. La simetría total de la función de onda depende, por lo tanto, de la simetría del producto  $(\Psi_n^{rot} \Psi_n^s)$ .

La función de onda rotacional nuclear depende del número cuántico rotacional  $J$ . Para valores de  $J$  pares,  $\Psi_n^{rot}$  es simétrica con respecto al intercambio de núcleos mientras que para valores de  $J$  impares  $\Psi_n^{rot}$  es antisimétrica. La función de onda de espín nuclear puede ser de la misma manera simétrica o antisimétrica. Siguiendo la regla de sumar momentos

angulares en mecánica cuántica, se puede mostrar que la combinación de dos espines correspondientes a cada núcleo da cuatro posibles funciones. Pueden escribirse como una combinación lineal del producto directo de las dos posibles orientaciones de espín  $1/2$  ( $\alpha$  o  $\beta$ ) para cada único espín, es decir, como

$$\begin{aligned}\Psi_{+1}^T &= |\alpha\alpha\rangle \\ \Psi_0^T &= \frac{1}{\sqrt{2}} (|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle) \\ \Psi_{-1}^T &= |\beta\beta\rangle \\ \Psi_0^S &= \frac{1}{\sqrt{2}} (|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle),\end{aligned}\tag{2.2}$$

Las funciones están agrupadas de acuerdo al momento angular de espín total. Las primeras tres funciones tienen un espín total  $S = 1$  (con la proyección en  $z$  indicada en los subíndices) mientras que la cuarta función posee espín total  $S = 0$ . Son comúnmente conocidas como triplete y singlete, respectivamente; el triplete es simétrico en el núcleo y el singlete es antisimétrico.

De acuerdo al principio de Pauli, la función de rotación simétrica debe ser combinada con una función nuclear singlete, mientras que cada función rotacional antisimétrica tiene que ser asociada con las tres funciones de espín simétricas, para generar una función total de onda siendo antisimétrica con respecto al núcleo. Por lo tanto, existen dos isómeros de hidrógeno, uno llamado parahidrógeno ( $pH_2$ ), teniendo una función nuclear de espín antisimétrica y existiendo solamente en sistemas rotacionales pares, y el otro llamado ortohidrógeno ( $oH_2$ ), teniendo una función nuclear de espín simétrica y existiendo solamente en los estados rotacionales impares.

Debemos ver ahora las proporciones en las cuales orto- y parahidrógeno están presentes en los rangos de condiciones bajo las cuales se llevan a cabo los experimentos de RMN. Es posible calcular la proporción exacta de  $pH_2/oH_2$  a una dada temperatura si consideramos un ensamble de moléculas de  $H_2$  utilizando mecánica estadística.

La función partición de cualquier sistema se define<sup>63</sup> como

$$Z = \sum_i d_i \exp(E_i/k_B T),\tag{2.3}$$

donde  $d_i$  representa la degeneración del nivel de energía  $E_i$ ,  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta. Considerando la aproximación de Born-Oppenheimer que planteamos anteriormente, las poblaciones de los estados rotacionales, acoplados con los estados de espín nucleares, son las que determinan las poblaciones de los estados de espín. Es decir, los estados rotacionales y de espín nucleares no pueden ser separados. Los niveles de energía rotacionales pueden ser expresados como

$$E_J = J(J+1) \frac{\hbar^2}{2I},\tag{2.4}$$

donde  $I$  es el momento de inercia de la molécula de hidrógeno.<sup>61</sup> La diferencia de energía

entre los valores  $E_{J=1}$  y  $E_{J=0}$  es de varios órdenes de magnitud más grande que las diferencias de energía entre estados nucleares de espín. Es por esto, que es posible simplificar la función partición rotacional-espín considerando solo los niveles de energía rotacionales con una degeneración extra producida por los estados de espín nucleares.

Las poblaciones de cada estado se distribuyen de acuerdo al equilibrio de Boltzmann, con la población de cada estado dado por

$$P_J = \frac{1}{Z} d_J d_S \exp(-E_J/k_B T), \quad (2.5)$$

donde los factores  $d_J$  ( $d_S$ ) corresponden a la degeneración de los estados rotacionales (de espín) nucleares. En ausencia de campos magnéticos y eléctricos la degeneración  $d_J$  es  $(2J + 1)$ , de tal manera que la población de cada nivel puede reescribirse como

$$P_J = \frac{1}{Z} (2J + 1) d_S \exp(-J(J + 1)\theta_r/T), \quad (2.6)$$

donde  $\theta_r$  es la temperatura rotacional definida como  $\theta_r = \hbar^2/2Ik_B$ .<sup>56,64</sup> La degeneración  $d_S$  depende del valor de  $J$ . Si consideramos valores de  $J$  pares (impares), la degeneración de espín nuclear  $d_S$  será 1 (3) correspondiente al singlete (triplete).

La razón de moléculas en estado *para* a *orto* presentes a cualquier temperatura en equilibrio térmico se obtiene de calcular las poblaciones de todos los niveles de rotación con números cuánticos pares:

$$N_{para} = \sum_{J=par} (2J + 1) \exp(-J(J + 1)\theta_r/T). \quad (2.7)$$

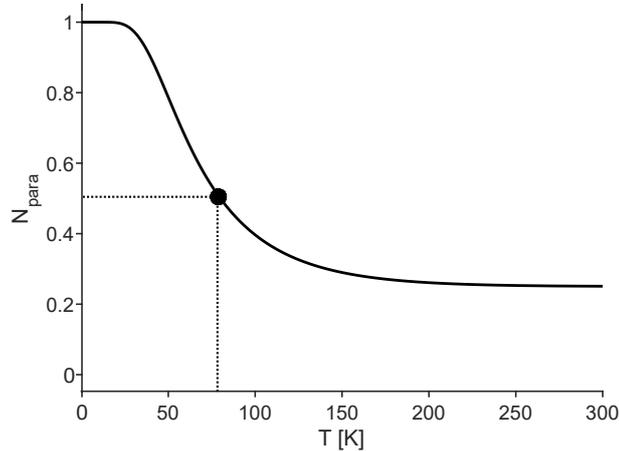


Figura 2.2: Fracción de parahidrógeno presente en un ensamble de moléculas de hidrógeno en su fase gaseosa en equilibrio térmico en función de la temperatura. La línea punteada destaca la temperatura de ebullición del nitrógeno, es decir  $T = 77$  K.

A partir de la Ec. (2.7), es posible calcular la proporción de parahidrógeno en un rango de temperaturas de 0 K a 300 K usando  $\theta_r = 87,6$  K.<sup>65</sup> La Fig. 2.2 muestra la fracción

de parahidrógeno presente en un ensamble de moléculas de hidrógeno gaseoso a equilibrio térmico en función de la temperatura. Para temperaturas que tienden a 0 K existe un 100 % de parahidrógeno en el ensamble, luego el radio *para/orto* decrece rápidamente. La línea punteada vertical destaca la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido ( $T = 77$  K), donde las proporciones de  $pH_2$  y  $oH_2$  son aproximadamente iguales. A temperatura ambiente, la fracción de parahidrógeno es de aproximadamente 25 %. Esta curva es de gran valor para aquellos que llevan a cabo experimentos de RMN con parahidrógeno, preparado ya sea con hidrógeno líquido, nitrógeno líquido, hielo seco, hielo con cloruro de sodio, agua más hielo o a temperatura ambiente.

Es necesario aclarar que el mero enfriamiento del dihidrógeno normal simplemente mantiene la relación original *para/orto* pero altera la distribución de estados rotacionales. Esta situación surge porque las transiciones entre los estados de espín singlete y triplete están prohibidas por las reglas de selección de la mecánica cuántica y consecuentemente la interconversión entre los estados *para* y *orto* es normalmente muy lenta. De hecho, la probabilidad de transición espontánea es de  $\sim 10^{-10} s^{-1}$  o una transición cada 300 años.<sup>66</sup> Veremos más adelante que para acelerar el proceso es necesario el uso de un catalizador adecuado.

## 2.3. Formalismo de operadores densidad aplicados a PHIP

Como es usual en la RMN, los operadores densidad de espín se usan para representar ensambles de espines nucleares no interactuantes, indistinguibles. Matemáticamente, un operador densidad puede ser convenientemente representado por una matriz densidad.<sup>67</sup> En esta sección describiremos brevemente el formalismo aplicado a la simulación de experimentos involucrando hidrogenaciones con parahidrógeno.

La definición formal del operador densidad para estados definidos por funciones de onda  $\Psi_i$  es

$$\rho = \sum_i w_i |\Psi_i\rangle \langle \Psi_i|, \quad (2.8)$$

donde  $w_i$  representa la fracción del estado  $i$ -ésimo en el ensamble. En ausencia de un campo magnético externo, la base natural para expresar la matriz asociada al operador densidad de un ensamble genérico de moléculas de hidrógeno corresponde a la base triplete-singlete, ya que estos vectores son autovectores (ver Ec. (2.2)). Sin embargo, usualmente es preferible expresar el operador densidad en la base Zeeman,  $B = \{|\alpha\alpha\rangle, |\alpha\beta\rangle, |\beta\alpha\rangle, |\beta\beta\rangle\}$ .

El uso de esta base permite una descomposición en un producto de operadores de espín  $I^x, I^y, I^z$ ,<sup>68,69</sup> los cuales (junto a la matriz identidad  $\mathbb{I}$ ) representan la base de operadores para un espín  $1/2$ . A partir de esta base de operadores, para un sistema de dos espines

1/2 interactuantes, es posible reescribir la base triplete-singlete como

$$\begin{aligned}
|\Psi_{+1}^T\rangle\langle\Psi_{+1}^T| &= \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{1}{2}(I_1^z + I_2^z + 2I_1^z I_2^z), \\
|\Psi_0^T\rangle\langle\Psi_0^T| &= \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{1}{2}(2I_1^x I_2^x + 2I_1^y I_2^y - 2I_1^z I_2^z), \\
|\Psi_{-1}^T\rangle\langle\Psi_{-1}^T| &= \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{1}{2}(-I_1^z - I_2^z + 2I_1^z I_2^z), \\
|\Psi_0^S\rangle\langle\Psi_0^S| &= \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{1}{2}(-2I_1^x I_2^x - 2I_1^y I_2^y - 2I_1^z I_2^z),
\end{aligned} \tag{2.9}$$

donde  $\mathbb{I}$  es el operador unidad o identidad de dimensión cuatro. A partir de la Ec. (2.9), es posible definir un operador densidad para el ortohidrógeno puro y otro para el parahidrógeno puro. Reemplazando en la Ec. (2.8),  $w = 1/3$  para cada componente del  $oH_2$  y  $w = 1$  para  $pH_2$  para normalizar el operador densidad, se obtiene

$$\begin{aligned}
\rho^{orto} &= \frac{1}{3}\{|\Psi_{+1}^T\rangle\langle\Psi_{+1}^T| + |\Psi_0^T\rangle\langle\Psi_0^T| + |\Psi_{-1}^T\rangle\langle\Psi_{-1}^T|\} = \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{1}{3}(I_1^x I_2^x + I_1^y I_2^y + I_1^z I_2^z), \\
\rho^{para} &= |\Psi_0^S\rangle\langle\Psi_0^S| = \frac{1}{4}\mathbb{I} - (I_1^x I_2^x + I_1^y I_2^y + I_1^z I_2^z).
\end{aligned} \tag{2.10}$$

Estas expresiones pueden ser reescritas de manera más compacta como

$$\begin{aligned}
\rho^{orto} &= \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{1}{3}\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2 \\
\rho^{para} &= \frac{1}{4}\mathbb{I} - \mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2.
\end{aligned} \tag{2.11}$$

Denotando por  $\rho^{hidr}$  a la matriz densidad de un ensamble de moléculas de hidrógeno, con una fracción arbitraria de parahidrógeno representado por  $N_{para}$  obtenemos

$$\rho^{hidr} = (1 - N_{para})\rho^{orto} + N_{para}\rho^{para} = \frac{1}{4}\mathbb{I} - \xi\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2 + \frac{\epsilon}{4}(I_1^z + I_2^z), \tag{2.12}$$

donde  $\xi \equiv (4N_{para} - 1)/3$ . El tercer factor, es el asociado con el equilibrio térmico presente en un campo magnético intenso y se agregó por completitud. El factor  $\epsilon$  representa el factor de Boltzmann,  $\hbar\gamma B_0/k_B T$ , que a temperatura ambiente, para protones en un campo del orden de los Tesla es de  $\sim 10^{-5}$ . La fracción de  $N_{para}$  depende de la temperatura en la cual el parahidrógeno es enriquecido, como se muestra en la Fig. 2.2. Notar que  $N_{para} = \frac{1}{4}$  a temperatura ambiente, y por lo tanto el segundo término del lado derecho de la Ec. (2.12) desaparece (es decir,  $\xi = 0$ ). De esta forma, el término asociado con el factor de Boltzmann dominará, obteniendo así la matriz densidad para un sistema de dos espines en equilibrio térmico a temperatura ambiente. Por otro lado, a temperaturas extremadamente bajas (menores a 20 K), la proporción de gas parahidrógeno tiende al 100% (es decir,  $\xi = 1$ ), y el operador densidad será dominado por el segundo término del lado derecho de la Ec. (2.12), y el factor térmico puede ser descartado. Cabe destacar, que el cociente  $\xi/\epsilon$  ya nos da una idea del grado de hiperpolarización teórica del sistema (del orden de  $10^4$ ) y, por ende, del aumento en la señal de RMN.

En experimentos de PHIP, el gas hidrógeno debe ser siempre enfriado y el estado parahidrógeno ser lo suficientemente enriquecido de tal manera que  $1/2 \leq N_{para} \leq 1$ . Para el resto del capítulo, y sin pérdida de generalidad, definiremos  $\xi \equiv 1$  (cualquier factor menor a este solo reescalará la señal de RMN aumentada).

El operador densidad inicial  $\rho^{para}$  es proporcional al término  $\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2$ , ver Ec. (2.11). Este

operador es invariante frente a rotaciones, lo que implica en la RMN que en principio no posee una magnetización observable. Es decir, el parahidrógeno por sí mismo no genera ninguna señal de RMN, por lo que necesita de una molécula con la cual reaccionar. Si ambos protones de la misma molécula de  $pH_2$  se transfieren de a pares a una molécula durante una reacción de hidrogenación, el operador densidad de equilibrio térmico de la molécula producto se verá afectado. Asumiendo que la molécula objetivo (reactante) consiste de  $N$  espines  $1/2$ , el operador densidad en equilibrio térmico puede ser expresado como<sup>67, 68, 70</sup>

$$\rho^{re}(0) = \frac{1}{2^N} \mathbb{I} + \frac{1}{2^N} \sum_{k=1}^N \epsilon_k I_k^z. \quad (2.13)$$

Este es el operador densidad de la molécula reactante justo antes de comenzar la reacción. El operador densidad para la molécula producto a  $t = 0$  se construye:

$$\rho^{pr}(0) = \rho^{hidr}(0) \otimes \rho^{ed}(0), \quad (2.14)$$

donde  $\otimes$  denota el producto directo entre las matrices asociadas con los operadores densidad. Usando las aproximaciones detalladas arriba, es posible descartar los términos de Boltzmann. Por lo tanto, el operador densidad producto inmediatamente después de la hidrogenación resulta en

$$\rho^{pr}(0) = \rho^{hidr}(0) \otimes \frac{1}{2^N} \mathbb{I}. \quad (2.15)$$

Inmediatamente después de la reacción, el operador densidad de la molécula producto evoluciona de acuerdo a la ecuación de Liouville-von Neumann,

$$\frac{d\rho^{pr}(t)}{dt} = -i [\mathcal{H}^{pr}, \rho^{pr}(t)], \quad (2.16)$$

donde  $\mathcal{H}^{pr}$  es el Hamiltoniano de espín de la molécula producto independiente del tiempo. La solución formal de esta ecuación es<sup>67, 71</sup>

$$\rho^{pr}(t) = e^{(-i\mathcal{H}^{pr}t)} \rho^{pr}(0) e^{(+i\mathcal{H}^{pr}t)}. \quad (2.17)$$

De esta manera, dado el Hamiltoniano de la molécula producto, es posible calcular el operador inicial de una única molécula reactante. Sin embargo, con el objetivo de considerar todo el proceso de hidrogenación, se debe considerar un ensamble de moléculas. Dado que el gas no se encuentra homogéneamente distribuido en el sistema, se producirán hidrogenaciones a distintos tiempos  $t_i$ , distribuidos a lo largo de un período de tiempo de duración  $T$ . Antes de realizar el experimento de RMN, existirá un ensamble de operadores  $\rho_i^{pr}$  que tienen evoluciones individuales por períodos de tiempo  $T - t_i$ . Si el tiempo en el cual transcurre la hidrogenación es mayor que cualquier evolución interna del sistema, el operador densidad sobre todo el ensamble puede obtenerse realizando un promedio temporal

$$\bar{\rho}^{pr}(T) = \frac{1}{T} \int_{t=0}^T \rho_i^{pr}(t) dt. \quad (2.18)$$

Como consecuencia de la reacción y de la subsecuente evolución, la hiperpolarización puede transferirse desde el parahidrógeno al resto de la molécula, dependiendo únicamente en el Hamiltoniano molecular.

### 2.3.1. Hamiltoniano molecular

Persiguiendo el objetivo de obtener una matriz densidad inicial para un sistema hiperpolarizado con parahidrógeno, es necesario hacer un análisis sobre el Hamiltoniano molecular a utilizar generalmente en esta tesis.

Existen una gran variedad de Hamiltonianos que expresan las interacciones de los espines nucleares, ya sea con efectos externos como con dinámicas internas del sistema. Si bien un análisis profundo de todos los Hamiltonianos existentes exceden el enfoque de esta tesis, es necesario plantear aquellos que serán de gran utilidad para entender los próximos resultados.

#### Interacciones Externas

El espectrómetro usualmente provee dos tipos de campos externos. Un campo estático muy fuerte  $\vec{B}_0$  y otro oscilante mucho más pequeño y perpendicular al primero  $\vec{B}_{\text{rf}}$  o  $\vec{B}_1$ .

- Campo Estático

Por lo general, al campo estático se lo define en una dirección  $z$  arbitraria en un sistema de referencia estático denominado de *laboratorio*,  $\vec{B}_0 = B_0 \hat{k}$ . De esta manera, cada espín nuclear interactúa magnéticamente con ese campo de la forma

$$\mathcal{H}_j^Z = -\gamma B_0 I_j^z = \omega_0 I_j^z. \quad (2.19)$$

El operador  $\mathcal{H}_j^Z$  se lo conoce como Hamiltoniano Zeeman, y asumimos por simplicidad que todos los espines tienen la misma razón giromagnética. El factor  $\omega_0$  representa la frecuencia de Larmor y es la frecuencia en la cual el espín precesa alrededor del campo. En nuestro caso, esta frecuencia es del orden de los cientos de MHz para núcleos de  $^1\text{H}$ .

Esto define la polarización anteriormente descripta, la cual es posible manipular utilizando pulsos de radio frecuencia (pulsos de r.f.) y así obtener una señal de RMN.

- Campo Transversal:

La bobina de radiofrecuencia genera un campo  $\vec{B}_1$ , en el plano perpendicular a  $\vec{B}_0$ . Durante un pulso de radiofrecuencia, este campo oscila a una frecuencia  $\omega_{\text{ref}}$  con una fase  $\phi$ , respectivamente, que pueden ser controladas por el espectrómetro. El campo magnético de r.f. se define:

$$\vec{B}_1(t) = B_1 \{ \cos(\omega_{\text{ref}} t + \phi) \hat{x} + \sin(\omega_{\text{ref}} t + \phi) \hat{y} \}. \quad (2.20)$$

Manipulando matemáticamente esta expresión, podemos llegar al Hamiltoniano para la interacción de los núcleos con el campo transversal:<sup>68</sup>

$$\mathcal{H}_j^{\text{r.f.}}(t) \propto \gamma B_1 \{ \cos(\omega_{\text{ref}}t + \phi) I_j^x + \sin(\omega_{\text{ref}}t + \phi) I_j^y \}. \quad (2.21)$$

La cantidad  $|\gamma B_1|$  es proporcional a la máxima intensidad del campo r.f. en la bobina, y puede ser una medida de cuán intensamente este campo influye en la dinámica de los espines. Ésta se denomina *frecuencia de nutación* y es denotada por  $\omega_{\text{rf}}$ . Típicamente, la frecuencia de nutación  $\omega_{\text{rf}}/2\pi$  está en el rango de 1-200 kHz. Esto es tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la frecuencia de Larmor, incluso bajo los pulsos de r.f. más fuertes. Es destacable que un campo tan pequeño, en relación al campo externo, genere efectos tan claros en los espines. Esto se debe a que el campo de r.f. es resonante con la precesión del espín. Mientras el espín precesa, el campo rotante de r.f. (ver Ec. (2.20)) se mantiene con él, por lo que su efecto se va acumulando con el transcurso del tiempo. Normalmente los pulsos que se utilizan son del orden de los microsegundos.

### Interacciones Internas

Los núcleos experimentan campos eléctricos y magnéticos originados por la propia muestra que permiten un análisis de la estructura interna de la molécula a estudiar. Existen varias interacciones internas pero ahora nos interesaremos solo en dos: el corrimiento químico y el acoplamiento- $J$ .

- Corrimiento químico:

Existe un mecanismo interno de cada molécula que produce un corrimiento en la frecuencia de Larmor de los espines,  $\delta_j$ , debido a pequeños cambios en los campos magnéticos locales producidos por corrientes electrónicas en los orbitales moleculares. Este efecto se lo conoce como corrimiento químico y es la conexión por excelencia de la RMN con la química. En líquidos, el Hamiltoniano se puede expresar como

$$\mathcal{H}_j^{CQ} = -\gamma\delta_j B_0 I_j^z = \omega_j I_j^z. \quad (2.22)$$

Es conveniente combinar la interacción externa con el campo magnético, Ec. (2.19), y la interacción con el corrimiento químico Ec. (2.22), ya que ambas son lineales en los operadores de espín. El resultado de esto es:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_j^0 &= \mathcal{H}_j^Z + \mathcal{H}_j^{CQ} \\ &= \omega_j^0 I_{jz}, \end{aligned} \quad (2.23)$$

donde  $\omega_j^0$  se denomina frecuencia de Larmor químicamente variada correspondiente al espín  $I_j$ . La frecuencia de Larmor  $\omega_j^0$  depende del corrimiento químico  $\delta^j$  de acuerdo a:<sup>68</sup>

$$\omega_j^0 = -\gamma_j B^0 (1 + \delta^j). \quad (2.24)$$

De ahora en más, cuando se mencione la frecuencia del espín  $I_j$ ,  $\omega_j^0$ , se hará referencia a esta frecuencia variada químicamente que incluye el corrimiento químico.

■ Acoplamiento- $J$

La RMN también puede detectar la interacción indirecta que hay entre espines nucleares mediadas por electrones. Esta interacción se denomina acoplamiento- $J$  o acoplamiento dipolar indirecto. El acoplamiento- $J$  representa la segunda gran conexión entre la RMN y la química. El corrimiento químico da una idea del entorno electrónico alrededor del núcleo y el acoplamiento- $J$  permite entrever los enlaces químicos entre el núcleo en cuestión y los núcleos vecinos. En el caso de un líquido isotrópico, el Hamiltoniano- $J$  entre dos espines  $j$  y  $k$  es

$$\mathcal{H}_{jk}^J = 2\pi J_{jk} \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k. \quad (2.25)$$

### El sistema rotante

La solución a la ecuación de Liouville-Von Neumann presentada en la Ec. (2.17) es válida si el Hamiltoniano de la molécula producto  $\mathcal{H}^{pr}$  es independiente del tiempo. Sin embargo, el Hamiltoniano de interacción de los núcleos con el campo transversal de r.f. sí depende del tiempo, Ec. (2.21). Por lo tanto la Ec. (2.16) se vuelve muy difícil de resolver. El “truco” para resolver la dinámica de los espines es equivalente a mirarlos desde un sistema de referencia que rota alrededor del eje  $z$  a la frecuencia de referencia  $\omega_{\text{ref}}$ .

Es posible definir al Hamiltoniano rotado como

$$\tilde{\mathcal{H}}^{pr} = R_z(-\Phi) \mathcal{H}^{pr} R_z(\Phi) - \omega_{\text{ref}} I_z, \quad (2.26)$$

donde  $\Phi$  denota la variable angular tal que  $\Phi = \omega_{\text{ref}} t$ .

Para desarrollar la forma de  $\tilde{\mathcal{H}}^{pr}$ , supongamos un pulso de radiofrecuencia de fase  $\phi_p$  aplicado perpendicularmente al campo estático en el sistema de referencia de laboratorio. Como ya sabemos, el campo de r.f. oscila a la frecuencia de resonancia del espectrómetro  $\omega_{\text{ref}}$ , mientras que los espines precesan a la frecuencia de Larmor  $\omega_j^0$ , Ec. (2.24). Entonces de acuerdo a la Ec. (2.26), el  $\tilde{\mathcal{H}}^{pr}$  para un dado espín  $I_j$  es:

$$\tilde{\mathcal{H}}^{pr} = \Omega_j^0 I_j^z + \omega_{\text{rf}} (I_j^x \cos(\phi_p) + I_j^y \sin(\phi_p)) + \mathcal{H}_{jk}^J, \quad (2.27)$$

donde  $\Omega_j^0$  se denomina frecuencia de offset o frecuencia de resonancia y es la diferencia entre la frecuencia de Larmor  $\omega_j^0$  y la frecuencia de referencia del espectrómetro  $\omega_{\text{ref}}$ ,

$$\Omega_j^0 = \omega_j^0 - \omega_{\text{ref}}. \quad (2.28)$$

Lo más interesante dentro de toda esta “elección” de los sistemas a usar es que el operador densidad  $\rho^{pr}$  es igual en ambos sistemas. La demostración es muy ilustrativa y puede encontrarse en la referencia 68, página 284. Por lo tanto, como la descripción del pulso de r.f. es mucho más sencilla desde el sistema rotante, usaremos de ahora en adelante dicho sistema. El símbolo  $\tilde{\phantom{x}}$  utilizado para identificarlos es descartado desde ahora.

El Hamiltoniano molecular cuando no se aplique un pulso de r.f. en el sistema rotante estará dado por

$$\mathcal{H}^{pr} = 2\pi \sum_{j=1}^N \nu_j I_j^z + 2\pi \sum_{j,k;j}^N J_{j,k} \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k, \quad (2.29)$$

donde  $2\pi\nu_j = \Omega_j^0$ .

## 2.4. Aumento de la señal de RMN con pH<sub>2</sub> enriquecido

En esta sección, encontraremos la matriz densidad inicial de una molécula reaccionada con parahidrógeno, dado el protocolo PASADENA, antes de realizar cualquier tipo de experimento de RMN. Utilizaremos un sistema de dos espines para mostrar la evolución temporal del operador densidad, junto con las distintas características del espectro de RMN de PHIP para el caso donde los protones del parahidrógeno se depositan en dos sitios magnéticamente inequivalentes.

Asumamos que los protones transferidos formarán lo que se llama un sistema de acoplamiento débil, en el que se cumple que la diferencia de corrimiento químico es mucho mayor al acoplamiento- $J$  entre ellos,  $\Delta\nu = |\nu_1 - \nu_2| \gg J_{12}$ . Consideraremos una reacción con parahidrógeno enriquecido realizada a un campo magnético intenso, tal que los protones forman un sistema de espín AX (o débilmente acoplado) en la molécula producto. Antes de la reacción, el operador densidad es  $\rho^{pr}(0) = \mathbb{I}/4 - \mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2$ . Si se resuelve numéricamente la Ec. (2.17) para un Hamiltoniano de dos espines débilmente acoplados<sup>68</sup>

$$\mathcal{H}_{12} = 2\pi\nu_1 I_1^z + 2\pi\nu_2 I_2^z + 2\pi J_{12} I_1^z I_2^z \quad (2.30)$$

y luego se realiza un promedio temporal de acuerdo a la Ec. (2.18) durante un tiempo de reacción  $t_r$  más largo que los tiempos característicos internos del sistema, es decir  $t_r \gg 1/\nu_{1,2}; 1/J_{12}$ , el operador densidad promedio que se obtiene es igual a

$$\bar{\rho}^{pr}(tr) = \mathbb{I}/4 - I_1^z I_2^z, \quad (2.31)$$

el cual resulta, luego de un pulso de radiofrecuencia (que luego detallaremos la característica que debe tener), en el espectro mostrado en la Fig. 2.3(a). La Fig. 2.3(b) muestra el espectro de RMN si el operador inicial fuera el de equilibrio térmico

$$\rho_{ter} = \frac{\mathbb{I}}{4} + \frac{\epsilon}{4} (I_1^z + I_2^z), \quad (2.32)$$

de tal manera que se puede observar el aumento teórico de la señal de RMN. Las simulaciones fueron realizadas para  $T = 300$  K,  $B_0 = 7$  T,  $\nu_{1,2} = \pm 350$  Hz,  $J_{12} = 7$  Hz.

La característica de picos en antifase es una de las cualidades más famosas del protocolo de PASADENA luego de una reacción hidrogenación de a pares. A diferencia del sistema de espín en equilibrio térmico con el campo magnético estático, el operador densidad

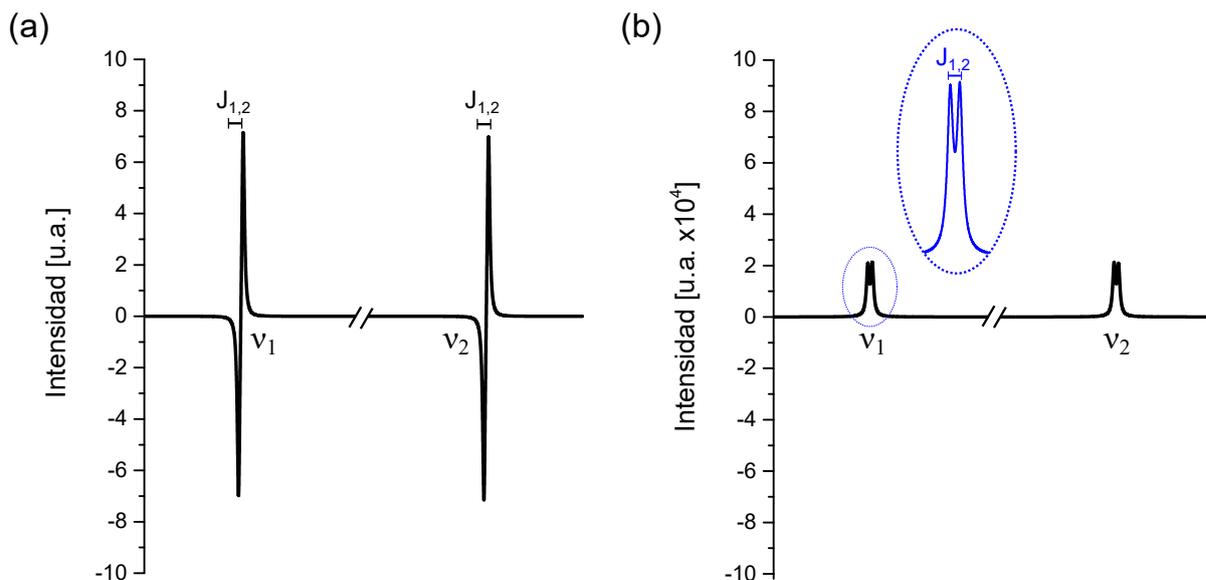


Figura 2.3: (a) Simulación de un espectro de RMN de dos espines hiperpolarizados. La característica señal antifase surge del operador inicial bilineal. (b) Igual que (a) pero para un operador inicial dado por la distribución de Boltzman a temperatura ambiente. Las intensidades muestran el aumento teórico de la señal de RMN. En azul se le hace un acercamiento a uno de los dobletes para indicar que la separación de los picos es igual al acoplamiento- $J$ .

que describe el estado de espín inicial está dominado por un operador longitudinal de orden dos de espín. Por lo tanto, en un espectro de RMN surgen los característicos picos antifase a las frecuencias de corrimiento químico correspondientes en la molécula producto y separados por el acoplamiento- $J$ , ver Fig. 2.3(a). Observaremos más adelante, que la forma de estos picos es especialmente sensible a inhomogeneidades en el campo magnético estático lo que nos producirá una pérdida de la información (situación que en equilibrio térmico no sucede).

## 2.5. Método experimental

### 2.5.1. Preparación del gas enriquecido en parahidrógeno

La Fig. 2.2 nos da una idea de como realizar este proceso. Ya se mencionó que el mero enfriamiento del gas solo produce cambios en la distribución de estados rotacionales debido a la prohibición cuántica de las transiciones entre los estados de espín triplete y singlete. Fue Dennison, en 1927, quien mostró que la interconversión de  $oH_2$  a  $pH_2$  es extremadamente lenta.<sup>72</sup> Dos años más tarde Bonhoeffer y Harteck<sup>73</sup> descubrieron que catalizadores, como el carbón activado, aceleran la concreción del equilibrio termodinámico, permitiendo la rápida modificación de la relación  $pH_2/oH_2$  al enfriar el gas. Una vez alcanzado el equilibrio térmico, el gas debe ser retirado de las impurezas paramagnéticas y se debe almacenar en un reservorio limpio. Ahora la ausencia de transiciones se convierte

en una ventaja, ya que el gas no volverá a su estado natural a temperatura ambiente, es decir de 25%  $pH_2$  y 75%  $oH_2$ , y se mantendrá la proporción de parahidrógeno a la temperatura en la cual se enfrió el gas anteriormente.

El gas, en teoría, debería permanecer en este estado por tiempos extremadamente largos. En la práctica, el gas enriquecido mantiene la proporción obtenida algunas semanas, ya que es imposible almacenar el gas en un lugar libre de impurezas, ya que la propia presencia de las paredes del cilindro de aluminio que se utiliza para su almacenamiento o las simples colisiones con moléculas de ortohidrógeno generan nuevas transiciones triplete/singlete.

Todos estos recaudos se tuvieron en cuenta a la hora de la construcción del arreglo experimental para la generación del gas enriquecido en estado parahidrógeno. La construcción del sistema de generación del gas fue parte de la tesis del Dr. Prina.<sup>74</sup> Un esquema básico del arreglo experimental usado para generar 50% de gas enriquecido en  $pH_2$  se muestra en la Fig. 2.4.

