

## Historias de la RMN

Jorge Santoro

### 18. El experimento TOCSY

En 1962 Sven Hartmann y Erwin Hahn concibieron (1) un ingenioso método de doble resonancia para transferir polarización entre espines de distinto tipo en el caso de sólidos. Los experimentos iniciales detectaban la pérdida de magnetización del espín fuente, I, como consecuencia de la transferencia al espín objetivo, S. Esto permitía determinar la resonancia de espines S, diluidos o de baja relación magnetogirica, observando espines I abundantes, con el consiguiente incremento en la sensibilidad. Años después el procedimiento adquirió gran interés cuando Alexander Pines, M.G. Gibby y John Waugh (2) pusieron el énfasis en la detección de los espines S, denominando al método *cross polarization*, y Jacob Schaefer y Edward Stejskal combinaron esta versión del método Hartmann-Hahn con el giro al ángulo mágico para obtener espectros de  $^{13}\text{C}$  en fase sólida (3). Ambos desarrollos dieron un gran impulso a la RMN de sólidos.

La descripción teórica de la transferencia Hartmann-Hahn se puede efectuar mediante consideraciones termodinámicas. Los espines I, que se encuentran en equilibrio a la temperatura T en el campo  $B_0$ , se llevan al plano donde se anclan a un eje mediante un campo de radiofrecuencias,  $B_1(I)$ . En el sistema de ejes rotatorio, en el que solo es relevante  $B_1(I)$ , la temperatura de los espines I es baja,  $T_R = T \cdot B_1/B_0$ , puesto que el número de espines alineados a favor del campo  $B_1$  es muy elevado en comparación con la polarización de equilibrio que corresponde a  $B_1$  a la temperatura T. La aplicación de un campo de radiofrecuencia,  $B_1(S)$ , a los espines S causa inicialmente su saturación, por lo que en su sistema de ejes rotatorio su temperatura es infinita. Si ambos reservorios térmicos se ponen en contacto se producirá un flujo que calentará los espines I (disminuyendo su polarización a lo largo de  $B_1(I)$ ) y enfriará los espines S (incrementando su polarización a lo largo de  $B_1(S)$ ). La forma propuesta por Hartmann y Hahn (1) para establecer el contacto entre ambos reservorios térmicos consiste en hacer

$$\gamma_I B_1(I) = \gamma_S B_1(S)$$

una igualdad conocida como condición Hartmann-Hahn. En esas condiciones el cambio simultáneo de la orientación de un espín I y de un espín S en direcciones opuestas conserva la energía total (en los sistemas de ejes rotatorios), con lo que el proceso, mediado por el acoplamiento dipolar, es muy eficiente. Dadas las características expuestas la modificación de las polarizaciones de I y S debe seguir una cinética exponencial. En principio, el método no resulta aplicable a líquidos, ya que se necesitan grandes conjuntos de espines acoplados que formen los reservorios térmicos, lo que únicamente ocurre en sólidos con interacciones dipolares extensas, tanto intra- como intermoleculares.

Durante un estudio de la polarización cruzada mediante la condición Hartmann-Hahn en un monocristal de ferroceno, el grupo de Richard Ernst observó (4) oscilaciones transitorias intensas en la magnetización de  $^{13}\text{C}$  en función del tiempo de polarización, superpuestas a la cinética exponencial esperada. Interpretaron este comportamiento como debido a una transferencia coherente mediada por el acoplamiento dipolar del  $^{13}\text{C}$  con el protón enlazado directamente y desarrollaron un modelo teórico simple que estaba de acuerdo con las observaciones. Sugerían, finalmente, que el mismo

efecto debería observarse en monocristales en los que existiera un acoplamiento dipolar dominante. En este punto conviene destacar que Hartmann y Hahn habían mostrado (1) que en el caso de líquidos en los experimentos de polarización cruzada se puede producir una transferencia de polarización oscilatoria causada por el acoplamiento escalar entre los espines I y S. Posiblemente este hecho, junto con las observaciones efectuadas con el ferroceno, llevó al grupo de Ernst a proponer el uso de la polarización cruzada como uno de los métodos para conseguir una transferencia de magnetización neta en los experimentos 2D de correlación heteronuclear en líquidos, experimentos que se estaban desarrollando en esa época (5). Posteriormente, efectuarían un amplio estudio teórico de la transferencia de magnetización en líquidos mediante polarización cruzada en el caso heteronuclear (6).

