

# RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE: passato, presente e futuro di una tecnica spettroscopica che ha cambiato la chimica e non solo.

## Parte II

VALENTINA DOMENICI<sup>a</sup>, CARLO ALBERTO VERACINI<sup>b</sup>

Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale,  
Università degli studi di Pisa,  
via Risorgimento 35, 56126 Pisa, Italia

<sup>a</sup> V. D. e-mail: valentin@dcci.unipi.it; tel: 050 2219 266; fax: 050 2219 260.

<sup>b</sup> C. A. V. e-mail: verax@dcci.unipi.it; tel: 050 2219 235; fax: 050 2219 260.

### Parole chiave:

spettroscopia, NMR, risonanza magnetica, imaging, spin, struttura molecolare, chimica, biologia, medicina.

### Sommario:

La Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è nata subito dopo la Seconda Guerra Mondiale sull'onda delle tecnologie di guerra. Similmente nasceva in quegli anni la Spettroscopia di Risonanza Paramagnetica a seguito dello sviluppo delle tecnologie a microonde usate per il RADAR. Lo sviluppo storico della Risonanza Magnetica Nucleare è stato argomento di un precedente articolo pubblicato su questa rivista. In questo nuovo lavoro cercheremo da un lato di esporre alcuni principi su cui si fonda questo tipo di Spettroscopia, dall'altro di illustrare alcune delle molteplici applicazioni che la utilizzano, con uno sguardo alle più recenti nel campo medico e della scienza dei materiali.

### NMR: dai principi alle applicazioni

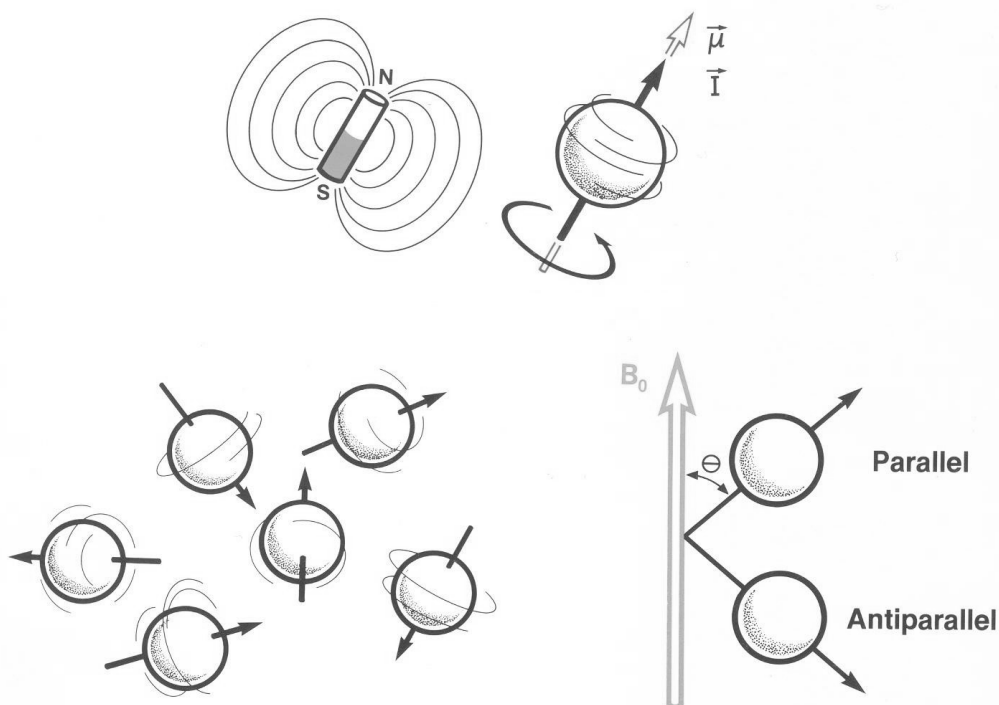
I concetti di base della Spettroscopia NMR sono generalmente oggetto di corsi di chimica fisica, ed esistono per questo numerosi testi<sup>1,2,3,4,5,6</sup> e monografie<sup>7,8,9</sup> rivolte per lo più a studenti universitari o ricercatori che lavorano in questo ambito. I principi di base di questa spettroscopia sono infatti piuttosto complessi per un pubblico generico in quanto richiedono di fare a loro volta riferimento a concetti di fisica lontani dalla fisica più conosciuta, ovvero quella classica. Essendo i nuclei l'oggetto principale di questa spettroscopia gran parte delle leggi che la governano si rifanno alla fisica quantistica. Fortunatamente nell'equazione fondamentale della risonanza non compare  $h$  (la costante di Plank) per cui si può descrivere il fenomeno della risonanza anche con le equazioni dell'elettromagnetismo classico (che dovrebbe ma spesso non è molto familiare ai più).

Lo scopo di questo articolo è quello di introdurre in modo semplice alcuni dei concetti più importanti che differenziano l'NMR dalle altre spettroscopie e dare un'idea delle possibilità che essa offre di studiare il mondo che ci circonda, accennando ad alcune delle applicazioni più interessanti e attuali nel campo della medicina, della scienza dei materiali e dell'alimentazione.

### I nuclei magnetici e la precessione di Larmor

I nuclei degli atomi magnetici, ovvero sensibili alla presenza di campi magnetici esterni, vengono associati nella letteratura scientifica a piccole calamite (*Figura 1*). Questa analogia seppur lontana dal fornire una descrizione esatta della realtà dei nuclei atomici è molto efficace per far capire una serie di proprietà derivanti dall'interazione tra i nuclei e i loro momenti angolari ( $I$ ) e i campi magnetici, statici e fluttuanti ( $B$ ). Se immaginiamo un nucleo come una particella carica ruotante attorno a un asse di simmetria (*Figura 1*) giustifichiamo così la presenza di un momento magnetico di spin, indicato con  $\mu$ . Infatti, è ben noto dalla fisica classica che particelle cariche in rotazione producono un momento magnetico. Cosa succede se tanti nuclei, pensiamo per esempio ai nuclei di idrogeno di tante molecole di acqua, vengono immersi in un campo magnetico  $B_0$ ? La distribuzione inizialmente random degli spin viene alterata in quanto il campo magnetico tende ad allineare gli spin in alcune particolari orientazioni. Il caso semplice dei nuclei di idrogeno, e di tutti quei nuclei aventi spin  $I$  uguale a  $1/2$ , prevede solo due possibili orientazioni, indicate come parallela e antiparallela.<sup>10</sup> La direzione dei momenti magnetici di spin,  $\mu$ , può formare con la direzione del campo magnetico  $B_0$

solo un certo angolo,  $\theta$ , (Figura 1) puntando nella stessa direzione del campo (orientazione parallela) o nella direzione opposta (orientazione antiparallela). Queste due situazioni corrispondono a due stati energetici diversi, solitamente indicati con stato  $\alpha$  ( $m_I=1/2$ ) e stato  $\beta$  ( $m_I=-1/2$ ).

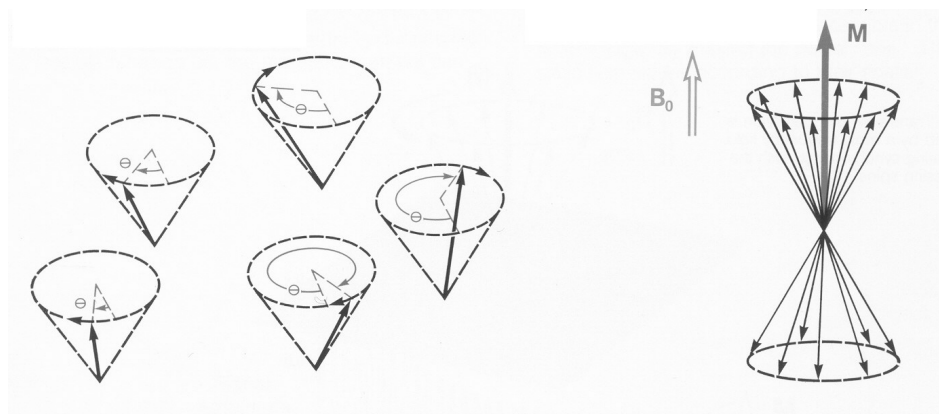


**Figura 1:** Rappresentazione schematica dei nuclei magnetici come piccole calamite. L'orientazione random degli spin in assenza di campi esterni si riduce a due possibili orientazioni (parallela e antiparallela) in presenza di un campo magnetico  $B_0$ .

Classicamente il nucleo magnetico si comporta come un dipolo magnetico microscopico o più semplicemente come una piccola calamita. In realtà l'analogia con la "piccola calamita" non è del tutto corretta perché per i nuclei i momenti magnetici sono associati al momento angolare della quantità di moto. Una analogia più calzante è quella della trottola ruotante nel campo gravitazionale terrestre: la reazione alla forza torcente della gravità è la precessione della trottola.

Una conseguenza quindi della forza torcente esercitata dal campo magnetico sui momenti magnetici di spin sarà la loro precessione attorno alla direzione del campo magnetico. La velocità di precessione è molto importante perché ci fornisce informazioni sul tipo di nucleo. La relazione di Larmor ( $\omega_0 = \gamma B_0$ ) è sicuramente la più nota nella spettroscopia NMR perché definisce la velocità di rotazione degli spin dei nuclei in funzione dell'intensità del campo magnetico esterno  $B_0$  e di  $\gamma$ , la costante giromagnetica, espressa in MHz/Tesla, specifica del tipo di nucleo.

Continuando a considerare a titolo d'esempio il nostro insieme di molecole d'acqua in fase liquida in un campo magnetico  $B_0$ , possiamo immaginare quindi che gli spin  $\mu$  dei nuclei degli idrogeni di questo sistema siano tutti in precessione attorno a  $B_0$ , come riportato in Figura 2. Ogni spin, sia esso parallelo o antiparallelo, avrà una fase diversa dando come risultato netto un momento magnetico nullo nel piano perpendicolare al campo (xy). Al contrario, seguendo la legge di distribuzione di energia di Boltzmann, il numero o la popolazione di spin paralleli (p) sarà leggermente superiore a quello degli antiparalleli (a), risultando in un momento magnetico totale lungo z diverso da zero, indicato con M (Figura 2). La legge di Boltzmann prevede infatti che il rapporto tra le popolazioni dei due livelli ( $\alpha$  e  $\beta$ ) sia uguale a  $\frac{n_p}{n_a} = e^{(-\Delta E/kT)}$  dove K e T sono rispettivamente la costante di Boltzmann e la temperatura, mentre  $\Delta E$  è la differenza di energia tra i due livelli. Questa differenza di energia, seppur piccola, è responsabile della magnetizzazione netta M, fondamentale perché si possa pensare di osservare un segnale con la spettroscopia NMR. A questo dobbiamo aggiungere che la situazione appena descritta è una situazione di equilibrio che può essere alterata momentaneamente irradiando il sistema con una opportuna radiazione nella regione delle radiofrequenze.

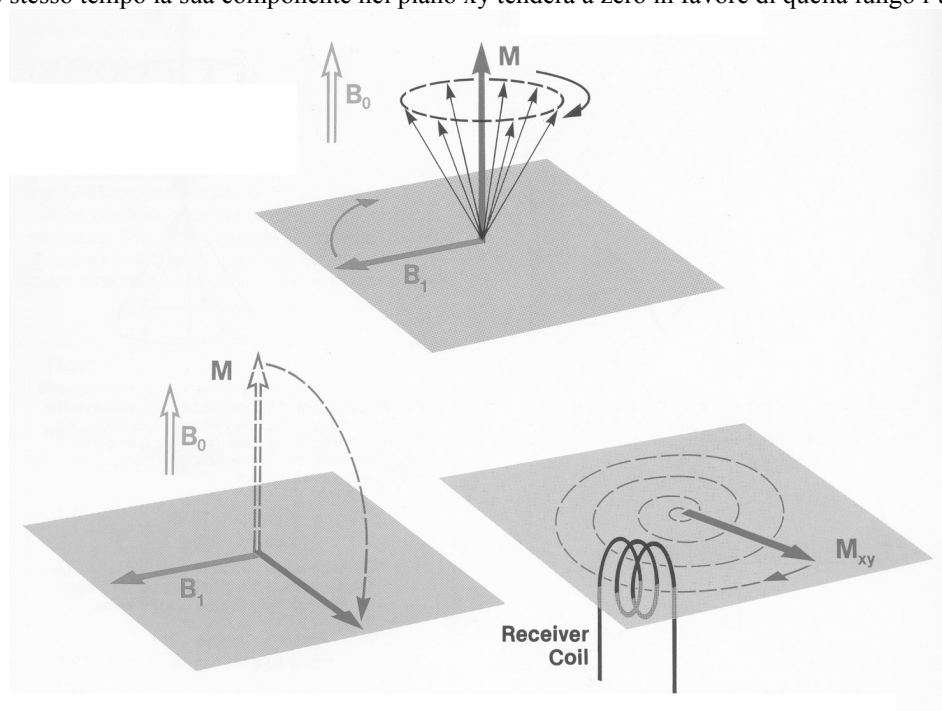


**Figura 2:** A destra: una serie di spin paralleli che precedono con una fase ( $\theta$ ) random. A sinistra: L'allineamento dei momenti magnetici dei singoli nuclei creano una magnetizzazione macroscopica,  $M$ , nella direzione del campo magnetico,  $B_0$ . La componente trasversa,  $M_{xy}$ , è nulla come si evince dalla distribuzione dei vettori rispetto al piano  $xy$  perpendicolare a  $B_0$ .

