

CAPÍTULO 1 – PREPARO DE AMOSTRAS DE RMN EM FASE LÍQUIDA

Andersson Barison

O preparo de amostras em solução é a etapa que conecta a realidade química do sistema ao que o espectrômetro de RMN efetivamente detecta; uma amostra bem preparada permite explorar todo o potencial de resolução, sensibilidade e informação estrutural da técnica, enquanto pequenos descuidos podem gerar artefatos, perda de sinal e interpretações equivocadas. Escolha adequada de solvente, concentração, tubo, sonda e procedimentos de limpeza e homogeneização não são detalhes secundários, mas parte essencial do experimento, especialmente quando se busca dados quantitativos ou comparáveis entre diferentes laboratórios e equipamentos.

Escolha do solvente

Na RMN de soluções, é usual dissolver a amostra em solventes deuterados, como CDCl_3 , D_2O , $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD , CD_3CN ou acetona- d_6 , que fornecem um sinal de deutério para o *lock* do espectrômetro e reduzem a contribuição de hidrogênios do solvente no espectro de ^1H . A adição de pequenas quantidades de tetrametilsilano (TMS) ou de padrões equivalentes (como TMSP ou DSS) oferece um sinal de referência bem definido em $\delta = 0$ ppm, facilitando a calibração de deslocamentos químicos e a comparação entre diferentes medidas e equipamentos.

Em algumas situações, o uso de solvente totalmente deuterado é impraticável ou indesejável, seja por custo, solubilidade ou por se tratar de uma matriz complexa. Nesses casos, é possível trabalhar com solventes não deuterados contendo apenas uma fração de solvente deuterado ou um tubo capilar com solvente deuterado para fornecer o sinal de lock. Se a presença de sinais intensos de solvente no espectro de ^1H for um problema, é possível usar sequências de pulso de supressão do sinal do solvente de acordo com o objetivo da análise. Há ainda a possibilidade de realizar a análise sem o lock.

Qualidade e escolha do tubo de RMN

A escolha de tubos de RMN de boa qualidade é fundamental para obter espectros reprodutíveis e com boa resolução, especialmente em espectrômetros de alto campo. Tubos padrão de 5 mm são os mais utilizados em sondas de líquidos, pois oferecem compromisso adequado entre volume de amostra (tipicamente 0,5–0,7 mL), sensibilidade e facilidade de manuseio, desde que tenham uniformidade, espessura de parede e acabamento compatíveis com as especificações do equipamento.

Além dos tubos de 5 mm convencionais, existem tubos de baixo volume, como Shigemi e tubos de 3 mm, que permitem trabalhar com volumes menores

mantendo a região sensível centrada na bobina da sonda. Também há tubos descartáveis de menor custo, adequados para aplicações de rotina em equipamentos de menor campo ou quando a máxima resolução não é crítica, e tubos especiais para medições quantitativas ou sob condições específicas (por exemplo, tubos valvulados para amostras sensíveis à atmosfera ou pressão).

Cuidados na limpeza de tubos

A reutilização de tubos de RMN exige procedimentos de limpeza rigorosos, pois resíduos orgânicos, sais ou filmes secos podem degradar significativamente a linha de base, a forma dos picos e a homogeneidade de campo. Protocolos típicos envolvem esvaziar e enxaguar os tubos logo após o uso, lavá-los com solventes apropriados (e, se necessário, soluções ácidas seguidas de neutralização), e secá-los completamente em estufa ou com fluxo de gás, evitando riscos e deformações; sistemas específicos de lavagem para tubos de 5 mm ajudam a reduzir consumo de solvente e contaminação cruzada.

Tipos de sonda de líquidos

Sondas de RMN de líquidos são projetadas para diâmetros específicos de tubo (em geral 3, 5 ou 10 mm), e o uso adequado do diâmetro recomendado é essencial para otimizar sensibilidade, homogeneidade e estabilidade mecânica. Sondas de 5 mm são o padrão mais comum em muitos laboratórios, oferecendo boa combinação entre volume de amostra e desempenho, enquanto sondas de 3 mm priorizam economia de amostra e sondas de 10 mm atendem situações em que grandes volumes são necessários ou em configurações especiais.