Resultaba evidente que los efectos Hartmann-Hahn en líquidos podían ocurrir también entre espines del mismo tipo, por ejemplo, entre dos protones. De acuerdo con (1) basta para ello con eliminar los términos Zeeman del hamiltoniano. Lukas Braunschweiler y Richard Ernst sistematizaron el tratamiento de Hartmann y Hahn considerando el efecto general de un hamiltoniano formado exclusivamente por el acoplamiento escalar (7), un hamiltoniano isótropo puesto que trata por igual la magnetización en cualquier dirección espacial. En esas condiciones los espines no evolucionan individualmente, sino que lo hacen con modos colectivos. Esto conduce a una transferencia neta de coherencia de carácter oscilatorio a través del sistema de espines acoplados, dando lugar a transferencias de relevos de múltiples pasos,  $I_a \rightarrow I_b \rightarrow I_c \dots$ . Debido a esta característica propusieron para el experimento el nombre *TOTAL CORRELATION SPECTROSCOPY*, TOCSY. Para la obtención de un hamiltoniano que solo contenga el acoplamiento escalar propusieron varias posibilidades. A pesar de las ventajas que presenta el TOCSY sobre los experimentos COSY con relevos (8) el experimento tuvo inicialmente poca difusión.

En este punto conviene hacer algunas aclaraciones. Aunque se suele afirmar que es necesario eliminar los términos Zeeman del hamiltoniano, y es la afirmación que hemos hecho antes, realmente la condición necesaria es que la interacción de los dos espines acoplados con el campo magnético total,  $B_0$  más  $B_1$ , sea similar, para lo que no hace falta que desaparezcan por completo los efectos de *offset*. Es decir, no es necesario que la condición Hartmann-Hahn se cumpla estrictamente, sino que basta con que el producto  $\gamma B_{\text{eff}}$  sea aproximadamente igual para los dos espines acoplados. Más concretamente basta con que se cumpla la condición  $|\nu_{I,\text{eff}} - \nu_{S,\text{eff}}| \ll |J_{IS}|$ , con  $\nu_{I,\text{eff}} = (\nu_I^2 + \nu_{rf}^2)^{1/2}$  y  $\nu_{S,\text{eff}} = (\nu_S^2 + \nu_{rf}^2)^{1/2}$ .

Un par de años después de la propuesta de Ernst, Ad Bax redescubrió por azar el experimento TOCSY. En el espectro ROESY de un péptido cíclico Ad Bax y Donald Davis observaron que además de las señales de correlación de signo contrario a las señales diagonales, lo esperable para el espectro ROESY, aparecían señales de correlación del mismo signo que las diagonales (9). Bax acababa de terminar una estancia postdoctoral en la *Colorado State University* trabajando en RMN de estado sólido con Gary Maciel, lo que le ayudó a interpretar el origen de los picos espurios como originados por una polarización cruzada Hartmann-Hahn homonuclear. Tras publicar el correspondiente artículo sobre la presencia de picos espurios en el experimento ROESY, dando orientaciones de como minimizarlos (9), comenzó a investigar en profundidad el experimento de transferencia Hartmann-Hahn homonuclear. En un primer artículo (10) Bax y Davis mostraron la potencia de método utilizando una irradiación continua como método para conseguir la transferencia Hartmann-Hahn, bien con una fase constante bien alternando la fase entre +x y -x. En un artículo