El gas hidrógeno se encuentra almacenado en el reservorio **A** a temperatura ambiente. Antes de ingresar en el tubo lleno de impurezas paramagnéticas se realiza un vacío a toda la línea por donde fluirá el gas. Luego de extraer todo el aire presente, el hidrógeno ingresa en la cámara con el carbón activado abriendo la válvula **1**, la cual está embebida en nitrógeno líquido (77 K). La proporción parahidrógeno-ortohidrógeno aumenta siguiendo la línea marcada en la Fig. 2.2, desde 300 K hasta la temperatura de ebullición del nitrógeno. Teóricamente el equilibrio térmico se alcanza en cuestiones de algunos minutos (siempre y cuando haya las suficientes impurezas paramagnéticas), pero para asegurarnos la conversión total del gas, se esperó 30 min por carga de gas ingresado en la cámara. Pasado ese tiempo, se abre la válvula **2**, la cual posee un filtro de lana de vidrio y una tela para evitar que el catalizador se filtre por la línea. El gas enriquecido en estado parahidrógeno ingresa al reservorio **2** al cual se le había practicado antes un vacío de hasta  $10^{-5}$  Bar. Todo este proceso se repite entre cuatro y cinco veces hasta obtener la presión deseada de  $pH_2$  (dependiendo del experimento a realizar se utiliza entre 4 a 6 Bar aproximadamente). A pesar de la larga duración del estado parahidrógeno del gas dentro del reservorio, generalmente el gas se produjo el mismo día o el día anterior a realizar los experimentos de RMN, para asegurarnos la máxima eficiencia posible.

### 2.5.2. Hidrogenación

La hidrogenación que genera una hiperpolarización en una dada molécula producto no es un proceso para nada sencillo de lograr. En primer lugar, se debe cumplir necesariamente que ambos átomos participantes de una única molécula de  $pH_2$  deben ser transferidos a una molécula objetivo. De esta manera, la correlación del singlete de espín se conserva en el producto, generando la hiperpolarización como observamos teóricamente en la sección anterior. Es necesario aclarar que existen ejemplos donde un solo átomo es transferido a la molécula producto mostrando hiperpolarización<sup>75,76</sup> pero estos casos son considerados excepcionales. En general, la reacción de a pares puede ser considerada una condición restrictiva.<sup>77</sup> En segundo lugar, el tiempo en el que debe realizarse la reacción debe ser lo suficientemente corto (del orden de los segundos), como para poder realizar el experimen-

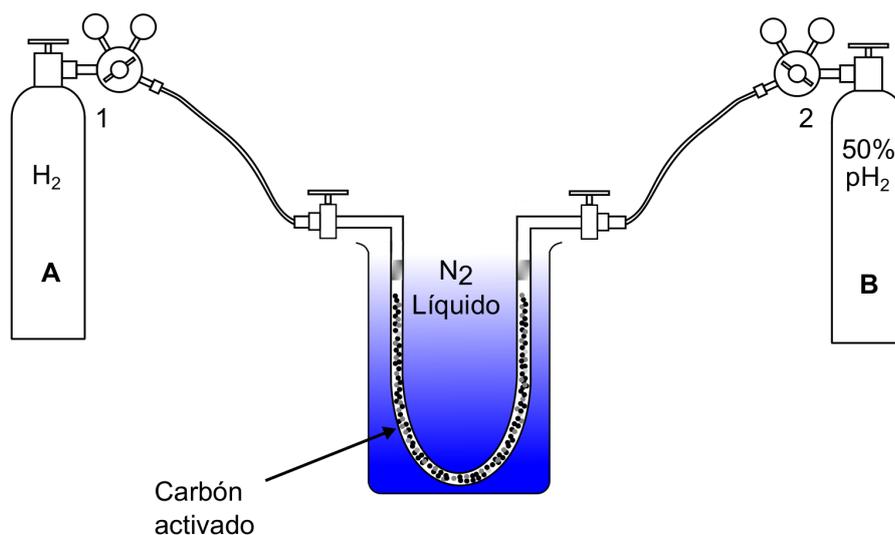


Figura 2.4: Esquema del arreglo experimental utilizado para enriquecer  $H_2$  en un 50% de estado  $pH_2$ .

to de RMN antes de que el sistema vuelva al equilibrio térmico. A todo esto, se le puede sumar también que no toda molécula es apta para recibir este par de átomos de hidrógeno, lo que genera que la lista, tanto de catalizadores como de moléculas a hiperpolarizar, no sea demasiado extensa.

La mayoría de los experimentos de PHIP sobre espectroscopía o imágenes encontrados en la literatura son realizados con catalizadores homogéneos, usualmente centros metálicos, disueltos junto a la molécula objetivo en una misma fase líquida<sup>59,78,79</sup> (de ahí el término “homogéneo”). Este no es un punto menor, ya que las aplicaciones en medicina clínica con IRM están opacadas por la dificultad de eliminar el catalizador de la muestra reaccionada. Esto es debido a su alto grado de toxicidad y baja, o nula, solubilidad en agua, y por lo que en general se utiliza acetona como solvente, lo que impide el uso directo en sistemas biológicos. Si bien ya existen avances para separar el catalizador de la molécula reaccionada (o utilizar catalizadores solubles en agua<sup>80,81</sup>), todavía sigue siendo uno de los grandes desafíos de PHIP. Un enfoque distinto para sobreponerse a este obstáculo es el uso de catalizadores heterogéneos, donde la molécula producto se encuentra en fase gaseosa y el catalizador en estado sólido.<sup>82,83</sup> Sin embargo, la mayoría de los catalizadores utilizados no son compatibles con la adherencia de a pares necesaria. Por el contrario, este tipo de reacciones generalmente conducen a insertar aleatoriamente átomos de hidrógeno en la molécula objetivo. A pesar de esta debilidad, la posibilidad de lograr experimentos de PHIP con reacciones heterogéneas (HET-PHIP) ha sido largamente demostrada por Koptyug y sus colaboradores.<sup>84-86</sup>

Debido a la dificultad para la implementación de reacciones heterogéneas, en esta tesis se optó por llevar a cabo hidrogenaciones homogéneas. Desde hace varios años, se conoce que los catalizadores llamados complejos de Wilkinson<sup>87</sup> resultan ideales para realizar experimentos de PHIP. En particular, aquellos que poseen centros metálicos con Iridio,

Paladio o Rodio, han demostrado tener un buen desempeño en reacciones de hidrogenación homogénea.

En esta tesis se utilizó un catalizador adquirido comercialmente a base de Rodio (ver Fig. 2.5(a)). Este compuesto es el más utilizado en PHIP, ya que produce hidrogenación de a pares en cuestión de segundos una vez disuelto en acetona. Particularmente, en esta tesis se utilizó acetona deuterada ya que no posee señal de RMN, y no interfiere en las señales que buscamos obtener. Todo el proceso de disolución del catalizador debe realizarse en una cámara de atmósfera controlada en presencia de Nitrógeno debido a que el catalizador es propenso a oxidarse y esto afecta directamente el desempeño de la reacción química.

Con respecto a la molécula a hidrogenar, se utilizó 1-hexino (ver Fig. 2.5(b)) debido a su alta reactividad y bajo costo. Este es un líquido tóxico, inflamable con punto de ebullición entre 71 °C y 72 °C. Desde el punto de vista del sistema de espines, la molécula reaccionada (1-hexeno) forma un sistema de tres espines débilmente acoplados etiquetados como  $H_a$ ,  $H_b$ , y  $H_c$ . El espectro de RMN resultante se muestra en la Fig. 2.5(c) donde se observa la típica señal antifase de PHIP y que no existe transferencia a otros protones ya que el experimento se realizó con el protocolo PASADENA.

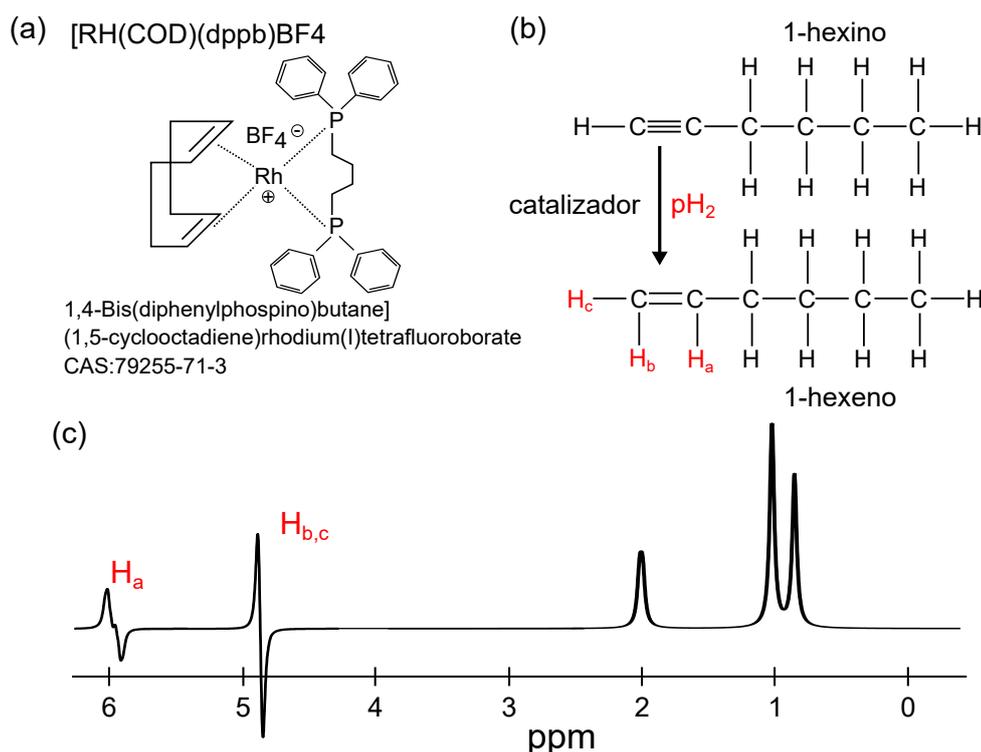


Figura 2.5: (a) Catalizador soluble en acetona utilizado en los experimentos de PHIP. (b) Esquema de hidrogenación de 1-hexino a 1-hexeno. (c) Espectro de 1-hexeno hiperpolarizado. Los picos etiquetados marcan los antiguos protones del parahidrógeno.

## 2.6. Adquisición de la señal de PHIP

En la Fig. 2.3(a) y Fig. 2.5(c) observamos simulaciones y experimentos, respectivamente, de los dobletes antifases que surgen de aplicar el protocolo PASADENA con PHIP. A pesar del aumento de la señal, en comparación con aquella obtenida en equilibrio térmico, existen situaciones donde puede ocurrir la pérdida de información. La presencia de un campo magnético inhomogéneo genera un aumento en el ancho de línea de los picos de resonancia de un espectro de RMN. En sistemas térmicamente polarizados, esto se traduce en una pérdida de resolución pero la integral de todo el espectro se conserva porque está relacionada a la magnetización transversal inmediatamente después del pulso de r.f., Fig. 2.6(a). En el caso del espectro de PASADENA, el aumento del ancho de línea producto de inhomogeneidades de campo magnético produce una cancelación parcial de la señal. El área bajo la curva ya no es más constante cuando las inhomogeneidades aumentan el ancho de línea,<sup>21</sup> Fig. 2.6(b). En otras palabras, la presencia de inhomogeneidades de campo magnético puede extinguir la hiperpolarización alcanzada por PHIP al punto de hacerla apenas observable.

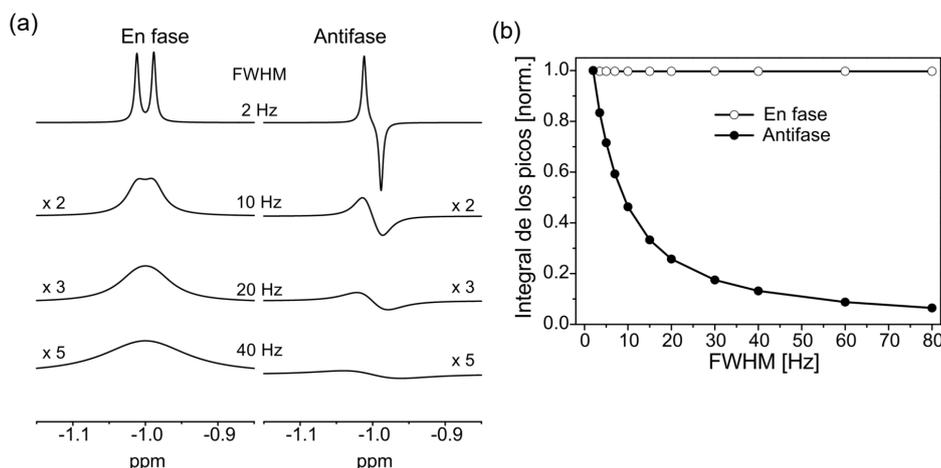


Figura 2.6: Figura extraída de la tesis del Dr. Ignacio Prina.<sup>74</sup> Esquema del efecto de la inhomogeneidades de campo en las señales térmicas y PHIP. (a) Espectros simulados con diferentes anchos de línea. (b) Integrales de los espectros en función del ancho de línea. Se puede apreciar como la señal PHIP disminuye su intensidad a medida que el campo es más inhomogéneo.

Una forma de solucionar este problema es utilizar secuencias que comúnmente se conocen como ecos de espín o eco de Hahn. Estas secuencias consisten en pulsos de radiofrecuencia separados por un tiempo denominado tiempo de eco ( $t_E$ ) a partir de los cuales se eliminan las contribuciones de las inhomogeneidades de campo refocalizando la magnetización. Bajo ciertas condiciones experimentales y el correcto procesamiento de los datos obtenidos (los cuales se describirán más adelante), es posible obtener una señal de RMN donde las inhomogeneidades de campo no se aprecian y estará modulada solo por los acoplamientos- $J$ . Esto se conoce como espectroscopía- $J$ <sup>19,20</sup> y en esta tesis se

utilizó como bloque de adquisición para distintos experimentos que involucran sistemas hiperpolarizados con PHIP.

Es importante destacar dos puntos fundamentales a la hora de entender esta técnica. Primero, como se dijo anteriormente, se elimina la cancelación parcial del pico debido a la alta resolución de un espectro- $J$ , por lo general en el orden de 0.1 Hz. Por otro lado, la evolución de los operadores de densidad en señales PHIP bajo esta secuencia difiere sustancialmente de los operadores que surgen de la polarización térmica, esto resulta en una separación de frecuencias de ambos tipos de señales, incluso en situaciones experimentales en donde las señales provenientes de protones térmicamente polarizados están mezcladas con las señales de protones hiperpolarizados. Nos referimos a este método como PhD-PHIP por Parahydrogen Discriminated PHIP.<sup>21,22</sup>

### 2.6.1. CPMG y espectroscopía- $J$

Los trenes de ecos son el corazón de la RMN desde su primera implementación por Carr y Purcel en 1954.<sup>88</sup> La secuencia de pulso original consistía en un tren de pulsos de radiofrecuencia refocalizadores (o pulsos de  $\pi$  o de  $180^\circ$ ) precedidos por un pulso de excitación de la magnetización inicial, todos con las mismas fases. Unos años más tarde, Meiboom y Gill presentaron una alternativa a la secuencia de pulso original, con la fase de los pulsos de  $\pi$  cambiada en  $90^\circ$  con respecto al pulso de excitación, Fig. 2.7. La secuencia, conocida mayoritariamente como CPMG (Carr, Purcel, Meiboom y Gill) en el mundo de la RMN, demostró ser mucho más eficiente en remover la acumulación de errores causados por fallas en los pulsos de  $\pi$ .<sup>89</sup>

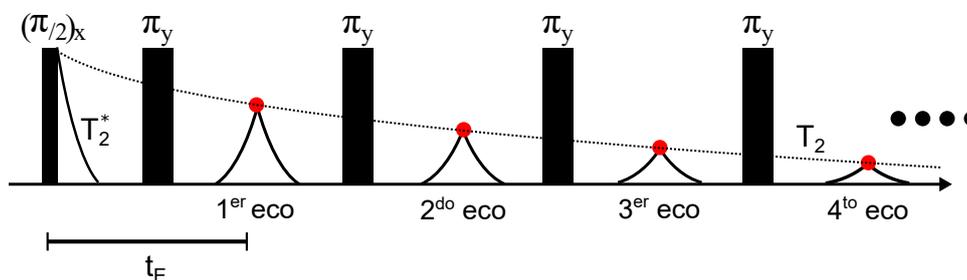


Figura 2.7: Secuencia de pulsos CPMG. El primer pulso de  $\pi/2$  o  $90^\circ$  se denomina pulso de excitación, el cual induce una señal (denominada FID) la cual decae en un tiempo característico  $T_2^*$  marcada por las inhomogeneidades de campo. Seguidamente se aplican pulsos de  $\pi$  o  $180^\circ$  denominados de refocalización los cuales producen ecos en la señal de RMN. Si uno adquiere el centro de estos ecos, esta señal no tiene las contribuciones de las inhomogeneidades por lo que decaen de acuerdo al tiempo de relajación transversal propio del sistema de espines  $T_2$ . El tiempo entre los pulsos de refocalización se denomina tiempo de eco ( $t_E$ ). Con respecto a la fase de los pulsos aplicados, si todos tienen la misma fase corresponde a la secuencia CP. Si por el contrario, el primer pulso difiere en  $90^\circ$  del resto corresponde a la secuencia CPMG.

Estas secuencias de múltiples pulsos de refocalización abrieron el camino a un amplio rango de aplicaciones en la RMN. Mediciones precisas de los tiempos de relajación

transversal ( $T_2$ ) de la señal de RMN, proveniente de las interacciones naturales a niveles atómicos y/o moleculares del sistema de espines, proveen un análisis crucial de las propiedades mecánicas y termodinámicas de los polímeros,<sup>90</sup> en monitorear reacciones químicas,<sup>91,92</sup> en el estudio de mecanismos de intercambios químicos en sistemas diluidos,<sup>93-95</sup> o en el estudio de la dinámica de proteínas.<sup>96</sup> En el amplio campo de los medios porosos, la CPMG es generalmente usada para obtener la distribución de tamaños de poros.<sup>97,98</sup> Secuencias de pulsos ultrarrápidas para la adquisición de imágenes por resonancia magnética (IRM) para sistemas estáticos o dinámicos<sup>99,100</sup> se basan también en trenes de pulsos. Adicionalmente, las secuencias multiecos se conectan al final de varias secuencias, como un bloque de adquisición con el fin de mejorar la relación señal-ruido a través de la suma de ecos.<sup>101</sup> La amplia cantidad de aplicaciones y su variedad se manifiesta en la enorme importancia de las secuencias multipulsos en la RMN. En términos de la espectroscopía, en los años 60s y 70s, los trenes de eco tuvieron un rol central en la determinación de los acoplamientos espín-espín indirectos o acoplamiento- $J$  en muestras líquidas de RMN.<sup>20,102,103</sup>

La espectroscopía- $J$  surgió como una alternativa para evitar los efectos negativos asociados a inhomogeneidades de campo magnético. En muestras térmicamente polarizadas, se evita el desfase originado por inhomogeneidades de campos magnéticos al adquirir solo los datos correspondientes al centro de los sucesivos ecos en un tren de pulsos con una tasa de repetición de pulsos cuidadosamente seleccionada.<sup>20,22</sup> Al aplicar la transformada rápida de Fourier (FFT) a la señal temporal adquirida se obtiene un espectro (denominado espectro- $J$ ) el cual consta de varios multipletes con alta resolución centrado a frecuencia cero, ya que las evoluciones con el Hamiltoniano de corrimiento químico también son refocalizadas.

Para entender este comportamiento consideremos la dinámica de un par de espines acoplados indirectamente (acoplamiento- $J$ ) en equilibrio térmico con el campo magnético externo, representado por el operador densidad

$$\rho_{\text{ter}}(0) \propto (I_1^z + I_2^z) \quad (2.33)$$

durante un tren de pulsos de  $180^\circ$ . Inmediatamente después de un pulso de excitación de  $\pi/2$  o de  $90^\circ$  con fase en la dirección  $x$  obtenemos:

$$\rho_{\text{ter}}(0^+) \propto -(I_1^y + I_2^y), \quad (2.34)$$

básicamente una rotación de  $90^\circ$  en la dirección  $x$ . Estamos interesados en la señal en el centro de los sucesivos ecos. Suponiendo que el acoplamiento entre espines es débil, la evolución con el corrimiento químico será refocalizada para esos valores particulares de tiempos, y puede ser omitida para el resto del cálculo. Por lo tanto, solo se consideran evoluciones con el Hamiltoniano de acoplamiento- $J$ ,  $\mathcal{H}^J$ . La primera evolución bajo ese Hamiltoniano, de la forma  $\mathcal{H}^J = 2\pi J_{12} I_1^z I_2^z$  (sistema débilmente acoplado), evaluado a un tiempo  $t_E/2$  da

$$\rho_{\text{ter}}(t_E/2) \propto (-I_1^y + I_2^y) \cos(\pi J_{12} t_E/2) + (2I_1^x I_2^z + 2I_1^z I_2^x) \sin(\pi J_{12} t_E/2). \quad (2.35)$$

El primer término en la expresión anterior conmuta con un pulso de  $\pi$  en la dirección  $y$  y el término remanente cambia su signo dos veces (es decir, ambos  $I_k^x$  e  $I_j^z$  invierten su signo; por lo tanto el producto se mantiene inalterado). Consecuentemente,  $\rho_{ter}(t_E/2)$  no se verá afectado por la aplicación del pulso de  $180^\circ$ . Repitiendo el cálculo para un segundo período de evolución, obtenemos para el operador densidad en el centro del primer eco la siguiente expresión:

$$\rho_{ter}(t_E) \propto -(I_1^y + I_2^y) \cos(\pi J_{12} t_E) + (2I_1^x I_2^z + 2I_1^z I_2^x) \sin(\pi J_{12} t_E). \quad (2.36)$$

La señal detectable se calcula tomando la traza del operador densidad con el operador  $I^+ = (I_1^x + I_2^x) + i(I_1^y + I_2^y)$ , es decir

$$S_{ter}(t_E) = Tr \{ \rho_{ter}(t_E) (I_1^x + I_2^x) \} \propto \cos(\pi J_{12} t_E), \quad (2.37)$$

para la parte real de la señal. Si adicionalmente, la tasa de repetición del pulso durante el tren es pequeña comparada a cualquier diferencia de corrimiento químico, la señal adquirida en el centro de los  $n$ -ecos será

$$S_{ter}(nt_E) \propto \cos(n\pi J_{12} t_E), \quad (2.38)$$

y por lo tanto mostrará solo información sobre la evolución con los acoplamientos- $J$ . En este caso, el decaimiento exponencial está caracterizado por  $T_2 \gg T_2^*$ , siendo  $T_2^*$  un tiempo característico marcado por las inhomogeneidades de campo magnético. Si el decaimiento exponencial es más lento, esto se traduce espectralmente en mayor resolución de los picos de resonancia. Esto puede ser directamente extendido a un sistema de espines débilmente acoplados. En este tipo de sistemas, luego de una transformada de Fourier estándar (FFT) de la señal temporal, muchos multipletes muy bien resueltos aparecen en el espectro de frecuencias, todos alrededor de la frecuencia cero, en lo que se conoce usualmente como espectro- $J$ ,<sup>19,102,103</sup> Fig. 2.8(a). La ventana espectral es, en este caso, determinada por el tiempo de eco  $t_E$ , es decir las frecuencias caen en el rango  $\pm\nu_m/2$ , siendo la frecuencia máxima  $\nu_m = 1/t_E$ . En el caso más general, el algoritmo de FFT aplicado a una dada señal digital produce componentes de frecuencia en el rango  $(0, \nu_m)$ . Sin embargo, en el software de RMN la FFT es implementada con un cambio en frecuencia de  $N/2$  puntos para mostrar el espectro de RMN en el rango  $-\nu_m/2$  a  $+\nu_m/2 - \nu_m/N$  tal que la información relevante se muestra en el centro a frecuencia cero. Esto veremos a continuación que es muy importante para cuando se tengan en cuenta señales provenientes de espines hiperpolarizados con PHIP. Todo el proceso anteriormente descrito se ilustra en el esquema de la Fig. 2.8(a), donde los espines del grupo metilo se acoplan a sus compañeros del grupo metileno en una molécula genérica. Bajo estas condiciones, las frecuencias en el espectro- $J$  están enteramente determinadas por sus constantes de acoplamiento.

### 2.6.2. Espectroscopía- $J$ parcial. Filtro digital

Esta secuencia puede ser mejorada a través del uso de un filtro digital. La pérdida de información de corrimiento químico en espectroscopía- $J$  puede producir espectros- $J$  muy

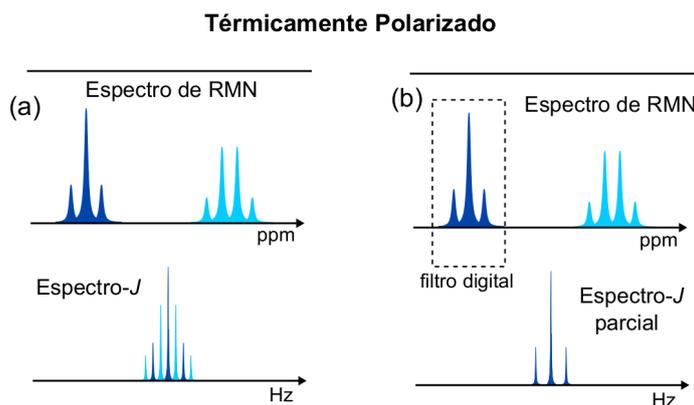


Figura 2.8: (a) Espectro de RMN vs espectro- $J$ , donde multipletes mucho más finos convergen a frecuencia cero. Los espines del grupo metilo se acoplan a sus compañeros del grupo metileno en una molécula genérica. Bajo estas condiciones, las frecuencias en el espectro- $J$  están enteramente determinadas por sus constantes de acoplamiento. (b) Un espectro- $J$  parcial es obtenido adquiriendo el centro de los ecos con un filtro digital definido a una frecuencia dada.

complejos, con todos los multipletes convergiendo en una pequeña región de la ventana espectral, cercana a la frecuencia cero. Una modificación muy astuta al diseño experimental fue introducida por Freeman y Hill en 1971, con el objetivo de simplificar el espectro- $J$  y de alguna manera recuperar el corrimiento químico al mismo tiempo. La técnica, llamada espectroscopía- $J$  parcial,<sup>20</sup> hace uso de un filtro digital durante la adquisición, centrado en la frecuencia química del multiplete elegido, para filtrar las frecuencias de los espines restantes dentro de la molécula pero conservando la información del acoplamiento- $J$ . El espectro- $J$  resultante muestra solo el multiplete elegido, como se representa en la Fig. 2.8(b). Al adquirir varios espectros- $J$  parciales con filtros centrados a diferentes frecuencias es posible obtener información sobre toda la red de acoplamientos- $J$  de una manera muy clara.

Sin ánimos de explicar en detalle el funcionamiento de un espectrómetro moderno de RMN (para ello ver la Ref. 165), se presentarán algunas características de la adquisición con un filtro digital. En la consola de RMN se define una frecuencia de irradiación a la frecuencia de resonancia del pico a estudiar su espectro- $J$  parcial. El ancho espectral a observar con el filtro nos define el paso temporal de adquisición, con el cual debemos asegurarnos que se adquiriera el centro del eco para evitar errores. Por otro lado, a pesar del ancho espectral definido por el usuario, el equipo de RMN adquiere datos a una frecuencia mayor (lo que se denomina *oversampling*) para mejorar la relación señal-ruido. Todos esos datos se multiplican por una función sinc, tal que al hacer una FFT se convoluciona la señal con esta función obteniendo una función escalón (centrada a la frecuencia de irradiación y del ancho espectral definido por el usuario) que elimina cualquier frecuencia de la señal que no esté dentro del escalón.

### 2.6.3. PhD-PHIP

El resultado en el espectro de frecuencias es marcadamente diferente si el mismo tren de eco es usado para adquirir la señal en el experimento de PASADENA. Por simplicidad, volvamos al caso de dos espines débilmente acoplados, donde el operador inicial de PHIP bajo las condiciones de PASADENA es:

$$\rho_{\text{PHIP}}(0) \propto (2I_1^z I_2^z), \quad (2.39)$$

donde eliminamos el término de la identidad ya que no contribuye a la señal. Supongamos que aplicamos un pulso de excitación de  $\pi/2$  con fase en la dirección  $x$ , como en el caso anterior. El resultado será  $2I_1^y I_2^y$ , el cual es un operador bilineal no observable. Por lo tanto, generalicemos asumiendo un pulso de excitación de ángulo  $\theta$ :

$$\rho_{\text{PHIP}}(0+) \propto (2I_1^z I_2^z) \cos(\theta)^2 + (2I_1^y I_2^y) \sin(\theta)^2 - (2I_1^y I_2^z + 2I_1^z I_2^y) \sin(\theta) \cos(\theta). \quad (2.40)$$

Maximizando el tercer término (el cual es el único que contribuirá a la señal detectable) obtenemos que el ángulo óptimo es  $\theta = 45^\circ$ . De esta manera, luego de un pulso de  $\pi/4$  en la dirección  $x$  tenemos

$$\rho_{\text{PHIP}}(0+) \propto (2I_1^z I_2^z) + (2I_1^y I_2^y) - (2I_1^y I_2^z + 2I_1^z I_2^y). \quad (2.41)$$

Descartaremos los primeros dos términos de la parte derecha de esta ecuación. La primera evolución bajo un Hamiltoniano débilmente acoplado produce

$$\rho_{\text{PHIP}}(t_E/2) \propto (I_1^x + I_2^x) \sin(\pi J_{12} t_E/2) - (2I_1^y I_2^z + 2I_1^z I_2^y) \cos(\pi J_{12} t_E/2). \quad (2.42)$$

En este punto la diferencia entre los espines térmicamente polarizados Ec. (2.35) e hiperpolarizados se vuelve clara: el signo de ambos términos de la expresión anterior cambia bajo la acción de un pulso de  $180^\circ$  en la dirección  $y$ . El primer término, con operadores de espín lineales, cambia su signo como siempre. El segundo término, bilineal, también cambia ya que  $I_k^z$  cambia y  $I_j^y$  conmuta con el pulso, produciendo un cambio en el producto. Por ende, inmediatamente después del pulso de refocalización tenemos

$$\rho_{\text{PHIP}}(t_E/2+) \propto -(I_1^x + I_2^x) \sin(\pi J_{12} t_E/2) + (2I_1^y I_2^z + 2I_1^z I_2^y) \cos(\pi J_{12} t_E/2), \quad (2.43)$$

el cual evoluciona a

$$\rho_{\text{PHIP}}(t_E) \propto -(I_1^x + I_2^x) \sin(\pi J_{12} t_E) + (2I_1^y I_2^z + 2I_1^z I_2^y) \cos(\pi J_{12} t_E), \quad (2.44)$$

en el centro del primer eco. La señal en este eco es

$$S_{\text{PHIP}}(t_E) \propto -i \sin(\pi J_{12} t_E). \quad (2.45)$$

Notar que el eco se forma en la parte imaginaria de la señal (comparada con la señal térmica). Si se repite este proceso para un nuevo período de evolución, sumado a otro pulso de refocalización más su consecuente período de evolución, llegando así al centro

del segundo eco uno obtiene

$$\rho_{\text{PHIP}}(2t_E) \propto (I_1^x + I_2^x) \sin(\pi J_{12} 2t_E) - (2I_1^y I_2^z + 2I_1^z I_2^y) \cos(\pi J_{12} 2t_E), \quad (2.46)$$

correspondiente a una intensidad de señal de

$$S_{\text{PHIP}}(2t_E) \propto +i \sin(\pi J_{12} 2t_E). \quad (2.47)$$

Basados en estos cálculos, la intensidad del eco  $n$ -ésimo será

$$S_{\text{PHIP}}(nt_E) \propto i(-1)^n \sin(\pi J_{12} nt_E), \quad (2.48)$$

imponiendo a la señal temporal un comportamiento par-impar. Espectralmente, este comportamiento es equivalente a un *offset* de  $\nu_m/2$  luego de aplicar el algoritmo de la transformada de Fourier (una demostración de esto se puede encontrar en las referencias<sup>21,74</sup>).

En la Fig. 2.9(a) la diferencia entre las señales temporales térmica y de PHIP se presenta esquemáticamente para un sistema de dos espines. Se observa que si no se realiza el cambio de frecuencia habitual de los experimentos de RMN, el espectro de señales térmicas presenta líneas en los bordes de la ventana espectral. Por lo tanto, es posible aprovechar la naturaleza de este cambio natural que surge del comportamiento de la señal de PHIP durante el tren de eco para discriminar contribuciones térmicas de hiperpolarizadas. El algoritmo de FFT sin el cambio de frecuencia aplicado a los datos adquiridos en el centro de los ecos genera un tipo especial de espectro- $J$ , el cual llamamos PhD-PHIP, con multipletes muy bien resueltos separados en dos regiones: La información correspondiente a protones hiperpolarizados aparece en el centro de la ventana espectral mientras que los núcleos de hidrógeno térmicamente polarizados están representados por multipletes en los bordes.<sup>22</sup> Una vez más, esto puede ser directamente ampliado a sistemas de espines más grandes. Esto se muestra pictóricamente en la Fig. 2.9(b) (la figura se incluye con fines ilustrativos; no representa ningún sistema de espín en particular). Con este simple método, es posible evitar la cancelación de la señal debido al ensanchamiento de las líneas y a la presencia de una gran cantidad de espines polarizados térmicamente simultáneamente.

Es posible repetir la estrategia del uso del filtro digital en la adquisición de los datos en el centro de los ecos aplicada a experimentos de PASADENA, como se muestra en la Fig. 2.9(c). Notar que solamente las señales dentro del rango de frecuencias cubiertas por el filtro digital, ya sean térmicas o PHIP, se conservan en esta versión de PhD-PHIP. Sin embargo, el efecto del proceso de filtrado es solo el de eliminar o remover señales con valores de frecuencias fuera del ancho de banda del filtro. Para ponerlo de otra manera, la evolución con el Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  incluyendo todos los espines acoplados al núcleo seleccionado, incluidos o no dentro del filtro digital, igualmente afecta la forma de los ecos antes del filtrado. Este efecto se refleja en el espectro de frecuencias y produce distorsiones que pueden ser evitadas al usar un arreglo de fases especial en el tren de pulsos que se describe a continuación, y es el primer aporte de esta tesis.