### L'origine del segnale NMR

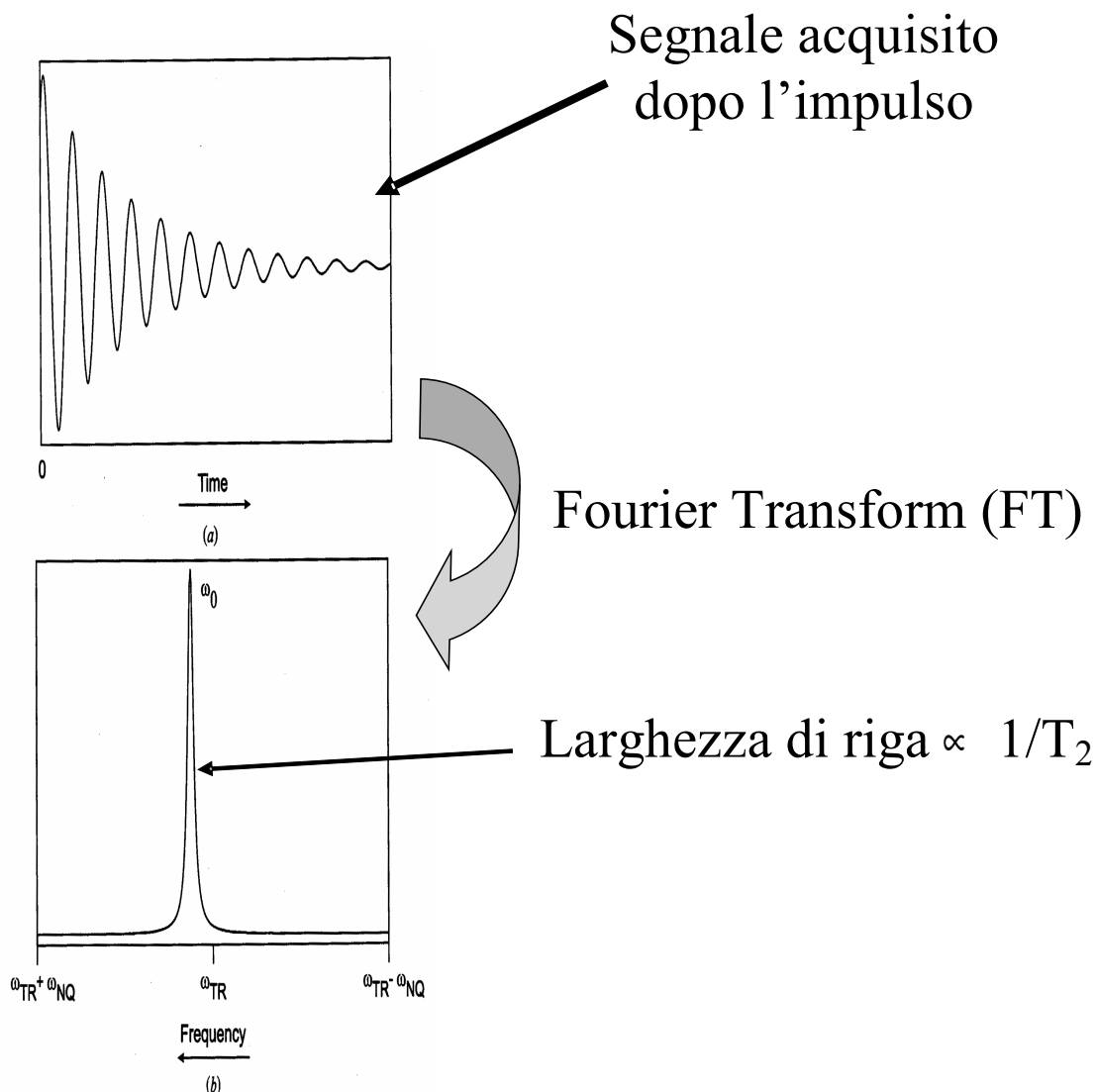
L'applicazione di un campo magnetico ruotante  $B_1$ , associato a una radiazione di radiofrequenze, può dunque alterare l'equilibrio nella distribuzione di popolazione tra gli stati  $\alpha$  e  $\beta$ , a patto che l'energia di questa radiazione sia pari alla differenza di energia tra i due livelli ( $\Delta E = h \nu_0$ ). Condizione questa definita di *risonanza*.<sup>11</sup> Nella pratica questo si verifica mandando un breve impulso di radiofrequenze sul sistema in modo che la magnetizzazione  $M$ , inizialmente lungo l'asse  $z$ , venga portata esattamente nel piano  $xy$  (Figura 3). Per ragioni geometriche si dice che l'impulso che verifica questa condizione è l'impulso a 90 gradi.

Una volta cessato l'impulso, essendo la nuova situazione, in cui  $M$  è tutta nel piano  $xy$ , di non equilibrio, seguirà un periodo di ripristino della situazione di equilibrio. In questo lasso di tempo, il vettore  $M$  continuerà la precessione lungo l'asse  $z$ , ma allo stesso tempo la sua componente nel piano  $xy$  tenderà a zero in favore di quella lungo l'asse  $z$  (Figura 3).



**Figura 3:** Effetto di un campo a radio frequenze,  $B_1$ , sulla magnetizzazione del sistema di spin,  $M$ . A condizione che la frequenza di rotazione del campo  $B_1$  sia sincrona con quella degli spin (condizione di risonanza), la magnetizzazione  $M$  può essere ruotata nel piano  $xy$ , creando così una magnetizzazione trasversa,  $M_{xy}$ . Il posizionamento di un ricevitore nel piano  $xy$  permette di registrare il segnale dovuto alla rotazione di  $M_{xy}$  rispetto all'asse  $z$ , che oltre a ruotare diminuisce in intensità fino ad annullarsi.

Se avremo posto un ricevitore nel piano  $xy$ , in questo stesso periodo di tempo registreremo un segnale analogo a quello di *Figura 4*. E' il cosiddetto FID, dall'inglese *free induction decay*: si tratta di un segnale oscillante che decade lentamente a zero. L'oscillazione del segnale è legata alla differenza in frequenza fra la rotazione di  $B_1$  (su questa frequenza è sintonizzata la bobina ricevente) e la frequenza di Larmor di precessione della Magnetizzazione  $\omega_0$ . Se  $B_1$  fosse applicato esattamente a  $\omega_0$  il segnale decadrebbe esponenzialmente senza oscillare. Il valore iniziale del segnale al tempo 0,  $I(0)$ , ci fornisce un'informazione quantitativa sulla popolazione del sistema, essendo esso proporzionale a  $M$ . Inoltre, il decadimento, di tipo esponenziale, che descrive il ripristino della situazione di equilibrio iniziale, in cui  $M_{xy}$  è nulla, è regolato da una quantità molto importante, specifica del sistema in esame, che è il tempo di rilassamento trasversale,  $T_2$ . Queste grandezze caratteristiche,  $I(0)$ ,  $\omega_0$  e  $T_2$  possono essere facilmente ottenute anche osservando la trasformata di Fourier del FID, il vero e proprio spettro NMR (*Figura 4*). La posizione del segnale NMR sull'asse delle frequenze è legata a  $\omega_0$ , l'intensità del segnale a  $I(0)$ , e la larghezza di riga del segnale al  $T_2$ .



**Figura 4:** Il FID e lo spettro di un segnale NMR.

### Lo spostamento e lo schermo chimico

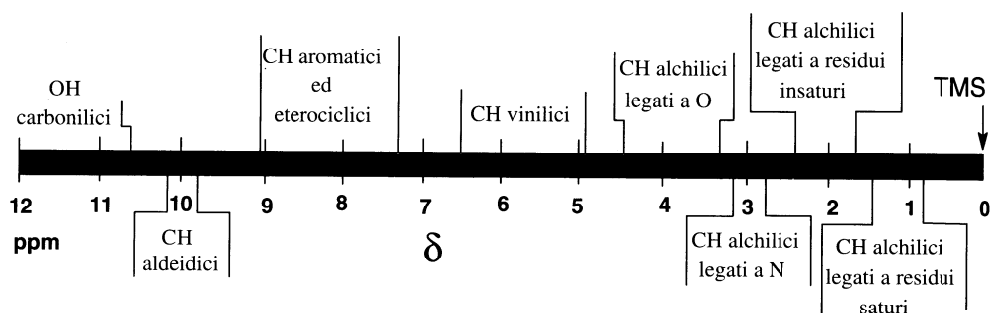
Se tutti i nuclei degli atomi di idrogeno di qualsiasi molecola dessero esattamente lo stesso segnale NMR l'uso di questa tecnica sarebbe assolutamente limitato. Per fortuna dei chimici e non solo, la sensibilità dell'NMR (capacità di distinguere situazioni chimiche e fisiche pur all'interno di una stessa specie di nuclei) è molto elevata soprattutto grazie alla costante di schermo chimico,  $\sigma$ . I nuclei atomici, a differenza delle semplici calamite, sono continuamente soggetti all'influenza degli elettroni che li circondano e che, muovendosi, inducono campi magnetici secondari, che si oppongono al campo magnetico esterno  $B_0$ .<sup>12</sup>

## Risonanza magnetica nucleare

I nuclei sono quindi sensibilmente influenzati dal loro intorno chimico e il campo magnetico effettivo è generalmente più piccolo di  $B_0$ . Per la precisione si dice che i nuclei sono schermati dagli elettroni dell'intorno chimico di una quantità pari a  $\sigma B_0$ , dove  $\sigma$  è la costante di schermo, una quantità adimensionale.<sup>13</sup> Il campo locale "sentito" da un nucleo di idrogeno è quindi pari a  $B_{loc}=B_0(1-\sigma)$ . Questo determina la differenziazione tra nuclei di idrogeno posizionati in siti diversi di una stessa molecola, che avranno frequenze di risonanza leggermente diverse e quindi contribuiranno a segnali diversi nello spettro NMR.

Se ci limitiamo a considerare il caso dei nuclei di idrogeno, quello più usato per la caratterizzazione dei composti organici, ad esempio, un altro concetto molto importante connesso al precedente è quello di spostamento chimico o *chemical shift*. Sapere che nuclei con un diverso intorno chimico hanno una diversa frequenza di risonanza non basta per poter distinguere i segnali NMR soprattutto se abbiamo molecole complesse con molti nuclei di idrogeno in posizioni diverse. Occorre sapere di quanto queste frequenze sono diverse secondo alcune regole pratiche che derivano da uno studio molto sistematico degli spettri NMR e dell'origine quantomeccanica della costante di schermo. Per ragioni di brevità non è possibile entrare nel dettaglio di questi studi. Basti pensare che a influenzare il valore effettivo dello schermo chimico di un nucleo sono fenomeni complessi, quali il diamagnetismo e paramagnetismo, l'anisotropia magnetica dei legami così come le correnti di anello nel caso di composti aromatici e le interazioni con il solvente.

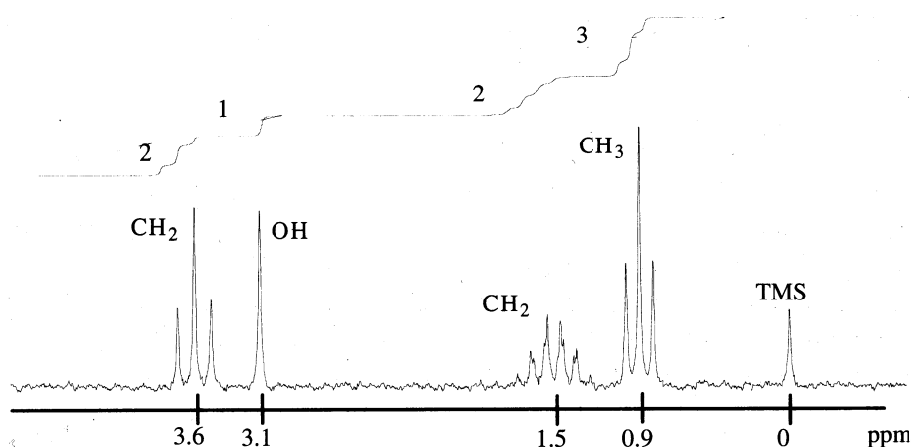
Per praticità lo spostamento chimico dei segnali NMR,  $\delta$ , viene definito rispetto a uno standard, che per l'idrogeno,  $^1\text{H}$ , è il tetrametilsilano,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ , o brevemente TMS:  $\delta = 10^6 (v_{\text{campione}} - v_{\text{TMS}})$ . Questa relazione è analoga a:  $\delta = 10^6 (\sigma_{\text{TMS}} - \sigma_{\text{campione}})$ , dove il legame tra spostamento chimico e schermo chimico appare evidente. Comunemente quindi gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono definiti in funzione dello spostamento chimico e sono contenuti in un intervallo di  $\delta$  che va da 0 a 12 parti per milione (ppm). In *Figura 5* sono riportati gli intervalli tipici degli spostamenti chimici di alcuni gruppi di idrogeni di molecole organiche.