posterior más amplio (11) introdujeran varias mejoras. En primer lugar, flanquearon el módulo de transferencia con pulsos de poda (*trim pulses*) con objeto de eliminar toda la magnetización excepto la alineada con el pulso. De este modo la transferencia de magnetización aparece modulada en intensidad en lugar de en fase, con lo que es posible obtener señales de absorción pura en el espectro bidimensional. Como módulo de transferencia utilizaron el superciclo MLEV-16, que cubre un intervalo de frecuencias mayor que la irradiación continua o que el uso de pulsos duros de  $180^\circ$ . Este superciclo, como consecuencia de imperfecciones experimentales, da lugar a un pequeño giro alrededor del eje z, con lo que la repetición de múltiples superciclos degradaba la calidad de la transferencia. Para eliminar este inconveniente añadieron un pulso duro de  $180^\circ$  al final del superciclo. Este pulso adicional invierte el error de fase, con lo que es compensado por el siguiente superciclo (posteriormente se ha visto que es posible obtener el mismo resultado si el pulso adicional es de  $60^\circ$  con la misma fase que los pulsos de poda). Bautizaron el nuevo superciclo como MLEV-17. El método de transferencia neta de magnetización empezó a conocerse tanto con el acrónimo HOHAHA (de *HO*monuclear *HA*rtmann *HA*hn) propuesto por Bax, como con el nombre que le había dado Ernst, TOCSY. Ambas denominaciones coincidieron durante una época, aunque acabó por imponerse la segunda.

Aunque MLEV-17 consigue transferencias eficaces, se buscaron otras posibilidades para generar un hamiltoniano isótropo. Puesto que se trata de conseguir que los espines acoplados evolucionen de modo casi idéntico a pesar de poseer *offsets* diferentes, resultaba apropiado considerar las secuencias de desacoplamiento heteronuclear. En efecto, estas secuencias compensan los efectos de *offset* extremadamente bien, por lo que consiguen un buen ajuste Hartmann-Hahn en un amplio intervalo de frecuencias. Entre las secuencias sugeridas destaca la secuencia DIPSI-2 (12), cuyas ventajas para el TOCSY fueron analizadas por Steven Rucke y Athan Shaka (13). En el artículo correspondiente, además, se hacía uso de una propuesta de Mark Rance (14) consistente en efectuar el proceso de mezcla en el eje z, de modo que se transfiera magnetización longitudinal entre los espines, lo que posee algunas ventajas. Para ello los pulsos de poda que flanquean la secuencia de mezcla isótropa en el plano se sustituyen por pulsos duros de  $90^\circ$ . El primero lleva la magnetización del plano perpendicular al eje z y, tras el proceso de mezcla, el segundo la devuelve al plano para la detección. La selección de la componente z durante la mezcla TOCSY se efectuaba inicialmente mediante un ciclado de fases análogo al del experimento NOESY, aunque actualmente lo habitual es seleccionarla mediante pulsos de gradiente de campo magnético.

Los intentos de aplicar la transferencia TOCSY entre carbonos se veían limitados por el ancho intervalo de banda y la baja relación giromagnética del  $^{13}\text{C}$  en comparación con el  $^1\text{H}$ . Debido a ello resulta necesario utilizar un campo de radiofrecuencia muy intenso. Para minimizar este inconveniente Shaka diseñó (15,16) las secuencias FLOPSY-8 y FLOPSY-16 (FLip-flop SpectroscopY), que para la misma potencia de  $B_1$  son eficientes en un intervalo de frecuencias mayor que DIPSI-2.

Al igual que el experimento ROESY se ve contaminado por picos TOCSY el experimento TOCSY se ve contaminado por picos debidos a la relajación cruzada, NOE y ROE. En el caso de moléculas pequeñas esta contaminación no es importante, puesto que los picos debidos a la relajación cruzada crecen más despacio que los picos TOCSY, por lo que a los tiempos de mezcla habituales (60-100 ms) su contribución es pequeña. La situación en el caso de macromoléculas es bien distinta: los picos ROESY crecen relativamente rápido. Aunque los picos ROESY tienen signo contrario a los TOCSY, con lo que resultaría fácil distinguirlos, hay que considerar la posibilidad de interferencia destructiva.