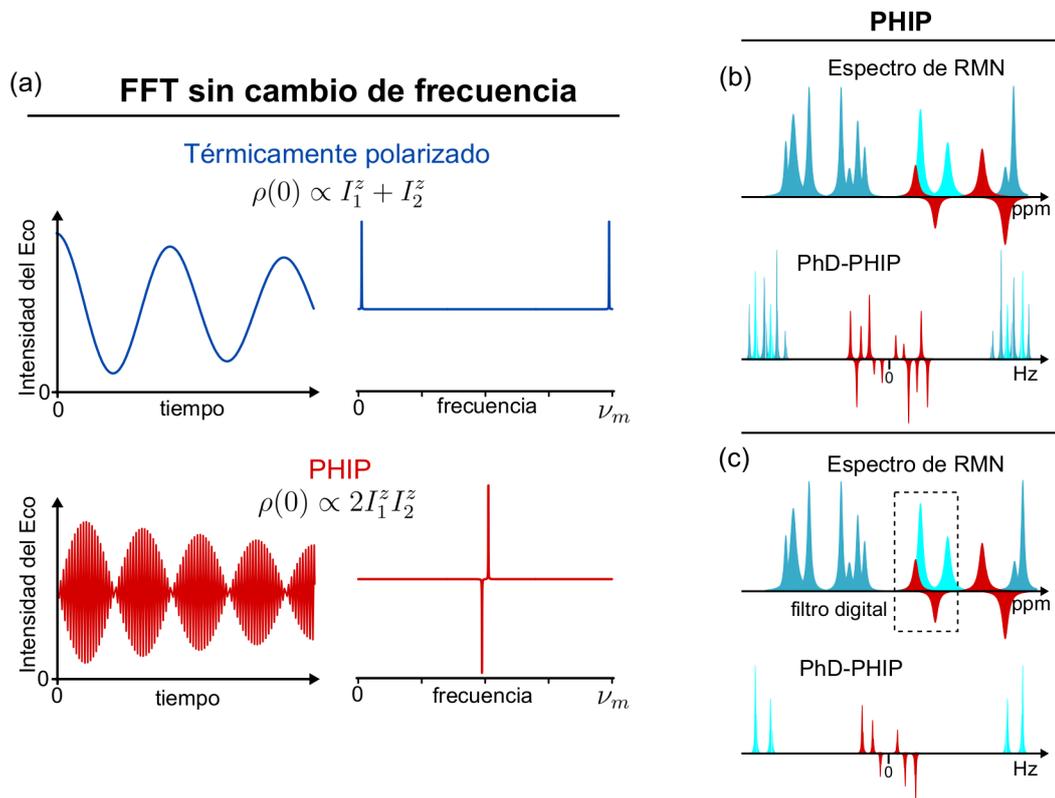


Figura 2.9: El mecanismo detrás de la PhD-PHIP explicado esquemáticamente. (a) Diferentes efectos del algoritmo de FFT en espines térmicamente polarizados y hiperpolarizados, mostrado para dos espines, para evidenciar los detalles detrás de la discriminación de señales. (b) En la PhD-PHIP, los multipletes térmicos aparecen separados de los multipletes dados por PHIP, evitando la cancelación de la señal. (c) Cuando la fuente de interferencia cae dentro del filtro digital, la PhD-PHIP aún separa los multipletes en el espectro de frecuencias.



# Capítulo 3

## Optimización de las fases en los trenes de pulsos

### 3.1. Introducción

Como se mencionó con anterioridad, los trenes de pulsos forman parte del corazón de la RMN desde su primera implementación en los años 50,<sup>88,89</sup> ya que proporcionan una herramienta con una gran cantidad de aplicaciones. Para la presente tesis este tipo de secuencia será de suma importancia, porque nos proporcionará una técnica de adquisición de la señal de RMN invaluable. En publicaciones previas, se puede observar que ya se ha hecho uso de la CPMG como bloque de adquisición en sistemas hiperpolarizados con PHIP, en lugar de aplicar un único pulso de excitación.<sup>22,23,104–106</sup>

Una vez que la difusión molecular, la relajación de espín y las inhomogeneidades de campo magnético (ya sea en el campo polarizante o en el de r.f.) fueron tenidas en cuenta, las fases de los pulsos de refocalización son la variable a ajustar con el objetivo de mejorar el desempeño de la secuencia de pulsos. Este capítulo centra la discusión en la búsqueda del mejor arreglo de fases para secuencias multiecos, aplicadas a sistemas hiperpolarizados con parahidrógeno. El uso de superciclos ha sido considerado muchas veces en el pasado, pero siempre desde el punto de vista del régimen temporal; es decir, en un esfuerzo por extender el decaimiento de la magnetización. Las comparaciones entre estos esquemas de fase durante el tren de ecos que se encuentran en la literatura, según nuestro conocimiento, se realizaron exclusivamente en el espacio temporal y para muestras térmicamente polarizadas.<sup>107–109</sup> En todos los casos, se comparan resultados y se extraen conclusiones basadas en la duración del decaimiento de la señal.

En este capítulo, se presenta un estudio detallado de diferentes esquemas de fases en trenes de pulsos, combinando datos experimentales con simulaciones numéricas. Esto se realiza con el objetivo de determinar la mejor alternativa para la adquisición de espectro- $J$ , manteniendo los errores al mínimo en la región de frecuencia de interés. Se demuestra que las fases relativas en los pulsos de refocalización pueden compensar los errores de pulso y los efectos de espines fuera de resonancia, los cuales se encuentran comúnmente en la espectroscopía- $J$ , cuando la secuencia CPMG se usa como bloque de adquisición. Se usan sistemas de espines acoplados, en los cuales su evolución cuántica puede ser simulada y

comparada con resultados experimentales. Con el fin de explorar detalles más finos, se recurre a la espectroscopía- $J$  parcial. Se muestra inequívocamente que, cuando se consideran pulsos de radiofrecuencia finitos, los efectos de multipletes cercanos fuera de resonancia afectan la dinámica de los espines dentro de la ventana espectral de adquisición. Más aún, el esquema de ciclado de fase más robusto para la configuración experimental utilizada consiste en un ciclo de 4 pulsos, con fases  $yyyy$  o  $xxxx$  para un pulso de excitación  $x$ . Se consideran resultados simulados y experimentales en sistemas térmicamente polarizados e hiperpolarizados con PHIP.

### 3.2. CPMG o CP

Como se mencionó previamente, la conveniencia de la modificación realizada por Meiboom y Gill sobre la secuencia de pulsos original de Carr y Purcell es conocida desde los primeros días de la RMN.<sup>88,89</sup> Observaremos que lo que está bien establecido para muestras térmicamente polarizadas, sin embargo, parecerá no ser *a priori* válido para experimentos en PHIP. Para simplificar el argumento, y sin pérdida de generalidad, asumamos nuevamente un sistema de dos espines en un régimen de acoplamiento débil (sistema AX).<sup>68,110</sup> Si el sistema de espines está térmicamente polarizado, el operador densidad está expresado como vimos anteriormente,

$$\rho_{\text{ter}}(0) = \frac{1}{4}\mathbb{I} + \frac{\epsilon}{4}(I_1^z + I_2^z), \quad (3.1)$$

donde  $\epsilon = \hbar\gamma B_0/k_B T$  representa el factor de Boltzmann e  $\mathbb{I}$  es el operador identidad de dimensión cuatro.<sup>68</sup> Luego de un pulso de  $90^\circ$  con fase  $x$ , es decir, el campo de radiofrecuencia  $B_1^{\pi/2}$  (donde el superíndice indica el ángulo de rotación del pulso) alineado con el eje  $x$  del sistema rotante, obtenemos el siguiente operador densidad:

$$\rho_{\text{ter}}(0^+) = \frac{1}{4}\mathbb{I} - \frac{\epsilon}{4}\underbrace{(I_1^y + I_2^y)}_{\text{observable}}. \quad (3.2)$$

El segundo término en la expresión de la derecha de la Ec. (3.2) es un observable, es decir se detecta la FEM inducida en la bobina produciendo la FID (ver Fig. 3.1(a))

$$S_{\text{ter}}(t) \propto -(I_1^y + I_2^y). \quad (3.3)$$

De acuerdo al esquema de la secuencia CPMG, el tren de pulsos de refocalización debe ser aplicado en una fase corrida en  $90^\circ$  con respecto al pulso de excitación ( $x \rightarrow y$ ). Por lo tanto, el campo de radiofrecuencia  $B_1^\pi$ , va a estar en el mismo eje que la magnetización transversal (ver Fig. 3.1(a)).

En los experimentos de PASADENA,<sup>18</sup> donde la reacción química que adhiere los átomos de parahidrógeno a la molécula objetivo y la detección de la señal es llevada a

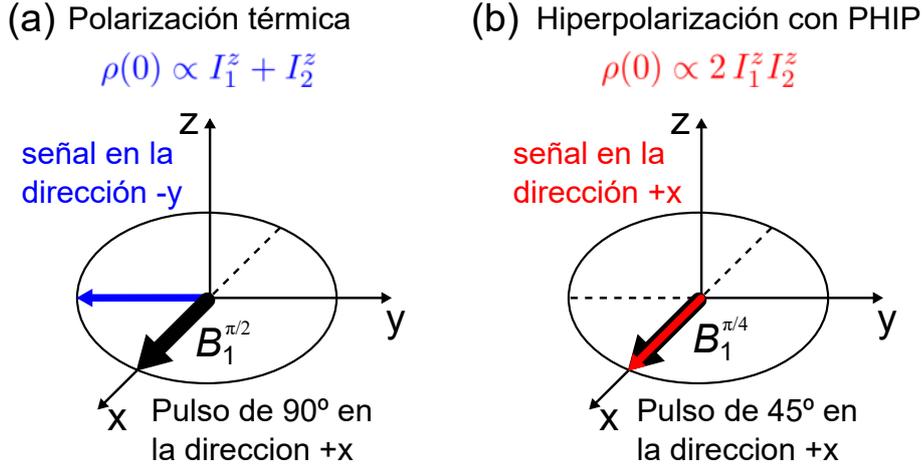


Figura 3.1: Señal luego del pulso de excitación sobre la dirección  $x$  del sistema rotante para sistemas de espines acoplados débilmente (a) térmicamente polarizados y (b) hiperpolarizado con PHIP.

cabo a campo alto, el operador densidad antes del pulso de r.f. es<sup>111,112</sup>

$$\rho_{\text{PHIP}}(0) = \frac{1}{4} \mathbb{I} - \xi I_1^z I_2^z, \quad (3.4)$$

donde  $\xi = (4N_{\text{para}} - 1)/3$  depende linealmente de la fracción de parahidrógeno en el ensamble del gas. Se observó previamente que la máxima señal es obtenida luego de un pulso de 45°, en vez del típico pulso de 90° para espines polarizados térmicamente. Si el pulso de excitación de 45° es aplicado en la dirección  $x$  del sistema rotante, el operador densidad se convierte en:

$$\rho_{\text{PHIP}}(0^+) = \frac{\mathbb{I}}{4} - \frac{\xi}{4} (I_1^y I_2^y + I_1^z I_2^z) + \frac{\xi}{4} \underbrace{(I_1^y I_2^z + I_1^z I_2^y)}_{\text{evoluciona a obs.}}. \quad (3.5)$$

El operador  $\rho_{\text{PHIP}}(0^+)$  está compuesto por operadores de orden de espín dos, los cuales son no observables, por lo tanto la señal de RMN inmediatamente después del pulso es nula. Solamente el último término de la parte derecha de la Ec. (3.5) se vuelve observable luego de la evolución bajo el Hamiltoniano de espín de la molécula,  $\mathcal{H} = \mathcal{H}^Z + \mathcal{H}^J$ , resultando en una señal de RMN de la forma

$$S_{\text{PHIP}}(t) \propto (I_1^x + I_2^x). \quad (3.6)$$

La señal detectada,  $S_{\text{PHIP}}$ , se manifiesta con la misma fase que aquella del pulso de excitación (en  $x$  en este caso), lo que sugiere que la aplicación de la secuencia de pulso CP en PHIP se debería comportar como la secuencia CPMG en espines térmicamente polarizados (ver Fig. 3.1(b)).

Este análisis expuesto para dos espines débilmente acoplados puede ser extendido sencillamente a sistemas de espines más complejos. En los experimentos de PASADENA

considerados en esta tesis, la molécula de  $pH_2$  participa en la hidrogenación de 1-hexeno para producir 1-hexeno hiperpolarizado. Los protones originarios del parahidrógeno ocupan sitios químicamente inequivalentes en la molécula objetivo, como se muestra en la parte superior de la Fig. 3.2 (los antiguos átomos del parahidrógeno están marcados con \*).

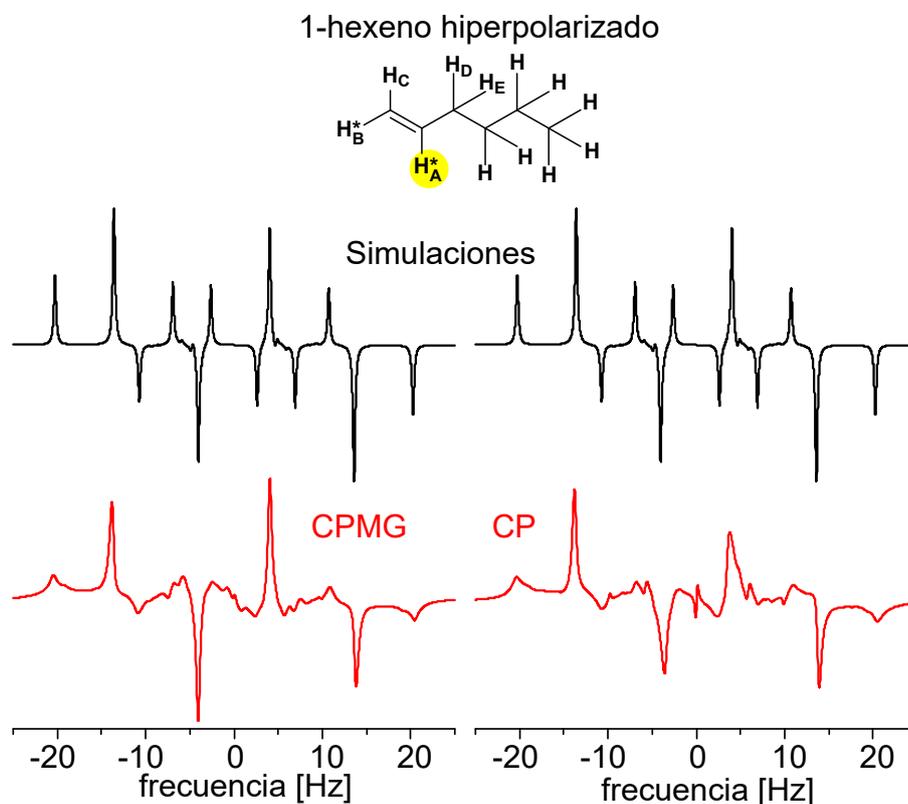


Figura 3.2: Espectro- $J$  parcial de  $H_A^*$  obtenido con las secuencias de pulso CPMG y CP luego de la hidrogenación de 1-hexeno con gas parahidrógeno enriquecido. Se incluyen simulaciones con rotaciones ideales para comparar.

La Fig. 3.2 muestra datos experimentales (parte inferior) junto con simulaciones numéricas de un espectro- $J$  parcial con un filtro centrado en el núcleo de  $^1\text{H}$  etiquetado como  $H_A^*$ . Los experimentos corresponden a las secuencias de pulso de tipo CPMG y CP aplicadas inmediatamente después de la hidrogenación con el hidrógeno conteniendo 50% de  $pH_2$ . En ambos casos, se usó un pulso de excitación de  $45^\circ$ , en la dirección  $x$  del sistema rotante. La FFT de la señal temporal adquirida con ambas secuencias fue aplicada sin el cambio de frecuencia.<sup>22,106</sup>

Para las simulaciones se considera la evolución del operador densidad durante las secuencias de trenes de pulsos de refocalización (CP o CPMG según corresponda). En primer lugar, se calcula el operador densidad como vimos en la secciones 2.3 y 2.4 a partir del Hamiltoniano molecular del 1-hexeno. Luego se calcula la dinámica durante la secuencia de pulsos resolviendo la ecuación de Liouville-Von Neumann, Ec. (2.16), a  $t = nt_E$  con el Hamiltoniano molecular. Los pulsos aplicados en este caso fueron perfectos, es decir,

rotaciones ideales del operador densidad hiperpolarizado. Estos cálculos con rotaciones perfectas nos permiten comparar los resultados experimentales con la mejor situación posible. Los espectros son el resultado de aplicar el algoritmo de la transformada de Fourier a los datos sin aplicar el usual cambio de frecuencia presente en el software de RMN, ya que son espines hiperpolarizados. Es evidente por la Fig. 3.2 que, a pesar de rasgos fundamentales que serían útiles para determinar si se produjo o no una reacción química, ambas secuencias muestran un desempeño muy pobre en reproducir la información sobre la evolución cuántica bajo el Hamiltoniano molecular. Por lo tanto, será necesario tener en cuenta otro tipo de esquemas de fases.

### 3.3. Ciclados de fases alternativos

Distintas alternativas basadas en las secuencias de pulsos CP y CPMG serán analizadas,

$$P_{\theta}^{f_0} - \tau - P_{\pi}^{f_1} - 2\tau - P_{\pi}^{f_2} - 2\tau - P_{\pi}^{f_3} - 2\tau - P_{\pi}^{f_4} - \dots \quad (3.7)$$

donde  $P_{\theta}$  es el pulso de excitación que genera una rotación  $\theta$  de la magnetización, el sufijo  $f_j$  representa la fase del pulso  $j$ -ésimo y  $\tau$  es la evolución libre entre pulsos. Con esta notación, el tiempo de eco puede ser expresado como  $t_E = 2\tau + t_{P_{\pi}}$ , siendo el último término la duración del pulso de refocalización. Hemos adoptado una terminología según se muestra en el Cuadro 3.1, donde el número en el nombre indica el tamaño del superciclo usado para armar el tren de pulsos.

Terminología	Fases
CPMG	$x - (y)_N$
CPMG4	$x - (yy\bar{y}\bar{y})_{N/4}$
CPMG8	$x - (yy\bar{y}\bar{y} \bar{y}y\bar{y}\bar{y})_{N/8}$
CPMG16	$x - (yy\bar{y}\bar{y} \bar{y}y\bar{y}\bar{y} \bar{y}\bar{y}y\bar{y} y\bar{y}\bar{y}y)_{N/16}$
CP	$x - (x)_N$
CP4	$x - (xx\bar{x}\bar{x})_{N/4}$
CP8	$x - (xx\bar{x}\bar{x} \bar{x}x\bar{x}\bar{x})_{N/8}$
CP16	$x - (xx\bar{x}\bar{x} \bar{x}x\bar{x}\bar{x} \bar{x}\bar{x}x\bar{x} x\bar{x}\bar{x}x)_{N/16}$

Cuadro 3.1: Secuencias de pulsos utilizadas en este capítulo. La columna de la derecha indica la fase de los pulsos y la letra  $N$  representa la cantidad total de pulsos de refocalización. La barra por encima de la dirección del eje indica que es en sentido negativo.

Nuestro enfoque en el espacio de frecuencias ofrece una manera mucho más simple de estudiar la dinámica de espines durante el tren de pulsos de refocalización. Permitiendo, de esta manera, una determinación confiable del esquema de fases con mejor desempeño, a través de la información presentada en el espectro- $J$  parcial. Todos los experimentos corresponden a muestras cuyo tamaño es menor al de la bobina, lo que reduce los efectos de inhomogeneidades de r.f..

## 3.4. Sistemas de espín polarizados térmicamente

### 3.4.1. Espines desacoplados

El primer conjunto de experimentos que realizamos fue con agua, como un ejemplo de sistema de espines desacoplados, para comparar los datos extraídos del dominio de las frecuencias con los reportados en el espacio temporal en la literatura.<sup>107,108</sup> Los resultados de aplicar las secuencias descritas en el Cuadro 3.1, con  $t_E = 8$  ms, se muestran en la Fig. 3.3, donde el eje vertical es el mismo para todos los gráficos. El ancho espectral total se muestra en los gráficos individuales ( $1/t_E = 125$  Hz), para destacar la ausencia de efectos apreciables por errores de pulso. La información relevante cae en el centro del espectro- $J$ , con una forma Lorentziana como es de esperar de un decaimiento monoexponencial en el espacio temporal. Los paneles incluyen un “zoom” en la región de interés, para ayudar a discernir los detalles finos de la forma de los picos. Es notable la diferencia entre CPMG y CP, consistente con los resultados previos de Meiboon y Gill.<sup>89</sup> Los esquemas de fase con un superciclo largo de 8 y 16 pulsos dan resultados comparables con la CPMG para ambas CPMGn y CPn. Sin embargo, para  $n = 4$ , se observa un desempeño más bajo. Las intensidades son más bajas y consecuentemente los picos son más anchos, ya que las integrales son iguales para todo el conjunto de experimentos. Esto es equivalente a observar un decaimiento exponencial más rápido en el espacio temporal, en concordancia con las conclusiones de las referencias.<sup>107,108</sup>

### 3.4.2. Sistemas de espines acoplados

La situación es marcadamente diferente cuando se considera un sistema de espines acoplados. Retomemos el mismo sistema AX, por simplicidad, y una secuencia de un único pulso de refocalización,  $P_{\pi/2}^x - \tau - P_{\pi}^y - \tau$ . Estamos interesados en calcular la señal adquirida en el centro del eco. En particular, la elección de la fase del pulso no es importante para los siguientes cálculos. Si el sistema rotante rota a la frecuencia de Larmor del espín etiquetado como  $I_1$ ,  $\Omega_1^0 = 0$ , (es decir, la frecuencia de r.f. se define de manera que coincida con el corrimiento químico de uno de los espines del sistema), el Hamiltoniano de los espines puede ser expresado como,

$$\mathcal{H}_{12} = \Omega_2^0 I_2^z + \pi J_{12} 2I_1^z I_2^z,$$

donde solamente la parte  $I_1^z I_2^z$  del Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  se conserva, de acuerdo a la condición de acoplamiento débil.<sup>67,68</sup> El operador o propagador evolución durante el pulso de r.f. es  $\mathcal{U}(t) = \exp(-i(\mathcal{H}_{12} + \mathcal{H}^{\text{r.f.}})t)$ . Manipulándolo matemáticamente, para un pulso de  $\pi$  con fase en la dirección  $y$  se obtiene,

$$\mathcal{U}_{\pi}^y = \exp\left(-i\pi(I_1^y + I_2^y) - i\pi\frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}}I_2^z\right) = \mathcal{U}_{\pi,1}^y \mathcal{U}_{\pi,2}^y, \quad (3.8)$$

donde  $\omega_{\text{rf}}$  indica la frecuencia de nutación alrededor del campo de r.f.,  $\omega_{\text{rf}} = \gamma B_1$ . La frecuencia de nutación se asume mucho más grande que cualquier constante de acoplamiento-

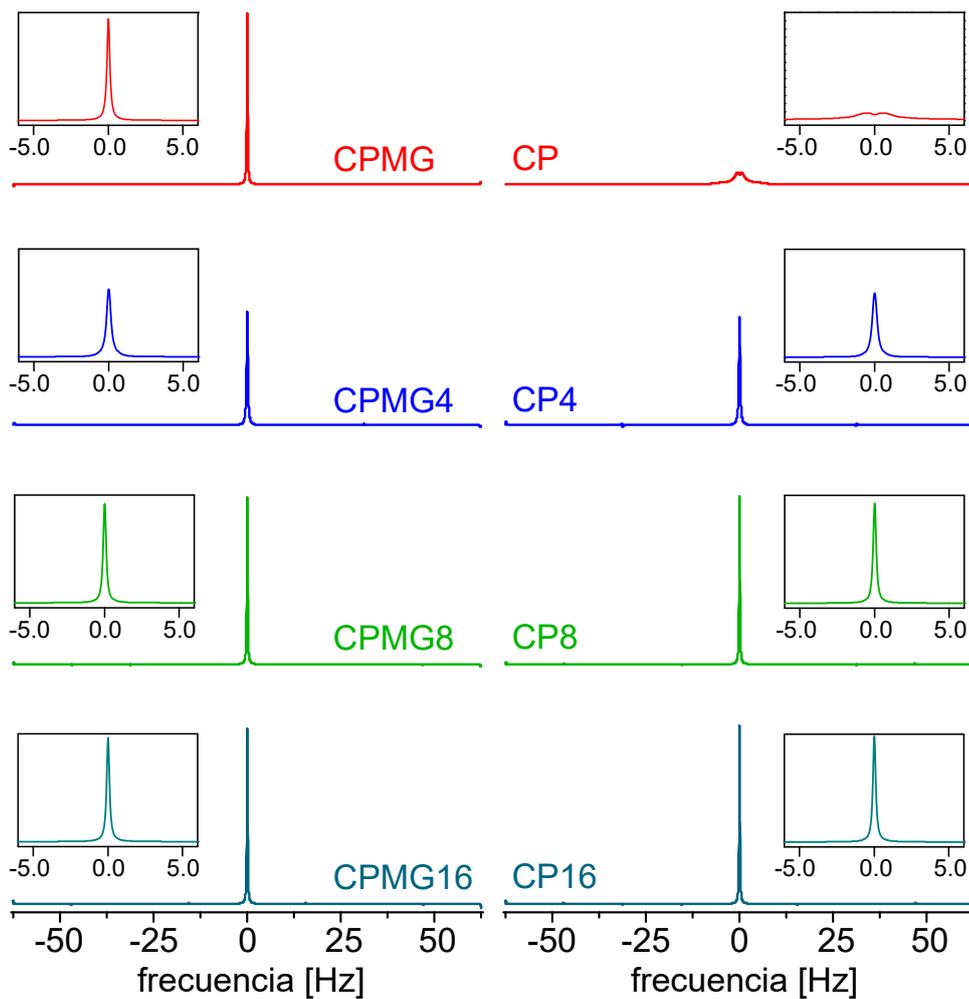


Figura 3.3: Resultado experimental del espectro- $J$  parcial para muestras de agua adquiridos con distintos esquemas de fase especificados en el Cuadro 3.1 (todos con la misma escala vertical). Los paneles muestran un “zoom” de la región central.

$J$  (condición que usualmente se cumple en este tipo de experimentos), por lo tanto los términos del acoplamiento  $J$  no se tienen en cuenta para la evolución durante los pulsos. El propagador puede ser dividido en dos propagadores ya que los operadores relacionados a espines diferentes conmutan entre ellos. Por lo tanto,

$$\mathcal{U}_{\pi,1}^y = \exp(-i\pi I_1^y) \quad \text{y} \quad \mathcal{U}_{\pi,2}^y = \exp\left(-i\pi\left(I_2^y + \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}}\right)I_2^z\right). \quad (3.9)$$

A pesar de ser pequeña, la diferencia de corrimientos químicos entre los espines, en este caso  $\Omega_2^0$  porque estamos en resonancia con el espín  $I_1$ , es capaz de producir efectos notables y por lo tanto ese propagador se conserva.

El propagador total en el centro del eco,  $\mathcal{U}(t_E)$  puede obtenerse a través de,<sup>68</sup>

$$\mathcal{U}(t_E) = \mathcal{U}(\tau)\hat{\mathcal{U}}(\tau)\mathcal{U}_\pi^y$$

donde  $\hat{\mathcal{U}}(\tau)$  es el propagador rotado, definido como  $\hat{\mathcal{U}}(\tau) = e^{-i\tau\hat{\mathcal{H}}_{12}}$ . El Hamiltoniano rotado es,

$$\hat{\mathcal{H}}_{12} = \mathcal{U}_\pi^y \mathcal{H}_{12} \mathcal{U}_\pi^{\bar{y}},$$

el cual, de acuerdo a la Ec. (3.8), toma la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}_{12} &= \hat{\mathcal{H}}^Z + \hat{\mathcal{H}}^J \\ &= \Omega_2^0 \mathcal{U}_{\pi,2}^y I_2^z \mathcal{U}_{\pi,2}^{\bar{y}} + \pi J_{12} \mathcal{U}_\pi^y 2I_1^z I_2^z \mathcal{U}_\pi^{\bar{y}}. \end{aligned} \quad (3.10)$$

La contribución Zeeman del Hamiltoniano rotado es afectado solamente por  $\mathcal{U}_{\pi,2}^y$  ya que  $[\mathcal{U}_{\pi,1}^y, I_2^z] = 0$ .

Combinando las Ecs. (3.9-3.10) los Hamiltonianos rotados resultan,

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}^Z &= \Omega_2^0 e^{-i\pi \left( I_2^y + \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} I_2^z \right)} I_2^z e^{i\pi \left( I_2^y + \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} I_2^z \right)} \\ \hat{\mathcal{H}}^J &= \pi J_{12} e^{-i\pi \left( I_1^y + I_2^y + \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} I_2^z \right)} 2I_1^z I_2^z e^{i\pi \left( I_1^y + I_2^y + \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} I_2^z \right)}. \end{aligned}$$

Consecuentemente, el propagador total resulta,

$$\mathcal{U}(t_E) = e^{-i\tau(\mathcal{H}^Z + \mathcal{H}^J)} e^{-i\tau(\hat{\mathcal{H}}^Z + \hat{\mathcal{H}}^J)} e^{-i\pi \left( I_1^y + I_2^y + \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} I_2^z \right)}.$$

Si la adquisición es llevada a cabo con un filtro digital tal que solo la señal correspondiente al espín  $I_1$  se observa,

$$S_1(t_E) = \text{Tr} \{ \mathcal{U}(t_E) \rho(0^+) \mathcal{U}^\dagger(t_E) (I_1^x + i I_1^y) \} \quad (3.11)$$

Es válido aclarar que la señal contiene la evolución con el Hamiltoniano Zeeman del espín  $I_2$ , debido a la existencia de los términos con el cociente  $\Omega_2^0/\omega_{\text{rf}}$  en el propagador. Estos términos evitan la simplificación de  $\mathcal{U}(t_E)$  y por lo tanto introducen información de los efectos de la r.f. en el espín  $I_2$  en la señal correspondiente al espín  $I_1$ . En un tren de ecos, a pesar del uso de un filtro digital para obtener un espectro- $J$  parcial limpio, la información sobre la rotación del espín  $I_2$  sobre el eje inclinado caerá en el ancho espectral de  $I_1$ , perturbando los multipletes producidos por evoluciones con el Hamiltoniano de acoplamiento- $J$ .

El ángulo  $\theta_2$  sobre el cual rota la magnetización del espín  $I_2$  es,

$$\theta_2 = \arctan \left( \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} \right).$$

Los operadores de espín asociados con el segundo espín, por otro lado, rotarán sobre ese

eje inclinado con una frecuencia efectiva  $\omega_{\text{eff}}$  dada por:

$$\omega_{\text{eff}} = \omega_{\text{rf}} \sqrt{1 + \left(\frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}}\right)^2}.$$

En los casos donde la intensidad de r.f. es mucho más grande que el offset del segundo espín, es decir,  $\Omega_2^0/\omega_{\text{rf}} \ll 1$ , el ángulo y la frecuencia efectiva pueden ser aproximados por:

$$\theta_2 \sim \frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}} \quad \text{y} \quad \omega_{\text{eff}} \sim \omega_{\text{rf}} + \frac{\omega_{\text{rf}}}{2} \left(\frac{\Omega_2^0}{\omega_{\text{rf}}}\right)^2.$$

El ángulo entre el plano  $x - y$  y el eje de rotación crece linealmente con  $\Omega_2^0/\omega_{\text{rf}}$ , mientras que la frecuencia efectiva tiene una dependencia cuadrática. Por lo tanto, incluso para frecuencias altas de nutación (es decir, r.f. de alta intensidad) la desviación del eje efectivo del plano  $x-y$  es la principal responsable de la presencia de información del espín  $I_2$ , aún cuando la señal es filtrada por el filtro digital centrado a la frecuencia del espín  $I_1$ .

Vale la pena aclarar el caso  $\Omega_2^0/\omega_{\text{rf}} \rightarrow 0$ , es decir, el caso límite de r.f. con intensidad infinita. El propagador para el pulso aplicado al segundo espín,  $\mathcal{U}_{\pi,2}^y$ , representa una rotación pura sobre el eje  $y$  del sistema rotante, y el Hamiltoniano rotado resulta:

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}^Z &= \Omega_2^0 e^{-i\pi I_2^y} I_2^z e^{i\pi I_2^y} = -\Omega_2^0 I_2^z = -\mathcal{H}^Z, \\ \hat{\mathcal{H}}^J &= \pi J_{12} e^{-i\pi(I_1^y + I_2^y)} 2I_1^z I_2^z e^{i\pi(I_1^y + I_2^y)} = \pi J_{12} 2I_1^z I_2^z = \mathcal{H}^J. \end{aligned}$$

En esta aproximación, el propagador en el centro del eco es,

$$\mathcal{U}(t_E) = e^{-i\tau(\mathcal{H}^Z + \mathcal{H}^J)} e^{-i\tau(-\mathcal{H}^Z + \mathcal{H}^J)} e^{-i\pi(I_1^y + I_2^y)}. \quad (3.12)$$

En otras palabras, la señal en el caso límite de potencia de r.f. infinita contiene solo información sobre el operador densidad evolucionando con un Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  puro.

La complejidad de los cálculos aumenta dramáticamente cuando se pretenden analizar los múltiples ecos. Por lo tanto, para explicar los efectos de la relación  $\Omega_2^0/\omega_{\text{rf}}$  en un tren de ecos extenso, y la influencia de la fase relativa entre los pulsos, utilizaremos simulaciones numéricas para dos situaciones distintas.

La Fig. 3.4 muestra un conjunto de simulaciones para diferentes acoples en un sistema de dos espines, con  $J_{12} = 20$  Hz, y  $\Omega_2^0/2\pi = 250$  Hz para un acople intermedio y  $\Omega_2^0/2\pi = 4$  kHz para un régimen de acople débil. La r.f. fue aplicada a la frecuencia de un espín, y su señal fue adquirida para obtener el espectro- $J$  parcial, como se esquematiza en el panel superior de la Fig. 3.4. El eje de rotación inclinado para el espín remanente se muestra para ambas situaciones. Los espectros- $J$  parciales llamados *rotaciones ideales* se incluyen como referencia, correspondiendo a simulaciones realizadas con intensidad de r.f. infinita, es decir cuando el pulso produce una rotación global del operador densidad completo sin importar la frecuencia de resonancia de los espines individuales.

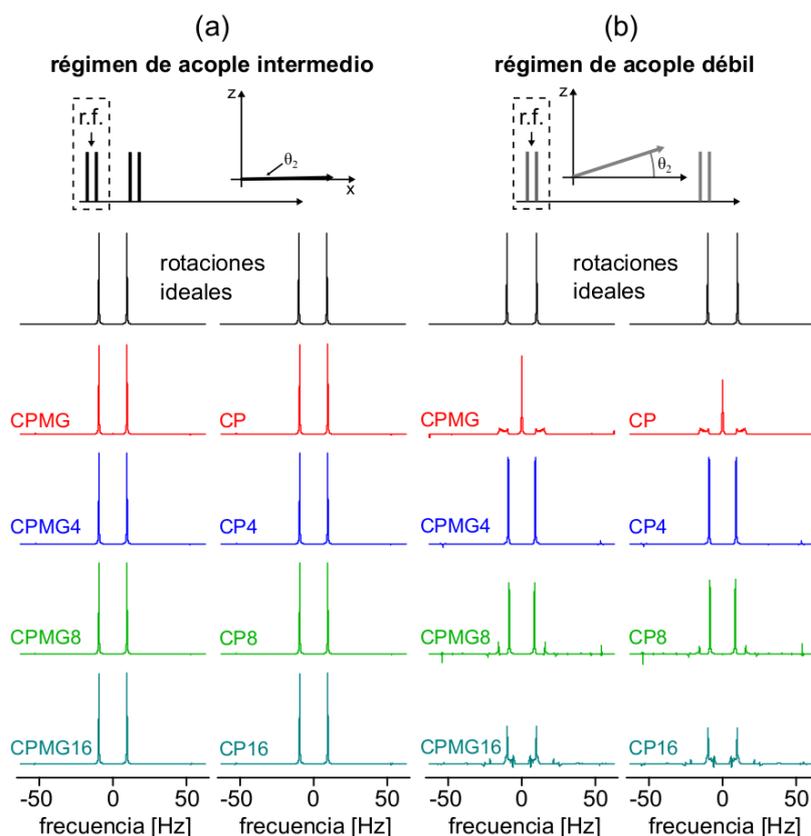


Figura 3.4: Espectro- $J$  parcial simulado para un sistema de dos espines con diferentes regímenes de acoples. El rectángulo de línea punteada representa el filtro digital para el doblete indicado. El eje en el panel superior muestra esquemáticamente el eje inclinado de rotación para el segundo espín durante los pulsos de refocalización.