Homogeneidade das soluções

Independentemente do solvente e do tubo escolhidos, a amostra deve ser uma solução homogênea, sem bolhas, partículas em suspensão visíveis ou gradientes de concentração ao longo do tubo, pois qualquer heterogeneidade compromete a homogeneidade de campo e a qualidade do shimming. Boas práticas incluem dissolver completamente o sólido antes de transferir para o tubo, evitar que a solução evapore até quase a secar, misturar suavemente (por inversão ou agitação moderada) e garantir que a altura da coluna de líquido seja adequada à região sensível da sonda.

Papel do usuário no preparo de amostras

Por fim, a qualidade dos espectros de RMN depende tanto do instrumento quanto do cuidado do usuário no preparo das amostras: pesagens exatas, uso correto de pipetas automáticas, escolha adequada de solvente e concentração e manuseio cuidadoso de tubos e sondas. Pequenas negligências — como resíduos em tubos, volumes muito baixos ou muito altos, etiquetas mal colocadas, ou preparo apressado sem homogeneização — podem degradar significativamente a resolução, a reprodutibilidade e a utilidade quantitativa dos dados, reforçando que o preparo de amostras é etapa crítica do experimento, e não apenas um detalhe prévio.

CAPÍTULO 2 – PROCESSAMENTO BÁSICO DE ESPECTROS DE RMN

Maria Gabriela Barros

Este capítulo apresenta os fundamentos do processamento de espectros de RMN, com ênfase no uso do software TopSpin e em etapas essenciais como transformada de Fourier, apodização, zero filling, correção de fase, ajuste de linha de base, calibração e marcação de sinais. A ideia é mostrar, de forma integrada, como transformar o FID bruto em um espectro bem resolvido e interpretável, tanto em 1D quanto em experimentos 2D básicos.

Domínio do tempo e da frequência

Os dados de RMN são originalmente coletados no domínio do tempo, sob a forma de um FID que contém a soma de todas as contribuições de frequência dos núcleos excitados. Por meio da transformada de Fourier, esse sinal temporal é convertido no domínio da frequência, revelando picos em posições associadas aos deslocamentos químicos e permitindo a análise espectral convencional na escala de ppm, independente do campo magnético do equipamento.

Softwares de processamento

O TopSpin é um dos softwares mais utilizados para processamento de espectros de RMN, oferecendo ferramentas integradas para importação de dados, pré-processamento, transformada de Fourier, correção de fase, base e calibração. Além dele, outros programas como Mnova, SpinStudio e pacotes especializados para biomoléculas também podem ser empregados, mas o fluxo conceitual de processamento permanece similar entre as diferentes plataformas.

FID e pré-processamento

O FID é o ponto de partida de qualquer processamento e pode ser tratado com funções de janela (apodização) e com zero filling antes da transformada de Fourier. A apodização aplica funções como exponencial ou gaussiana para melhorar a relação sinal-ruído às custas de alguma perda de resolução, enquanto o zero filling adiciona pontos nulos ao final do FID para suavizar o espectro e melhorar a definição visual dos picos sem alterar o conteúdo físico do sinal.

Transformada de Fourier

A transformada de Fourier converte o FID em um espectro no domínio da frequência, sendo um passo central no processamento de RMN. No TopSpin, esse passo é realizado com comandos específicos para 1D e 2D, mas em todos os casos pressupõe que o FID foi corretamente adquirido e, quando necessário, submetido a funções de janela e zero filling adequados ao tipo de experimento e à qualidade do sinal.

Correção de fase e linha de base

Após a transformada de Fourier, o espectro frequentemente apresenta distorções de fase que precisam ser corrigidas para que os picos assumam o formato absorptivo adequado, o que pode ser feito de forma automática ou manual. Em seguida, o ajuste da linha de base remove inclinações e ondulações residuais que podem prejudicar integrais e medições finas, garantindo que o contorno do espectro entre os picos seja o mais plano possível.

Calibração do espectro

A calibração do espectro consiste em definir corretamente a referência de deslocamento químico, geralmente a partir de um pico de padrão interno como TMS, TMSP ou DSS, ou de sinais bem conhecidos do solvente. Uma calibração cuidadosa assegura que todos os deslocamentos químicos medidos sejam comparáveis entre diferentes amostras e equipamentos, e é um requisito para interpretação confiável e para o uso de tabelas de referência.