Además, aunque no es nada habitual, los picos TOCSY también pueden ser negativos en algunos casos (17). Ernst y colaboradores diseñaron un método para eliminar los picos debidos a la relajación cruzada en el caso de macromoléculas (18). Durante el tiempo de mezcla isótropa la velocidad de relajación cruzada efectiva es una media pesada de las correspondientes al plano (efecto ROE) y al eje z (efecto NOE), pesadas por los tiempos en los que la magnetización se encuentra en dichos estados. En el caso de macromoléculas ambas velocidades son de signo contrario ( $\sigma_{ROE} = -2\sigma_{NOE}$ ), por lo que la velocidad de relajación cruzada efectiva puede hacerse nula si los tiempos de residencia en ambos estados son adecuados. El grupo de Ernst mostró que, cuando se selecciona magnetización transversal, esto puede conseguirse insertando tiempos de evolución libre que flanquean a los pulsos de  $180^\circ$  del pulso compuesto MLEV en la secuencia MLEV-17. Casi simultáneamente Daniel Bearden, Slobodan Macura y L.R. Brown llegaron a la misma conclusión (19), aunque la secuencia que propusieron seleccionaba magnetización longitudinal y, en lugar de incluir periodos de evolución en la secuencia MLEV base, incluía ecos de espín tras una repetición de varios superciclos MLEV-17. Posteriormente Ernst adoptó una solución intermedia: cada pulso compuesto R de una secuencia de mezcla es flanqueado por dos periodos de evolución libre consistentes cada uno de ellos en dos ecos de espín (20). Tras estudiar el rendimiento de varias secuencias de mezcla isótropa (MLEV, WALTZ, DIPSI, FLOPSY) con esta modificación, propuso una nueva secuencia R ( $48^\circ_{-x}, 276^\circ_x, 48^\circ_{-x}$ ) que se comportaba mejor que las anteriores para la transferencia TOCSY. La nueva secuencia de mezcla, que solo es válida para transferencia de magnetización longitudinal, recibió el nombre de 'clean CITY' (*clean Computer-Improved Total-correlation spectroscopy*). Al año siguiente James Cavanagh y Mark Rance propusieron una versión "limpia" del DIPSI-2 (21). La secuencia propuesta es válida para transferencia de magnetización z y utiliza la estrategia inicial de Ernst, incluir tiempos de espera entre pulsos cuando la magnetización es longitudinal. Puesto que con los pulsos de la secuencia DIPSI-2 esto solo ocurre al final del pulso compuesto utilizaron una estrategia inteligente: dividir los pulsos de la secuencia DIPSI en dos partes, la primera de las cuales lleva la magnetización al eje z y la segunda completa el giro correspondiente al DIPSI-2. De este modo resulta posible insertar entre ambas partes tiempos de espera durante los que la magnetización es longitudinal. El pulso compuesto de la secuencia DIPSI-2

320-410-290-285-30-245-375-265-370

pasa a ser

(180- $\Delta$ -140)-(320- $\Delta$ -90)-(270- $\Delta$ -20)-(200- $\Delta$ -85)-(30)-(125- $\Delta$ -120)-(300- $\Delta$ -75)-(255- $\Delta$ -10)-(190- $\Delta$ -180)- $\Delta$

donde los números corresponden a grados sexagesimales de giro del pulso, los elementos subrayados se aplican con una fase de  $180^\circ$  respecto a los otros y  $\Delta$  es un tiempo de espera de duración equivalente a la de un pulso de  $144^\circ$ . La expansión de este elemento en el superciclo RRRR recibe el nombre de DIPSI-2rc (*DIPSI-2 relaxation compensated*). Al igual que en el caso de clean CITY la secuencia DIPSI-2rc solo es válida para transferencia de magnetización longitudinal,  $I_z \rightarrow S_z$ .

La transferencia de coherencia isótropa en el caso de dos espines, suponiendo un ajuste Hartmann-Hahn perfecto, es de la forma

$$I_\alpha \rightarrow 1/2 [1+\cos(2\pi J_{IS}\tau)] I_\alpha + 1/2 [1-\cos 2\pi J_{IS}\tau] S_\alpha + 1/2 \sin(2\pi J_{IS}\tau) (2I_\beta S_\gamma - 2I_\gamma S_\beta)$$

$$2I_\beta S_\gamma \rightarrow 1/2 [1+\cos(2\pi J_{IS}\tau)] 2I_\beta S_\gamma + 1/2 [1-\cos 2\pi J_{IS}\tau] 2I_\gamma S_\beta + 1/2 \sin(2\pi J_{IS}\tau) (S_\alpha - I_\alpha)$$