Los gráficos de la Fig. 3.4(a) muestra que el desempeño de todas las secuencias es similar, ya que el eje de rotación del segundo espín está inclinado  $1^\circ$ . Por el contrario, las simulaciones de la Fig. 3.4(b), donde  $\theta_2 \sim 18^\circ$ , el espectro- $J$  parcial difiere notablemente. Únicamente las secuencias CPMG4-CP4 dan los resultados esperados. En las secuencias restantes, se vuelve evidente que los errores inducidos por las rotaciones del segundo espín sobre el eje inclinado deterioran el espectro.

Con el fin de observar experimentalmente los efectos descritos con anterioridad, el etanol es una excelente alternativa, representando un sistema de espines acoplados con un espectro de RMN relativamente simple. El alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ) puede ser considerado como un sistema de 5 espines separados en dos grupos de núcleos magnéticamente equivalentes, metilo y metileno. El protón enlazado al oxígeno puede ser ignorado cuando nos focalizamos en la red de acoplamiento porque, habitualmente, se somete a un intercambio rápido de molécula a molécula, lo suficiente como para promediar el acoplamiento- $J$  y por lo tanto cualquier separación en los picos de los grupos metilo y metileno.<sup>68</sup> Más aún, el

acoplamiento- $J$  entre los espines en distintos grupos es  $\sim 6,9$  Hz, mientras que la diferencia entre corrimientos químicos a la frecuencia de Larmor de nuestro espectrómetro ( $\sim 300$  MHz) es de 740 Hz. Bajo estas condiciones, la molécula puede ser considerada como un sistema de espines débilmente acoplados, siendo el espectro de RMN representado por dos líneas de resonancia divididas en un número de líneas que depende del número de espines magnéticamente equivalentes acoplados,  $k$ . Las intensidades de las líneas extras son proporcionales a los coeficientes binomiales, denotados por  $C_p^k = \binom{k}{p}$ , con  $p = 0, \dots, k$ .<sup>68, 110</sup> Las líneas correspondientes al grupo metilo, por ejemplo, se dividen en un *tripleto* con intensidades relativas 1 – 2 – 1 como se muestra esquemáticamente en la Fig. 3.5(a).

La Figura 3.5(a) también incluye los resultados experimentales para cada secuencia de pulsos descrita en el Cuadro 3.1. La CPMG produce un pico dominante a frecuencia cero, mucho más grande que las líneas a  $\pm J$ , mientras que la CP efectivamente remueve la línea central y, por lo tanto, toda información sobre los acoplamientos. Del conjunto de experimentos mostrados en la Fig. 3.5(a), se observa que los errores originados por la mala definición de los pulsos y por la rotación de los espines fuera de resonancia alrededor del eje inclinado son la causa de la señal a frecuencia cero. Estos son completamente removidos únicamente en el caso de la CPMG4-CP4, generando el multiplete con intensidades relativas de acuerdo a la relación 1-2-1, predicha por la mecánica cuántica. En otras palabras, la información sobre la evolución con un Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  durante el tren de ecos se preserva únicamente para el caso de la CPMG4-CP4. Los datos mostrados del CPMG16-CP16 muestran picos distorsionados, con líneas un poco más anchas y consecuentemente menor intensidad. Es importante remarcar que cualquier contribución extra a frecuencia cero para CPMGn y CPn con  $n \neq 4$  no son removidas con un ciclado de fase.

Dos conjuntos de simulaciones se muestran en la Fig. 3.5(b)-(c) para demostrar los efectos de las inhomogeneidades de radiofrecuencia. En la Fig. 3.5(b), las simulaciones numéricas fueron realizadas con pulsos de refocalización tal que produzcan rotaciones de  $180^\circ$  en los espines en resonancia. La CPMG-CP muestran comportamientos similares, aunque la línea central tiene una intensidad más pequeña para el último caso. Las secuencias CPMGn-CPn para  $n=4,8$  muestran resultados equivalentes, ambas con los cocientes de intensidades apropiados del multiplete, y las CPMG16 y CP16 presentan cocientes medianamente más grandes. La Figura 3.5(c) muestra simulaciones con errores de pulsos para producir rotaciones del espín resonante  $\sim 10\%$  más pequeñas que con los pulsos perfectamente calibrados. Esto se realiza para explorar los efectos de una intensidad de radiofrecuencia errónea, es decir para incluir los efectos de las inhomogeneidades de r.f. de una manera más simple. Cuando las intensidades de r.f. no están correctamente definidas, el ángulo  $\theta_2$  del eje inclinado sobre el cual los espines fuera de resonancia rotan es mayor, produciendo un efecto mucho más fuerte en la evolución durante el tren de pulsos, recuperando los resultados experimentales. La CPMG tiene una línea dominante a frecuencia cero, la CP no muestra la información sobre la estructura del multiplete, y solamente las secuencias CPMG4-CP4 preservan las intensidades consistentes con la evolución bajo la evolución del Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  puro.

Estos resultados son coherentes con las conclusiones reportadas en un sistema de espines acoplados dipolarmente (polímeros) por Saalwächter et al.<sup>113</sup> Adicionalmente,

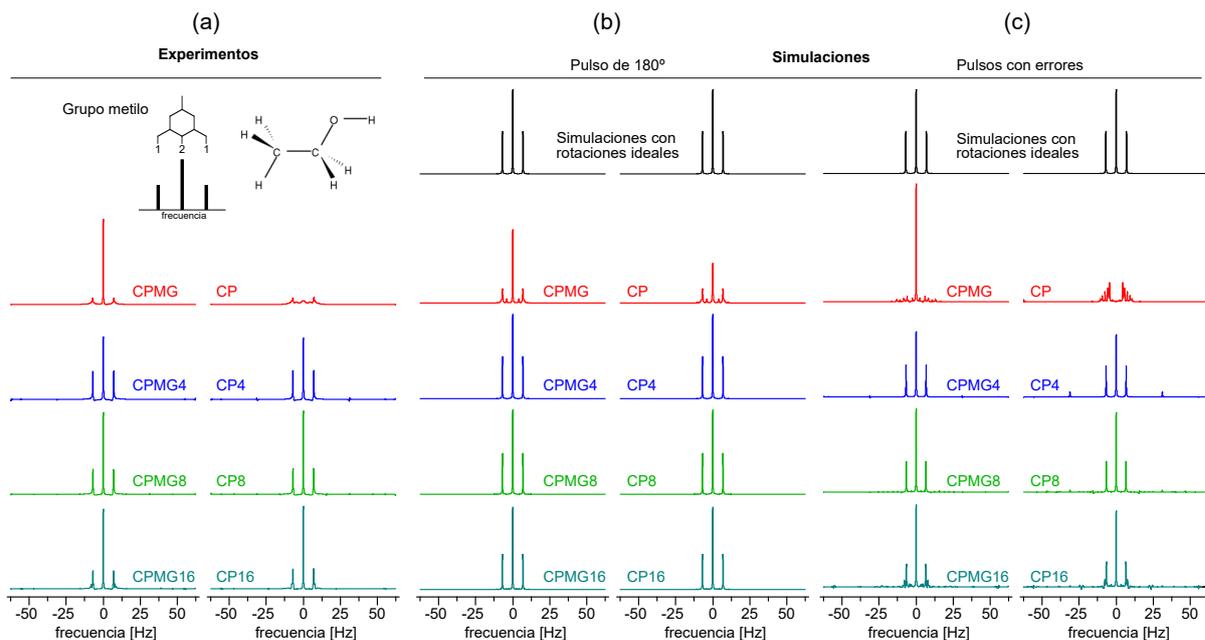


Figura 3.5: Experimentos y simulaciones para etanol. (a) Espectro- $J$  parcial experimental para el grupo metilo, para diferentes esquemas de fases. (b) Simulaciones numéricas con pulsos de refocalización de  $180^\circ$  para el espín en resonancia y (c) con pequeños errores de pulsos para imitar efectos de inhomogeneidades de r.f. En ambos casos, las simulaciones numéricas con rotaciones ideal se incluyen como comparación.

Franzoni et al.<sup>109</sup> ha mostrado experimentalmente la precisión de la CPMG4 en reproducir los datos obtenidos a través de una serie de ecos de Hahn en presencia de gradientes de campos magnéticos constantes para muestras sólidas. En ambos artículos, los autores afirman que la secuencia de pulso CPMG4 es más efectiva en prevenir distorsiones en los decaimientos de la señal temporal originados por las imperfecciones de pulsos, efectos de *spin-lock* y la formación de ecos estimulados espurios.

### 3.5. Sistemas de espín hiperpolarizados con PHIP

Continuando con el principal propósito de este capítulo, es decir, determinar el mejor esquema de fases para un espectro- $J$  de un sistema hiperpolarizado, se presentan en esta sección un conjunto de simulaciones y experimentos de muestras hiperpolarizadas de 1-hexeno. En este caso, dos aspectos nuevos deben ser considerados: la necesidad de un pulso de excitación de  $\pi/4$ , en vez de uno de  $\pi/2$ , y un estado inicial que incluye los términos de operadores de espines bilineales. El pulso de  $\pi/4$  al principio de la secuencia deja la mitad del estado inicial sobre  $z$ , lo cual puede interferir con la señal durante el tren de pulsos debido a los pulsos de  $\pi$  imperfectos.

En la Fig. 3.6(a) presentamos el espectro- $J$  experimental para distintos esquemas de fases. Los datos representan el espectro- $J$  parcial con el filtro digital centrado a la frecuencia de Larmor del protón etiquetado como  $H_A^*$  (es decir, uno de los átomos del para-

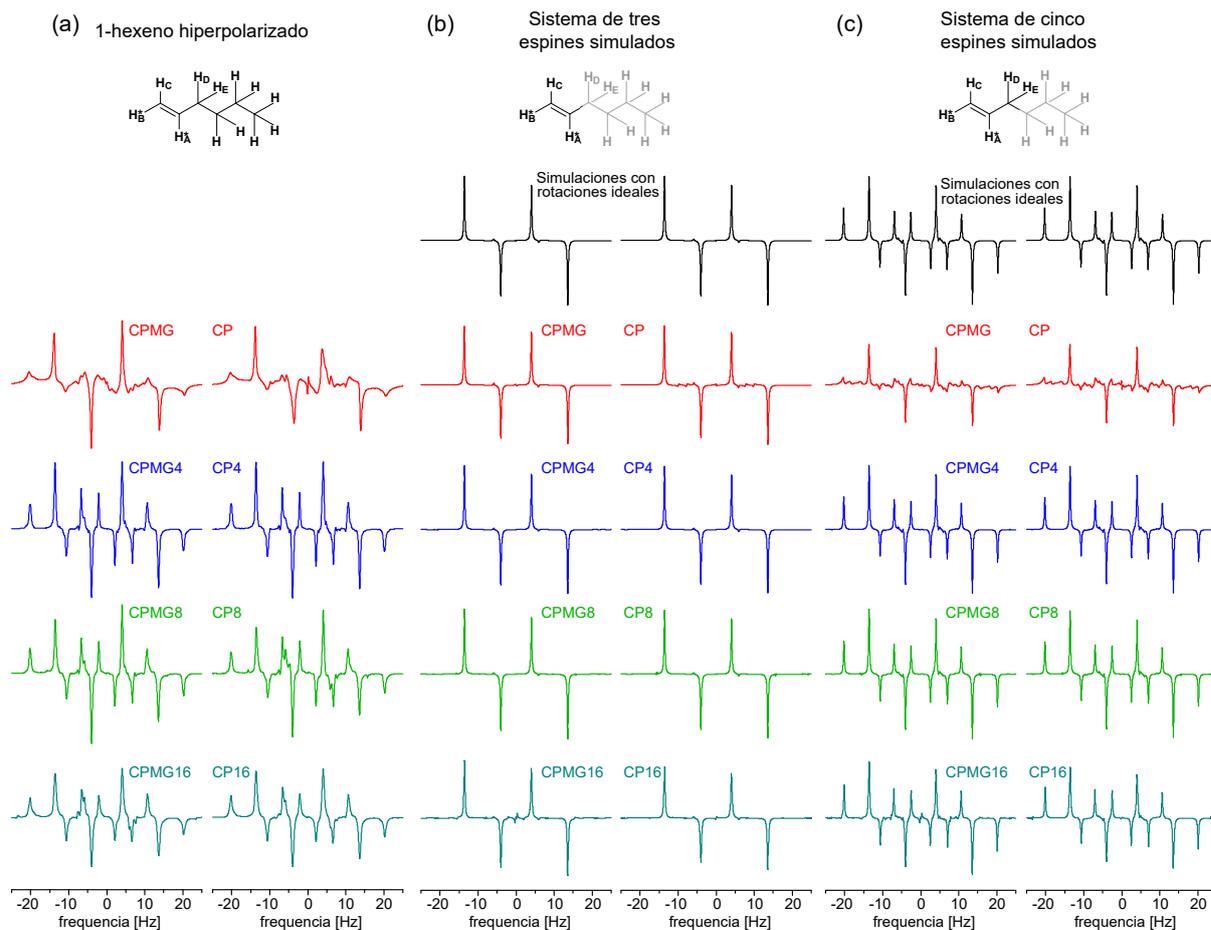


Figura 3.6: Espectro- $J$  parcial de  $H_A^*$  para el 1-hexeno hiperpolarizado. (a) Resultados experimentales. (b) Simulaciones numéricas considerando solamente el acoplamiento entre los espines etiquetados como  $H_A^*$ ,  $H_B^*$  y  $H_C$ . (c) Simulaciones incluyendo el sistema de 5 espines  $H_A^*$ ,  $H_B^*$ ,  $H_C$ ,  $H_D$ ,  $H_E$ . Se incluyen simulaciones con rotaciones ideales como comparación.

hidrógeno). En esta instancia, el mismo funcionamiento encontrado para espines térmicamente polarizados se observa: Los espectros adquiridos con las CPMG4-CP4 reproducen casi perfectamente las simulaciones ideales. A partir de las CPMG8-CP8 obtenemos resultados aceptables, aunque las intensidades están un poco más distorsionadas con respecto a las simulaciones, mientras que las CPMG16-CP16 presentan una mayor cantidad de ensanchamiento.

Por otro lado, la Figura 3.6(b) muestra el conjunto de simulaciones numéricas del espectro- $J$  parcial del protón  $H_A^*$  donde solo el hidrógeno etiquetado como  $H_B^*$  y  $H_C$  son considerados para la reacción hidrogenante y la evolución durante la secuencia de pulsos. El desempeño de todas las secuencias es similar a las simulaciones con rotaciones ideales, porque los protones  $H_B^*$  y  $H_C$  rotan alrededor del eje inclinado a  $1^\circ$ . Este es el mismo comportamiento mostrado en la Fig. 3.4(a), donde los espines fuera del filtro digital perturban levemente el espectro- $J$  parcial. Las simulaciones en la Fig. 3.6(c) incluyen dos

protones extra  $H_D$  y  $H_E$  en los cálculos del estado inicial (reacción química) y en la evolución durante la secuencia de pulsos. El campo efectivo para esos protones está inclinado a  $\sim 5^\circ$  y por lo tanto la fase relativa entre pulsos generan diferencias más pronunciadas. Estas últimas simulaciones presentan una excelente concordancia con los resultados experimentales, confirmando que el resto de la molécula, debido a los pequeños valores de acoplamientos con el protón  $H_A^*$  puede ser tranquilamente eliminada.

Esto demuestra que, a pesar de las diferencias mencionadas entre los sistemas térmicamente polarizados y aquellos hiperpolarizados con PHIP, la principal discrepancia entre los distintos esquema de fases es el hecho que los espines fuera de resonancia rotan alrededor de algún eje inclinado. Esto modifica la evolución a través del acoplamiento- $J$  al espín o grupo de espines equivalentes que generan el espectro- $J$  parcial.

### 3.6. Detalles experimentales

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 7 T con una consola Bruker Avance II, equipada con una bobina para líquidos. Los pulsos de excitación fueron  $90^\circ$  y  $45^\circ$  para muestras térmicamente polarizadas e hiperpolarizadas respectivamente. La potencia de r.f. se definió tal que  $\omega_{rf}/2\pi = 14,5$  kHz, por lo tanto la duración del pulso de  $180^\circ$  resultó en  $\sim 35 \mu s$ . Todas las muestras fueron preparadas con aproximadamente la mitad del largo de la bobina de RMN para reducir los efectos de inhomogeneidades de r.f. El tiempo de eco se definió  $t_E = 8$  ms y el filtro digital de un ancho de 500 Hz. El numero de ecos fue de 2048.

Las muestras para los experimentos de PHIP fueron preparadas bajo una atmósfera controlada de nitrógeno. Se usó una solución de 0.015 g (182  $\mu mol$ ) de 1-hexino y 0.010 g (13.8  $\mu mol$ ) del catalizador (complejo de Rodio: CAS 79255-71-3) en 0.443 g (0.5 mL) de acetona- $d_6$ . Todos los componentes se adquirieron de Sigma Aldrich. Se compró etanol con 96 % de pureza de Porta y se usó sin purificar.

El parahidrógeno se preparó al depositar hidrógeno normal en la cámara colmada con carbón activado, la cual está embebida en nitrógeno líquido (77 K). La cantidad de carbón activado nos asegura que luego de 30 min se produce en el gas la conversión de *orto* a *para*, y posteriormente se procede a su guardado en cilindros de acero inoxidable (Swagelok, Alemania) a 4 bares. La cantidad de gas depositado en la muestra para burbujear se controló mediante tubos de plástico de 4 mm de diámetro externo y válvulas electromagnéticas (Festo KG, Esslingen, Germany).

Previo a la adquisición del espectro- $J$  parcial con PHIP, el parahidrógeno enriquecido fue burbujeadado en la muestra durante 15 s, seguido de un período de espera de 5 s para asegurarnos la ausencia de burbujas en el volumen de detección.

### 3.7. Conclusiones

La antigua pregunta sobre las fases relativas de los pulsos de refocalización en una secuencia de tipo CPMG fue abordada desde el punto de vista de la espectroscopía- $J$ . Este enfoque prueba ser más ventajoso que el análisis tradicional desde el espacio temporal,

ya que la mecánica cuántica puede ser usada para comparar los resultados obtenidos. Hemos testeado el desempeño de una serie de superciclos tradicionales involucrando 4 a 16 pulsos en muestras térmicamente polarizadas y en sistemas de PHIP. El efecto en los errores de pulsos vuelve a ser evidente cuando se analiza la influencia de los espines cercanos en la adquisición del espectro- $J$  parcial. En este caso, el filtro digital es usado para detectar un único grupo con la frecuencia de resonancia en un corrimiento químico particular. El espectro aparece modulado debido a los espines situados en una posición de corrimiento químico cercana, los cuales rotan sobre un eje inclinado un dado ángulo que se define por la relación entre la diferencia de corrimiento químico y el ancho de banda de la radiofrecuencia. Contrariamente a la intuición común, que cuanto más largo el superciclo mejor compensa los errores de pulso, para nuestro diseño experimental encontramos que el ciclo compuesto de cuatro pulsos, con fases relativas  $yy\bar{y}\bar{y}$  (generalmente referida a la literatura como MLEV4 o CPMG4) provee el espectro más preciso. *Journal of Magnetic Resonance*, vol.: 289, págs.: 55-62, Abril 2018. “*Optimized phases for the acquisition of  $J$ -spectra in coupled spin systems for thermally and PHIP polarized molecules*”. S. Bussandri, I. Prina, R.H. Acosta, y L. Buljubasich.



# Capítulo 4

## Medición de difusión asistida por PhD-PHIP

### 4.1. Introducción

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las herramientas fundamentales para el estudio de mezclas en estado líquido, donde una gran variedad de métodos espectroscópicos han sido ideados para resolver, identificar y cuantificar muestras complejas. Entre estos métodos, se destaca la espectroscopía de difusión ordenada (DOSY por sus siglas en inglés, Diffusion Ordered SpectroscopY),<sup>114–116</sup> ya que permite la discriminación de moléculas en solución a través de sus propiedades de difusión, tanto así que ha sido llamada “cromatografía por RMN”.<sup>117</sup> El método se basa en la adquisición de un conjunto de datos 2D, el cual consiste en un espectro en la dimensión directa y codificado por el desplazamiento molecular en la dimensión indirecta con gradientes de campo pulsados de amplitud variable. De esta manera, es posible determinar el coeficiente para cada pico espectral. Las aplicaciones de DOSY se encuentran en un amplio rango de especialidades,<sup>118</sup> como en el estudio de reacciones químicas,<sup>119–121</sup> productos naturales,<sup>122,123</sup> emulsiones y surfactantes,<sup>124–126</sup> mezclas de moléculas pequeñas<sup>127–130</sup> y medicina<sup>131–133</sup> entre otras.

Existen básicamente tres tipos de dificultades para obtener información clara de esta técnica: coeficientes de difusión similares de moléculas distintas, superposición espectral y baja relación señal-ruido en mezclas diluidas. En el caso de coeficientes de difusión similares, una de las técnicas utilizadas es agregar a la muestra a estudiar algún aditivo que interactúa de manera diferente con los componentes de la muestra que tienen igual coeficiente de difusión. Estas interacciones permiten optimizar la resolución en la dimensión de la difusión.<sup>134,135</sup> En el caso de superposición espectral, una solución posible es la implementación de técnicas espectroscópicas como *Pure Shift NMR*<sup>136</sup> donde se suprime el acoplamiento entre protones y por ende colapsan todos los multipletes a singletes. Combinar DOSY con esta técnica conlleva a una mejora en la resolución y reduce sustancialmente la superposición espectral, permitiendo así una determinación mucho más precisa de los coeficientes de difusión.<sup>137–139</sup> Considerando la sensibilidad de la señal, en experimentos de DOSY rutinarios, los coeficientes de difusión son determinados por ajustes monoexponenciales de cada línea de resonancia del espectro. En sistemas complejos,

donde están presentes decaimientos multiexponenciales, distintos análisis numéricos de múltiples variables demandan de una buena relación señal-ruido. El problema de la sensibilidad se ha abordado tradicionalmente con el uso de imanes más grandes, y por lo tanto más caros. En algunos sistemas, sin embargo, el uso de métodos de hiperpolarización puede ayudar a aumentar la relación señal-ruido.

A pesar de la existencia de varias técnicas de hiperpolarización, muy pocas son aplicables al estudio de mezclas líquidas. Excepto la polarización nuclear dinámica por disolución<sup>26</sup> (d-DNP), la polarización inducida por parahidrógeno (PHIP)<sup>16,17,24</sup> se destaca como una de las candidatas más aptas. Recientemente, experimentos de SABRE (una técnica similar a PHIP pero donde no se hidrogena el reactante)<sup>140,141</sup> en combinación con DOSY se llevaron a cabo para el análisis de mezclas micromolares y milimolares.<sup>142,143</sup> En estos experimentos, así como en cualquier experimento 2D que involucre PHIP, uno de los mayores desafíos con los que lidiar es la reproducibilidad de la señal. Un enfoque en este sentido es el uso de secuencias ultrarrápidas, las cuales permiten la adquisición de un conjunto de datos 2D en un solo intento.<sup>144-146</sup> En cualquier caso, la limitación final está impuesta por el esquema de hidrogenación de la muestra. Por ejemplo en la ref 143 se agitó la muestra para la hidrogenación, lo que induce en la muestra una convección durante la secuencia de pulsos. Estos efectos se mitigaron codificando con un gradiente espacial en la dirección transversal con respecto al tubo de RMN. En el caso de Reile et al.,<sup>142</sup> se implementó un sistema de frenado y flujo, en el cual se usó un tiempo de espera para permitir al sistema que se estabilice, en combinación con un sistema de control de la temperatura. En el caso de la hidrogenación heterogénea, diferentes diseños de flujos de gas fueron implementados también.<sup>84-86</sup> Distintas estrategias de hidrogenación incluyen inyecciones por rociado<sup>147</sup> o a través de un catéter produciendo una hidrogenación por lotes y posterior extracción del catéter.<sup>148</sup> Una alternativa para la disolución del gas en la muestra es el uso de membranas o tubos huecos. En la referencia 149 se mostró que el estado polarizado de  $^{129}\text{Xe}$  fue preservado al momento de pasar por las membranas poliméricas. Se usaron también tubos de PDMS (polidimetilsiloxano) para la inyección del parahidrógeno en un flujo continuo en *chips* microrreactores<sup>149</sup> y en tubos de teflón para el estudio de traqueadores PET (*positron emission tomography*), asegurándose que los tubos no afectaran apreciablemente la resolución espectral.<sup>150</sup>

En este sentido, PHIP surge como una alternativa atractiva para mejorar la falta de sensibilidad en los sistemas diluidos que admiten una hidrogenación de a pares. Debido a la característica única de la señal antifase, se podrá obtener un beneficio adicional usándose como agente de contraste para resolver la difusión en mezclas de moléculas con coeficientes de difusión similares. Sin embargo, la superposición espectral todavía puede comprometer, no solo la correcta interpretación de la respuesta de DOSY, pero también puede llegar a producir cancelamiento parcial de la señal de PHIP. En este marco es cuando entra en escena la adquisición parcial del espectro- $J$  en PHIP (PhD-PHIP).<sup>21,22</sup>

En este capítulo, se muestra el uso de tubos de Teflón en experimentos de hiperpolarización con parahidrógeno con el objetivo de realizar experimentos de difusión *in-situ*. Estas membranas de Teflón, junto con el apropiado flujo de gas, producen una polarización constante durante una ventana de tiempo que nos permite la adquisición de datos 2D. Estudiaremos brevemente los efectos de la difusión para la RMN, así como secuencias

con una codificación indirecta simple y doble con los gradientes de campo pulsado. Una de estas secuencias nos servirá para eliminar una contribución por convección, inducida por un gradiente de presión que surge cuando el gas fluye por las membranas. Debido a la evolución dominante con el acoplamiento- $J$  durante la secuencia de pulso, debemos recurrir a cálculos numéricos y experimentos para establecer los tiempos óptimos, con el objetivo de maximizar la relación señal-ruido. Finalmente, usamos la secuencia PhD-PHIP como un bloque de detección para separar señales inducidas térmicamente de aquellas hiperpolarizadas.

## 4.2. Difusión molecular y RMN

Las moléculas en un líquido se mueven dada su energía cinética. Este movimiento traslacional es, a diferencia del movimiento rotacional, conocido como movimiento molecular Browniano y es usualmente llamado difusión o autodifusión. Este movimiento depende de varios parámetros físicos como el tamaño y forma de la molécula, la temperatura, y la viscosidad. Asumiendo un tamaño esférico de la molécula, el coeficiente de difusión descripto por la ecuación de Stokes-Einstein es

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s}, \quad (4.1)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosidad del líquido y  $r_s$  el radio hidrodinámico de la molécula.

Los métodos más comunes para la medición de la difusión incluyen experimentos de dispersión como rayos X, ópticos y de ultrasonidos. La RMN surge entre los métodos más usados para estudiar el movimiento molecular ya que es no invasiva, es decir que no perturba a la muestra a estudiar. Otra propiedad especial de la RMN es que no necesita de una dirección privilegiada, a diferencia de los experimentos de dispersión que requieren un haz direccionado hacia la muestra.

Los efectos de movimiento en una señal de RMN han sido conocidos desde hace varios años. Bloembergen et al. discutió los efectos de la difusión en la señal de RMN y en sus tiempo de relajación.<sup>151</sup> El uso de ecos de espín para medir los movimientos moleculares fue primeramente sugerido por Hahn en 1950.<sup>152</sup> Carr y Purcell midieron constantes de difusión en líquidos al usar múltiples ecos y 11 años más tarde, Stejskal y Tanner<sup>153</sup> le sumaron a los ecos el uso de pulsos de gradientes de campo magnético.

Los movimientos moleculares aleatorios en presencia de gradientes de campo magnético imparten un defasaje a la magnetización transversal lo que, a priori, produce una disminución en la resolución del espectro de RMN (se puede hacer la analogía con inhomogeneidades de campo magnético extremadamente grandes). A pesar de que estos efectos de fase, debido al movimiento, pueden degradar la calidad de la información obtenida, se los puede aprovechar cuando se los utiliza con cuidado.

Ya observamos en el capítulo 2 que el eco de espín refocaliza las inhomogeneidades de campo. Cualquier movimiento de la molécula sobre esta escala de tiempo resulta en una acumulación de fase y el efecto en la señal de eco puede ser usado para deducir la forma

del movimiento. El principio de funcionamiento está en usar a la fase de la magnetización transversal como una “etiqueta” para la molécula (una idea que es el corazón de las imágenes por RMN). Uno podría observar esta “etiqueta” en un instante de tiempo, y comparar luego esta etiqueta a un tiempo posterior con el objetivo de observar si la molécula se ha movido. Si pudiéramos medir la variación en la “etiqueta” podríamos deducir el movimiento. Para la medición del movimiento lo que necesitamos, por lo tanto, es medir las diferencias de fases. Por eso el eco de espín es realmente adecuado.

### 4.2.1. Eco de espín con gradientes pulsados

Cualquier secuencia básica con gradientes pulsados para medir movilidad de las moléculas en un dado sistema consiste de tres intervalos, uno de preparación, otro de guardado de la magnetización y un último de lectura. La Figura 4.1 muestra los pulsos de r.f. y de gradiente usados en la secuencia llamada eco de espín con gradientes pulsados (PGSE, según sus siglas en inglés). Es esencialmente igual a un eco de Hahn (un pulso de  $\pi/2$  y otro de  $\pi$  separados un tiempo  $t_E/2$ ), excepto que ahora se agregan un par de gradientes de largo  $\delta$  e intensidad  $g$  variable separados en un tiempo  $\Delta$ . Mantendremos nuestra atención en la evolución de la magnetización transversal durante el período que lleva al eco. En ausencia de gradientes, las fases acumuladas debido a los pequeños gradientes de campo magnético (las inhomogeneidades) serán refocalizadas en el tiempo de eco  $t_E$  como vimos anteriormente.

Ahora consideremos el efecto de los gradientes  $\vec{g} = g\hat{k}$ , donde el versor  $\hat{k}$  está definido por la dirección del campo magnético externo. Asumiendo un gradiente lineal en la dirección  $z$ , el campo magnético en el espacio estará dado por

$$B_0(z) = B_0 + \vec{g} \cdot \vec{r}, \quad (4.2)$$

donde  $\vec{r}$  es la posición de la molécula. La movilidad de la molécula puede ser grabada haciendo uso de este gradiente de campo magnético, el cual impone una frecuencia dependiente de la posición y con la cual el momento magnético nuclear del protón precesará alrededor del campo magnético  $B_0(z)$

$$\omega_0(z) = \gamma B_0 + \gamma \vec{g} \cdot \vec{r}. \quad (4.3)$$

Usando la aproximación que  $\delta \ll \Delta$ , podemos observar que el efecto del primer pulso de gradiente, es imponer una fase

$$\phi_1 = \gamma \delta \vec{g} \cdot \vec{r}_1 \quad (4.4)$$

a un espín localizado en una posición  $\vec{r}_1$  al instante del pulso. Esta fase va a ser invertida por el pulso de r.f. de  $\pi$ . Supongamos que la molécula que contiene el espín se ha movido a  $\vec{r}_2$  al momento del segundo gradiente de pulso. La fase neta luego de este pulso será

$$\phi_2 = \gamma \delta \vec{g} \cdot (\vec{r}_2 - \vec{r}_1). \quad (4.5)$$

Si los espines permanecieran quietos, aparecería un eco perfectamente refocalizado debido a que no habría acumulación de fase. Cualquier movimiento de los espines causará un cambio de fase que atenuará al eco.

Es posible calcular la atenuación del eco dada las variables  $\delta$ ,  $g$ ,  $\Delta$ ,  $D$  siendo  $D$  el coeficiente de difusión de la molécula, la cual dependerá de cada secuencia de pulso utilizada. Para el caso de la PGSE la atenuación del eco se escribe como<sup>98</sup>

$$\ln \frac{S}{S_0} = -Db = -D\gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3), \quad (4.6)$$

donde  $S$  es la amplitud del eco y  $S_0$  la amplitud en el eco sin gradientes. Conservando todos los parámetros constantes y variando sistemáticamente la amplitud de  $g$  puede encontrarse el coeficiente de difusión  $D$ .

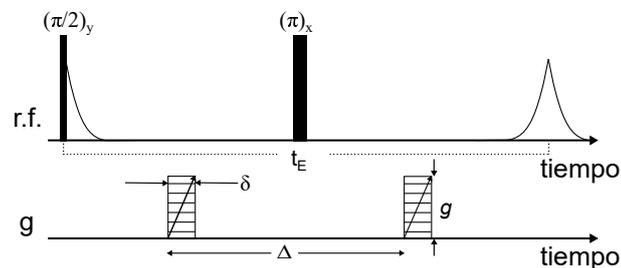


Figura 4.1: Secuencia eco de espín de gradientes pulsados (PGSE).

#### 4.2.2. Eco de espín con doble gradientes pulsados

Cuando uno realiza experimentos de difusión en soluciones o en sistemas poco viscosos, es importante mantener la temperatura y la presión de la muestra constantes durante la medición. Si esto no se logra, es posible que surjan en la muestra corrientes convectivas que pueden producir una atenuación de la señal mucho más grande que el propio efecto de autodifusión lo que perjudicará la medición. Generalmente, los espectrómetros contienen sistemas de control de temperatura precisos y sobre todo homogéneo para estos experimentos. Sin embargo, controlar la presión dentro de la muestra en sistemas donde se le está inyectando un gas externamente puede ser muy complejo.

