

*Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos
Departamento de Física e Informática*

**TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA
LOCALIZADA *IN VIVO***

Bernd Uwe Foerster

02



Tese apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de doutor
em Ciências: Física aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci

**São Carlos
1999**

Foerster, Bernd Uwe

Técnicas de espectroscopia localizada *in vivo*/Bernd Uwe Foerster.--São Carlos, 1998.
130 p.

Tese (Doutorado)--Instituto de Física de
São Carlos, 1998.

Orientador: Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci

1. Ressonância magnética. 2. Espectroscopia
localizada.

I. Título.



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE BERND UWE FOERSTER APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 25 DE MARÇO DE 1999.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci/IFSC-USP

Prof. Dr. José Pedro Donoso Gonzalez/IFSC-USP

Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho/FFCLRP-USP

Prof. Dr. Alberto Passos Guimarães/CBPF-RJ

Dr. Luiz Alberto Coinago/EMBRAPA

Die Unsterblichen

Immer wieder aus der Erde Tälern
Dampft zu uns empor des Lebens Drang,
Wilde Not, berauschter Überschwang,
Blutiger Rauch von tausend Henkersmälern,
Krampf der Lust, Begierde ohne Ende,
Mörderhände, Wuchererhände, Beterhände,
Angst- und lustgepeitschter Menschenschwarm
Dunstet schwül und faulig, roh und warm,
Atmet Seligkeit und wilde Brünste
Frisst sich selbst und speit sich wieder aus,
Brütet Kriege aus und holde Künste,
Schmückt mit Wahn das brennende Freudenhaus,
Schlingt und zerrt und hurt sich durch die grellen
Jahrmarktsfreuden ihrer Kinderwelt,
Hebt für jeden neu sich aus den Wellen,
Wie sie jedem einst zu Kot zerfällt.

Wir dagegen haben uns gefunden
In des Äthers sterndurchglänzttem Eis,
Kennen keine Tage, keine Stunden,
Sind nicht Mann noch Weib, nicht jung noch Greis.
Eure Sünden, sind eure Ängste,
Euer Mord und eure geilen Wonnen
Schauspiel uns gleichwie die kreisenden Sonnen,
Jeder einzige Tag ist uns der längste.
*Still zu eurem zuckenden Leben nickend,
Still in die sich drehenden Sterne blickend
Atmen wir des Weltraums Winter ein,
Sind befreundet mit dem Himmelsdrachen,
Kühl und wandellos ist unser ewiges Sein,
Kühl und sternenhell unser ewiges Lachen.

Aus : "Der Steppenwolf"
(Hermann Hesse)

Os Imortais

Dos vales terrenos
chega até nós o anseio da vida:
impulso desordenado, ébria exuberância,
sangrento aroma de repastos fúnebres.
São espasmos de gôzo, ambições sem termo,
mãos de assassinos, de usurários, de santos,
o enxame humano fustigado pela angústia e o prazer.
Lança vapôres asfixiantes e pútridos, crus e cálidos,
respira beatitude e ânsia insopitada,
devora-se a si mesmo para depois se vomitar.
Maquina a guerra e faz surgir as artes puras,
adorna de ilusões a casa do pecado
arrasta-se, consome-se, prostitui-se todo
nas alegrias de seu mundo infantil;
ergue-se em ondas ao encalço de qualquer novidade
Para de nôvo retombar na lama.

Já nós vivemos
no gêlo etéreo transluminado de estrêlas;
não conhecemos os dias nem as horas,
Não temos sexos nem idades.
Vossos pecados e angústias,
vossos crimes e lascivos gozos, são para nós
um espetáculo como o girar dos sóis.
Cada dia é para nós o mais longo.
Debruçados tranqüilos sôbre vossas vidas,
contemplamos serenos as estrêlas que giram,
respiramos o inverno do mundo sideral;
somos amigos do dragão celeste:
fria e imutável é nossa eterna essência,
Frígido e astral o nosso eterno riso.

de : "O lobo da estepe"
(Trad. : Ivo Barroso)

Dedico este trabalho a todos os meus amigos na cidade de São Carlos.

Agradecimentos

Embora seja difícil expressar a minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na efetivação deste trabalho, deixo aqui os meus agradecimentos :

ao meu orientador Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci, pelo incentivo, orientação dispensada, pela paciência e seu constante apoio;

ao Prof. Dr. Alberto Tannús, pelo incentivo, discussões e a grande ajuda que foi indispensável na elaboração deste trabalho;

aos Prof. Dr. Tito José Bonagamba e Claudio José Magon, pelo apoio e valiosas discussões;

aos meus colegas Eduardo Ribeiro de Azevedo, Maria do Rosário, Dardo Gustavo Tomasi, Elizabeth Caparelli, Rodrigo Villares Portugal, Henrique Jota de Paula Freire, Kleber Pinheiro Naccarato, Antônio José Gatti Conde e Bráulio Tavares Muniz, pela intensa colaboração e a experiência de trabalho em equipe;

aos nossos engenheiros e técnicos no grupo de RMN, Edson L.G. Vidoto, Mateus J. Martins, João Gomes da Silva Filho, Odir Adolfo Canevarallo e José Carlos Gazziro, pela grande colaboração e pela ajuda nos problemas instrumentais;

às nossas secretarias Leila Maria Lamon e Isabel Aparecida Possatto, pelo seu valioso e sempre atencioso trabalho;

ao IFSC, FAPESP, CAPES, CNPq, FINEP e PADCT por ter proporcionado os subsídios necessários à concretização deste trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram e que por um lapso de memória esqueci mencionar.

Lista de Figuras

Figura I.1	- Pulso de RF seletivo tipo sinc truncado	10
Figura I.2	- Espectro típico de ^1H	17
Figura I.3	- A molécula ATP	19
Figura I.4	- Espectro típico de ^{31}P	20
Figura I.5	- Espectro típico de ^{13}C	21
Figura II.1	- Sequência PRESS	24
Figura II.2	- Supressão de água com CHESSE	26
Figura II.3	- <i>Outer volume supression</i>	28
Figura II.4	- Sequência STEAM	31
Figura II.5	- Sequência STEAM otimizada	32
Figura II.6	- Desacoplamento	34
Figura II.7	- Sequência ISIS unidimensional	35
Figura II.8	- Sequência ISIS tridimensional	36
Figura II.9	- Artefato de localização	39
Figura II.10	- Sequência CSI 2D sem refocalização	40
Figura II.11	- Sequência CSI 2D com refocalização	41
Figura II.12	- Sequência CSI 1D com refocalização	42
Figura II.13	- Sequência híbrida combinando PRESS e CSI	43
Figura III.1	- Perfil do campo de bobinas de superfície	46
Figura III.2	- Sistema girante de coordenadas	48
Figura III.3	- Funções de modulação sen/cos e tanh/sech	49
Figura III.4	- Funções de modulação NOM	50
Figura III.5	- Funções de modulação de pulsos compostos	51
Figura III.6	- Perfil da magnetização para GMAX unidimensional	53
Figura III.7	- Sequência GMAX 3D	54
Figura III.8	- Representação de uma amostra cúbica	55
Figura III.9	- Distribuição espacial da magnetização para GMAX	56
Figura III.10	- Sequência GMAX para tomografia	58
Figura III.11	- Imagem adquirida com GMAX	59
Figura III.12	- Imagens do perfil selecionado com GMAX	60
Figura IV.1	- Espectro ^1H de glicose sem ecc	63
Figura IV.2	- Espectro de referencia para ecc	63
Figura IV.3	- Espectro ^1H de glicose com ecc	64
Figura IV.4	- Espectro ^{13}C de glicose	65
Figura IV.5	- Configuração do β -isômero de glicose	65
Figura IV.6	- Espectro ^{13}C de músculo e de glicose	66
Figura IV.7	- Experimento de CSI de músculo esquelético	69
Figura IV.8	- Experimento de STEAM de músculo esquelético	70
Figura IV.9	- Espectro C^{13} não localizado de um tumor de próstata	71

Figura IV.10	- Experimento de CSI de óleo vegetal	74
Figura IV.11	- Experimento de CSI em um voluntário humano	77
Figura IV.12	- Espectro de óleo vegetal sem desacoplamento	78
Figura IV.13	- Espectro de óleo vegetal com desacoplamento	79
Figura IV.14	- Espectro da panturrilha com desacoplamento	80
Figura V.1	- Espectro de água localizado com PRESS	84
Figura V.2	- Imagens de uma amostra com CuSO_4 e óleo vegetal	84
Figura V.3	- Espectros localizados com PRESS	85
Figura V.4	- Espectros localizados com STEAM	87
Figura VI.1	- Caixa de ajustes do sistema de gradientes	91
Figura VI.2	- Instabilidade do amplificador de corrente	94
Figura VI.3	- Atenuador para reduzir o ganho	96
Figura VI.4	- Forma dos gradientes do canal z	98
Figura VI.5	- Forma dos gradientes do canal y	99
Figura VI.6	- Forma dos gradientes do canal x	100
Figura VI.7	- Forma dos gradientes do canal x após correção	101
Figura VI.8	- Sequência para ecc	102
Figura VI.9	- Ajuste da blindagem dos gradientes	103
Figura VI.10	- Ajuste da pré-ênfase na direção X	105
Figura VI.11	- Ajuste da pré-ênfase na direção Y	106
Figura VI.12	- Ajuste da pré-ênfase na direção Z	107
Figura VI.13	- Sonda de deutério	109
Figura VI.14	- Microimagem adquirida com <i>Spin Echo</i>	110
Figura VI.15	- Microimagem adquirida com FLASH	111
Figura VI.16	- Imagem para teste de localização com PRESS	111
Figura VI.17	- Imagens localizadoras	112
Figura VI.18	- Espectros não localizados e localizados com PRESS	113

Lista de Tabelas

Tabela I.1	-	Caraterísticas de núcleos comumente utilizados	14
Tabela I.2	-	Caraterísticas de outros núcleos	15
Tabela I.3	-	Deslocamento químico δ e tempos de relaxação	15
Tabela I.4	-	Deslocamento químico em ^1H	18
Tabela I.5	-	Deslocamento químico em ^{31}P	20
Tabela I.6	-	Deslocamento químico em ^{13}C	22
Tabela II.1	-	Esquema de adição/subtração para ISIS	36
Tabela III.1	-	Esquema de adição/subtração para GMAX 3D	57
Tabela IV.1	-	Tempos de relaxação de glicose	67
Tabela IV.2	-	Tempos de relaxação de músculo esquelético	67
Tabela IV.3	-	Identificação de picos da figura IV.13	79
Tabela VI.1	-	Variáveis de calibração dos gradientes	90
Tabela VI.2	-	Valores das resistências na caixa de ajustes	92
Tabela VI.3	-	Parâmetros elétricos do sistema de gradientes	92
Tabela VI.4	-	Constantes de tempo disponíveis para ecc	93

Lista de Abreviações

ADP	-	Adenosina-5'-Difosfato
AM	-	Amplitude Modulation
ATP	-	Adenosina-5'-Trifosfato (^3P metabólito)
CHESS	-	Chemical-Shift Selective Excitation
CSI	-	Chemical Shift Imaging
CW	-	Continous Wave
Cho	-	Colina (^1H metabólito)
Cr	-	Creatina (^1H metabólito)
DRESS	-	Depth Resolved Surface-Coil Spectroscopy
FID	-	Free Induction Decay
FM	-	Frequency Modulation
FOV	-	Field of View
GMAX	-	Gradient Modulated Adiabatic Excitation
IR	-	Inversão Recuperação
ISIS	-	Image Selected in vivo Spectroscopy
Ins	-	Inositol (^1H metabolito)
Lac	-	Lactato (^1H metabólito)
MRI	-	Magnetic Resonance Imaging
MRS	-	Magnetic Resonance Spectroscopy
NAA	-	N-Acetil Aspartato (^1H metabólito)
NOE	-	Nuclear Overhouser Effect
NOM	-	Numerically Optimized Modulation
NTP	-	Nucleotídeo-Trifosfato (^3P metabólito)
OVS	-	Outer Volume Supression (Prematuração espacial)
PCr	-	Fosfo Creatina ($^1\text{H}/^3\text{P}$ metabólito)
PDE	-	Fósforodiester (^3P metabólito)
PME	-	Fósforomonoester (^3P metabólito)
PRESS	-	Point Resolved Spectroscopy
Pi	-	Fosfato inorgânico (^3P metabólito)
RF	-	Radiofrequência
ROI	-	Region of Interest
SAR	-	Specific Absorption Rate
SEMS	-	Spin Echo Multislice
SI	-	Spectroscopic Imaging
SPACE	-	Spatially and Chemical-shift Encoded Excitation
STEAM	-	Stimulated Acquisition Mode
SPARSE	-	Spatially Resolved Spectroscopy
TE	-	Tempo ao eco
THK	-	Espessura de fatia (Thickness)
TM	-	Tempo de mistura (Mixing time)
TMR	-	Topical Magnetic Resonance
TMS	-	Tetrametilsilano, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$
TR	-	Tempo de repeticao
Tau	-	Taurina (^1H metabólito)
VOI	-	Volume of Interest
VSE	-	Volume Selective Excitation

Resumo

No presente trabalho várias técnicas de espectroscopia localizada foram investigadas. Suas aplicações para experimentos em núcleos diferentes tais como ^1H , ^{31}P e ^{13}C foram analisados e, finalmente, serão apresentados alguns exemplos da aplicação dessas técnicas *in vivo*.

A localização de um pequeno volume bem definido dentro de uma amostra mais extensa é um pré-requisito para experimentos de espectroscopia em amostras não homogêneas. A espectroscopia localizada, assunto deste trabalho, permite adquirir a informação espectral de tal volume, localizado arbitrariamente. Torna-se portanto possível investigar de forma não-invasiva, processos bioquímicos em seres vivos. Assim, a espectroscopia localizada pode complementar a tomografia no diagnóstico médico, identificando não somente o fato de haver um mal-funcionamento numa determinada região do organismo mas trazendo informações mais detalhadas sobre o metabolismo e os processos bioquímicos envolvidos naquela região.

Neste trabalho, descreve-se a implementação de diferentes sequências de pulsos para espectroscopia localizada, tais como PRESS, STEAM, CSI e também técnicas relacionadas como supressão de água (CHESS), *outer volume suppression* (OVS) e desacoplamento (WALZ-16). Em experimentos *in vitro* foi desenvolvida uma metodologia otimizada para espectroscopia localizada de ^{13}C utilizando dois sistemas de RMN diferentes; o primeiro é um equipamento experimental de 2 Teslas e o segundo um sistema comercial de corpo inteiro de 1.5 Teslas. Neste último, a metodologia otimizada foi aplicada num experimento em que os volumes observados foram localizados no interior da cabeça de um voluntário normal.

Além disso, obtivemos as primeiras imagens em deutério com resolução micrométrica e espectros com volumes de localização de apenas alguns microlitros. Para tornar isso possível, instalamos e calibramos o subsistema de gradientes de um espectrômetro VARIAN Unity Inova de 400 MHz.

Abstract

In this work different techniques for localized spectroscopy have been investigated. Their applications in experiments observing different nuclei such as ^1H , ^{31}P e ^{13}C have been analyzed and, finally, some results of *in vivo* experiments are shown.

The localization of a well-defined volume inside of a larger sample is a pre-requisite for spectroscopy in non-homogeneous samples. Localized spectroscopy, topic of the present work, allows to acquire spectral information within a limited region, which may be positioned arbitrarily inside of the sample. This makes it possible to investigate, non-invasively, biochemical processes in living beings. Localized spectroscopy can therefore complement NMR Tomography in medical diagnostics, not only indicating organic disorders, but revealing more detailed information about the metabolism and biochemical processes in the affected region.

In this work the implementation of several pulse sequences for localized spectroscopy have been described, such as PRESS, STEAM, CSI and other related techniques like water suppression (CHESS), outer volume suppression (OVS) and decoupling (WALZ-16). Using *in vitro* experiments, an optimized methodology for localized ^{13}C spectroscopy has been developed, working on two different NMR systems, an experimental one operating at 2 Teslas and a commercial whole body scanner working at 1.5 Teslas. The optimized methodology was practiced in a localized spectroscopy experiment whose volumes were chosen to be inside the head of a normal volunteer.

Also, the first deuterium images with micrometric resolution and localized spectra from volumes of just some microliters have been obtained. To make this possible, it was necessary to install and calibrate the gradient subsystem of a 400 MHz VARIAN Unity Inova spectrometer.

Índice

	Lista de figuras	v
	Lista de tabelas	vii
	Lista de abreviações	viii
	Resumo	ix
	Abstract	x
Capítulo I	- Introdução	
I.1	História da espectroscopia localizada <i>in vivo</i>	1
I.2	Objetivo	4
I.3	Fundamentos básicos	6
I.4	Gradientes de campo magnético	9
I.5	Deslocamento químico (<i>chemical-shift</i>)	11
I.6	Caraterísticas de núcleos importantes para RMN	13
I.7	Espectroscopia de ^1H	17
I.8	Espectroscopia de ^{31}P	18
I.9	Espectroscopia de ^{13}C	20
Capítulo II	- Técnicas de espectroscopia localizada	
II.1	<i>Point Resolved Spectroscopy</i> (PRESS)	23
II.2	Supressão de água	25
II.3	<i>Outer Volume Supression</i> (OVS)	27
II.4	<i>Eddy Current Correction</i> em ^1H por pós-processamento ..	28
II.5	<i>Stimulated Aquisition Mode</i> (STEAM)	30
II.6	Desacoplamento	33
II.7	<i>Image Selected in Vivo Spectroscopy</i> (ISIS) ..	35
II.8	Artefatos de localização (<i>chemical-shift artifact</i>)	37
II.9	<i>Chemical Shift Imaging</i> (CSI)	39
II.10	Correção de linha de base	42
II.11	Sequências híbridas	43
Capítulo III	- Pulsos adiabáticos	
III.1	Aspecto gerais	45
III.2	O segundo sistema girante de coordenadas	47
III.3	Pulsos adiabáticos	48
III.4	<i>Gradient Modulated Adiabatic Excitation</i> (GMAX)	52

III.5	GMAX-3D	54
III.6	Aplicação de GMAX unidimensional	58
Capítulo IV	- Resultados de espectroscopia de ¹³C	
IV.1	Objetivo	61
IV.2	Espectroscopia de glicose (¹ H) em 2 Teslas	63
IV.3	Espectroscopia de glicose (¹³ C) em 2 Teslas	64
IV.4	Tempos de relaxação em 2 Teslas	66
IV.5	Comparação da sequências CSI e STEAM em espectroscopia localizada de ¹³ C em 2 Teslas	68
IV.6	Resultados de espectroscopia <i>in vivo</i> de ¹³ C em 2 Teslas	71
IV.7	Resultados de CSI em ¹³ C obtidos no sistema SIEMENS Magnetom - SP de 1.5 Teslas	73
IV.8	Resultados de ¹³ C com desacoplamento	78
Capítulo V	- Implementação das sequências PRESS e STEAM	
V.1	Instrumentação	81
V.2	Implementação da sequência PRESS	83
V.3	Implementação da sequência STEAM	86
Capítulo VI	- Espectroscopia e microimagens em 9.6 Teslas	
VI.1	Instalação de um sistema de gradientes	88
VI.1.1	Espectrômetro VARIAN Unity Inova	89
VI.1.2	Bobina de Gradientes IBMT 50G	90
VI.1.3	Amplificadores TECHRON 8606	93
VI.1.4	Formas de Gradiente	96
VI.1.5	Ajustes da correção de <i>eddy currents</i>	101
VI.2	Sonda sintonizada para ² H	108
VI.3	Microimagens de deutério	109
VI.4	Espectroscopia localizada em deutério	111
Capítulo VII	- Conclusões	
VII.1	Resumo	114
VII.2	Conclusões	115
Referências Bibliográficas	118

Capítulo I

Introdução

Neste capítulo vamos elucidar os objetivos e a motivação do presente trabalho, começando por resumir a história da espectroscopia localizada. Vamos ainda introduzir os princípios básicos da ressonância magnética e discutir algumas propriedades de núcleos comumente utilizadas na espectroscopia *in vivo*.

1.1 História da espectroscopia localizada *in vivo*

O fenômeno de ressonância magnética nuclear (RMN) foi observado pela primeira vez em 1946 por Bloch ^[1] e Purcell ^[2]. Em 1950, Hahn ^[3] publicou um trabalho pioneiro para a aplicação da ressonância magnética em espectroscopia ^[4]. Com a introdução da RMN pulsada em 1966 por Ernst e Anderson ^[5] a espectroscopia por RMN transformou-se numa ferramenta valiosa na análise química. Nos anos 70, Lauterbur ^[6] Ernst ^[7] e Mansfield ^[8] utilizaram o princípio de RMN para obter de imagens do corpo humano. Desde então, a tomografia por RMN tornou-se uma das ferramentas mais poderosas no diagnóstico médico.

No início dos anos 80, surgiu uma nova ferramenta para auxiliar no diagnóstico médico, chamada espectroscopia localizada *in vivo*. Essa técnica permite obter informações espectrais de pequenas regiões bem definidas dentro de uma amostra maior. Assim, tornou-se possível investigar, de forma não-invasiva, os processos bioquímicos em seres vivos.

Diferentes técnicas para a localização foram propostas, abandonadas ou aprimoradas durante a última década. Uma primeira técnica, denominada *Topical Magnetic Resonance* (TMR) ^[9], baseia-se

em um método de alterar o campo principal (B_0), para o processo de localização utilizando bobinas específicas para gerar os campos necessários. Nesta, além de existirem dificuldades técnicas na construção das bobinas não é possível posicionar arbitrariamente o volume localizado. Técnicas como *Volume Selective Excitation* (VSE) ^[10], *Spatially and Chemical-shift Encoded Excitation* (SPACE) ^[11] e *Spatially Resolved Spectroscopy* (SPARSE) ^[12] utilizam pulsos de radiofrequência (RF) compostos que, além de difícil controle experimental, depositam grande potência de RF numa amostra, o que pode ser prejudicial aos seres vivos. Outras técnicas de espectroscopia localizada utilizam o perfil do campo de RF (B_1) produzido por bobinas de superfície ^[13,14]. Nessas técnicas são necessárias múltiplas excitações com diferentes potências e em seguida processamento dos sinais adquiridos para obter o efeito da localização. Uma técnica famosa que pertence a esta categoria é a de *Depth Pulses* ^[15-18] que foi implementada em alguns tomógrafos comerciais e, para determinadas aplicações, está sendo utilizada ainda hoje.

Em 1984, P.A. Bottomley et al.^[19] propôs uma técnica denominada *Depth resolved Surface-Coil Spectroscopy* (DRESS) que utiliza um pulso seletivo, em combinação com um gradiente de campo magnético, para a localização de um plano paralelo ao da bobina de superfície. A idéia de utilizar, na espectroscopia localizada, o mesmo conceito de pulsos seletivos em conjunto com gradientes de campo magnéticos, já conhecido na tomografia, foi aprimorada para realizar a localização nas três direções coordenadas ^[20]. Duas técnicas baseadas nesse princípio se provaram bastante versáteis, a *Point Resolved Spectroscopy* (PRESS) ^[21,22] baseada em um experimento de *Spin Echo* e a *Stimulated Echo Acquisition Mode* (STEAM) ^[23-25] que utiliza o eco estimulado ^[3]. As duas usam três pulsos de RF com gradientes de campo magnético nas três direções ortogonais para excitar seletivamente o volume de interesse (VOI).

Em experimentos usando substâncias com tempos de relaxação extremamente curtos pode ser necessário adquirir o sinal de RMN não como eco, mas na forma de um FID (*Free Induction Decay*). A técnica clássica para estas aplicações é a sequência *Image Selected in vivo Spectroscopy* (ISIS) ^[26-28] introduzida por Ordidge et al. ISIS utiliza um

intervalo de preparação de três pulsos de inversão seletivos para a localização nas três direções ortogonais, um pulso não seletivo de 90° e subsequente aquisição do sinal do FID. Aplicando-se um esquema de subtração/adição com no mínimo oito combinações de um ou mais dos pulsos de inversão ligados ou desligados o sinal fora do volume de interesse é cancelado, enquanto o sinal dentro soma-se coerentemente.

Todas as técnicas mencionadas acima pertencem à categoria de *single voxel* por adquirir um espectro de uma única região selecionada. Além desse grupo de técnicas de espectroscopia localizada existe a chamada *Spectroscopic Imaging* (SI) ou *Chemical-shift Imaging* (CSI) [29]. Com CSI são adquiridos, em um único experimento, múltiplos espectros ao longo de uma direção da amostra (CSI 1D) ou dentro de um plano (CSI 2D). No caso de CSI em duas dimensões (espaciais), é possível reconstruir imagens referentes a determinadas componentes espectrais, em todos os espectros. Estas imagens, chamadas mapas metabólicos (*metabolic maps*), mostram a concentração de uma determinada substância dentro do plano escolhido. Muitas vezes CSI é combinada com técnicas de *single voxel* como PRESS, STEAM ou ISIS para melhorar a localização e suprimir sinais indesejáveis de regiões fora do volume de interesse.

Conclui-se que a espectroscopia in vivo passou na última década por aprimoramentos consecutivos. Hoje em dia as sequências PRESS, STEAM, ISIS e CSI, em combinação com uma das três anteriores, são as mais utilizadas. Além das técnicas de tomografia convencional, a espectroscopia localizada torna-se cada vez mais importante como método auxiliar no diagnóstico médico e na pesquisa de processos biológicos. No entanto as informações contidos em espectros localizados em seres vivos são de difícil interpretação pelo fato da complexidade dos processos bioquímicos envolvidos. Por esta razão e pelo fato de que a espectroscopia localizada exigir sistemas de RMN bem calibrados e sequências otimizadas ainda existe muito espaço para novas pesquisas.

I.2 Objetivos

A espectroscopia localizada *in vivo* é uma técnica para obter informações espectrais do interior de seres vivos que permitem investigar os processos bioquímicos nesses organismos. A espectroscopia localizada *in vivo* combina conceitos conhecidos da tomografia, que é utilizada no diagnóstico médico, e da espectroscopia clássica usada na análise química.

A tomografia permite, de forma não-invasiva, diferenciar anomalias anatômicas e patológicas dos tecidos normais, tais como tumores, edemas e processos inflamatórios. A informação nas imagens tomográficas, representada em tons de cinza, é baseada nas diferenças de densidade de hidrogênio (^1H) e seus tempos de relaxação, e retratam não apenas detalhes anatômicos, mas também contêm informações sobre a fisiologia dos tecidos analisados. A espectroscopia clássica, contudo, traz informações adicionais sobre o ambiente químico das substâncias investigadas permitindo distinguir as diferentes substâncias presentes numa amostra. Devido ao efeito de deslocamento químico (*chemical shift*), diferentes substâncias emitem sinais em frequências diferentes dando origem a picos distintos em um espectro de RMN.

A espectroscopia localizada, fruto da combinação das técnicas espectroscópicas e de imagens, permite relacionar a informação espectral com informação espacial de forma que o sinal do espectro localizado provém de uma região bem definida da amostra. A localização de um volume limitado dentro de uma amostra mais extensa é um pré-requisito para experimentos de espectroscopia em amostras não homogêneas. Portanto, com técnicas de espectroscopia localizada, torna-se possível investigar, de forma não-invasiva, processos bioquímicos em seres vivos. Assim, a espectroscopia localizada pode complementar a tomografia no diagnóstico médico, identificando não somente o fato de existir uma patologia numa determinada região do organismo mas trazendo informações mais detalhadas sobre o metabolismo e os processos bioquímicos envolvidos naquela região.

Na espectroscopia ainda é possível observar o sinal de RMN de outros núcleos além do hidrogênio (^1H), sendo os mais utilizados os de ^{31}P e ^{13}C entre outros, abrindo assim um espaço amplo para novas aplicações. No presente trabalho relatamos avanços na espectroscopia localizada de ^{13}C para a aplicação no acompanhamento do tratamento de tumores cerebrais. Apresentamos ainda as primeiras imagens em deutério com resolução micrométrica e espectros com volumes de localização de apenas alguns microlitros. Esta técnica permite monitorar a absorção de água deuterada em fragmentos de plantas.

As várias técnicas existentes para espectroscopia localizada possuem diferentes características que as tornam mais adequadas para uma ou outra aplicação e/ou núcleo. Portanto é necessário conhecer detalhadamente os mecanismos das diferentes técnicas para entender suas características, tornando possível escolher a técnica mais adequada para uma determinada aplicação. A sequência de pulsos escolhida para esta aplicação deve ser otimizada tanto na sua implementação quanto nos seus parâmetros experimentais. A comparação das técnicas de espectroscopia localizada para diferentes aplicações, suas implementações e otimizações formam um parte importante do presente trabalho.

O grupo de Ressonância Magnética do Instituto de Física de São Carlos atua tanto na área de tomografia quanto na de espectroscopia de RMN em geral. Na tomografia são desenvolvidas aplicações clínicas, bem como o desenvolvimento de novas metodologias com aplicações em pesquisa. Na espectroscopia, uma linha de pesquisa importante é a espectroscopia de alta resolução em sólidos. Outra linha de pesquisa, onde se enquadra o presente trabalho, é a espectroscopia (não localizada) *in vivo*, que é intimamente ligada as aplicações clínicas da área de tomografia. Nessa parte, o presente trabalho contribui com o desenvolvimento de metodologias de espectroscopia localizada para aplicação *in vivo*. Este trabalho permitirá uma série de novas aplicações interligando as áreas de biofísica, tomografia e espectroscopia por RMN.

I.3 Fundamentos básicos

O conceito central da ressonância magnética nuclear é o do spin nuclear. Núcleos atômicos com um número ímpar de núcleons (prótons e nêutrons) sempre possuem um spin nuclear $I \neq 0$. Em seguida, serão discutidos os fenômenos da ressonância magnética nuclear em um modelo semi-clássico. Uma descrição mais detalhada utilizando o formalismo da mecânica quântica pode ser encontrada nas obras de A. Abragam^[30], C. P. Slichter^[31], A. Tannús^[32] e B. Foerster^[33].

No modelo semi-clássico trata-se o spin nuclear como um momento angular clássico $J = \hbar I$ que pode ser entendido como resultado da rotação do núcleo em torno de si mesmo. O momento angular \vec{J} é relacionado a um momento magnético $\vec{\mu}_N = \gamma \vec{J}$, onde γ é o fator giromagnético, característico para cada espécie nuclear. O momento magnético pode ser considerado como o resultado da rotação do núcleo que possui uma carga elétrica distribuída na sua superfície.

Exposto a um campo magnético \vec{B}_0 , o momento magnético $\vec{\mu}_N$ sofre um torque $\vec{T} = \vec{\mu}_N \times \vec{B}_0$. Isto ocorre devido ao fato do momento magnético $\vec{\mu}_N$ tentar se alinhar ao campo magnético \vec{B}_0 . Considerando-se a equação clássica do movimento rotatório $\vec{T} = d/dt \vec{J}$, obtém-se a equação diferencial $d/dt \vec{\mu}_N = \vec{\mu}_N \times \gamma \vec{B}_0$. Esta descreve um movimento giroscópico, chamado precessão, cuja frequência angular ω_0 , conhecida como frequência de Larmor, é dada por :

$$\omega_0 = \gamma B_0 . \tag{I.1}$$

Essa é a equação fundamental da ressonância magnética nuclear. Superpondo um campo de radiofrequência $B_1(t) \ll B_0$ ortogonal a B_0 pode-se observar uma absorção pela amostra na frequência de ressonância ω_0 .

Para as considerações que seguem abaixo, é conveniente trabalhar em um sistema de coordenadas^[31] \hat{x}' , \hat{y}' , \hat{z}' , que gira com velocidade ω em volta de $\hat{z}' \parallel \hat{z} \parallel \vec{B}_0$. Nesse novo sistema de

coordenadas o campo magnético B_0 transforma-se em $B_0 - \omega / \gamma$. Para $\omega = \omega_0$ o momento magnético $\vec{\mu}_N$ torna-se estático nesse sistema. Introduzindo um campo de radiofrequência $\vec{B}_1 \parallel \hat{x}$ (com $\vec{B}_0 \parallel \hat{z}$) pode-se definir um o campo efetivo como:

$$\vec{B}_{\text{EFF}} = \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \hat{z}' + B_1 \hat{x}' . \quad \text{I.2}$$

Nessa situação, o momento magnético $\vec{\mu}_N$ passa a realizar um movimento de precessão em torno de \vec{B}_{EFF} . Para pulsos de radiofrequência intensos com frequências próximas da ressonância ($B_1 \gg B_0 - \omega/\gamma$), o campo efetivo se reduz a $B_1 \hat{x}'$. Se este campo B_1 for aplicado por um tempo de duração t_p o momento magnético $\vec{\mu}_N$ vai precessionar com um ângulo bem definido de α , dado por :

$$\alpha = \gamma \int_0^{t_p} B_1(t) dt . \quad \text{I.3}$$

Escolhendo adequadamente o tempo de aplicação t_p do campo B_1 e sua intensidade, o ângulo α pode ser ajustado arbitrariamente. Um pulso que produz um ângulo de 90° , girando o momento magnético $\vec{\mu}_N$ da direção \hat{z}' para a direção \hat{y}' , é denominado pulso de excitação e um que produz um ângulo de 180° é chamado pulso de inversão.

Após uma excitação dos momentos magnéticos $\vec{\mu}_N$, estes vão iniciar um movimento de precessão no plano transversal ($\hat{x}-\hat{y}$). Envolvendo a amostra com uma bobina, a variação do fluxo magnético produzido pela precessão dos momentos magnéticos induz uma força eletro-motriz na bobina que oscila com a frequência de Larmor. O sinal observado é conhecido como FID (*Free Induction Decay*). A força eletro-motriz não persiste indefinidamente, ela é atenuada devido a efeitos de relaxação. A relaxação ocorre devido a interação dos momentos magnéticos entre si ^[31].

Dois tipos de relaxação devem ser distinguidos. A relaxação longitudinal, devido à troca de energia dos momentos nucleares com

seus vizinhos, é responsável pela volta dos momentos magnéticos do plano transversal a sua posição de equilíbrio, alinhando-se novamente ao campo magnético B_0 . Esta relaxação é caracterizada pela constante de decaimento T_1 . A relaxação transversal descreve a atenuação do sinal de RMN devido à perda de coerência no movimento dos momentos magnéticos no plano transversal e é caracterizada pela constante de decaimento T_2 .

A grandeza macroscopicamente observável é a magnetização dada pela soma dos momentos magnéticos por volume de amostra :

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \cdot \sum_N \vec{\mu}_n . \quad \text{I.4}$$

O comportamento da magnetização pode ser descrito por um conjunto de equações diferenciais acopladas, conhecidas como equações de Bloch [1]. Elas representam as equações de movimento do vetor de magnetização $\vec{M}(t) = (M_x \ M_y \ M_z)^T$ sob ação do campo magnético \vec{B}_{EFF} , adicionando correções fenomenológicas para os efeitos de relaxação longitudinal (T_1) e relaxação transversal (T_2). Em forma vetorial as equações de Bloch são dadas por :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_{\text{EFF}} + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \hat{z} - \frac{M_x}{T_2} \hat{x} - \frac{M_y}{T_2} \hat{y} , \quad \text{I.5}$$

sendo a magnetização de equilíbrio $\vec{M}_0 = (0 \ 0 \ M_0)^T$. No caso da ausência do campo de radiofrequência $\vec{B}_{\text{EFF}} = (0 \ 0 \ (\omega_0 - \omega) / \gamma)^T$ as equações de Bloch possuem a solução :

$$\begin{aligned} M_{\perp}(t) &= M_{\perp}^{t=0} \cdot e^{i(\omega_0 - \omega)t} \cdot e^{-t/T_2} \\ M_z(t) &= M_0 + (M_z^{t=0} - M_0) \cdot e^{-t/T_1} \end{aligned} \quad \text{I.6}$$

sendo a magnetização transversal $M_{\perp} = M_x + iM_y$. Para um pulso de RF curto, os termos de relaxação nas equações de Bloch podem ser

desprezados. Tendo o pulso um ângulo de excitação α e fase na direção \hat{x}' a solução das equações de Bloch é :

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_x^{t=0} \\ M_y(t) &= M_y^{t=0} \cdot \cos \alpha + M_z^{t=0} \cdot \sin \alpha \\ M_z(t) &= M_z^{t=0} \cdot \cos \alpha - M_y^{t=0} \cdot \sin \alpha \end{aligned} \quad \text{I.7}$$

I.4 Gradientes de campo magnético

Na tomografia por RMN e na espectroscopia localizada, gradientes de campo magnético são utilizados comumente para codificar a posição do sinal de RMN. Estes são campos cuja amplitude varia linearmente em uma direção. Deve-se destacar, que embora essa direção do gradiente é arbitrária os vetores de campo produzidos pelo gradiente são sempre paralelos ao campo principal $\vec{B}_0 \parallel \hat{z}$.

Se um gradiente G_x na direção \hat{x} é superposto ao campo principal B_0 a magnetização realiza um movimento de precessão em torno do novo campo $\vec{B}(x) = (B_0 + x G_x) \hat{z}$, portanto a frequência de ressonância depende da posição x :

$$\omega_0(x) = \gamma (B_0 + x G_x) \quad \text{I.8}$$

Na tomografia, essa dependência espacial da frequência de ressonância é explorada aplicando-se um gradiente, chamado gradiente de leitura, durante a aquisição do sinal de RMN. Deste modo os momentos magnéticos em diferentes posições da amostra tem sua precessão com frequências diferentes, o sinal adquirido é a superposição de todas as frequências das diferentes posições. A informação da posição dos momentos magnéticos pode ser obtida através da Transformada de Fourier ^[34].

Na espectroscopia, a aplicação de um gradiente durante a aquisição, em geral, não é possível pois o objetivo é adquirir informação

espectral, não espacial. No entanto, na espectroscopia localizada tal como na tomografia, a variação espacial da frequência de ressonância, como descrita na equação acima, é utilizada para excitar seletivamente uma região limitada da amostra.

Um pulso de RF somente excita spins em um certo intervalo (ou banda) de frequências de precessão em torno da frequência do pulso (frequência da portadora). Na presença de um gradiente, chamado gradiente de seleção, a frequência de ressonância dos spins depende da posição. Desta maneira, somente spins dentro de uma determinada região no espaço podem ser excitados. Utilizando pulsos de RF modulados em amplitude, a característica da distribuição de frequências deste pode ser controlada através da modulação. A figura I.1a mostra a envoltória de um pulso de RF frequentemente utilizado, conhecido como pulso sinc ($\sin(x) / x$). A figura I.1b mostra o perfil de frequências da resposta dos spins para um pulso de excitação (90°) e um pulso de inversão (180°).