donde  $\alpha, \beta, \gamma$  es una permutación cíclica de  $x, y, z$ . Por lo tanto, el TOCSY, además de transferir magnetización en fase a magnetización en fase, da lugar a términos adicionales en oposición de fase. En el caso  $\alpha = z$  estos términos adicionales,  $(2I_xS_y - 2I_yS_x)$ , corresponden a una coherencia de cuanto nulo. En los dos casos restantes,  $\alpha = x$  o  $\alpha = y$ , se trata de su equivalente en una dirección del plano. Estos términos dan lugar a dobletes dispersivos en oposición de fase en el espectro. En muchas aplicaciones especialmente en el caso de macromoléculas, su contribución es poco importante, puesto que las colas de las dos señales dispersivas tienden a cancelarse y su contribución en el centro es similar a una señal de absorción. Sin embargo, este hecho reduce la resolución y modifica los máximos de las señales, impidiendo, por ejemplo, la medida precisa de constantes de acoplamiento. Para minimizar este efecto indeseado Braunschweiler y Ernst propusieron (7) sumar varios espectros con tiempos de mezcla TOCSY distintos. Otra solución a este tipo de problemas consiste en incorporar un filtro-z (22) a la secuencia. La coherencia de cuanto nulo evoluciona durante el tiempo del filtro, por lo que la suma de varios transitorios obtenidos con diferentes duraciones del filtro-z logra una cierta cancelación. La magnetización longitudinal prácticamente no varía durante el tiempo del filtro, puesto que éste suele ser mucho menor que  $T_1$ , y se suma coherentemente. Este procedimiento fue puesto de relieve por Subramanian y Bax (23) en el caso de la versión monodimensional del TOCSY. Conviene resaltar aquí que el problema que plantean las coherencias de cuanto nulo se da en otros experimentos, como es el caso del NOESY que también se ve contaminado con señales debidas coherencias de dicho tipo.

Intentando suprimir las coherencias de cuanto nulo de un modo más eficiente, James Keeler mostró que la aplicación de un pulso de anclaje en presencia de un campo magnético  $B_0$  o  $B_1$  inhomogéneo desfasa las coherencias de cuanto nulo en un único transitorio (24). El procedimiento es fácil de entender en el caso de inhomogeneidad de  $B_0$ , que es el caso más eficiente. Durante el pulso de anclaje, de intensidad  $\omega_1$ , en presencia de un gradiente de campo magnético la velocidad angular de evolución de la coherencia de cuanto nulo es

$$\omega_{zQ} = ([\omega_k + g(z)]^2 + \omega_1^2)^{1/2} - ([\omega_l + g(z)]^2 + \omega_1^2)^{1/2}$$

donde  $g(z)$  es la velocidad angular adicional debida al gradiente de campo, dependiente de la coordenada  $z$ . Para  $g(z)$  nulo y  $\omega_1 \gg \omega_k$ ,  $\omega_l$  la velocidad angular es nula. Para  $g(z) \gg \omega_1$  la velocidad angular es  $\omega_k - \omega_l$ . Entre estos extremos la velocidad angular alcanza un valor intermedio. Por tanto, la fase que adquiere la coherencia de cuanto nulo es dependiente de la coordenada  $z$ , y la suma de todas las coordenadas disminuye o anula la señal debida a ella. El método, sin embargo, presenta algunos inconvenientes para su aplicación en el experimento TOCSY. En el espectro TOCSY es necesario eliminar la coherencia de cuanto nulo presente antes de la mezcla (para anular la transferencia antifase  $\rightarrow$  en fase) y la existente tras la mezcla (para anular la transferencia en fase  $\rightarrow$  antifase), lo que requiere usar dos pulsos de purga. Esto alarga la duración del experimento. Aunque en teoría basta con que la duración de los pulsos de purga sea menor, en el artículo utilizaban 60 ms para cada uno de los pulsos de purga. Durante este tiempo se producen dos efectos indeseables. Por un lado, una disminución de la magnetización debido a la relajación. Por otro, durante los periodos de anclaje se producen fenómenos de relajación cruzada.