Para ello uno debe hacer uso de secuencias con doble eco, para suprimir efectos causados por la convección dentro de la muestra a estudiar. Ya en 1954, Carr y Purcell<sup>88</sup> notaron que los ecos pares en un experimento multipulso compensaban la convección. Por lo tanto, cuando uno asume un término de velocidad constante que experimentan las moléculas difundiendo, una secuencia de doble gradiente pulsado eliminaría este efecto de la convección del experimento de difusión. La secuencia más simple posible de este tipo es la llamada eco de espín con doble gradiente pulsado (DPGSE, por sus siglas en inglés). La Fig. 4.2 muestra la secuencia con los correspondientes pulsos de r.f. y de gradiente. Se puede observar que simplemente corresponde a repetir la secuencia de PGSE pero evitando el primer pulso de  $\pi/2$ . La atenuación del eco dada las variables  $\delta$ ,  $g$ ,  $\Delta$ ,  $D$  para el

caso de la DPGSE se escribe como<sup>98</sup>

$$\ln \frac{S}{S_0} = -Db = -2D\gamma^2\delta^2g^2(\Delta - \delta/3). \quad (4.7)$$

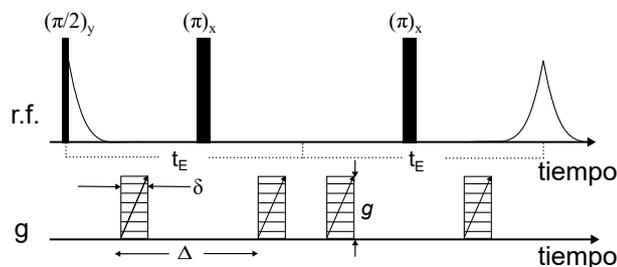


Figura 4.2: Secuencia eco de espín con doble gradientes pulsados (DPGSE).

### 4.3. Cámara de reacción

Con el doble objetivo de obtener una reacción constante y calcular el coeficiente de difusión de las moléculas reaccionadas, se llevó a cabo la construcción de una cámara de reacción para evitar principalmente la presencia de burbujas en la muestra. La Fig. 4.3(a) muestra la cámara de reacción utilizada y esquematiza la inyección del gas parahidrógeno en la muestra. El núcleo de la cámara de reacción<sup>150</sup> está compuesto de tubos de Teflón (IDEX Health and Science) de 360  $\mu\text{m}$  de diámetro exterior y 150  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, Fig. 4.3(b). Estos tubos son permeables al hidrógeno y se ha demostrado que no inducen transiciones del estado *para* al *orto*-hidrógeno.<sup>154</sup> Ambas salidas de los tubos de Teflón se colocaron dentro un tubo Festo (aproximadamente 10 mm de penetración) y luego se pegaron. El largo de los tubos de Teflón (115 mm) se definió tal que la parte baja en forma de U alcance el fondo del tubo de vidrio. De esta manera, cuando la cámara de reacción se llena con la mezcla reactante, el hidrógeno puede ser disuelto en el líquido al aplicar suficiente presión para poder permear a través de las paredes de los tubos de Teflón. Así se evita la presencia de burbujas que perturban el movimiento molecular y deterioran la resolución espectral, debido a la distribución de susceptibilidades magnéticas presentes dentro de la cámara de reacción. El tubo Festo de 6mm de diámetro se pegó a una tapa de acrílico de 40 mm de diámetro y 10 mm de espesor con un hueco en el centro, tal que la salida en el exterior puede ser equipada con una válvula. El tubo de vidrio es de 10 mm de diámetro externo y fue soldado a una boca de 35 mm de diámetro externo y 4.5 mm de espesor, Fig. 4.3(c). Encontramos en estas dimensiones la suficiente rigidez para evitar fracturas. Arriba de esto se adhiere O-ring de 40 mm de diámetro externo, 26 mm de diámetro interno y 5 mm de espesor. La Figura 4.3(d) muestra el detalle de las abrazaderas de resina acetil que mantienen todas estas piezas juntas. Cuatro tornillos de cobre de 6 mm de diámetro se usan para sujetar estas dos piezas de resina.

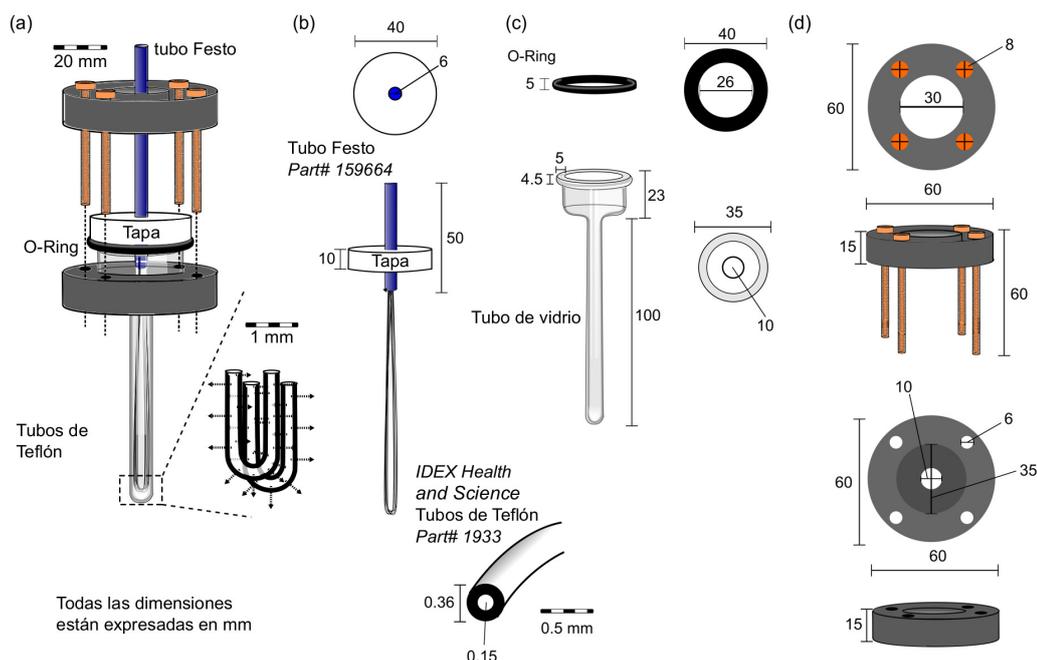


Figura 4.3: (a) Esquema de la cámara de reacción. (b) El núcleo de la cámara de reacción, compuesto de tubos de Teflón de  $360 \mu\text{m}$  de diámetro externo y  $150 \mu\text{m}$  diámetro interno. La entrada y salida de los tubos están pegados a un tubo de plástico Festo (en azul en la figura). El tubo Festo de 6 mm de diámetro externo se pegó a una tapa de acrílico hueca en el centro de 40 mm de diámetro y 10 de espesor. (c) Tubo de vidrio de 10 mm de diámetro externo soldado a una boca de 35 mm de diámetro y 4.5 de espesor, dimensiones que nos aseguraban evitar fisuras en el vidrio. Sobre esta boca de vidrio, se posiciona un O-ring de goma de 40 mm de diámetro externo, 26 mm de diámetro interno y 5 mm de espesor. (d) Detalles de las agarraderas de resina acetil, las cuales mantienen todas las piezas juntas. Cuatro tornillos de cobre de 6 mm se usan para mantener ambas piezas de resina juntas.

#### 4.4. Monitoreo de la reacción química

El experimento estándar de PASADENA se lleva a cabo burbujeando parahidrógeno en la mezcla reactante dentro del tubo de RMN. Para adquirir el espectro es necesario frenar el flujo de parahidrógeno y esperar cierto tiempo para dejar que la solución se estabilice. Por supuesto, esto implica una interrupción en la reacción y más aún una pérdida de la polarización en el tiempo de espera como resultado de la relajación espín-red. Otro problema de este método es la reproducibilidad, ya que sería necesario fluir la misma cantidad de parahidrógeno por cada experimento y esperar exactamente la misma cantidad de tiempo antes de medir si uno quisiera obtener niveles de polarización constantes. Esto supone un problema para promediar experimentos (y así obtener una relación señal-ruido mayor) o para la realización de experimentos 2D.

La implementación de la cámara de reacción mostrada en la sección anterior soluciona estos contratiempos, principalmente gracias al uso de los tubos de Teflón. Se hizo fluir parahidrógeno a 6 bares de presión por dichos tubos generando una hidrogenación en la muestra reactante. Con el objetivo de monitorear la tasa de reacción con una buena relación señal-ruido en la detección, adquirimos la señal con la secuencia de pulso PhD-PHIP introducida en los capítulos anteriores.

En la Fig. 4.4(a) se muestran dos espectros- $J$  parciales a modo de ejemplo para distintos tiempos luego de comenzar la reacción. Recordemos que una de las ventajas principales de adquirir con PhD-PHIP en experimentos con gas parahidrógeno es que la información que tenemos en el centro del espectro proviene exclusivamente de espines hiperpolarizados. De esta manera, contamos con una herramienta vital para poder medir el perfil de la reacción.<sup>23</sup> La adquisición se llevó a cabo cada 2 minutos luego de que la válvula del gas se abriera (tiempo cero) para un intervalo de tiempo de 100 minutos, como se muestra en la Fig. 4.4(b). Se observa un crecimiento inicial de la intensidad de la señal de PHIP durante los primeros 10 minutos durante el cual la presión aumenta y se activa el catalizador. Inmediatamente después se obtiene un período de  $\sim 42$  minutos donde la señal permanece aproximadamente constante, con el valor medio representando el 96% de la señal máxima detectada. Bajo estas condiciones experimentales, la estabilidad de la señal permite la realización de experimentos 2D con un máximo de 22 pasos en la dimensión indirecta, si se utiliza un solo escán. Posteriormente, la señal de PHIP decae debido a que la cantidad de moléculas a reaccionar es cada vez menor dentro de la muestra. Este decaimiento suave indica, al mismo tiempo, una adecuada estabilidad de nuestra cámara de reacción.

## 4.5. Difusión de un sistema térmico con acoplamiento- $J$

La presencia de burbujas en un líquido perturba el medio, generando un aumento del desplazamiento medio molecular comparado con el de autodifusión.<sup>91</sup> Por otro lado, la convección inducida por el gas representa un movimiento mucho más ordenado comparado con el movimiento Browniano y con tipos de flujos muchos menos coherentes, como la temperatura o la convección inducida por presión. Se ha demostrado que los efectos de estos tipos de desplazamientos moleculares pueden ser efectivamente removidos del decaimiento de la señal con la codificación de doble gradiente.<sup>88,155</sup> Con el objetivo de confirmar la ausencia de burbujas de gas y para determinar la presencia de convección inducida por la disolución de hidrógeno, se llevaron a cabo experimentos de difusión con una secuencia estándar (PGSE) y una secuencia con doble gradiente (DPGSE). Se utilizó en una muestra de 1-hexeno diluido en acetona deuterada en la misma proporción de las muestras usadas para los experimentos de PHIP (no se incluyó el catalizador para evitar cualquier tipo de hidrogenación).

El sistema a estudiar (1-hexeno) es una molécula con una red de acoplamientos- $J$  compleja. Generalmente, la estrategia en experimentos de difusión en sistemas donde la evolución es dominada por interacciones con el acoplamiento- $J$  es usar tiempos de

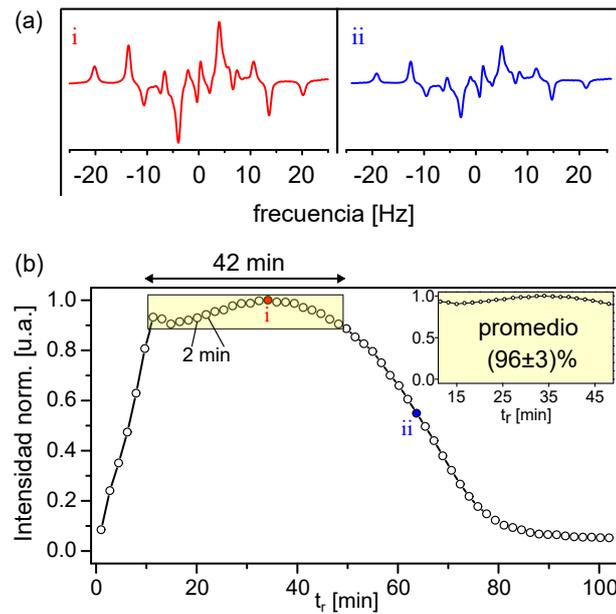


Figura 4.4: (a) Espectro- $J$  representativo para distintos tiempos como se indica debajo. (b) La reacción de 1-hexeno como función del tiempo monitoreada con la secuencia PhD-PHIP. Se observa un crecimiento inicial de la señal mientras que el sistema se satura con  $pH_2$ . Luego de 10 minutos, la señal alcanza su techo máximo, el cual dura aproximadamente 42 minutos.

codificación cortos. Sin embargo, esta estrategia no es aplicable a experimentos de PHIP, donde la intensidad de la señal es inicialmente cero.<sup>17</sup> Incluso para muestras térmicas, una codificación corta implica pulsos de gradientes más grandes que para ciertos diseños experimentales es imposible de lograr. Los pulsos de  $\pi$  usados para refocalizar la evolución bajo campos magnéticos inhomogéneos no afectan la evolución con los acoplamientos- $J$ , y por lo tanto el centro de cada eco presenta una modulación como función del tiempo de eco. Con el objetivo de determinar el tiempo más acorde en la secuencia de pulso, se llevó a cabo la variación del tiempo de evolución sin la presencia de gradientes de campo magnético (es decir, únicamente los pulsos de r.f. que generan el eco). La Fig. 4.5(a) muestra la intensidad de la señal (centro del eco de espín en este caso) para el 1-hexeno vs el tiempo de evolución, definido como ( $t_E$ ) para PGSE y como ( $2t_E$ ) para DPGSE. Se adquirió la señal desde el centro de cada uno de los ecos. El gráfico insertado muestra el espectro obtenido luego de la FFT de estas señales adquiridas a dos tiempos de evolución particulares. De esta manera observamos que para un tiempo de evolución de 260 ms (lo que corresponde a un  $t_E = 260$  ms y  $t_E = 130$  ms para las secuencias PGSE Y DPGSE respectivamente) se da el máximo local de señal dada la modulación de los ecos con el Hamiltoniano  $J$ .

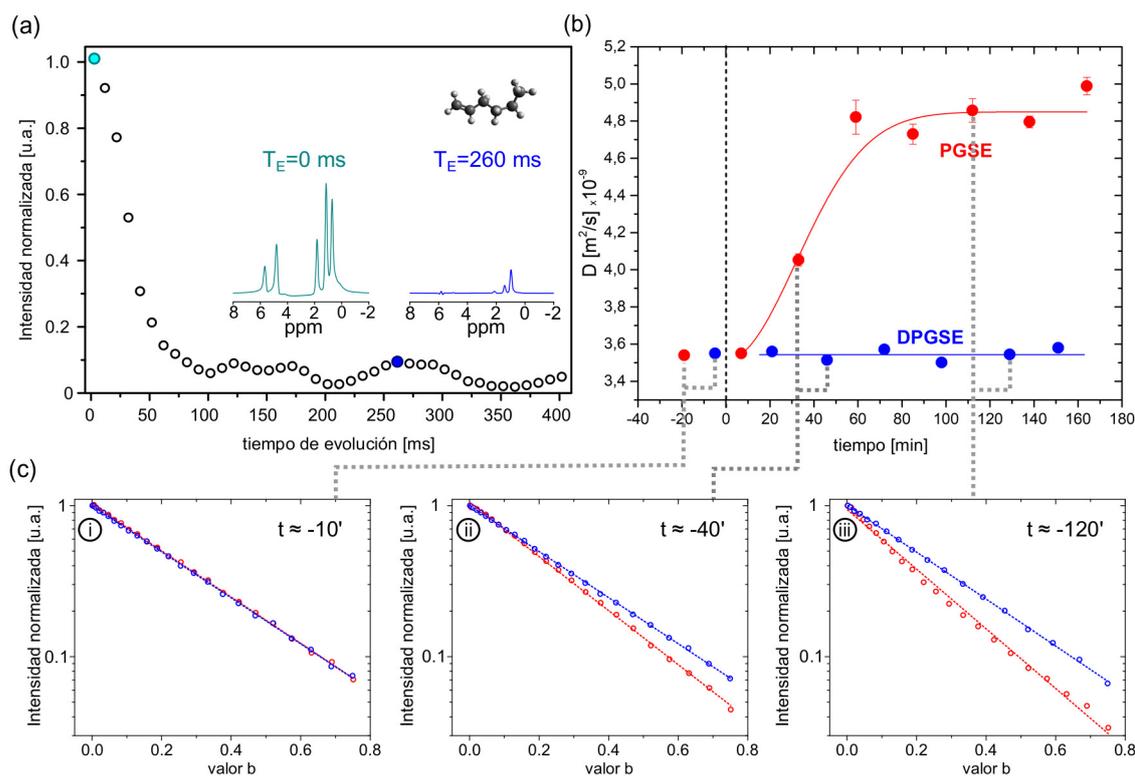


Figura 4.5: (a) Intensidad de la señal en función del tiempo de evolución, definido como  $t_E$  para PGSE y  $2t_E$  para DPGSE. Espectros en celeste y azul corresponden a la intensidad máxima y al máximo local respectivamente. (b) Coeficiente de difusión de 1-hexeno en acetona deuterada durante el flujo de hidrógeno a través de las membranas a 6 bares. Los experimentos de PGSE y DPGSE se llevaron a cabo a diferentes tiempos de flujos. Para tiempos negativos se indica el coeficiente de difusión en ausencia de parahidrógeno. Luego se observa, como es esperado, que la DPGSE no se ve influenciada por el flujo convectivo. (c) Decaimiento de la magnetización usando la secuencia PGSE (rojo) y DPGSE (azul) como una función de la intensidad del gradiente para tres tiempos distintos. (i) Antes de abrir la válvula. (ii) Cuando comienza a crecer la presión dentro de la cámara. (iii) Cuando se estabiliza el proceso convectivo. Observar que el decaimiento se mantiene constante para la codificación con doble gradiente.

A partir del tiempo de eco óptimo, se llevaron a cabo experimentos de difusión luego de que se abriera la válvula del reservorio de hidrógeno, alternando adquisiciones con ambas secuencias. La Figura 4.5(b) muestra los coeficientes de difusión determinados con PGSE and DPGSE. En la Fig. 4.5(c) se muestra el decaimiento de la magnetización para ambas secuencias a tres tiempos distintos. Los coeficientes de difusión medidos a tiempos “negativos” implican que la válvula de gas estaba cerrada, Fig. 4.5(c-i). La línea punteada a tiempo cero indica el momento en el que el gas comienza a fluir por los tubos de Teflón. Se puede observar que para el caso de la PGSE, inicialmente, se obtiene un coeficiente de

difusión  $3.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ , y luego aumenta mientras la presión crece dentro de la cámara de reacción, indicando la presencia de una convección, Fig. 4.5(c-ii). Luego de un período de 1 hora, el coeficiente de difusión determinado se estabiliza a un valor mucho más alto ( $4.8 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), Fig. 4.5(c-iii). Por otro lado, los coeficientes de difusión determinados con DPGSE son constantes durante el tiempo, como era de esperarse. Teniendo en cuenta que el valor obtenido es el mismo que aquel medido sin inyectar el gas, se descarta la presencia de burbujas, por lo que significa que la fuente de perturbación del movimiento Browniano solamente se debe a la convección, la cual se elimina efectivamente con la doble codificación.

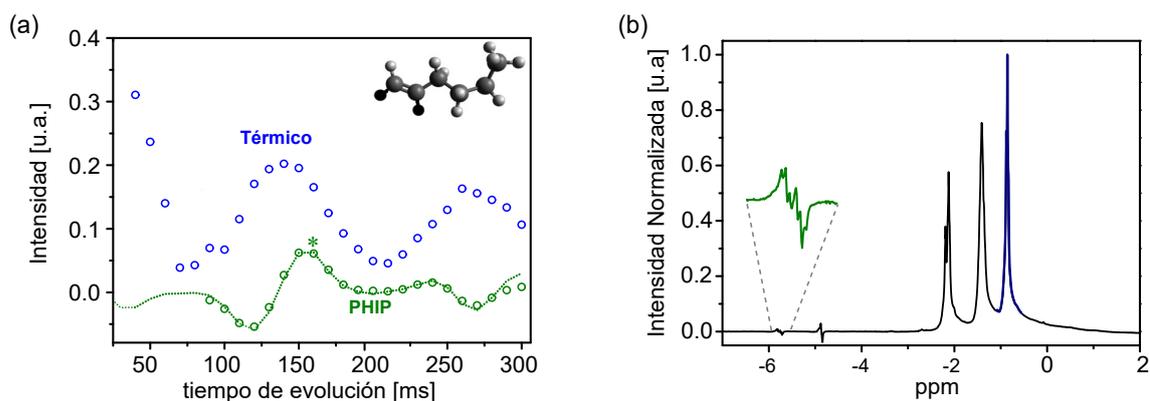


Figura 4.6: (a) Señales correspondientes a espines térmicamente polarizados y hiperpolarizados para distintos tiempos de evolución. El punto indicado como un asterisco muestra el tiempo de evolución usado para los experimentos de difusión ( $t_E = 80$  ms para DPGSE). Dentro del gráfico se observa la molécula de 1-hexeno hidrogenada, con los antiguos protones de parahidrogeno mostrados en negro. (b) Espectro de 1-hexeno hiperpolarizado. Se destacan en verde y azul los picos usados para obtener las intensidades del gráfico (a).

## 4.6. Difusión de moléculas hiperpolarizadas

La evolución de la señal para distintos tiempos de ecos correspondientes a muestras térmicamente polarizadas e hiperpolarizadas se muestra en la Fig. 4.6(a), donde el asterisco indica el valor seleccionado para realizar los experimento de difusión ( $t_E = 80$  ms para DPGSE). La línea punteada corresponde a cálculos numéricos de la dinámica de espín, para destacar el hecho que no hay señal disponible en tiempos cortos de evolución. Se adquirió un espectro para cada tiempo de evolución y las áreas en las regiones espectrales mostradas en la Fig. 4.6(b) se usaron para monitorear la evolución de la señal. Las señales térmicas son superposiciones de moléculas no reaccionadas de 1-hexeno con la hidrogenación producto (1-hexeno) y cambia levemente durante todo el experimento, mientras que las señales de PHIP se reponen en cada experimento. Con el objetivo de llevar los niveles de sensibilidad al máximo, se exploró este sistema con un limitado grado

de polarización usado para imitar un sistema extremadamente diluido. Es válido notar que este diseño se pretende usar solo como una prueba de concepto. Se pueden alcanzar niveles de polarización mucho más grandes aumentando la tasa de inyección del gas, aumentando la temperatura o usando el gas hidrógeno con niveles más alto de contenido de parahidrógeno.

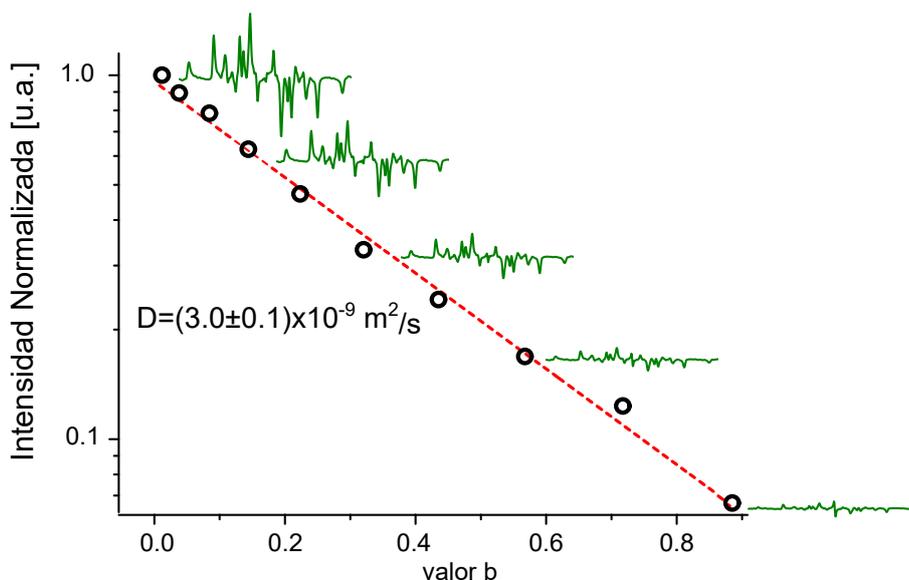


Figura 4.7: Decaimiento de la señal de las moléculas hiperpolarizadas de 1-hexeno, diluidas en una solución de acetona deuterada, y 1-hexino como una función de la intensidad del gradiente. Se muestran los espectros- $J$  parciales representativos para distintos valores de  $b$ .

Con el fin de determinar el coeficiente de difusión solo de las moléculas que fueron hidrogenadas con parahidrógeno en cada experimento, a la secuencia de pulso mostrada en la Fig. 4.2 (con el primer pulso de excitación siendo de  $\pi/4$ ) se le incorporó un bloque de detección llevado a cabo por la secuencia PhD-PHIP. En el caso actual, el pulso inicial de  $\pi/4$  de la secuencia PhD-PHIP no es necesario ya que el centro del eco en la Fig. 4.2 provee la magnetización transversal para ser adquirida. En este sentido, las señales se adquieren en un espectro- $J$  muy bien resuelto, con el filtro digital definido para seleccionar solo las frecuencias alrededor del pico a estudiar. Las contribuciones térmicas aparecen en el borde de la ventana espectral mientras que las señales originadas por PHIP aparecen en la región central.<sup>22</sup> La Fig. 4.7 muestra el decaimiento de la señal de las moléculas hiperpolarizadas de 1-hexeno. Se muestran también los espectro- $J$  parciales. Cada intensidad fue obtenida al integrar el módulo de cada espectro (es decir, el área bajo el espectro en la región de interés). El decaimiento en función de la intensidad del gradiente (Ec. 4.7) muestra un comportamiento monoexponencial del cual se obtiene el coeficiente de difusión de las moléculas que han sido hidrogenadas con el parahidrógeno.

## 4.7. Detalles experimentales

La muestra se preparó de la misma manera que se detalló en el capítulo anterior. Una cantidad aproximada de 0.1 g de la muestra reactante se colocó en la cámara de reacción. Los tubos de Teflón se colocaron dentro de la cámara y se selló. Inmediatamente luego de sacarlo de la caja con la atmosfera controlada de nitrógeno, una línea de transferencia, (Festo GmbH, Alemania) previamente vaciada con la ayuda de una bomba de vacío turbo molecular Pfeiffer, se conectó al reservorio de  $pH_2$ . La cámara de reacción se colocó dentro del núcleo de un imán superconductor de 7 T.

La duración de los pulsos de gradiente de campo magnético fue de  $\delta = 1.1$  ms, el tiempo de eco usado fue de 80 ms, la máxima intensidad de gradiente se definió en  $G = 0,5$  T/m y se codificaron 10 puntos espaciados logarítmicamente en la dimensión indirecta. El coeficiente de difusión se calculó al normalizar la señal inicial ( $S_0$ ) con  $\ln(S(b)/S_0) = -bD$ , donde:

$$b = 2g^2\gamma^2\delta^2 \left( \Delta - \frac{\delta}{3} \right). \quad (4.8)$$

Relativo al bloque de detección con PhD-PHIP, los parámetros utilizados fueron los mismos que en el capítulo 3.

## 4.8. Conclusiones

En este capítulo, se mostró que se pueden realizar experimentos 2D con intensidad de señales reproducibles en PHIP usando un diseño de hardware muy sencillo. Para el caso particular de los experimentos de difusión, una codificación mediante un doble pulso de gradiente, DPGSE, mostró ser lo suficientemente robusta para tener en cuenta la convección inducida por la permeación del parahidrógeno en la muestra líquida. Este enfoque, combinado con la discriminación de la señal de PHIP, permite la determinación de coeficientes de difusión de muestras extremadamente diluidas. Esto puede ser aplicado, en principio, a sistemas más complejos, por ejemplo, la determinación del radio hidrodinámico de nanopartículas funcionalizadas, las cuales podrían adaptarse para ser hidrogenadas de a pares en los grupos funcionales.

Al expandir el bloque de detección se pueden plantear varias mejoras. Aquí aplicamos la DPGSE+PhD-PHIP para codificar la difusión y la detección con discriminación espectral de las señales hiperpolarizadas de las térmicas. De ser necesaria una completa eliminación de las señales térmicas, puede alcanzarse con la implementación además de una nueva secuencia, denominada OPSY, que veremos en el siguiente capítulo. La combinación de este conjunto de herramientas puede ser muy útil en sistemas donde es muy difícil lograr niveles altos de polarización.<sup>156</sup> Journal of Magnetic Resonance, vol.: 320, pág.: 106833, Septiembre 2020. “*Diffusion measurements with continuous hydrogenation in PHIP*”. S. Bussandri, L. Buljubasich y R.H. Acosta.



# Capítulo 5

## Aumento de la resolución y sensibilidad de PHIP

### 5.1. Introducción

Si bien el aumento en la señal de los experimentos de PHIP es varios órdenes de magnitud más grande que la polarización alcanzada en muestras térmicamente polarizadas,<sup>112,157</sup> existen ciertos factores que pueden disminuir la intensidad de la señal originada en PHIP o incluso hacerla no observable. Uno de estos factores es la presencia de una gran cantidad de moléculas no hidrogenadas dentro de la muestra, generada porque la concentración de los reactantes es muy baja,<sup>158</sup> la eficiencia de la reacción es pobre o debido a solventes no deuterados (o parcialmente deuterados). En este sentido, hace algunos años se introdujo una alternativa a la adquisición con un único pulso de excitación, con el objetivo de filtrar las señales que vienen de protones térmicamente polarizados y por lo tanto limpiar el espectro de PHIP. La secuencia de pulso conocida como OPSY (por su nombre en inglés Only Parahydrogen Spectroscopy)<sup>159,160</sup> usa un par de pulsos de gradientes de campo magnético con una relación de intensidad 1:2 e igual duración. Esta secuencia actúa como un filtro de operadores de espín de orden uno como los que representan las señales térmicamente polarizadas y por lo tanto, la señal de RMN al final de la secuencia está formada por los términos de orden dos presentes en el operador densidad de PHIP luego del primer pulso de r.f.. Este filtrado aumenta la sensibilidad del experimento, porque la eliminación de la señal de los solventes o de cualquier fuente de interferencia previene la saturación del receptor, y se puede obtener una mejor relación señal-ruido, al aumentar el nivel de ganancia del receptor.

La resolución, por otro lado, es otra cuestión importante cuando uno trata con PHIP. Como ya se mencionó reiteradas veces en esta tesis, cuando la hidrogenación con  $pH_2$  y la detección se llevan a cabo a un campo magnético alto (PASADENA) el estado de espín al final de la reacción es dominado por términos de orden dos de espín, los cuales definen un doblete en antifase en el espectro de frecuencia, es decir, dos picos con signos opuestos separados por la constante de acoplamiento- $J$  (de unos pocos Hz para protones). Cualquier fuente de inhomogeneidad del campo magnético que lleve a un ensanchamiento en las líneas produce la cancelación de la señal.<sup>21</sup> Cuando uno trata con líneas de resonancia de unos

20 Hz de ancho, una fracción importante de hiperpolarización se pierde. Esto impone una seria limitación en el diseño experimental. En los capítulos anteriores ya se presentó la secuencia multipulso PhD-PHIP para superar esta interferencia la cual genera un espectro- $J$  parcial prácticamente independiente de las inhomogeneidades de campo.<sup>22,23,104–106,161</sup> Adicionalmente, la propiedad de separar las contribuciones de señales PHIP y térmicas en la ventana espectral supone una gran ventaja al momento de mejorar la resolución del experimento. Sin embargo, mientras que las señales térmicamente polarizadas aún se adquieran, la ganancia del receptor deber ser ajustada cuidadosamente con el objetivo de evitar la saturación del receptor. Esto implica una limitación en la sensibilidad debido al hecho que estas contribuciones térmicas pueden saturar el receptor generando errores indeseados en el espectro.

En este capítulo se presentará en primer lugar la estrategia de combinar estas dos secuencias filtrando las señales térmicamente polarizadas por el uso de la secuencia OPSY, y adquiriendo una ventana espectral específica con la alta resolución provista por la PhD-PHIP. Este método es extremadamente útil en situaciones en las cuales las moléculas reactivas están muy diluidas, el espectro resultante es muy complejo y/o el campo magnético es inhomogéneo. En segundo lugar, se presentará la idea de alcanzar el mismo resultado pero reemplazando en el bloque de filtrado, los gradientes de campo magnético estáticos con campos de radiofrecuencia variables linealmente en el espacio, usualmente conocido como gradientes de  $B_1$ .<sup>98,162</sup> Se introducirá también la base teórica de una nueva secuencia de pulso aprovechando la región inhomogénea en una única bobina de r.f. y se presentarán experimentos llevados a cabo en un campo magnético de 7 T. Más aún, se mostrará que cuando el tamaño de la muestra cumple ciertos requisitos mínimos, los pulsos fuertes de r.f. rotan eficientemente la magnetización total como en el caso de campos de r.f. homogéneos, proveyendo una manera muy simple de controlar el Hamiltoniano del sistema sin requerir otro tipo de hardware. La precisión de este control es tal que es posible adquirir un espectro- $J$  parcial muy limpio aún utilizando dos mil pulsos de refocalización inhomogeneos sin perturbaciones visibles.

## 5.2. Filtrado con gradientes de campo magnético

En esta sección se mostrará la combinación de las secuencias OPSY y PhD-PHIP con el objetivo de realzar la resolución y sensibilidad del experimento de PHIP. En primer lugar se definirá la base teórica de las secuencias a utilizar, luego se mostrarán los experimentos realizados, finalizando con los parámetros de los experimentos junto a los métodos de preparación de muestra.

### 5.2.1. Base teórica

En esta sección damos una corta discusión sobre los principios detrás de las secuencias de pulsos a ser usadas en este capítulo. Un tratamiento más detallado de OPSY puede ser encontrado en la referencia.<sup>160</sup>

## OPSY

La secuencia OPSY usada en este capítulo se muestra esquemáticamente en la Fig. 5.1. Consiste de dos pulsos de r.f.,  $(\pi/2)_y$ , y de dos períodos de evolución de duración  $\tau$  en presencia de gradientes de campo magnético con diferentes polaridad e intensidad. Un decaimiento de inducción libre (FID) se adquiere luego del segundo gradiente de campo pulsado.

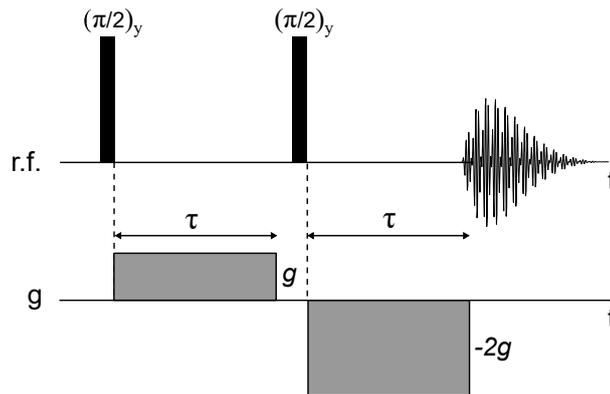


Figura 5.1: Secuencia de pulso OPSY, donde se muestran las fases de r.f. y el esquema de gradientes.