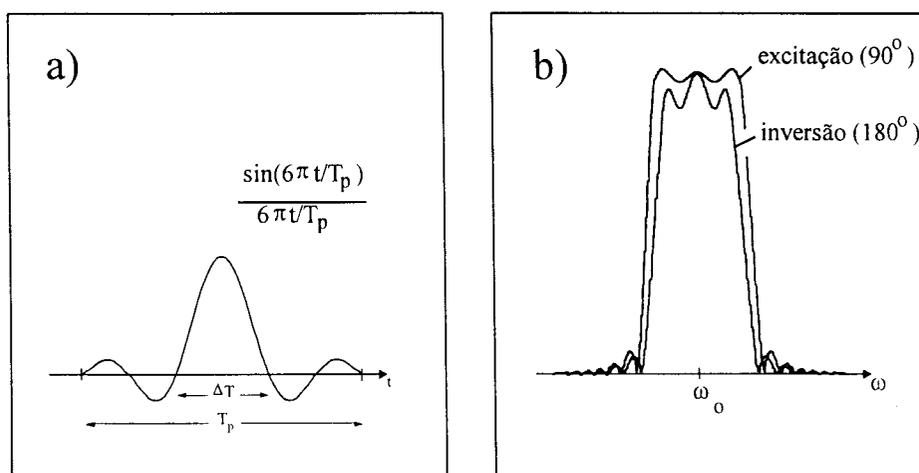


Figura I.1 : a) envoltória de um pulso seletivo tipo sinc truncado e b) seu espectro de frequências para um pulso de excitação (90°) e um pulso de inversão (180°)

Observa-se que o perfil difere para os dois pulsos devido à não linearidade da resposta do sistema de spins, representada nas equações de Bloch ^[1,31]. Na presença de um gradiente, o perfil de frequências representa diretamente o perfil da região selecionada, sua meia largura é aproximadamente $2/\Delta T$ onde ΔT é definido na figura I.1a.

Uma outra técnica que envolve gradientes para obter uma codificação do sinal de RMN no espaço é a codificação de fase. Para isto um gradiente G_y , é ligado durante um determinado intervalo de tempo τ entre a excitação dos spins e aquisição do sinal de RMN. Desta maneira, a fase Φ do sinal adquirido depende da posição y :

$$\Phi(y) = \gamma (B_0 + y G_y \tau) , \quad \text{I.9}$$

Se a amplitude do gradiente G_y é incrementada em experimentos sucessivos, Φ será modulada e a transformada de Fourier retornará a informação espacial do sinal adquirido na direção codificada. Uma descrição mais detalhada da codificação de fase encontra-se na dissertação de doutoramento de A. Tannús [32].

Na tomografia, pulsos de RF seletivos em conjunto com gradientes de seleção são utilizados para excitar seletivamente spins dentro de uma fatia da amostra. Nesse plano, a codificação de frequência e a codificação de fase são utilizadas para obter uma imagem bidimensional. Em técnicas de tomografia 3D, o pulso de RF seletivo é substituído por um segundo gradiente de codificação de fase. Na espectroscopia localizada geralmente são utilizados três pulsos de RF seletivos nas três direções ortogonais x , y e z . No *Chemical Shift Imaging* unidimensional (CSI 1D) são utilizados dois pulsos de RF seletivos e um gradiente de codificação de fase, em CSI 2D um pulso de RF seletivo e dois gradientes de codificação de fase.

I.5 Deslocamento químico (*chemical-shift*)

Embora a frequência de ressonância seja determinada pelo fator giromagnético, característico para cada espécie de núcleo, são observadas pequenas alterações na frequência de spins localizados em diferentes moléculas. Este fenômeno é chamado deslocamento químico (*Chemical Shift*). Sua origem é a blindagem parcial do campo B_0 devido aos elétrons que se encontram ao redor do núcleo. O efeito deste depende

sensivelmente da configuração eletrônica da molécula, ou seja, da sua composição química. Por isso, o deslocamento químico é tão importante para a espectroscopia por RMN na análise química.

Para a espectroscopia *in vivo* isso implica que determinados processos metabólicos podem ser observados de forma não invasiva, diferentemente a métodos cirúrgicos ou outras técnicas invasivas como por exemplo PET (*Positron Emission Tomography*) que utiliza marcadores radioativos.

O deslocamento químico, no caso genérico, é um efeito anisotrópico e portanto o efeito de blindagem é descrito por um tensor $\vec{\sigma}$:

$$\vec{B}_{\text{EFF}} = (\vec{1} - \vec{\sigma}) \vec{B}_O \quad \text{I.10}$$

Além disso, o deslocamento químico possui duas contribuições, uma diamagnética ($\vec{\sigma}_d$) e uma paramagnética ($\vec{\sigma}_p$). Em geral, a primeira prevalece, blindando o campo magnético externo, enquanto a contribuição paramagnética reforça o campo magnético externo, portanto : $\vec{\sigma} = \vec{\sigma}_d - \vec{\sigma}_p$

O tensor do deslocamento químico pode ser decomposto em dois tensores, um diagonal e um com traço zero : $\vec{\sigma} = \delta \vec{1} + \vec{\sigma}'$. Em líquidos o tensor $\vec{\sigma}'$ anula-se devido ao movimento browniano isotropico, essa condição é chamada *extreme narrowing* [30,31]. O resultado é um deslocamento químico isotrópico dado por $\delta = \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})$. Nesse caso, a equação I.10 toma a forma conhecida :

$$\vec{B}_{\text{EFF}} = (1 - \delta) \vec{B}_O \quad \text{I.11}$$

Ao se escrever essa equação em frequências $\omega = (1 - \delta)\omega_0$ obtém-se $\delta = (\omega_0 - \omega)/\omega_0$ que descreve a alteração da frequência de ressonância ω em relação a uma referência ω_0 . A ordem de grandeza do deslocamento químico é de ppm (10^{-6}). A frequência ω_0 é definida por uma substância de referência ($\delta = 0$).

Para o núcleo de hidrogênio (^1H) a substância de referência é tetrametilsilano ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ - TMS), que serve também de referência

para o núcleo ^{13}C . A referência para o núcleo ^{31}P é o ácido fosfórico (H_3PO_4). Na espectroscopia *in vivo* são usadas referências internas de substâncias mais comumente encontradas nos tecidos biológicos como a água (^1H , 4.7 ppm) o grupo metileno (^{13}C , 30 ppm) e a fosfocreatina (^{31}P , 0 ppm).

Além do deslocamento químico existem outros efeitos que podem alterar a frequência de ressonância. Estes efeitos são devido a interações do núcleo em observação com outros spins. As principais interações são :

Acoplamento spin-spin: essa interação, também conhecida como acoplamento J, é um efeito quântico entre os spins de dois núcleos numa molécula, transmitido por meio dos elétrons da ligação química. Seu efeito é formar linhas de ressonância em forma de multipletos ou, no caso da resolução ser insuficiente, alargar as linhas de ressonância. Estes efeitos indesejáveis podem ser eliminados com o desacoplamento (item II.6).

Acoplamento dipolar: essa interação entre dois dipolos magnéticos (momentos magnéticos $\vec{\mu}_N$) é conhecida da eletrodinâmica clássica. Na espectroscopia em líquidos seu efeito é cancelado pelo movimento browniano isotrópico, embora possa ser explorado em experimentos de efeito overhauser nuclear (NOE) [35].

Interação quadrupolar: Em núcleos com momento quadrupolar ($I > 1/2$) existe uma interação do spin com gradientes de campo elétrico produzidos pelos elétrons do em volta do núcleo. Na espectroscopia *in vivo* essa interação não possui grande importância, já que em geral são utilizados núcleos com $I = 1/2$.

I.6 Características de núcleos importantes para RMN

Experimentos de ressonância magnética podem ser realizados em qualquer núcleo que possui spin $I \neq 0$. Particularmente interessantes

para espectroscopia *in vivo* são os núcleos com $I = \frac{1}{2}$ devido à ausência da interação quadrupolar.

Uma das características mais importantes dos experimentos de espectroscopia *in vivo* é a intensidade do sinal. Essa depende da concentração do núcleo em observação nos tecidos biológicos e da sua abundância natural na composição dos isótopos. O hidrogênio, por exemplo, é o núcleo encontrado em maior concentração em tecidos biológicos (63%). Seu isótopo ^1H possui abundância natural de 99.985% e os restantes 0.015% são representados pelo isótopo ^2H (deutério).

Um fator importante, além da concentração e da abundância natural, é a sensibilidade relativa. Essa representa a intensidade do sinal de RMN de um núcleo em concentração e abundância natural de 100%, em relação ao sinal de ^1H . A sensibilidade relativa é proporcional a $I(I + 1) \gamma_I^3$. A sensibilidade absoluta é o produto da sensibilidade relativa pela abundância natural, representando assim a intensidade do sinal de substâncias com composição isotópica natural. A sensibilidade biológica é o produto da sensibilidade relativa pela abundância natural e pela concentração nos tecidos biológicos, sendo essa a medida para a intensidade esperada em um experimento *in vivo*. Na tabela abaixo estão relacionadas as características mais importantes para os núcleos comumente utilizados na espectroscopia *in vivo*. Na tabela I.2 são resumidos as características de outros núcleos com spin $I \neq \frac{1}{2}$ de interesse biológico.

núcleo	relação giromagnética a $[\gamma_I/\gamma_H]$	abundância natural [%]	concentração em tecidos biológicos [%]	sensibilidade relativa	sensibilidade absoluta	sensibilidade biológica
^1H	1	99.985	65	1.00	1.00	1.00
^{31}P	0.405	100	0.22	$6.63 \cdot 10^{-2}$	$6.63 \cdot 10^{-2}$	$2.32 \cdot 10^{-4}$
^{13}C	0.252	1.108	9.5	$1.59 \cdot 10^{-2}$	$1.76 \cdot 10^{-4}$	$2.66 \cdot 10^{-5}$

Tabela I.1 : Características de núcleos comumente utilizados na espectroscopia *in vivo* conforme Bruker Almanac ^[36].

núcleo	Spin [\hbar]	relação giromagnética [γ_I/γ_H]	abundância natural [%]	sensibilidade relativa	sensibilidade absoluta
^2H	1	0.154	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$9.65 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-6}$
^7Li	3/2	0.389	92.58	0.29	0.27
^{14}N	1	0.072	99.63	$1.01 \cdot 10^{-4}$	$1.01 \cdot 10^{-4}$
^{15}N	1/2	0.101	0.37	$1.04 \cdot 10^{-3}$	$3.85 \cdot 10^{-6}$
^{17}O	5/2	0.136	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$2.91 \cdot 10^{-2}$	$1.08 \cdot 10^{-5}$
^{23}Na	3/2	0.265	100	$9.25 \cdot 10^{-2}$	$9.25 \cdot 10^{-2}$
^{39}K	3/2	0.047	93.1	$5.08 \cdot 10^{-4}$	$4.73 \cdot 10^{-4}$

Tabela I.2 : Características de outros núcleos de interesse biológico conforme Bruker Almanac ^[36].

Na realização de experimentos de espectroscopia localizada existem outros parâmetros relevantes, tais como tempos de relaxação e faixa do deslocamento químico. Os tempos de relaxação influenciam a intensidade do sinal, T_2 devido ao decaimento do sinal durante o intervalo entre excitação e aquisição (TE), T_1 devido à recuperação do equilíbrio depois da aquisição e antes da próxima excitação (TR). A diferença entre os valores de deslocamento químico das diferentes substâncias presentes numa amostra, ou seja a faixa do deslocamento químico, define a largura de banda necessária para adquirir o sinal, e assim a resolução espectral necessária para a separação das linhas presentes no espectro. A tabela abaixo resume estes parâmetros para os núcleos ^1H , ^{31}P e ^{13}C .

núcleo	δ	δ em 1.5 T	T_1	T_2
^1H	10 ppm	700 Hz	200 ms - 2 s	50-500 ms
^{31}P	25 ppm	700 Hz	500 ms - 5 s	10-100 ms
^{13}C	200 ppm	3000 Hz	50 ms - 1.5 s	10-100 ms

Tabela I.3 : Deslocamento químico δ e tempos de relaxação para núcleos comumente utilizados.

O hidrogênio (^1H) possui, de todos os núcleos estáveis, a maior sensibilidade. Já que o corpo humano constitui-se de aproximadamente

63% de água, é possível observar este sinal com apenas uma única aquisição, sendo esse o fato que torna possível a tomografia por RMN. Na espectroscopia, o sinal da água é utilizado para a homogeneização (*shimming*) do campo magnético. Fora disso, este torna-se indesejado, já que possui uma intensidade aproximadamente 10^5 vezes maior que as demais substâncias de interesse biológico, presentes em um espectro de ^1H . Os sinais dessas substâncias muitas vezes são sobrepostos e mascarados pelo sinal da água, tornando-se necessária a supressão do sinal predominante, tipicamente utilizando-se pulsos de RF para saturação da ressonância da água (item II.2)

Devido à faixa de deslocamento químico do ^1H ser somente 10 ppm, experimentos de espectroscopia localizada *in vivo* em ^1H exigem uma resolução espectral alta e portanto, uma boa homogeneidade do campo magnético no volume localizado.

As dificuldades em experimentos de espectroscopia *in vivo* com ^{31}P são devido a sua sensibilidade, aproximadamente 10^{-4} menor que a do ^1H e seu tempo de relaxação transversal (T_2) curto. Estes dois fatores tornam necessária a acumulação de várias aquisições para promediação do sinal. Isto, juntamente com o fato de T_1 ser longo (de até 5s), pode aumentar consideravelmente a duração do experimento. A resolução espectral, em geral, não é um fator problemático, já que num típico espectro de ^{31}P o número de sinais de interesse biológico é bem limitado.

A espectroscopia em ^{13}C sofre igualmente pela baixa sensibilidade desse núcleo, mas possui a vantagem da possibilidade da utilização de substâncias enriquecidas em ^{13}C . A larga faixa de deslocamento químico facilita a separação dos sinais das várias substâncias presentes numa amostra biológica. No entanto muitas substâncias apresentam multipletos complexos devido ao acoplamento C-H, que torna importante a utilização de técnicas de desacoplamento (item II.6).

I.7 Espectroscopia de ^1H

Com a espectroscopia de ^1H é possível investigar uma grande variedade de substâncias biológicas em diferentes anatomias ^[37] tais como o cérebro humano ^[38-45], músculo esquelético ^[46-49] e outras ^[50,51]. A aplicação clássica da espectroscopia de ^1H encontra-se na neurologia trazendo informações detalhadas sobre a bioquímica de patologias como esclerose múltipla ^[40] e tumores ^[44], utilizadas para o diagnóstico e controle da terapia.

As diferentes substâncias biológicas visíveis num espectro de RMN, chamadas metabólitos, trazem informações sobre processos no nível celular, como o metabolismo energético das células e a função de neuro transmissores. Por exemplo, o lactato é uma substância produzida em casos de falha na oxigenação das células, portanto o fato de aparecer um sinal de lactato indica a falta de oxigênio na região observada, possivelmente devido a deficiências na circulação sanguínea ou estresse imposto à musculatura ^[44]. Em regiões do cérebro danificadas por derrames ou tumores pode-se observar uma diminuição do sinal da neuro transmissor N-Acetil Aspartato (NAA) ^[40,44,45]. Como exemplo da espectroscopia de ^1H observa-se na figura I.2 um espectro de J. Frahm et al. ^[39], da matéria branca do cérebro de um voluntário normal. Na tabela I.4 são resumidos as propriedades dos metabólitos mais importantes.

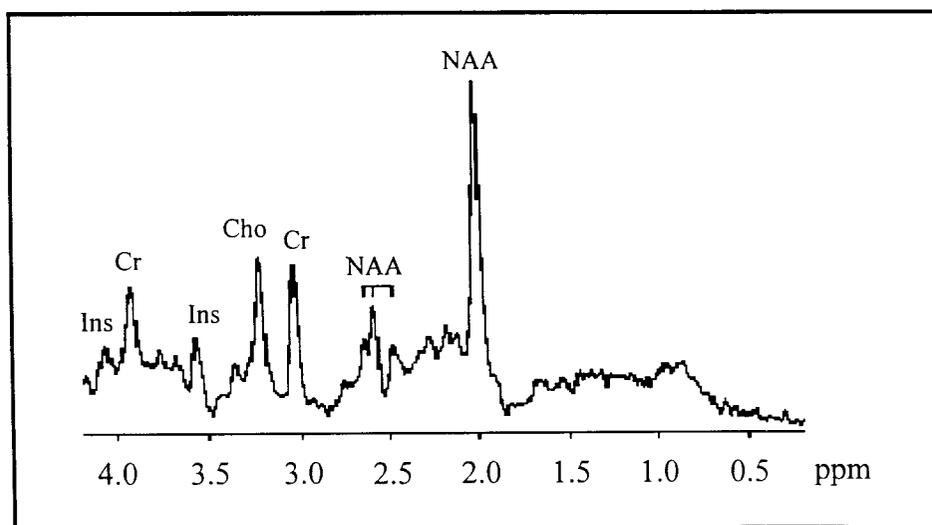


Figura I.2 : Espectro típico de ^1H do cérebro de um voluntário normal ^[39].

metabólito	deslocamento químico [ppm]	T ₁ [ms]	T ₂ [ms]	concentração [mM]
Lac	1.3	1550	1200	–
NAA	2.0	1450	450	17
Cr + PCr	3.0	1550	240	10
Cr + PCr	3.9	1550	240	10
Cho	3.2	1150	330	2.2
Tau	3.3	1700	270	–
Ins + Glicina	3.5	900	110	6.0

Tabela I.4 : Resumo do deslocamento químico em ¹H, dos tempos de relaxação e da concentração absoluta de diferentes metabólitos na região occipital do cérebro humano normal ^[39] sendo Lactato (Lac), N-Acetil Aspartato (NAA), Creatina (Cr), Fosfocreatina (PCr), Colina (Cho), Taurina (Tau), Inositol (Ins) e Glicina.

I.8 Espectroscopia de ³¹P

A espectroscopia de ³¹P traz muitas informações sobre o metabolismo energético das células. A substância chave nesses processos é a Adenosina-5'-Trifosfato (ATP) mostrada na figura I.3.

O principal processo energético nas células é a transformação de ATP em ADP ($ATP + H_2O \Leftrightarrow ADP + P_i + H^+$) que fornece energia para os demais processos bioquímicos. A fosfocreatina (PCr) é importante para armazenar e transportar energia dentro das células e permite a re-síntese de ATP ($PCr^{2-} + MgADP^- + H^+ \Leftrightarrow Cr + MgATP^{2-}$). Uma descrição desses processos bioquímicos encontra-se no trabalho de S.P. Besseman et al.^[52].

Devido à grande distância entre os átomos de fósforo e a adenosina uma substituição da adenosina por um outro nucleotídeo não altera significativamente as frequências de ressonância do ATP. Portanto, é mais adequado referir-se a essas substâncias como Nucleotídeo-Trifosfatos NTP.

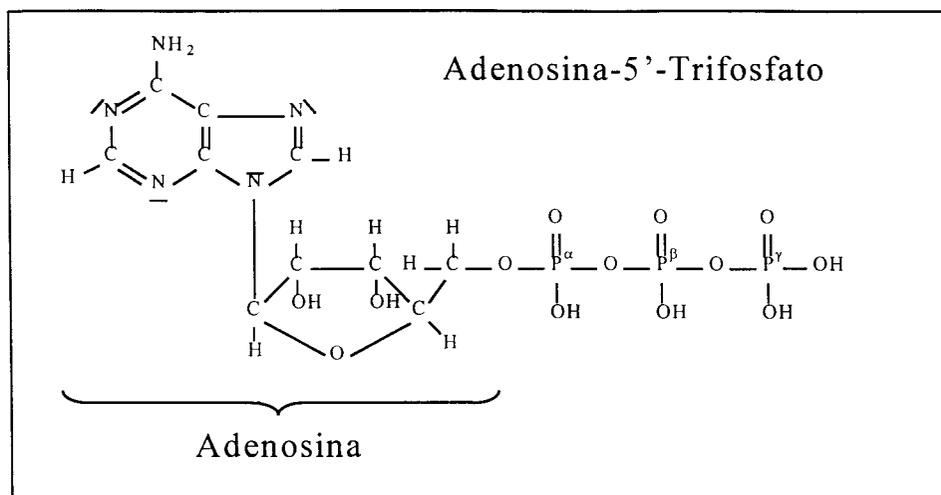


Figura I.3 :A molécula de Adenosina-5'-Trifosfato (ATP). Em geral refere-se a esse grupo de substâncias como Nucleotídeo-Trifosfato (NTP), já que a adenosina pode ser substituída por outro nucleotídeo.

O deslocamento químico do fosfato inorgânico (Pi) é dependente do pH da região onde essas moléculas se encontram, portanto pode ser utilizado como indicador de pH. O valor do pH pode ser calculado ^[52] a partir da diferença do deslocamento químico δ (em ppm) entre o Pi e a Fosfocreatina (PCr), sendo :

$$\text{pH} = 6.75 + \log_{10} [(\delta - 3.27) / (5.69 - \delta)] \quad \text{I.12}$$

Como os pHs intra e extra-celulares são diferentes é possível distinguir se o fosfato inorgânico predomina dentro ou fora das células, ou seja se as mesmas estão intactas ou em estado de destruição parcial. Exemplos de outras aplicações da espectroscopia de ³¹P encontram-se nas referências [53-57] e medidas de concentrações de ³¹P metabólitos em diferentes anatomias encontram-se nas referências [58,59].

Na figura I.4 observa-se um espectro típico de ³¹P da panturrilha (*calf muscle*) de um voluntário normal, adquirido em 1.5 T utilizando uma bobina de superfície sem localização. Observam-se que os sinais do NTP formam multipletos devido ao acoplamento spin-spin homonuclear entre os átomos de fósforo. O β -fosfato possui dois vizinhos (α e β), e portanto a ressonância β -NTP é um triplete. Ambos, α - e β -fosfato só possuem um vizinho (γ) e portanto suas linhas de ressonância são dubletos.

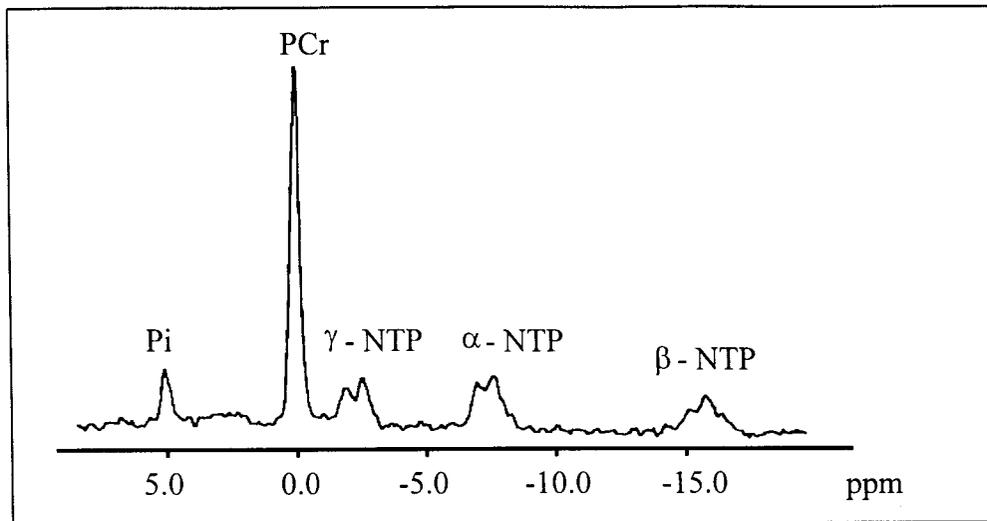


Figura I.4 : Espectro de ^{31}P da panturrilha de um voluntário normal.

Na tabela abaixo são resumidas as propriedades mais importantes de metabólitos tipicamente encontrados em espectros de ^{31}P .

metabólito	deslocamento químico [ppm]	T_1 [ms]	T_2 [ms]	concentração [mM]	grupo molecular
PME	6.5	1420	70	4.1	$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}_3$
Pi	4.9	1450	80	2.0	$-\text{PO}_4$
PDE	2.0-3.0	1320	20	11.6	$-\text{CH}_2-\text{PO}_4-\text{CH}_2-$
PCr	0	3140	150	4.9	$-\text{NH}-\text{PO}_3$
γ - NTP	- 2.4	650	30	-	$-\text{O}-\text{PO}_3$
α - NTP	- 7.6	850	30	2.3	$-\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$
β - NTP	- 16.0	800	20	-	$-\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-$

Tabela I.5 : Resumo do deslocamento químico em ^{31}P , dos tempos de relaxação e da concentração absoluta de diferentes metabólitos na panturrilha de um voluntário normal sendo Fósforomonoester (PME), Fósforo inorgânico (Pi), Fósforodiester (PDE), Fosfocreatina (PCr), α -, β - e γ - Nucleotídeo-Trifosfato (NTP).

I.9 Espectroscopia de ^{13}C

A espectroscopia de ^{13}C *in vitro* é bastante difundida como ferramenta analítica na química e bioquímica. Aplicações *in vivo* de forma não localizada começaram surgir no final dos anos 80. A espectroscopia localizada de ^{13}C *in vivo*, até hoje, não está sendo

utilizada de forma rotineira em ambiente clínico. Isso deve-se à baixa sensibilidade desse núcleo, da complexidade dos sinais observados, e das dificuldades instrumentais da técnica de desacoplamento.

Com experimentos em músculo esquelético pode-se investigar o metabolismo da glicose [60-62]. Somente alguns poucos trabalhos relatam experimentos localizados em anatomias como o cérebro humano [64,65] e outras anatomias [63].

Na figura abaixo observa-se um espectro típico de ^{13}C de uma amostra de músculo esquelético adquirido *in vitro* em um sistema de MRI de 2 T.

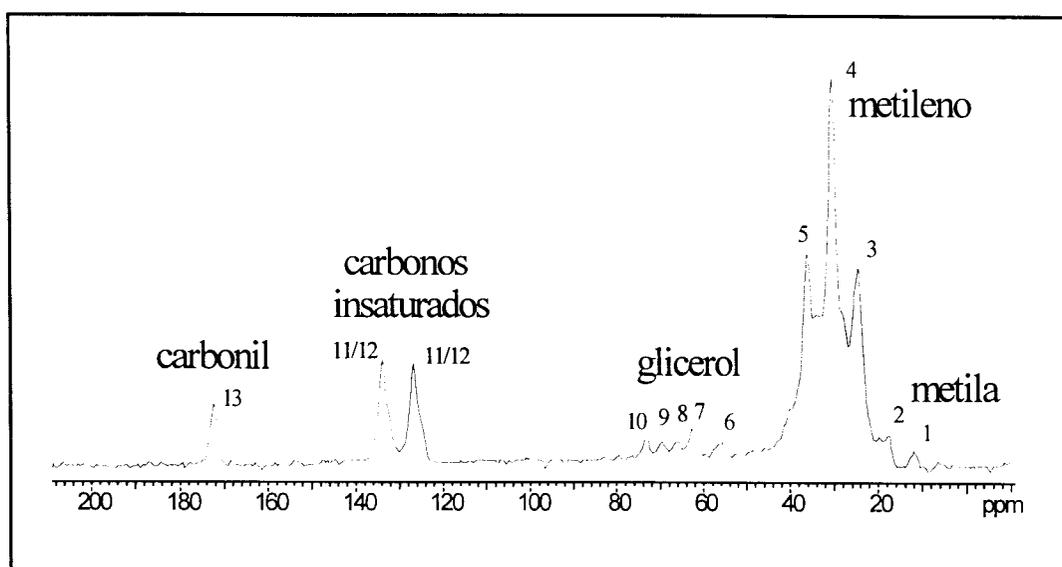


Figura I.5 : Espectro típico de C^{13} de uma amostra de músculo esquelético adquirido *in vitro*.

Apesar da aquisição ter sido feita sem desacoplamento dos prótons pode-se observar alguns grupos de metabólitos bem definidos cujas propriedades são resumidas na tabela I.6. Resultados de espectroscopia de ^{13}C localizada *in vivo* serão discutidos no item IV.

Nr.	posição [ppm]	metabólito
1	11.6	metila $-\text{CH}_3$
2	17.5	metila $-\text{CH}_3$
3	24.3	metileno $-\text{CH}_2-$
4	30.0	metileno $-\text{CH}_2-$
5	35.9	metileno $-\text{CH}_2-$
6	55.5	glicerol- C_1, C_3
7	62.3	glicerol- C_1, C_3
8	65.8	glicerol- C_2
9	69.3	glicerol- C_1, C_3
10	72.9	glicerol- C_2
11	126.5	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$
12	133.6	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$
13	172.0	carbonila $\text{R}-\text{O}-\text{C}=\text{O}-\text{R}'$

Tabela I.6 : Identificação de picos da figura I.5. O pico do grupo metileno em 30ppm serve como referência interna.

Capítulo II

Técnicas de espectroscopia localizada

Neste capítulo vamos discutir as sequências de pulsos para experimentos de espectroscopia localizada. Vamos introduzir as sequências PRESS, STEAM, ISIS, CSI e técnicas relacionadas como a supressão de água com CHESSE, *outer volume suppression* (OVS) e desacoplamento.

II.1 *Point Resolved Spectroscopy* (PRESS)

A sequência PRESS ^[21,22], ilustrada na figura II.1, é baseada em um experimento de *spin echo* duplo. Um pulso de 90° excita os spins seletivamente em uma direção e um pulso de inversão os refocaliza. O pulso de inversão é seletivo em uma segunda direção ortogonal à primeira, sendo assim o eco gerado por estes dois pulsos provém somente da interseção dos dois planos selecionados. Para localizar um volume em forma de um cubo é necessário aplicar um terceiro pulso seletivo na direção ortogonal às duas anteriores. A sequência PRESS utiliza para este fim, um segundo pulso de inversão seletivo que gera um segundo *spin echo*. Assim somente spins que sofreram todos os três pulsos contribuem para o sinal e então o volume de interesse (VOI) é definido pela interseção dos três planos selecionados.

De modo geral, em um experimento de NMR, com três pulsos de RF, podem aparecer vários sinais depois do último pulso, sendo esses o FID do último pulso, um *spin echo*, um eco estimulado e três ecos de segunda ordem ^[3]. Nem todos estes sinais são resultado de todo o conjunto dos três pulsos de RF, como por exemplo o FID que resulta unicamente do último pulso de RF. Portanto, estes sinais contêm

informações não localizadas e precisam ser suprimidos eficientemente para não contaminarem o sinal localizado contido no *spin echo*.

A supressão dos sinais indesejados é realizada com gradientes, chamados *spoilers* ou *crushers*, localizados simetricamente antes e depois de cada pulso de inversão. As áreas dos *spoilers* antes e depois dos pulsos de inversão devem ser idênticas. Desta maneira, os spins são defasados antes do pulso de RF mas somente aqueles que forem invertidos pelo pulso de RF serão “refasados” pelo segundo gradiente. Por exemplo, um FID depois do último pulso de RF será destruído pelo *spoiler* aplicado imediatamente depois do mesmo. Assim todos os sinais de spins que sofreram somente um ou dois pulsos de RF são destruídos pelos *spoilers*. O sinal adquirido é o resultado de todo o conjunto dos três pulsos de RF e provém somente do volume selecionado.

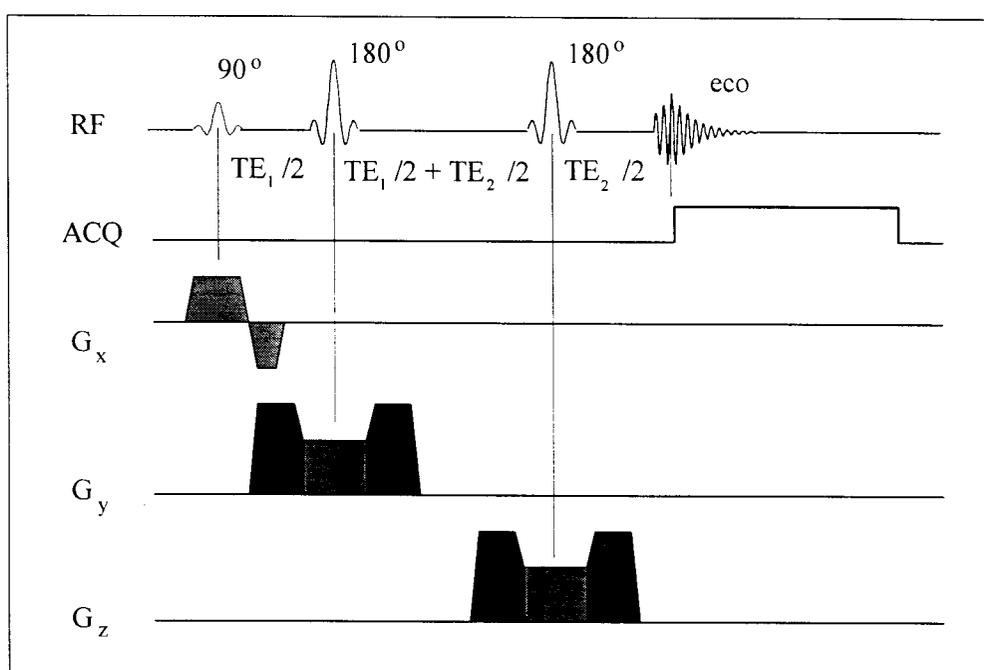


Figura II.1 : Sequência de pulsos necessários para experimentos de espectroscopia localizada pela técnica PRESS ^[21,22]. Gradientes de seleção são marcados em cinza claro, *spoilers* em cinza escuro.

Na sequência PRESS, tal como de forma geral na espectroscopia localizada, o sinal de RMN muitas vezes é adquirido somente a partir do máximo de eco com o objetivo de minimizar o tempo entre excitação e começo da aquisição, o tempo ao eco (TE). Devido ao fato de PRESS

gerar dois *spin echos* para a localização, o tempo ao eco total, é a soma dos tempos ao eco (TE_1 e TE_2) relacionados aos dois *spin echos* gerados pelos pulsos de inversão. Por causa dessa característica da sequência, TE é relativamente longo ($TE > 100$ ms) e o sinal de amostras com tempos de relaxação T_2 curtos decai substancialmente. Portanto, a sequência PRESS é utilizada principalmente em experimentos de espectroscopia de 1H que possui T_2 relativamente longo, mas não em ^{31}P e ^{13}C por causa do T_2 geralmente curto nesses núcleos (veja tabela I.3).

Na espectroscopia em 1H é indispensável eliminar, ou no mínimo reduzir consideravelmente, o sinal da água para poder observar os sinais dos metabólitos. Técnicas de supressão de água serão discutidas em seguida.

II.2 Supressão de água

Em amostras biológicas o sinal da água é aproximadamente 5 ordens de grandeza maior que os sinais dos metabólitos que contém a informação a ser investigada. Assim os sinais de interesse são superpostos e mascarados pelo sinal indesejado da água. Além disso, uma dinâmica na amplitude do sinal de 5 ordens de grandeza é quase o limite de um conversor analógico-digital (A/D) de 16 bits comumente utilizado para aquisição do sinal. Isso significa que, por limitação da conversão A/D do espectrômetro, os sinais dos metabólitos podem desaparecer completamente do espectro ou serem seriamente afetados pela falta de resolução da digitalização. Por essa razão, é necessário utilizar técnicas de supressão de água para eliminar este sinal ou pelo menos diminuir sua amplitude ao mesmo nível dos sinais dos metabólitos.

As diferentes técnicas de supressão de água podem ser divididas em dois tipos: as que aplicam uma excitação seletiva de todas as frequências menos a da água ^[66] com subsequente aquisição do sinal, e segundo, as que destroem a magnetização longitudinal da água antes de

uma excitação de todo o espectro de frequências ^[67-71]. No segundo tipo distinguem-se as técnicas que destroem o sinal da água aproveitando-se dos tempos de relaxação ^[67] e as que utilizam o método de saturação seletiva da água ^[25,68-71]. A técnica de supressão de água mais comumente utilizada na espectroscopia de ¹H *in vivo* pertence ao último tipo, a chamada *Chemical-shift Selective Excitation* (CHESS) originalmente proposta por A. Haase et al. ^[70] e recentemente aprimorada por T. Ernst et al. ^[72].

A técnica CHESS utiliza um pulso de 90° altamente seletivo na frequência de ressonância da água. A envoltória do pulso de RF comumente é uma função gaussiana e a duração do pulso tipicamente 20 ms, o que resulta em uma banda de 60 Hz (ou 1 ppm em 1.5 Teslas). O pulso de RF traz a magnetização da água para o plano transversal. Imediatamente após o pulso de RF um gradiente de campo magnético é aplicado para destruir a coerência da magnetização transversal. Como um pulso de RF raramente pode ser ajustado para ter exatamente 90°, em geral, é utilizado um conjunto de três pulsos consecutivos como mostrada na figura II.2.

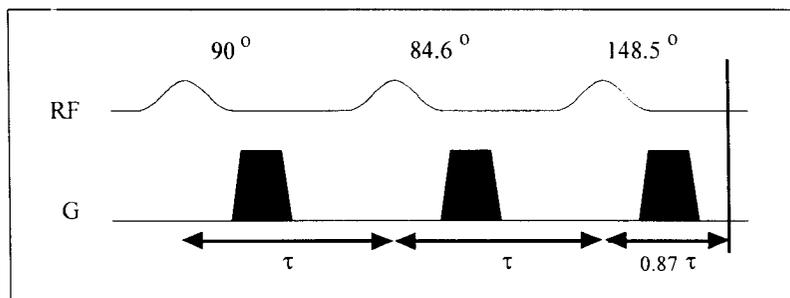


Figura II.2 : Conjunto de 3 pulsos CHESS ^[70] para supressão de água

Cada pulso do conjunto diminui a magnetização longitudinal da água, que tenha permanecido por imperfeição do pulso de 90° anterior, até destruir completamente essa magnetização indesejada. Em simulações descobriu-se ^[72] que pulsos com valores ligeiramente diferentes de 90° e não igualmente espaçados possuem maior eficiência. Essa é a técnica mais utilizada hoje em dia.

Para a supressão de água na espectroscopia localizada de ^1H o trecho de pulsos mostrado na figura acima pode preceder a sequência PRESS (figura II.1) ou qualquer outra sequência de localização.

II.3 *Outer Volume Suppression (OVS)*

Apesar das técnicas de localização serem eficazes na supressão de sinais fora do volume de interesse, em alguns casos, esses sinais ainda podem contribuir ligeiramente ao sinal adquirido. Isso pode ocorrer no caso de pacientes não completamente imóveis ou no caso de sinais muito fortes perto do volume localizado, como por exemplo gordura subcutânea. Nessas circunstâncias é desejável suprimir o sinal fora do volume de localização ainda mais, utilizando uma técnica chamada pré-saturação espacial ou *outer volume suppression (OVS)* [73].

Este método utiliza, como a supressão de água com CHESS, a saturação dos sinais indesejados. Um pulso de 90° , seletivo na região a ser suprimida, é aplicado e em seguida a magnetização transversal é destruída com um gradiente de campo magnético, que pode ser a extensão do próprio gradiente de seleção.

Para a supressão de todas as regiões em volta de um região cúbica seriam necessários seis pulsos de RF convencionais para saturar fatias paralelas aos seis cantos do cubo selecionado. Com pulsos de RF com espectro de potência em múltiplas frequências [74] é possível saturar duas fatias paralelas nos dois lados opostos do volume cúbico ao mesmo tempo, diminuindo dessa forma o número de pulsos de RF para três.

Uma típica sequência de pulsos para espectroscopia localizada em ^1H pode ser composta dos três elementos discutidos nos itens II.1-3 de forma a aplicar primeiro a supressão de água com CHESS, depois a *outer volume suppression* e finalmente a aquisição do sinal localizado com PRESS, em notação abreviada CHESS - OVS - PRESS

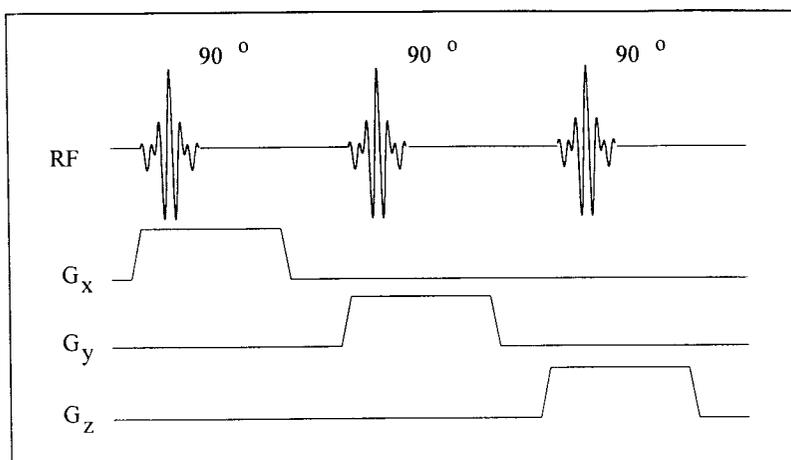


Figura II.3 : Conjunto de 3 pulsos de RF ^[73,74] para *outer volume supression* em 3 dimensões.