**Figura 5:** Lo spostamento chimico del protone in composti organici.

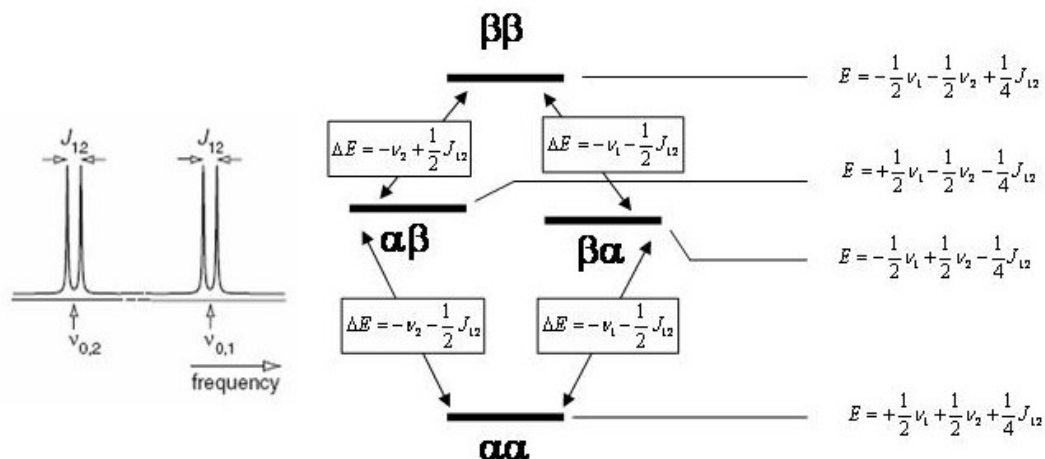
### L'accoppiamento e la struttura fine degli spettri NMR

Se osserviamo lo spettro  $^1\text{H}$  NMR dell'alcol n-propanolo ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) vediamo che non tutti i segnali si presentano nello stesso modo: mentre l'idrogeno del gruppo ossidrilico si presenta come un segnale singolo, detto singoletto, gli altri segnali sono più strutturati (*Figura 6*).



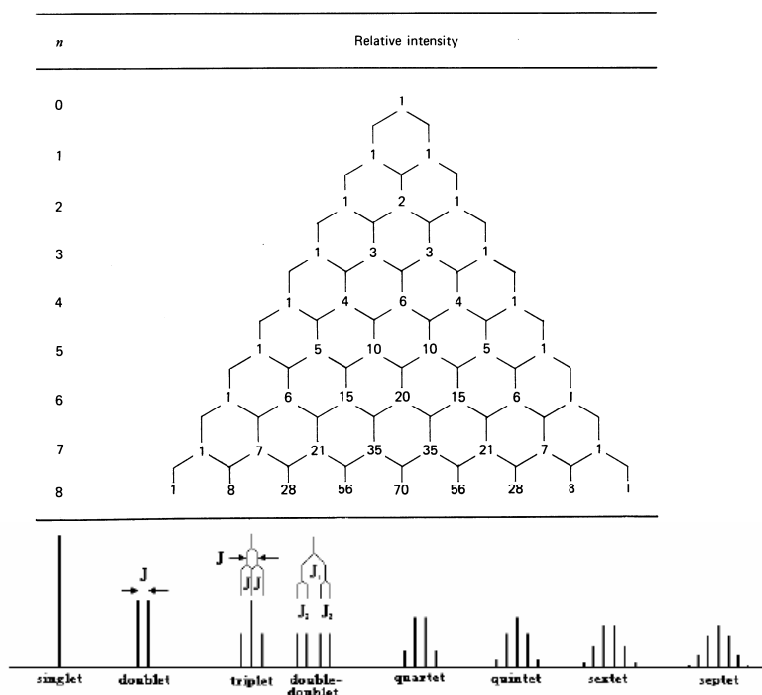
**Figura 6:** Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del composto n-propanolo.

La suddivisione di un segnale in più righe, a formare un doppietto, un tripletto e via via strutture ancora più complesse, dà luogo alla cosiddetta struttura fine dello spettro e deriva dall'interazione del nucleo di idrogeno con i nuclei di idrogeno vicini. L'interazione tra nuclei di idrogeno di posizioni vicine sulla stessa molecola viene espresso in termini della costante di accoppiamento scalare,  $J$ . Questa costante non dipende dal valore del campo magnetico e viene espressa in Hz piuttosto che in ppm. Tipici valori di  $J$  in composti organici vanno da poche unità a decine di Hz. Da qui si capisce perché l'uso di spettrometri ad alta risoluzione, ovvero a campi alti, abbia permesso di "vedere" correttamente la struttura fine degli spettri di molecole complesse, caratterizzate da segnali molto ravvicinati e accoppiati scalarmente. L'accoppiamento tra due nuclei, 1 e 2, influenza le energie dei livelli del sistema, come riportato in *Figura 7*.



**Figura 7:** L'accoppiamento scalare  $J$  in un sistema a due spin.

Nel caso di due nuclei di idrogeno, o in generale con spin  $I=1/2$ , lo spettro corrispondente consiste di due doppietti separati proprio dalla costante  $J$ , dove l'intensità dei segnali è la stessa. Aumentando il numero dei nuclei la molteplicità ovvero il numero di righe in cui un segnale è suddiviso aumenta come  $n + 1$ , dove  $n$  è il numero di nuclei equivalenti a cui il nucleo che stiamo osservando è accoppiato. I segnali però non hanno la stessa intensità, ma seguono la regola del triangolo di Pascal (*Figura 8*). Ad esempio, un idrogeno (A) accoppiato a due idrogeni (X) darà un tripletto ( $n + 1 = 3$ ) con intensità 1:2:1.



**Figura 8:** Il triangolo di Pascal e la molteplicità dei segnali per accoppiamenti multipli.

## Risonanza magnetica nucleare

Nel caso del n-propanolo (*Figura 6*) il segnale corrispondente al CH<sub>3</sub> è un tripletto, così come il CH<sub>2</sub> legato all'ossidrilico. Il CH<sub>2</sub> intermedio invece ha una struttura più complessa, un triplo quartetto, derivante dall'accoppiamento con tre nuclei equivalenti del CH<sub>3</sub> (quartetto) ulteriormente suddiviso per effetto dell'accoppiamento con i due nuclei del CH<sub>2</sub> adiacente (tripletto).

### Il rilassamento nucleare

Supponiamo di inserire un campione nel *probe*, posto nel campo magnetico, per registrarne lo spettro NMR. La domanda è: dopo quanto tempo si otterrà lo spettro desiderato? Certamente occorrerà attendere alcuni secondi, il tempo che il campione impiega a magnetizzarsi, in quanto al tempo zero la differenza di popolazione fra i livelli magnetici (livelli Zeeman) sarà nulla, o molto piccola se consideriamo quella dovuta al debole campo magnetico terrestre. Nei campi normalmente usati per l'NMR, che vanno dal Tesla a una/due decine di Tesla, si stabilirà nel tempo una differenza di popolazione appropriata alla distribuzione di Boltzmann: in questo processo che corrisponde alla magnetizzazione dei nuclei magnetici del campione, che può richiedere anche parecchi secondi, l'energia passa dai nuclei all'intorno. I nuclei "caldi" si raffreddano, per raggiungere l'equilibrio di popolazione dei livelli energetici creati dall'interazione del loro momento magnetico con il campo magnetico B<sub>0</sub>. Questo processo viene chiamato *rilassamento*.

Va puntualizzato che il *rilassamento* non avviene per transizione energetica spontanea, in quanto alle frequenze radio i tempi di vita naturale dei livelli sono praticamente infiniti e la transizione spontanea è nulla. A provocare i processi di rilassamento sono i moti molecolari che creano campi fluttuanti casuali che provocano transizioni nel sistema di spin. In aggiunta ai parametri che riguardano la frequenza di risonanza, quali lo spostamento chimico e gli accoppiamenti scalari, in NMR sono molto importanti i tempi di rilassamento in quanto fanno da reporter sulla dinamica molecolare e sono quindi legati alla temperatura, alla viscosità e ad altre caratteristiche chimico-fisiche della fase del sistema che stiamo studiando.

Consideriamo per esempio i nuclei di molecole in un liquido posto in un campo magnetico: le transizioni fra i livelli di spin possono essere indotte dai campi magnetici fluttuanti originati dai momenti magnetici legati agli spin dei nuclei sulla stessa molecola o di molecole vicine. Le molecole eseguono nei liquidi moti Browniani, hanno cioè rapidi moti di diffusione traslazionale e rotazionale. I campi fluttuanti creati dai moti molecolari possono essere risolti mediante analisi di Fourier in componenti oscillanti a varie frequenze: le componenti perpendicolari al campo magnetico statico, che oscillano alla frequenza di Larmor, inducono transizioni fra i livelli di spin.

Queste transizioni provocano il rilassamento della magnetizzazione longitudinale, M<sub>z</sub>, parallela al campo inducente, in quanto la riportano al valore d'equilibrio, M<sub>0</sub>. Se, a seguito dell'impulso a radio frequenze, viene creata una magnetizzazione traversa, M<sub>x,y</sub>, anche questa decade nel tempo al suo valore di equilibrio, che però è zero.

Le componenti dei campi fluttuanti che operano su M<sub>x,y</sub> sono, in un sistema di riferimento ruotante, sia ad alta che a bassa frequenza. Le transizioni ad alta frequenza limitano il tempo di vita dei livelli e allargano la distribuzione in energia provocando un allargamento delle righe. L'allargamento di riga ha anche un contributo a frequenza bassa (vicina a zero), dovuto a quei fenomeni che modulano lentamente la differenza d'energia fra i livelli.

Da un punto di vista termodinamico il decadere della magnetizzazione longitudinale (ovvero lungo z) implica un trasferimento di energia con l'intorno chimico (*rilassamento spin-reticolo*, T<sub>1</sub>), mentre il decadere della magnetizzazione traversa corrisponde a una perdita di fase delle sue componenti (*rilassamento spin-spin*, T<sub>2</sub>) ovvero a un disordine entropico.

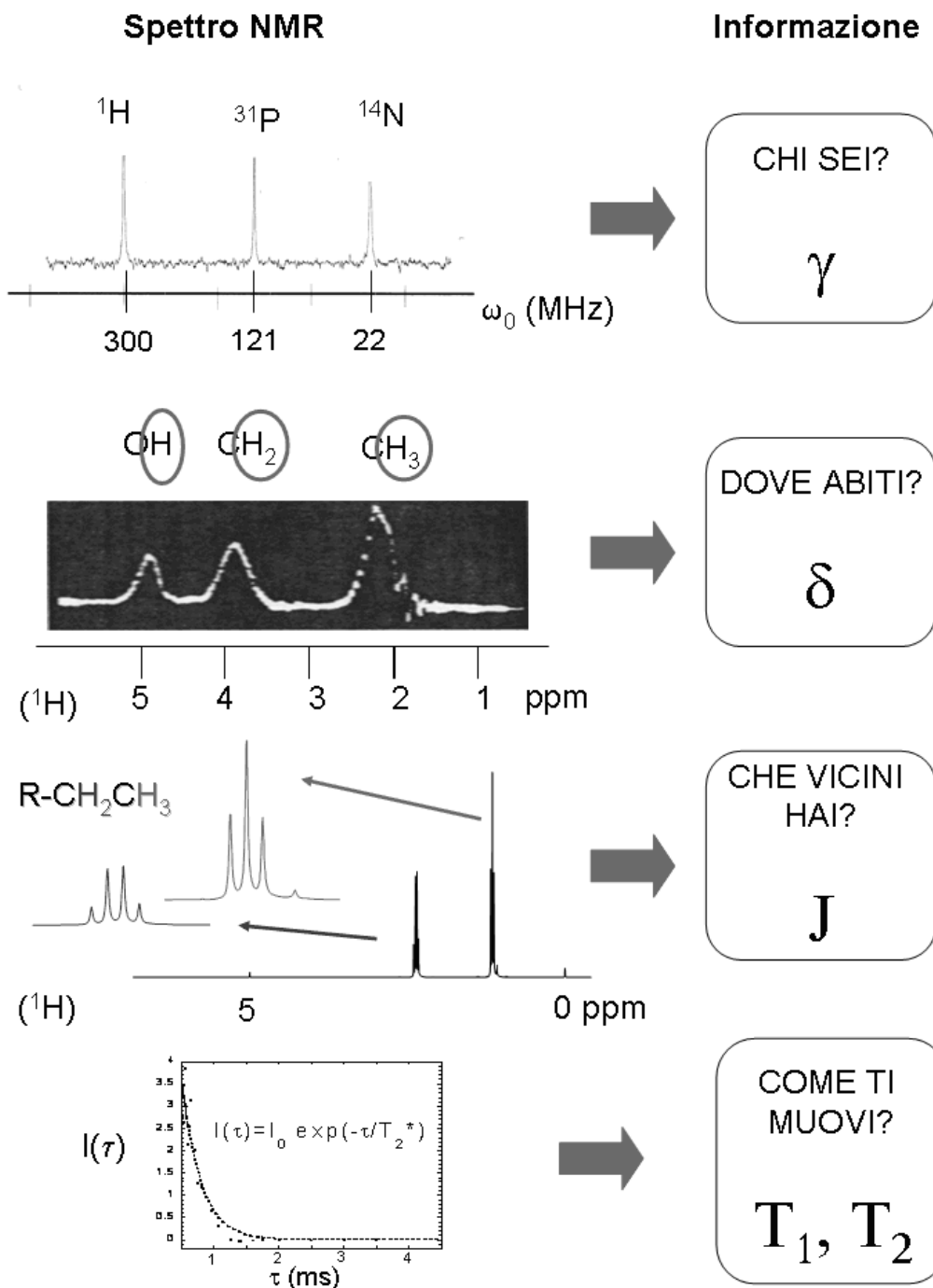
Come conseguenza di quanto detto, la magnetizzazione traversa rilassa al suo valore d'equilibrio sempre in maniera più veloce di quella longitudinale essendo influenzata da due contributi, ad alta e a bassa frequenza (solo al limite, nei fluidi isotropi i due rilassamenti sono uguali).