La clave del desempeño de esta secuencia es el comportamiento de las diferentes coherencias durante  $\tau$ , debido a la particular relación entre las intensidades de los gradientes de campo,  $+g$  y  $-2g$ . En lo que sigue asumiremos el operador densidad perteneciente a los espines polarizados térmicamente como,

$$\rho_{\text{ter}}(0) \propto \sum_j I_j^z.$$

Como se mencionó en reiteradas ocasiones, el operador densidad del sistema inmediatamente luego de la reacción química cuando se realiza a campo alto está dominado por una combinación lineal de operadores de espín longitudinales de orden dos,<sup>112</sup>

$$\rho_{\text{PHIP}}(0) \propto \sum_{j < k} \beta_{jk} I_j^z I_k^z.$$

Luego del primer pulso de  $(\pi/2)_y$ , los espines térmicamente polarizados producen términos de coherencias cuánticas simples ( $\text{SQ}_{\text{ter}}$ ),

$$\rho_{\text{ter}}(0+) \propto \sum_j (I_j^+ + I_j^-),$$

mientras que la parte bilineal de los espines hiperpolarizados generan una combinación

lineal de coherencias cuánticas cero y dobles ( $\text{CQ}_{\text{PHIP}}$  y  $\text{DQ}_{\text{PHIP}}$ ),

$$\rho_{\text{PHIP}}(0+) \propto \sum_{j < k} \beta_{jk} (I_j^+ I_k^+ + I_j^+ I_k^- + I_j^- I_k^+ + I_j^- I_k^-).$$

Durante el primer período de evolución las coherencias evolucionan bajo el Hamiltoniano de espín molecular superpuesto con la interacción con el gradiente de campo, la cual asumiremos, sin perder generalidad, orientado sobre el eje  $z$  del sistema rotante (el mismo que  $B_0$ ). La evolución bajo el gradiente de campo agrega un factor de fase a los operadores de espín, que a su vez, depende del orden de las coherencias, ya que una coherencia de orden  $n$  evoluciona  $n$  veces comparada a una orden simple. En el caso de coherencia cuántica de orden cero, el gradiente tiene un efecto global nulo y por lo tanto, se conserva solo la evolución con el Hamiltoniano de espín.

Esto puede ser expresado como:

$$\rho_{\text{ter}}(\tau) \propto \sum_j \left( I_j^+ e^{(-i\mathcal{H}\tau + i\phi_g \tau I_j^z)} + I_j^- e^{(-i\mathcal{H}\tau - i\phi_g \tau I_j^z)} \right),$$

y

$$\rho_{\text{PHIP}}(\tau) \propto \sum_{j,k} \left\{ \begin{array}{l} I_j^+ I_k^+ e^{(-i\mathcal{H}\tau + i2\phi_g \tau I^z)} + \\ + (I_j^- I_k^+ + I_j^+ I_k^-) e^{(-i\mathcal{H}\tau)} + \\ + I_j^- I_k^- e^{(-i\mathcal{H}\tau - i2\phi_g \tau I^z)} \end{array} \right\},$$

donde  $\phi_g = \gamma g z$ .

El segundo pulso de  $\pi/2$  transforma los términos de cuántica simple en una combinación lineal de magnetizaciones longitudinales y términos de cuántica simple. Una evolución posterior en presencia de una gradiente con intensidad  $-2g$  desfazará fuertemente los términos de cuántica simple, resultando en ausencia de señal neta al comienzo de la adquisición ( $t = 2\tau$ ). Por otro lado, el operador densidad  $\rho_{\text{PHIP}}(\tau+)$  está compuesto por una combinación lineal de operadores de espín longitudinales de orden dos,  $\text{CQ}_{\text{PHIP}}$ ,  $\text{SQ}_{\text{PHIP}}$  and  $\text{DQ}_{\text{PHIP}}$ , con diferentes fases acumuladas durante la primera evolución. Esto puede escribirse en una forma compacta como

$$\rho_{\text{PHIP}}(\tau) \propto \sum_{j,k} \left\{ \begin{array}{l} I_j^z I_k^z + \text{CQ}_{\text{PHIP}} + \\ + \text{SQ}_{\text{PHIP}} + \text{DQ}_{\text{PHIP}} \end{array} \right\} \times \sum_{m=-1}^{+1} e^{(-i\mathcal{H}\tau + i2m\phi_g \tau I^z)}.$$

Los términos de operadores potencialmente observables están relacionados a

- (i)  $\text{SQ}_{\text{PHIP}} \times e^{(-i\mathcal{H}\tau + i2\phi_g \tau I^z)}$ ,
- (ii)  $\text{SQ}_{\text{PHIP}} \times e^{(-i\mathcal{H}\tau I^z)}$ ,
- (iii)  $\text{SQ}_{\text{PHIP}} \times e^{(-i\mathcal{H}\tau - i2\phi_g \tau)}$ .

En el siguiente período de evolución libre (a  $2\tau$ ), para un gradiente de campo lo suficientemente fuerte y relativamente corto (comparado con la dinámica cuántica llevada por el Hamiltoniano molecular), la evolución bajo el Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  puede ser ignorada en los casos (i) y (iii) debido a la fuerte influencia del gradiente de campo. Por otro lado, en los tres casos las evoluciones con el Hamiltoniano de corrimiento químico se refocalizan a  $2\tau$ . Más aún, el término (i) se refocaliza luego de una evolución con el gradiente de pulso de duración  $\tau$  y de intensidad  $-2g$ , mientras que el término (iii) requiere de un gradiente de intensidad  $+2g$ . El término (ii), sin embargo, muestra únicamente la evolución con el acoplamiento- $J$ .

Estas diferencias dan lugar a las principales dos variantes de la secuencia.<sup>160</sup> Para el caso de usar gradientes con una relación de intensidad  $1 : \pm 2$ , se denominó a la secuencia OPSY- $d$  ( $d$  por double). Para el caso de usar gradientes con relación 1:0 se denominó a la secuencia OPSY- $z$  ( $z$  por zero). Los cálculos exactos muestran que la señal adquirida con OPSY- $d$  tienen la mitad de intensidad de la señal adquirida con OPSY- $z$ . Sin embargo, como en el período sin gradiente de campo la evolución con el Hamiltoniano de acoplamiento- $J$  no puede ser ignorada, el efecto de filtrado no es el óptimo. Experimentalmente, la secuencia de pulso OPSY- $d$  es mucho más eficiente en remover la señal originada de espines térmicamente polarizados.<sup>163</sup> Por otro lado, considerando corrientes espurias, la configuración de gradientes ( $+g, -2g$ ) representa la mejor alternativa. Como resultado, toda la secuencia actúa como un filtro para la polarización térmica, y al momento de la adquisición solo la polarización viniendo de PHIP va a contribuir a la señal. En publicaciones<sup>163</sup> recientes los autores examinan hasta nueve diferentes secuencias de pulsos basadas en los mismos principios, y concluyen que la OPSY- $d$  es la mejor elección. Consecuentemente, adoptamos este esquema para nuestros experimentos, al que simplemente llamaremos de ahora en más OPSY.

## OPSY + PhD-PHIP

A pesar del aumento en la sensibilidad alcanzado con la OPSY, la resolución espectral es la misma que en el caso de realizar un único pulso de excitación. Ya vimos que para aumentar la resolución del espectro en un experimento de PHIP con el protocolo PASADENA podemos recurrir a la secuencia PhD-PHIP. Al principio, parecería que este método filtra las señales de los espines térmicamente polarizados que caen fuera de la ventana del filtro. Sin embargo, cuando la señal es adquirida con un filtro digital, todas las frecuencias son grabadas en el receptor antes de que se lleve a cabo el proceso de filtrado.<sup>164</sup> Esta es una severa limitación en los experimentos de PhD-PHIP, donde el aumento en la resolución lleva un aumento en la sensibilidad gracias a evitar la cancelación de los picos, pero el nivel de ganancia del receptor está aun limitado por todos los espines térmicamente polarizados dentro de la muestra.

Por lo tanto, pareciera sumamente natural combinar las secuencias OPSY y PhD-PHIP con el objetivo de filtrar térmicamente las señales polarizadas con OPSY, y llevar a cabo un adquisición de alta resolución con PhD-PHIP. La secuencia de pulso se presenta en la Fig. 5.2, donde un tren de pulsos de refocalización se coloca al final de la secuencia OPSY- $d$ , inmediatamente después de un tiempo de evolución libre de  $t_E/2$ . Por lo tanto,

la secuencia OPSY-*d* tiene el rol del pulso de excitación de  $\pi/4$  en la secuencia PhD-PHIP original, con la tarea extra de filtrar las señales indeseables.

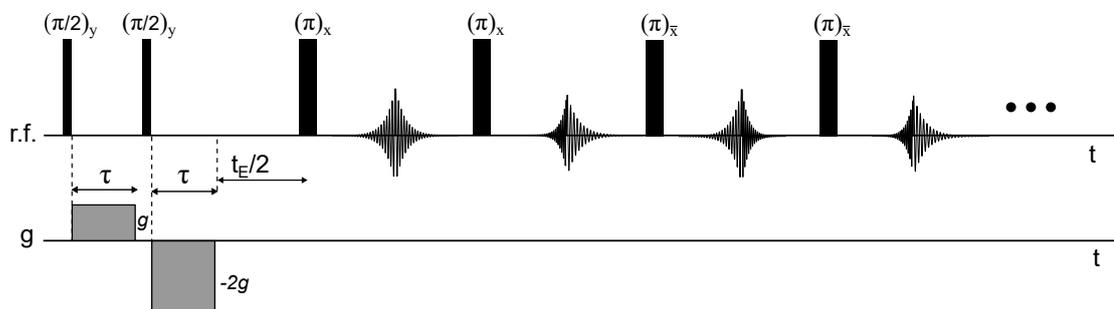


Figura 5.2: Secuencia de pulso obtenida implementando OPSY-*d* como un filtro y la PhD-PHIP como bloque de adquisición.

### 5.2.2. Resultados Experimentales

La Figura 5.3 muestra los resultados obtenidos con 1-hexeno hiperpolarizado. La molécula con los protones etiquetados del antiguo parahidrógeno como  $H_A^*$  y  $H_B^*$  se muestra en el panel superior. El espectro adquirido con un solo pulso de r.f.  $\pi/4$  se muestra en la Fig. 5.3(a). Es evidente la presencia de una gran cantidad de moléculas no reaccionadas, donde solo se observa un pequeño grado de reacción entre 4.5 y 6.5 ppm.

Cuando el mismo experimento es detectado con OPSY (Fig. 5.3(b)) solamente se encuentran los dobletes característicos originados de PHIP. Un aumento en la ganancia del receptor (RG) se convertirá en una saturación del receptor, lo que básicamente consiste en una convolución de la señal adquirida con una función escalón, llevando a la presencia de una modulación de cada línea de resonancia con una función *sinc*, como se muestra en la Fig 5.3(c). Sin embargo, la señal adquirida con OPSY-*d* para la misma ganancia del receptor aparece sin distorsiones, Fig. 5.3(d) y con un aumento en la relación señal-ruido.

Como se mencionó previamente, la adquisición con la PhD-PHIP, está limitada por la presencia de señales térmicamente polarizadas. Con el objetivo de ver los efectos de estas señales en la adquisición con un dado filtro digital centrado a  $H_A^*$  (ver la molécula en la Fig. 5.3), se adquirió un espectro sin la hidrogenación y sin *pH*<sub>2</sub>. Como no hay señal en el rango de frecuencia adquirida, uno esperaría la presencia de ruido blanco, sin embargo, Fig. 5.4(a) muestra que una gran cantidad de señal aparece en el centro de la ventana de resonancia, la cual viene de señales térmicas adquiridas durante el tren de pulsos. Bajo las mismas condiciones, la aplicaciones de OPSY+PhD-PHIP provee un ruido blanco limpio, como es de esperarse (5.4(b)). Cuando la hidrogenación con *pH*<sub>2</sub> se lleva a cabo y la detección se produce con un nivel de ganancia alto del receptor (misma situación que en la Fig. 5.3(c)), la PhD-PHIP provee un espectro que es altamente distorsionado como se muestra en la Fig. 5.4(c). De hecho, no hay demasiadas diferencias en el espectro saturado con o sin PHIP, ya que la reacción fue definida en niveles muy bajos. Sin embargo, bajo

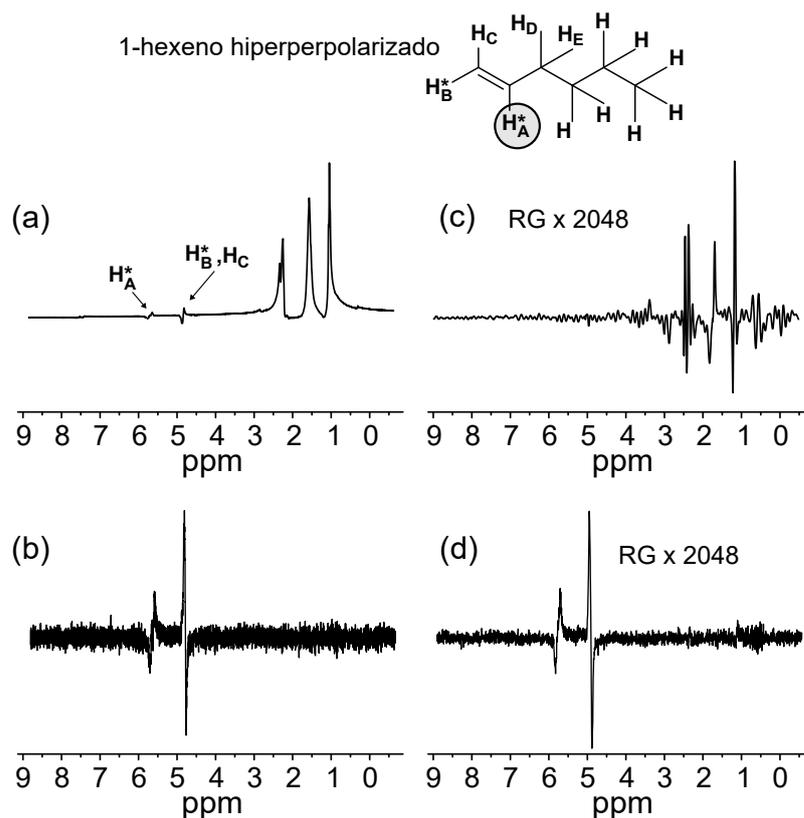


Figura 5.3: En el panel superior se muestra el 1-hexeno hiperpolarizado, con los protones del antiguo parahidrógeno etiquetados como  $H_A^*$  y  $H_B^*$ . El espectro de RMN adquirido con un pulso de  $\pi/4$  (a), con la OPSY- $d$  (b). En (c) el mismo resultado que en (a) se muestra con la ganancia del receptor (RG) aumentado por encima del nivel de saturación. (d) Una señal con una mejor relación señal-ruido y libre de distorsiones se observa usando OPSY- $d$  con el mismo nivel de ganancia del receptor.

estas circunstancias, la aplicación de OPSY+PhD-PHIP genera un espectro- $J$  parcialmente sumamente limpio como se ve en la Fig. 5.4(d).

Una comparación de los desempeños puede ser cualitativamente observada en la Fig. 5.5, donde el espectro- $J$  parcial del multiplete correspondiente al protón  $H_A^*$  adquirido con la OPSY+PhD-PHIP se grafica con la porción del espectro adquirido con la OPSY- $d$ . Es claro que el nivel de ruido es menor que aquel con la OPSY- $d$ , lo que es un beneficio del uso de un filtro digital angosto. Finalmente, se debe aclarar que estos gráficos corresponden a muestras con un grado de reacción extremadamente pequeño especialmente preparadas con propósitos demostrativos.

### 5.2.3. Detalles Experimentales

La muestra y el parahidrógeno se prepararon según lo indicado en los detalles experimentales del capítulo 3. Para la deposición del gas dentro de la muestra se reiteró el uso de tubos Festo de 4 mm de diámetro y válvulas electrónicas.

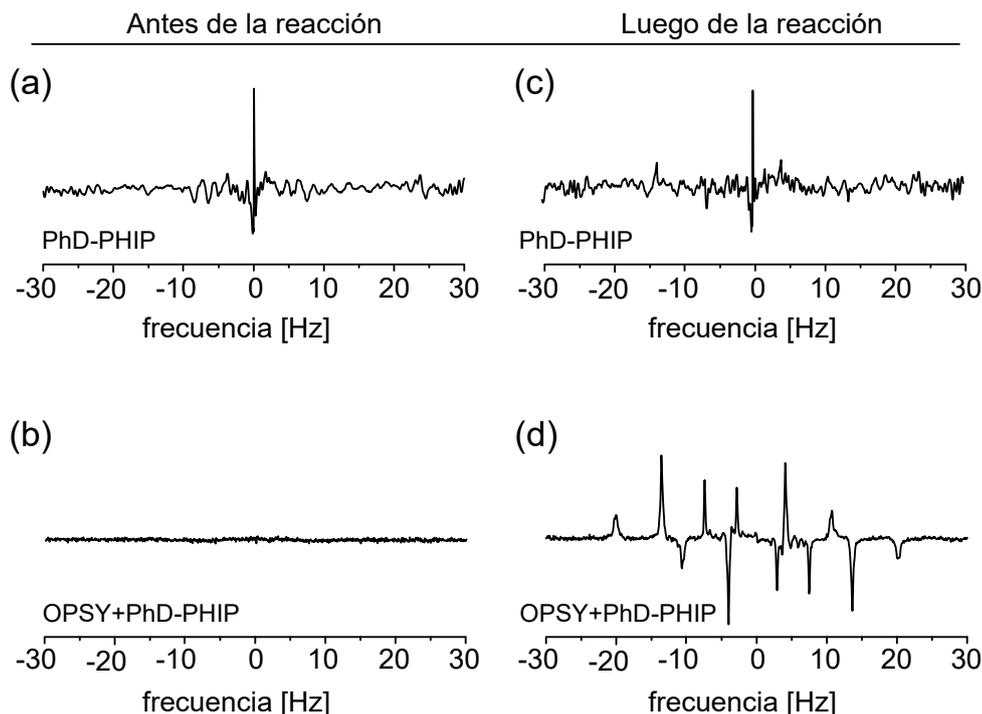


Figura 5.4: Espectro- $J$  parcial con el filtro digital centrado en  $H_A^*$  adquirido con PhD-PHIP (a) y la secuencia de la Fig. 5.2 (b) antes de la hidrogenación con  $pH_2$ , donde la ganancia del receptor se define por encima del límite de saturación. (c) y (d) muestra los resultados experimentales luego de la hidrogenación.

Los experimentos se llevaron a cabo en un campo magnético de intensidad 7 T con una consola Bruker Avance II, equipado con una sonda de imágenes y una bobina de tipo birdcage y bobinas de gradiente 3D con un gradiente máximo de 1.5 T/m. La potencia de r.f. se definió tal que  $\omega_{rf}/2\pi = 14,5$  kHz, correspondiente a pulso de duración de 14.5  $\mu s$  y 29  $\mu s$  para pulsos de  $\pi/2$  y  $\pi$  respectivamente. Todas las muestras se prepararon aproximadamente con la mitad del largo de la bobina de RMN, para mantener los efectos de inhomogeneidades de r.f. al mínimo. Los gradientes de campos magnéticos se alinearon con la dirección del campo magnético externo, con duración  $\tau = 1$  ms, e intensidad  $g = 50$  mT/m, aplicados en el esquema de la OPSY- $d$ , ( $+g, -2g$ ). Para el bloque PhD-PHIP se repitieron los parámetros usados previamente.

### 5.3. Filtrado de señales térmicas con r.f. inhomogénea

En esta sección se presenta una nueva secuencia basada en OPSY, también destinada a filtrar las señales provenientes de protones polarizados térmicamente en PHIP pero usando campos de radiofrecuencia inhomogéneos en lugar del par de gradientes de campo magnético. Se presenta un modelo teórico junto con la implementación experimental para una bobina de tipo birdcage en un campo magnético de 7 T. El nivel de control alcanzado por esta estrategia permite la inclusión de un tren de pulsos de refocalización.

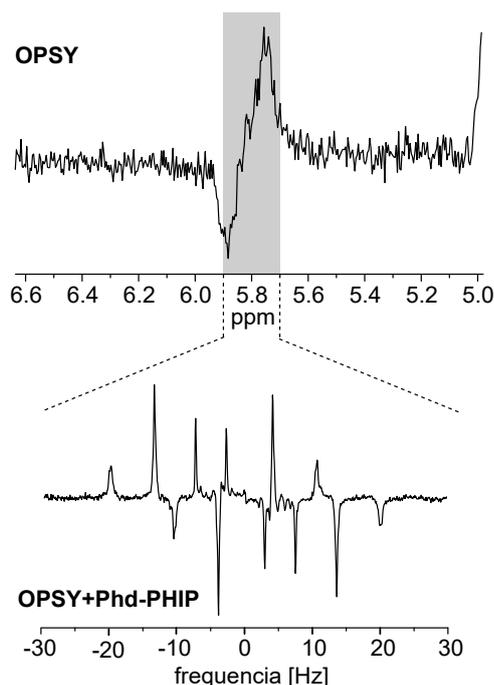


Figura 5.5: Resultados experimentales obtenidos en Fig. 5.2(d) y Fig. 5.4(d) mostrados juntos para destacar la mejora en sensibilidad y resolución obtenido por la combinación de OPSY-*d* y PhD-PHIP.

De la misma manera que se realizó en la anterior sección y a pesar del uso de pulsos de r.f. inhomogéneos, se puede combinar con la PhD-PHIP como bloque de detección para mejorar la resolución del experimento en un solo escaneo.

### 5.3.1. Evolución de espín durante la irradiación de una r.f. inhomogénea intensa

Con el objetivo de producir un desfase y la refocalización de las coherencias necesarias, el período de evolución durante un pulso de radio frecuencia con una distribución espacial es combinado con una rotación global sobre una dada dirección en el plano  $x$ - $y$ , logrado por un par de pulsos con fases opuestas. El resultado es una evolución efectiva sobre la dirección  $z$  del sistema rotante.<sup>98, 162</sup> Este razonamiento sugiere una manera directa de construir una nueva secuencia de pulso, apuntando a filtrar las señales originadas por espines térmicamente polarizados en experimentos de PHIP. Sin embargo, hay algunas aproximaciones relacionadas con la respuesta precisa del sistema de espín para distintos esquemas de r.f. que merecen una descripción un poco más detallada.

#### Hamiltonianos y propagadores

Asumamos un sistema de espín que consiste en un ensamble de moléculas en un líquido isotrópico, en presencia de un campo magnético estático fuerte  $\vec{B}_0 = B_0 \hat{k}$ , y un campo de

r.f. oscilante a la frecuencia de Larmor del núcleo objetivo,  $\omega_0$ . El Hamiltoniano de espín de todo el sistema,  $\mathcal{H}_s$ , expresado en el sistema rotante a  $\omega_0$  es:<sup>68</sup>

$$\mathcal{H}_s = \sum_i (\omega_i - \omega_0) I_i^z + \sum_{j < k} J_{jk} \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k. \quad (5.1)$$

En este punto, no hacemos ninguna suposición sobre los valores relativos de las constantes de acoplamiento- $J$  con respecto a las diferencias de corrimientos químicos entre cualquier par de espines involucrados. El campo de radiofrecuencia con intensidad  $B_{\text{r.f.}} \gamma = \omega_{\text{r.f.}}$ , alineado en una dirección arbitraria en el plano  $x$ - $y$  del sistema rotante, es representado por el Hamiltoniano:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{\text{r.f.}} &= \sum_i \omega_{\text{r.f.}}^i (\cos(\phi) I_i^x + \sin(\phi) I_i^y) \\ &= \omega_{\text{r.f.}} (\cos(\phi) I^x + \sin(\phi) I^y), \end{aligned} \quad (5.2)$$

donde  $\phi$  representa el ángulo azimutal del sistema de coordenadas esféricas,  $I^\alpha = \sum_j I_j^\alpha$  con  $\alpha = x, y$  or  $z$ , y la intensidad de r.f. se asume suficientemente grande como para afectar a todos los espines de la molécula indistintamente (es decir,  $\omega_{\text{r.f.}}^i = \omega_{\text{r.f.}} \forall i$ ). Más aún, definiendo la intensidad de r.f. lo suficientemente fuerte para cumplir  $\omega_{\text{r.f.}} \gg (\omega_i - \omega_0) \forall i$  y  $\omega_{\text{r.f.}} \gg J_{jk} \forall j, k$ , el análisis de la dinámica de espín puede ser simplificado por la aproximación secular.<sup>67,70</sup> Si, además, la duración de r.f.  $\tau$  se define lo suficientemente corta tal que  $\tau \ll J_{jk}^{-1} \forall j, k$ , la evolución de los espines puede ser considerada únicamente llevada a cabo por  $\mathcal{H}_{\text{r.f.}}$ , descrito por el siguiente propagador:

$$\mathcal{U}_{\text{r.f.}}^\phi = \exp(-i \omega_{\text{r.f.}} \tau (\cos(\phi) I^x + \sin(\phi) I^y)). \quad (5.3)$$

### Gradiente ideal de r.f.

Inicialmente consideremos una bobina ideal con una región donde la r.f. es altamente homogénea con una intensidad  $\omega_{\text{r.f.}}^0$ , y una región inhomogénea con una gradiente constante, el cual modelaremos como:

$$\omega_{\text{r.f.}}(z) = \omega_{\text{r.f.}}^0 (1 - z/L), \quad (5.4)$$

donde  $L$  es el valor en  $z$  al cual el campo de r.f. desaparece (ver Fig. 5.6(a)). Se debe tener cuidado con la intensidad de r.f., con respecto a las aproximaciones hechas anteriormente. Si los espines dentro de la muestra están posicionados cerca de  $z = L$ , el campo de r.f. puede no ser lo suficientemente intenso como para cumplir las condiciones definidas para el truncamiento del Hamiltoniano. Por lo tanto, asumamos una muestra de largo  $l_s$  con  $0 < l_s < L$ , posicionada como se muestra esquemáticamente en la Fig. 5.6 (a).

Consideremos el campo de r.f. en la dirección  $y$  del sistema rotante. Bajo irradiación en resonancia, la magnetización global permanecerá en el plano  $x$ - $z$ . Los espines en el centro de la muestra rotarán alrededor del campo de r.f. con una frecuencia de nutación

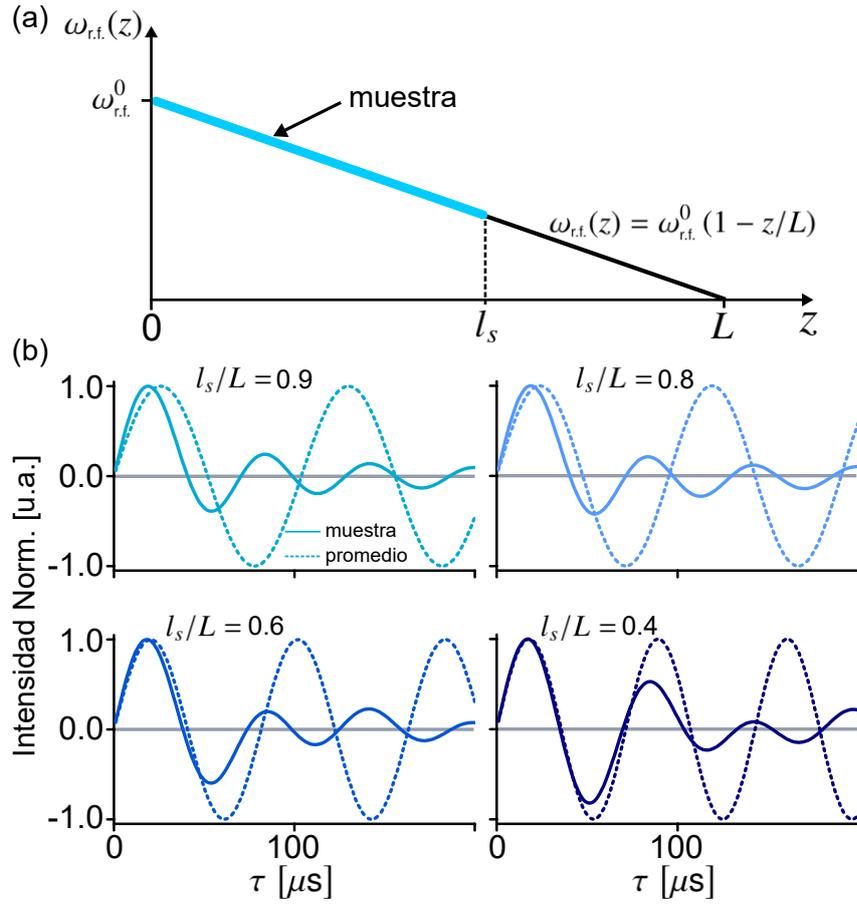


Figura 5.6: (a) Modelo de la región inhomogénea de una bobina de r.f. ideal. Se asume una muestra de largo  $l_s$ . (b) Intensidades de la señal simuladas como función de la duración de la r.f., para muestras de distintas relaciones  $l_s/L$ . En línea punteada se incluyen los experimentos de nutación con la frecuencia promedio (ver texto) como comparación. Para los cálculos, la máxima potencia de r.f. se definió a  $\omega_{r.f.}^0/2\pi = 17,5$  kHz.

de

$$\langle \omega_{r.f.} \rangle = \frac{1}{2} \omega_{r.f.}^0 (2 - l_s/L). \quad (5.5)$$

Denotamos a la magnetización de equilibrio en un intervalo  $(z, z+dz)$  por  $m_0(z) \hat{k}$ , tal que la magnetización de equilibrio general antes de la irradiación de r.f. resulta en  $\vec{M}_0 = M_0 \hat{k}$ , con  $M_0 = \int_0^{l_s} m_0(z) dz$ . Por lo que la amplitud de la magnetización transversal por unidad de longitud luego de un período de r.f. de duración  $\tau$  es,

$$m_x(z, \tau) = m_0(z) \sin(\omega_{r.f.}(z)\tau). \quad (5.6)$$

El principio de reciprocidad dice que el voltaje inducido en la bobina depende de la magnetización transversal, y, de la intensidad del campo producido por la bobina en la posición de la muestra.<sup>165</sup> Bajo la condición descrita en la Fig. 5.6(a), la señal global

adquirida por la bobina resulta en:

$$\begin{aligned}
S_x(\tau) &\propto \int_0^{l_s} m_0(z) (\omega_{\text{r.f.}}^0 \{1 - z/L\}) \sin(\omega_{\text{r.f.}}(z) \tau) dz \\
&\propto \frac{\{1 - l_s/L\} \cos(\tau \omega_{\text{r.f.}}^0 \{l_s/L - 1\}) - \cos(\omega_{\text{r.f.}}^0 \tau)}{\tau} + \\
&\quad + \frac{\sin(\tau \omega_{\text{r.f.}}^0 (l_s/L - 1)) + \sin(\tau \omega_{\text{r.f.}}^0)}{\omega_{\text{r.f.}}^0 \tau^2}
\end{aligned} \tag{5.7}$$

Los gráficos de la Fig. 5.6(b) muestran el comportamiento de la señal descrita por la ec.(5.7) como función de  $\tau$  para distintos valores de  $l_s/L$ , donde la intensidad de r.f. se eligió tal que la señal de la magnetización (línea continua) difiere en gran medida de aquella originada en los espines posicionados al centro de la muestra (línea punteada), al aumentar  $\tau$ . Sin embargo, para valores de  $l_s/L < 0,6$ , ambas curvas son indistinguibles durante la mitad del primer período del comportamiento sinusoidal con frecuencia  $\langle \omega_{\text{r.f.}} \rangle$ . En este sentido, un valor de  $\tau$  pequeño otorga un promedio de ángulos de giro de  $90^\circ$  para ciertos tamaños de muestras, mientras que la aplicación de pulsos largos produce un gran dispersión de rotación de ángulos. Esto representa una herramienta muy simple y económica para controlar la evolución de espín durante el proceso de diseñar una secuencia de pulso eficiente.

### Implementación en una bobina de tipo birdcage

Las bobinas birdcage son muy populares debido a la habilidad de generar campos de r.f. altamente homogéneos. Consisten de un arreglo de conductores longitudinales colocados simétricamente en forma cilíndrica, denominados patas (legs, en inglés). Estas patas están confeccionadas a partir de una fina chapa conductora que se conectan formando circuitos cerrados. El campo generado por la bobina es perpendicular a la cara de las patas y su homogeneidad aumenta cuando aumenta su cantidad. Las birdcages se pueden dividir en dos tipos, dependiendo de la posición de los capacitores que permiten sintonizar la bobina. Las denominadas pasa-alto, Fig. 5.7(a), donde los capacitores se colocan en los arcos que conectan las patas; o las conocidas como pasa-bajo, donde los capacitores se ubican en medio de las patas, Fig. 5.7(b). Ambos arreglos tienen sus virtudes y defectos, que no serán detallados aquí. Una muy buena recopilación de las propiedades de cada tipo se puede encontrar en la Ref.<sup>166</sup>

El comportamiento previamente descrito en la sección anterior se comprobó gracias a una serie de experimentos llevados a cabo en una bobina de este tipo con un diámetro interno de 10 mm en un campo magnético de 7 T. Un tubo de RMN de 10 mm se llenó con agua hasta  $\sim 1$  mm de alto y se colocó a distintas posiciones, en las cuales se realizaron experimentos de nutación para distintas potencias de r.f., como se muestra en la Fig. 5.8(a) (muestra-A). Los puntos azules en el gráfico de la Fig. 5.8(b) representan las intensidades de r.f. ( $\omega_{\text{r.f.}}/2\pi$ ) extraídas de los experimentos de nutación, como función de la distancia al centro de la bobina.

Los experimentos de nutación consisten para una dada potencia de r.f.,  $\omega_{\text{r.f.}}$ , en variar

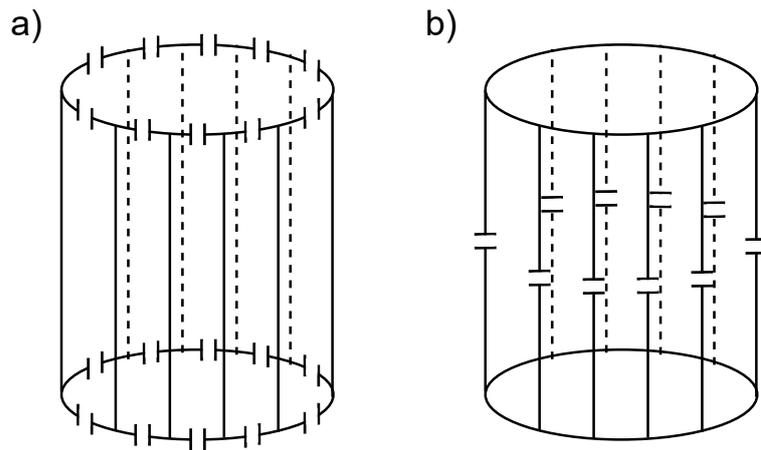


Figura 5.7: Bobina de tipo *birdcage* (a) pasa-alto y (b) pasa-bajo.

el tiempo del pulso  $\tau$ . Inicialmente, la magnetización se encuentra en la dirección  $z$ , al aplicar un pulso en la dirección  $x$  en el sistema rotante, se voltea la misma al plano  $y$ - $z$ . La duración del pulso con el cual la magnetización transversal es máxima, corresponde al pulso de  $\pi/2$ ,  $\tau_{\pi/2}$ , (y mínima al de  $\pi$ ). A partir de la ecuación

$$\nu_{r.f.} = \omega_{r.f.}/2\pi = \frac{1}{(4\tau_{\pi/2})} \quad (5.8)$$

es posible obtener la potencia del pulso aplicado.