II.4 Eddy Current Correction em ¹H por pós-processamento

Em todas as técnicas de tomografia e espectroscopia localizada que utilizam gradientes de campo magnético, o chaveamento dos mesmos provoca correntes induzidas em partes metálicas do ímã. Estas correntes são chamadas *eddy currents* e decaem de forma exponencial com o tempo, alterando temporariamente o campo B_0 , o que pode provocar sérios artefatos na imagem ou no espectro. Para minimizar estes efeitos, muitos sistemas de RMN preparados para espectroscopia *in vivo*, utilizam bobinas de gradientes ativamente blindadas (*self shielded coils*). Uma redução adicional dos efeitos de *eddy currents* é feita através de uma pré-ênfase do sinal de entrada no amplificador de gradiente (veja item VI.5).

Mesmo com as correções efetuadas por *hardware*, efeitos de *eddy currents* persistem e podem provocar artefatos graves, especialmente no caso da espectroscopia localizada. Isto porque, na espectroscopia localizada são utilizados gradientes de campo magnético até instantes imediatamente anteriores ao da aquisição do sinal de RMN, a qual é feita na ausência de qualquer gradiente. Portanto, pequenas contribuições de *eddy currents* provocadas pelo transiente do último gradiente antes da aquisição, provocam erros graves nos primeiros

pontos do sinal de RMN adquirido. Isso se manifesta no espectro em distorções da forma e fase das linhas.

No planejamento das sequências de pulsos para espectroscopia localizada os efeitos de *eddy currents* devem ser minimizados, reduzindo-se o uso de chaveamento de gradientes, principalmente antes da aquisição do sinal. Experimentalmente, providências devem ser tomadas a cerca da temporização da sequência de pulsos de tal forma que haja tempo suficiente para efeitos de *eddy currents* decaírem a níveis suficientemente baixos.

Uma particularidade da espectroscopia localizada de ^1H é que existe um método de pós-processamento dos dados adquiridos, que permite eliminar quase completamente os artefatos provocados por efeitos de *eddy currents* [75]. A idéia básica é corrigir os erros de fase nos primeiros pontos do sinal de RMN utilizando um conjunto de dados de referência. Na espectroscopia de ^1H este conjunto de dados de referência pode ser conseguido em uma única aquisição de um experimento sem supressão de água. Neste caso, o conjunto de dados é dominado pelo sinal da água e as contribuições dos sinais dos metabólitos são desprezíveis já que, comparativamente, suas intensidades são aproximadamente 5 ordens de grandeza menor. Supõe-se que a ressonância da água esteja localizada no centro do espectro, a fase do sinal é constante. Entretanto *eddy currents* introduzem um erro de fase. Um conjunto de dados adquiridos com supressão de água, nas mesmas condições experimentais, contém contribuições idênticas dos efeitos dos *eddy currents*. Portanto, a fase desses dados pode ser corrigida utilizando o conjunto de dados de referência simplesmente multiplicando pela a fase da referência. Uma vantagem adicional é que uma fase linear que eventualmente esteja presente nos dois espectros também será cancelada.

Deve-se salientar que não todos os efeitos dos *eddy currents* podem ser corrigidos com este método, apenas aqueles que estão relacionados à fase dos dados e não aqueles relacionados a sua amplitude. Apesar disso, conseguem-se melhoramentos consideráveis na qualidade do espectro resultante como ilustrado em um exemplo ao item IV.2.

II.5 Stimulated Echo Acquisition Mode (STEAM)

A sequência STEAM [23-35] consiste de três pulsos seletivos de 90° nas três direções ortogonais para a seleção do volume de interesse, análogo à sequência PRESS apresentada no item I.1. No entanto, na sequência STEAM o sinal é adquirido na forma de um eco estimulado [3].

O primeiro pulso de 90° leva a magnetização ao plano transversal onde ela permanece durante $TE/2$, o segundo pulso retorna a magnetização transversal novamente à direção longitudinal onde ela permanece durante TM (*mixing time*). Finalmente, o terceiro pulso gera o eco estimulado depois de um intervalo $TE/2$ após o último pulso. Para eliminar sinais indesejados como o FID depois do último pulso de RF, o *spin echo* e os ecos de segunda ordem [3] são adicionados gradientes chamados *spoilers*.

Na figura II.4 encontra-se um exemplo para a sequência STEAM ilustrando as diferentes funções dos gradientes. Os pulsos de RF são acompanhados por um conjunto de gradientes de seleção (positivo) e refocalização (negativo) marcados em cinza claro. A refocalização é necessária devido à defasagem da magnetização durante a seleção. Para refocalizar essa defasagem a área do gradiente de refocalização deve ser a metade da área do gradiente de seleção. O gradiente de refocalização é localizado antes ou depois do gradiente de seleção, dependendo em qual das duas posições a magnetização se encontra no plano transversal.

Para eliminar os sinais indesejados são usados *spoilers* durante os intervalos $TE/2$ e TM , aplicados nas três direções x , y e z . O conjunto de *spoilers* durante $TE/2$ consiste de duas partes. A primeira parte encontra-se entre o primeiro e o segundo pulso de RF, a segunda parte entre o último pulso de RF e o começo da aquisição. A segunda parte dos *spoilers* é necessária para eliminar o FID do último pulso de RF, a primeira parte dos *spoilers* serve para preparar a magnetização de tal maneira que o sinal do eco estimulado seja refocalizada para a aquisição. As duas partes de cada conjunto devem possuir áreas idênticas.

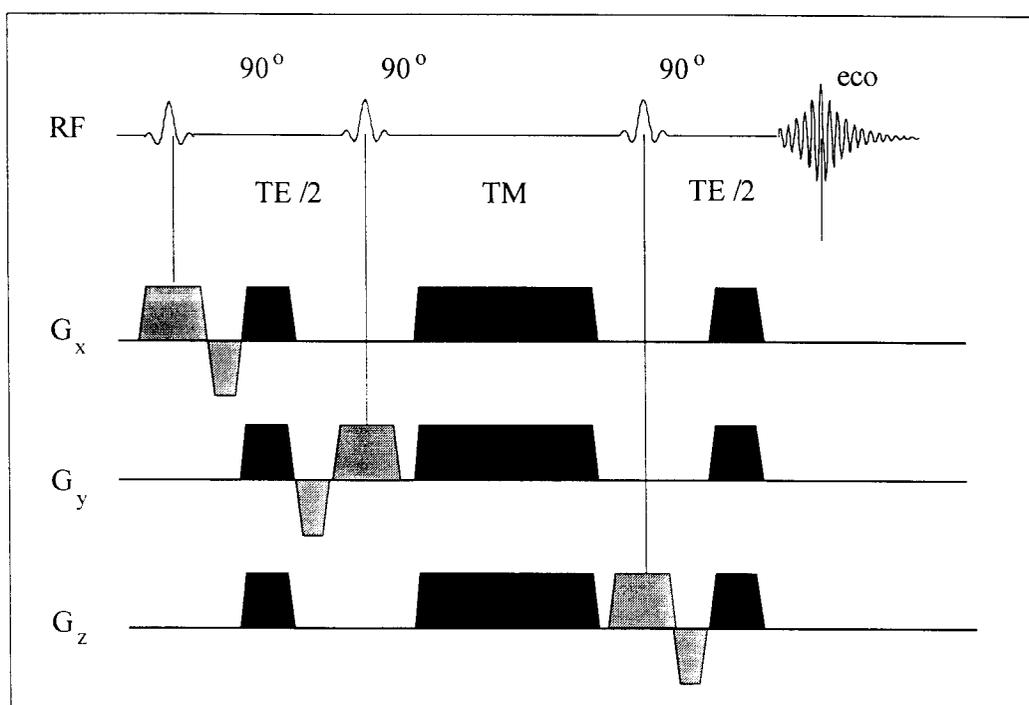


Figura II.4 : Sequência de pulsos necessários para experimentos de espectroscopia localizada pela técnica STEAM ^[23-25]. Gradientes de seleção são marcados em cinza claro, *spoilers* em cinza escuro.

Durante o intervalo TM são aplicados três *spoilers* longos, que servem para eliminar o spin eco que pode ser gerado pelo segundo e terceiro pulso de RF, tal como para eliminar ecos de segunda ordem provocados pelos três pulsos de RF em conjunto. Este gradientes pode ser aplicados durante todo intervalo TM. Pelo fato da magnetização encontrar-se na direção longitudinal durante TM, estará ocorrendo apenas a relaxação longitudinal. Como essa, geralmente, é pelo menos uma ordem de grandeza mais lenta que a transversal, TM pode ser escolhido longo, o que possibilita a aplicação de *spoilers* fortes durante este intervalo. Isso é necessário para garantir que os sinais indesejados sejam eliminados eficientemente.

A vantagem da sequência STEAM sobre a sequência PRESS é que o tempo ao eco (TE) não inclui o intervalo TM. Isso permite TE consideravelmente mais curto ($TE < 50$ ms) do que na sequência PRESS ($TE > 100$ ms). Isso torna possível utilizar STEAM em espectroscopia de ^{31}P e ^{13}C , já que estes núcleos possuem tempos de relaxação T_2 curtos

(tabela I.3). Caso STEAM seja utilizado em espectroscopia de ^1H é necessário aplicar uma técnica de supressão de água. Os pulsos CHESSE, discutidos no item II.2, podem preceder a sequência STEAM e/ou serem intercalados durante T_M [25].

Como discutido no item anterior, na implementação de sequências de pulsos para espectroscopia localizada é indispensável minimizar o uso de chaveamento de gradientes, por causa dos efeitos indesejáveis dos *eddy currents*. Na figura II.5 e mostrada uma implementação da sequência STEAM que leva isso em conta.

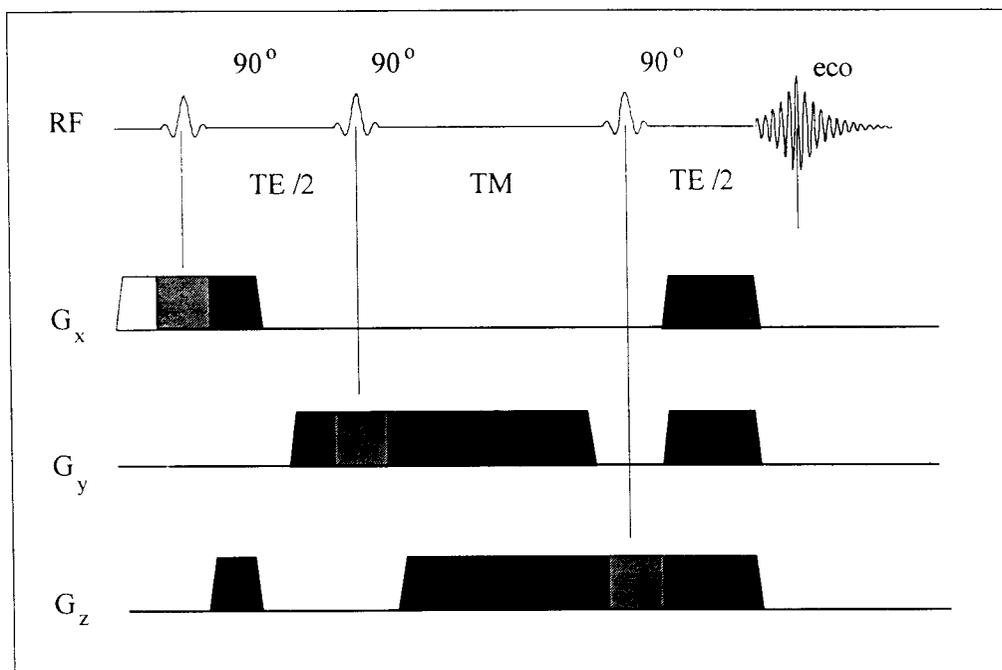


Figura II.5 : Sequência STEAM otimizada para reduzir efeitos de *eddy currents*. Gradientes de seleção são marcados em cinza claro, *spoilers* em cinza escuro. Gradientes com propósitos iguais possuem cores idênticas a figura II.4, alguns gradientes foram modificados.

Efeitos de *eddy currents* no começo dos gradientes de seleção podem provocar distorções do perfil do volume selecionado. Para diminuir este efeito, os gradientes de seleção são ligados alguns milissegundos antes do pulso de RF que permite o gradiente atingir um valor constante. As partes de refocalização dos gradientes de seleção, sendo negativas na figura II.5, foram incorporadas nos *spoilers* evitando assim o grande transiente entre o gradiente de seleção (positivo) e o

gradiente de refocalização (negativo). Dessa forma os gradientes de seleção e os *spoilers* podem ser aplicados continuamente evitando transientes. Assim, a sequência passa a possuir somente dois pulsos de gradiente em cada direção.

II.6 Desacoplamento

A técnica de desacoplamento elimina o efeito da interação spin-spin, também conhecida como acoplamento J. Este acoplamento entre dois núcleos em uma molécula, transmitido por meio dos elétrons da ligação química, dá lugar a linhas de ressonância em forma de multipletos. Muitas vezes multipletos de diferentes metabólitos se superpõem, dificultando a identificação das linhas. Além disso, num espectro sem desacoplamento a intensidade do sinal de um metabólito se divide entre as diferentes partes do multipletto, enquanto num espectro desacoplado toda a intensidade colapsa numa única linha. Na espectroscopia *in vivo* este efeito geralmente aparece em espectros de ^{31}P e ^{13}C devido ao acoplamento forte desses núcleos com prótons vizinhos (^1H).

A técnica de desacoplamento heteronuclear consiste na aquisição do sinal de um núcleo enquanto um outro, o núcleo a ser desacoplado, está sendo irradiado na sua frequência de ressonância. Sendo assim, é necessário a aplicação de RF em duas frequências diferentes, primeiro na frequência do núcleo sob investigação (^{31}P ou ^{13}C) e depois, durante todo o intervalo de aquisição, na frequência do núcleo a ser desacoplado (^1H), como indicado na figura II.6. Instrumentalmente, isso significa que são precisos dois canais de RF com sintetizadores de RF, amplificadores e sondas separadas, respectivamente sondas de dupla ressonância.

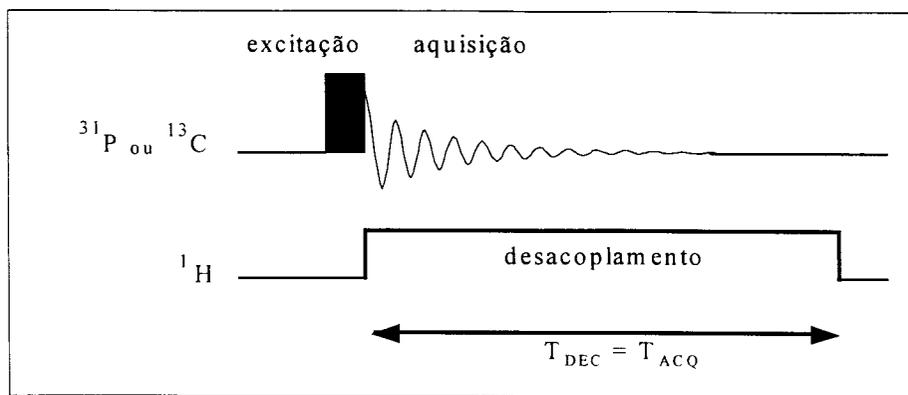


Figura II.6 : desacoplamento em onda contínua

No desacoplamento de onda contínua (CW), como mostrado na figura acima, a faixa de frequências do desacoplamento é $\Delta\omega = 1/T_{DEC}$. Para um intervalo de aquisição típico de $T_{DEC} = 1s$ isso resulta em uma banda de $\Delta\omega=1$ Hz. A faixa de deslocamento químico de 1H , o núcleo a ser desacoplado, em 1.5 Teslas é aproximadamente 700Hz (tabela I.3). Desta maneira o desacoplamento CW não cobre a toda a faixa do deslocamento químico. Portanto, para um desacoplamento eficaz em toda a faixa de frequências, são necessárias técnicas de desacoplamento de banda larga.

As técnicas de desacoplamento de banda larga introduzem deslocamentos da fase durante a irradiação de 1H , de forma aleatória como na *noise modulation* [76], ou em forma de esquemas de pulsos compostos com fases diferentes como nas diferentes versões de MLEV [77-79] e WALZ [80,81]. Todos tem em comum o alargamento da banda de frequências do desacoplamento para até alguns kilohertz, suficiente na maioria das aplicações.

As técnicas de desacoplamento podem ser aplicadas em qualquer sequência de pulsos, simplesmente irradiando o núcleo a ser desacoplado durante toda a aquisição. Em seres vivos, certos cuidados devem ser tomados com relação à potência média aplicada (*specific absorption rate*, SAR), muitas vezes é necessário aumentar-se o tempo de repetição para diminuir a potência média.

II.7 Image Selected in vivo Spectroscopy (ISIS)

Na sequência ISIS [26-28] a informação espectroscópica é adquirida em forma de um FID, imediatamente após à excitação, e não gerando um eco como nas sequências PRESS e STEAM. Assim, ISIS é particularmente indicada para estudos do núcleo ^{31}P e ^{13}C que possuem valores de T_2 curtos. Isto porque, não há perda de sinal devido a tempos ao eco longos e a resolução dos espectros não sofre por efeitos de alargamento de linhas, devido ao acoplamento spin-spin homonuclear.

ISIS utiliza pulsos de inversão seletivos para preparar a magnetização de equilíbrio que em seguida é excitada uniformemente por um pulso não seletivo de 90° . O FID gerado por este procedimento não ainda não é localizado. Para a localização, múltiplos FID's devem ser acumulados repetindo o experimento básico com combinações diferentes dos pulsos de inversão ligados ou desligados. Uma versão unidimensional de ISIS é mostrada na figura II.7. Nessa sequência devem ser feitas duas aquisições, uma vez com o pulso de inversão ligado, e uma segunda vez sem este pulso. Desta maneira, no primeiro experimento, a magnetização produzida pelos spins internos à região selecionada encontra-se na direção $-x$ e a magnetização dos spins externos na direção $+x$. No segundo experimento todos os spins refocalizam na direção $+x$. Subtraindo os dois sinais, a contribuição dos spins de fora da região selecionada se cancela.

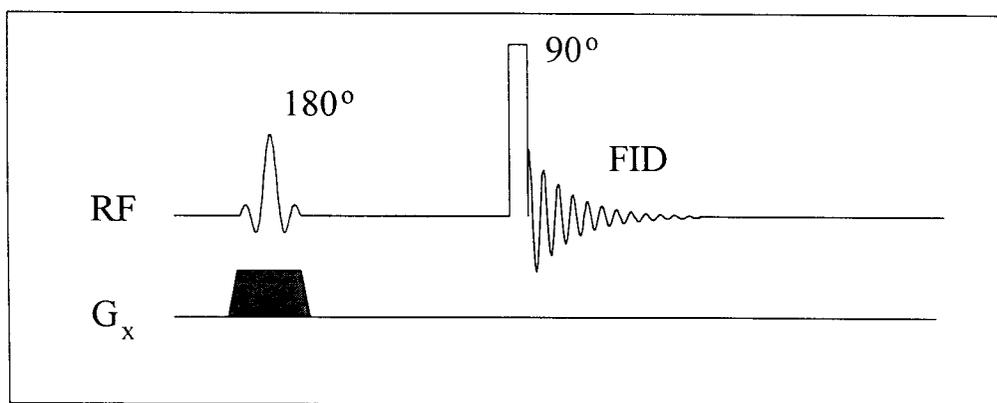


Figura II.7 : Esquema para um experimento unidimensional da técnica ISIS.

Para a localização completa em três dimensões é necessário aplicar um esquema de subtração/adição com todas as oito combinações dos pulsos de inversão ligados ou desligados. Assim, o sinal externo ao volume de localização se cancela, enquanto o sinal interno soma-se coerentemente. A sequência ISIS com localização completa em três dimensões é mostrada na figura II.8. O esquema de adição/subtração com os respectivos gradientes ligados ou desligados e dado na tabela II.1.

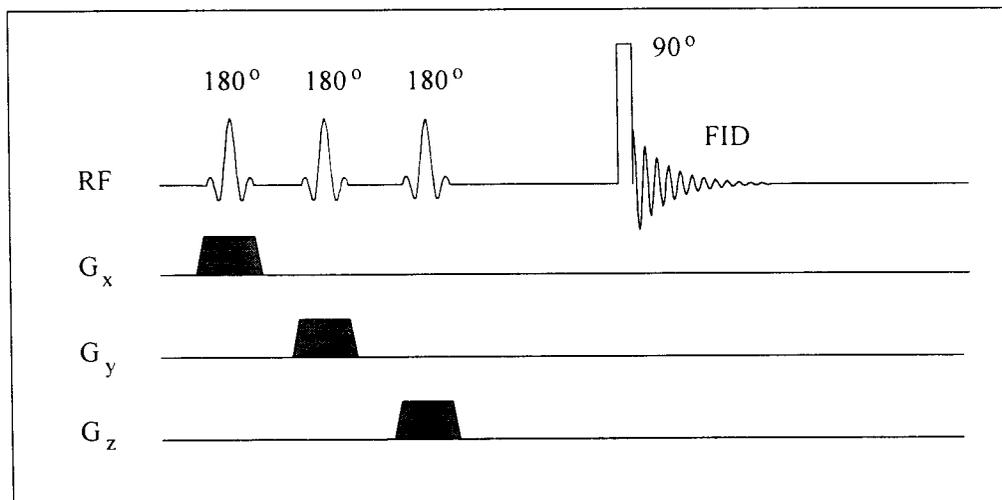


Figura II.8 : Sequência de pulsos necessários para experimentos de espectroscopia localizada pela técnica ISIS ^[26-28]. Um tempo de espera é introduzido entre o terceiro pulso de inversão e o pulso de excitação não seletivo para minimizar efeitos de *eddy currents*.

Nº. do experimento	pulso 180° seletivo em x	pulso 180° seletivo em y	pulso 180° seletivo em z	contrib. para o espectro
1	0°	0°	0°	+1
2	180°	0°	0°	-1
3	0°	180°	0°	-1
4	180°	180°	0°	+1
5	0°	0°	180°	-1
6	180°	0°	180°	+1
7	0°	180°	180°	+1
8	180°	180°	180°	-1

Tabela II.1 : Esquema de adição/subtração para a sequência ISIS. A sigla 180° se refere a aplicação de um pulso de inversão seletiva e 0° à ausência do pulso. A contribuição do sinal pode ser positiva, o FID será somado aos demais, ou negativa, o FID será subtraído.

Métodos de localização, como ISIS, que dependem da combinação de diferentes aquisições para eliminar o sinal externo ao volume de interesse possuem algumas desvantagens. A sequência é sensível a efeitos de movimento que resultam em erros na subtração dos sinais. Por exemplo, o movimento de um paciente durante a aquisição dos oito FID's necessários para a localização resultará em erros graves da mesma. Muitas vezes o batimento cardíaco e/ou o movimento respiratório é suficiente para tornar a localização ineficiente, ainda mais no caso de um paciente com deficiência de coordenação de movimento. Esse é um fato que torna a utilidade da sequência ISIS em ambiente clínico bastante questionável, a não ser quando combinado com *chemical shift imaging* (CSI) como discutido abaixo no item II.11. Problemas de localização também podem ser reduzidos com a técnica de *outer volume suppression* como discutido no item II.3 [27].

Além da sensibilidade a movimentos, o sinal adquirido possui níveis bastante variáveis dependendo dos pulsos seletivos serem ligados ou não (experimento 1 e 8 na tabela II.1). Assim o sistema de recepção necessita de um grande alcance dinâmico.

Outros aprimoramentos de sequência básica para ISIS [26] foram propostos [27], a extensão do esquema de adição/subtração para a aquisição simultânea de dois volumes e a substituição dos pulsos de RF convencionais por pulsos adiabáticos [28], que serão discutidos no capítulo III. Utilizando pulsos adiabáticos a sequência pode ser utilizada em combinação com bobinas de superfície para aumentar a sensibilidade.

II.8 Artefatos de localização (*chemical-shift artifact*)

Como já mencionado no item I.5, o núcleo de ^{13}C possui uma grande faixa do deslocamento químico. Em geral isso é uma vantagem, facilitando a identificação dos sinais. No entanto, nas sequências de

espectroscopia localizada, discutidas nos itens anteriores isso provoca o chamado artefato de localização.

Para a definição de um volume ou fatia é necessária a aplicação de gradientes de campo magnético que produzam uma variação das frequências de ressonância ao longo de uma direção espacial. A variação de frequência induzida pelo gradiente é superposta à variação de frequência devido ao deslocamento químico fazendo com que os sinais de diferentes metabólitos provenham de regiões deslocadas.

Na presença de um gradiente G_z o sinal de dois metabólitos com frequências ω_1 e ω_2 provém de duas fatias deslocadas por Δz , dado por :

$$\Delta z = \frac{\omega_1 - \omega_2}{\gamma G_z} \quad \text{II.1}$$

Observa-se que o artefato de localização Δz aumenta com a diferença das frequências dos dois metabólitos, ou seja ele aumenta com o deslocamento químico δ e com o campo B_0 , lembrando que : $\omega_{1,2} = (1 - \delta_{1,2})\gamma B_0$. No entanto, pode-se diminuir os artefatos de localização aumentando-se o gradiente de localização G_z mas, para se manter a extensão da região selecionada constante deve-se aplicar um pulso de RF mais curto. Para se conseguir o mesmo ângulo de excitação este pulso de RF deve ser mais intenso, o que muitas vezes não é possível, ou pelas limitações do caminho de RF (voltagem máxima permitida) ou pelos limites de segurança impostos em tomógrafos comerciais (*specific absorption rate*, SAR).

Na figura II.9 é mostrado o artefato de localização entre os sinais do grupo metileno, carbonos insaturados e carbonila num espectro ^{13}C num campo de 2 Teslas. Utilizou-se uma amostra de óleo vegetal adquirindo-se um perfil de 0.6 cm ao longo de uma direção espacial. O gradiente de localização foi 70 mT/m, o que provoca um deslocamento entre metileno e carbonila de aproximadamente 0.5 cm.

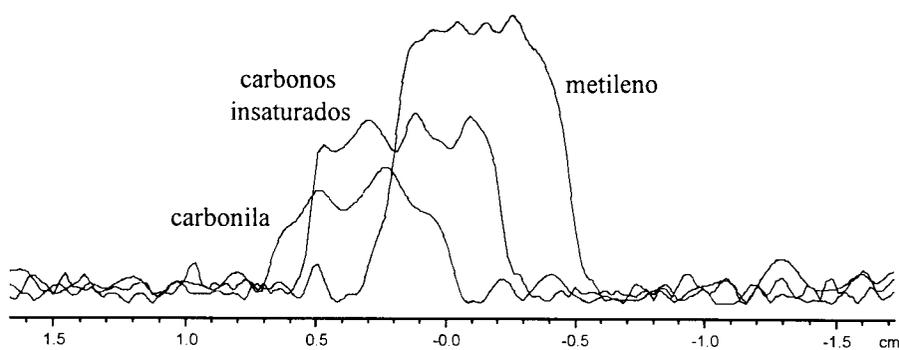


Figura II.9 : Artefato de localização entre três metabólitos importantes de um espectro de C^{13} , utilizando um gradiente de localização de 70mT/m.

Nas sequências de localização em três dimensões como PRESS, STEAM e ISIS o artefato de localização acontece em todas as três direções, de forma que volumes de diferentes metabólitos são deslocados na direção diagonal do volume cúbico. As únicas técnicas que não sofrem por artefatos de localização são as que utilizam o conceito de codificação de fase para a localização, como CSI que será discutido nos próximos itens.

II.9 Chemical shift imaging (CSI)

A técnica de *chemical shift imaging* (CSI), também chamada *spectroscopic imaging* (SI) ^[29], consiste em selecionar uma região uni- ou bidimensional, com pulsos seletivos convencionais, e codificar a posição dentro dessa região com gradientes de codificação de fase. Uma vantagem dessa técnica é não ser sensível a artefatos de localização (item II.8). Isso significa que, em um experimento de CSI bidimensional, artefatos de localização somente aparecerão na direção de seleção da fatia e não dentro do plano da “imagem”.

Em CSI 2D uma fatia da amostra é selecionada com um pulso de RF em conjunto com um gradiente de seleção. Dois gradientes de codificação de fase são utilizados para codificar as duas direções dentro da fatia como mostrado na figura II.10. O resultado da aquisição é uma

matriz de dados tridimensional, com uma dimensão que contém informação espectral e duas direções que contêm informação espacial.

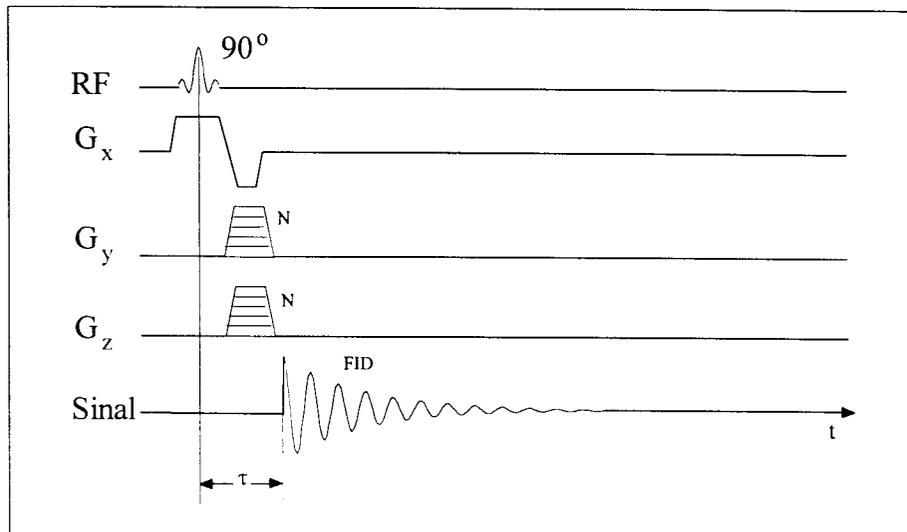


Figura II.10 : Sequência de pulsos utilizados para experimentos de *chemical shift imaging* (CSI) em duas dimensões.

O sinal é adquirido na ausência de gradientes e a informação espectral é revelada pela transformada de Fourier ao longo do eixo temporal. Com a técnica de codificação de fase adquirem-se $N \times N$ espectros variando os dois gradientes de codificação de fase, nas duas direções y e z , em N passos. Aplicando-se a transformada bidimensional nas direções da codificação de fase pode-se recuperar a informação espacial. O resultado são $N \times N$ espectros cujo sinal provém de posições bem definidos ao longo das direções Y e Z dentro da fatia selecionada na direção X .

Pode-se integrar os espectros ao longo da direção espectral em uma faixa limitada do deslocamento químico em volta de um metabólito. O resultado, visualizado na forma de uma imagem, chama-se mapa metabólico. Este representa a intensidade que um determinado metabólito produz na fatia selecionada. Um mapa metabólico parece-se muito com imagens de tomografia convencional apesar de possuir de resolução (espacial) muito menor. Por outro lado, mapas metabólicos contém informações bem mais específicas sobre a distribuição de densidade de uma determinada substância.

A sequência CSI 2D, como apresentada na figura II.10, possui a vantagem de adquirir o sinal de RMN pouco depois da excitação, sendo assim o sinal não sofre por decaimento devido a relaxação T_2 . Portanto, esta técnica pode ser utilizada para espectroscopia de ^{31}P e ^{13}C que possuem T_2 curto. No entanto, para a localização é necessário aplicar gradientes durante o intervalo τ entre a excitação e a aquisição. Além de provocar efeitos indesejáveis de *eddy currents* (item II.4) o atraso do começo da aquisição por τ introduz uma fase linear nos espectros. Essa fase linear pode ser corrigida ^[82] por *software* mas este procedimento introduz uma variação da linha de base do espectro. Métodos para correção de linha de base serão discutidos em seguida. Experimentos de CSI 2D que não provocam esse tipo de problemas podem ser realizados adquirindo o sinal de RMN em forma de um *spin echo* como ilustrado na figura II.11.

Como discutimos acima, técnicas que são baseadas na formação de um *spin echo* sofrem por decaimento de sinal quando utilizados em amostras com T_2 curto, como o caso na espectroscopia de ^{31}P e ^{13}C . Portanto a sequência mostrada na figura II.11 é mais indicada para espectroscopia de ^1H .

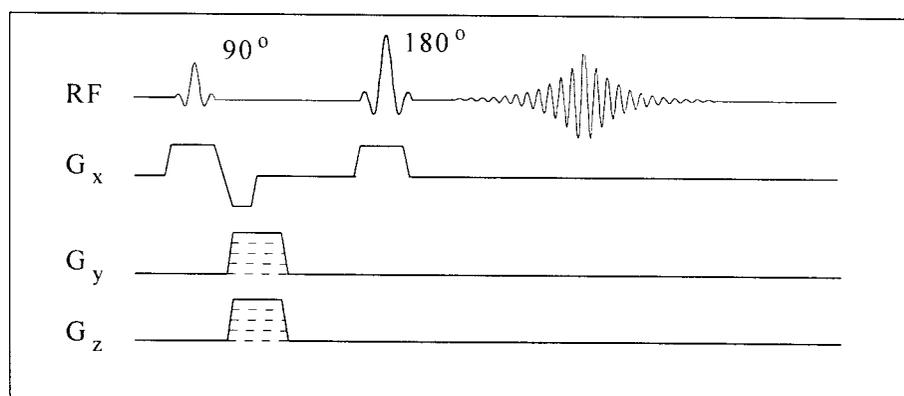


Figura II.11 : Sequência de pulsos utilizados para experimentos de *chemical shift imaging* (CSI) em duas dimensões com refocalização de um *spin echo*.

A sequência de CSI 2D da figura II.11 pode ser facilmente alterada para implementar CSI unidimensional simplesmente retirando-se um dos gradientes de codificação de fase e trocando-se o gradiente de

seleção do pulso de 180° para esta direção. Na figura abaixo é mostrado o esquema para CSI 1D.

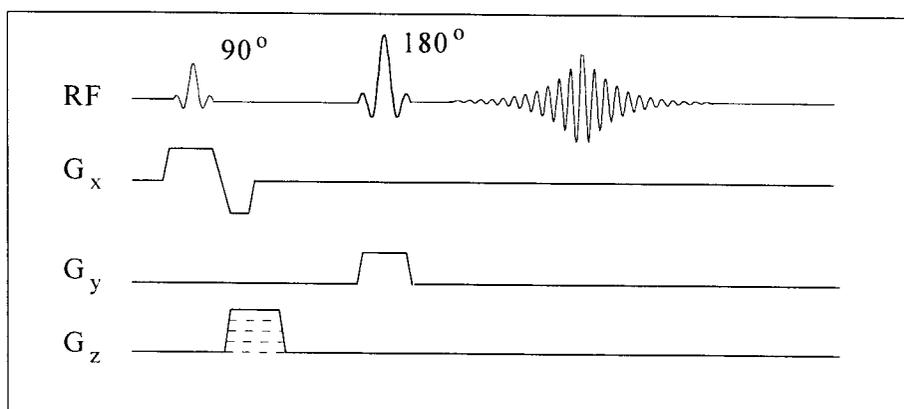


Figura II.12 : Sequência de pulsos utilizados para experimentos de *chemical shift imaging* (CSI) unidimensional.

Uma outra possibilidade para a implementação de CSI 1D é a utilização de uma das sequências PRESS, STEAM ou ISIS selecionando-se um volume em forma de uma coluna prolongada. Ao longo da direção do eixo maior dessa coluna e aplicado o gradiente de codificação de fase. A combinação de CSI com as técnicas *single voxel* PRESS, STEAM e ISIS será discutida no item II.11.

II.10 Correção de linha de base

Observamos no item anterior que um *delay* τ entre a excitação dos spins e a aquisição do sinal introduz uma fase linear ^[82] nos espectros que é difícil de ser corrigida. Existem métodos numéricos para calcular o sinal nos pontos que não foram adquiridos durante τ , como a chamada *linear prediction* ^[83] e métodos de máxima entropia ^[84]. Estes métodos envolvem muitos cálculos numéricos e portanto são demorados.

Como indicado no item anterior, um método bastante utilizado é fazer a correção da fase linear no espectro e em seguida corrigir a linha de base introduzida pela correção fase de primeira ordem. Um método simples de correção da linha de base em espectros de RMN consiste na definição de regiões do espectro que não contém sinais e utilização

destes dados para *fitting* de uma função arbitrária (muitas vezes um polinômio ou um *spline*). Depois essa função é subtraída do espectro ^[85] removendo-se assim a linha de base. Apesar de poder ser automatizado, este procedimento em geral é executado interativamente, o que não é possível no tratamento de grandes quantidades de dados, gerados em experimentos de CSI. Para automatização das correções, vários métodos foram propostos ^[86-88], na maioria baseados em deconvolução do espectro, uma técnica relacionada a transformada de Fourier ^[34].

II.11 Sequências híbridas

CSI muitas vezes é utilizada em combinação com uma das técnicas *single voxel* PRESS, STEAM ou ISIS para melhor definir um volume de interesse e obter um número limitado de espectros localizados dentro desse volume. Na combinação de PRESS com CSI são adicionados gradientes de codificação de fase entre o pulso de 90° e o primeiro pulso de 180°, como indicado na figura II.13.

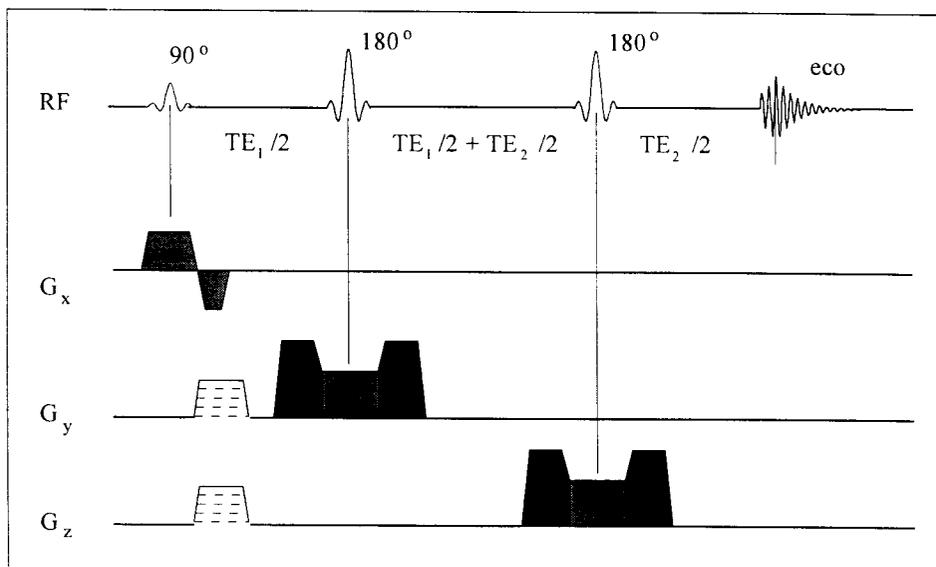


Figura II.13 : Sequência híbrida combinando PRESS (figura I.1) com CSI.