Tiempo después Michael Thrippleton y James Keeler propusieron un procedimiento más eficiente, aunque más complejo experimentalmente, en el que se logra la cancelación en un único transitorio utilizando como pulso de purga un pulso de inversión adiabático en presencia de un gradiente de campo (25). El pulso de inversión en presencia del gradiente invierte los espines

equivalentes situados en posiciones diferentes de la muestra a tiempos distintos. El resultado es que, en diferentes partes de la muestra, la coherencia de cuanto nulo evolucione durante tiempos distintos (el tiempo posterior al de la inversión menos el tiempo anterior) y, por tanto, adquiera una fase diferente. La suma de todas las regiones de la muestra atenúa la intensidad de la coherencia de cuanto nulo. La magnetización longitudinal, sin embargo, al no evolucionar en los tiempos anterior y posterior a la inversión se suma coherentemente.

Aunque las secuencias TOCSY se utilizan habitualmente para una transferencia homonuclear, el primer experimento de polarización cruzada en líquidos fue un experimento heteronuclear (1) con el que Hartmann y Hahn demostraron la transferencia debida al acoplamiento escalar y determinaron el acoplamiento  $^1J_{HP}$  en ácido fosforoso ( $HPO(OH)_2$ ) observando la magnetización del protón en un experimento de polarización cruzada  $^{31}P \rightarrow ^1H$ . Años después Bertrand y Chingas utilizaron la transferencia TOCSY  $^1H \rightarrow X$  para incrementar la intensidad del espectro del heteronúcleo, tanto en el caso de  $^{13}C$  (26) como de  $^{15}N$  (27). Posteriormente, Daniel Bearden y Larry Brown pusieron de manifiesto la posibilidad de usar la polarización cruzada heteronuclear (hetero-TOCSY o HEHAHA) con objeto de establecer correlaciones heteronucleares (28) como alternativa al experimento bidimensional HETCOR. Puesto que trabajaban con un espectrómetro de 500 MHz, la utilización de una irradiación continua, tal y como habían hecho Bertrand y Chingas, no resultaba aceptable, pues requeriría demasiada potencia de irradiación. En vista de ello, probaron con las secuencias MLEV-16, MLEV-17 y WALTZ, que se utilizaban en el TOCSY homonuclear, obteniendo buenos resultados con esta última. Más adelante, Andrew Gibbs y Gareth Morris mostraron (29) que era posible realizar el experimento HEHAHA  $^{13}C, ^1H$  en modo inverso, con detección de protón, con el consiguiente incremento en la sensibilidad. Proponían, además, utilizar tiempos de mezcla relativamente largos con objeto de observar las correlaciones  $^{13}C-^1H$  a varios enlaces. El experimento propuesto era una alternativa al experimento HMBC.

Aunque la polarización cruzada heteronuclear se utiliza de un modo similar a la homonuclear, presenta características diferentes. La fundamental es que, en general, el hamiltoniano promedio resultante de la secuencia de polarización cruzada no es isótropo. Para la irradiación continua, la secuencia WALTZ o la secuencia DIPSI-2 el hamiltoniano (suponiendo que la radiofrecuencia se aplica en el eje x) resulta (30)

$$H = J(I_z S_z + I_y S_y)/2$$

Este hamiltoniano tan solo transfiere entre espines la componente x de la magnetización (y la antifase en la dirección perpendicular). Además, la constante de acoplamiento efectiva (responsable de la velocidad de transferencia) es la mitad de la real.

$$I_x \rightarrow 1/2 [1 + \cos(\pi J_{IS}\tau)] I_x + 1/2 [1 - \cos(\pi J_{IS}\tau)] S_x + 1/2 \sin(\pi J_{IS}\tau) (2I_y S_z - 2I_z S_y)$$

$$2I_y S_z \rightarrow 1/2 [1 + \cos(\pi J_{IS}\tau)] 2I_y S_z + 1/2 [1 - \cos(\pi J_{IS}\tau)] 2I_z S_y + 1/2 \sin(\pi J_{IS}\tau) (S_x - I_x)$$