La magnetizzazione traversa in realtà decade anche, e spesso più velocemente, per la disomogeneità del campo: le varie zone del campione sentono il campo B<sub>0</sub> +/- ΔB<sub>0</sub> e quindi la magnetizzazione totale risulta dalla somma delle *isocromate* di spin, cioè i contributi di queste zone che essendo a campo diverso per la disomogeneità precedono anche a frequenza diversa ω<sub>0</sub> +/- Δω<sub>0</sub>, sfasandosi velocemente. E' per questo che il segnale di induzione decade con T<sub>2</sub>\* e 1/T<sub>2</sub>\* = 1/T<sub>2</sub> + 1/T<sub>2</sub>ΔB.

A questo punto ci possiamo chiedere: come mai rispetto alle altre spettroscopie in NMR sono così importanti i tempi di rilassamento? Come dicevamo, a differenza delle spettroscopie vibrazionale e rotazionale, per le quali i tempi di rilassamento sono dell'ordine di 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-4</sup> s, tempi di rilassamento dell'ordine dei secondi sono invece comuni in NMR. Il rilassamento relativamente lungo ha importanti conseguenze: c'è in NMR il rischio di saturare i livelli e quindi anche i più semplici esperimenti impulsati, che comportano la ripetizione e l'accumulo di segnale, *impongono* un tempo di attesa perché fra un treno d'impulsi e l'altro il sistema recuperi la sua situazione di equilibrio.

In *Figura 9* sono rappresentati in modo molto schematico i concetti di base fin qui esposti. Riassumendo, quando ci troviamo di fronte a uno spettro NMR, la prima cosa che dobbiamo chiederci è quale nucleo stiamo osservando (e quindi

la sua  $\gamma$ ) e quale è il *range* di frequenze dei segnali (chi sei?). Il secondo passo sarà capire dal numero dei segnali, e dalla loro posizione reciproca, la corrispondenza tra segnale NMR e posizione del nucleo nella molecola che stiamo esaminando. Questo corrisponde a capire l'intorno chimico dei diversi nuclei sulla base dello spostamento chimico ( $\delta$ ) (dove abiti?). La struttura dei segnali, la loro molteplicità e quindi la costante di accoppiamento ( $J$ ) ci dicono invece chi sono i nuclei o i gruppi di nuclei equivalenti immediatamente vicini al nucleo che stiamo osservando (che vicini hai?). Infine, il decadimento del FID, la larghezza della riga e in particolare i tempi di rilassamento aggiungeranno informazioni sul comportamento del nucleo e del frammento di molecola su cui esso si trova, in particolare sulla dinamica (come ti muovi?).



**Figura 9:** Schema riassuntivo delle informazioni che si possono ottenere dall'analisi di uno spettro NMR di un nucleo, ad esempio il protone,  $^1\text{H}$ .



## Risonanza magnetica nucleare

### Magneti per l’NMR

Il cuore della spettroscopia NMR è rappresentato dai grandi strumenti e, in particolare, dal magnete superconduttore che si trova al loro interno. La maggior parte degli spettrometri NMR oggi è di tipo “superconduttore” o “criomagnete”. I primi NMR invece erano elettromagneti, costituiti da grandi bobine di cavi di rame, i solenoidi, dove la circolazione di corrente elettrica garantiva la presenza di un campo magnetico generalmente non molto intenso ( $B_0 < 2.3$  Tesla, corrispondente a una frequenza di Larmor per il protone di 100MHz). Questi strumenti sono stati sostituiti dai superconduttori, con cui si raggiungono campi magnetici di oltre 20 Tesla, sfiorando una frequenza di Larmor per il protone dell’ordine dei Giga Herz. Gli elettromagneti sono ancora utilizzati per alcuni scopi precisi, là dove è utile variare la frequenza di risonanza, come nella rilassometria NMR, per studiare la dinamica dei materiali.

I magneti superconduttori di ultima generazione sono fatti di una lega di niobio-titanio, raffreddata a elio liquido a circa 4°K, sono dotati di schermatura del campo magnetico disperso e sono verticali (si veda ad esempio *Figura 10*). Questo tipo di magnete viene usato sia per l’NMR a stato liquido che a stato solido. Quello che cambia tra i due casi è l’insieme delle altre apparecchiature e degli accessori, dal probe ai disaccoppiatori, fino ai dispositivi idraulici necessari per la rotazione ad angolo magico (*MAS*).



**Figura 10:** Esempio di spettrometro NMR per stato solido.



**Figura 11:** Apparecchiatura tipica per l’MRI: magnete schermato con posizionamento orizzontale, console corredata di schermo e oscilloscopio.

Anche nell’*imaging* di risonanza magnetica, o MRI, i magneti sono superconduttori. In questo caso, la geometria del magnete e l’intensità del campo magnetico è molto importante per il tipo di studi e applicazioni specifiche, soprattutto nel campo della medicina. Come vedremo nei paragrafi dedicati all’MRI, la dispersione del campo è un fattore determinante: il campo magnetico non deve essere costante nello spazio, ma variare grazie alla presenza dei gradienti. Il magnete è il componente più grande e costoso dell’apparecchiatura dell’MRI (*Figura 11*), che comprende oltre ad esso tutta la parte elettronica e informatica per l’acquisizione ed elaborazione dei segnali. A differenza dell’NMR, nell’MRI, i superconduttori sono orizzontali, con diametri interni molto maggiori, compresi tra i 200 mm e i 600 mm e con intensità di campo magnetico  $B_0$  da 2 Tesla a circa 12 Tesla. I campi magnetici di circa 2-3 T sono considerati oggi un buon compromesso tra costo e prestazioni per uso ospedaliero, mentre l’introduzione di campi più intensi è necessaria per scopi di ricerca medica. Campi magnetici superiori a 3 Tesla sono necessari anche nelle indagini cliniche di routine soprattutto per applicazioni di risonanza magnetica funzionale, cerebrale o cardiaca.

La dimensione del diametro interno di questi magneti è anch’essa variabile in funzione dell’uso che viene fatto della strumentazione MRI. Ad esempio, un diametro di 150 mm può essere utile per lo studio di piccoli animali, mentre 400 mm e oltre è adatto per l’uomo.

Nei prossimi paragrafi esamineremo alcuni esempi di applicazione della spettroscopia NMR, accennando anche all’uso di tecniche specifiche, e in certi casi molto avanzate, che comunque si basano sui principi e sui concetti appena descritti.

### Biopolimeri e macromolecole di interesse biologico

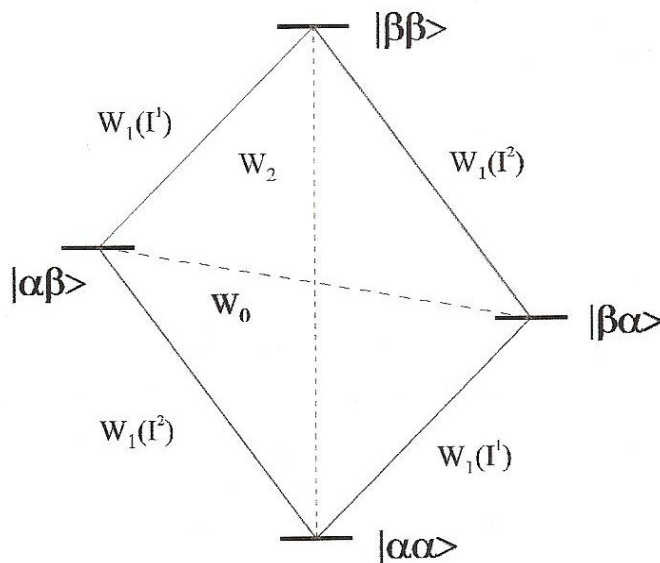
Nell’era della genomica e della post-genomica, e dell’acquisizione di informazioni sempre più dettagliate sulle molecole che sono alla base della vita degli esseri viventi, come il DNA, le proteine e i lipidi, anche la spettroscopia NMR ha avuto e continua ad avere un ruolo molto importante.<sup>14</sup>

Questa tecnica infatti è essenziale per l'analisi della struttura di molecole e macromolecole in soluzione fisiologica, ovvero nelle condizioni tipiche delle cellule, così come per lo studio dei processi dinamici che regolano per esempio l'attività di enzimi e il trasporto delle sostanze nutritive attraverso le membrane cellulari. Insieme ad altre tecniche, come la diffrazione a raggi X con luce di sincrotrone, la diffrazione neutronica e la microscopia elettronica, l'NMR ha permesso di risolvere alcuni importanti quesiti che riguardano il legame tra struttura molecolare e funzione biologica.

A partire dagli anni settanta i primissimi studi in questo campo si basavano sull'analisi di soli spettri monodimensionali  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR di oligopeptidi in soluzione acquosa e, come ricorda il premio Nobel Wüthrich, non si poteva pretendere di meglio avendo a disposizione spettrometri con frequenza di Larmor di appena 100MHz.<sup>15</sup> L'aumento della risoluzione degli spettri grazie al rapido passaggio a spettrometri a campi magnetici sempre più alti, insieme all'aiuto determinante dell'informatica nell'analisi degli spettri, permisero di passare a molecole più grandi e a tecniche sempre più sofisticate.<sup>16</sup>

Oggi sono analisi di routine gli spettri multidimensionali come quelli di correlazione tra  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  i cui acronimi più comuni sono FOCSSY, NOESY e TROSY. La maggior parte di questi esperimenti si basa sul fenomeno NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) che fornisce informazioni sull'interazione dipolare tra nuclei magnetici. Se due nuclei sono relativamente vicini nello spazio l'interazione dipolo-dipolo, analoga a quella della descrizione classica, può essere sfruttata come meccanismo di rilassamento, favorendo la soppressione di alcuni segnali nello spettro o semplicemente per ricavare dalla diminuzione o aumento dell'intensità dei segnali l'effettiva distanza tra due nuclei di una stessa molecola. E' in questo modo, confrontando i dati ottenuti con l'NMR con quelli delle simulazioni, che si risale alla struttura delle macromolecole oggetto di studio.

In *Figura 12* è riportato lo schema degli scambi energetici, e di popolazione, per un sistema di due spin ( $I_1$  e  $I_2$ ) dove le velocità di trasferimento, o di rilassamento, tra un livello e l'altro sono indicati con i termini  $W_i$ , con  $i$  uguale al tipo di transizione (0 = zero quanti, 1 = un quanto, 2 = due quanti di energia). Alterare la popolazione di uno dei quattro livelli induce una variazione nel rapporto tra le velocità  $W_i$  dando luogo al fenomeno NOE che si concretizza appunto nella variazione delle intensità dei segnali NMR.