Medidas de δ , J e integrais

Uma vez obtido um espectro bem processado, é possível extrair dele três tipos principais de informação: o deslocamento químico δ , que reflete o ambiente eletrônico; as constantes de acoplamento J e multiplicidades, que informam sobre vizinhanças e conectividades; e as integrais, que fornecem o número relativo de núcleos em cada sinal. A forma dos picos, por sua vez, traz indícios sobre dinâmica molecular e qualidade do processamento, completando o conjunto de informações que a RMN oferece.

Processamento básico de 2D

Em experimentos 2D, o processamento segue os mesmos princípios gerais, mas agora em duas dimensões de tempo e frequência, exigindo transformadas de Fourier em ambas as direções e seleção adequada de funções de janela. A escolha de apodização e dos parâmetros de correção de fase em f1 e f2 depende do tipo de experimento (modo magnitude ou phase-sensitive), e comandos específicos permitem aplicar as transformadas, ajustar fases e calibrar eixos de forma consistente.

Resumo de comandos usuais

No dia a dia com o TopSpin, o processamento básico envolve um conjunto recorrente de ações: aplicar funções de janela e zero filling, executar a

transformada de Fourier, ajustar fase e linha de base, calibrar o espectro e marcar picos e integrais. Embora existam muitos comandos e opções detalhadas, a compreensão conceitual dessas etapas principais permite estruturar um fluxo de trabalho estável, que depois pode ser refinado com parâmetros e rotinas mais avançadas conforme a necessidade.

CAPÍTULO 3 – RMN QUANTITATIVA (qNMR)

Kahlil Shwanka Salome

RMN quantitativa (qNMR) explora o fato de que a área integrada dos sinais de RMN é proporcional ao número de núcleos observados e à concentração das espécies em solução, permitindo determinar quantidades absolutas ou relativas sem necessidade de curvas de calibração complexas. Isso torna possível realizar, em uma única medida, análise qualitativa e quantitativa de vários analitos simultaneamente, preservando a amostra e com alto grau de reprodutibilidade.

Conceitos básicos e integração de sinais

No contexto de qNMR, o aspecto central do espectro é a integral: a área sob cada sinal reflete diretamente o número de núcleos que contribuem para aquele pico e sua concentração. Para que essa proporcionalidade seja válida, é necessário garantir que todos os spins tenham retornado ao equilíbrio entre pulsos, de modo que a magnetização inicial seja totalmente reconstituída antes de cada aquisição; assim, diferenças de intensidade passam a refletir apenas diferenças reais de quantidade de matéria.

Condições para espectro quantitativo

Um espectro quantitativo depende do cumprimento de condições experimentais que assegurem resposta linear do sistema, como tempos de relaxação adequados, ausência de saturação de sinal e escolha apropriada de parâmetros de aquisição. Isso significa, em particular, usar um tempo de espera entre pulsos compatível com os tempos de relaxação longitudinal (T_1) dos núcleos de interesse, além de evitar distorções de linha de base, sobrecarga do receptor e artefatos de processamento que possam deformar integrais.

Papel do usuário e preparo de amostra

O preparo cuidadoso da amostra é responsabilidade direta do usuário e tem impacto decisivo na confiabilidade quantitativa, incluindo pesagem correta, calibração de pipetas e balanças, escolha de solvente adequado, boa dissolução, eventual filtração e uso de tubos apropriados ao campo e à sonda. A escolha do tipo de tubo (por exemplo, 5 mm convencional, tubos de baixo volume ou especiais como Shigemi) e o controle de fatores como volume, homogeneidade e presença de bolhas também influenciam sensibilidade e homogeneidade de campo, refletindo-se na qualidade das integrais.

Ajuste do equipamento

Para que o espectrômetro produza dados quantitativos confiáveis, ajustes como lock, shimming, tune e match devem ser realizados de forma criteriosa, assegurando campo homogêneo e máxima eficiência de pulsos de RF. Além disso, parâmetros como tempo de relaxação entre pulsos (D1), número de acumulações (NS), ganho do receptor (RG), largura de banda espectral (SW), tempo de aquisição e temperatura precisam ser escolhidos de modo a evitar saturação, manter boa relação sinal-ruído e minimizar efeitos de difusão e evaporação.