Por exemplo, em espectroscopia localizada de ^1H do cérebro humano existem sinais fortes da gordura subcutânea que podem

contaminar um experimento CSI convencional ^[45]. A combinação de PRESS com CSI pode ser utilizada para selecionar um volume grande, em forma de uma fatia limitada nos seus quatro lados, de forma que este seja localizado inteiramente no espaço intra-craniano. Dentro desse volume selecionado com PRESS, uma matriz de tipicamente 16x16 espectros são adquiridos com CSI bidimensional. Da mesma forma pode-se utilizar a combinação de PRESS com CSI unidimensional para observar lipídeos no coração humano ^[51]. Neste caso, um volume em forma de uma coluna é posicionado adequadamente e CSI 1D é utilizada para adquirir espectros localizados ao longo do maior eixo dessa coluna.

Análoga à combinação de CSI com PRESS, pode-se introduzir um ou mais gradientes de codificação de fase no intervalo entre os primeiros dois pulsos de RF da sequência STEAM (figura II.5). Essa sequência híbrida tem aplicações em espectroscopia localizada de ³¹P, por exemplo no cérebro humano ^[54].

A combinação de CSI na suas duas formas ilustradas nas figuras II.10 e II.11 com a sequência ISIS (figura II.8) pode ser aplicada na espectroscopia de ³¹P no cérebro e coração humano ^[55], tal como na espectroscopia de ¹³C do abdômen ^[65].

Capítulo III

Pulsos adiabáticos

Neste capítulo, vamos introduzir o princípio de pulsos adiabáticos, utilizados para a excitação uniforme de uma amostra, utilizando bobinas de superfície. Vamos ainda, discutir a aplicação de pulsos adiabáticos em conjunto com gradientes modulados de campo magnético, para localizar um volume de interesse pela técnica *Gradient Modulated Adiabatic Excitation* (GMAX)

III.1 Aspectos gerais

As técnicas relacionadas à espectroscopia localizada, discutidas no capítulo anterior, dependem todas da precisão do ângulo dos pulsos de RF utilizados. Principalmente as técnicas de supressão de água (item II.2) e de *outer volume supression* (item II.3) somente funcionam eficientemente com pulsos de 90° bem ajustados. Pulsos mal ajustados nas sequências PRESS e STEAM resultam em perdas de sinal substanciais. Portanto, as amplitudes dos pulsos devem ser ajustadas cuidadosamente durante a calibração. Além disso, as bobinas utilizadas devem produzir campos B_1 suficientemente homogêneos para-se evitar grandes variações dos ângulos dos pulsos de RF, dentro do volume selecionado.

Para a obtenção de campos B_1 suficientemente homogêneos pode-se utilizar a combinação de uma bobina de grande extensão (bobina de corpo) para excitação e uma bobina adaptada à anatomia sobre investigação para a aquisição do sinal. Entretanto, em determinados experimentos é vantajoso utilizar-se uma única bobina para ambos, excitação e aquisição. Neste caso bobinas de superfície possuem a desvantagem de gerar campos B_1 com inomogeneidades grandes. Na

figura III.1 é mostrado o campo B_1 no plano xy de uma bobina de superfície localizada perpendicularmente ao plano, à esquerda a distribuição teórica de linhas de campo constante e à direita uma imagem adquirida com a sequência *spin echo* ilustrando o efeito na prática.

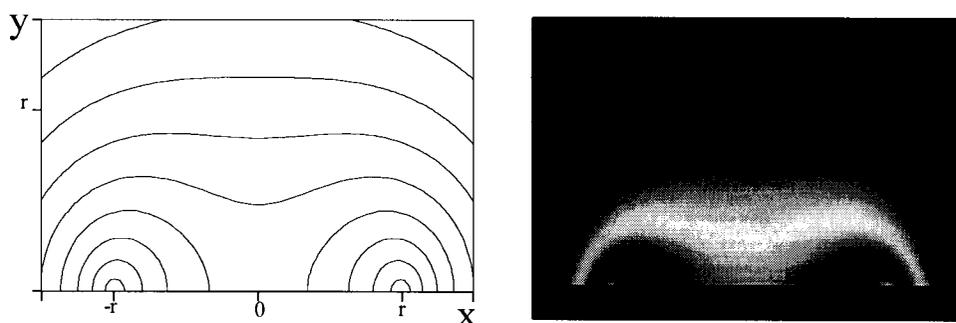


Figura III.1 : Campo B_1 no plano xy produzido por uma bobina de superfície perpendicular ao plano. A esquerda a distribuição teórica, à direita a distribuição real, imagem adquirida com a sequência *spin echo*.

A utilização de bobinas de superfície para a obtenção de espectros de ressonância magnética é especialmente indicada quando se trata de experimentos de baixa sensibilidade (^{31}P e ^{13}C) a fim de aumentar a mesma.

Uma excitação uniforme dos spins, em ângulos corretos, com bobinas de superfície é possível utilizando-se um novo conceito de pulsos de excitação ^[89,90] modulados em amplitude e frequência, que foram chamados pulsos adiabáticos ^[91-94]. Estes são utilizados, por exemplo, em um aprimoramento da sequência ISIS ^[28] e em uma técnica de localização chamada *Gradient Modulated Adiabatic Excitation* (GMAX) ^[95,96] que utiliza bobinas de superfície, pulsos adiabáticos junto a gradientes de campo magnético modulados.

III.2 O segundo sistema girante de coordenadas

Para discutir o princípio dos pulsos adiabáticos é conveniente analisar o comportamento do vetor magnetização M em sistemas girantes de coordenadas. No item I.3 foi introduzido o primeiro sistema girante de coordenadas no qual a magnetização executa um movimento de precessão em torno de um campo magnético efetivo B_{EFF} composto pela soma vetorial de $B_1 \hat{x}'$ e a componente do campo principal $(B_0 - \omega / \gamma) \hat{z}'$. No caso de pulsos adiabáticos, modulados em amplitude e frequência, as componentes B_1 (modulação em amplitude) e $(\omega_0 - \omega) / \gamma$ (modulação em frequência) adquirem dependência temporal, portanto B_{EFF} varia temporalmente. A taxa de variação é $d\alpha/dt$ onde α , o ângulo do campo efetivo com B_1 é dado por:

$$\alpha = \arctan \left(\frac{\Delta\omega}{\gamma B_1} \right) \quad \text{III.1}$$

Nestas circunstâncias é conveniente introduzir um segundo sistema girante coordenadas (x'' , y'' , z'') que acompanha B_{EFF} e gira com $d\alpha/dt$ em volta de $\hat{x}'' \parallel \vec{B}_{\text{EFF}}$. Neste novo sistema girante a direção de B_{EFF} é constante, mas não necessariamente sua amplitude. No segundo sistema girante, há uma contribuição para B_{EFF} ao longo da direção y'' com magnitude $(d\alpha/dt) / \gamma$ (vide figura abaixo). Conseqüentemente, um vetor de magnetização que inicialmente esteja ao longo da direção x'' realizará a precessão em torno da soma vetorial dos dois campos como ilustrado na figura III.2.

Se $|d\alpha/dt| \ll \gamma B_{\text{EFF}}$ o vetor da magnetização M será aproximadamente colinear a B_{EFF} . Nessa condição, conhecida como condição adiabática, o vetor da magnetização acompanhará o movimento do campo efetivo B_{EFF} . A condição adiabática, por convenção ^[91], também é escrita na forma :

$$B_{\text{EFF}} / (d\alpha/dt) \gg 1 , \quad \text{III.2}$$

definindo B_{EFF} (e B_1) em dimensão de radianos/segundo. Na discussão dos pulsos adiabáticos, na próxima seção, vamos seguir essa convenção.

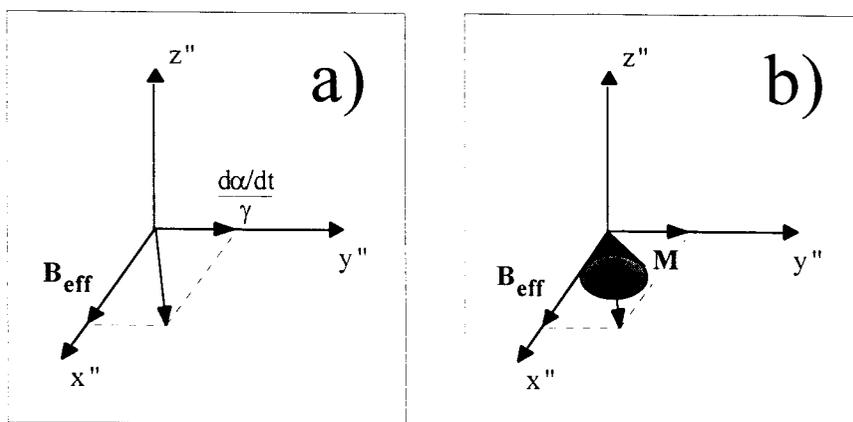


Figura III.2 : Sistema girante de coordenadas a) Campo efetivo B_{EFF} , b) Rotação do vetor de magnetização M em torno de B_{EFF} .

III.3 Pulsos adiabáticos

Para um pulso adiabático satisfazer a condição de adiabaticidade, as duas funções de modulação em amplitude e frequência devem possuir determinados comportamentos temporais. Supondo que, inicialmente, a magnetização seja a magnetização de equilíbrio, que se encontra ao longo da direção z' . Para a magnetização acompanhar o campo B_{EFF} durante um pulso adiabático ela deve apontar na mesma direção que B_{EFF} . Então, é necessário que B_{EFF} seja na direção z' ou então B_1 seja pequeno comparado com $\Delta\omega/\gamma$. Isso significa que inicialmente, a RF deve ser de pequena amplitude e com frequência fora da ressonância. Durante o pulso a direção de B_{EFF} deve mudar lentamente, assim vetor de magnetização acompanhará B_{EFF} , até chegar no plano transversal. Para B_{EFF} realizar este movimento a amplitude da RF deve aumentar durante o pulso enquanto a frequência se aproxima da frequência de ressonância. Assim, B_1 cresce até alcançar seu máximo e $\Delta\omega/\gamma$ diminui a zero.

Observe-se que, a função de modulação em amplitude deve crescer em função do tempo, enquanto a função de modulação em frequência deve diminuir. De forma geral a modulação em amplitude e frequência pode ser descrita por:

$$B_1(t) = 2\pi B_1^0 F_1(t) \quad \text{III.3}$$

$$\omega(t) = 2\pi A F_2(t) - \omega_0$$

onde F_1 e F_2 são as funções de modulação. Nessas equações adotamos a convenção ^[91] de A e B_1^0 serem em unidades de hertz, assim B_1 e ω tem dimensão de radianos/segundo. F_1 e F_2 são funções adimensionais. A magnitude B_1^0 da modulação em amplitude, pode ainda ser relacionada à amplitude da modulação em frequência A , sendo : $B_1^0 = A v$, onde v carrega a dependência espacial, levando em conta a inomogeneidade de B_1 . Para funções de modulação arbitrárias como definidas acima, a condição adiabática é dada por :

$$|B_{\text{eff}} / (d\alpha/dt)| = 2\pi A v^{-1} (v^2 F_1^2 + F_2^2)^{3/2} |F_1(dF_2/dt) - F_2(dF_1/dt)|^{-1} \gg 1 \quad \text{III.4}$$

Isso deve ser satisfeito durante todo o tempo da aplicação do pulso. Dois conjuntos de funções de modulação que são bastante comuns e que podem satisfazer essa condição são os pares sen/cos e tanh/sech, mostradas nas figuras abaixo.

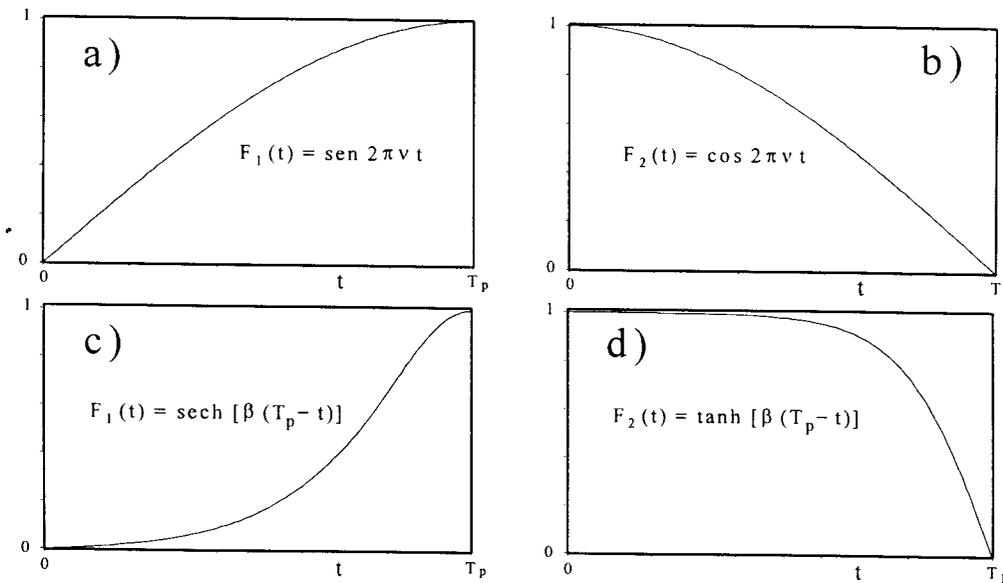


Figura III.3 : As funções de modulação em amplitude e frequência dos pares a,b) sen/cos e c,d) tanh/sech

Com os dois pares de funções de modulação sen/cos e tanh/sech vê-se que existem soluções diferentes que podem satisfazer a condição adiabática variando-se lentamente a amplitude e frequência do pulso de RF, ou seja trabalhando-se com uma duração do pulso T_p suficientemente longa. Dada a amplitude máxima, existe para cada um dos pulsos, um T_p mínimo para que a condição adiabática seja satisfeita. Este valor mínimo de T_p depende do parâmetro ν , que representa a não uniformidade do campo de RF. Mantendo-se T_p fixo, é possível encontrar outras formas de modulação que satisfaçam a condição adiabática mais eficientemente durante todo o pulso, para diferentes valores do parâmetro ν . O par de funções de modulação sen/cos é a solução ótima para $\nu = 1$, ou seja sem inomogeneidades do campo de RF.

Um método numérico de otimização das funções de modulação para pulsos adiabáticos utilizando um método variacional foi descrito por Ugurbil et al. ^[94]. Nessa otimização, qualquer um dos dois pares de funções de modulação descritos acima (ou qualquer outra) pode ser utilizado como ponto de partida para os cálculos numéricos. Os pulsos adiabáticos com funções de modulação numericamente otimizadas são chamados pulsos NOM (*Numerically Optimized Modulation*). A figura III.4 mostra o resultado da otimização no intervalo $\nu=0.1-10$, que representa uma inomogeneidade de B_1 coma variação de três ordens de grandeza.

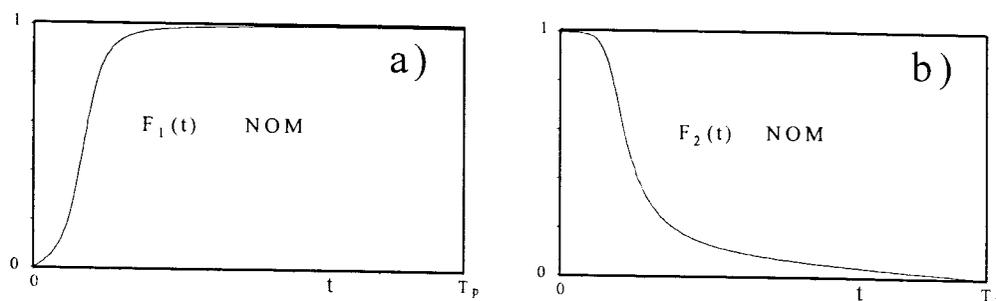


Figura III.4 : Funções de modulação em a) amplitude e b) frequência para os pulsos de RF adiabáticos, otimizadas numericamente para um intervalo de ν de 0.1 a 10.0.

Com pulsos adiabáticos como os acima somente é possível trazer a magnetização da direção z ($0,0,M_0$) para o plano transversal ($M_0,0,0$) ou, estendendo o esquema de modulação, para a direção $-z$ ($0,0,-M_0$). Existem pulsos adiabáticos compostos de múltiplos segmentos como os descritos acima para executar rotações de um vetor de magnetização inicial arbitrário (M_x, M_y, M_z). Nestes pulsos compostos é introduzido uma diferença de fase da RF entre segmentos consecutivos. Assim, podem ser construídos pulsos adiabáticos com ângulos de 90° (BIR) ^[91] e 180° (BIREF) ^[92,93] para manipular a magnetização em condições iniciais arbitrárias. A figura III.5 mostra dois exemplos destes pulsos compostos.

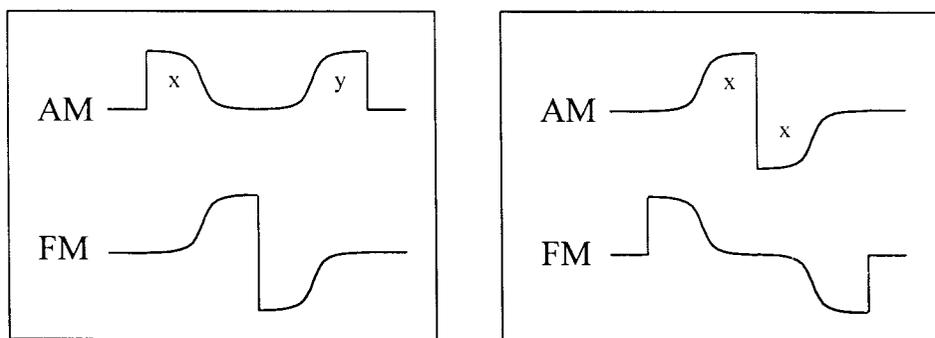


Figura III.5 : Esquema de modulação do pulsos adiabáticos compostos BIR-1 (esquerda) e BIREF-1 (direita), a fase é indicada na modulação em AM.

A desvantagem dos pulsos compostos é que eles agem sobre a amostra inteira e não permitem a excitação ou refocalização restrita a um volume bem definido. Para esta finalidade seria necessário aplicar gradientes de campo magnético simultaneamente ao pulso de RF. Estes provocariam uma variação da frequência de ressonância ao longo da amostra, incompatível com a modulação em frequência dos pulsos adiabáticos compostos.

III.4 Gradient Modulated Adiabatic Excitation (GMAX)

Ao invés de aplicar um gradiente constantes durante o pulso adiabático, o que provocaria erros de fase na magnetização resultante, Johnson et al. ^[95] propuseram utilizar pulsos adiabáticos na presença de gradientes modulados. Estes são gradientes cuja magnitude varia temporalmente com uma determinada função de modulação. Para este tipo de experimento deve-se reescrever as equações do item anterior. Utilizando-se a mesma função de modulação para o gradiente e a modulação em frequência resulta em :

$$B_1(\mathbf{r},t) = 2\pi A v(\mathbf{r}) F_1(t) \quad \text{III.5}$$

$$\Delta\omega(\mathbf{r},t) = 2\pi [G_0(\mathbf{r}) - A] F_2(t)$$

onde $G_0(\mathbf{r})$ é a amplitude do campo na posição \mathbf{r} produzido pelo gradiente. É importante que o gradiente possua a mesma dependência temporal que a modulação de RF, sendo $F_2(t)$ a função de modulação. Neste caso existe uma determinada posição \mathbf{r} onde $\Delta\omega$ é zero durante todo o pulso, ou seja um nó espacial é criado em $\Delta\omega$. O nó é localizado perpendicularmente ao gradiente em uma região onde a amplitude do gradiente G_0 é exatamente igual à amplitude da função de modulação em frequência A , sendo $G_0(\mathbf{r}) = A$. Em um dos lados, $\Delta\omega$ começará com amplitude positiva ($G_0(\mathbf{r}) - A > 0$), ou seja B_{EFF} será paralelo à magnetização de equilíbrio. Durante o pulso, $\Delta\omega$ diminuirá para zero trazendo assim a magnetização ao plano transversal. No outro lado do nó a amplitude de $\Delta\omega$ é negativa ($G_0(\mathbf{r}) - A < 0$), ou seja B_{EFF} é antiparalelo à magnetização de equilíbrio. Conforme $F_2(t)$ diminui, $\Delta\omega$ se aproxima para zero deixando a magnetização no plano transversal. Como a magnetização é antiparalela a B_{EFF} na região $G_0(\mathbf{r}) - A < 0$ a magnetização transversal depois do pulso terá uma diferença de fase de 180° relativa à magnetização da região $G_0(\mathbf{r}) - A > 0$.

Um experimento de localização em uma dimensão pode ser entendido da seguinte maneira. Ajustando-se G_0 e/ou A o nó espacial de $\Delta\omega$ pode ser posicionado em qualquer região da amostra. Em uma fase do experimento este nó pode estar na posição, por exemplo, x_0 e na

outra em $-x_0$. Ao se inverter a fase de B_1 na segunda parte do experimento, inverte-se também a fase da magnetização transversal resultante. A soma dos dois sinais resultantes cancela a contribuição do sinal que provém de regiões fora dos nós definidos pelas duas excitações. A figura III.6 mostra esquematicamente o perfil da magnetização transversal depois de duas excitações adiabáticas e o efeito de cancelamento do sinal fora da região de interesse, somando os sinais dos dois experimentos.

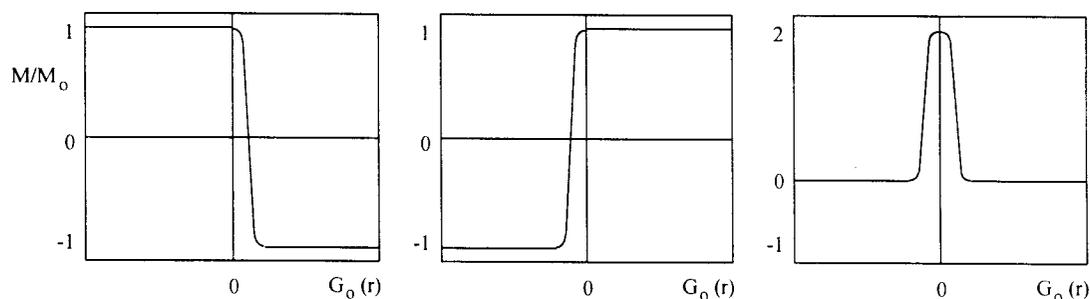


Figura III.6 : O perfil da magnetização transversal normalizada, ao longo da direção r definida pela amplitude $G_0(r)$ do gradiente aplicado, depois de dois pulsos adiabáticos com fase de RF invertida e diferentes amplitudes na modulação em frequência a) e b). Nota-se que a magnetização passa por zero em posições diferentes nos dois experimentos, as posições dos zeros definem dois nós da magnetização. c) Soma da magnetização transversal dos dois experimentos, mostrando o cancelamento do sinal fora da região entre os dois nós.

Para estender este tipo de experimento em três dimensões, é necessário utilizar três pulsos adiabáticos em conjunto com gradientes modulados aplicados em direções ortogonais. Para localizar completamente um volume em três dimensões, analogamente à ISIS, deve ser aplicado um esquema de adição/subtração com no mínimo oito aquisições ^[26,96]. A sequência de pulsos necessária para uma localização completa será discutida em seguida.

III.5 GMAX - 3D

A técnica de localização com pulsos adiabáticos e gradientes modulados para uma dimensão, discutida no item anterior, pode ser estendida para três dimensões ^[96]. Da mesma maneira que a sequência ISIS, um experimento básico deve ser executado repetidamente para cancelar todo o sinal fora do volume de interesse.

Para a localização em três dimensões com a técnica GMAX o experimento básico deve utilizar três pulsos adiabáticos com gradientes modulados, aplicados em três direções ortogonais. Dessa forma, cada um dos pulsos produz um nó espacial na magnetização resultante e os planos que definem os nós são ortogonais entre si. Este experimento básico deve ser repetido no mínimo oito vezes, alterando-se as posições dos nós espaciais e utilizando-se um esquema de adição/subtração para os FID's resultantes. A figura III.7 mostra a sequência de pulsos para o experimento básico de GMAX em três dimensões. A função de modulação dos gradientes é idêntica à da modulação em frequência. Os planos que definem os nós espaciais podem ser posicionados arbitrariamente alterando-se a amplitude da modulação em FM ou, alternativamente, a modulação do gradiente correspondente.

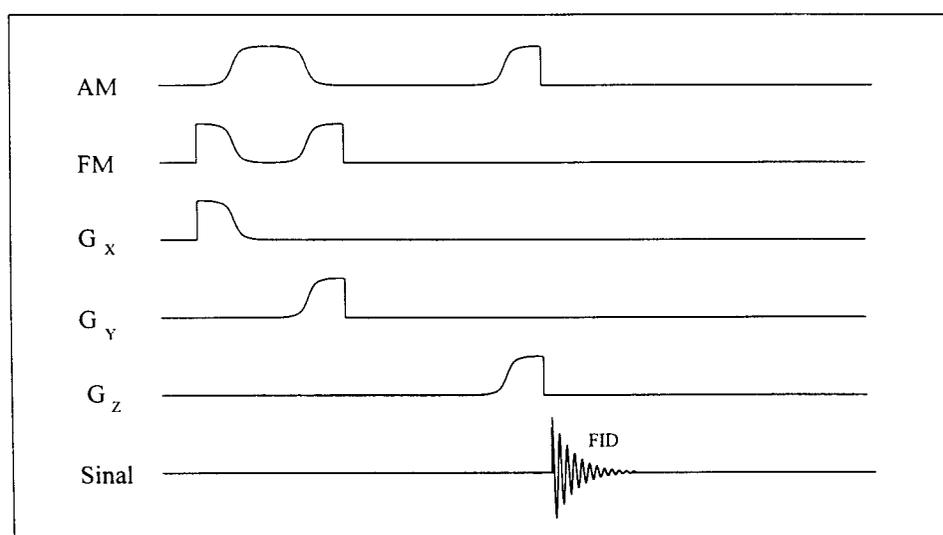


Figura III.7 : Esquema de pulsos necessários para o experimento básico de GMAX - 3D. Os pulsos de RF modulados em AM e FM são aplicados simultaneamente com gradientes modulados nas três direções ortogonais.

Analisando-se o efeito dos três pulsos do experimento básico de GMAX - 3D sobre a magnetização em diferentes regiões considera-se uma amostra cúbica dividida em 27 subvolumes como mostrado na figura III.8. Com o propósito de facilitar a visualização da magnetização nas diferentes partes da amostra definem-se três planos paralelos que interceptam os subvolumes.

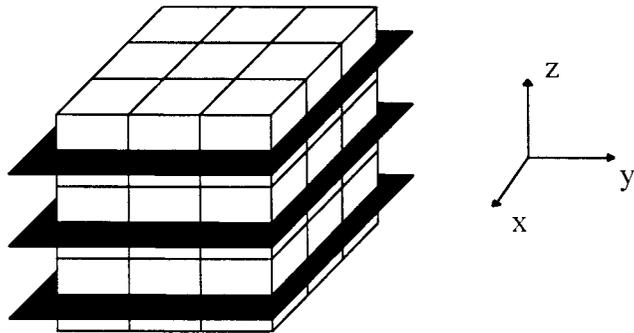


Figura III.8 : Representação de uma amostra cúbica dividida em 27 subvolumes interceptados por três planos.

O primeiro pulso adiabático do experimento é aplicado juntamente com um gradiente modulado na direção x conforme mostrada na figura III.9. Forma-se um nó espacial em forma de um plano perpendicular à direção x como mostrado na figura III.9-a. De um lado deste plano o pulso atua como um pulso de 90° e do outro lado como pulso de -90° . O segundo pulso adiabático é aplicado imediatamente após, mudando-se o gradiente da direção x para a direção y , assim o nó espacial forma-se desta vez em um plano perpendicular à direção y . O efeito sobre a magnetização é novamente o de um pulso de 90° em um lado do plano e um de -90° no outro. Como mostrado na figura III.9-b, depois do segundo pulso a magnetização nas diferentes regiões é paralela ou antiparalela ao eixo longitudinal z , representado por ângulos de 0° e 180° respectivamente. Finalmente, o terceiro pulso com gradiente na direção z , novamente traz a magnetização para o plano transversal desta vez distinguindo regiões na direção z . O resultado dos três pulsos adiabáticos, que pode ser observado na

figura III.9-c, é uma magnetização no plano transversal com fase positiva ou negativa correspondente à posição em relação aos três planos dos nós espaciais.

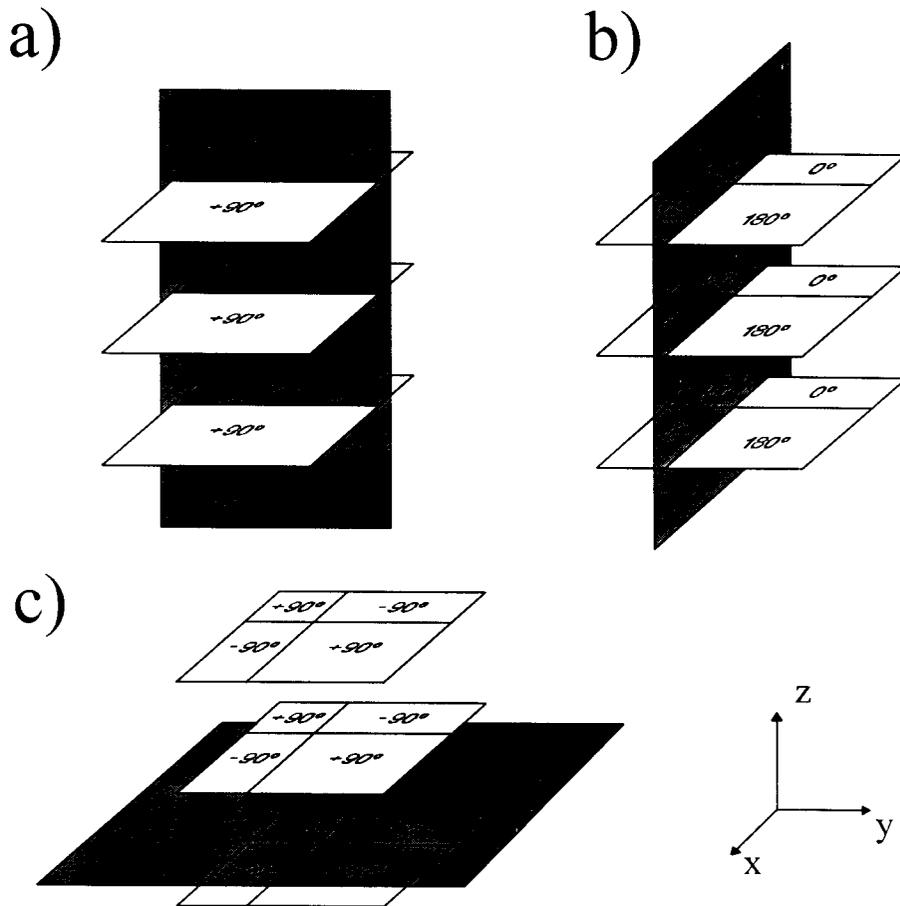


Figura III.9 : Distribuição espacial da magnetização a) depois do primeiro pulso adiabático b) depois do segundo e c) distribuição final.

Este experimento básico deve ser repetido alterando-se as posições dos nós espaciais de tal maneira que a contribuição do sinal fora do subvolume central seja cancelada. Como discutido no item anterior, em uma dimensão isso pode ser realizado com apenas dois experimentos mudando-se a posição do nó espacial e invertendo-se a fase da modulação em AM. No entanto, em três dimensões são necessárias oito combinações para a localização completa. Na tabela III.1 é resumido o esquema de adição/subtração dos oito experimentos. As posições dos nós espaciais nas três direções são representadas com X_i , Y_i e Z_i , onde $i=1,2$ simboliza as duas posições do nó espacial

Número do experimento	pulso com nó espacial na direção x	pulso com nó espacial na direção y	pulso com nó espacial na direção z	contribuição para o espectro
1	X ₁	Y ₁	Z ₁	+1
2	X ₂	Y ₁	Z ₁	- 1
3	X ₁	Y ₂	Z ₁	- 1
4	X ₂	Y ₂	Z ₁	+1
5	X ₁	Y ₁	Z ₂	- 1
6	X ₂	Y ₁	Z ₂	+1
7	X ₁	Y ₂	Z ₂	+1
8	X ₂	Y ₂	Z ₂	- 1

Tabela III.1 : Esquema de adição/subtração para a sequência GMAX 3D. A sigla X_i refere-se a aplicação de um pulso adiabático de 90° na direção X com nó espacial na posição i. A contribuição do sinal pode ser positiva, o FID deve ser somado aos demais, ou negativa, o FID deve ser subtraído.

Na técnica GMAX são adquiridos os FID's imediatamente após o último pulso. Por isso, essa técnica é indicada para a espectroscopia de núcleos com tempos de relaxação T₂ curtos (³¹P e ¹³C). Chamamos atenção que o intervalo no qual a magnetização fica no plano transversal, entre o primeiro e segundo pulso (figura III.7), deve ser curto para não ocorrer defasagem dos momentos magnéticos. Portanto, o segundo pulso é aplicado imediatamente após o primeiro.

Comparando-se a sequências ISIS e GMAX-3D, a segunda possui como vantagem o fato da dinâmica da intensidade do sinal adquirido ser menor. Na técnica ISIS o esquema de localização requer que os pulso de inversão sejam alternadamente ligados e desligados. Na sequência GMAX-3D essa dinâmica pode ser menor porque em todas as aquisições há regiões que contribuem positivamente ao sinal total e outras que contribuem negativamente. Assim, dependendo do posicionamento do volume de interesse as contribuições das diferentes regiões espaciais se cancelam parcialmente.

Como já mencionado na discussão da técnica ISIS, métodos de localização que dependem da combinação de diferentes aquisições para eliminar o sinal fora do volume de interesse, como também GMAX-3D, possuem uma desvantagem séria: as sequências são sensíveis a efeitos devido ao movimento do objeto, o que resulta em erros na subtração dos sinais.

III.6 Aplicação de GMAX unidimensional

Para-se definir um perfil unidimensional na forma de um plano tomográfico com GMAX o experimento básico deve ser executado duas vezes mudando-se a posição do nó espacial, invertendo-se a amplitude do pulso e somando-se os dois sinais adquiridos. Na figura III.10 é mostrada a sequência de pulsos necessária para adquirir uma imagem tomográfica com GMAX.

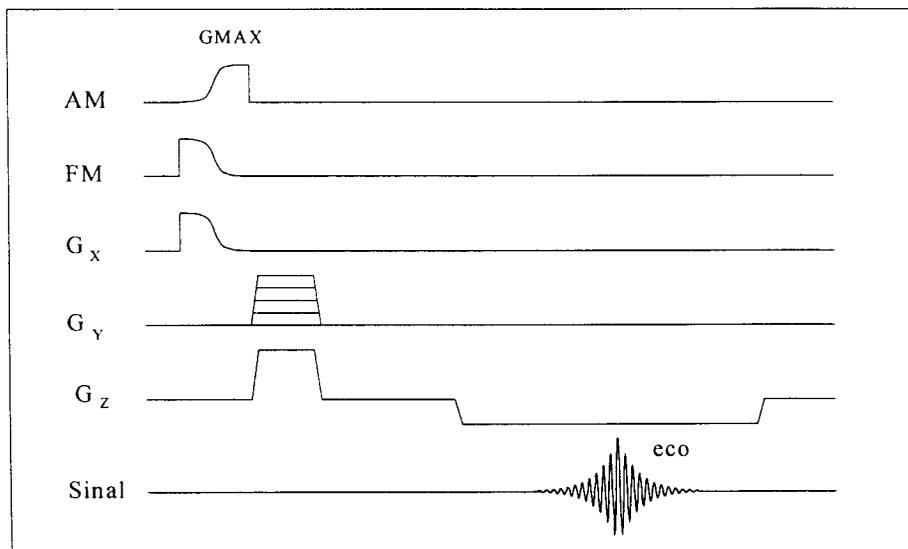


Figura III.10 : Esquema de pulsos necessários para um experimento tomográfico utilizando GMAX.

Por utilizar pulsos adiabáticos essa sequência possui a vantagem de ser insensível a inhomogeneidades de B_1 , e portanto pode ser utilizada

uma bobina de superfície para ambos, a excitação e a detecção do sinal de RMN.

A sequência de pulsos da figura III.10 foi utilizada para verificar a insensibilidade da técnica a variações de B_1 . Foi adquirida uma imagem com um pulso adiabático usando-se uma bobina de superfície para excitação tal como para aquisição. A potência utilizada foi a mesma que aquela usada na aquisição com um pulso convencional mostrada na figura III.1 esquerda. Observou-se no resultado da figura III.11 que o sinal é distribuído muito mais uniformemente no experimento com o pulso adiabático que naquela com um pulso convencional (figura III.1 esquerda), os spins foram excitados com o ângulo correto de 90° apesar de uma grande variação na amplitude de B_1 . Devido ao perfil de sensibilidade da bobina de superfície, importante na aquisição, o sinal diminui com a distância à bobina.

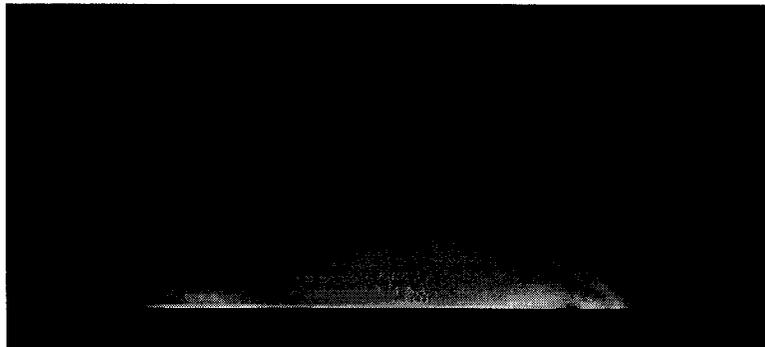


Figura III.11 : Imagem adquirida com GMAX unidimensional (figura III.10) utilizando uma bobina de superfície mostrando a homogeneidade da excitação com pulsos adiabáticos. A potência do pulso é a mesma da figura III.1(esquerda).

Foi realizado um teste de localização com a sequência GMAX unidimensional trocando-se a direção do gradiente modulado (seleção) para a direção x, desta forma adquiriu-se imagens que mostram o perfil do plano selecionado pelo pulso adiabático. Na figura III.12 é mostrado o perfil de três fatias de 3 cm localizados em posições diferentes da amostra.