Con objeto de que la transferencia tuviera lugar para cualquier magnetización del plano xy, Christian Griesinger propuso flanquear la secuencia de polarización cruzada, HCP, con dos pulsos de  $90^\circ$  aplicados tanto al espín I como al S,  $90^\circ_y(I,S)$ -HCP $_x(I,S)$ - $90^\circ_y(I,S)$ . De este modo se transfiere magnetización antifase de un espín a magnetización en fase del otro, tanto desde el eje x como desde el eje y. Demostró su utilidad con un experimento HSQC en el que la transferencia  $^{13}C \rightarrow ^1H$  se efectuaba con la secuencia hetero-TOCSY modificada (31). Una década después Teo Parella mostró

que se podía dar una gran versatilidad a la secuencia de Griesinger jugando con las fases de los pulsos duros (32). Posteriormente aumentó la versatilidad de la secuencia haciendo lo mismo con las fases relativas de las secuencias de mezcla aplicadas a ambos espines y propuso diversos experimentos, en general encaminados a la medida de constantes de acoplamiento. Una compilación de sus resultados aparece en (33). Finalmente, conviene comentar que la transferencia TOCSY heteronuclear se puede producir entre cualquier par de núcleos. Un ejemplo reciente es (34) en donde se describen transferencias  $^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$ .

A pesar de que el TOCSY heteronuclear constituye una alternativa válida a las transferencias tipo INEPT o similares, su uso ha sido limitado. Este hecho se debe a que la polarización cruzada heteronuclear presenta varios inconvenientes. Por un lado, el ajuste Hartmann-Hahn es más difícil de conseguir que en el caso homonuclear, fundamentalmente porque la inhomogeneidad espacial de las dos radiofrecuencias es diferente, dado que se generan en bobinas distintas. Por otro, los heteronúcleos presentan generalmente grandes anchuras espectrales y valores pequeños de la relación giromagnética, lo que implica que es necesario aplicar grandes potencias de radiofrecuencia. Esto produce un calentamiento de la muestra y puede dañar la sonda. Por último, simultáneamente a la transferencia heteronuclear se produce una transferencia TOCSY homonuclear, lo que, en general, genera efectos no deseados.

## Referencias

1. S.R. Hartmann, E.L. Hahn, *Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame*, Phys. Rev., 128, 2042-2053, 1962.
2. A. Pines, M.G. Gibby, J.S. Waugh, *Proton-Enhanced NMR of Dilute Spins in Solids*, J. Chem. Phys., 59, 569-590, 1973.
3. J. Schaefer, E.O. Stejskal, *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Polymers Spinning at the Magic Angle*, J. Am. Chem. Soc., 98, 1031-1032, 1976.
4. L. Müller, A. Kumar, T. Baumann, R.R. Ernst, *Transient Oscillations in NMR Cross-Polarization Experiments in Solids*, Phys. Rev. Lett., 32, 1402-1406, 1974.
5. A.A. Maudsley, L. Müller, R.R. Ernst, *Cross-Correlation of Spin-Decoupled NMR Spectra by Heteronuclear Two-Dimensional Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 28, 463-469, 1977.
6. L. Müller, R.R. Ernst, *Coherence Transfer in the Rotating Frame*, Mol. Phys., 38, 963-992, 1979.
7. L. Braunschweiler, R.R. Ernst, *Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 53, 521-528, 1983.
8. G. Eich, G. Bodenhausen, R.R. Ernst, *Exploring Nuclear Spin Systems by Relayed Magnetization Transfer*, J. Am. Chem. Soc. 104, 3731-3732, 1982.
9. A. Bax, D.G. Davis, *Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 63, 207-212, 1985.
10. D.G. Davis, A. Bax, *Assignment of Complex  $^1\text{H}$  NMR Spectra via Two-Dimensional Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc., 107, 2820-2821, 1985.
11. A. Bax, D.G. Davis, *MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 65, 355-360, 1985.
12. A.J. Shaka, C.J. Lee, A. Pines, A. *Iterative Schemes for Bilinear Operators; Application to Spin Decoupling*, J. Magn. Reson., 77, 274-293, 1988.
13. S.P. Rucker, A.J. Shaka, *Broadband Homonuclear Cross Polarization in 2D N.M.R. using DIPSI-2*, Mol. Phys., 68, 509-517, 1989.