Padrão interno, padrão externo e ERETIC

A quantificação por qNMR pode ser feita usando padrões internos, adicionados diretamente à amostra, ou padrões externos, mantidos em inserções separadas, cada abordagem com vantagens e limitações quanto a sobreposição de sinais e interações intermoleculares. Alternativamente, métodos eletrônicos como ERETIC, baseados em referências geradas eletronicamente e em protocolos como PULCON, permitem correlacionar integrais de espectros diferentes sem adição de substâncias externas, reduzindo problemas de sobreposição e simplificando o preparo de amostras de rotina.

Exemplo de fluxo prático

Em uma aplicação típica, prepara-se primeiro uma solução de referência com concentração e pureza bem conhecidas, registra-se um espectro sob condições cuidadosamente controladas e define-se essa medida como padrão para a calibração do método. Em seguida, amostras contendo os analitos de interesse são medidas com os mesmos parâmetros experimentais, e a análise das integrais — combinada com as informações do padrão e, quando aplicável, com rotinas como ERETIC — permite estimar as concentrações dos componentes com boa precisão, desde que todas as etapas de preparo, ajuste instrumental e processamento tenham sido seguidas de forma consistente.

CAPÍTULO 4 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO SOB A PERSPECTIVA DOS ORBITAIS MOLECULARES.

Cláudio Tormena

Este capítulo discute como a estrutura eletrônica das moléculas, descrita em termos de orbitais moleculares e orbitais naturais, controla os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento observadas em RMN. A ideia central é sair de uma visão puramente empírica (tabelas de valores) e passar a enxergar esses parâmetros como consequência direta da distribuição de densidade eletrônica e de sua reorganização em diferentes ambientes químicos.

O que é Deslocamento Químico?

Em RMN, cada núcleo “sente” um campo magnético efetivo que é parcialmente reduzido pela presença de elétrons ao seu redor, fenômeno conhecido como blindagem. Diferenças na blindagem entre ambientes químicos levam a frequências de precessão distintas, que são expressas como deslocamentos químicos em ppm em relação a um padrão, permitindo distinguir e atribuir os diferentes sítios da molécula. Em termos qualitativos, quanto menor a blindagem (ambiente mais desblindado), mais o sinal aparece deslocado para campo baixo no espectro.

Entendendo a Blindagem

A blindagem resulta da resposta eletrônica da molécula ao campo magnético externo, combinando contribuições de elétrons mais internos e de elétrons de valência. Alterações sutis na estrutura — como troca de um substituinte ou mudança conformacional — podem modificar essa resposta e deslocar significativamente os sinais de RMN, mesmo que a conectividade formal da molécula permaneça a mesma. Assim, pequenas mudanças de densidade eletrônica se traduzem em diferenças observáveis de deslocamento químico.

Constantes de Acoplamento (nJ)

As constantes de acoplamento descrevem como o spin de um núcleo influencia o de outro através do esqueleto eletrônico da molécula. Em acoplamentos de uma, duas ou três ligações, os valores de J refletem não apenas o tipo de ligação, mas também a geometria local, especialmente ângulos diedrais em acoplamentos vicinais, tornando-se uma ferramenta sensível para investigar conformações. Dessa forma, δ e J se complementam: enquanto o deslocamento informa sobre o ambiente eletrônico médio, J traz detalhes da conectividade e da geometria.

Por Que Usar Computação Química?

Ferramentas de química computacional permitem estimar deslocamentos químicos e constantes de acoplamento a partir de modelos estruturais, oferecendo uma ponte entre estrutura proposta e espectros experimentais. Mesmo sem entrar em detalhes de métodos e rotinas, o ponto importante é que esses cálculos ajudam a testar hipóteses estruturais, distinguir entre isômeros e racionalizar tendências observadas em séries de compostos relacionados. Assim, o uso combinado de experimento e cálculo aumenta a confiabilidade na atribuição de estruturas.

Orbitais Naturais de Ligação (NBO)

Orbitais moleculares usuais são frequentemente deslocalizados sobre toda a molécula, o que dificulta a interpretação química intuitiva. A análise NBO recodifica essa informação em orbitais localizados de ligação, pares isolados e orbitais antiligantes, próximos à linguagem de estruturas de Lewis, permitindo relacionar diretamente cada grupo químico a uma distribuição eletrônica específica. Essa representação torna mais claro como doadores e aceptores de densidade, ligações múltiplas e pares isolados influenciam os parâmetros de RMN.