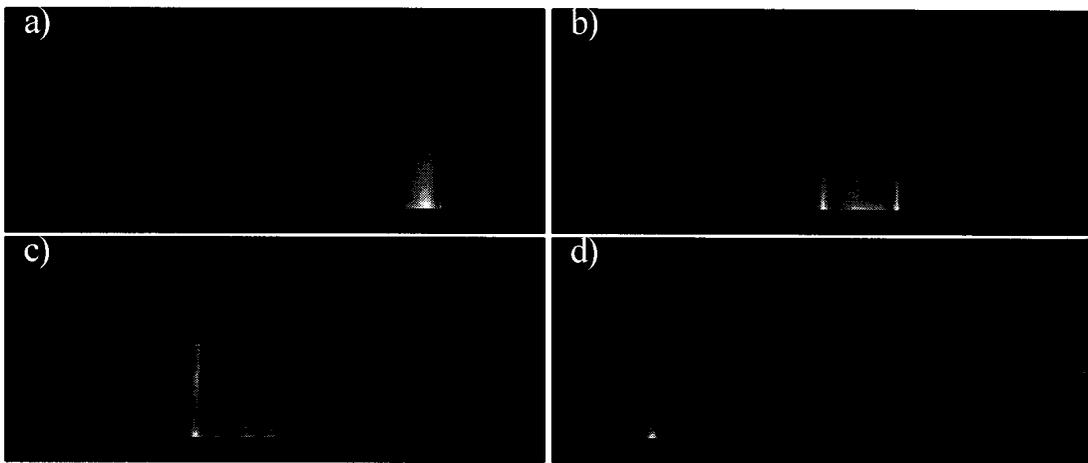


Figura III.12 : Imagens com plano selecionado perpendicular à imagem mostrando o perfil de seleção em diferentes posições ao longo da amostra. A espessura do plano selecionada é 3 cm usando os pulsos NOM da figura III.4

Observa-se que a posição do perfil como também sua largura podem ser escolhidos arbitrariamente. Este é um dos pré-requisitos para que uma técnica de espectroscopia localizada seja flexível suficiente para aplicações *in vivo*. Nota-se que no centro da bobina a localização é melhor, principalmente no lado esquerdo (figura III.12-d) permanece um sinal fora do plano selecionado perto do fio da bobina. Esta é localizada perpendicular à imagem logo abaixo da amostra. A imperfeição da localização é devido ao sinal, extremamente forte nessa região mais sensível da bobina, não ter se anulado completamente nas duas aquisições necessárias para a localização. As regiões escuras dentro do perfil selecionado são devido a inhomogeneidades do campo estático B_0 .

Capítulo IV

Resultados de espectroscopia de ^{13}C

Neste capítulo vamos apresentar resultados de espectroscopia de ^{13}C obtidos no *Centro de Pesquisa sobre Câncer* (Deutsches Krebsforschungszentrum - DKFZ) em Heidelberg - Alemanha. Utilizamos dois sistemas de RMN diferentes, um espectrômetro experimental da firma VARIAN/SISCO baseado em um ímã supercondutor horizontal de 2 Teslas com bore de 30 cm e um tomógrafo comercial SIEMENS Magnetom - SP de 1.5 Teslas equipado para espectroscopia de ^1H , ^{31}P e ^{13}C . O sistema experimental foi utilizado para escolha e otimização de uma metodologia para aplicações de espectroscopia localizada de ^{13}C . Portamos essa metodologia otimizada para o sistema comercial e aplicamos a num experimento com um voluntário humano. Ainda apresentamos o resultado de um experimento de espectroscopia de ^{13}C com desacoplamento de ^1H na panturrilha do mesmo voluntário.

IV.1 Objetivo

A espectroscopia por RMN é uma ferramenta poderosa na pesquisa sobre câncer sendo utilizada para ajudar identificar tumores ^[44] tal como para acompanhar o tratamento ^[57] por quimio e/ou radioterapia. A ressonância magnética possui a vantagem de ser não invasiva, o que é muito importante em casos de tumores cerebrais. No entanto, nesses tumores é muitas vezes difícil realizar o acompanhamento do tratamento radioterapêutico utilizando experimentos de espectroscopia por RMN. Isto ocorre porque muitas substâncias indicadas como marcadores para

RMN não conseguem penetrar a barreira hemoencefálica (*blood-brain barrier* - BBB).

Uma substância indicada para investigar o metabolismo de tumores é a glicose, ela possui a vantagem de ser de fácil acesso, não ser tóxica e conseguir penetrar a barreira hemoencefálica. Sendo importante para o abastecimento energético dos órgãos, a glicose pode indicar alterações no metabolismo energético das células. Em tumores, por exemplo, espera-se um metabolismo mais acelerado que deve ser observável através de uma maior concentração de glicose, seus derivados e seus produtos de decomposição.

Contudo, o estudo do metabolismo da glicose em espectroscopia de ^1H é difícil porque os sinais da glicose encontram-se muito perto da ressonância da água, dificultando assim a supressão de água (item II.2). Além disso, os sinais de glicose em ^1H são sobrepostos por sinais de outros metabólitos (figura I.2 e IV.2). Alternativamente, a glicose pode ser observada em espectroscopia de ^{13}C com a vantagem da grande faixa de deslocamento químico desse núcleo (tabela I.3), que facilita a identificação das linhas nos espectros.

O objetivo do nosso trabalho executado no DKFZ foi a utilização da espectroscopia localizada de ^{13}C para monitorar o metabolismo de glicose em tecidos cancerígenos. O trabalho não chegou à aplicação em pacientes devido a baixa sensibilidade do núcleo ^{13}C e dificuldades jurídicas na utilização de produtos enriquecidos em ^{13}C em humanos. No entanto, chegamos a indicar uma metodologia otimizada para estudos *in vivo* baseando-se em experimentos de ^{13}C em abundância natural. Nos experimentos apresentados nos próximos itens utilizamos as técnicas PRESS, STEAM e CSI discutidas no capítulo II. Descartamos as técnicas ISIS (item II.7) e GMAX (item III.4) por causa da sua sensibilidade ao movimento, incompatível com a utilização em um ambiente clínico.

IV.2 Espectroscopia de glicose (^1H) em 2 Teslas

Utilizamos uma amostra de glicose em solução aquosa para experimentos de espectroscopia localizada de ^1H com a técnica PRESS precedida por um pulso supressão de água CHESS (item II.2). A localização, nesse exemplo, foi necessária para limitar o volume da amostra em 8 ml, garantindo assim uma boa homogeneidade do campo de RF e fazendo com que a supressão de água fosse eficiente. O espectro resultante é apresentado na figura IV.1, mostrando uma distorção da forma das linhas devido a efeitos de *eddy currents*. Usamos o método descrito no item II.4 para correção desses efeitos por pós-processamento utilizando a multiplicação da fase com uma referência. Obtivemos os dados de referência com um experimento sem supressão de água, o espectro resultante desse experimento é mostrado na figura IV.2. Observamos uma assimetria da linha de água provocada pelos efeitos de *eddy currents*.

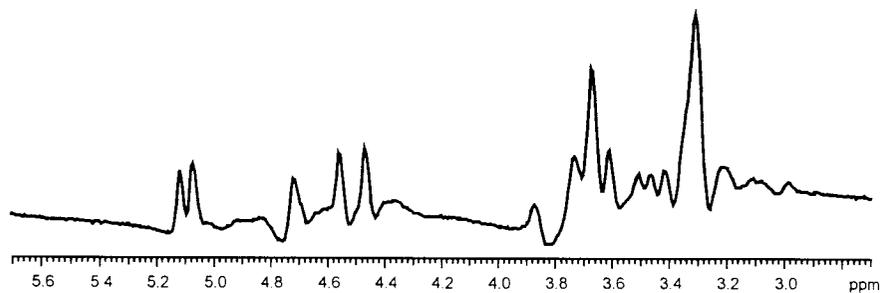


Figura IV.1 : Espectro ^1H de glicose em solução aquosa com supressão de água.

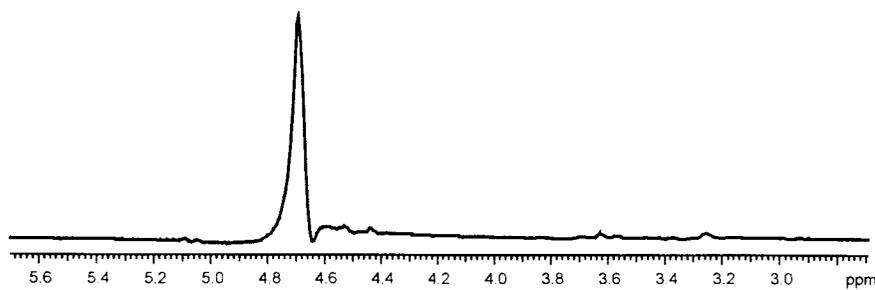


Figura IV.2 : Espectro ^1H de glicose sem supressão de água utilizado como referência para corrigir as distorções da forma das linhas do espectro da figura IV.1

Mostramos na figura IV.3 o espectro corrigido. Observamos que todas as linhas associadas à glicose estão em modo de absorção enquanto a linha de água restante, depois da supressão, encontra-se em modo dispersivo, sendo este um efeito associado à técnica de supressão de água. Além disso, a linha de base relacionada à correção de uma fase linear no espectro IV.1, desapareceu no espectro corrigido (figura IV.3), sendo esta uma vantagem adicional da técnica de pós-processamento.

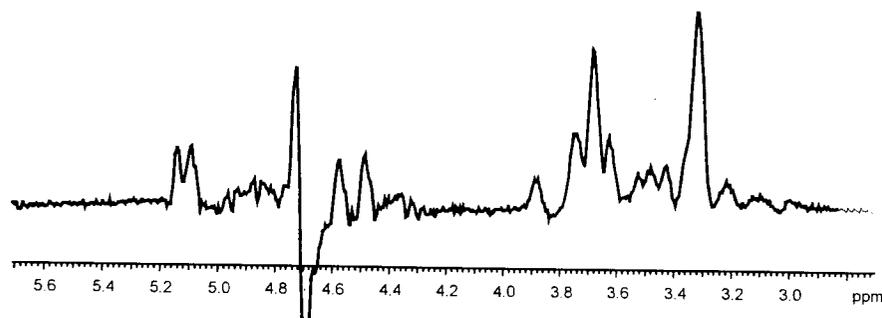


Figura IV.3 : Espectro ^1H de glicose com correção dos *eddy currents*.

Comparando o espectro acima com um espectro típico de ^1H como o da figura I.2 observamos que muitas das linhas da glicose encontram-se na região de 3-4 ppm superpondo-se então às linhas da creatina, colina e inositol. Além disso, existem dois pares de ressonância extremamente pertos da ressonância da água, que em um experimento *in vivo*, são difíceis de resolver por causa de imperfeições na supressão de água.

IV.3 Espectroscopia de glicose (^{13}C) em 2 Teslas

Na figura IV.4 mostramos um espectro não localizado de ^{13}C da amostra de glicose em solução aquosa. O espectro foi adquirido sem desacoplamento, já que o espectrômetro experimental VARIAN/SISCO de 2 Teslas não dispõe de um segundo canal para desacoplamento de ^1H .

Mostramos na figura IV.5 a configuração do β -isômero de glicose, no α -isômero o grupo OH do primeiro átomo de carbono aponta para cima. Em solução aquosa as duas configurações da glicose se encontram em um equilíbrio dando origem aos dois dubletos 11/13 e 10/12 do espectro da figura IV.4. Os demais sinais contêm os dubletos dos núcleos 2,3,4 da figura IV.5, um singlete do núcleo 5 e um tripleto do núcleo 6.

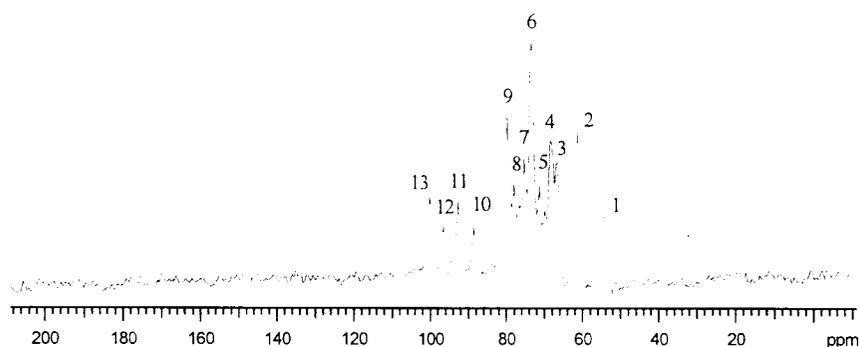


Figura IV.4 : Espectro ^{13}C de glicose em solução aquosa. As posições das linhas são resumidas na tabela IV.1

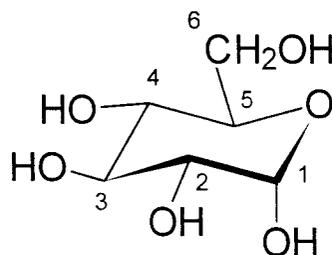


Figura IV.5 : Configuração do β -isômero de glicose.

Para localizar as ressonâncias da glicose no músculo esquelético (figura I.3) executamos um experimento *in vitro* com as duas substâncias em conjunto. O espectro resultante desse experimento é apresentado na figura IV.6 mostrando as ressonâncias da glicose na região do glicerol.

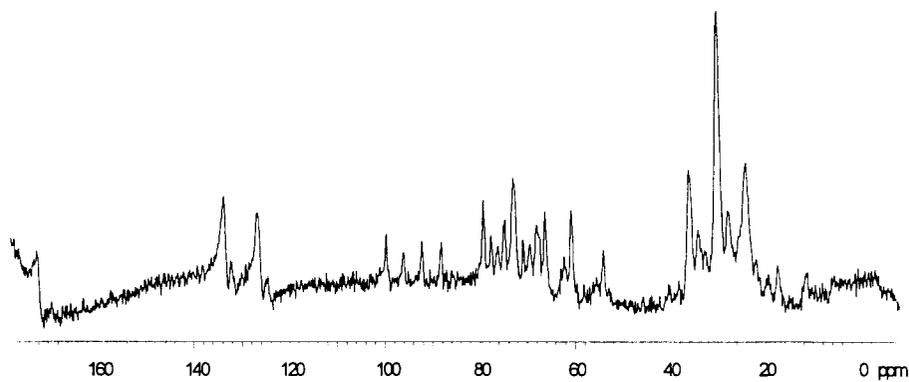


Figura IV.6 : Espectro ^{13}C obtido com a combinação de amostras de músculo e de glicose em solução aquosa.

IV.4 Tempos de relaxação em 2 Teslas

A intensidade do sinal de RMN é uma função dos tempos de relaxação T_1 e T_2 e portanto é importante ter conhecimento dos seus valores nos tecidos a serem investigados. Utilizamos as técnicas *Inversion recovery* (IR) e *Spin Echo* (SE) para medir T_1 e T_2 em glicose e músculo esquelético *in vitro* no espectrômetro experimental VARIAN/SISCO de 2 Teslas. Na sequência IR foram utilizados dois pulso adiabáticos tipo sech de 180° e 90° respectivamente, na sequência SE um pulso sech (90°) para excitação e um pulso BIR-1 (180°) para refocalização.

Nas tabela IV.1 e IV.2 identificamos os conjuntos de picos e seus tempos de relaxação de glicose e músculo, respectivamente. Observamos que os tempos de relaxação da glicose variam ligeiramente em torno de $T_1 = 650$ ms e $T_2 = 120$ ms enquanto os de músculo possuem uma variação muito maior. Observamos na tabela IV.2 que metila e carbonila possuem T_1 longo, enquanto glicerol tem T_1 e principalmente T_2 curto. Esses dois achados são importantes na escolha dos tempos de repetição (TR) e tempos ao eco (TE) nas sequência de espectroscopia.

Nr.	δ (ppm)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
1	54.2	470±11	99±8
2	60.9	371±6	106±5
3	66.3	679±10	115±6
4	68.1	616±10	132±6
5	71.0	689±16	123±9
6	73.0	686±7	119±5
7	75.1	686±13	143±5
8	77.6	681±12	137±10
9	79.3	705±8	133±8
10	88.3	679±20	166±15
11	92.4	679±11	127±8
12	96.2	689±18	188±11
13	99.9	700±16	129±8

Tabela IV.1 : Tempos de relaxação de glicose em solução aquosa. Número das ressonâncias conforme indicado na figura IV.4

metabólito	δ (ppm)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
metila	11.6	1144±44	44±5
metila	17.5	688±16	33±3
metileno	24.3	180±5	16±1
metileno	30.0	231±2	24±1
metileno	35.9	180±4	16±1
glicerol	55.5	42±6	10±2
glicerol	62.3	43±2	12±1
glicerol	65.8	94±11	19±2
glicerol	69.3	57±6	12±3
Glicerol	72.9	96±16	24±2
C insaturado	126.5	266±6	36±2
C insaturado	133.6	296±6	38±2
carbonila	172.0	973±21	43±2

Tabela IV.2 : Tempos de relaxação de músculo esquelético *in vitro*.

Devido aos tempos de relaxação, precisamos escolher TR longo para observar metila e carbonila. Na medida de T_2 observamos que este tempo de relaxação varia entre ~15 ms (glicerol) e ~45 ms (ácidos lipídicos não saturados) tornando assim a escolha de uma sequência com TE curto indispensável.

IV.5 Comparação da sequências CSI e STEAM em espectroscopia localizada de ^{13}C em 2 Teslas

Nos experimentos de CSI realizados no espectrômetro experimental VARIAN/CISCO utilizamos a sequência ilustrada na figura II.10 com uma bobina de superfície de 2 cm de diâmetro. Otimizamos a sequência de pulsos para minimizar o artefato de localização na seleção do plano mostrado e minimizar os efeitos de *eddy currents*. Mostramos na figura IV.7 os resultados obtidos *in vitro* com uma amostra de músculo esquelético. A fatia de 1.6 cm de espessura (THK) foi posicionada 0.6 cm acima da bobina de superfície.

Mostramos quatro mapas de metabólitos sendo os de carbonila, carbonos insaturados, glicerol e do grupo metileno dos ácidos graxos, integrados em intervalos de 10, 20, 30 e 30 ppm respectivamente. Mostramos também um espectro de uma região central no plano onde indicamos os limites de integração para os mapas metabólitos.

Notamos que no espectro todos os picos são visíveis, o de carbonila sendo relativamente fraco devido ao seu T_1 longo em combinação com $TR = 52$ ms curto. Tivemos que trabalhar com TR curto por causa da dupla codificação de fase da sequência CSI que aumenta o número de aquisições e portanto a duração do experimento consideravelmente. A duração de experimento (T_{TOT}) foi 28 minutos com 512 promediações (N_{AVG}) e uma matriz de aquisição de 8x8 pontos em um *field of view* (FOV) de 8x8 cm. No processamento dos mapas metabólitos foi feito *zero filling* para 16x16 pontos. Na direção espectral foram adquiridos 512 pontos, aplicando *zero filling* para 1024 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 10 Hz.

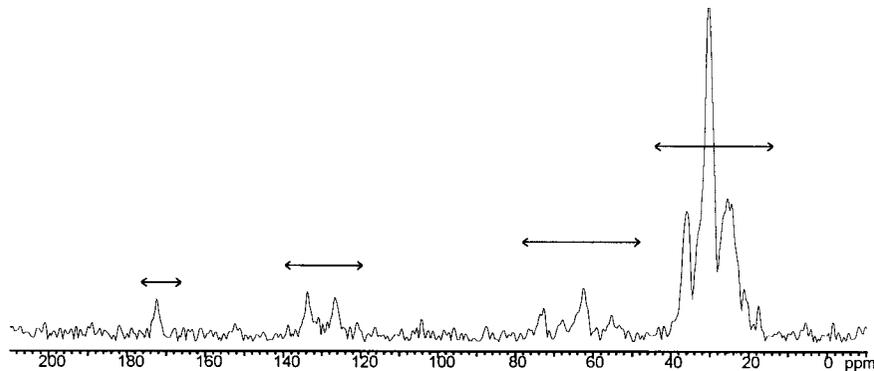
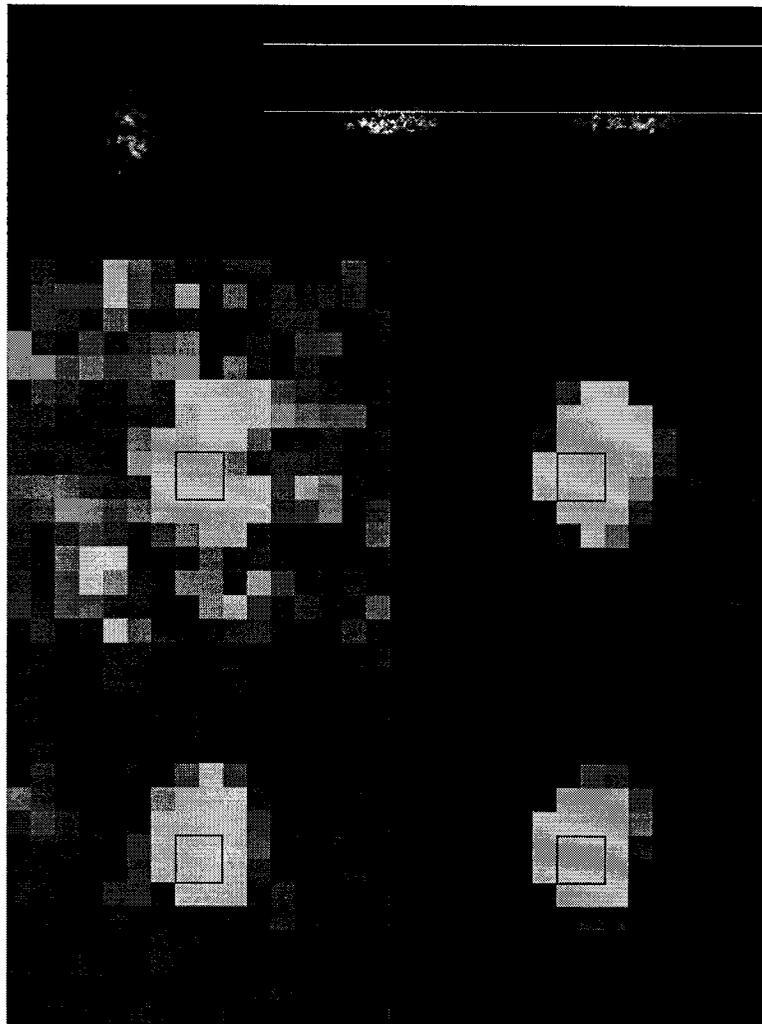


Figura IV.7 : Experimento de ^{13}C - CSI *in vitro* de uma amostra de músculo esquelético em direção coronal. Acima as imagens localizadoras H^1 indicando o posicionamento da fatia localizada, no meio os mapas metabólitos de carbonila, carbonos insaturados, glicerol e do grupo metileno, integrados em intervalos de 10, 20 30 e 30ppm, respetivamente, como indicado no espectro da região central abaixo. Parâmetros experimentais : $\text{TR}=52\text{ms}$, $N_{\text{AVG}}=512$, $T_{\text{TOT}}=28\text{min}$, $\text{THK}=1.6\text{cm}$, $\text{FOV}=8\times 8\text{cm}$, resolução espacial 8×8 pontos com zero filling para 16×16 .

Utilizamos a sequência STEAM discutida no item II.5 em um experimento *in vitro* com a mesma amostra de músculo e otimizada da mesma forma como acima. Antes de adquirir o espectro localizado em ^{13}C utilizamos a mesma sequência STEAM em ^1H para a homogeneização do campo B_0 no volume de localização (*shimming local*).

O volume selecionado foi de $\text{VOI} = 2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$ posicionado como indicado nas imagens localizadoras. Adquirimos 2048 pontos, aplicamos *zero filling* para 4096 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 5Hz, com um tempo de aquisição de 30 minutos.

Apesar da resolução espectral ser muito melhor nos espectros obtidos pela sequência STEAM consideramos este ultimo resultado insatisfatório para um tempo de aquisição de 30 minutos. Comparando-se com os resultados obtidos com CSI observamos que essa técnica é mais indicada para espectroscopia localizada em C^{13} .

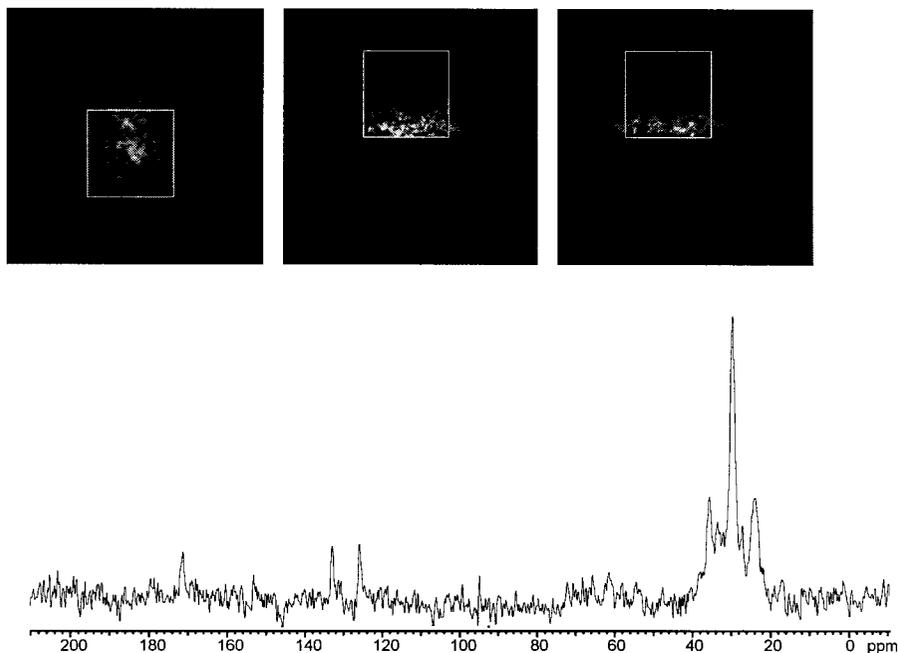


Figura IV.8 : Espectro ^{13}C da amostra de músculo esquelético obtido com a sequência STEAM. Acima as imagens localizadoras H^1 . Parâmetros experimentais: $\text{TR}=140\text{ms}$, $\text{TE}=8\text{ms}$, $\text{VOI}=2 \times 2 \times 2\text{cm}$, $\text{N}_{\text{AVG}}=12288$, $\text{T}_{\text{TOT}}=30\text{min}$.

O artefato de localização (item II.8) nos dois experimentos acima é apenas 0.5cm entre os sinais do grupo metileno e da carbonila. Isso é devido ao gradiente forte de 70mT/m produzido pelas bobinas de gradiente ativamente blindadas do espectrômetro experimental VARIAN/SISCO.

IV.6 Resultados de espectroscopia *in vivo* de ^{13}C em 2 Teslas

Executamos um experimento de espectroscopia de ^{13}C *in vivo* em um rato com um tumor de próstata (AT1) induzido. O experimento foi planejado para utilizar a sequência CSI com duração da aquisição de duas horas e os demais parâmetros idênticos ao experimento, da figura IV.7. Por falha do sistema de gradientes durante o experimento somente foi possível adquirir um espectro não localizado mostrado na figura IV.9.

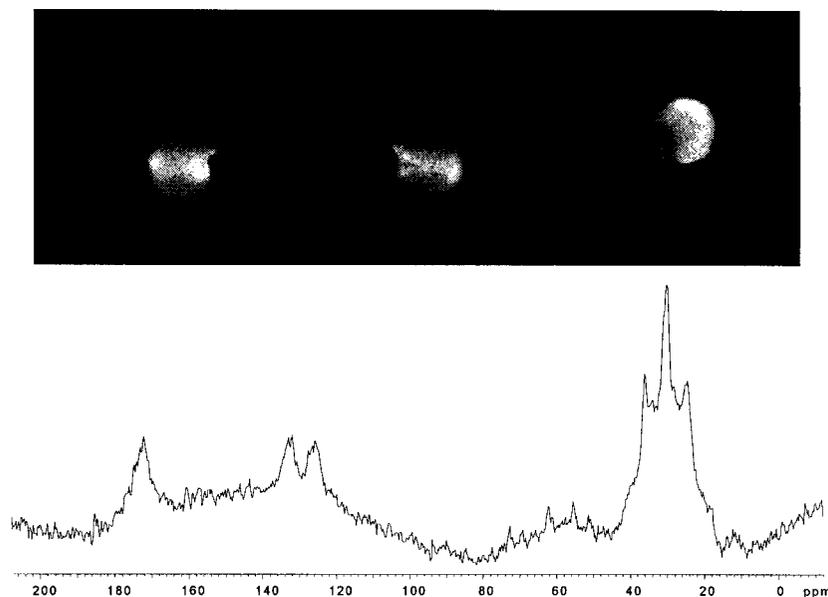


Figura IV.9 : Imagens ^1H em direções sagital, transversal e coronal (acima) e espectro ^{13}C não localizado de um tumor de próstata induzido em um rato. $\text{TR}=110$, $N_{\text{AVG}}=8192$, $T_{\text{TOT}}=15\text{min}$.

A bobina de superfície foi posicionada assim que o tumor inteiro, localizado da perna posterior do rato, encontrava-se dentro da bobina. A posição da bobina pode ser observada como pequena sinuosidade nas imagens localizadoras sagital (esquerda) e transversal (centro).

O espectro acima mostra uma linha de base distorcida comumente encontrada em experimentos *in vivo*, uma correção de linha de base como discutido no item II.10 não foi aplicada. Observamos a baixa amplitude das linhas do glicerol, e a não identificação de glicose. Isso implica na necessidade de injeção de glicose enriquecida em ^{13}C que, no experimento acima, não foi possível por causa do alto custo do produto. Nos experimentos em humanos, discutidos nos próximos itens, também não foi possível utilizar produtos enriquecidos em ^{13}C , devido a problemas jurídicos, relacionados à injeção de substâncias não permitidas para seres humanos.

IV.7 Resultados de CSI em ^{13}C obtidos no sistema SIEMENS Magnetom - SP de 1.5 Teslas

No Tomógrafo de corpo inteiro (Siemens Magnetom SP) implementamos a técnica CSI (figura II.6) já existente para o núcleo ^{31}P , adaptamos essa sequência para nossos experimentos em ^{13}C . A mudança do núcleo no sistema Siemens envolve várias modificações no código de baixo nível que controla o espectrômetro. Os experimentos foram realizados utilizando uma bobina sintonizada em ^1H na configuração de um par de Helmholtz com eixo na direção x (horizontal na figura IV.10) utilizada para a aquisição das imagens localizadoras. Para a aquisição em ^{13}C , foi utilizada uma bobina com a mesma configuração, de menor extensão e seu eixo na direção y (vertical na figura II.10). A aquisição dos espectros de ^{13}C foi feita sem desacoplamento devido a limitações do *duty cycle* do amplificador de ^1H . Para manter o *duty cycle* abaixo do máximo permitido, experimentos com desacoplamento iriam exigir um tempo de repetição (TR) muito maior que o utilizado, resultando em uma duração injustificável do experimento.

Como observamos no item anterior, a técnica CSI possui a vantagem sobre STEAM de fornecer num tempo de aquisição idêntico mais informações. Portanto executamos um teste com essa sequência no sistema SIEMENS Magnetom - SP utilizando uma amostra de óleo vegetal. Os resultados são apresentados na figura IV.10. Mostramos quatro mapas metabólicos sendo os de carbonila, carbonos insaturados, glicerol e do grupo metileno dos ácidos graxos. Os mapas metabólicos foram obtidos integrando o sinal nos intervalos indicados nos espectros abaixo. O tempo da aquisição foi 15 minutos com uma matriz de 16x16 pontos em um FOV de 256x256 mm.

No processamento dos mapas metabólicos foi aplicado *zero filling* para 32x32. Na direção espectral foram adquiridos 1024 pontos, aplicado *zero filling* para 2048 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 10 Hz. No pós-processamento dos espectros foi feita uma correção de fase de primeira ordem e em seguida uma correção de linha de base como discutido no item II.10.

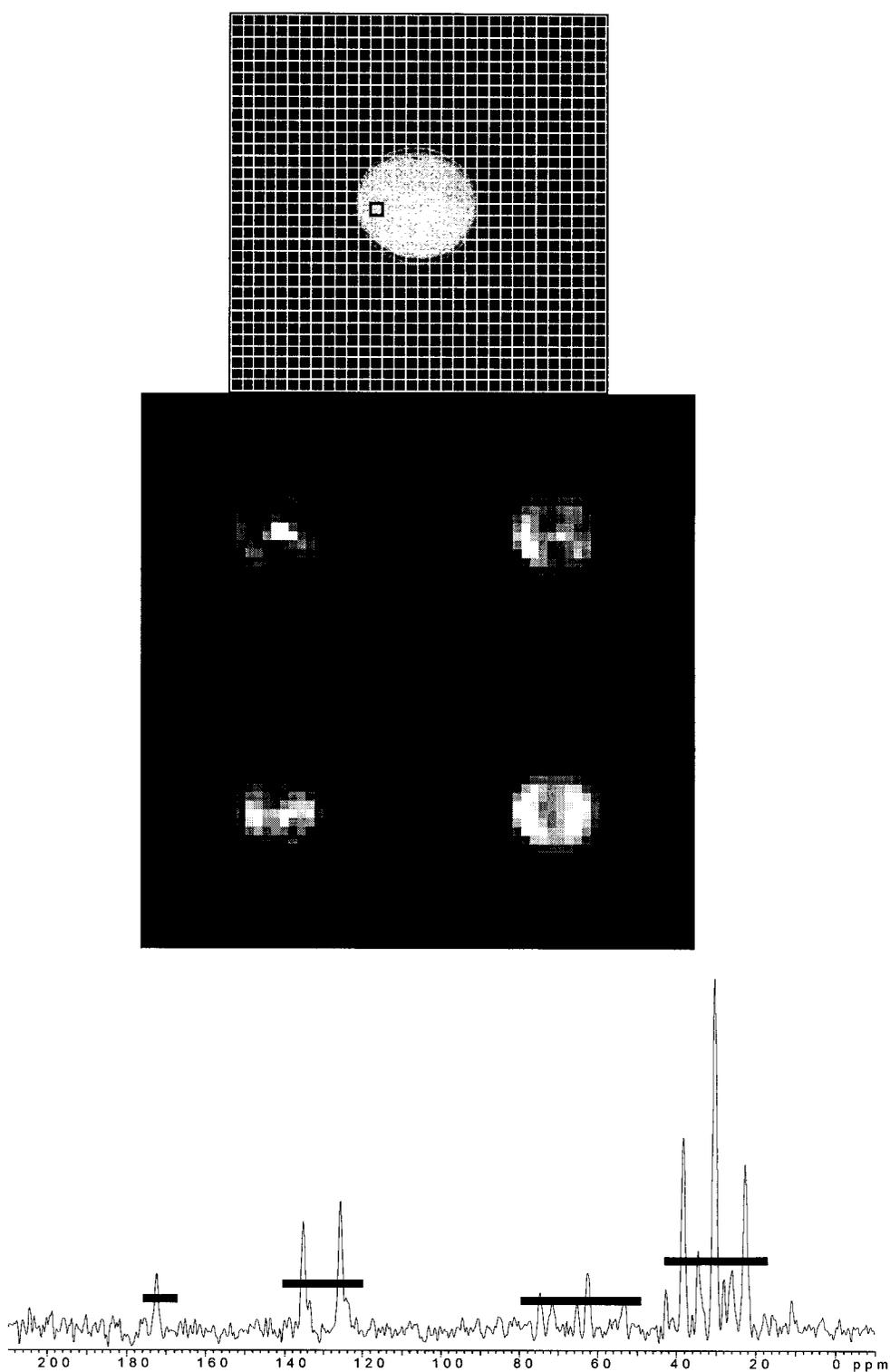


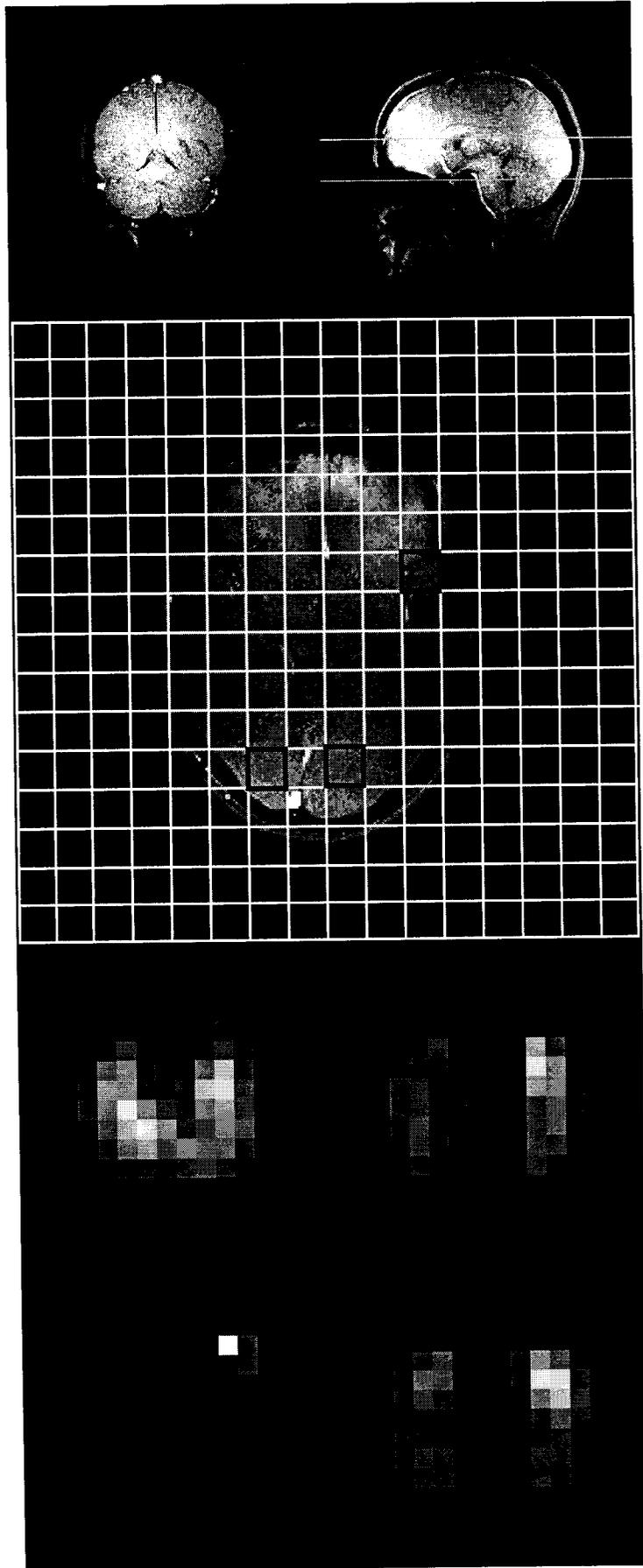
Figura IV.10 : Experimento de ^{13}C - CSI executado com amostra de óleo vegetal em direção coronal. Acima a imagens H^1 , no meio os mapas metabólicos de carbonila, carbonos insaturados, glicerol e do grupo metileno dos ácidos graxos, respectivamente, integrados nos intervalos indicado no espectro abaixo. Parâmetros experimentais : $\text{TR}=110\text{ms}$, $\text{THK}=4\text{cm}$, $\text{FOV}=25.6\text{cm}$, resolução 16×16 com zero filling para 32×32 , $N_{\text{AVG}}=32$, $T_{\text{TOT}}=15\text{min}$.

No processamento dos mapas metabólicos foi aplicado *zero filling* para 32x32. Na direção espectral foram adquiridos 1024 pontos, aplicado *zero filling* para 2048 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 10 Hz. No pós-processamento dos espectros foi feita uma correção de fase de primeira ordem e em seguida uma correção de linha de base como discutido no capítulo II.10.