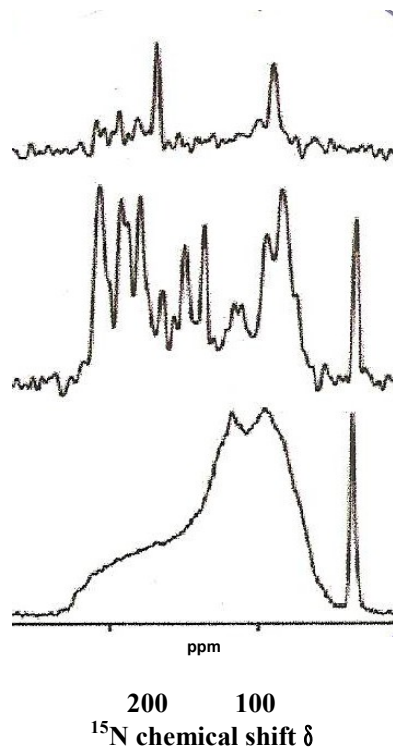
**Figura 12:** Schema dei processi di rilassamento alla base del fenomeno NOE in un semplice sistema a due spin ( $I_1$  e  $I_2$ ) accoppiati dipolarmente. I termini  $W_i$  sono le velocità di rilassamento che "collegano" i diversi livelli energetici implicando transizioni a 0, 1 o 2 quanti di energia.

Negli ultimi anni, accanto alle tecniche NMR di alta risoluzione in stato liquido stanno diventando di uso sempre più frequente anche le tecniche NMR di stato solido. Queste richiedono un apparato dedicato, dovendo disporre di disaccoppiatori in alta potenza e di sistemi meccanici che permettano di ruotare il campione a velocità di diversi KHz. Disporre di frammenti isotopicamente arricchiti, che abili biologi sono in grado di inserire selettivamente nel corredo genetico di batteri e altri organismi, è diventato fondamentale per poter studiare con dettaglio la struttura molecolare delle proteine. Un esempio è riportato in *Figura 13*: alcuni spettri  $^{15}\text{N}$  NMR a stato solido di una proteina in una membrana cellulare (un doppio strato fosfolipidico) sono stati registrati nel caso in cui (A) la proteina è arricchita in  $^{15}\text{N}$  solo su un peptide (leucina) e la membrana è orientata nel campo magnetico; (B) la proteina è tutta arricchita in  $^{15}\text{N}$  e la

## Risonanza magnetica nucleare

membrana è orientata nel campo magnetico; (C) la proteina è tutta arricchita in  $^{15}\text{N}$  e la membrana non è orientata nel campo magnetico, e possiede quindi tutte le possibili orientazioni nello spazio.<sup>17</sup>

Tra le nuove sfide che vedono tra i protagonisti l'NMR ad alta risoluzione, sia a stato liquido che a stato solido, ricordiamo il processo di *folding* delle proteine, l'attività di proteine di membrana, i neurorecettori e i canali ionici, il legame tra struttura e funzione delle porzioni di DNA non codificanti (*spam genes*).



**Figura 13:** Serie di spettri  $^{15}\text{N}$  NMR a stato solido di una proteina in una membrana cellulare (ref. 16) registrati in condizioni diverse (si veda il testo).

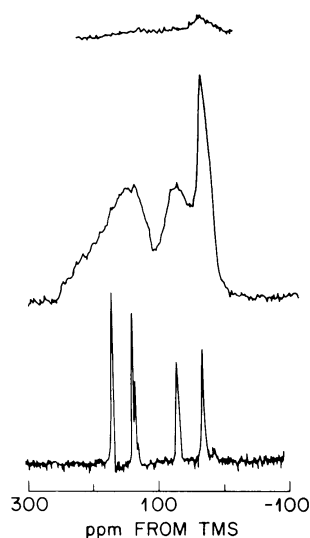
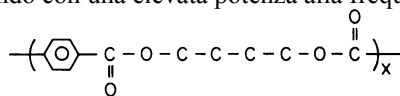
### I polimeri e la materia “soft”

I polimeri sono stati oggetto di numerosi studi basati sulla spettroscopia NMR, sia disciolti in soluzione, avvalendosi quindi di tecniche di stato liquido, sia nel loro stato di solidi amorfi, semicristallini o cristallini.

Tecniche NMR standard di stato liquido, come semplici spettri NMR al  $^1\text{H}$  e al  $^{13}\text{C}$ , vengono usati per determinare il rapporto tra monomeri in sistemi copolimerici, per studiare la conformazione dei monomeri o per verificare che la reazione di polimerizzazione sia avvenuta a completezza e se ci sono siti di reazione più attivi di altri. Analisi più sofisticate, come studi multinucleari si basano sull'osservazione di nuclei meno comuni, come il  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{27}\text{Al}$  e il  $^{11}\text{B}$ , e permettono di individuare dettagli sulla geometria dei diversi siti di polimerizzazione del catalizzatore, di solito di tipo inorganico. A questi studi vanno aggiunti poi quelli bi- e multidimensionali dove la correlazione tra nuclei dello stesso tipo (es.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) o di tipo diverso (es.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR) permette di avere dettagli sull'intera struttura macromolecolare e sulla connettività di polimeri anche complessi.

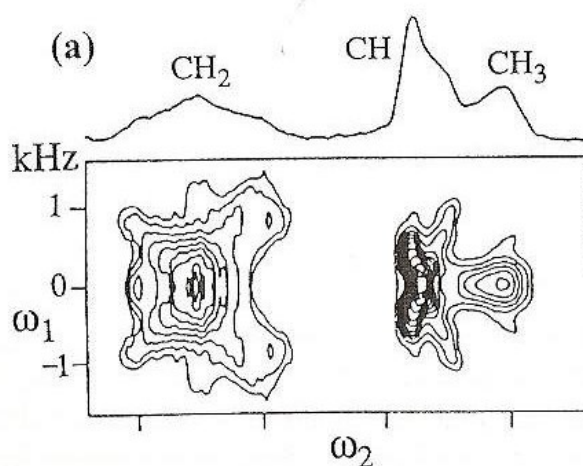
Accanto a questi studi, diventati quasi di routine nei laboratori chimici di industrie e università, si devono aggiungere le tecniche NMR di stato solido, in alta e bassa risoluzione. Se un polimero in soluzione, come qualsiasi altra sostanza in fase liquida, ha una elevata mobilità permettendo allo spettroscopista di osservare solo quantità mediate sui moti molecolari, un polimero in fase solida è soggetto a moti molto lenti nella scala temporale dell'esperimento NMR e quindi diventa importante l'orientazione relativa dei frammenti molecolari rispetto al campo magnetico  $B_0$ . Questo aspetto, strettamente legato alla natura tensoriale delle interazioni dei nuclei magnetici, rende gli spettri NMR a stato solido molto più complicati, ma allo stesso tempo ricchi di informazioni aggiuntive. Un metodo utilizzato per semplificare gli spettri a stato solido consiste nel ruotare il campione all'angolo magico (MAS, *magic angle spinning*),<sup>18</sup> ovvero a  $54.7^\circ$  rispetto al campo magnetico, a velocità di vari KHz. In questo modo si annullano i contributi anisotropi, ovvero che dipendono dall'orientazione, delle interazioni nucleari (come lo spostamento chimico e

l'accoppiamento dipolare). Un altro metodo che deve essere spesso affiancato al MAS per semplificare gli spettri (Figura 14) consiste nell'annullare l'effetto dell'accoppiamento dipolare dei nuclei osservati (ad esempio di carbonio 13) con i nuclei  $^1\text{H}$ , che si ottiene irradiando con una elevata potenza alla frequenza tipica dei nuclei  $^1\text{H}$ .



**Figura 14:** Dall'alto in basso: spettro  $^{13}\text{C}$  NMR a stato solido di un polimero senza MAS e senza disaccoppiamento; spettro  $^{13}\text{C}$  NMR a stato solido con disaccoppiamento, ma senza MAS; spettro  $^{13}\text{C}$  NMR a stato solido con disaccoppiamento e MAS.

Tuttavia la semplificazione degli spettri, anche se li rende più facilmente interpretabili, comporta la perdita di molte informazioni, sia sulla struttura che sulle proprietà dinamiche dei polimeri. Per aggirare questo problema sono stati sviluppati numerosi metodi,<sup>19</sup> per lo più bidimensionali, che permettono di "recuperare" nella seconda dimensione le informazioni perse. Tra questi ricordiamo il cosiddetto SLF, da *separated local field*, dove a essere recuperato è l'accoppiamento dipolare tra nuclei di tipo diverso, come il  $^{13}\text{C}$  e il  $^1\text{H}$ , o il  $^{15}\text{N}$  e il  $^1\text{H}$ . Conoscere l'accoppiamento dipolare di siti molecolari diversi, distinguibili proprio grazie a questa tecnica bidimensionale, permette di ricostruire la struttura conformazionale della macromolecola. Un esempio è mostrato in Figura 15:

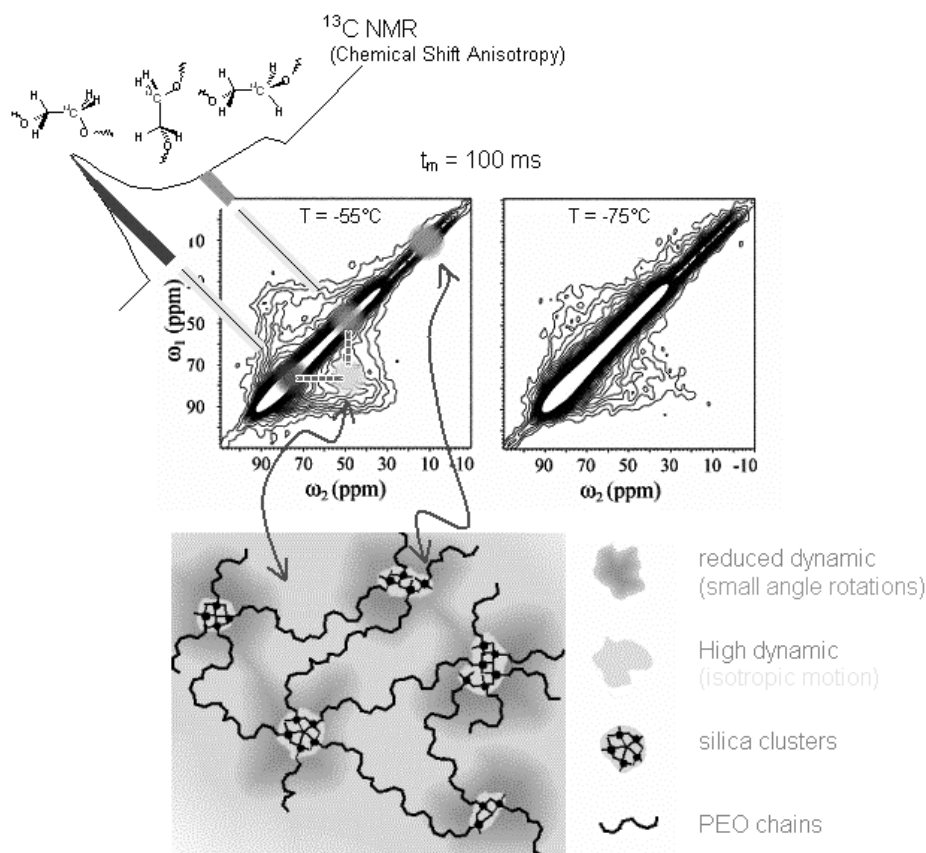


**Figura 15:** Esempio di applicazione dell'NMR a stato solido bidimensionale a un polimero molto comune, il polipropilene isotattico. Si tratta di un esperimento SLF (*separated local field*) in cui si mette in correlazione il chemical shift (asse  $\omega_2$ ) con l'accoppiamento dipolare (asse  $\omega_1$ ).