Deslocalizações Eletrônicas e Estabilização

Interações doador-aceptor entre orbitais ocupados e orbitais vazios geram delocalização eletrônica e estabilização adicional, o que modifica a densidade em regiões específicas da molécula. Essas delocalizações, que incluem efeitos como conjugação e hiperconjugação, afetam tanto geometrias quanto blindagens locais e, portanto, repercutem diretamente em deslocamentos e constantes de acoplamento. A análise NBO quantifica essas interações e ajuda a identificar quais delas são mais relevantes para explicar diferenças de δ e J entre moléculas aparentadas.

Análise NLMO e Contribuições Orbitais

Na abordagem NLMO, a blindagem em torno de um núcleo é decomposta em contribuições de orbitais localizados específicos, como orbitais de carço, ligações σ , ligações π e pares isolados. Isso permite responder perguntas do tipo “quais orbitais são responsáveis por blindar ou desblindar este carbono ou hidrogênio em particular?”, oferecendo uma visão mais fina do mecanismo eletrônico por trás de um deslocamento observado. Em séries comparativas, torna-se possível ver, por exemplo, quando a maior parte da diferença de deslocamento vem de alterações em orbitais σ e não em orbitais π .

Efeitos de Substituintes e Estrutura

Substituintes doadores ou aceptores de elétrons em anéis aromáticos e cadeias conjugadas alteram a distribuição eletrônica local e, por consequência, deslocamentos e acoplamentos nos átomos vizinhos. A análise em termos de orbitais localizados mostra que, muitas vezes, mudanças em ligações σ e pares isolados têm papel tão importante quanto modificações em sistemas π , desafiando visões simplificadas baseadas apenas em ressonância clássica. Esse

tipo de raciocínio refinado ajuda a interpretar séries experimentais em que efeitos substituintes não seguem tendências óbvias.

Efeitos Relativísticos e Isotópicos

Em moléculas contendo átomos mais pesados, efeitos relativísticos relacionados ao acoplamento spin-órbita podem alterar significativamente deslocamentos químicos de núcleos vizinhos, exigindo atenção especial na interpretação de séries contendo halogênios pesados ou metais. Além disso, a substituição isotópica em certos núcleos pode produzir pequenas, porém detectáveis, diferenças de deslocamento e acoplamento devido a mudanças sutis em vibrações e densidade eletrônica média, oferecendo ferramentas adicionais para confirmar detalhes estruturais delicados. Ambos os efeitos ilustram como RMN é sensível não apenas à conectividade, mas também a propriedades nucleares e eletrônicas mais finas.

CAPÍTULO 5 – ESPECTROSCOPIA ORDENADA POR DIFUSÃO - DOSY

Fernando Macedo Jr.

DOSY é uma técnica de RMN que adiciona, além do deslocamento químico, uma dimensão relacionada ao coeficiente de difusão das espécies em solução, permitindo separar sinais de acordo com o tamanho ou mobilidade das moléculas. Em misturas complexas, isso funciona como uma “cromatografia no domínio da difusão”, ajudando a distinguir moléculas pequenas, agregados, complexos e macromoléculas que, em um espectro 1D convencional, apareceriam sobrepostos. Como será visto, a base da DOSY é a RMN é a combinação do experimento de Eco de Spin com Gradientes de Campo Pulsados (*PFG*) para codificar e decodificar as frequências dos spins nucleares.

Movimento Browniano e Difusão Molecular

As moléculas em solução estão em constante movimento aleatório devido a colisões com o solvente, fenômeno conhecido como movimento browniano, cuja intensidade é descrita pelo coeficiente de difusão (D). Em termos qualitativos, moléculas menores ou mais compactas difundem-se mais rapidamente (D maior), enquanto espécies maiores, agregadas ou mais alongadas se movem mais lentamente (D menor), e é essa diferença que a DOSY explora para separar os sinais no espectro.