14. M. Rance, *Improved Techniques for Homonuclear Rotating-Frame and Isotropic Mixing Experiments*, *J. Magn. Reson.*, 74, 557-564, 1987.
15. M. Kadkhodaie, O. Rivas, M. Tan, A. Mohebbi, A.J. Shaka, *Broadband Homonuclear Cross Polarization using Flip-Flop Spectroscopy*, *J. Magn. Reson.*, 91, 437-443, 1991.
16. A. Mohebbi, A.J. Shaka, *Improvements in Carbon-13 Broadband Homonuclear Cross-Polarization for 2D and 3D NMR*, *Chem. Phys. Lett.*, 178, 374-378, 1991.
17. M. Rance, *Sign Reversal of Resonances via Isotropic Mixing in NMR Spectroscopy*, *Chem. Phys. Lett.*, 154, 242-247, 1989.
18. C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R.R. Ernst, *Clean TOCSY for <sup>1</sup>H Spin System Identification in Macromolecules*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 7870-7872, 1988.
19. D.W. Bearden, S. Macura, L.R. Brown, *Suppression of Cross Relaxation in TOCSY Experiments on Macromolecules*, *J. Magn. Reson.*, 80, 534-538, 1988.
20. J. Briand, R.R. Ernst, *Computer-Optimized Homonuclear TOCSY Experiments with Suppression of Cross Relaxation*, *Chem. Phys. Lett.*, 185, 276-285, 1991.
21. J. Cavanagh, M. Rance, *Suppression of Cross-Relaxation Effects in TOCSY Spectra via a Modified DIPSI-2 Mixing Sequence*, *J. Magn. Reson.* 96, 670-678, 1992.
22. O.W. Sørensen, M. Rance, R.R. Ernst, *z Filters for Purging Phase- or Multiplet-Distorted Spectra*, *J. Magn. Reson.*, 56, 527-534, 1984.
23. S. Subramanian, A. Bax, *Generation of Pure Phase NMR Subspectra for Measurement of Homonuclear Coupling Constants*, *J. Magn. Reson.*, 71, 325-330, 1987.
24. A.L. Davis, G. Estcourt, J. Keeler, E.D. Laue, J.J. Titman, *Improvement of z-Filters and Purging Pulses by the Use of Zero-Quantum Dephasing in Inhomogeneous B<sub>1</sub> or B<sub>0</sub> Fields*, *J. Magn. Reson. Ser. A*, 105, 67-183, 1993.
25. M.J. Thrippleton, J. Keeler, *Elimination of Zero-Quantum Interference in Two-Dimensional NMR Spectra*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 3938-3941, 2003.
26. R.D. Bertrand, W.B. Moniz, A.N. Garroway, G.C. Chingas, *<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H Cross Polarization in Liquids*, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 5227-5229, 1978.
27. R.D. Bertrand, W.B. Moniz, A.N. Garroway, G.C. Chingas, *Sensitivity Enhancement in <sup>15</sup>N NMR Spectroscopy of Liquids Using the J Cross-Polarization Technique*, *J. Magn. Reson.*, 32, 465-467, 1978.
28. D.W. Bearden, L.R. Brown, *Heteronuclear Isotropic Mixing in Liquids*, *Chem. Phys. Lett.*, 163, 432-436, 1989.
29. A. Gibbs, G.A. Morris, *High-Resolution Proton-Detected 2D HEHAHA Correlation Experiments with Spin-Echo Discrimination of Long-Range Correlations*, *Magn. Reson. Chem.*, 30, 662-665, 1992.
30. M. Ernst, C. Griesinger, R.R. Ernst, W. Bermel, *Optimized Heteronuclear Cross Polarization in Liquids*, *Mol. Phys.* 74, 219-252, 1991.
31. J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sørensen, C. Griesinger, *A General Enhancement Scheme in Heteronuclear Multidimensional NMR Employing Pulsed Field Gradients*, *J. Biomol. NMR*, 4, 301-306, 1994.
32. T. Parella, *A Complete Set of Novel 2D Correlation NMR Experiments Based on Heteronuclear J Cross-Polarization*, *J. Biomol. NMR*, 29, 37-55, 2004.
33. P. Nolis, T. Parella, *Solution-State NMR Experiments Based on Heteronuclear Cross-Polarization*, *Curr. Anal. Chem.*, 3, 47-68, 2007.
34. A. Kumar, C. Wiedemann, P. Bellstedt, R. Ramachandran, O. Ohlenschläger, *NMR of intrinsically disordered proteins: A Note on the Application of <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C<sup>α</sup> Het-TOCSY Mixing for <sup>13</sup>C<sup>α</sup> Magnetisation Transfers*, *J. Magn. Reson.*, 337, 107166, 2022.