## Risonanza magnetica nucleare

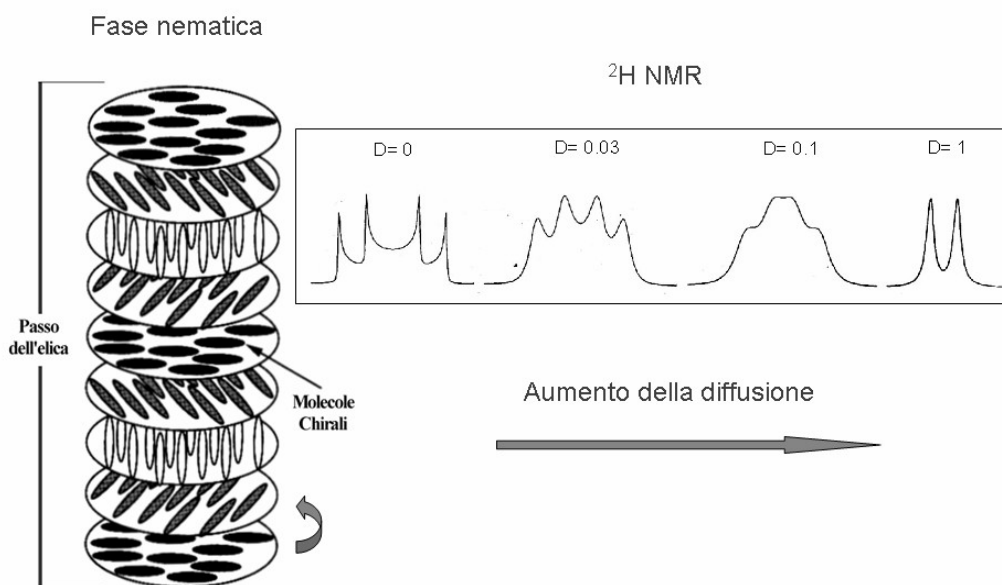
si tratta di uno spettro 2D del polipropilene isotattico ottenuto con la tecnica SLF. Sulle ascisse è riprodotto lo spettro monodimensionale del carbonio  $^{13}\text{C}$ , dove i tre segnali molto larghi corrispondono ai carboni  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  del polimero. Sull'asse delle ordinate si trova l'accoppiamento dipolare  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ . Ad ogni tipo di segnale  $^{13}\text{C}$ , nel caso specifico i tre segnali  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  del polimero, corrisponde nello spettro 2D una struttura molto caratteristica, chiamata *pattern*, la cui simulazione permette di ricavare angoli e lunghezze di legame, nonché l'orientazione degli assi principali del tensore di spostamento chimico,  $\sigma$ .<sup>20</sup>

Tra le proprietà che possono essere studiate con la spettroscopia NMR molto interessanti sono le proprietà dinamiche, legate alla mobilità dei polimeri e dei loro componenti, come le catene principali e le terminazioni laterali. Alcune tecniche NMR, come la *wideline separation* (WISE)<sup>21</sup> oppure la *2D exchange NMR*,<sup>22</sup> vengono in aiuto per districare il complicato problema della dinamica delle macromolecole. Un esempio di applicazione di quest'ultima tecnica è presentato in *Figura 16*. Anche in questa tecnica bidimensionale lo spettro ha una forma caratteristica, un *pattern* molto strutturato, dove le zone fuori diagonale indicano la presenza di uno scambio di magnetizzazione tra siti diversi della stessa molecola. Queste strutture fuori diagonale riflettono la presenza di un moto interno con caratteristiche geometriche ben precise, come ad esempio una rotazione di un legame attorno a un asse di simmetria formante con quest'ultimo un angolo  $\theta$ . L'esempio di *Figura 16* si riferisce allo scambio di magnetizzazione tra siti di carbonio  $^{13}\text{C}$  della stessa macromolecola, in questo caso un polimero, l'ossido di polietilene, indicato con l'acronimo PEO. Le diverse zone dello spettro *2D exchange NMR*, indicate con scale di grigio didderenti, attestano la presenza di zone a diversa mobilità. Nel caso specifico, essendo il materiale un sistema ibrido con una componente polimerica (PEO) e una inorganica (silice), le zone ad alta mobilità sono quelle della catena polimerica più lontane dalla silice, e i segnali corrispondenti sono fuori diagonali e molto intensi; viceversa le zone del polimero prossime ai *cluster* di silice sono più rigide e non hanno un corrispondente fuori diagonale nello spettro 2D. Individuare regioni di un campione con diversa mobilità, e quindi con una diversa dinamica, può essere molto importante per capire le proprietà macroscopiche di un materiale. Infatti, la resistenza di una plastica a stress meccanici, il comportamento in presenza di variazioni della temperatura di un polimero isolante, o la risposta ai campi elettrici in un materiale dielettrico o ferroelettrico, sono intimamente legati alla struttura e all'eterogeneità di un materiale a livello microscopico. L'NMR offre la possibilità in molti casi di andare a fondo nello studio dell'origine di queste proprietà.



**Figura 16:** Applicazione di una tecnica  $^{13}\text{C}$  NMR bidimensionale detta "di scambio" ad un materiale polimerico (PEO) mescolato con silice. Questa tecnica permette di individuare le regioni aventi una diversa mobilità in campioni eterogenei. (da: [patoo.hope.free.fr/english/polymers.php](http://patoo.hope.free.fr/english/polymers.php))

I polimeri fanno parte di una categoria di materiali molto ampia, quella della *Soft Matter*, o materia “soft”, di cui fanno parte tra l’altro i colloidali, i solidi amorfi e i cristalli liquidi. Questi ultimi hanno rappresentato, e continuano a essere, un fertile campo di indagine e di sviluppo della spettroscopia NMR. La ragione risiede nella loro natura di materiali parzialmente orientati e facilmente orientabili se sottoposti a campi esterni (magnetici ed elettrici) o a semplici forze di contatto. Qui gli spettri NMR sono dominati dalle componenti anisotrope dei tensori delle interazioni tra nuclei, ma il vantaggio, rispetto ai materiali solidi, consiste nel poter “osservare” una singola orientazione e non una distribuzione di tante orientazioni, come nel caso di una polvere di un materiale cristallino. Tra i nuclei più interessanti un posto di rilievo è certamente quello del deuterio,  $^2\text{H}$ , un isotopo dell’idrogeno, che ha spin  $I=1$  e possiede quindi un’interazione aggiuntiva, detta quadrupolare. È questa a dominare e a giustificare la forma degli spettri NMR al Deuterio, dalla cui analisi si possono ricavare molte informazioni: sulla geometria e conformazione molecolare media, sull’orientazione media delle molecole del campione e anche sulle proprietà dinamiche.<sup>23</sup> Un esempio di applicazione è mostrato in *Figura 17* e si riferisce a un cristallo liquido colesterico. Tra i cristalli liquidi più diffusi quelli colesterici sono forse anche quelli più studiati per le importanti applicazioni tecnologiche, che spaziano dai display a cristalli liquidi (LCD) ai laser, dai sensori termici ai cristalli fotonici.<sup>24</sup> Dallo studio della forma di riga di uno spettro NMR al Deuterio e dai cambiamenti della forma di riga in funzione della temperatura, ad esempio, si ricavano informazioni sulla diffusione delle molecole in una direzione particolare, quella che definisce la simmetria elicoidale delle fasi colesteriche e che è responsabile delle sue importanti applicazioni tecnologiche.



**Figura 17:** Esempio di applicazione della spettroscopia  $^2\text{H}$  NMR allo studio dei cristalli liquidi. Caso di una fase colesterica e dell’effetto della diffusione delle molecole nella direzione del passo dell’elica.

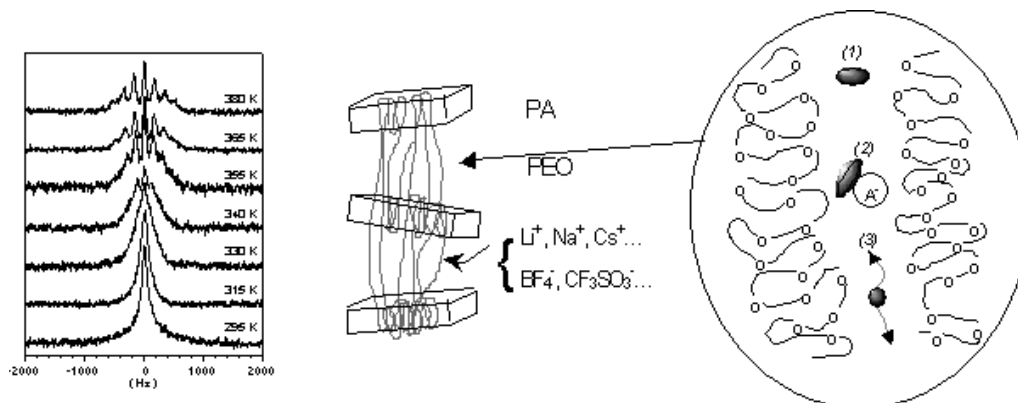
### I materiali solidi

La spettroscopia NMR applicata allo stato solido viene comunemente impiegata per studiare le proprietà fisiche e chimiche di nuovi materiali di grande importanza tecnologica. Tra questi ricordiamo i vetri, le ceramiche, i materiali superconduttori, ferromagnetici e i nuovi materiali dalle proprietà ottiche innovative. Per studiare i materiali nel loro stato solido, come abbiamo già visto nei precedenti paragrafi, è stata sviluppata una intera branca della spettroscopia NMR, detta appunto NMR di stato solido, che si avvale di una strumentazione specifica e di tecniche *ad hoc* per lo stato solido.<sup>25</sup> Tra le informazioni e proprietà che possono essere studiate con queste tecniche ricordiamo: geometria e caratteristiche della struttura dei materiali, presenza di eterogeneità nella composizione dei materiali, studio del polimorfismo dei materiali cristallini. E ancora: mobilità intra e intermolecolare, individuazione di forme tautomeriche (particolarmente importanti nei farmaci) e presenza di inclusione di altri componenti, oltre a quello principale, in materiali ibridi e compositi.<sup>26</sup>

Soprattutto negli anni recenti, con il progresso nel campo della sintesi chimica di nuovi materiali compositi, l’NMR a stato solido ha dato il suo contributo. Spesso la chimica dei materiali è guidata dalla necessità di aumentare le prestazioni dei materiali, ad esempio la resistenza alle temperature estreme o alle sollecitazioni meccaniche nel caso di materiali da costruzione. Tuttavia, non sempre gli avanzamenti nella sintesi chimica vanno di pari passo con la conoscenza

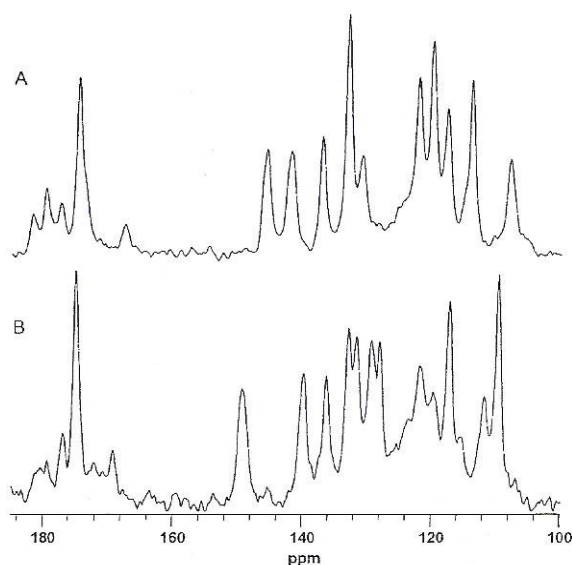
## Risonanza magnetica nucleare

approfondita delle proprietà chimico-fisiche dei materiali di nuova “progettazione”. L’NMR offre la possibilità di legare le nuove proprietà macroscopiche ai cambiamenti a livello molecolare, come la struttura, la composizione e la dinamica molecolare. In *Figura 18* una serie di spettri NMR al Cesio,  $^{133}\text{Cs}$ , sono stati registrati su un materiale composito con componente inorganica di  $\text{CsClO}_4$  e componente organica costituita da strati di ossido di polietilene (PEO) e di poliacrilato (PA).<sup>27</sup> Dall’analisi degli splitting quadrupolari del Cesio 133 (nucleo quadrupolare) si riesce a individuare la posizione degli ioni  $\text{Cs}^+$  all’interno della struttura polimerica. In particolare, si trova che gli ioni Cesio sono in parte liberi di diffondere tra gli strati, in parte sottoforma di ioni complessi, in parte legati da interazioni elettrostatiche ai singoli strati. Le proprietà complessive del materiale derivano evidentemente dalla disposizione e dalla mobilità degli ioni Cesio all’interno della struttura lamellare del polimero.



**Figura 18:** Serie di spettri  $^{133}\text{Cs}$  NMR del  $\text{CsClO}_4$  disciolto in un materiale polimerico composto da PEO e PA. Dall’analisi degli spettri NMR si individuano gli ioni Cesio  $\text{Cs}^+$  posizionati in un intorno chimico diverso: ioni complessi (1), ioni appaiati (2), ioni liberi di diffondere tra gli strati polimerici (3).

Tra i materiali solidi di grande importanza ricordiamo i farmaci, che possono trovarsi sotto forma di polveri cristalline pure, di materiali solvatati, ovvero contenenti oltre al componente principale anche molecole di solvente che possono migliorare la solubilità dei farmaci stessi, o infine di solidi adsorbiti in matrici polimeriche che, anche in questo caso, possono influenzare le proprietà di trasporto e di solubilità del farmaco stesso. L’importanza della purezza cristallina dei farmaci è spesso cruciale per la loro efficacia e se, come spesso accade, un composto chimico può avere più forme cristalline, sarà fondamentale distinguerle. Il polimorfismo infatti influisce sulla stabilità, solubilità e anche tossicità dei farmaci e l’NMR è in grado di distinguere molto bene tra forme cristalline diverse.<sup>28</sup> Gli spettri di *Figura 19* si riferiscono a due forme polimorfe dell’acido flufenamico, il principio attivo di un analgesico. La tecnica detta CP-MAS, ovvero *cross polarization* combinata al *magic angle spinning*, permette di registrare assai velocemente gli spettri NMR al Carbonio 13 del solido dell’acido flufenamico, distinguendo tra la forma III (*Figura 19 a*) e la forma I (*Figura 19 b*).