A espessura da fatia foi 4cm, com um artefato de localização de 6 cm entre os sinais do grupo metileno e da carbonila. O metabólito metileno está deslocado 3cm para cima da fatia indicada na imagem localizadora e a carbonila é deslocada 3 cm para baixo. Este grande artefato de localização deve-se ao fato de que não foi possível utilizar o gradiente total permitido pelo sistema Siemens (10 mT/m). Isso devido ao aumento excessivo da potência do pulso de RF utilizado para seleção da fatia (veja discussão no item II.8)

Na figura IV.11 mostramos um experimento de CSI em um voluntário humano. O tempo da aquisição foi 30 minutos com uma matriz de 8x8 pontos em um FOV de 300x300 mm. No processamento dos mapas metabólicos foi feito *zero filling* para 16x16. Na direção espectral foram adquiridos 1024 pontos, aplicando *zero filling* para 2048 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 10 Hz. Aplicamos a correção de linha de base como descrito anteriormente. Mostramos três espectros de regiões diferentes como indicado na imagem localizadora H^1 acima. Observamos que nos espectros occipitais a intensidade do metabólito carbonila é elevada. Este fato mostra-se também nos mapas metabólicos. Notamos que o sinal de C^{13} provem principalmente de lipídios da gordura que se encontra em volta da massa cerebral. Além da carbonila na região occipital, somente o sinal do grupo metileno é intenso suficiente para fornecer um sinal significativo em outras regiões.

O artefato de localização é o mesmo como no experimento da figura IV.11. O metabólito metileno é deslocado 3cm na direção superior em relação à fatia indicada na imagem localizadora e a carbonila deslocado 3 cm em direção inferior.



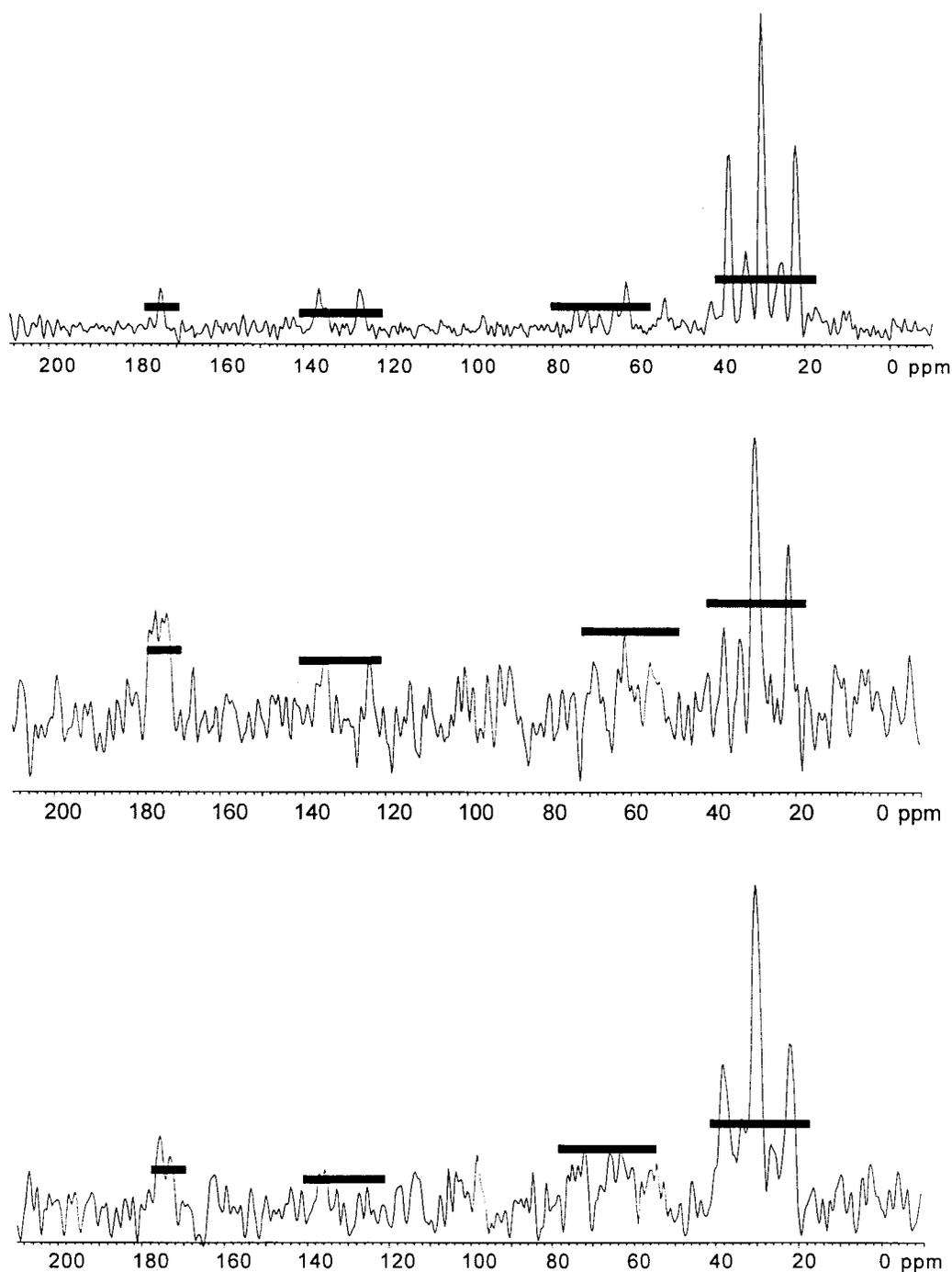


Figura IV.11 : Experimento de ^{13}C - CSI em um voluntário humano. Acima a imagens localizadoras H^1 , no meio os mapas metabólicos de carbonila, carbonos insaturados, glicerol e do grupo metileno, integrados nos intervalos indicado nos espectros abaixo. Os espectros foram extraídos de três regiões nas posições indicadas na imagem H^1 transversal, sendo frente esquerda, occipital esquerda e occipital direita. Observe-se que nos espectros occipitais a intensidade da carbonila é elevada e que o glicerol não foi possível de ser detectado. Parâmetros experimentais : $\text{TR}=110\text{ms}$, $\text{THK}=4\text{cm}$, $\text{FOV}=30\text{cm}$, resolução 8×8 com *zero filling* para 16×16 , $N_{\text{AVG}}=256$, $T_{\text{TOT}}=30\text{min}$.

IV.8 Resultados de ^{13}C com desacoplamento em 1.5 Teslas

Executamos experimentos com desacoplamento em ^1H com a técnica WALTZ-16 [80,81]. Utilizamos a amostra de óleo vegetal com uma bobina de superfície de dupla ressonância. Adquirimos 1024 pontos, aplicando *zero filling* para 2048 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 10Hz. Mostramos na figura IV.12 um espectro não localizado sem desacoplamento, na figura IV.13 com desacoplamento em condições idênticas e identificamos na tabela IV.3 os picos do espectro desacoplado. Observamos que os picos dos carbonos inaturados e glicerol são, no espectro não desacoplado, dubletos que colapsam no desacoplamento numa única linha.

Chamamos atenção ao tempo de repetição (TR) longo, necessário devido às limitações do *duty cycle* do amplificador de ^1H utilizado para o desacoplamento.

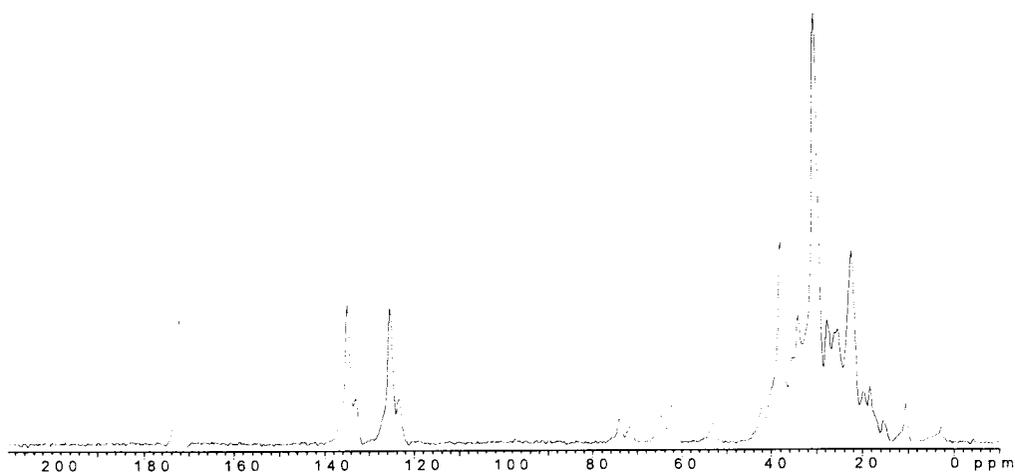


Figura IV.12 : Espectro da amostra de óleo vegetal não localizado sem desacoplamento. Parâmetros experimentais: TR=1500ms, $N_{\text{AVG}}=600$, $T_{\text{TOT}}=15\text{min}$.

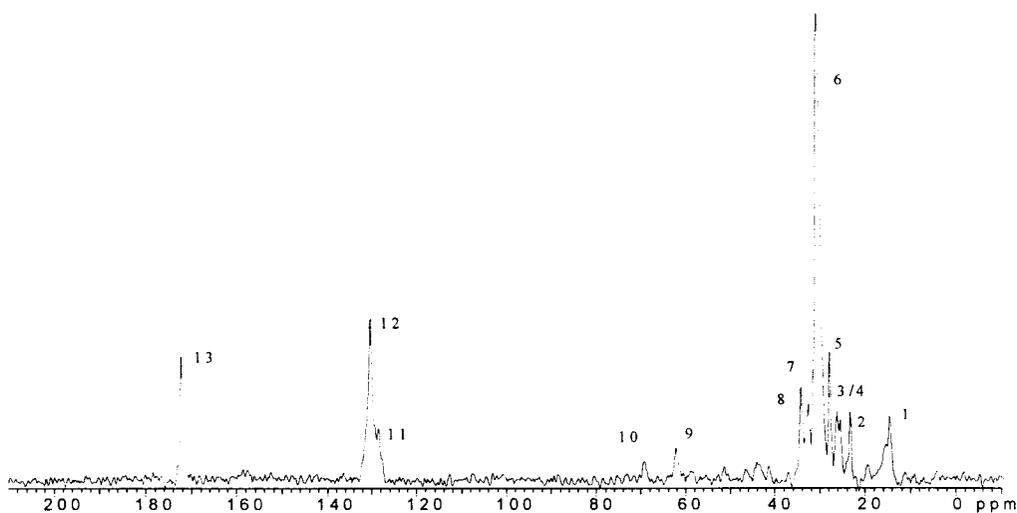


Figura IV.13 : Espectro da amostra de óleo vegetal com desacoplamento utilizando WLATZ-16 [80,81]. Parâmetros experimentais: TR=1500ms, $N_{\text{AVG}}=600$, $T_{\text{TOT}}=15\text{min}$.

Nr.	posição (ppm)	metabólito
1	14.2	$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
2	23.3	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3-$
3	25.4	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$
4	26.2	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$
5	27.7	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
6	30.0	$[-\text{CH}_2-]_n$
7	32.5	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3-$
8	34.2	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$
9	62.1	glicerol- C_1, C_3
10	69.5	glicerol- C_2
11	128.2	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$
12	130.4	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$
13	172.1	$\text{R}-\text{O}-\text{CO}-\text{R}'$

Tabela IV.3 : Identificação de picos da figura IV.13. O pico de metileno em 30ppm serve como referência interna.

Executamos um experimento de espectroscopia de ^{13}C em um voluntário humano com desacoplamento em H^1 . Mostramos na figura IV.14 um espectro da região da panturrilha (*calf muscle*) localizado em uma fatia de 4 cm como indicado na imagem localizadora. Adquirimos 1024 pontos, aplicando *zero filling* para 2048 e um filtro exponencial de alargamento de linha de 10 Hz.

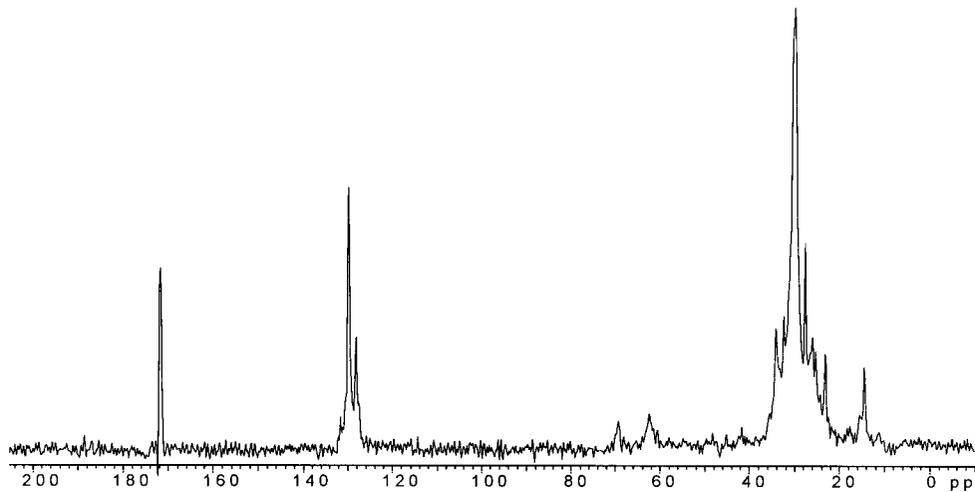
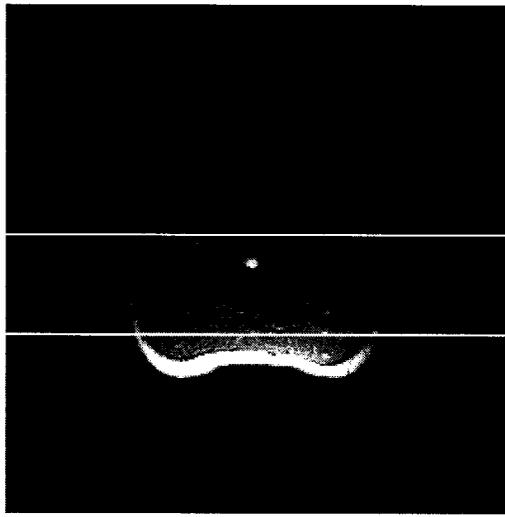


Figura IV.14 : Espectro da panturrilha (*calf muscle*) de um voluntário com desacoplamento utilizando WLATZ-16 ^[80,81]. Parâmetros experimentais: TR=2000ms, N_{AVG}=900, T_{TOT}=30min.

O artefato de localização é o mesmo que o do experimento anterior, sendo o sinal do grupo metileno deslocado 3cm para cima. Essa é a razão da sua intensidade mais baixa, quando comparado ao espectro da figura IV.13.

Capítulo V

Implementação das sequências PRESS e STEAM

Neste capítulo vamos apresentar uma tentativa de implementar as sequências PRESS e STEAM em um sistema de RMN de 2 Teslas disponível no nosso laboratório. Nos espectros obtidos em ^1H revelou-se que o sistema, na presente configuração, não é preparado para espectroscopia localizada *in vivo*.

V.1 Instrumentação

Os experimentos discutidos nos próximos itens envolvem dois sistemas de RMN disponíveis no nosso laboratório.

Um espectrômetro, que é utilizado para experimentos em sólidos, baseado em um ímã supercondutor horizontal de 2 Teslas, idêntico ao do sistema VARIAN/SISCO utilizado para os experimentos discutidos nos itens IV.2-6. O ímã dispõe de um conjunto de 14 canais de *shimming* e bobinas de gradiente não blindadas nas três direções x, y e z. No entanto, o sistema de controle TECHMAC não permite o controle do sistema de gradientes, já que este não é necessário para experimentos em estado sólido. O segundo sistema disponível no nosso laboratório é um tomógrafo de ultra-baixo campo (0.05 Teslas) controlado por um espectrômetro Analogic AN9100.

Nos experimentos discutidos nesse capítulo utilizamos todo *hardware* de controle, amplificadores de RF e gradientes do tomógrafo de ultra-baixo campo aproveitando apenas do ímã supercondutor de 2 Teslas do sistema de espectroscopia em sólidos. O tomógrafo já é preparado para este modo de operação, somente é necessário trocar a entrada do sinal de RMN e as saídas dos amplificadores de RF e de

gradientes. Tomamos cuidado para evitar *ground loops* utilizando um transformador isolador na entrada do sinal de RMN do espectrômetro.

No *software* do espectrômetro é suficiente trocar a frequência de ressonância e calibrar as amplitudes dos gradientes produzidos pelas bobinas de gradientes disponíveis no ímã de 2 Teslas. Adaptamos dessa maneira a sequência *spin echo* para adquirir imagens localizadoras de ^1H e implementamos as sequências PRESS e STEAM discutidas no capítulo II.

Como sonda utilizamos uma bobina em configuração de gaiola (*bird cage*) que trabalha em frequência fixa e possui somente um ajuste para casamento de impedância (*matching*). Este ajuste se provou insuficiente para sintonizar a bobina com as amostras utilizadas por duas razões: Para uma sintonia eficiente da bobina com diferentes amostras seria necessário um ajuste fino da frequência da bobina (*tuning*); Em segundo lugar o ajuste de casamento de impedância (*matching*) encontrava-se sempre perto do seu limite. Contudo, conseguimos sintonizar a bobina utilizando uma carga em forma de uma amostra de 1l de água com 770mg de CuSO_4 e 2g de NaCl . Essa carga possui uma condutividade grande devido ao cloreto de sódio que tem o efeito de alterar ligeiramente a frequência de ressonância da bobina. Assim, posicionando adequadamente essa carga a trás da amostra utilizada para os experimentos de espectroscopia, foi possível conseguir uma sintonia da bobina de RF suficientemente boa.

O ímã supercondutor de 2 Teslas dispõe de um conjunto de 14 bobinas de *shimming*, no entanto não é possível controlá-lo por *software*. Executamos o procedimento de *shimming* manual descrito por M. R. Willcott et al. ^[97] com pouco sucesso, devido ao fato de que três bobinas de *shimming* dos canais X, ZY e ZR^2 estão defeituosas. Além disso, os canais Z^2X e Z^2Y não podiam ser utilizados por causa de excesso da corrente necessária para correção nesses canais. Este fato foi encontrado também no trabalho de Willcott et al. ^[97]. Nos experimentos descritos abaixo utilizamos *offsets* constantes nas bobinas dos gradientes (canais X, Y e Z) para melhorar o *shimming* de ordem baixa e compensar pelo defeito do canal X do conjunto de bobinas de *shimming*.

A forte inomogeneidade do campo magnético B_0 que permaneceu depois do processo de *shimming* é uma das fontes principais dos problemas encontrados nos experimentos de espectroscopia localizada apresentados em seguida. A segunda razão são efeitos fortes de *eddy currents* induzidos nas partes metálicas do ímã e/ou da bobina de RF.

V.2 Implementação da sequência PRESS

Implementamos inicialmente a sequência PRESS como indicada na figura II.1. Espectros obtidos com essa implementação mostraram artefatos fortes de efeitos de *eddy currents* não somente distorcendo a forma das linhas de ressonância mas provocando oscilações nas bases das linhas. Modificamos a sequência PRESS alterando a amplitude dos *spoilers* de forma que eles possuam a mesma amplitude que o gradiente de seleção intercalado entre as duas partes dos *spoilers* (veja figura II.1). A diminuição da amplitude dos *spoilers* foi compensada aumentando a duração dos mesmos. Dessa forma minimizamos os transientes provocados pela mudança da amplitude dos gradientes, o que diminuiu os efeitos dos *eddy currents*. Introduzimos ainda um intervalo de 10 ms entre a rampa de descida do último gradiente e o começo da aquisição. Desta forma o tempo ao eco mínimo é $TE = 100$ ms.

Nessa configuração adquirimos um espectro localizado em um volume de $2 \times 2 \times 2$ cm³ contendo apenas a linha da água de uma amostra de uma solução aquosa de 5 mM de $CuSO_4$ mostrado na figura V.1.

Observamos que nesse espectro os artefatos dos *eddy currents* são suficientemente baixos. No entanto, a largura de linha de aproximadamente 0.5 ppm demonstra a baixa homogeneidade do sistema, mesmo após o processo de *shimming* manual. Para comparar, no espectro da figura II.2, também adquirido em 2 Teslas, a largura de linha é aproximadamente 0.1 ppm.

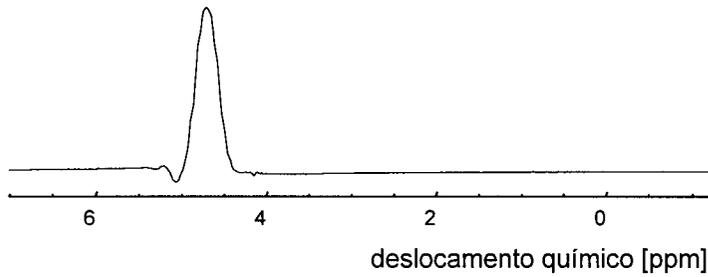


Figura V.1 : Espectro de água localizado com PRESS otimizado para minimizar efeitos de *eddy currents*. Parâmetros experimentais: $VOI=2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$, $TE=100 \text{ ms}$, $TR=700 \text{ ms}$, $N_{AVG}=128$, $T_{TOT}=1:30 \text{ min}$, $Dwell \text{ time}=500 \mu\text{s}$, $N^\circ \text{ Pts}=512$, *zero filling* para 1024 Pts.

Contudo, prosseguimos com testes da eficiência da localização utilizando uma amostra cilíndrica composta de uma solução aquosa 5mM de CuSO_4 e óleo vegetal. Na figura V.2 mostramos imagens desta amostra adquiridos com a sequência *spin echo*. Nessas imagens observe se um leve artefato de deslocamento químico, que consiste em um deslocamento dos dois compartimentos (água, óleo) na horizontal (direção da codificação em frequência). Este artefato já foi minimizado, escolhendo um gradiente de leitura intenso.

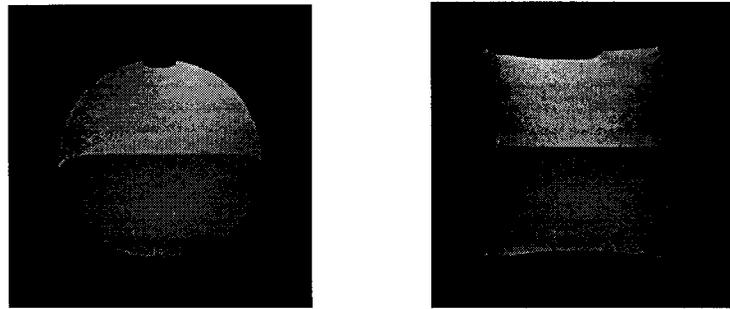


Figura V.2 : Imagens nas direções transversal (esquerda) e sagital (direita) de uma amostra cilíndrica preenchido com solução de CuSO_4 e óleo vegetal utilizando a técnica *spin echo*. Parâmetros experimentais : $Matriz=256 \times 256 \text{ Pts.}$, $FOV=15 \times 15 \text{ cm}$, $TE=16 \text{ ms}$, $TR=300 \text{ ms}$, $N_{AVG}=2$, $T_{TOT}=3 \text{ min}$.

Na figura V.3 mostramos espectros da amostra acima de maneira que em V.3a o volume de interesse (VOI) de $3 \times 3 \times 3 \text{ cm}^3$ é localizado inteiramente no compartimento de óleo, em V.3c inteiramente na água e em V.3b na interface dos dois, as escalas verticais são idênticas. À

esquerda mostramos imagens transversais do VOI selecionado obtidos com uma sequência PRESS modificada. Introduzimos gradientes de codificação de fase, preparação e leitura, analogamente à sequência mostrada na figura II.13. Os espectros mostram uma boa supressão dos sinais que são localizados fora do VOI, comprovando a eficiência da localização na direção vertical. Esse achado é comprovado pelas imagens das regiões localizadas, apesar de distorções da forma cúbica do volume selecionado. Essas distorções são devido à falta de homogeneidade de B_0 .

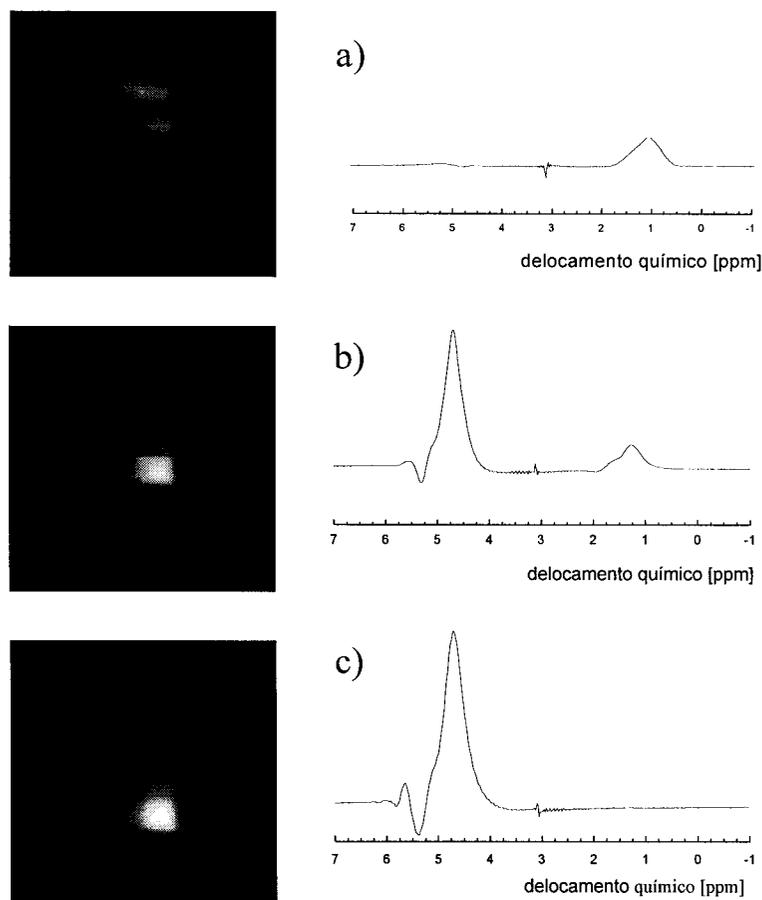


Figura V.3: Conjunto de espectros localizados em $3 \times 3 \times 3 \text{ cm}^3$ na amostra da figura V.2 e imagens indicando a posição da localização. Mostramos resultados localizados na região de óleo (a) de água (c) e na interseção (b). Parâmetros experimentais das imagens: Matriz=256x256Pts., FOV=15x15cm, VOI=3x3x3cm³, TE=38ms, TR=500ms, N_{AVG}=4, T_{TOT}=9min. Parâmetros experimentais dos espectros: VOI=3x3x3cm³, TE=100ms, TR=700ms, N_{AVG}=128, T_{TOT}=1:30min, N^o Pts=512, *zero filling* para 1024 Pts.

Nas imagens localizadoras nota-se que as intensidades dos compartimentos de óleo e água são invertidos comparados a figura V.2. Isto ocorre porque os tempos de relaxação do óleo são mais curtos que os da água. As imagens da figura V.2 foram adquiridas com ambos TE e TR mais curtos possíveis, que resulta em forte contraste por T_1 . Nas imagens da figura V.3 TE tinha que ser mais longo, devido as propriedades da técnica PRESS, e portanto estas imagens possuem um maior contraste por T_2 .

Mesmo utilizando a sequência PRESS otimizada para minimizar os efeitos de *eddy currents* eles são observados na deformação das formas das linhas de ressonância. Junto à largura de linha maior que 0.5ppm a utilidade do espectrômetro para espectroscopia localizada *in vivo* é duvidosa.

V.2 Implementação da sequência STEAM

Tendo em vista a experiência adquirida na implementação de sequência PRESS, a respeito da sensibilidade do sistema a efeitos de *eddy currents*, implementamos a sequência STEAM, já minimizando o uso de chaveamento de gradientes como discutido no capítulo II (figura II.5). O intervalo entre a rampa de decida do último gradiente e o começo da aquisição é 10 ms resultando em um tempo ao eco mínimo é $TE = 40$ ms.

Utilizamos a sequência STEAM na forma como ilustrado na figura II.5 para localizar três volumes na amostra apresentada na figura V.2, sendo um volume localizado inteiramente no compartimento de água (figura V.4a) de óleo (figura V.4c) e na interface dos dois (figura V.4b).

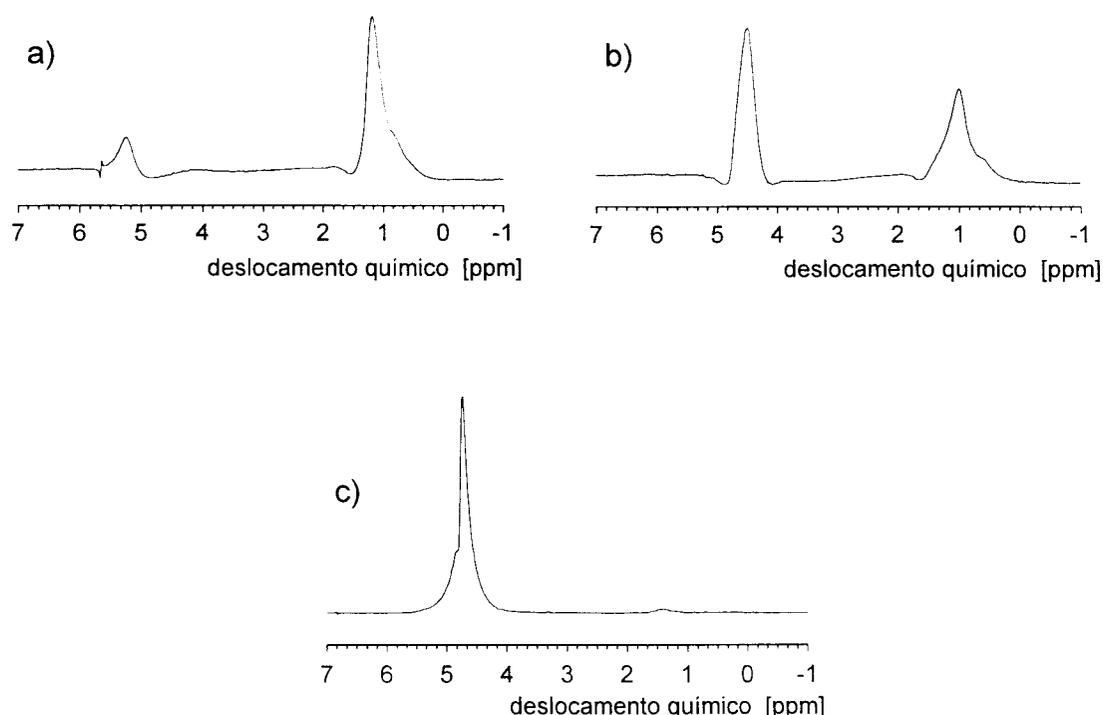


Figura V.4: Conjunto de espectros localizados com em $3 \times 3 \times 3 \text{ cm}^3$ na amostra da figura V.2 e imagens indicando a posição da localização. Mostramos resultados localizados na região de óleo (a) de água (c) e na interseção (b). Parâmetros experimentais dos espectros: $\text{VOI} = 3 \times 3 \times 3 \text{ cm}^3$, $\text{TE} = 40 \text{ ms}$, $\text{TR} = 700 \text{ ms}$, $N_{\text{AVG}} = 128$, $T_{\text{TOT}} = 1:30 \text{ min}$, $N^{\circ} \text{ Pts} = 512$, *zero filling* para 1024 Pts.

Observamos nos espectros os artefatos dos *eddy currents* devido ao fato que as bobinas de gradientes não possuem blindagem ativa. As larguras das linhas são seriamente afetadas pela falta de homogeneidade do campo B_0 , até mais que nos espectros da figure V.3. Isso provavelmente é devido à falha no *shimming* de ordem zero (canais x, y e z).

Com estes resultados insatisfatórios decidimos abandonar a tentativa de utilizar este sistema para espectroscopia localizada e aproveitar de um espectrômetro VARIAN 400 MHz recém adquirido pelo nosso grupo. No próximo capítulo vamos apresentar o trabalho da instalação do sistema de gradientes e mostrar primeiros resultados com experimentos de espectroscopia localizada e microscopia.

Capítulo VI

Espectroscopia e microimagens em 9.6 Teslas

Neste capítulo vamos apresentar resultados pioneiros de microimagens e espectroscopia localizada de ^2H (deutério), em experimentos realizados em um espectrômetro VARIAN Unity Inova de 400 MHz. Começamos o capítulo apresentando alguns trabalhos necessários para conseguir obter os resultados apresentados no final deste capítulo. Discutimos no item VI.1 o processo de instalação e calibração do sistema de gradientes e mostramos no item VI.2 a sonda que construímos para a frequência de ^2H . Finalmente apresentamos nos itens VI.3 e VI.4 os resultados de microimagens e espectroscopia localizada obtidos em ^2H .

VI.1 Instalação de um sistema de gradientes

O espectrômetro VARIAN Unity Inova adquirido por nosso grupo é destinado à espectroscopia em sólidos (1D e 2D). Considerando à disponibilidade desse sistema, surgiu interesse de utiliza-lo para experimentos de espectroscopia localizada e de microscopia, tendo em vista que a espectroscopia localizada necessita de imagens localizadoras de alta resolução para posicionar o volume de interesse. Para poder realizar estes experimentos que necessitam de gradientes de campo magnético foram necessários algumas adaptações.

O espectrômetro já dispõe de um gerador de gradientes. Dispomos de amplificadores de corrente TECHRON 8606, que anteriormente foram utilizados em um outro sistema de RMN. Finalmente, foi adquirido uma bobina de gradientes ativamente blindada de 50

Gauss/cm (IBMT 50G), fabricada pelo departamento de engenharia biomédica do Instituto Fraunhofer, na Alemanha.

A instalação destas componentes ficou a cargo do nosso grupo. Descrevemos nos subitens VI.1-5 o trabalho que executamos para instalar o subsistema de gradientes. O processo de instalação consiste de três partes: a adaptação das componentes de *hardware*, a calibração da forma e da amplitude dos gradientes e a correção dos efeitos de *eddy currents*.

Este processo foi um pré-requisito para poder obter os resultados de microimagens e espectroscopia localizada descritos nos itens VI.3-4.

VI.1.1 Espectrômetro VARIAN Unity Inova

O espectrômetro VARIAN Unity Inova em configuração completa dispõe de placas controladoras que se comunicam com os amplificadores de gradientes. Através do *software* integrado ao sistema de aquisição (*ecctool*), é possível controlar o tempo de subida dos pulsos de gradientes (*rise time*), o ganho dos amplificadores e o *duty cycle* máximo das bobinas de gradiente. Além disso, essas placas de controle, permitem aplicar correções nos pulsos de gradiente a fim de minimizar correntes induzidas (*eddy currents*).

Na configuração do nosso espectrômetro não foram incluídas as placas controladoras de gradientes, portanto não foi possível usar os recursos previstos no *software* para a calibração dos gradientes, por isso tivemos que adotar o procedimento descrito em seguida. No espectrômetro à nossa disposição existem somente as saídas para gradientes nas três direções ortogonais, com um nível de sinal máximo de ± 10 Volts, programáveis digitalmente em 65535 passos. O *software* do espectrômetro dispõe de um arquivo que especifica alguns parâmetros dos gradientes, como mostrado na tabela VI.1.

VARIABLE NAME	VALUE
boresize	5.00 cm
trise	0.001000 sec
gxmax	58.00 gauss/cm
gymax	57.00 gauss/cm
gzmax	74.00 gauss/cm
gxlimit	30.00 gauss/cm
gylimit	30.00 gauss/cm
gzlimit	30.00 gauss/cm

Tabela VI.1 : Variáveis de calibração dos gradientes do arquivo `/export/home/vnmr/imaging/gradtables/main`

As variáveis *gxmax*, *gymax* e *gzmax* especificam a amplitude dos gradientes que seriam produzidos com nível de sinal máximo na saída do espectrômetro. Além disso, o *software* permite limitar a saída do espectrômetro para não produzir gradientes maiores que *gxlimit*, *gylimit* e *gzlimit*, respetivamente. O parâmetro *trise* é o tempo de subida para o gradiente máximo.

A amplitude dos gradientes foi calibrada ajustando os valores *gxmax*, *gymax* e *gzmax* deste arquivo. Os valores dados na tabela VI.1 são os atuais no nosso sistema. Para a calibração ajustamos o ganho dos amplificadores TECHRON e medimos a amplitude dos gradientes através de experimentos de tomografia. Estando o sistema ainda em estágio de testes, foi imposta, por medidas de segurança, a limitação dos gradientes em 30 G/cm.

VI.1.2 Bobina de Gradientes IBMT 50G

O sistema de gradientes IBMT 50G consiste em bobinas na configuração de *Golay* para produzir gradientes de campo magnético de no máximo 50 Gauss/cm nas três direções X, Y e Z. As bobinas são ativamente blindadas usando, para cada canal, uma bobina principal de diâmetro menor e uma bobina de blindagem de diâmetro maior. Nesta

última, passa uma corrente contrária á da bobina principal, cancelando o campo no lado externo ao sistema de gradientes. Desta forma minimizam-se as correntes induzidas em partes metálicas próximas do sistema de gradientes. Para calibrar a corrente na bobina de blindagem existe uma caixa de ajustes na entrada do sistema de gradientes que também contém um fusível de proteção para cada canal. O esquema interno da caixa de ajustes está mostrado na figura VI.1.

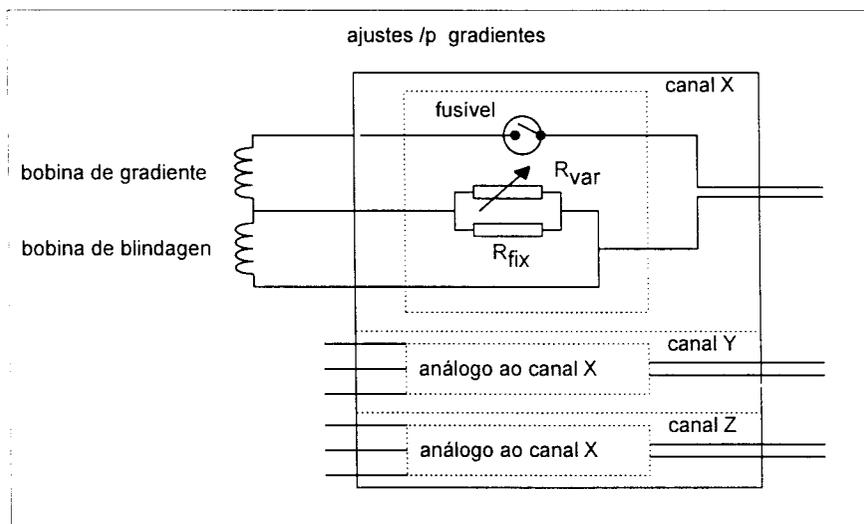


Figura VI.1 : Esquema da caixa de ajustes da blindagem do sistema de gradientes.

O fusível na entrada da bobina de gradiente é de 2 Ampères em modo contínuo para proteção das bobinas contra excesso de potência. Em modo pulsado, a corrente máxima do fusível aumenta conforme o *duty cycle* dos pulsos de gradientes utilizados. Executamos testes dos gradientes nas direções X, Y e Z com amplitudes de 20, 25 e 30 G/cm e calculamos a corrente média durante um ciclo do experimento. Chegamos a conclusão que o fusível de proteção desarma nessa faixa de amplitudes com aproximadamente 0.4 A. Esse fato não corresponde às especificações da bobina de gradiente e o problema ainda deverá ser resolvido pelo fabricante.

As duas resistências R_{FIX} e R_{VAR} na saída da bobina de gradiente drenam uma parte da corrente, de forma que a corrente circulando na bobina de blindagem é menor que na bobina principal. O valor de R_{FIX} é

pequeno, e sua potência de 5 Watts; A resistência R_{VAR} é variável, de 1-101 Ohms. Os valores das resistências na configuração atual e na configuração original são listadas na tabela VI.2.

canal	atual			original		
	R_{FIX}	R_{VAR}	R_{TOTAL}	R_{FIX}	R_{VAR}	R_{TOTAL}
X	1.32 Ω	16 Ω	1.22 Ω	1.30 Ω	101 Ω	1.28 Ω
Y	1.32 Ω	13 Ω	1.20 Ω	1.30 Ω	101 Ω	1.28 Ω
Z	0.58 Ω	10 Ω	0.55 Ω	0.61 Ω	101 Ω	0.61 Ω

Tabela VI.2 : Valores das resistências na caixa de ajuste da blindagem das bobinas de gradientes, antes e depois da calibração dos gradientes.