El rango de distancias  $< 5$  mm corresponde a la región donde la intensidad de r.f. es altamente homogénea, usualmente ocupado por la muestra en los experimentos estándares. Desde 6 mm a 12 mm la intensidad de r.f. decrece siguiendo una tendencia aproximadamente lineal para ambas intensidades de r.f. mostradas. Los ajustes lineales que representan las líneas rojas, con pendientes dadas por  $(1,8 \pm 0,1)$  kHz/mm y  $(0,90 \pm 0,08)$  kHz/mm, respectivamente. Esto corresponde a una variación promedio de 0,04 T/m y 0,02 T/m respectivamente.

Luego, se posicionó un tubo de RMN con agua hasta 6 mm de alto, con el nivel del agua 5 mm debajo del centro de la bobina, como se indica en la Fig. 5.8(a) (muestra-B). Los gráficos en la Fig. 5.8(c) muestran los resultados de los experimentos de nutación obtenidos con la muestra-B, superpuestos con los resultados obtenidos con la muestra-A posicionada en  $z = 8$  mm. Como en el caso de la bobina ideal, ambas evoluciones de magnetizaciones transversales coinciden para casi la mitad del período de la repuesta sinusoidal. Notar que la nutación con la muestra-A también muestra el decaimiento debido al tamaño de  $\sim 1$  mm, el cual es sensitivo a la variación de r.f. en ese rango (a diferencia de las simulaciones numéricas, donde se tomo una única posición para los cálculos).

Vale la pena notar que este análisis no está limitado a las bobinas de tipo *birdcage*, sino que puede ser extendido a otro tipo de bobinas que produzcan campos homogéneos con simetría azimutal, donde la intensidad de r.f. en la región no uniforme pueda ser considerada con una variación aproximadamente lineal con la posición.<sup>167</sup>

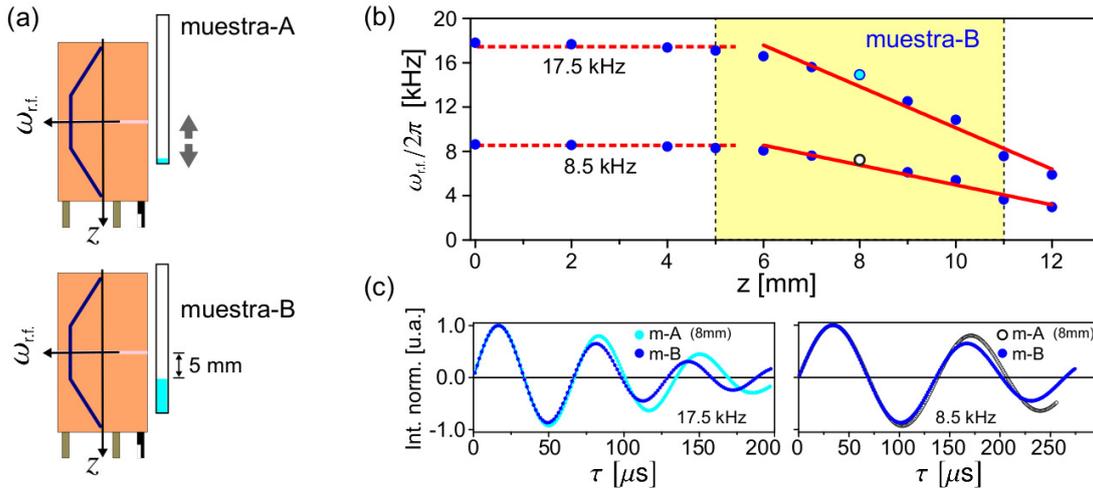


Figura 5.8: (a) Esquema de la bobina de tipo *birdcage* funcionando a 300 MHz para dos muestras de distinto largo. La muestra-A, de 1 mm, se usó para obtener el perfil de intensidad de r.f., por medio de experimentos de nutación a distintas alturas. La muestra-B, de 6 mm, se posiciona a 5 mm debajo del centro de la bobina, para hacer uso de los campos de r.f. inhomogéneos. (b) Perfil de radiofrecuencia de una bobina de tipo *birdcage* de 10 mm, obtenido por una serie de experimentos de nutación con la muestra-A, para dos potencias de r.f. distintas. La región en amarillo marca el rango cubierto por la muestra-B. (c) Experimentos de nutación para ambas intensidades de r.f. 17.5 kHz y 8.5 kHz, respectivamente.

### 5.3.2. Diseño de la secuencia de pulso

El gran control de la evolución de espín durante la excitación de r.f. es usado para diseñar la secuencia, la cual se divide en dos bloques por separados. Un bloque inicial de filtrado, inspirado en OPSY,<sup>159,160</sup> seguido por un bloque de adquisición representado por un tren de pulsos de refocalización como en la PhD-PHIP.<sup>22</sup> El primer bloque apunta a filtrar las señales que vienen de espines térmicamente polarizados y dejando inalterada, al mismo tiempo la señal proveniente de  $pH_2$ . En el segundo bloque se espera que remueva la mayor parte de las inhomogeneidades de  $B_0$  y por lo tanto la cancelación parcial de la señal en experimentos de PHIP. Es válido recordar que la secuencia de PhD-PHIP también separa las señales térmicas de aquellas originadas por PHIP debido a propiedades de la FFT, proveyendo una mejor resolución en el espectro si el proceso de filtrado no es perfecto.

#### Bloque de filtrado

Consideremos la siguiente secuencia:

$$(90^\circ)_{\bar{x}} - (\text{r.f.})_y - (90^\circ)_x, \quad (5.9)$$

descrito por el siguiente propagador:

$$\begin{aligned} \mathcal{U}(\tau) &= \mathcal{P}_{90^\circ}^x \mathcal{U}_{r.f.}^y \mathcal{P}_{90^\circ}^{-x} = e^{-i\frac{\pi}{2}I^x} e^{-i\omega_{r.f.}\tau I^y} e^{+i\frac{\pi}{2}I^x} \\ &= \exp(-i\omega_{r.f.}\tau I^z). \end{aligned} \quad (5.10)$$

Ésta representa una rotación global de ángulo  $\omega_{r.f.}\tau$  alrededor de la dirección  $z$ . Para una r.f. linealmente dependiente en la coordenada  $z$ ,  $\omega_{r.f.} = \omega_{r.f.}(z)$ , la magnetización transversal global (y de hecho, todos los órdenes de coherencias) será efectivamente defasada, como si estuviéramos en presencia de un gradiente de campo magnético. Esto puede relacionarse perfectamente con la Ec. (4.4) presentada en el capítulo 4 sobre la acumulación de fase en presencia de un gradiente de campo magnético. Por lo tanto, se puede construir una nueva secuencia de pulsos a partir de la secuencia anterior. Comenzando con OPSY, cualquier intervalo donde se aplique un gradiente de campo magnético debe reemplazarse por un bloque de r.f. descrito en la eq. (5.9). En esta secuencia, a la cual nos referiremos como REOPSY (por sus siglas en inglés Radiofrequency Encoded OPSY) se describe en la Fig. 5.9, donde la secuencia OPSY original se incluye como comparación. En OPSY, el segundo gradiente puede tener intensidades  $\pm 2g$ , donde el signo menos se prefiere para minimizar los efectos de corrientes espurias. En REOPSY sin embargo, estas corrientes no están presentes.

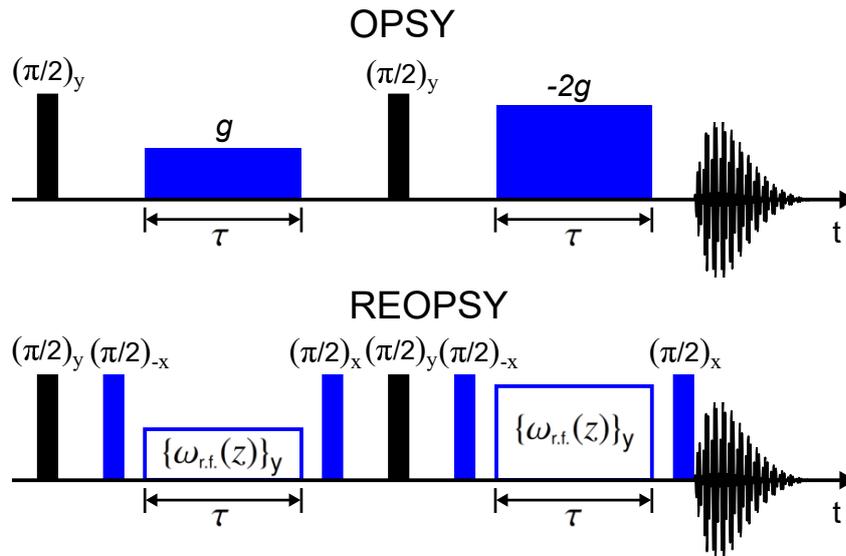


Figura 5.9: Secuencias de pulso OPSY y REOPSY. Los dos pulsos de  $90_y^\circ$  (en negro) son comunes para ambas secuencias. El gradiente de campo magnético estático de duración  $\tau$  (en gris en OPSY) es reemplazado por la secuencia descrita por la eq. (5.9) (en azul). La adquisición de la señal en OPSY debe ser demorada unos cientos de  $\mu s$  luego del apagado del pulso de gradiente de campo para evitar efectos de corrientes espurias. Sin embargo, para la REOPSY la adquisición se produce luego del tiempo muerto del último pulso de  $90^\circ$ .

Los tamaños de los bloques con las etiquetas  $\{\omega_{r.f.}(z)\}$  representan el grado de inho-

mogeneidad, el cual está directamente relacionado con la potencia de r.f. como se usa comúnmente. Estas inhomogeneidades deben cumplir la relación 1:2 como en la secuencia de pulso original (OPSY).<sup>159,160</sup> En este caso, el mecanismo que produce el filtrado de la señal es exactamente el mismo que en OPSY. Al final del último pulso, se forma la señal de RMN originada sólo de los espines hiperpolarizados con parahidrógeno, como se muestra esquemáticamente.

Como durante la secuencia REOPSY se presenta una distribución de ángulos de giro alrededor de  $90^\circ$ , la eficiencia de la secuencia para el filtrado de señales térmicas fue probada con la muestra-B (6 mm de largo) posicionada en la región inhomogénea de la bobina. Tres tipos distintos de sistemas de espines se usaron en las pruebas: un sistema de espines no interactuantes (agua), un sistema débilmente acoplado (etanol), y un sistema de espín más complejo (1-hexeno). Como método de comparación, se adquirieron dos señales distintas de RMN: luego de un pulso de excitación único y luego de la secuencia REOPSY. Se usaron dos bloques de r.f. de duración  $\tau = 1$  ms y de intensidades  $\omega_{r.f.}^0/2\pi = (8,50 \pm 0,15)$  kHz and  $(17,5 \pm 0,3)$  kHz respectivamente. Los espectros de RMN obtenidos se muestran en la Fig. 5.10. En todos los casos, el espectro obtenido con un único pulso y con la REOPSY se grafican con la misma escala vertical. Las diferencias de intensidades sugieren que la mayor parte de la señal coherente es filtrada, solamente quedando líneas de base distorsionadas las cuales son inherentes a las imperfecciones de pulso.

### Bloque de detección

En la sección anterior destacamos los beneficios de usar un tren de pulsos de refocalización como un bloque de detección, *conectado* al final de la secuencia OPSY. Antes de la implementación de REOPSY, la adquisición multipulso debe ser testeada cuidadosamente, ya que los pulsos de refocalización son producidos ahora por un campo de r.f. altamente inhomogéneo. Si bien los resultados mostrados en la Fig. 5.8(c) indican que las rotaciones de  $180^\circ$  no difieren de la de una muestra pequeña, se considero necesario verificar el desempeño de rotaciones con pulsos de r.f. intensos para una secuencia con miles de pulsos. Para este propósito, usamos una muestra de 6 mm de largo de etanol para verificar el desempeño de la PhD-PHIP. La red de acoplamiento- $J$  relativamente simple hace de esta molécula una buena candidata como prueba. Se realizaron dos experimentos con un primer pulso de  $90^\circ$  seguido por 2048 pulsos de refocalización con el filtro digital centrado en ambos grupos funcionales, el metilo y el metileno respectivamente. El espectro- $J$  parcial resultante se muestra en la Fig. 5.11, mostrando los multipletes libres de errores y bien resueltos, con una gran concordancia con las predicciones teóricas.

### 5.3.3. Experimentos con PHIP

Se burbujeó gas hidrógeno enriquecido en el estado *para* en una mezcla de 1-hexino y un catalizador de rodio disuelto en acetona deuterada para producir el 1-hexeno hiperpolarizado. Una muestra de 6 mm de alto se posicionó en la región inhomogénea de una bobina de tipo *birdcage*, como antes (muestra-B). La Figura 5.12 muestra esquemáticamente la reacción, donde los antiguos núcleos del parahidrógeno se etiquetan como  $H_a$  y

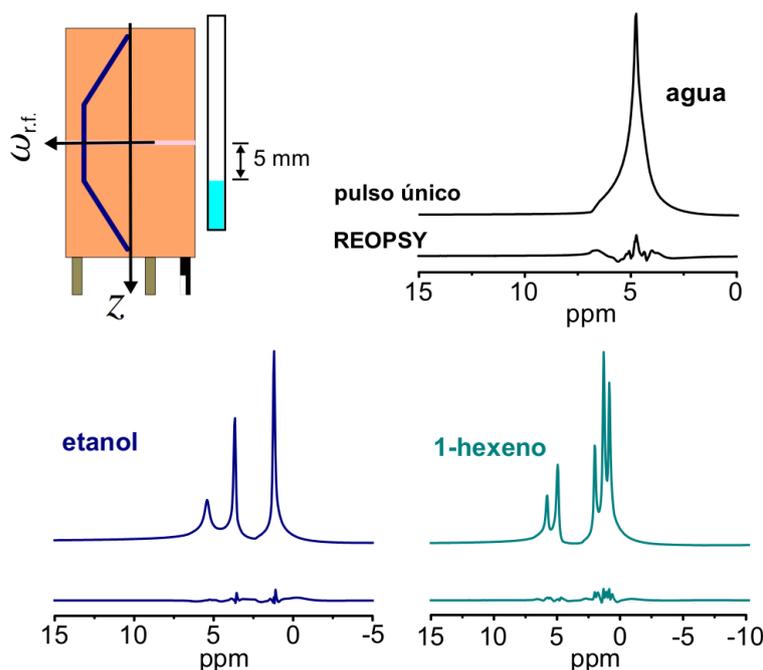


Figura 5.10: Configuración usada para probar la eficiencia de REOPSY, junto con los resultados obtenidos para tres sistemas de espines distintos. Los experimentos con un único pulso se llevaron a cabo con un pulso de  $90^\circ$  correspondiente a  $\omega_{r.f.}^0/2\pi = 17,5$  kHz. En los experimentos de REOPSY, la duración de los bloque de r.f. se definió en  $\tau = 1$  ms. Las intensidades de r.f. son las mismas que obtuvimos desde la calibración mostrada en la Fig. 5.8:  $\omega_{r.f.}^0/2\pi = (8,50 \pm 0,15)$  kHz y  $(17,5 \pm 0,3)$  kHz.

$H_b$  en la molécula producto. Un experimento de un único pulso de  $45^\circ$  se llevó a cabo luego de una primera reacción para observar el grado de hiperpolarización. Luego de una nueva reacción, se adquirió la señal al final de la secuencia REOPSY. El espectro de RMN correspondiente observado en la Fig. 5.12 muestra que la mayoría de la señal térmica fue filtrada. Aún cuando una línea de base aparece en los multipletes de PHIP, las características principales se conservan. En un segundo paso, implementamos la combinación de REOPSY+PhD-PHIP. El espectro- $J$  parcial obtenido con el filtro digital centrado en la frecuencia de resonancia de  $H_a$  se muestra en el panel inferior de la Fig. 5.12, la cual coincide con los experimentos previos con alta resolución y una gran relación señal-ruido para el bajo nivel de hiperpolarización obtenida en este diseño en particular.

## 5.4. Conclusiones

En este capítulo se trató con el problema de mejorar la sensibilidad y resolución durante la adquisición de señales de PHIP hiperpolarizadas. Se demostró la factibilidad de aumentar ambas propiedades en un mismo experimento al combinar dos secuencias. Si

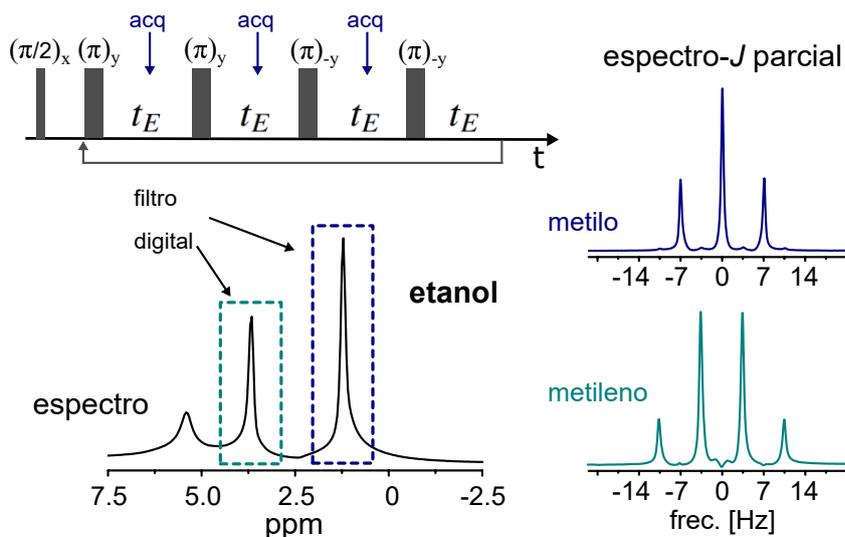


Figura 5.11: Secuencia de pulso usada para adquirir el espectro- $J$  parcial junto con los resultados para etanol. Un total de 2048 ecos, con  $t_E = 8$  ms, se produjeron en experimentos independiente definiendo la frecuencia de excitación en el corrimiento químico deseado. Los *tops* de los ecos se adquirieron con un ancho espectral de 500 Hz, definidos por los rectángulos punteados, tal que el filtro digital remueve las señales de los multipletes no deseados.

bien esta combinación se realizó para dos pares de secuencias distintas, siempre se siguió el mismo concepto, el de un bloque de filtrado o eliminación de contribuciones de espines polarizados térmicamente y un segundo bloque de adquisición llevado a cabo por un tren de pulsos de refocalización.

En primer lugar, se observó que la secuencia OPSY provee un espectro libre de contribuciones de señales térmicamente polarizadas, mientras que la ganancia del receptor se puede definir tal que se maximiza la relación señal-ruido. La PhD-PHIP por otro lado también filtra señales térmicamente polarizadas y adicionalmente aumenta la resolución en la adquisición del espectro- $J$  parcial. Sin embargo, la adquisición se lleva a cabo en presencia de señales polarizadas térmicamente, tal que se limita la ganancia del receptor. La combinación de ambas secuencias explotan los beneficios de ambos mundos. La nueva secuencia de pulso es una implementación directa sin requerimiento de hardware extra. Los experimentos en una muestra compleja con un nivel de hiperpolarización muy bajo mostraron un excelente desempeño del método. La claridad de los resultados permiten prever una implementación en concentraciones aún menores y en una gran variedad de diseños experimentales donde la homogeneidad de  $B_0$  es perturbada por la presencia de dispositivos y/o sensores en la proximidad del volumen sensitivo de la bobina.

En segundo lugar se introdujo una nueva secuencia de pulso basada en la secuencia OPSY, denominada REOPSY, también con el objetivo de filtrar señales de RMN de protones térmicamente polarizados en experimentos de PHIP. Se usa la dependencia espacial del campo de r.f. en lugar de un gradiente de campo magnético estático para producir el efecto de filtrado. Como una prueba de principio se usó la variación de campo magnético

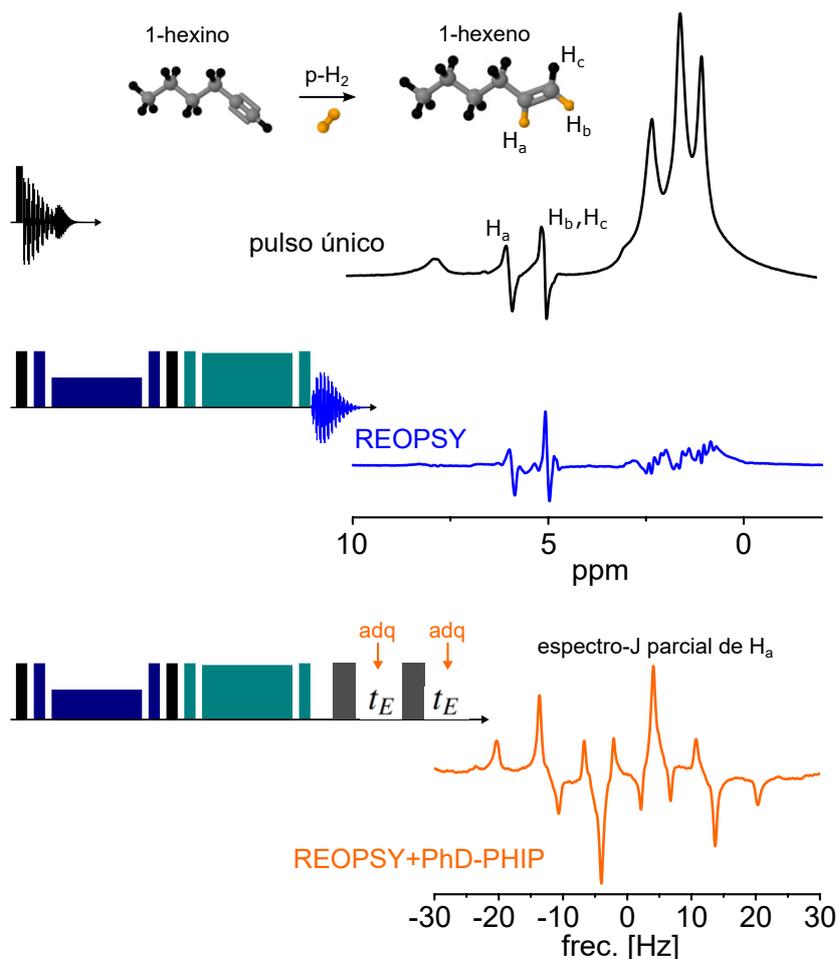


Figura 5.12: Experimentos de PHIP con un único pulso de excitación, REOPSY y REOPSY+PhD-PHIP adquiridos luego de tres reacciones químicas independientes. El experimento de un único pulso se llevó a cabo con un pulso de  $45^\circ$  correspondiente a  $\omega_{r.f.}^0/2\pi = 17,5$  kHz y una duración de pulso de  $7,25 \mu\text{s}$ . Los bloques de REOPSY y PhD-PHIP se realizaron con los mismos parámetros que en las Figs. 5.10 y 5.11 respectivamente.

en el núcleo de una bobina de tipo *birdcage* estándar, donde los pulsos cortos de r.f. producen un giro promedio de  $90^\circ$  de la magnetización, mientras que para excitaciones largas produce un desfasaje sobre el volumen de la muestra. Los experimentos realizados en la región lineal de una bobina *birdcage* comercial de 10 mm coinciden perfectamente con el caso ideal. Esta nueva secuencia de pulso fue probada independientemente en diferentes sistemas de espín térmicamente polarizados. En todos los casos hubo una sustancial eliminación de la señal térmica de RMN al final de cada secuencia. En los experimentos de PHIP, la secuencia probó ser efectiva en filtrar las señales térmicas mientras que se mantiene la señal hiperpolarizada prácticamente imperturbada. Finalmente, la combinación de REOPSY+PhD-PHIP resulta en un espectro-*J* parcial compuesto solo por los espines hiperpolarizados con una resolución y sensibilidad excelente. *Journal of Magnetic Resonance*, vol.:299, págs.:28-32, Febrero 2019. “*Combination of OPSY and PhD-PHIP*

*results in enhanced sensitivity in PHIP*". S. Bussandri, L.Buljubasich y R.H. Acosta. Journal of Magnetic Resonance, vol.:323, págs.:106894, Diciembre 2020. "*Radiofrequency encoded Only Parahydrogen Spectroscopy*". S. Bussandri, R.H. Acosta y L.Buljubasich.

# Capítulo 6

## Conclusiones y perspectivas

En esta tesis, se describieron en detalle distintos experimentos en sistemas de espines con acoplamientos complejos hiperpolarizados con parahidrógeno. Particularmente, se presentaron herramientas para mejorar la obtención de información en estos sistemas mediante la adquisición de la señal hiperpolarizada con un tren de pulsos de r.f. en comparación del usual método con un único pulso.

El primer aporte de esta tesis fue presentar un estudio detallado de distintos esquemas de fases, combinando datos experimentales y simulaciones numéricas, con el objetivo de determinar la mejor alternativa para la adquisición del espectro- $J$ , manteniendo los errores al mínimo en la región de frecuencias de interés. El análisis se llevó a cabo desde el dominio de las frecuencias, a diferencias de los tratamientos encontrados en la literatura para ecos de trenes, los cuales están plenamente enfocados en las señales temporales. Nuestros resultados son consistentes con los encontrados por otros autores para sistemas de espines desacoplados, es decir protones en agua. Cuando se consideran sistemas de espines con acoplamientos- $J$  en muestras térmicamente polarizadas e hiperpolarizadas, el desempeño de las distintas secuencias multiecos en el dominio de frecuencia es directamente observado a través de las distorsiones producidas por los pulso de r.f. en la evolución cuántica con el Hamiltoniano de espín. Nuestro trabajo arrojó como resultado que estas distorsiones se evitan usando un arreglo especial de fases en el tren de pulsos, siguiendo el esquema  $x - (yy\bar{y}\bar{y})^N$ , o cualquier otra rotación global respecto a esas fases relativas.

Esperamos que este método simple pueda ser aplicado para el estudio de futuras modificaciones en secuencias multipulso, o para probar el desempeño de aquellas que ya están establecidas, como las que involucran pulsos de refocalización compuestos. Mas aún, consideramos que el enfoque presentado en esta tesis puede ser inmediatamente extendido a otras áreas de investigación que usa la CPMG para valorar la precisión en los resultados, como el decaimiento de la magnetización de líquidos confinados en medios porosos.

A partir de los buenos resultados obtenidos con la secuencia PhD-PHIP por sí misma, se estudió la combinación de esta secuencia con otras preexistentes para el estudio de muestras hiperpolarizadas en distintas condiciones. En primer lugar, nos concentramos en el estudio de la difusión de un grupo de moléculas hiperpolarizadas extremadamente disueltas en un medio líquido. Usamos la técnica espectroscópica 2D denominada DOSY, que resuelve las moléculas en soluciones por sus propiedades de difusión a través de la

adquisición de un espectro con la ayuda de gradientes de campo magnético pulsados. Como cualquier técnica de RMN, DOSY requiere de conseguir un nivel aceptable de sensibilidad para rendir eficientemente. En este sentido, los métodos de hiperpolarización como PHIP ayudan a mejorar la relación señal-ruido. Definir los coeficientes de difusión de las moléculas presentadas en algunas muestras puede aún ser complicado si esos coeficientes son similares. Una ventaja de usar PHIP en estos experimentos es el uso de su distintiva señal característica como un agente de contraste para la discriminación, incluso bajo las condiciones de coeficientes de difusión similares; pero la superposición espectral puede aún ser un problema. La combinación de la secuencia de difusión como un bloque de codificación, con la secuencia PhD-PHIP como el bloque de adquisición provee una herramienta muy útil para la medición de coeficientes de difusión la cual, como en las aplicaciones previas, evita la superposición espectral y discrimina las señales térmicas de las hiperpolarizadas.

Cualquier experimento 2D que involucre PHIP tiene el desafío de la reproducibilidad de la señal impuesta por la hidrogenación. Nuestra alternativa para solucionar este aspecto fue el uso de membranas o tubos huecos para la inyección del gas parahidrógeno en la muestra. Se presentó una cámara de reacción construida con estos tubos de Teflón, los cuales dan un control pleno de la reacción hidrogenación. La reacción fue exitosamente monitoreada alcanzando una cantidad constante de hiperpolarización durante 42 minutos, tiempo suficiente para realizar experimentos 2D precisos. La cámara usada para la hidrogenación evita la formación de burbujas pero el gas inyectado genera un gradiente de presión que induce convección. El efecto en la movilidad molecular puede ser evitado por la aplicación de una secuencia doblemente codificada con gradientes pulsados de ecos de espín. Antes de la medición de los coeficientes de difusión de las moléculas reaccionadas, algunos parámetros de la secuencia de codificación fueron ajustados cuidadosamente a través de simulaciones numéricas y experimentos debido al complejo régimen de acoplamientos presentado en la moléculas usada para reaccionar. Se definió un experimento demostrativo el cual permitió la medición de la difusión de las moléculas reaccionadas, incluso en un grado muy bajo de hiperpolarización y concentración.

En segundo lugar con el objetivo de mejorar la información obtenida en un sistema con un grado de hiperpolarización extremadamente bajo, se combinó la secuencia OPSY con la secuencia PhD-PHIP. La primer secuencia consta de un par de pulsos de  $90^\circ$  y dos períodos de evolución en presencia de un gradiente de campo magnético y funciona como un filtro de señales térmicas, resultando en una señal proveniente únicamente de los espines hiperpolarizados con PHIP. Sin embargo, la señal es adquirida en forma de FID, la cual sufre del ensanchamiento de líneas debido a las inhomogeneidades mientras que la secuencia PhD-PHIP al final de la secuencia OPSY elimina cualquier fuente de cancelación de la señal. Es importante aclarar, que a pesar de que a primera vista parece que el mismo efecto se logra con el uso del filtro digital, la situación no es equivalente. En un escenario de un relativamente bajo nivel de hiperpolarización, ya sea por una pobre eficiencia en la reacción o una baja concentración de los reactantes, la ganancia del receptor está limitada por las señales térmicas. Esto incluso sucede cuando están fuera del rango del filtro digital porque previo al proceso de filtrado, toda la señal es adquirida. Por lo tanto, independientemente del uso de filtros digitales durante la adquisición con

PhD-PHIP, usar OPSY como un filtro de señales térmicas permite el aumento del nivel de la ganancia del receptor, resultando en un aumento en la sensibilidad.

Finalmente, se estudió la misma estrategia de un prefiltrado de la señal de PHIP antes de la adquisición con PhD-PHIP, pero sin la aplicación de gradientes de campo magnético. El enfoque, denominado REOPSY, explota la región inhomogénea de la bobina de r.f. para producir un defasaje global de las señales no deseadas. Se presentó un modelo teórico para esta secuencia así como una implementación experimental en una bobina de tipo birdcage a un campo magnético de 7 T. Al seleccionar precisamente el largo de la muestra y su posición con respecto a la bobina de r.f., se demostró que los períodos largos de r.f. producen un fuerte defasaje, mientras que los pulsos cortos efectivamente rotan toda la magnetización simultáneamente. La mayor ventaja de esta secuencia es que no requiere de un hardware extra al que tiene cualquier equipo básico de RMN. Bajo estas condiciones, fuimos capaces de filtrar la mayor cantidad de señal térmica en un experimento de PHIP y de adquirir la señal con un tren de más de 2000 pulsos de refocalización, obteniendo multipletes muy bien resueltos. Es posible implementar a futuro esta misma secuencia en un sistema a campo bajo el cual no cuenta con una bobina de gradientes.

Todos los resultados presentados en esta tesis se resumen en una publicación invitada en calidad de “mini-review” en: ChemPhysChem, Julio 2021. “*Discrimination of PHIP signals through their evolution in multipulse sequences*”. S. Bussandri, M.B. Franzoni, L. Buljubasich y R.H. Acosta.



# Bibliografía

- [1] H. Dudgeon.  $^{77}\text{Se}$  NMR spectroscopy and its applications in chemistry. volume 52 of Annual Reports on NMR Spectroscopy, pages 105–166. Academic Press, 2004.
- [2] D. D. Laws, H.L. Bitter, and A. Jerschow. Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. Angewandte Chemie - International Edition, 41(17):3096–3129, 2002. Cited By :243.
- [3] P. Espinet, A.C. Albéniz, J.A. Casares, and J.M. Martínez-Ilarduya.  $^{19}\text{F}$  NMR in organometallic chemistry: Applications of fluorinated aryls. Coordination Chemistry Reviews, 252(21):2180–2208, 2008.
- [4] N.E. Jacobsen. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology, pages 1–668. 2007.
- [5] G. Otting. Prospects for lanthanides in structural biology by NMR. Journal of Biomolecular NMR, 42(1):1–9, 2008.
- [6] B. P. Hills, S. F. Takacs, and P. S. Belton. A new interpretation of proton NMR relaxation time measurements of water in food. Food Chemistry, 37(2):95–111, 1990.
- [7] H. N. Cheng and T. G. Neiss. Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides. Polymer Reviews, 52(2):81–114, 2012.
- [8] M. F. Marcone, S. Wang, W. Albabish, S. Nie, D. Somnarain, and A. Hill. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. Food Research International, 51(2):729–747, 2013.
- [9] H. K. Kim, Y. H. Choi, and R. Verpoorte. NMR-based metabolomic analysis of plants. Nature Protocols, 5(3):536–549, 2010.
- [10] P. Krishnan, N. J. Kruger, and R. G. Ratcliffe. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. Journal of experimental botany, 56(410):255–265, 2005.
- [11] C. A. Mullen, G. D. Strahan, and A. A. Boateng. Characterization of various fast-pyrolysis bio-oils by NMR spectroscopy. Energy and Fuels, 23(5):2707–2718, 2009.