**Figura 19:** Due spettri NMR al Carbonio-13 ottenuti con la tecnica CP-MAS sulle due forme polimorfe dell’acido flufenamico. A: forma III. B: forma I. (dal riferimento n. 27)



La combinazione di tecniche NMR che fanno capo al cosiddetto “spectral editing” (CPPI, WIMSE, SS-APT e TPPM sono solo alcune delle sequenze NMR più usate a questo scopo) è utile all’assegnazione dei vari segnali  $^{13}\text{C}$  nelle due forme I e III così da risalire alla diversa struttura cristallina dei due solidi polimorfi.

### Analisi dei cibi

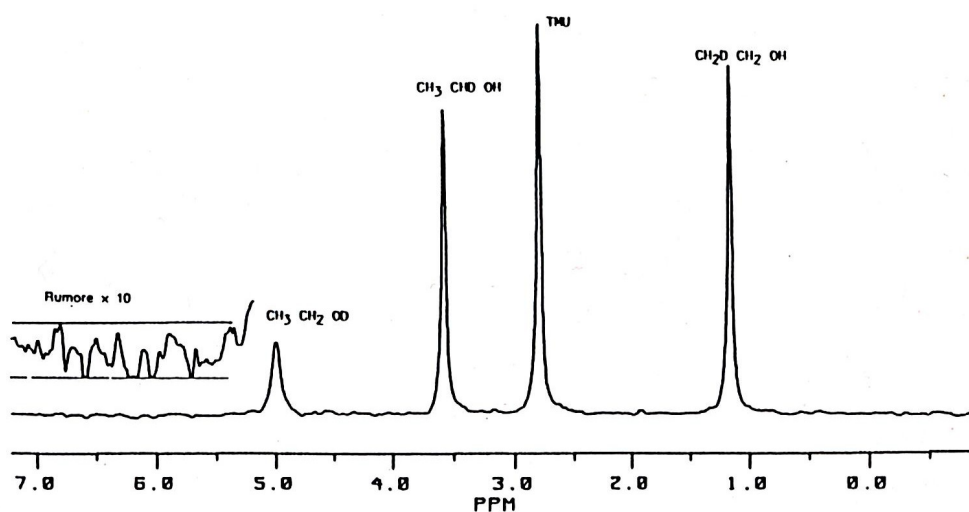
La varietà di sostanze, strutture e materiali presenti nei cibi è enorme. I cibi in fase liquida si presentano strutturalmente omogenei ma possono contenere migliaia di sostanze chimiche con una estrema varietà nelle concentrazioni; i cibi solidi possono avere un alto livello di complessità strutturale combinando quindi la possibile eterogeneità con un’elevata complessità. Non sorprende quindi che una grande varietà di tecniche sia stata applicata per risolvere vari tipologie di problemi analitici e strutturali, per affrontare in vario modo l’inerente scarsa sensibilità dell’NMR e di sfruttarne al massimo la capacità di speciazione. La sfida che i cibi rappresentano per la spettroscopia NMR è stata affrontata quindi con tecniche sia mono che bidimensionali che con tecniche a stato solido, sia a bassa che ad alta risoluzione (CP-MAS), sia con metodi di *magnetic resonance imaging* di cui parleremo ampiamente nell’ultima parte dell’articolo.

Le tematiche affrontate vanno dalla autenticità e quantificazione, alla “*sensory science*” per l’individuazione degli aromi e dei sapori, alla struttura e funzionalità degli ingredienti alle applicazioni di stato solido per la determinazione del grado di idratazione e del contenuto di grassi, allo studio e speciazione dei metaboliti, alla localizzazione spaziale e alla diffusione dei diversi componenti.

La letteratura prodotta è estremamente vasta e molti sono i lavori di *review* sull’argomento.<sup>29,30</sup>

Spesso i lavori in questo campo si basano sulla sempre più elevata sensibilità degli strumenti ad alto campo per la rivelazione di piccole quantità di sostanze o metaboliti in miscele complesse (vini, birra latte). Nel caso di prodotti solidi (farine, paste, lieviti, frutta, semi) si sfruttano le sempre più sofisticate potenzialità degli strumenti ad alta risoluzione a stato solido.

La spettroscopia NMR di nuclei diversi dal protone si è rivelata spesso fonte preziosa di informazione per individuare le sofisticazioni o l’aggiunta di prodotti non naturali. La tecnica a cui è stato dato il nome di SNIF-NMR, per esempio, fa uso delle deviazioni dalla distribuzione statistica dei nuclei di deuterio nei differenti siti delle molecole per individuare la sorgente biologica o la provenienza geografica dei composti naturali presenti nelle bevande (vini, birra, succhi di frutta, caffè...). L’abbondanza del deuterio nei composti organici viene eseguita normalmente con la spettroscopia di Massa: l’analisi comporta la combustione seguita dalla riduzione dell’acqua per produrre l’idrogeno gassoso il cui contenuto isotopico viene poi determinato. Questo metodo basato sulla spettroscopia di massa serve tuttavia per il contenuto totale di  $^2\text{H}$ , ma non per la sua distribuzione nei siti molecolari. La procedura SNIF-NMR si basa su un’analisi automatizzata degli spettri  $^2\text{H}$  NMR di alcune molecole (es. l’alcool) a seguito dei processi di distillazione o fermentazione e offre un potente mezzo per l’autenticazione e la caratterizzazione di cibi e bevande (si veda ad esempio *Figura 20*). Per gli oli d’oliva è la spettroscopia NMR al  $^2\text{H}$  che rivela impurezze o sostanze derivanti da sofisticazioni per aggiunta di oli di altra origine. La procedura SNIF-NMR può essere inoltre applicata anche al  $^{13}\text{C}$ , anche se determinazioni quantitative del  $^{13}\text{C}$  sono sperimentalmente più difficili a causa dell’effetto Overhauser (NOE) e della possibilità accresciuta di arricchimento in due siti a causa della maggior abbondanza naturale del  $^{13}\text{C}$ .<sup>31</sup>



**Figura 20:** Esempio di spettro al  $^2\text{H}$  NMR dell’alcool etilico, registrato secondo la procedura SNIF-NMR per individuare dall’intensità relativa dei segnali l’origine di un prodotto alimentare (in questo caso il vino).



## Risonanza magnetica nucleare

La rilassometria NMR a bassa risoluzione è impiegata così universalmente che è riconosciuta come un “*International Standard Method*”. Lavorando semplicemente sul FID (ovvero sul dominio temporale, senza applicare la trasformata di Fourier), in particolare dal suo decadere temporale, è possibile determinare l’acqua libera, o legata, e il contenuto di grassi di cibi, semi e altri prodotti. Per citare una semplice applicazione a titolo di esempio il metodo viene impiegato per stimare il contenuto di olio nelle olive non seccate.

I metodi di *imaging* (localizzazione spaziale e mobilità del protone) sono applicati a varie matrici solide complesse che vanno dal pane e prodotti da forno alla carne ai formaggi e prodotti caseari. Le immagini, che possono essere pesate dai rilassamenti, danno una visione delle omogeneità o disomogeneità del prodotto intero che servono, per esempio nel caso dei formaggi, a studiarne la maturazione nel tempo.

### Applicazioni cliniche e biochimiche

La spettroscopia NMR ha trovato molte applicazioni per la determinazione e la localizzazione di metaboliti *in vivo* e *in vitro* ed è per questo che può essere usata anche per la diagnosi di molte malattie. Molte sono le applicazioni allo studio di tessuti, di sistemi cellulari, sia nel mondo vegetale e animale che nell’uomo.

Una delle caratteristiche più importanti dell’NMR è infatti l’elevata selettività. Prendiamo per esempio le cellule di *Saccharomyces Cerevisiae*, tenuto vitale in un adatto mezzo di per fusione e poniamoci una domanda: perché in questo sistema cellulare noi possiamo osservare mediante NMR i segnali dei metaboliti derivanti dagli zuccheri fosforilati (Fosfocreatina, ATP ed ADP inclusi) e non il segnale dei nuclei di  $^{31}\text{P}$  delle membrane cellulari? Questo si spiega con la differente mobilità delle molecole del metabolita e delle membrane. L’alta mobilità dei metaboliti infatti ne strettisce le righe di risonanza, le rende sottili e ben visibili nel larghissimo, e per questo appiattito, spettro, quasi con caratteristiche a stato solido, delle membrane cellulari, che al contrario hanno una scarsa mobilità.

Per studi analoghi a questo, che vanno sotto il nome di Metabolomica, l’NMR usa una varietà di nuclei: i più importanti, oltre  $^1\text{H}$ , sono il  $^{31}\text{P}$ , che funziona da nucleo sonda per i metaboliti fosforilati, il  $^{13}\text{C}$  e in qualche misura il  $^{23}\text{Na}$ .

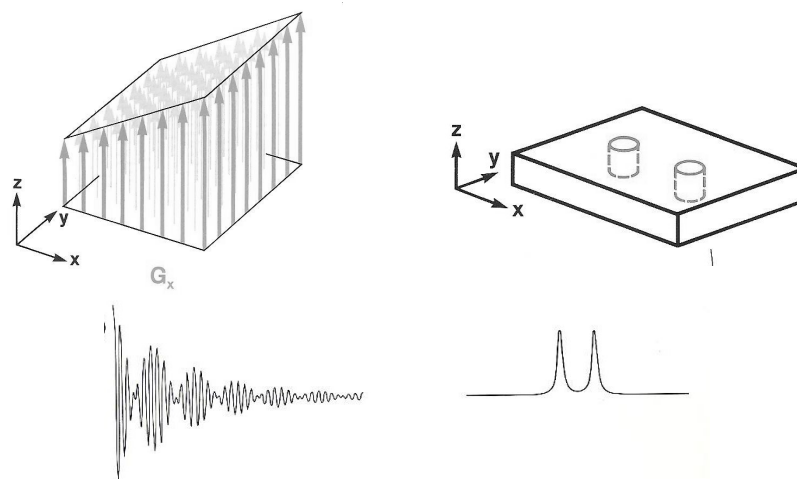
Volendo osservare il carbonio, comunemente si arricchisce un sito molecolare specifico (es: uno zucchero, un metabolita) e se ne seguono i flussi metabolici, come nel caso del complesso cammino nella Glicolisi, sia aerobica che anaerobica, oppure nel cammino inverso della Glucogenesi. Nel cervello umano e di ratto, con misure dei flussi del Glucosio marcato con il  $^{13}\text{C}$  si seguono simultaneamente il Glutammato e la Glutamina, si determina la velocità di ossidazione del Glucosio e il riciclo del neurotrasmettitore glutammato rivelando una stechiometria 1:1 dei due flussi.

Lo studio dei flussi metabolici e dei metaboliti intermedi, misurati da un metodo non invasivo quale la spettroscopia NMR, permettono così di mettere in connessione la Biochimica con la Fisiologia Sistemica. Particolarmente importante per usi clinici è l’applicazione della Metabolomica NMR allo studio dei fluidi fisiologici quali: sangue, siero sanguigno, urine, fluido spermatico. Per le urine, ad esempio, gli spettri protonici ad alto campo possono dare informazioni su l’identità di un veleno che risulta negli spettri in un *pattern* anormale dei metaboliti endogeni. Naturalmente gli spettri ad alto campo (600 MHz e oltre) appaiono con dettagli molto complessi e non è un facile esercizio da questi spettri seguire un metabolita di interesse (per esempio un metabolita *marker* di una malattia). Analisi statistiche comparate sono assolutamente necessarie per l’analisi dei dati NMR.

### L’uso dell’NMR come un microscopio

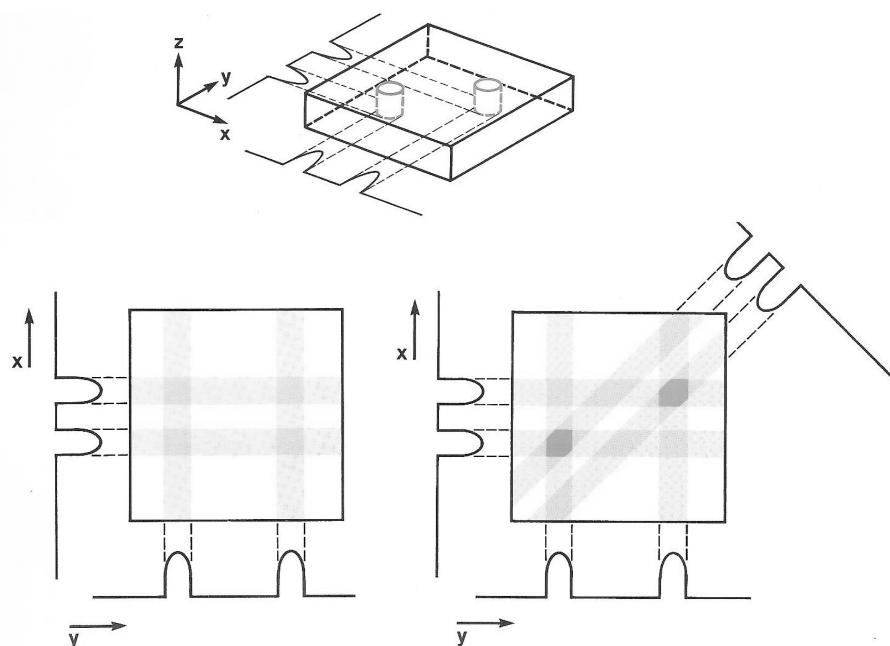
In molte delle applicazioni la risonanza NMR è una tecnica potente per studiare la composizione, la struttura e la dinamica delle molecole a uso dei chimici, dei fisici e dei biologi. Per questo scopo è bene avere una omogeneità del campo magnetico più alta possibile per guadagnare segnale e risoluzione producendo righe più strette. A questo proposito sono state inventate le bobine di “shim” cioè quelle bobine che apportando correzioni al campo, originato da un elettromagnete o un superconduttore, cercano di minimizzare i gradienti e massimizzare l’omogeneità. Per lo stesso scopo molti campioni nelle tecniche ad alta risoluzione vengono ruotati velocemente attorno all’asse del tubicino che li contiene (“spinning”).