Quando calibramos os valores R_{VAR} das resistências foi necessário mudar também a resistência fixa R_{FIX} . Mostraremos as medidas de calibração de R_{VAR} no item VI.1.5

Na tabela VI.3 mostramos as características elétricas do sistema de gradientes. Os valores de indutância e resistência são aqueles vistos pelo amplificador de corrente. Essa informação é importante para as adaptações do amplificador que serão descritas no próximo item

canal	atual			original		
	indutância	resistência	eficiência	indutância	resistência	eficiência
X	65 μ H	1.1 Ω	1 G/cm/A	114 μ H	0.7 Ω	1.5 G/cm/A
Y	67 μ H	1.1 Ω	1 G/cm/A	67 μ H	1.1 Ω	1 G/cm/A
Z	38 μ H	1.1 Ω	1 G/cm/A	38 μ H	1.1 Ω	1 G/cm/A

Tabela VI.3 : Valores dos parâmetros elétricos do sistema de gradiente na entrada da caixa de ajustes antes e depois de uma correção de fios ligados errados no canal X

No processo de calibração percebemos uma ligação errada em um conector entre a caixa de ajustes e as bobinas de gradientes, de forma que no canal X a corrente na bobina externa circulava no mesmo sentido que na bobina principal, tornando a blindagem ineficiente. Para corrigir

este erro abrimos a bobina de gradiente e a caixa de ajustes para verificar as ligações dos cabos e concertamos as conexões no conector entre bobina e caixa de ajuste.

VI.1.3 Amplificadores TECHRON 8606

Os amplificadores TECHRON possuem um ganho de aproximadamente 25 Ampères/Volt, com uma corrente de saída máxima de 400 Ampères. O valor do ganho depende dos ajustes efetuados no circuito de pre-ênfase utilizado para correções de *eddy currents*. Principalmente, utilizando-se constantes de tempo mais longas, pode-se aumentar o ganho do amplificador até 40 V/A. O circuito de pre-ênfase possui 4 constantes de tempo conforme mostrado na tabela VI.4.

Constantes de tempos	
atual	original
0.002 - 0.052s	0.002 - 0.052s
0.0094 - 0.2444s	0.0094 - 0.2444s
0.04 - 1.04s	0.04 - 1.04s
0.0001 - 0.0004 s	0.2 - 5.2s

Tabela VI.4 : Constantes de tempo disponíveis para correções de *eddy currents*

Como veremos adiante, é necessário introduzir uma constante de tempo mais curta para conseguir corrigir os efeitos de *eddy currents* de curta duração (de aproximadamente 300 μ s). Portanto, trocamos o capacitor do circuito ressonante RC da constante mais longa por um capacitor menor.

Os amplificadores foram utilizados anteriormente em um espectrômetro da General Eletrics baseado em um imã supercondutor de 2 Teslas, com bore de 30 cm. Portanto, os amplificadores possuem características elétricas otimizados para as bobinas de gradientes desse

sistema,. sendo esses parâmetros aproximadamente 1000 μH e 1 Ω para cada um dos três canais. Comparando esses valores com os da tabela VI.3, observamos uma grande diferença na indutância da carga do amplificador. Isso provocou uma instabilidade dos amplificadores, manifestando-se em oscilações atenuadas após a aplicação de pulsos retangulares, exemplificadas na figura VI.2.

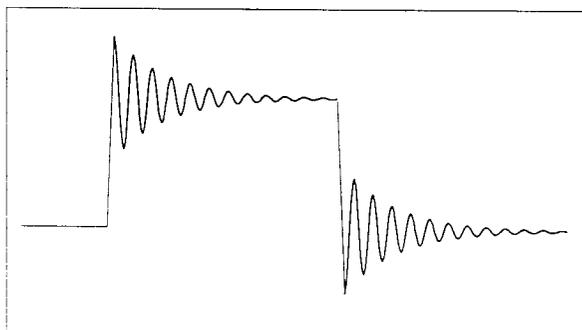


Figura VI.2 : Instabilidade da resposta do amplificador de corrente para pulsos retangulares.

Atribuímos estas oscilações ao fato de que nossas bobinas de gradiente são de baixa indutância (ver tabela VI.3) e à utilização de pulsos retangulares. A baixa indutância diminui o atraso entre a corrente e a voltagem que é necessária para o circuito de realimentação. Pulsos retangulares contêm componentes de alta frequência que também podem provocar oscilações.

Testamos os amplificadores com pulsos retangulares porque as sequências de pulsos já existentes no software do espectrômetro VARIAN utilizam exclusivamente pulsos de gradiente em forma retangular. No entanto, é possível reprogramar as sequências para utilizarem pulsos com tempos de subida e descida arbitrários.

Enfrentamos mais um problema quando ligamos os amplificadores na saída do espectrômetro VARIAN. O nível máximo de saída de gradientes do espectrômetro é de ± 10 V. Os amplificadores possuem um ganho de aproximadamente 25 A/V, com uma eficiência de 1 Gauss/cm/A. Portanto, poderia produzir gradientes de 250 Gauss/cm,

os quais seriam 5 vezes maiores que aqueles especificados pela bobina de gradiente.

Como já mostramos acima é possível limitar a saída do espectrômetro em valores menores que 10 V. Porém, essa abordagem diminuiria a faixa dinâmica e a resolução da saída do espectrômetro. Isso provocaria falhas na definição de pulsos de gradientes com forma arbitrária, por exemplo rampas de subida/descida seriam geradas em forma de escadas, com degraus relativamente grandes. Além disso, existe a questão de segurança do sistema: em casos de erros de programação ou de software, uma corrente alta demais poderia acidentalmente danificar as bobinas de gradiente. Portanto foi necessário diminuir o ganho dos amplificadores.

Os dois problemas encontrados nos amplificadores de corrente, oscilações atenuadas e excesso de ganho, poderiam ser resolvidos com maior eficiência adaptando-se os circuitos internos dos amplificadores. No entanto, tais adaptações não estão previstas no projeto dos amplificadores, além de que, nos manuais não se encontram informações concretas a respeito deste assunto. Isto nos levou a procurar soluções mais fáceis.

As oscilações atenuadas ocorreram principalmente no canal Z, o qual possui a bobina de menor indutância. Para eliminá-las, agregamos uma carga indutiva adicional de 80 μH em série com a bobina de gradiente, na saída do amplificador. Para diminuir o ganho dos amplificadores introduzimos um atenuador 1:5 na entrada de cada amplificador. O atenuador consiste em 3 resistências de precisão conforme mostra a figura VI.3. O capacitor de 10 nF filtra as componentes de altas frequências, que surgem na aplicação de pulsos retangulares. O valor de 10 nF foi encontrado empiricamente e escolhido de maneira a não introduzir constantes de tempo muito longas no sinal de entrada.

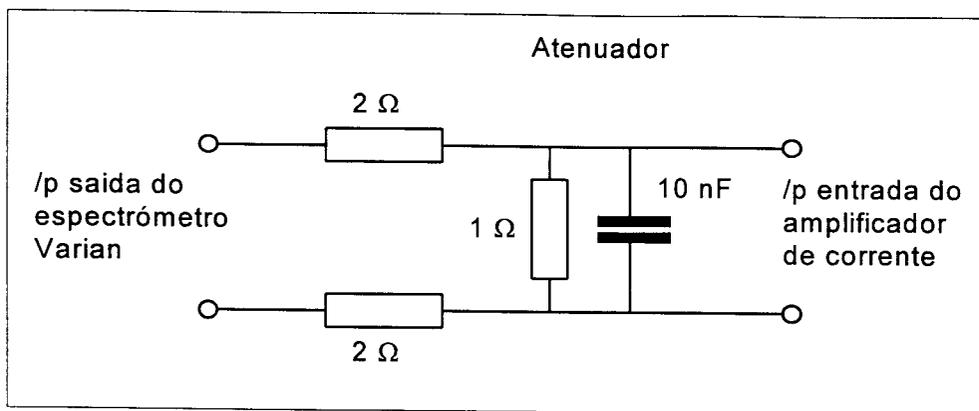


Figura VI.3 : Atenuador para reduzir o ganho dos amplificadores de corrente

Nessa configuração conseguimos resultados satisfatórios, os quais serão mostrados nos próximos itens. Usando pulsos retangulares para gradientes de 20 Gauss/cm, o tempo mínimo de resposta dos amplificadores (*risetime*), na atual configuração, é de aproximadamente 100 μ s, o que produz um nível de oscilações aceitável. Utilizando-se pulsos com rampas de subida/decida de 200 μ s, de mesma amplitude que os retangulares, as oscilações são desprezíveis.

VI.1.4 Formas de gradientes

A observação dos gradientes produzidos pelo nosso sistema pode ser feita através do monitor de corrente dos amplificadores, como também medindo-se diretamente o campo produzido pela bobina. No segundo caso, construímos e calibramos uma sonda (bobina de *pickup*) que captura o sinal induzido durante os transientes dos gradientes. O sinal resultante é visualizado em um osciloscópio digital, Tektronix TDS 410A, conectado a um microcomputador onde é efetuada a sua integração numérica.

Desta maneira podemos comparar a forma do gradiente efetivamente produzido (sinal integrado da bobina de *pickup*) com o sinal fornecido pelo monitor de corrente dos amplificadores. Um primeiro ajuste das constantes de tempo para correção de *eddy currents*,

disponíveis nos amplificadores TECHRON, foi feito observando visualmente o sinal integrado da sonda. Pelo fato de que os efeitos de *eddy currents* de longa duração não são facilmente observados através do método exposto aqui, somente as constantes de tempo mais curtas (100-400 μs) puderam ser ajustados. Muito embora, como pode ser observado nas figuras abaixo, isso foi suficiente para que o campo produzido pelos gradientes pudessem representar a forma correta do pulso aplicado.

Todos os testes realizados com os três canais, X, Y e Z, foram executados tanto com a bobina de gradientes instalada no imã supercondutor, quanto na bancada de trabalho. Utilizamos pulsos de gradientes retangulares e pulsos com um tempo de subida programado em 200 μs . A amplitude dos gradientes foi de 10 G/cm. A configuração do ajuste elétrico da blindagem, descrita acima, foi a original fornecida pelo fabricante, como mostrada na tabela VI.2.

Mostramos na figura VI.4 os resultados dos testes com o canal Z, com a bobina na bancada (VI.4a,b) e instalada no imã supercondutor (VI.4c,d). Em (a) e (c) graficamos os resultados para o pulso retangular e em (b) e (d) os resultados para o pulso com rampa de 200 μs . Ao lado da forma de onda completa mostramos também uma ampliação (5 x) do transiente de descida de ambos os sinais.

Observamos que em todos os gráficos da figura VI.4, o campo magnético real, medido através da integração do sinal da sonda, acompanha razoavelmente bem a forma do pulso mostrado pelo monitor de corrente. Esses resultados foram obtidos depois das modificações no hardware descrito acima, particularmente depois de colocar uma bobina de 80 μH em série com a bobina de gradiente do canal Z a fim de aumentar a sua carga indutiva vista pelo amplificador.

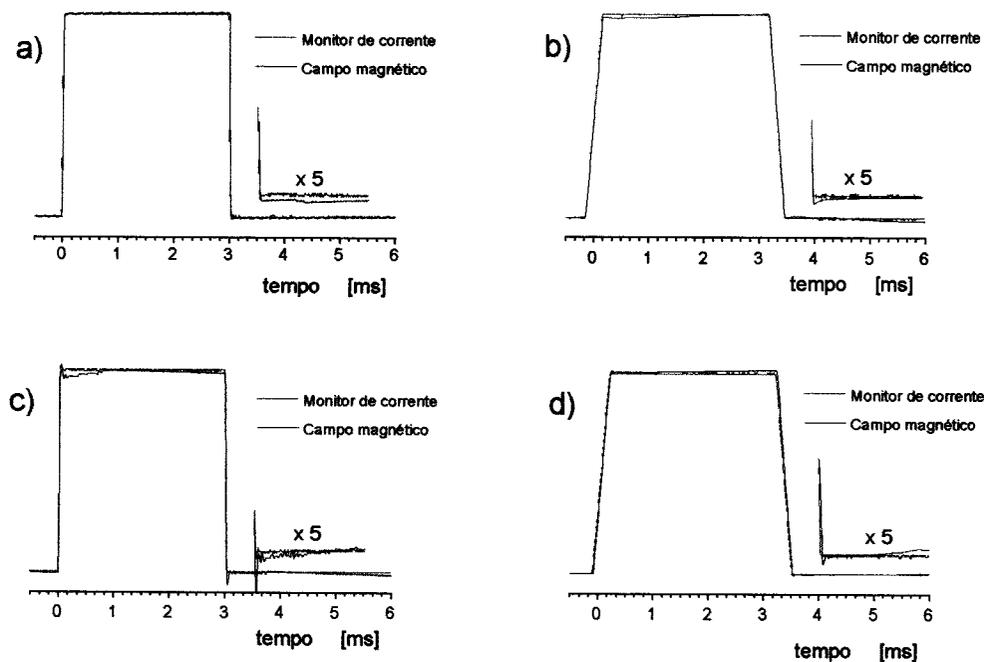


Figura VI.4 : Formas dos gradientes no canal Z mostrando o campo magnético real, medido pela integração do sinal da bobina de *pickup* e o sinal do monitor de corrente do amplificador. Na parte superior, com a bobina na bancada de trabalho e na parte inferior com ela instalada no imã. À esquerda, para um pulso retangular e à direita para um pulso com rampa de 200 μ s. Duração do pulso: 3ms.

Na figura VI.5 mostramos os mesmos testes para o canal Y. Neste caso, observou-se oscilações nos sinais do campo real e o do monitor de corrente, com a bobina instalada no imã. Lembramos que os circuitos internos dos amplificadores de corrente não foram adaptados para cargas de pequena indutância. Além disso, dentro do campo magnético principal as bobinas de gradientes sofrem forças mecânicas que podem provocar pequenos deslocamentos (*acoustic ringing*), que por sua vez provocam alterações na indutância da carga. É possível que as alterações da indutância da carga provoquem instabilidade do amplificador de corrente. Atribuímos as oscilações observadas a estes efeitos.

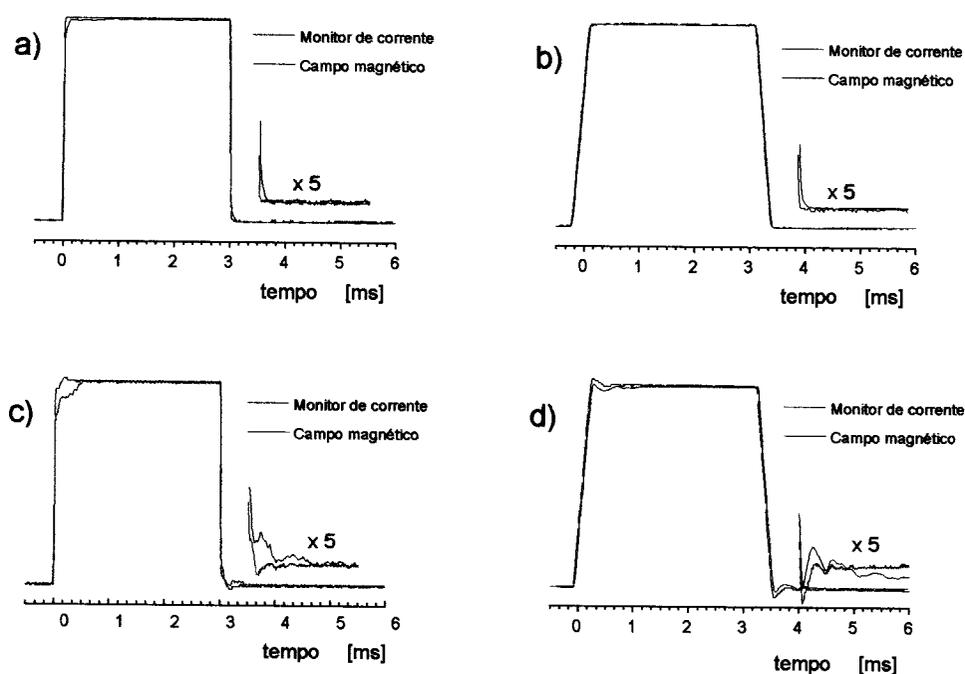


Figura VI.5 : Formas dos gradientes no canal Y.

Chamamos atenção que o mesmo efeito pode existir no canal Z, porém com uma intensidade muito menor, devido ao fato de que no canal Z foi necessário adicionar uma carga indutiva, em série com a bobina de gradiente. Dessa forma, pequenas alterações na carga da bobina de gradiente tem menor influência sobre o amplificador. Seria possível adicionar uma tal carga no canal Y também, no entanto isso iria aumentar o tempo de subida dos gradientes. Estamos entrando em contato com o fabricante dos amplificadores TECHRON para obter informações detalhadas sobre como adaptar os circuitos internos dos amplificadores com a nossa bobina de gradientes, conforme sugerimos inicialmente.

Na figura VI.6 mostramos os resultados para o canal X, onde se observa, nos gráficos (c) e (d), efeitos de *eddy currents* pronunciados.

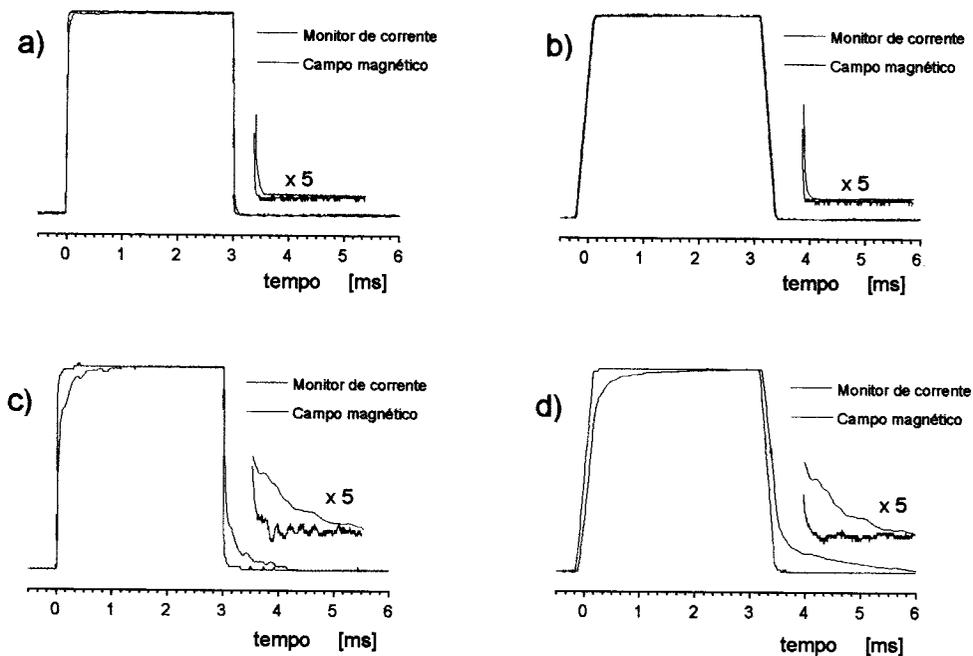


Figura VI.6 : Formas dos gradientes no canal X.

Conforme já mencionamos anteriormente, a degradação da eficiência da blindagem da bobina X deve-se ao erro de instalação nas conexões da bobina, provocado pelo fabricante. Houve um ligação errada na bobina de gradiente de tal forma que a corrente na blindagem circulava no mesmo sentido que na bobina principal. Corrigimos este erro concertando as conexões na bobina de gradientes.

Mostramos na figura VI.7 as formas dos gradientes com a bobina de gradiente dentro do campo principal com as ligações corrigidas. Observamos o aumento na eficiência da blindagem. Os resultados do canal X, depois da correção mostram as mesmas oscilações que as do canal Y.

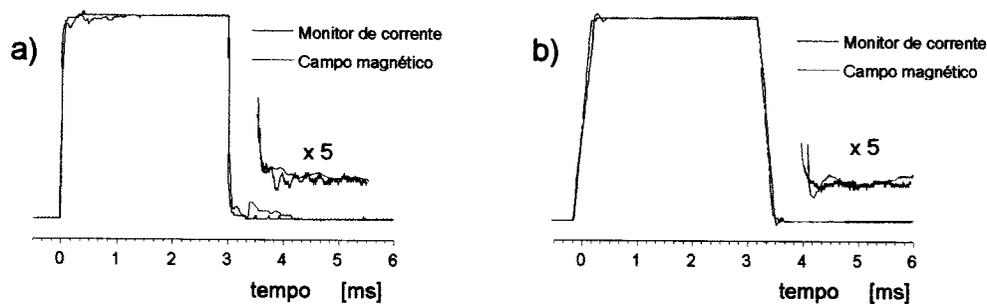


Figura VI.7 : Formas dos gradientes no canal X após corrigir as conexões da bobina.

VI.1.5 Ajustes da correção de *eddy currents*

O manual do sistema de gradientes, tal como o manual do espectrômetro VARIAN, indicam um procedimento para correção das *eddy currents* cuja execução exige o *hardware* e *software* originais. Como não possuímos as placas de interface do sistema de gradientes, o *software* existente não pode ser executado. Entretanto, é possível estabelecer um procedimento alternativo, parcialmente manual, para executar esta tarefa.

A base desse procedimento é a aquisição do sinal de RMN com a sequência de pulsos mostrada na figura VI.8. Essa sequência consiste em um pulso de gradiente de longa duração, seguida pela excitação e aquisição do sinal de RMN. Variando o *delay* τ entre o pulso de gradiente e a excitação os efeitos dos *eddy currents* podem ser observados através do sinal adquirido. Para realizar o teste em um determinado canal (X,Y ou Z) a amostra deve ser deslocada nessa direção, com o objetivo de aumentar o efeito do campo magnético produzido pelas *eddy currents*.

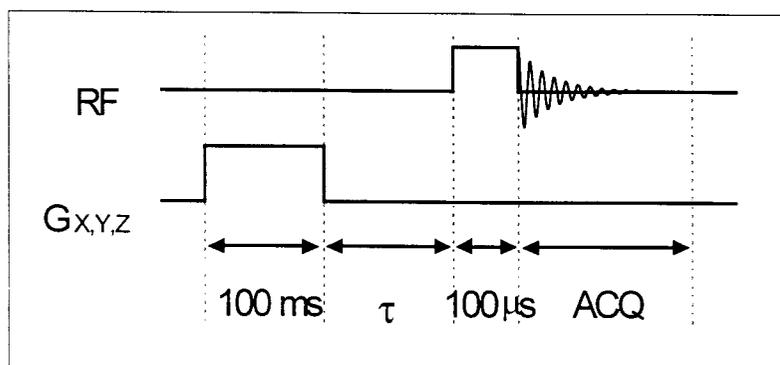


Figura VI.8 : Sequência de pulsos utilizada para ajustes da correção de *eddy currents*.

Para o ajuste das resistências da caixa de controle da blindagem (figura VI.1) foi utilizada uma sonda de deutério, que será descrita no item VI.3, e a sequência de pulsos mostrada na figura VI.8. Como os efeitos das *eddy currents* decaem com o aumento de τ , a condição $\tau = 0$ foi utilizada para melhor salientar o efeito. Com esse mesmo objetivo, se faz necessária a remoção do pre-ênfase nos amplificadores de corrente. Após implementadas estas duas condições, a resistência ajustável, R_{VAR} , é variada manualmente em passos de 1Ω , no intervalo $1-40 \Omega$. Mostramos na figura VI.9 os resultados para os 3 canais X, Y e Z. Observam-se fortes efeitos de *eddy currents*, tanto na amplitude quanto na fase dos primeiros espectros, para $R_{VAL} < 10 \Omega$. Estes dados foram obtidos após fixar um valor apropriado para R_{FIX} , o que é necessário a fim de melhor identificar o máximo do sinal, correspondente ao ótimo ajuste da blindagem das bobinas de gradiente. Conforme pode-se observar na figura VI.9, foram identificados os ótimos valores, 16Ω , 13Ω e 10Ω para os canais X, Y e Z, respectivamente.

Chamamos atenção que nos primeiros espectros de cada conjunto, que corresponde á condição da blindagem desajustada, pode-se observar um erro de fase provocado pelos *eddy currents* que não decaíram a níveis suficientemente baixos até o intervalo de aquisição. Além da fase dos espectros os efeitos dos *eddy currents* também se manifestam nas suas amplitudes. O máximo da amplitude foi utilizado para identificar o ótimo do ajusta de blindagem, que se encontra em $R_{VAR} = 16 \Omega$, $R_{VAR} = 13 \Omega$ e $R_{VAR} = 10 \Omega$ para os canais X, Y e Z, respectivamente

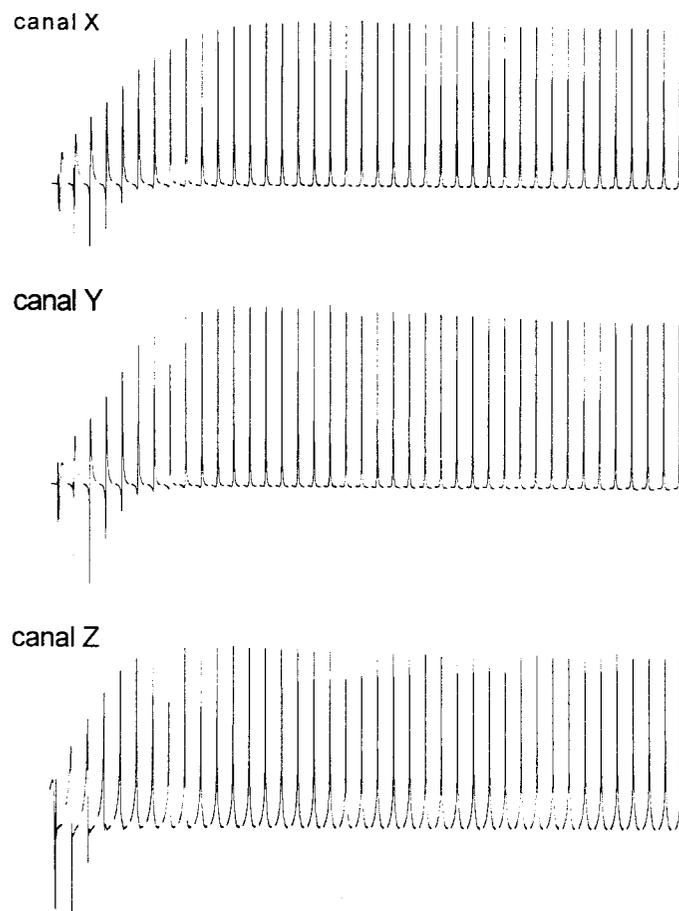


Figura VI.9 : Conjunto de espectros para ajuste da blindagem da bobina de gradientes nas direções X, Y e Z. Cada espectro corresponde a um valor de R_{VAR} sendo esse variado de 1-40 Ω em passos de 1 Ω . O máximo do sinal foi observado em 16 Ω (canal X), 13 Ω (canal Y) 10 Ω (canal Z).

O segundo passo, ainda com o objetivo de minimizar os efeitos indesejáveis provocados pelas *eddy currents*, foi ajustar as constantes de tempo que definem o pré-ênfase dos amplificadores de corrente. Utilizamos a mesma sequência de pulsos, mostrada na figura VI.8, na qual o delay τ é aumentado gradualmente no intervalo 0-20 ms, em passos de 0.5 ms. Mostramos nas figuras VI.10-12 os resultados para os canais X, Y e Z, respectivamente.

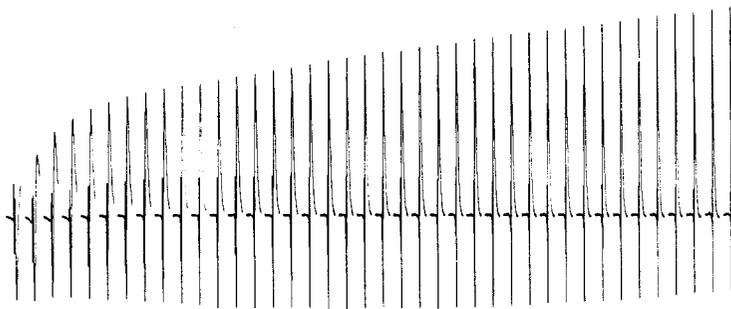
O teste mostrado na figura VI.10 consiste de três etapas. Na primeira, figura VI.10a, a blindagem foi propositadamente desajustada,

fixando $R_{\text{VAR}} = 1 \Omega$, e a correção por pré-ênfase dos amplificadores de corrente foi desligada. Este experimento permite mostrar como os efeitos das *eddy currents* se manifestam quando nenhum ajuste de correção é aplicado. Na segunda etapa, figura VI.10b, R_{VAR} é fixado em 16Ω (ótimo para a blindagem do canal X) e a correção por pré-ênfase mantida desligada. Finalmente, na figura VI.10c apresentamos o resultado obtido na terceira etapa, onde as duas correções são aplicadas simultaneamente. Os mesmos experimentos foram executados nos canais Y e Z e os resultados estão mostrados, de forma análoga aos anteriores, nas figuras VI.11 e VI.12, respetivamente.

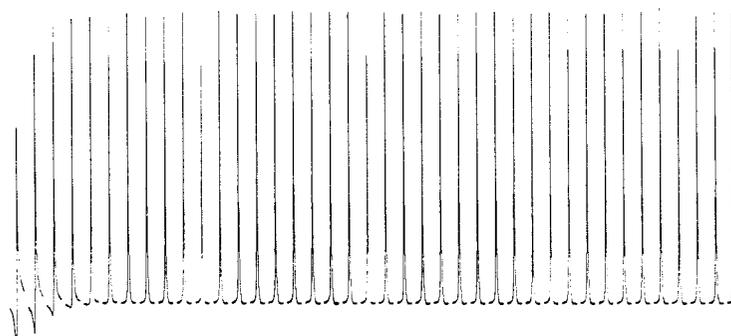
Observando as figuras nota-se claramente que os efeitos indesejáveis produzidos pelas *eddy currents* foram parcialmente eliminados após a segunda etapa restando apenas uma pequena distorção da fase nos primeiros espectros do conjunto. Finalmente, após da terceira etapa, os *eddy currents* foram reduzidos a níveis desprezíveis. Os espectros otimizados possuem uma largura de linha de 10 Hz (0.2 ppm) e a posição do centro da linha é praticamente independente de τ , mostrando flutuações menores que 5 Hz em todo o intervalo de medida.

Provamos com estes testes que na configuração do sistema de gradientes, como propomos nos itens VI.1.1 a VI.1.3, os gradientes produzidos possuem a forma desejada e não são sujeitos a efeitos de *eddy currents*. Isso possibilitou os primeiros experimentos de alta resolução em deutério como apresentados nos itens VI.3 e VI.4.

a)



b)



c)

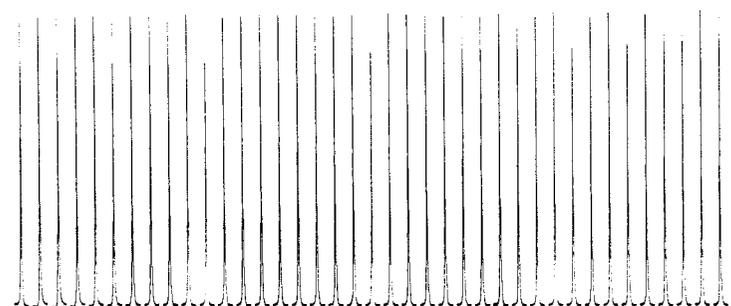
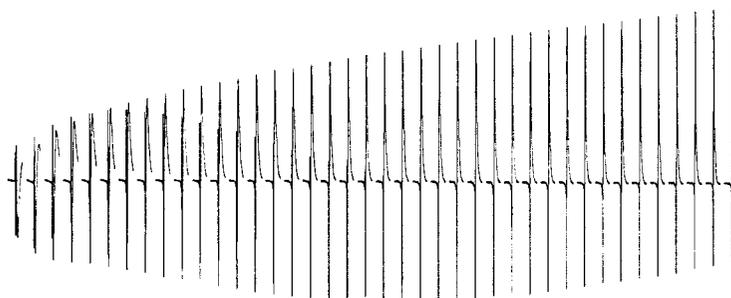
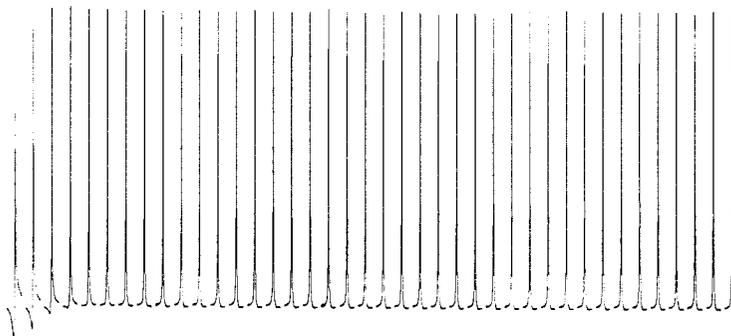


Figura VI.10 : Conjunto de espectros adquiridos com a sequência da figura VI.8 no canal X com $\tau=1-20\text{ms}$ em passos de 5ms, a) sem ajuste da blindagem nem da pré-ênfase dos amplificadores, b) com blindagem ajustada mas sem a pré-ênfase e c) com os dois ajustes aplicados.

a)



b)



c)

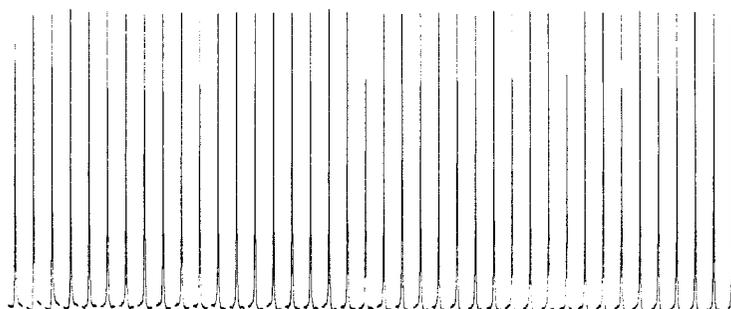
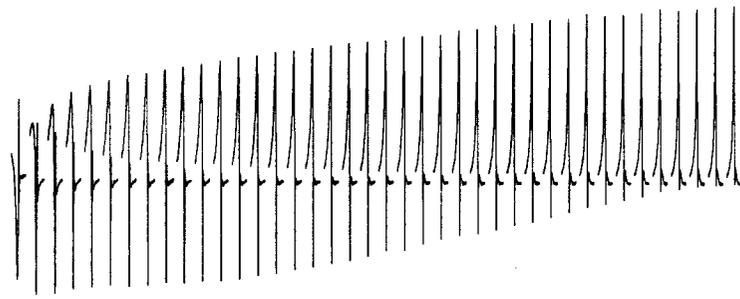
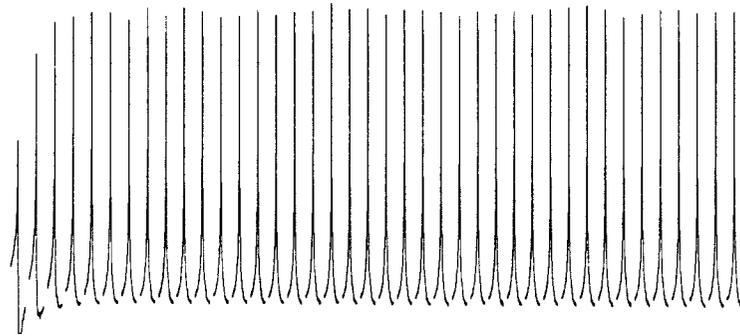


Figura VI.11 : Conjunto de espectros adquiridos com a seqüência da figura VI.8 no canal Y

a)



b)



c)

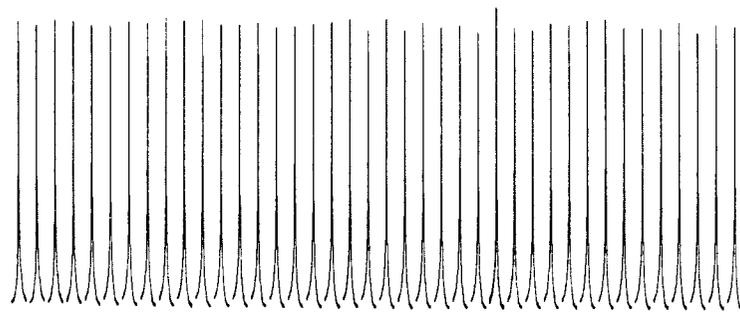


Figura VI.12 : Conjunto de espectros adquiridos com a seqüência da figura VI.8 no canal Z

VI.2 Sonda sintonizada para ^2H

Para poder realizar experimentos de microscopia e espectroscopia localizada em deutério (^2H) tivemos que construir uma sonda sintonizada na frequência desse núcleo (61.4 MHz). Existem três configurações diferentes, comumente utilizadas, para sondas de RMN : o solenóide, a gaiola (*birdcage*) e configuração de cela (*saddle coil*).

A configuração em forma de solenóide é a de mais fácil construção e produz um campo bastante homogêneo, porem não permite acesso axial à amostra. Tendo em vista futuras aplicações em fragmento de plantas que necessitam acesso axial (no nosso sistema a direção vertical) para as plantas ficarem na sua posição natural descartamos essa configuração.

A configuração em forma de gaiola é a mais adequada para frequências elevadas, porém, em dimensões pequenas, sua construção é muito difícil. Isso se deve ao fato de que, nessa configuração, são utilizados vários capacitores para conseguir a distribuição de corrente desejada. O tamanho desses capacitores impõe um limite inferior ao tamanho da sonda.

Portanto optamos para a terceira possibilidade, a configuração em forma de cela. Essa configuração é mais favorável para frequências mais baixas, e ainda tem um bom desempenho na frequência de deutério, ela permite acesso axial á amostra e sua construção em dimensões pequenas é viável. Projetamos, então, a sonda mostrada na figura VI.13 com 6 mm de diâmetro e 7.2 mm de comprimento. O circuito de sintonia e casamento de impedância, utilizando capacitores variáveis, é indicado na figura.

Preparamos para esta sonda duas amostras de deutério: Uma em forma de um tubo de 4.3 mm de diâmetro interno, preenchido com água deuterada a 99.7% para experimentos de microimagens, e uma outra amostra que contém um cubo de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ preenchido com metanol deuterado (CD_3OD) mergulhado em água deuterada (D_2O) para espectroscopia localizada.

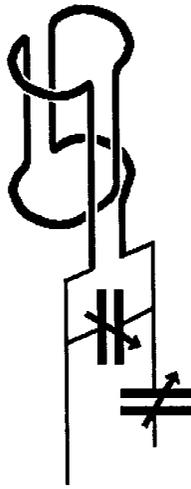


Figura VI.13 : Configuração em forma de sela (*saddle coil*) da sonda de ^2H . O circuito de sintonia é indicado pelos capacitores variáveis.

VI.3 Microimagens de deutério

Para os experimentos de microimagens tivemos que analisar a sequência *Spin Echo Multislice*, (SEMS), disponível no software do espectrômetro, e modifica-la para nosso sistema de gradientes.