- [12] J. Tong, X. Han, S. Wang, and X. Jiang. Evaluation of structural characteristics of huadian oil shale kerogen using direct techniques (solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR, XPS, FT-IR, and XRD). *Energy and Fuels*, 25(9):4006–4013, 2011.
- [13] N. Tzourio-Mazoyer, B. Landeau, D. Papathanassiou, F. Crivello, O. Etard, N. Delcroix, B. Mazoyer, and M. Joliot. Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *NeuroImage*, 15(1):273–289, 2002.
- [14] M. Lustig, D. Donoho, and J. M. Pauly. Sparse MRI: The application of compressed sensing for rapid MR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 58(6):1182–1195, 2007.
- [15] K. P. Pruessmann, M. Weiger, M. B. Scheidegger, and P. Boesiger. SENSE: Sensitivity encoding for fast MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 42(5):952–962, 1999.
- [16] M.G. Pravica and D.P. Weitekamp. Net NMR alignment by adiabatic transport of parahydrogen addition products to high magnetic field. *Chemical Physics Letters*, 145(4):255 – 258, 1988.
- [17] C.R. Bowers and D.P. Weitekamp. Transformation of Symmetrization Order to Nuclear-Spin Magnetization by Chemical Reaction and Nuclear Magnetic Resonance. *Phys. Rev. Lett.*, 57(21):2645–2648, November 1986.
- [18] C.R. Bowers and D.P. Weitekamp. Parahydrogen And Synthesis Allow Dramatically Enhanced Nuclear Alignment. *JACS*, 109(18):5541–5542, 1987.
- [19] A. Allerhand. Analysis of Carr Purcell spin echo NMR experiments on multiple systems. I. The effect of homonuclear coupling. *The Journal of Chemical Physics*, 44(1):1–9, 1966.
- [20] R. Freeman and H.D.W. Hill. High-Resolution Study of NMR Spin Echoes: J Spectra. *The Journal of Chemical Physics*, 54(1):301–313, January 1971.
- [21] L. Buljubasich, I. Prina, M.B. Franzoni, K. Münnemann, H.W. Spiess, and R.H. Acosta. High resolution para-hydrogen induced polarization in inhomogeneous magnetic fields. *Journal of Magnetic Resonance*, 230:155–159, May 2013.
- [22] I. Prina, L. Buljubasich, and R. H. Acosta. High-Resolution Hyperpolarized J-Spectra with Parahydrogen Discrimination. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(22):3924–3928, November 2013.
- [23] I. Prina, L. Buljubasich, and R.H. Acosta. Parahydrogen discriminated PHIP at low magnetic fields. *Journal of Magnetic Resonance*, 251:1–7, February 2015.

- [24] T.C. Eisenschmid, R.U. Kirss, P.P. Deutsch, S.I. Hommeltoft, R. Eisenberg, J. Bargon, R.G. Lawler, and A.L. Balch. Para hydrogen induced polarization in hydrogenation reactions. Journal of the American Chemical Society, 109(26):8089–8091, 1987.
- [25] M. Borghini, W. de Boer, and K. Morimoto. Nuclear dynamic polarization by resolved solid-state effect and thermal mixing with an electron spin-spin interaction reservoir. Physics Letters A, 48(4):244–246, 1974.
- [26] J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M.H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, and K. Golman. Increase in signal-to-noise ratio of  $> 10,000$  times in liquid-state NMR. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(18):10158–10163, 2003.
- [27] A. Abragam and M. Goldman. Principles of dynamic nuclear polarisation. Reports on Progress in Physics, 41(3):395–467, mar 1978.
- [28] K.H. Hausser and D. Stehlik. Dynamic nuclear polarization in liquids. In J.S. Waugh, editor, Advances in Magnetic Resonance, volume 3 of Advances in Magnetic and Optical Resonance, pages 79–139. Academic Press, 1968.
- [29] J. Bargon. The discovery of chemically induced dynamic polarization (CIDNP). Helvetica Chimica Acta, 89(10):2082–2102, October 2006.
- [30] J. Bargon and H. Fischer. Kernresonanz-Emissionslinien während rascher Radikalreaktionen: II. Chemisch induzierte dynamische Kernpolarisation. Zeitschrift für Naturforschung A, 22(10):1556–1562, 1967.
- [31] R.G. Lawler. Chemically induced dynamic nuclear polarization. Journal of the American Chemical Society, 89(21):5519–5521, 1967.
- [32] N. D. Bhaskar, W. Happer, and T. McClelland. Efficiency of spin exchange between rubidium spins and  $^{129}\text{Xe}$  nuclei in a gas. Phys. Rev. Lett., 49:25–28, Jul 1982.
- [33] T.G. Walker and W. Happer. Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei. Rev. Mod. Phys., 69:629–642, Apr 1997.
- [34] S. R. Hartmann and E. L. Hahn. Nuclear double resonance in the rotating frame. Phys. Rev., 128:2042–2053, Dec 1962.
- [35] P. Pelupessy and E. Chiarparin. Hartmann-Hahn polarization transfer in liquids: An ideal tool for selective experiments. Concepts in Magnetic Resonance, 12(3):103–124, 2000.
- [36] J.P. Colpa, D. Stehlik, and H.M. Vieth. Radio Frequency (RF-) saturation spectroscopy as detected via optical nuclear polarization, mechanisms due to ESR and NMR transitions in excited triplet states. Chemical Physics, 47(1):73–85, 1980.

- [37] H.M. Vieth, V. Macho, and D. Stehlik. Radio Frequency induced magnetic resonance transitions in excited molecular triplet states as detected via optical nuclear polarization. Chemical Physics Letters, 60(3):368–371, 1979.
- [38] M. A. Bouchiat, T. R. Carver, and C. M. Varnum. Nuclear polarization in  $^3\text{He}$  gas induced by optical pumping and dipolar exchange. Phys. Rev. Lett., 5:373–375, Oct 1960.
- [39] R.H. Acosta, P. Blümmler, K. Münnemann, and H.W. Spiess. Mixture and dissolution of laser polarized noble gases: Spectroscopic and imaging applications. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 66:40–69, 2012.
- [40] Y.V. Chang, J.D. Quirk, I.C. Ruset, J.J. Atkinson, F.W. Hersman, and J.C. Woods. Quantification of human lung structure and physiology using hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$ . Magnetic Resonance in Medicine, 71(1):339–344, 2014.
- [41] M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer, and A. Wishnia. Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized  $^{129}\text{Xe}$ . Nature, 370(6486):199–201, July 1994.
- [42] F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, D.E. Hu, P.R. Jensen, R. Zandt, M. Karlsson, A. Gisselsson, S.K. Nelson, T.H. Witney, S.E. Bohndiek, G. Hansson, T. Peitersen, M.H. Lerche, and K.M. Brindle. Production of hyperpolarized  $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ malate from  $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ fumarate is a marker of cell necrosis and treatment response in tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(47):19801–19806, 2009.
- [43] J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron, J.H. Ardenkjaer-Larsen, J.A. Bankson, K. Brindle, C.H. Cunningham, F.A. Gallagher, K.R. Keshari, A. Kjaer, C. Laustsen, D.A. Mankoff, M.E. Merritt, S.J. Nelson, J.M. Pauly, P. Lee, S. Ronen, D.J. Tyler, S.S. Rajan, D.M. Spielman, L. Wald, X. Zhang, C.R. Malloy, and R. Rizi. Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  MRI: Path to clinical translation in oncology. Neoplasia, 21(1):1–16, January 2019.
- [44] E. Cavallari, C. Carrera, G. Di Matteo, O. Bondar, S. Aime, and F. Reineri. In-vitro NMR studies of prostate tumor cell metabolism by means of hyperpolarized  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ pyruvate obtained using the PHIP-SAH method. Frontiers in Oncology, 10:497, 2020.
- [45] J. Eills, E. Cavallari, C. Carrera, D. Budker, S. Aime, and F. Reineri. Real-time nuclear magnetic resonance detection of fumarase activity using parahydrogen-hyperpolarized  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ fumarate. Journal of the American Chemical Society, 141(51):20209–20214, 2019. PMID: 31762271.
- [46] K.V. Kovtunov, D. Lebedev, A. Svyatova, E.V. Pokochueva, I.P. Prosvirin, E.Y. Gerasimov, V.I. Bukhtiyarov, C.R. Müller, A. Fedorov, and I.V. Koptuyug. Robust in situ magnetic resonance imaging of heterogeneous catalytic hydrogenation with and without hyperpolarization. ChemCatChem, 11(3):969–973, February 2019.

- [47] K.V. Kovtunov, D.A. Barskiy, R.V. Shchepin, O.G. Salnikov, I.P. Prosvirin, A.V. Bukhtiyarov, L.M. Kovtunova, V.I. Bukhtiyarov, I.V. Koptuyug, and E.Y. Chekmenev. Production of pure aqueous  $^{13}\text{C}$ -hyperpolarized acetate by heterogeneous parahydrogen-induced polarization. *Chemistry A European Journal*, 22(46):16446–16449, 2016.
- [48] K. Tokmic, R.B. Greer, L. Zhu, and A.R. Fout.  $^{13}\text{C}$  NMR signal enhancement using parahydrogen-induced polarization mediated by a cobalt hydrogenation catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 140(44):14844–14850, 2018.
- [49] S.B. Duckett and D. Blazina. The study of inorganic systems by NMR spectroscopy in conjunction with parahydrogen-induced polarisation. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2003(16):2901–2912, 2003.
- [50] K.D. Atkinson, M.J. Cowley, S.B. Duckett, P.I.P. Elliott, G.G.R. Green, J. López-Serrano, I.G. Khazal, and A.C. Whitwood. Para-hydrogen induced polarization without incorporation of para-hydrogen into the analyte. *Inorganic Chemistry*, 48(2):663–670, 2009.
- [51] J. Eills, W. Hale, M. Sharma, M. Rossetto, M.H. Levitt, and M. Utz. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy with picomole sensitivity by hyperpolarization on a chip. *Journal of the American Chemical Society*, 141(25):9955–9963, 2019.
- [52] M. Suefke, S. Lehmkuhl, A. Liebisch, B. Blümich, and S. Appelt. Para-hydrogen raser delivers sub-millihertz resolution in nuclear magnetic resonance. *Nature Physics*, 13(6):568–572, June 2017.
- [53] N.M. Ariyasingha, O.G. Salnikov, K.V. Kovtunov, L.M. Kovtunova, V.I. Bukhtiyarov, B.M. Goodson, M.S. Rosen, I.V. Koptuyug, J.G. Gelovani, and E.Y. Chekmenev. Relaxation dynamics of nuclear long-lived spin states in propane and propane-d6 hyperpolarized by parahydrogen. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(18):11734–11744, 2019.
- [54] D.A. Barskiy, O.G. Salnikov, A.S. Romanov, M.A. Feldman, A.M. Coffey, K.V. Kovtunov, I.V. Koptuyug, and E.Y. Chekmenev. NMR Spin-Lock Induced Crossing (SLIC) dispersion and long-lived spin states of gaseous propane at low magnetic field (0.05 T). *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 276:78–85, March 2017.
- [55] M.B. Franzoni, L. Buljubasich, H.W. Spiess, and K. Münnemann. Long-lived  $^1\text{H}$  singlet spin states originating from para-hydrogen in cs-symmetric molecules stored for minutes in high magnetic fields. *Journal of the American Chemical Society*, 134(25):10393–10396, 2012.
- [56] M. S. Anwar, L. Xiao, A. J. Short, J. A. Jones, D. Blazina, S. B. Duckett, and H. A. Carteret. Practical implementations of twirl operations. *Phys. Rev. A*, 71:032327, Mar 2005.

- [57] M. S. Anwar, D. Blazina, H. A. Carteret, S. B. Duckett, T. K. Halstead, J. A. Jones, C. M. Kozak, and R. J. K. Taylor. Preparing high purity initial states for nuclear magnetic resonance quantum computing. Phys. Rev. Lett., 93:040501, Jul 2004.
- [58] M. S. Anwar. NMR quantum information processing with para-hydrogen. arXiv: Quantum Physics, 2005.
- [59] R.A. Green, R.W. Adams, S.B. Duckett, R.E. Mewis, D.C. Williamson, and G.G.R. Green. The theory and practice of hyperpolarization in magnetic resonance using parahydrogen. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 67:1–48, 2012.
- [60] A. Messiah. Quantum Mechanics. Dover Publications, 2014.
- [61] L. Pauling. Introduction to quantum mechanics : with applications to chemistry. Dover Publications, New York, N.Y, 1985.
- [62] C.R. Bowers. Sensitivity Enhancement Utilizing Parahydrogen. American Cancer Society, 2007.
- [63] M. Toda. Statistical Physics I : Equilibrium Statistical Mechanics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1992.
- [64] I.F. Silvera. The solid molecular hydrogens in the condensed phase: Fundamentals and static properties. Rev. Mod. Phys., 52:393–452, Apr 1980.
- [65] P. W. Atkins. Atkins' Physical chemistry. Oxford University Press, Oxford New York, 2006.
- [66] V.A. Farkas. Orthohydrogen, Parahydrogen and Heavy Hydrogen. 1935.
- [67] R.R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. Oxford University Press, 1987.
- [68] Malcolm H. Levitt. Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance. Wiley, 2 edition, 2008.
- [69] O.W. Sørensen, G.W. Eich, M.H. Levitt, G. Bodenhausen, and R.R. Ernst. Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 16:163–192, 1984.
- [70] A. Abragam. Principles of Nuclear Magnetism. Oxford University Press, USA, October 1983.
- [71] M. Goldman. Quantum description of high-resolution NMR in liquids. Clarendon Press Oxford University Press, Oxford New York, 1988.
- [72] D.M. Dennison. A note on the specific heat of the hydrogen molecule. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 115(771):483–486, 1927.

- [73] K.F. Bonhoeffer and P. Harteck. Experimente über para- und orthowasserstoff. Die Naturwissenschaften, 17(11):182–182, March 1929.
- [74] I. Prina. Espectroscopía de alta resolución utilizando hiperpolarización con parahidrógeno. PhD thesis, Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación. Universidad Nacional de Córdoba, March 2007.
- [75] S. Bouguet-Bonnet, F. Reineri, and D. Canet. Effect of the static magnetic field strength on parahydrogen induced polarization NMR spectra. The Journal of Chemical Physics, 130(23):234507, 2009.
- [76] K. Miesel, K.L. Ivanov, T. Köchling, A.V. Yurkovskaya, and H.M. Vieth. Field-cycling effects on dynamic nuclear polarization. Applied Magnetic Resonance, 34(3-4):423–437, 2008.
- [77] L. Kuhn. Hyperpolarization methods in NMR spectroscopy. Springer, Berlin, 2013.
- [78] J.F. Dechent, L. Buljubasich, L.M. Schreiber, H.W. Spiess, and K. Münnemann. Proton magnetic resonance imaging with para-hydrogen induced polarization. Phys. Chem. Chem. Phys., 14:2346–2352, 2012.
- [79] F. Reineri, A. Viale, G. Giovenzana, D. Santelia, W. Dastrú, R. Gobetto, and S. Aime. New hyperpolarized contrast agents for  $^{13}\text{C}$ -MRI from parahydrogenation of oligoocyethyleneic alkynes. Journal of the American Chemical Society, 130(45):15047–15053, November 2008.
- [80] J.B. Hövener, E.Y. Chekmenev, K.C. Harris, W.H. Perman, L.W. Robertson, B.D. Ross, and P. Bhattacharya. PASADENA hyperpolarization of  $^{13}\text{C}$  biomolecules: equipment design and installation. Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine, 22(2):111–121, December 2008.
- [81] R.V. Shchepin, A.M. Coffey, K.W. Waddell, and E.Y. Chekmenev. Parahydrogen-induced polarization with a Rh-based monodentate ligand in water. The Journal of Physical Chemistry Letters, 3(22):3281–3285, 2012. PMID: 23227297.
- [82] L.S. Bouchard, S.R. Burt, M.S. Anwar, K.V. Kovtunov, I.V. Koptuyug, and A. Pines. NMR imaging of catalytic hydrogenation in microreactors with the use of parahydrogen. Science, 319(5862):442–445, 2008.
- [83] I.V. Koptuyug, K.V. Kovtunov, S.R. Burt, M.S. Anwar, C. Hilty, S. Han, A. Pines, and R.Z. Sagdeev. Para-hydrogen-induced polarization in heterogeneous hydrogenation reactions. Journal of the American Chemical Society, 129(17):5580–5586, 2007. PMID: 17408268.
- [84] D.A. Barskiy, K.V. Kovtunov, E.Y. Gerasimov, M.A. Phipps, O.G. Salnikov, A.M. Coffey, L.M. Kovtunova, I.P. Prosvirin, V.I. Bukhtiyarov, I.V. Koptuyug, and E.Y. Chekmenev. 2D mapping of NMR signal enhancement and relaxation for heterogeneously hyperpolarized propane gas. The Journal of Physical Chemistry C, 121(18):10038–10046, 2017.

- [85] O. Salnikov, D. Barskiy, A. Coffey, K. Kovtunov, I. Koptuyug, and E. Chekmenev. Efficient batch-mode parahydrogen-induced polarization of propane. ChemPhysChem, 17, 07 2016.
- [86] K. Kovtunov, M. Truong, D. Barskiy, O. Salnikov, V. Bukhtiyarov, A. Coffey, K. Waddell, I. Koptuyug, and E. Chekmenev. Propane-d6 heterogeneously hyperpolarized by parahydrogen. The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces, 118:28234–28243, 12 2014.
- [87] J. A. Osborn, F. H. Jardine, J. F. Young, and G. Wilkinson. The preparation and properties of tris(triphenylphosphine)halogenorhodium(I) and some reactions thereof including catalytic homogeneous hydrogenation of olefins and acetylenes and their derivatives. J. Chem. Soc. A, pages 1711–1732, 1966.
- [88] H.Y. Carr and E.M. Purcell. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. Physical Review, 94(3):630–638, 1954.
- [89] S. Meiboom and D. Gill. Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. Review of Scientific Instruments, 29:688–691, August 1958.
- [90] M. Schneider, L. Gasper, D. E. Demco, and B. Blümich. Residual dipolar couplings by  $^1\text{H}$  dipolar-encoded longitudinal magnetization, double- and triple-quantum nuclear magnetic resonance in cross-linked elastomers. The Journal of Chemical Physics, 111(1):402–415, July 1999.
- [91] L. Buljubasich, B. Blümich, and S. Stapf. Reaction monitoring of hydrogen peroxide decomposition by NMR relaxometry. Chemical Engineering Science, 65(4):1394–1399, February 2010.
- [92] L. Buljubasich, B. Blümich, and S. Stapf. Quantification of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations in aqueous solutions by means of combined NMR and pH measurements. Physical Chemistry Chemical Physics, 12(40):13166, 2010.
- [93] J.P. Carver and R.E Richards. A general two-site solution for the chemical exchange produced dependence of  $T_2$  upon the Carr-Purcell pulse separation. Journal of Magnetic Resonance (1969), 6(1):89–105, January 1972.
- [94] W.T. Sobol. A complete solution to the model describing Carr-Purcell and Carr-Purcell-Meiboom-Gill experiments in a two-site exchange system. Magnetic Resonance in Medicine, 21(1):2–9, September 1991.
- [95] D.E. Woessner. Relaxation Effects of Chemical Exchange. In Robin K. Harris, editor, Encyclopedia of Magnetic Resonance. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, March 2007. DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm0454.
- [96] A.L. Hansen, P. Lundström, A. Velyvis, and L.E. Kay. Quantifying Millisecond Exchange Dynamics in Proteins by CPMG Relaxation Dispersion NMR Using Side-Chain  $^1\text{H}$  Probes. Journal of the American Chemical Society, 134(6):3178–3189, February 2012.

- [97] G.R. Coates. NMR logging: principles and applications. Halliburton Energy Services, Houston, 2000. OCLC: 840365785.
- [98] P.T. Callaghan. Translational dynamics and magnetic resonance principles of pulsed gradient spin echo NMR. Oxford University Press, Oxford ; New York, 2011. OCLC: ocn701807843.
- [99] J. Hennig, A. Nauerth, and H. Friedburg. RARE imaging: A fast imaging method for clinical MR. Magnetic Resonance in Medicine, 3(6):823–833, December 1986.
- [100] A. Amar, B. Blümich, and F. Casanova. Rapid Multiphase Flow Dynamics Mapped by Single-Shot MRI Velocimetry. ChemPhysChem, 11(12):2630–2638, August 2010.
- [101] D.G. Rata, F. Casanova, J. Perlo, D.E. Demco, and B. Blümich. Self-diffusion measurements by a mobile single-sided NMR sensor with improved magnetic field gradient. Journal of Magnetic Resonance, 180(2):229–235, June 2006.
- [102] T. Tokuhiro and G. Fraenkel. Modulation of spin echoes in multi-half-spin systems. I. closed formulas of carr-purcell spin echoes in several  $A_nBX_x$  systems. The Journal of Chemical Physics, 49(9):3998–4008, November 1968.
- [103] R.L Vold and R.R Vold. Spin-echo measurements of long-range coupling constants in some simple esters. Journal of Magnetic Resonance (1969), 13(1):38–44, January 1974.
- [104] L. Buljubasich, I. Prina, M.B. Franzoni, and R.H. Acosta. Discrimination of parahydrogen induced polarization signals with J-spectra acquisition in poorly hyperpolarized samples. Microporous and Mesoporous Materials, 1016.
- [105] D. Graafen, S. Ebert, O. Neudert, L. Buljubasich, M.B. Franzoni, J.F. Dechent, and K. Münnemann.  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy and MR Imaging with Hyperpolarised Substances. In Annual Reports on NMR Spectroscopy, volume 82, pages 167–215. Elsevier, 2014.
- [106] R.H. Acosta, I. Prina, and L. Buljubasich. Chapter 9. High-resolution Spectra in PHIP. In Karol Jackowski and Michal Jaszunski, editors, New Developments in NMR, pages 304–335. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- [107] A.J. Shaka, S.P. Rucker, and A. Pines. Iterative Carr-Purcell trains. Journal of Magnetic Resonance (1969), 77(3):606–611, May 1988.
- [108] T. Gullion, D.B. Baker, and M.S. Conradi. New, compensated Carr-Purcell sequences. Journal of Magnetic Resonance (1969), 89(3):479–484, October 1990.
- [109] M. B. Franzoni, R. H. Acosta, H. M. Pastawski, and P. R. Levstein. Storage of quantum coherences as phase-labelled local polarization in solid-state nuclear magnetic resonance. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 370(1976):4713–4733, October 2012.

- [110] J. Keeler. Understanding NMR Spectroscopy, volume 2. Wiley, New York, 2005.
- [111] J. Natterer and J. Bargon. Parahydrogen induced polarization. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 31(4):293–315, November 1997.
- [112] L. Buljubasich, M.B. Franzoni, and K. Münnemann. Parahydrogen induced polarization by homogeneous catalysis: theory and applications. Top. Curr. Chem., 338:33–74, 2013.
- [113] K. Saalwächter, B. Herrero, and M.A. López-Manchado. Chemical Shift-Related Artifacts in NMR Determinations of Proton Residual Dipolar Couplings in Elastomers. Macromolecules, 38(9):4040–4042, May 2005.
- [114] K.F. Morris and Jr. Johnson, C.S. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of the American Chemical Society, 114(8):3139–3141, 1992.
- [115] C.S. Johnson Jr. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: Principles and applications. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 34(3-4):203–256, 1999.
- [116] Y. Cohen, L. Avram, and L. Frish. Diffusion NMR spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: An old parameter - New insights. Angewandte Chemie - International Edition, 44(4):520–554, 2005.
- [117] J.S. Gounarides, A. Chen, and M.J. Shapiro. Nuclear magnetic resonance chromatography: Applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interactions. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 725(1):79–90, 1999.
- [118] W.S. Price. NMR studies of translational motion. 2009.
- [119] L. Fielding. Determination of association constants ( $K(a)$ ) from solution NMR data. Tetrahedron, 56(34):6151–6170, 2000.
- [120] D. Li, I. Keresztes, R. Hopson, and P.G. Williard. Characterization of reactive intermediates by multinuclear diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY). Accounts of Chemical Research, 42(2):270–280, 2009.
- [121] A. Becht, C. Schollmayer, J. Wiest, D. Heller, W. Baumann, H. Buschmann, and U. Holzgrabe. Diffusion ordered NMR spectroscopy measurements as screening method of potential reactions of API and excipients in drug formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 162:41 – 46, 2019.
- [122] M.G.S. Vieira, N.V. Gramosa, N.M.P.S. Ricardo, G.A. Morris, R.W. Adams, and M. Nilsson. Natural product mixture analysis by matrix-assisted DOSY using Brij surfactants in mixed solvents. RSC Adv., 4:42029–42034, 2014.

- [123] J.S. Kavakka, V. Parviainen, K. Wähälä, I. Kilpeläinen, and S. Heikkinen. Enhanced chromatographic NMR with polyethyleneglycol. A novel resolving agent for diffusion ordered spectroscopy. Magnetic Resonance in Chemistry, 48(10):777–781, 2010.
- [124] O. Söderman and P. Stilbs. NMR studies of complex surfactant systems. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 26(5):445–482, 1994.
- [125] T.D.A. Senra, A. Khoukh, and J. Desbrières. Interactions between quaternized chitosan and surfactant studied by diffusion NMR and conductivity. Carbohydrate Polymers, 156:182 – 192, 2017.
- [126] X. Liu, Q. Yu, A. Song, S. Dong, and J. Hao. Progress in nuclear magnetic resonance studies of surfactant systems. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 45:14–27, 2020.
- [127] E.R. McCarney, R. Dykstra, and P. Galvosas. Evaluation of benchtop NMR diffusion ordered spectroscopy for small molecule mixture analysis. Magnetic Resonance Imaging, 56:103 – 109, 2019. Porous Media.
- [128] A. Le Gresley, E. Simpson, A.J. Sinclair, N. Williams, G.R. Burnett, D.J. Bradshaw, and R.A. Lucas. The application of high resolution diffusion NMR for the characterisation and quantification of small molecules in saliva/dentifrice slurries. Anal. Methods, 7:2323–2332, 2015.
- [129] S. Caldarelli. Chromatographic NMR: a tool for the analysis of mixtures of small molecules. Magnetic Resonance in Chemistry, 45(S1):S48–S55, 2007.
- [130] R. Neufeld and D. Stalke. Accurate molecular weight determination of small molecules via DOSY-NMR by using external calibration curves with normalized diffusion coefficients. Chem. Sci., 6:3354–3364, 2015.
- [131] G. Assemat, B. Gouilleux, D. Bouillaud, J. Farjon, V. Gilard, P. Giraudeau, and M. Malet-Martino. Diffusion-ordered spectroscopy on a benchtop spectrometer for drug analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 160:268 – 275, 2018.
- [132] V. Gilard, S. Balayssac, M. Malet-Martino, and R. Martino. Quality control of herbal medicines assessed by NMR. Current Pharmaceutical Analysis, 6:234–245, 11 2010.
- [133] S. Trefi, C. Routaboul, S. Hamieh, V. Gilard, M. Malet-Martino, and R. Martino. Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis) by  $^1\text{H}$  NMR, 2D DOSY  $^1\text{H}$  NMR and Raman spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 47(1):103 – 113, 2008.
- [134] R. Evans and I.J. Day. Matrix-assisted diffusion-ordered spectroscopy. RSC Advances, 6(52):47010–47022, 2016.

- [135] I.J. Day. Matrix-assisted dosy. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 116:1–18, 2020.
- [136] K. Zangger. Pure shift NMR. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 86-87:1–20, 2015.
- [137] M. Foroozandeh, L. Castañar, L.G. Martins, D. Sinnaeve, G.D. Poggetto, C.F. Tormenta, R.W. Adams, G.A. Morris, and M. Nilsson. Ultrahigh-resolution diffusion-ordered spectroscopy. Angewandte Chemie - International Edition, 55(50):15579–15582, 2016.
- [138] C. Li, H. Zhan, J. Yan, M. Hao, E. Lin, Y. Huang, and Z. Chen. A pure shift and spin echo based approach for high-resolution diffusion-ordered NMR spectroscopy. Journal of Magnetic Resonance, 305:209–218, 2019.
- [139] A. Le Gresley, G. Broadberry, C. Robertson, J.-M.R. Peron, J. Robinson, and S. O’Leary. Application of pure shift and diffusion NMR for the characterisation of crude and processed pyrolysis oil. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 140:281–289, 2019.
- [140] R.W. Adams, J.A. Aguilar, K.D. Atkinson, M.J. Cowley, P.I.P. Elliott, S.B. Duckett, G.G.R. Green, I.G. Khazal, J. López-Serrano, and D.C. Williamson. Reversible interactions with para-hydrogen enhance NMR sensitivity by polarization transfer. Science, 323(5922):1708–1711, 2009.
- [141] D. A. Barskiy, A. N. Pravdivtsev, K. L. Ivanov, K. V. Kovtunov, and I. V. Koptug. A simple analytical model for signal amplification by reversible exchange (SABRE) process. Physical Chemistry Chemical Physics, 18(1):89–93, 2016.
- [142] I. Reile, R.L.E.G. Aspers, J.M. Tyburn, J.G. Kempf, M.C. Feiters, F.P.J.T. Rutjes, and M. Tessari. DOSY analysis of micromolar analytes: Resolving dilute mixtures by SABRE hyperpolarization. Angewandte Chemie International Edition, 56(31):9174–9177, 2017.
- [143] L. Guduff, P. Berthault, C. van Heijenoort, J.N. Dumez, and G. Huber. Single-scan diffusion-ordered NMR spectroscopy of SABRE-hyperpolarized mixtures. ChemPhysChem, 20(3):392–398, 2019.
- [144] S. Ahola, V.V. Zhivonitko, O. Mankinen, G. Zhang, A.M. Kantola, H.Y. Chen, C. Hilty, I.V. Koptug, and V.V. Telkki. Ultrafast multidimensional laplace NMR for a rapid and sensitive chemical analysis. Nat Commun, 6(1):8363, 2015.
- [145] V. Daniele, F.X. Legrand, P. Berthault, J.N. Dumez, and G. Huber. Single-scan multidimensional NMR analysis of mixtures at sub-millimolar concentrations by using SABRE hyperpolarization. ChemPhysChem, 16(16):3413–3417, 2015.

- [146] A.S. Kiryutin, G. Sauer, D. Tietze, M. Brodrecht, S. Knecht, A.V. Yurkovskaya, K.L. Ivanov, O. Avrutina, H. Kolmar, and G. Buntkowsky. Ultrafast single-scan 2D NMR spectroscopic detection of a PHIP-hyperpolarized protease inhibitor. Chemistry A European Journal, 25(16):4025–4030, 2019.
- [147] A.M. Coffey, R.V. Shchepin, M.L. Truong, K. Wilkens, W. Pham, and E.Y. Chekmenev. Open-source automated parahydrogen hyperpolarizer for molecular imaging using  $^{13}\text{C}$  metabolic contrast agents. Analytical Chemistry, 88(16):8279–8288, 2016. PMID: 27478927.
- [148] B. Joalland, N.M. Ariyasingha, S. Lehmkuhl, T. Theis, S. Appelt, and E.Y. Chekmenev. Parahydrogen-induced radio amplification by stimulated emission of radiation. Angewandte Chemie International Edition, 59(22):8654–8660, 2020.
- [149] L. Bordonali, N. Nordin, E. Fuhrer, N. MacKinnon, and J.G. Korvink. Parahydrogen based NMR hyperpolarisation goes micro: an alveolus for small molecule chemosensing. Lab Chip, 19:503–512, 2019.
- [150] M. Braun, S. Häseli, F. Rösch, M. Piel, and K. Münnemann. NMR hyperpolarization of established PET tracers. ChemistrySelect, 3(18):5176–5184, 2018.
- [151] N. Bloembergen, E. M. Purcell, and R. V. Pound. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. Phys. Rev., 73:679–712, Apr 1948.
- [152] E. L. Hahn. Spin echoes. Phys. Rev., 80:580–594, Nov 1950.
- [153] E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. The Journal of Chemical Physics, 42(1):288–292, 1965.
- [154] A. Friebel, E. Von Harbou, K. Münnemann, and H. Hasse. Reaction monitoring by benchtop NMR spectroscopy using a novel stationary flow reactor setup. Industrial and Engineering Chemistry Research, 58(39):18125–18133, 2019.
- [155] L. Buljubasich, B. Blümich, and S. Stapf. Monitoring mass transport in heterogeneously catalyzed reactions by field-gradient NMR for assessing reaction efficiency in a single pellet. Journal of Magnetic Resonance, 212(1):47–54, September 2011.
- [156] K. Münnemann, M. Kölzer, I. Blakey, A.K. Whittaker, and K.J. Thurecht. Hyperbranched polymers for molecular imaging: designing polymers for parahydrogen induced polarisation (PHIP). Chem. Commun., 48:1583–1585, 2012.
- [157] J. Bargon, J. Kandels, and P. Kating. Nuclear magnetic resonance studies of homogeneous catalysis using parahydrogen: Analysis of nuclear singlet-triplet mixing as a diagnostic tool to characterize intermediates. The Journal of Chemical Physics, 98:6150, 1993.

- [158] P. Berthault, C. Boutin, C. Martineau-Corcos, and G. Carret. Use of dissolved hyperpolarized species in NMR: Practical considerations. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 118-119:74–90, June 2020.
- [159] J.A. Aguilar, P.I.P. Elliott, J. López-Serrano, R.W. Adams, and S.B. Duckett. Only Para-hydrogen Spectroscopy (OPSY), a technique for the selective observation of para-hydrogen enhanced NMR signals. Chemical Communications, (11):1183, 2007.
- [160] J.A. Aguilar, R.W. Adams, S.B. Duckett, G.G.R. Green, and R. Kandiah. Selective detection of hyperpolarized NMR signals derived from para-hydrogen using the Only Para-hydrogen Spectroscopy (OPSY) approach. Journal of Magnetic Resonance, 208(1):49–57, January 2011.
- [161] S. Bussandri, I. Prina, R.H. Acosta, and L. Buljubasich. Optimized phases for the acquisition of J -spectra in coupled spin systems for thermally and PHIP polarized molecules. Journal of Magnetic Resonance, 289:55–62, April 2018.
- [162] D. Canet. Radiofrequency field gradient experiments. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 30(1-2):101–135, March 1997.
- [163] A.N. Pravdivtsev, F. Sönnichsen, and J.B. Hövener. OnlyParahydrogen Spectroscopy OPSY pulse sequences one does not fit all. Journal of Magnetic Resonance, October 2018.
- [164] D. Moskau. Application of real time digital filters in NMR spectroscopy. Concepts in Magnetic Resonance, 15(2):164–176, June 2002.
- [165] D.I. Hoult and R.E. Richards. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. Journal of Magnetic Resonance (1969), 24(1):71 – 85, 1976.
- [166] A. Haase, F. Odoj, M. Von Kienlin, J. Warnking, F. Fidler, A. Weisser, M. Nittka, E. Rommel, T. Lanz, B. Kalusche, and M. Griswold. NMR probeheads for in vivo applications. Concepts in Magnetic Resonance, 12(6):361–388, 2000.
- [167] J. Mispelter, M. Lupu, and A. Briguet. NMR Probeheads for Biophysical and Biomedical Experiments: Theoretical Principles and Practical Guidelines. IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2 edition, July 2015.