Eco de Spin e Refocalização

Em experimentos de eco de spin, um pulso de 180° aplicado após um intervalo definido pode refocalizar a perda de coerência da magnetização macroscópica M_{xy} causada por pequenas variações locais do campo magnético, recuperando o sinal em forma de um “eco”. Esse princípio de refocalização é importante porque permite separar efeitos de inhomogeneidade do campo de outros mecanismos de diminuição de sinal, criando um cenário controlado no qual a atenuação adicional possa ser atribuída à difusão das moléculas durante o tempo de experimento.

Gradiente de Campo Magnético Pulsado

Ao aplicar um gradiente de campo magnético (codificação) ao longo do comprimento do volume da amostra, diferentes posições da amostra passam a experimentar campos ligeiramente diferentes, gerando fases distintas para spins excitados em posições espaciais diferentes. Quando um segundo gradiente de mesma intensidade, mas de sentido oposto (decodificação), é aplicado após um intervalo de tempo, moléculas que se moveram entre as aplicações dos gradientes

não têm sua fase totalmente refocada e contribuem para uma atenuação do sinal que depende de D ; assim, variando-se a intensidade dos gradientes, é possível extrair o coeficiente de difusão de cada conjunto de sinais.

O Experimento de DOSY básico

No experimento de DOSY, a sequência de Eco de Spin descrita acima é combinada com dois gradientes de campo pulsados idênticos separados por um intervalo de tempo de maneira que um pulso de 180° seja aplicado entre eles.

Limitações e Sequências Aprimoradas

Sequências simples de eco de spin podem sofrer perda de sinal significativa por relaxação transversal, especialmente em macromoléculas com T_2 curto, limitando o tempo de difusão acessível. Para contornar isso, utilizam-se sequências de eco estimulado e variantes com gradientes bipolares, que armazenam a magnetização ao longo do eixo principal (menos sensível à perda por T_2) e reduzem artefatos associados a correntes induzidas e convecção, ampliando a faixa de tamanhos moleculares que podem ser estudados com boa relação sinal-ruído.

Aquisição Prática do DOSY

Na prática, escolhe-se uma sequência de pulsos adequada (como versões baseadas em eco estimulado com gradientes) e define-se uma série de incrementos de intensidade de gradiente ao longo de várias aquisições, mantendo constantes os demais parâmetros. Cada valor de gradiente gera um espectro 1D em que as intensidades dos picos vão sendo progressivamente atenuadas em função do coeficiente de difusão das espécies, construindo um conjunto de dados a partir do qual se pode calcular D para cada sinal observado.

Processamento e Cálculo do Coeficiente de Difusão, D

O processamento envolve ajustar a variação da intensidade de cada sinal em função do “peso” dos gradientes a um modelo matemático de atenuação compatível com difusão livre. A partir desse ajuste, obtém-se um valor de coeficiente de difusão para cada conjunto de picos, que pode então ser associado a uma espécie molecular específica e, em alguns casos, usado para estimar tamanhos hidrodinâmicos aproximados ou mudanças de estado de agregação.

Espectro de DOSY

O resultado costuma ser representado como um mapa 2D em que o eixo horizontal corresponde ao deslocamento químico, como em um espectro ^1H convencional, e o eixo vertical representa o coeficiente de difusão (ou seu logaritmo). Sinais pertencentes à mesma espécie compartilham o mesmo valor de D e aparecem alinhados horizontalmente, enquanto espécies de tamanhos diferentes surgem em

níveis de D distintos, o que facilita a identificação de quais picos pertencem a cada componente de uma mistura.

Aplicações Práticas

DOSY é especialmente útil para estudar misturas complexas sem necessidade de separação prévia, investigar processos de agregação e autoassociação e monitorar interações receptor–ligante em solução. Em contextos sintéticos e analíticos, a técnica ajuda a distinguir reagentes, intermediários e produtos com tamanhos diferentes e pode complementar informações obtidas por outras técnicas de análise de tamanho, como espalhamento de luz ou cromatografia de exclusão por tamanho.

Considerações Práticas e Limitações

Embora poderosa, DOSY exige controle cuidadoso de temperatura, homogeneidade de campo e estabilidade da amostra, já que convecção, troca química rápida e agregação irreversível podem distorcer os resultados. Além disso, espécies com tamanhos ou formas muito similares podem apresentar coeficientes de difusão próximos, limitando a resolução nessa dimensão e exigindo combinação com outras técnicas de RMN e métodos espectroscópicos para uma caracterização completa.