De forma que utilizamos o arquivo de parâmetros do sistema de gradiente, mostrado na tabela VI.1, a sequência não permitia a aquisição de imagens com qualidade suficiente (relação sinal-ruído baixa). Isso se deve ao fato que os parâmetros gx_{max} , gy_{max} e gz_{max} , na sequência original, são utilizados para calcular a temporização dos gradientes e suas amplitudes. Porém, utilizamos estes parâmetros na calibração dos gradientes de forma não prevista pelo *software*. Consequentemente, a temporização e as amplitudes dos gradientes não são calculadas corretamente, inibindo assim a otimização adequada da sequência. Corrigimos as sequências de pulsos de forma que os cálculos são efetuados na base dos parâmetros gx_{limit} , gy_{limit} e gz_{limit} , que contem os valores corretos para as amplitudes máximas dos gradientes no nosso sistema. Assim foi possível utilizar as sequências de pulsos de forma otimizada, resultando em imagens com boa relação sinal-ruído.

Mostramos na figura VI.14 a microimagem da amostra de água deuterada em um *Field of View* (FOV) de 15 mm (somente 10 mm mostrado na figura) e com 256 pontos nas duas direções (frequência e fase). Isso resulta em uma resolução de 60 micrometros dentro do plano adquirido, sendo que a espessura do plano é 2 mm. Consideramos essa resolução espacial excelente para um tempo de aquisição total de 17 minutos, tendo em vista a baixa sensibilidade do núcleo ^2H , relativa à de ^1H . Com este resultado mostramos a primeira microimagem em deutério com resolução de apenas algumas dezenas de micrometros

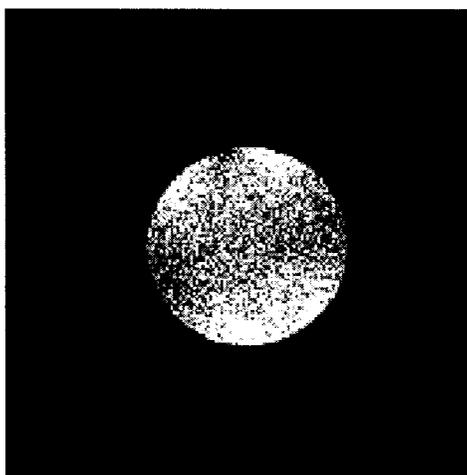


Figura VI.14 : Microimagem de uma amostra de deutério de 4.3mm de diâmetro, adquirida com a sequência *Spin Echo Multislice*. Parâmetros experimentais : Resolução *inplane* 60 micrometros, THK=2mm, $N_{\text{AVG}}=4$, TR = 1s, $T_{\text{TOT}}=17\text{min}$.

Utilizamos ainda a sequência FLASH para adquirir uma segunda imagem da nossa amostra. Com esta sequência não foi possível manter a resolução anterior, isto é, 60 micrometros, devido ao aumento excessivo do *duty cycle* dos gradientes aplicados nessa sequência. Utilizamos um *Field of View* de 30 mm (somente 10 mm mostrado na figura VI.15) com 256 pontos nas duas direções (frequência e fase). A espessura do plano selecionado é 2 mm. Com um tempo de repetição TR = 0.3 s e 4 médias o tempo de aquisição total é de 5 minutos.

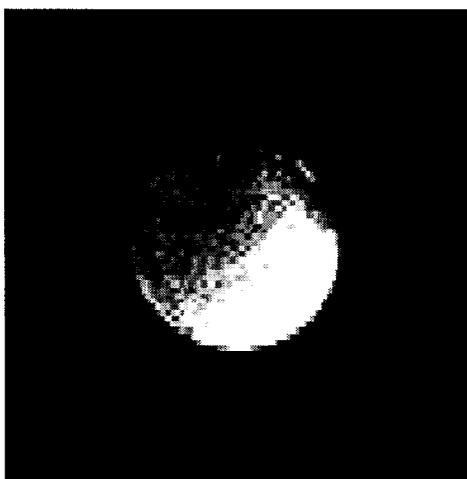


Figura VI.15 : Microimagem da amostra de deutério adquirida com a sequência FLASH. Parâmetros experimentais : Resolução *inplane* 120 micrometros, THK=2mm, $N_{AVG}=4$, TR=0.3s, $T_{TOT}=5$ min.

VI.4 Espectroscopia localizada em deutério

Utilizamos a mesma amostra de deutério para um experimento de localização de um volume, sendo o mesmo visualizado numa imagem análoga às da figura V.3. O resultado, apresentado na figura VI.16, mostra a localização de um volume de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ em uma imagem com FOV = $10 \times 10 \text{ mm}$ (somente 5 mm mostrado na figura VI.16). A Imagem prova que a localização é eficiente

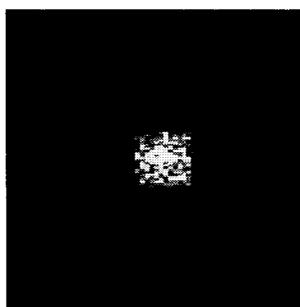


Figura VI.16 : Imagem para verificar a localização de um VOI de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$. Parâmetros experimentais: FOV= $10 \times 10 \text{ mm}$, matriz 256×128 Pts., THK=2mm, TE=106ms, TR=2s, $N_{AVG}=8$, $T_{TOT}=34$ min.

Para testes mais rigorosos da localização construímos uma amostra que contém um cubo de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ preenchido com metanol deuterado (CD_3OD). Este cubo é mergulhado em água deuterada (D_2O) dentro de um tubo de 4.3 mm de diâmetro. Adquirimos imagens localizadoras desta amostra com a sequência *spin echo* apresentadas na figura VI.17.

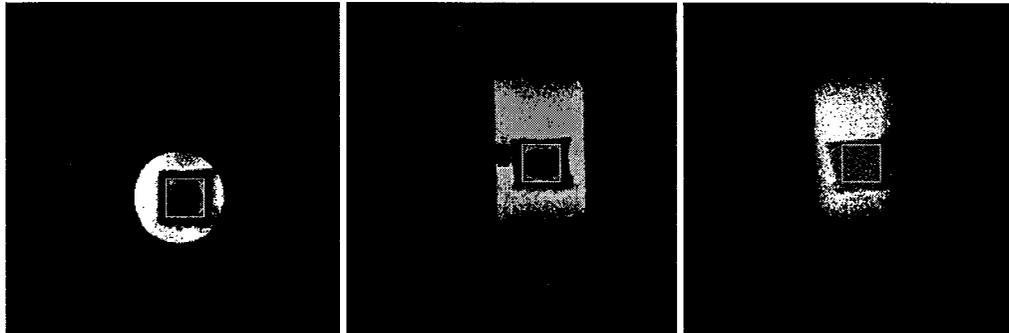


Figura VI.17 : Imagens localizadoras de uma amostra de um cubo de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ preenchido com metanol deuterado, mergulhado em água deuterada, nas direções transversal (esquerda), sagital (centro) e coronal (direita). Indicamos a localização de um volume de $1.8 \times 1.8 \times 1.8 \text{ mm}^3$ utilizado para adquirir o espectro da figura VI.18b. Parâmetros experimentais: FOV= $15 \times 15 \text{ mm}$, matriz 256×256 Pts., THK= 2 mm , TE= 26 ms , TR= 1 s , $N_{\text{AVG}}=8$, $T_{\text{TOT}}=34 \text{ min}$.

Na figura VI.18a mostramos o resultado de um experimento de espectroscopia não localizada realizado com esta amostra. Neste espectro observa-se a superposição da linha da água (0 ppm), com as duas linhas do metanol (1.2 e 2.5 ppm). Devido à grande extensão da amostra, o espectro da água se apresenta alargado. Na figura IV.18b mostramos o espectro localizado com PRESS, em um volume de $1.8 \times 1.8 \times 1.8 \text{ mm}^3$, como indicado nas imagens localizadoras da figura VI.17. Este espectro mostra somente as ressonâncias do metanol, provando assim a eficiência da localização nas três dimensões. Observa-se que a largura de linha do metanol em VI.18b é muito menor que a da água em VI.18a. Isso é devido ao efeito menor das inomogeneidades do campo B_0 em um volume pequeno, como o utilizado de $1.8 \times 1.8 \times 1.8 \text{ mm}^3$.

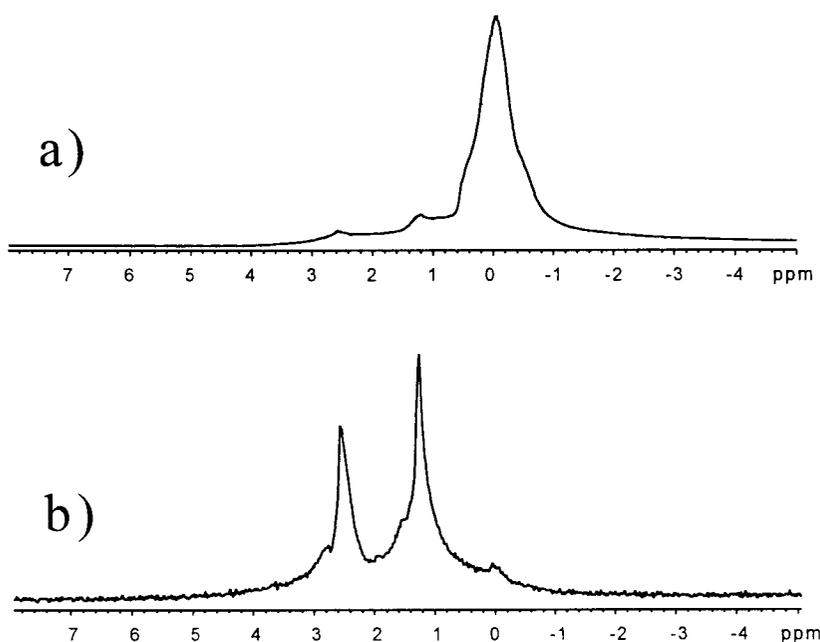


Figura VI.18 : Espectros da amostra apresentada na figura VI.17 a) não localizado e b) localizado com PRESS. Parâmetros experimentais: a) $TR=0.7s$, $N_{AVG}=64$, $T_{TOT}=45s$ b) $VOI=1.8 \times 1.8 \times 1.8mm^3$, $TR=0.8s$, $TE=30ms$, $N_{AVG}=1024$, $T_{TOT}=14min$. Em ambos os espectros foram adquiridos 2048 pontos com *zero filling* para 4096 pontos.

Os gradientes máximos utilizados no experimento de espectroscopia localizada com PRESS eram 25 G/cm (250 mT/m), sendo essa a metade do valor máximo permitido pela especificação da bobina de gradientes. Os efeitos de *eddy currents*, visíveis em uma pequena assimetria da forma das linhas, podem ser considerados desprezíveis.

O fato de ter obtido o primeiro espectro localizado de deutério em um volume de apenas alguns microlitros mostra o potencial para novas aplicações na área da espectroscopia localizada de pequenos volumes. Provamos ainda a instalação bem sucedida do subsistema de gradientes que será descrita detalhadamente no próximo item.

Capítulo VII

Conclusões

Neste capítulo vamos analisar os métodos utilizados neste trabalho e discutir de forma resumida os resultados mais relevantes.

VII.1 Resumo

O grupo de Ressonância Magnética do Instituto de Física de São Carlos, onde foi desenvolvido o presente trabalho, atua tanto na área de tomografia quanto na espectroscopia por RMN. Já realizamos nosso programa de mestrado nesse Instituto desenvolvendo metodologias de tomografia para uso clínico. No trabalho aqui apresentado continuamos essa atividade na área de espectroscopia com o desenvolvimento de metodologias para espectroscopia localizada *in vivo*. Isso permitirá ampliar as aplicações clínicas da RMN para a área de espectroscopia.

As metodologias propostas no presente trabalho, bem como a espectroscopia localizada em geral, encontram-se em estado de avaliação clínica. Portanto é importante conhecer detalhadamente as propriedades das diferentes técnicas. Estudamos as qualidades dessas técnicas para diferentes aplicações e núcleos. Aplicamos estes conhecimentos numa estadia de um ano e três meses no *Centro de Pesquisa sobre Cancer* (Deutsches Krebsforschungszentrum - DKFZ) em Heidelberg - Alemanha. O trabalho no ambiente clínico desse instituto refletiu-se na escolha de determinadas técnicas mais convenientes para a utilização na rotina clínica e a rejeição de outras menos adequadas.

Durante o trabalho aqui apresentado trabalhamos com vários equipamentos de RMN em campos diferentes. Além dos sistemas VARIAN/SISCO (2 Teslas) e SIEMENS Magnetom SP (1.5 Teslas) do DKFZ utilizamos os equipamentos disponíveis no nosso grupo : um espectrômetro Analogic AN9100 operando em um campo de 2 Teslas e um sistema VARIAN Unity Inova de 9.6 Teslas. Implementamos nesses sistemas as técnicas de espectroscopia localizada e desenvolvemos metodologias otimizadas para aplicações *in vivo*. Possivelmente o trabalho será continuado em um sistema de 0.5 Teslas que esta em fase de instalação na Santa Casa de São Carlos.

VII.2 Conclusões

Discutimos nos capítulos I e II as propriedades de diferentes núcleos e sequências de espectroscopia localizada. A técnica PRESS é a mais indicada para espectroscopia localizada de ^1H *in vivo*, porém não permite tempos ao eco curtos ($TE_{\text{MIN}} \approx 100\text{ms}$) e portanto não é indicada para experimentos em núcleos com tempos de relaxação transversais (T_2) curtos. Observamos que os núcleos ^{31}P e ^{13}C possuem T_2 curto de até 10ms. Em experimentos de espectroscopia localizada com esses núcleos é portanto necessário utilizar sequências de pulsos que permitam TE curto, sendo elas STEAM e CSI. A eficiência da localização com CSI pode ser aumentada combinando-a com técnicas de *single voxel* como PRESS, STEAM, ISIS. Apresentamos no capítulo VI os resultados obtidos com PRESS, STEAM e CSI.

Técnicas como ISIS e GMAX necessitam múltiplas aquisições para a localização através de um esquema de adição/subtração para cancelar o sinal fora do volume selecionado (itens II.7, III.4 e III.5) . Isso faz com que essas técnicas sejam muito sensíveis a movimentos durante a aquisição. Portanto elas não são muito indicadas para espectroscopia *in vivo*, devido principalmente ao batimento cardíaco

e/ou movimentos respiratórios que possam prejudicar a localização. Além disso, em ambiente clínico, muitas vezes trata-se de experimentos em pacientes com deficiência de coordenação motora. Um trabalho recente de R.A. de Graaf ^[98] et al. relata pulsos adiabáticos compostos que não necessitam um procedimento de adição/subtração dos sinais de diferentes aquisições para obter uma localização. Ainda não analisamos essa técnica detalhadamente, mas sendo os pulsos adiabáticos compostos de longa duração, a localização em três dimensões somente é possível em amostras com T_2 longos.

Em experimentos de espectroscopia localizada de ^{13}C percebemos sérios artefatos de localização devido à grande faixa de deslocamento químico desse núcleo (item II.8). Estes artefatos devem ser minimizados utilizando-se gradientes de seleção intensos e/ou a sequência CSI, que, nas direções de codificação de fase, não provoca artefatos de localização. O uso de gradientes intensos resulta em artefatos devido a *eddy currents* provocados pelo chaveamento dos mesmos. Estes artefatos devem ser reduzidos ao mínimo possível, implementando as sequências de espectroscopia localizada de forma a minimizar os chaveamentos dos gradientes. Nos experimentos, os parâmetros de temporização das sequências de pulsos devem ser configurados de forma que os efeitos de *eddy currents* possam decair a níveis suficientemente baixos. Deve-se preocupar principalmente em introduzir um intervalo entre o último chaveamento de gradiente e o começo da aquisição.

Apresentamos no capítulo IV resultados de espectroscopia localizada de ^{13}C com as sequências PRESS, STEAM e CSI otimizadas de forma de minimizar o artefato de localização e efeitos de *eddy currents*. Chegamos a indicar uma metodologia otimizada para estudos *in vivo* (itens IV.7 e IV.8) baseando-se em experimentos de ^{13}C em abundância natural. O trabalho não chegou à aplicação em pacientes devido a baixa sensibilidade do núcleo ^{13}C e dificuldades jurídicas na utilização de produtos enriquecidos em ^{13}C em humanos. No entanto

consideramos os resultados obtidos um grande avanço na espectroscopia localizada de ^{13}C *in vivo* possibilitando o acompanhamento do tratamento de tumores cerebrais.

No capítulo V observamos que uma boa homogeneidade do campo B_0 e a correção de efeitos de *eddy currents* é fundamental para experimentos de espectroscopia localizada bem sucedidos. Portanto, é necessário utilizar bobinas de gradientes ativamente blindadas (*self-shielded coils*), ajustando cuidadosamente as correntes na blindagem, e ainda utilizar a correção de *eddy current* por pre-ênfase do sinal de entrada nos amplificadores de gradiente. Apresentamos no capítulo VI resultados obtidos em deutério mostrando a instalação bem sucedida do sistema de gradientes de um espectrômetro VARIAN 400 MHz. Realizamos experimentos pioneiros de espectroscopia localizada em deutério com volumes de apenas alguns microlitros. Em experimentos de microimagens de deutério alcançamos uma resolução de apenas algumas dezenas de micrometros (itens VI.2 e VI.3). Estes resultados permitirão monitorar, por exemplo, a absorção de água deuterada em fragmentos de plantas. Utilizando as mesmas técnicas em ^1H , podemos alcançar uma resolução espacial ainda maior, tendo em conta que a sensibilidade deste núcleo é aproximadamente 100 vezes maior que a de deutério.

Para finalizar concluímos que este trabalho demonstra o progresso no desenvolvimento de metodologias de espectroscopia localizada otimizadas para aplicações clínicas. Os resultados obtidos mostram pioneirismo em experimentos com deutério e avanços consideráveis na espectroscopia localizada de ^{13}C *in vivo*. Com isso o trabalho deverá contribuir para novas aplicações clínicas da espectroscopia *in vivo* no nosso grupo.

Referências Bibliográficas

- (1) F. Bloch: "Nuclear Induction", *Phys. Rev.* **70**, 460 (1946)
- (2) E. U. Purcell, H. C. Torrey and R. V. Pound: "Absorption by Nuclear Magnetic Moments", *Phys. Rev.* **69**, 37 (1946)
- (3) E. L. Hahn: "Spin Echoes", *Phys. Rev.* **80**, 580 (1950)
- (4) R. V. Pound and W. D. Knight: "A Radiofrequency Spectrograph and Simple Magnetic-Field Meter", *Rev. Sci. Instr.* **21**, 219 (1950)
- (5) R. R. Ernst and W. A. Anderson: "Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance", *Rev. Sci. Instr.* **37**, 93 (1966)
- (6) P. Lauterbur: "Image Formation by Induced Local Interactions: Example Employing Nuclear Magnetic Resonance", *Nature* **242**, 190 (1973)
- (7) A. Kumar, D. Weltli e R. R. Ernst: "NMR Fourier Zeugmatography", *J. Magn. Reson.* **18**, 69 (1975)
- (8) P. Mansfield and I. L. Pykett: "Biological and Medical Imaging by NMR", *J. Magn. Reson.* **29**, 355 (1978)
- (9) R. E. Gordon, P. E. Hanley, D. Shaw, D. G. Gadian, G. K. Radda, P. Styles, P. J. Bore and L. Chan: "Localization of Metabolites in Animals Using ^{31}P Topical Magnetic Resonance", *Nature* **287**, 736 (1980)
- (10) W. P. Aue, S. Mueller: "Volume-Selective Excitation. A Novel Approach to Topical NMR", T. A. Cross and J. Seelig, *J. Magn. Reson.* **56**, 350 (1984)
- (11) D. M. Doddrell, W. M. Brooks, J. M. Bulsing, J. Field M. G. Irving and H. Braddley: "Spatial and Chemical-Shift Encoded Excitation. SPACE, a New Technique for Volume-Selected NMR Spectroscopy", *J. Magn. Reson.* **68**, 367 (1986)
- (12) P. R. Luyten, A. H. J. Marien, B. Sijtsma, J. A. den Hollander: "Solvent-Suppressed Spatially Resolved Spectroscopy. An Approach to High-Resolution NMR on a Whole-Body MR System", *J. Magn. Reson.* **67**, 148 (1986)
- (13) J.J.H. Ackermann, T. H. Grove, G. G. Wong, D. G. Gadian and D. G. Radda: "Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P NMR surface coils", *Nature* **283**, 167 (1980)
- (14) A.J. Shaka, J. Keeler, M.B. Smith and R. Freeman: "Spatial Localization of NMR Signals in an Inhomogeneous Radiofrequency Field", *J. Magn. Reson.* **61**, 175 (1985)

- (15) M. R. Bendall and R. E. Gordon: "Depth and Refocusing Pulses Designed for Multipulse NMR with Surface Coils", *J. Magn. Reson* **53**, 365 (1983)
- (16) M.R. Bendall and W.P. Aue: "Experimental verification of Depth Pulses Applied with Surface Coils", *J. Magn. Reson.* **54**, 149 (1983)
- (17) T.C. Ng, J.D. Glickson and M.R. Bendall: "Depth Pulse Sequence for Surface Coils: Spatial Localization and T_1 Measurement", *Magn. Reson. Med.* **1**, 450 (1984)
- (18) J. Pekar, S. Leigh and B. Cance: "Harmonically Analyzed Sensitivity Profile. A Novel Approach to Depth Pulses for Surface Coils", *J. Magn. Reson.* **64**, 115 (1985)
- (19) P. A. Bottomley, T. H. Foster and R. D. Darrow: "Depth Resolved Surface-Coil Spectroscopy (DRESS) for *in Vivo* ^1H , ^{31}P and ^{13}C NMR", *J. Magn. Reson.* **59**, 338 (1984)
- (20) R. Kimmich and D. Hoepfel: "Volume-Selective Multipulse Spin-Echo Spectroscopy", *J. Magn. Reson.* **72**, 379 (1987)
- (21) P. A. Bottomley U. S. Patent 4.480.228, 1984
- (22) P. A. Bottomley : "Spatial localization in NMR-Spectroscopy *in Vivo*", *Ann. NY Acad Sci* **508**, 333-348 (1987)
- (23) J. Granot: "Selected Volume Excitation Using Stimulated Echoes (VEST). Applications to Spatially Localized Spectroscopy and Imaging", *J. Magn. Reson.* **70**, 488 (1986)
- (24) J. Frahm, K. D Merboldt and W. Hanicke: "Localized Proton Spectroscopy Using Stimulated Echoes", *J. Magn. Reson* **72**, 502 (1987)
- (25) C.T.W. Moonen and P. C. M. van Zijl: "Highly effective Water Supression for *in Vivo* Proton NMR Spectroscopy (DRYSTEAM)", *J. Magn. Reson* **88**, 28 (1990)
- (26) R. J. Ordidge, A. Connelly and J. A. B. Lohman: "Image Selective *in Vivo* Spectroscopy (ISIS). A New Technique for Spatially Selective NMR Spectroscopy", *J. Magn. Reson* **66**, 283 (1986)
- (27) A. Connelly, C. Counsell, J. A. B. Lohman and R. J. Ordridge: "Outer Volume Suppressed Image Related *in Vivo* Spectroscopy (OSIRIS), a High-Sensitivity Localized Technique", *J. Magn. Reson* **78**, 519 (1988)
- (28) P. R. Luyten, J. P. Groen, J. W. A H. Vermeulen and J. A den Hollander: "Experimental Approaches to Image Localized Human ^{31}P NMR Spectroscopy", *Magn. Reson. Med.* **11**, 1 (1989)
- (29) A. A. Maudsley, S. K. Hilal, W. H. Perman and H. E. Simon: "Spatially Resolved High resolution Spectroscopy by Four Dimensional NMR", *J Magn. Reson.* **51**, 147 (1983)

- (30) A. Abragam : "Principles of Nuclear Magnetism", Clarendon Press, Oxford, (1994)
- (31) C. P. Slichter : "Principles of Magnetic Resonance", Springer Verlag, New York, (1980)
- (32) A. Tannús : "Desenvolvimento da Tecnologia de Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear - TORM", São Carlos (SP), Tese de doutorado IFQSC/USP (1987)
- (33) B. Foerster : "Técnicas de Aquisição rápida em Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear", São Carlos (SP), Tese de mestrado IFQSC/USP (1994)
- (34) R. Bracewell : "The Fourier Transform and its Applications", McGraw-Hill, New York, (1965)
- (35) A.E. Derome : "Modern NMR Techniques for Chemistry Research", Pergamon Press, New York, (1987)
- (36) Fa. Bruker, Almanac 1994
- (37) F.A. Howe, R.J. Maxwell, D.E. Saunders, M.M. Brown, J.R. Griffiths: "Proton Spectroscopy *in Vivo*" Magn. Reson. Quart. **9**, 31 (1993)
- (38) J. Frahm, H. Bruhn, M.L. Gynell, K.D. Merboldt, W. Hänicke and R. Sauter: "Localized High-Resolution Proton NMR Spectroscopy Using Stimulated Echoes: Initial Applications to Human Brain *in Vivo*", Magn. Reson. Med. **9**, 79 (1989)
- (39) J. Frahm, H. Bruhn, M.L. Gyngell, K.D. Merboldt, W. Hänicke and R. Sauter: "Localized Proton NMR Spectroscopy in Different Regions of the Human Brain *in Vivo*. Relaxation Times and Concentrations of Cerebral Metabolites", Magn. Reson. Med. **11**, 47 (1989)
- (40) P. van Hecke, G. Marchal, K. Johannik, P. Demaerel, G. Wilms, H. Carton and A.L. Baert: "Human Brain Proton Localized Spectroscopy in Multiple Sclerosis", Magn Reson. Med. **18**, 199 (1991)
- (41) D.L. Rothman, C.C. Hanstock, O.A.C. Petroff, E.J. Novotny, J.W. Richard and R.G. Shulman: "Localized ^1H NMR Spectra of Glutamate in the Human Brain", Magn. Reson. Med. **25**, 94 (1992)
- (42) J. Frahm, T. Michaelis, K.D. Merboldt, H. Bruhn, M.L. Gyngell and W. Hänicke: "Improvements in Localized Proton NMR Spectroscopy of Human Brain. Water Supression, Short Echo Times, and 1ml Resolution" J. Magn. Reson **90**, 464 (1990)
- (43) W.I. Jung, W. Grodd, O. Lutz and D. Petersen: "Localized ^1H *in Vivo* NMR Spectroscopy of Small-Volume Elements in Human Brain at 1.5T", Magn. Reson. Med. **15**, 320 (1990)

- (44) C.M. Segebarth, D.F. Balériaux, P.R. Luyten and J.A. den Hollander: "Detection of Metabolic Heterogeneity of Human Intracranial Tumors *in Vivo* by ^1H NMR Spectroscopic Imaging", *Magn. Reson. Med.* **13**, 62 (1990)
- (45) O. Gonen, F. Arias-Mendoza and G. Goelman: "3D Localized *in Vivo* ^1H Spectroscopy of Human Brain by Using a Hybrid of 1D-Hadamard with 2D-Chemical Shift Imaging", *Magn. Reson. Med.* **37**, 644 (1997)
- (46) C. Boesch, J. Slotboom, H. Hoppeler and R. Kreis: "*In Vivo* Determination of Intra-Myocellular Lipids in Human Muscle by Means of ^1H -MR-Spectroscopy", *Magn. Reson. Med.* **37**, 484 (1997)
- (47) H. Bongers, F. Schick, M. Skalej, W.I. Jung and A. Stevens: "Localized *in Vivo* ^1H Spectroscopy of Human Skeletal Muscle: Normal and Pathologic Findings", *Magn. Reson. Imag.* **10**, 957 (1992)
- (48) H. Bruhn, J. Frahm, M.J. Gynell, K.D. Merboldt, W. Hänicke and R. Sauter: "Localized Proton NMR Spectroscopy Using Stimulated Echoes: Applications to Human Skeletal Muscle *in Vivo*" *Magn. Reson. Med.* **17**, 82 (1991)
- (49) Z. Wang, E.A. Noyszewski and J.S. Leigh: "*In Vivo* MRS Measurements of Deoxymyoglobin in Human Forearms", *Magn Reson Med.* **14**, 562 (1990)
- (50) N.J. Shah, T.A. Carpenter, I.D. Wilkinson, L.D. Hall, A.K. Dixon, C.E.L. Freer, K. Prosser and D.B. Evans: "Localized *in Vivo* Proton Spectroscopy of the Human Kidney", *Magn. Reson. Med.* **20**, 292 (1991)
- (51) J.A. den Hollander, W.T. Evanochko and G.M. Pohost: "Observation of Cardiac Lipids in Humans by Localized ^1H Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging", *Magn. Reson Med.* **32**, 175 (1994)
- (52) S.P. Bessman and P.J. Geiger: "Transport of Energy in Muscle: The Phosphorylcreatine Shuttle" *Science* **211**, 448-452 (1981)
- (53) D.J. Taylor, P. Styles, P.M. Matthews, D.A. Arnold, D.G. Gadian, P. Bore and G.K. Radda: "Energetics of Human Muscle: Exercise-Induced ATP Depletion", *Magn. Reson. Med.* **3**, 44 (1986)
- (54) K.D. Merboldt, D. Chien, W. Hänicke, M.L. Gynell, H. Bruhn and J. Frahm: "Localized ^{31}P NMR Spectroscopy of the Adult Human Brain *in Vivo* Using Stimulated-Echo (STEAM) Sequences", *J. Magn. Reson.* **89**, 343 (1990)
- (55) D.B. Twieg, D.J. Meyerhoff, B. Hubesch, K. Roth, D. Sappoe-Mariner, M.D. Boska, J.R. Gober, S. Schaefer and M.W. Weiner: "Phosphorus-31 Magnetic Resonance Spectroscopy in Humans by Spectroscopic Imaging: Localized Spectroscopy and Metabolite Imaging", *Magn. Reson. Med.* **12**, 291 (1989)
- (56) M.D. Boska, B. Hubesch, D.J. Meyerhoff, D.B. Twieg, G.S. Karczmar, G.B. Matson and M.W. Weiner: "Comparison of ^{31}P MRS and ^1H MRI at 1.5 and 2.0 T", *Magn. Reson. Med.* **13**, 228 (1990)

- (57) O.M. Redmond, E. Bell, J.P. Stack, P.A. Dervan, D.N. Carney, B. Hurson and J.T. Ennis: "Tissue Characterization and Assessment of Preoperative Chemoterapeutic Response in Muscoletal Tumors by in Vivo 31P Magnetic Resonance Spectroscopy", *Magn. Reson. Med.* **27**, 226 (1992)
- (58) R. Buchli, C.O. Duc, E. Martin and P. Boesinger: "Assessment of Absolute Metabolite Concentrations in Human Tissue by ³¹P MRS *in Vivo*. Part 1: Cerebrum, Cerebellum, Cerebral Gray and White Matter" *Magn. Reson. Med.* **32**, 447 (1994)
- (59) R. Buchli, C.O. Duc, E. Martin and P. Boesinger: "Assessment of Absolute Metabolite Concentrations in Human Tissue by ³¹P MRS *in Vivo*. Part 2: Muscle, Liver Kidney" *Magn. Reson. Med.* **32**, 453 (1994)
- (60) N. Beckmann, J. Seelig and H. Wick: "Analysis of Glycogen Storage Disease by *in Vivo* ¹³C NMR: Comparison of Normal Volunteers with a Patient", *Magn. Reson. Med.* **16**, 150 (1990)
- (61) N. Beckmann, R. Fried, I. Turkalj, J. Seelig, U. Keller and G. Sandler: "Noninvasive Observation of Hepatic Glycogen Formation in Man by ¹³C MRS after Oral and Intravenous Glucose Administration", *Magn. Reson. Med.* **29**, 583 (1993)
- (62) R. Roussel, P.G. Carlier, C. Wary, G. Velho and G. Bloch: "Evidence for 100% ¹³C Visibility of Glucose in Humans Skeletal Muscle", *Magn. Reson. Med.* **37**, 821 (1997)
- (63) G. Ende and P. Bachert: "Dynamic ¹³C-¹H Nuclear Polarization of Lipid Methylene Resonances Applied to Broadband Proton-Decoupled *in Vivo* ¹³C MR Spectroscopy of Human Breast and Calf Tissue", *Magn. Reson. Med.* **30**, 415 (1993)
- (64) R. Gruetter, D.L. Rothman, E. J. Novotny and R.G. Shulman: "Localized ¹³C NMR Spectroscopy of *myo*-Inositol in the Human Brain *in Vivo*", *Magn. Reson. Med.* **25**, 204 (1992)
- (65) N. Beckman and S. Müller: "Natural-Abundance ¹³C Spectroscopic Imaging Applied to Humans", *J. Magn. Reson.* **93**, 188 (1991)
- (66) A.G. Redfield, S.D. Kunz and E.K. Ralph: "Dynamic Range in Fourier Transform Proton Magnetic Resonance", *J. Magn. Reson.* **50**, 495 (1975)
- (67) R.K. Gupta: "Dynamic Range Problem in Fourier Transform NMR. Modified WEFT Pulse Sequence", *J. Magn. Reson.* **24**, 461 (1976)
- (68) D.I. Hoult: "Solvent Peak Saturation with Single Phase and Quadrature Fourier Transformation", *J. Magn. Reson.* **21**, 337 (1976)
- (69) V. Sklenár and Z. Starcuk: "1-2-1 Pulse Train: A new Effective Method of Selective Excitation for Proton NMR in Water", *J. Magn. Reson.* **50**, 495 (1982)

- (70) A. Haase, J. Frahm, W. Hanicke and D. Matthei: “¹H NMR Chemical-Shift Selective (CHESS) Imaging”, *Phys. Med. Biol.* **30**, 341 (1985)
- (71) D.M. Doddrell, G.J. Galloway, W.M. Brooks, J. Field, J.M. Bulsing, M.G. Irving and H. Baddeley: “Water Signal Elimination in Vivo, Using “Suppression by Mistimed Echo and Repetitive Gradient Episodes””, *J. Magn. Reson.* **70**, 176 (1986)
- (72) T. Ernst and J. Henning: “Improved Water Suppression for Localized in Vivo ¹H Spectroscopy”, *J. Magn. Reson. Series B*, **106**, 181 (1995)
- (73) J.P. Mugler III and J.R. Brookeman: “The Design of Pulse Sequences Employing Spatial Presaturation for Suppression of Flow Artifacts”, *Magn. Reson. Med.* **23**, 201 (1992)
- (74) A.A. Maudsley: “Multiple-Line Scanning Spin Density Imaging”, *J. Magn. Reson.* **41**, 112 (1980)
- (75) G. Johnson, K.J. Jung, E.X. Wu and S.K. Hilal: “Self-Correction of Proton Spectroscopic Images for Gradient Eddy Current Distortions and Static Field Inhomogeneities”, *Magn. Reson. Med.* **30**, 255 (1993)
- (76) R.R. Ernst: “Nuclear Magnetic Double Resonance with an Incoherent Radio-Frequency Field”, *J. Chem. Phys.* **45**, 3845 (1966)
- (77) M.H. Levitt and R. Freeman: “Composite Pulse Decoupling”, *J. Magn. Reson.* **43**, 502 (1981)
- (78) M.H. Levitt: “Broadband Heteronuclear Decoupling”, *J. Magn. Reson.* **47**, 328 (1982)
- (79) M.H. Levitt: “Supercycles for Broadband Heteronuclear Decoupling”, *J. Magn. Reson.* **50**, 157 (1982)
- (80) A.J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel and R. Freeman: “An Improved Sequence for Decoupling: WALZ-16”, *J. Magn. Reson.* **52**, 335 (1983)
- (81) A.J. Shaka, J. Keeler and R. Freeman: “Evaluation of a New Broadband Decoupling Sequence: WALZ-16”, *J. Magn. Reson.* **53**, 313 (1983)
- (82) E.O. Stejskal and J. Schaefer: “Comparison of Quadrature and Single-Phase Fourier Transform NMR”, *J. Magn. Reson.* **14**, 160 (1974)
- (83) J. Tang, C.P. Lin, M.K. Bowman and J.R. Norris: “An Alternative to Fourier Transform Spectral Analysis with Improved Resolution”, *J. Magn. Reson.* **62**, 167 (1985)
- (84) V. Viti, E. Massaro, L. Guidoni and P. Barone: “The Use of the Maximum Entropy Method in NMR Spectroscopy”, *J. Magn. Reson.* **70**, 379 (1986)
- (85) G.A. Pearson: “A General Baseline-Recognition and Baseline-Flattening Algorithm”, *J. Magn. Reson.* **27**, 265 (1977)

- (86) K. Derby, C. Hawryszko and J. Trop: "Baseline Deconvolution, Phase Correction, and Signal Quantification in Fourier Localized Spectroscopic Imaging", *Magn. Reson. Med.* 12, 235 (1989)
- (87) G.C. McKinnon, C. Burger and P. Boesiger: "Spectral Baseline Correction Using CLEAN", *Magn. Reson. Med.* 13, 145 (1990)
- (88) A.A. Maudsley, Z.W. Dieter, J. Meyerhoff and M.W. Weiner: "Automated Processing for Proton Spectroscopic Imaging Using Water Reference Deconvolution", *Magn. Reson. Med.* 31, 589 (1994)
- (89) M. S. Silver, R. I. Joseph and D. I. Hoult: "Highly Selective $\pi/2$ and π Pulse Generation", *J. Magn. Reson.* **59**, 347 (1984)
- (90) D. Kunz: "Frequency-Modulated Radiofrequency Pulses in Spin-Echo and Stimulated-Echo Experiments", *Magn. Reson. Med.* **4**, 129 (1987)
- (91) K. Ugurbil, M. Garwood and M. R. Bendall: "Amplitude- and Frequency-Modulated Pulses to Achieve 90° Plane Rotations with Inhomogeneous B_1 Fields", *J. Magn. Reson.* **72**, 177 (1987)
- (92) M. R. Bendall, M. Garwood, K. Ugurbil and D. T. Pegg: "Adiabatic Refocusing Pulse Which Compensates for Variable RF Power and OFF-Resonance Effects", *Magn. Reson. Med.* **4**, 493 (1987)
- (93) K. Ugurbil, M. Garwood, A. Rath and M. R. Bendall: "Amplitude and Frequency/Phase-Modulated Refocusing Pulses that Induce Plane Rotations Even in Presence of Inhomogeneous B_1 Fields", *J. Magn. Reson.* **78**, 472 (1988)
- (94) K. Ugurbil, M. Garwood and A. R. Rath: "Optimization of Modulation Functions to Improve Insensitivity of Adiabatic Pulses to Variation in B_1 Magnitude", *J. Magn. Reson.* **80**, 448 (1988)
- (95) A. J. Johnson, M. Garwood and K. Ugurbil: "Slice Selection with Gradient-Modulated Adiabatic Excitation Despite the Presence of Large B_1 Inhomogeneities", *J. Magn. Reson.* **81**, 653 (1989)
- (96) A. Tannús, M. Garwood, H. Panepucci and T. J. Bonagamba, Proceedings do 9^o SMRM Meeting, N. York, 1328 (1990).
- (97) M. R. Willcott, III. , G. L. Mee and J.P. Chesick, "Magnetic Field Mapping in NMR Imaging", *Magn. Reson. Imaging* **5**, 301 (1987)
- (98) R.A. de Graaf, K. Nicolay and M. Garwood: "Single-shot, B_1 -insensitive slice selection with a gradient-modulated adiabatic pulse, BISS-8", *Magn Reson Med.* **35**, 652 (1996).