Mentre quindi la quasi totalità dei ricercatori concentrava i suoi sforzi all’ottenimento della migliore omogeneità annullando i gradienti di campo, alcuni pionieri, fra cui Mansfield e Lauterbur hanno avuto il coraggio di guardare dalla parte opposta: cosa sarebbe successo introducendo opportuni gradienti? Si può vedere dalla *Figura 21* cosa si ottiene sovrapponendo al campo  $B_0$  un gradiente lineare, per esempio lungo  $x$ , ed eseguendo una misura impulsata con un campione di acqua contenuta in 2 compartimenti identici ma separati lungo  $x$ . La trasformata di Fourier del segnale rivela 2 picchi identici separati in frequenza da un incremento  $\Delta\omega_0$ . La separazione deriva dal fatto che la frequenza di Larmor è proporzionale all’intensità del campo magnetico e quindi, se il primo dei due campioni sente un campo  $B_0$ , e risuonerà quindi a  $\omega_0$ , il secondo sentirà il campo  $B_0 + \Delta B_0$ , risuonando a  $\omega_0 + \Delta\omega_0$ . La separazione in frequenza dipende quindi linearmente dal campo che a sua volta è funzione lineare della distanza: la connessione segnale – distanza è fatta.



**Figura 21:** Applicazione di un gradiente di campo lungo la direzione  $x$  ( $G_x$ ). Osservazione dello spettro registrato nel caso di due campioni di acqua posti lungo la direzione  $x$  ad una certa distanza: la trasformata del FID (in basso a sinistra) consiste in due picchi separati in frequenza da  $\Delta\omega_0$  (in basso a destra).

Si tratta ora di estendere il risultato in tre dimensioni il che è possibile con gradienti in opportune direzioni. Per ottenere questo si può prima applicare un gradiente  $G_x$ , raccogliere e trasformare i segnali risultanti e poi ripetere il processo imponendo un gradiente  $G_y$ , come è mostrato nella *Figura 22*. Si può vedere tuttavia che la retro-proiezione di questi profili è ambigua. Almeno un'ulteriore proiezione, usando un ulteriore gradiente, è necessaria per individuare univocamente la posizione del campione. Questo metodo di ricostruzione dell'immagine per retroproiezione è analogo al procedimento per la tomografia a raggi X: la costruzione di un'immagine consistente in  $N \times N$  pixel richiede almeno  $N$  viste indipendenti ciascuna definita da  $N$  punti. Abbiamo descritto così la localizzazione spaziale in un piano: la densità dei campioni di acqua rimane costante lungo  $z$ . In campioni reali, quale un piccolo animale, un frutto, una foglia, l'uomo, un solido poroso imbevuto di liquido, la densità protonica legata all'acqua, o a un solvente, cambia nelle tre direzioni. Lo scopo di selezionare una "fetta" del campione si può raggiungere rendendo la frequenza di eccitazione selettiva nello spazio. Questo si può ottenere imponendo al campione un gradiente  $G_z$  e operando un'eccitazione selettiva nel dominio della frequenza: la larghezza di banda dell'impulso di eccitazione si può restringere allungando il tempo dell'impulso. Se l'eccitazione selettiva si attiva assieme al gradiente si confina l'eccitazione ai nuclei di una fetta mentre non si hanno segnali da aree vicine.



**Figura 22:** L'applicazione di due gradienti,  $G_x$  e  $G_y$ , lungo  $x$  e  $y$  rispettivamente, permette di localizzare zone diverse del piano  $xy$ , come due campioni di acqua (figura in alto). Tuttavia per distinguere correttamente le coordinate relative alle due zone occorre una terza misura indipendente, come mostrato in basso a destra.

## Risonanza magnetica nucleare

### La tomografia magnetica (MRI)

E' su questo principio che si basa la tomografia magnetica, o *imaging* di risonanza magnetica, abbreviata con MRI (*magnetic resonance imaging*), usata come tecnica di diagnosi clinica in moltissime strutture ospedaliere. Nel 2003 è stato stimato che le unità MRI presenti nel mondo sono circa 10000 e che si effettuano in un anno circa 75 milioni di esami diagnostici.<sup>32</sup>

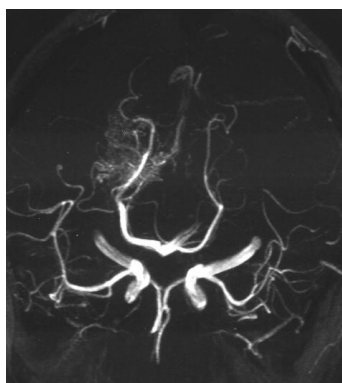
L'MRI permette la ricostruzione di immagini, bi e tridimensionali, di organi e di intere parti del corpo (*Figura 23*) sfruttando i principi del campo disperso, descritti brevemente nel paragrafo precedente. Per distinguere tra tessuti diversi, o individuare un tessuto malato rispetto a uno sano, si sfrutta la sensibilità dei tempi di rilassamento dei protoni ( $^1\text{H}$ ) delle molecole d'acqua al tipo di tessuto nel quale si trovano. Per aumentare la discriminazione tra i tessuti si fa anche uso di mezzi di contrasto, che sono sostanze con proprietà paramagnetiche che formano dei complessi con le molecole d'acqua di certi tessuti e non di altri. I tempi di rilassamento vengono fortemente influenzati aumentando la risoluzione e il contrasto tra i diversi tessuti.



**Figura 23:** Immagine di una colonna vertebrale ottenuta mediante MRI.

Tra le applicazioni più interessanti dell'MRI ricordiamo il cosiddetto MRI funzionale, una tecnica introdotta per evidenziare le diverse aree del cervello deputate a funzioni diverse. Quando una zona del cervello viene attivata, ad esempio quella deputata al linguaggio o alla coordinazione motoria, si assiste a una variazione del flusso sanguigno, perché questa zona richiede una quantità maggiore di ossigeno. La diminuzione di deossiemoglobina fa aumentare il tempo di rilassamento ( $T_2^*$ ) di questa area del cervello, aumentando l'intensità del segnale. Questa tecnica è sensibile alle variazioni del flusso sanguigno nelle varie aree del cervello, variazione che può essere anche associata ad anomalie cerebrali, motivo per cui la tecnica di MRI viene usata per la diagnosi di tumori e altre malattie.

Un'altra applicazione è l'angiografia (*Figura 24*). Con l'MRI si possono ricostruire le immagini dell'apparato circolatorio in tempo reale, individuando eventuali anomalie, ingrossamenti di arterie e presenza di placche. Anche in questo caso si fruttava la variazione di flusso sanguigno nello spazio e nel tempo.



**Figura 24:** Immagine in alta risoluzione di MRI funzionale di una angiografia.

### Uno sguardo sul futuro

In un lavoro<sup>9</sup> di “review” del 1980, Gutowski e Jonas definivano la spettroscopia NMR un “evergreen”, cioè un sempreverde. Così appare ancora oggi: non sembra infatti che sia stato raggiunto un limite né nel progresso strumentale né in quello teorico né tanto meno nel campo delle applicazioni. Per citare solo alcuni recenti progressi ricordiamo che i campi magnetici operativi per l’NMR si stanno spingendo molto in alto, permettendo ormai di raggiungere il GHz per la frequenza di risonanza del protone. L’uso di sonde, tecnicamente chiamate “probes”, stabili alle basse temperature in cui il gas elio è allo stato liquido, permettono di raggiungere sensibilità (e quindi un rapporto segnale/rumore) prima impensabili. L’uso di gas nobili iperpolarizzati o del paraidrogeno consentono anch’essi alte sensibilità.

Anche nel campo dell’*imaging* di risonanza magnetica (MRI) sono stati raggiunti campi magnetici molto alti per questa tecnica, superando ormai i 7 Tesla negli apparati usati per le ricerche mediche necessarie per comprendere il funzionamento del cervello (*functional imaging, fMRI*). E mentre la spettroscopia NMR a stato solido fa progressi enormi nello studio di materiali e biopolimeri, le applicazioni dell’NMR a stato liquido in chimica, biologia e agraria non si contano.

A questo vanno aggiunti i recenti risultati nell’uso dell’NMR nella “*quantum computer science*” che si prevede rivoluzionerà la velocità di calcolo dei moderni sistemi informatici.

### Riferimenti Bibliografici

- [1] J.A. Pople, W.G. Schneider, H. J. Bernstein, *High-resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill, New York 1959.
- [2] J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe, *High-resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Pergamon Press, Oxford 1965.
- [3] A. Carrington, A. D. McLachlan, *Introduction to magnetic resonance with applications to chemistry and chemical physics*, Harper and Row, New York 1967.
- [4] C. P. Slichter, *Principle of Magnetic Resonance*, Harper and Row, New York 1963.
- [5] R. M. Lynden Bell, R. K. Harris, *Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano 1972.
- [6] A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford Press, Clarendon, London 1961.
- [7] I. P. Gerotheranassis, A. Troganis, V. Exarchou, K. Barbarossou, *Chem. Educ. Res. Pract. Eur.* 2002, 3, 229.
- [8] R. A. Hoffman, S. Forsen, *Prog. Nucl. Magn. Res. Spect.* 1966, 1, 15.
- [9] J. Jonas, H. S. Gutowsky, “*NMR in Chemistry--An Evergreen*”, in Annual Review of Physical Chemistry, 1980, 31, 1.
- [10] R. K. Harris, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A physicochemical view*. Massachusetts, Pitman Publishing 1983.
- [11] P. J. Hore, *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press, New York 1995.
- [12] H. Gunther, *NMR Spectroscopy – Basic Principles, concepts and applications in chemistry*. Wiley, Chistester 1995.
- [13] I. P. Gerotheranassis, C. G. Kalodimos, *J. Chem. Edu.* 1996, 73, 801.
- [14] “*NMR in the post-genomic era: from molecular structure to biological function*”, report per la Training and Mobility of Researchers (TMR) “NMR in Concert”, gennaio 2000.
- [15] [http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/wuthrich\\_group/wu\\_people/wkurt/res\\_highs](http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/wuthrich_group/wu_people/wkurt/res_highs)
- [16] K. Wuthrich, “*NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*”, North-Holland, Amsterdam, 1976.
- [17] F. M. Marassi, A. Ramamoorthy, S. J. Opella, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94, 8551.
- [18] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature*, 1958, 182, 1659.
- [19] K. Schmidt-Rohr, H. W. Spiess, “*Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*”, Academy Press, San Diego 1994.
- [20] T. Nakai, J. Ashida, T. Terao, *Magn. Reson. Chem.*, 1989, 27, 666.
- [21] K. Schmidt-Rohr, J. Clauss, H. W. Spiess, *Macromol.*, 1992, 25, 3273.
- [22] C. Schmidt, S. Wefing, B. Blumich, H. W. Spiess, *Chem. Phys. Lett.*, 1986, 130, 84.
- [23] “*Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals*”, J. W. Emsley editore, Reidel, Dordrecht 1985.
- [24] P. Palfy-Muhoray, *Physics Today*, September 2007.
- [25] “*NMR basic principles and progress in solid state NMR*”, B. Blumich ed., Berlino, Springer: 1994.
- [26] <http://www.dur.ac.uk/solid.service/nmr.htm>
- [27] [pato.hope.free.fr/english/polymers.php](http://pato.hope.free.fr/english/polymers.php)
- [28] P. A. Tishmack, D. E. Bugay, S. T. Byrn, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 92, 577.
- [29] “*Applications of NMR to Food Science*”, P.S. Belton, I. J. Colquhoun, B.P. Hills, in “*Annual Reports on NMR*”, ed. G.A. Webb, 1993, 25, 1.
- [30] “*Magnetic Resonance in Food Science: From Molecules to Man*”, I. Farhat, P. Webb, G. Belton, Editors, Royal Society of Chemistry, London: 2007.
- [31] “*Analytical methods for Food Authentication*”, Eds. P. R. Ashurst, M. J. Tennis, London, Springer: 1998.
- [32] <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri.htm>