

1. Buongiorno, io vi parlerò delle applicazioni della HR-MAS-NMR relativamente alle matrici alimentari, alle matrici biologiche ed ai preparati farmaceutici. Sono tre argomenti molto vasti per cui io vi riporterò solo alcuni esempi fra i tanti che si potrebbero riportare.

2. Come primo punto vi ricordo che la capacità dello spettro NMR di fornire informazioni dipende in primo luogo dall'isotopo osservato, per cui, generalmente, siamo molto più interessati ad osservare gli spettri di protone, carbonio, azoto e fosforo, rispetto a spettri di altri isotopi. Lo spettro del protone, in particolare, è quello maggiormente osservato perché è quello avente maggiore sensibilità quantitativa e quindi è quello che permette di osservare un numero maggiore di componenti.

Vi ricordo anche che la capacità dello spettro NMR di fornire informazioni dipende fortemente dallo stato fisico del campione essendo che più la mobilità molecolare è ridotta, più le informazioni quali chemical shift e costante di accoppiamento scalare, risultano mascherate dalla larghezza dei segnali. Questo aspetto, però, è parzialmente o totalmente aggirabile, utilizzando la tecnica dell'angolo magico.

3. Iniziamo, quindi, a considerare le matrici alimentari.

4. L'utilizzo della HR-MAS nasce dai successi della NMR su matrici alimentari liquide quali: oli, vino, birra e succhi di frutta. Per essi sono state utilizzate diverse tecniche NMR che hanno consentito, in un numero significativo di casi, di determinare la specie biologica, la genuinità, l'identificazione del luogo di origine

☞ Il tipo di analisi che si esegue a tali scopi sono: il profilo metabolico, il quale richiede l'esecuzione di spettri 1D o della proiezione in F1 di spettri 2D-Jres. Questa analisi richiede poi il trattamento statistico dei risultati.

☞ Un'altro approccio è quello della ricerca di markers, che richiede l'esecuzione di spettri 1D e 2D e, talvolta, anche ☞ in questi casi è necessario un'analisi statistica dei risultati.

5. Per quanto riguarda l'analisi statistica vi rimando a queste review che sono molto interessanti.

6. L'analisi attraverso il profilo metabolico ha luogo attraverso una integrazione dello spettro

☞ suddiviso a zone.

7. La suddivisione può essere fatta rispettando i segnali, oppure indipendentemente dai segnali per cui un segnale può essere spezzato in due ed appartenere a due zone diverse di integrazione. Di solito la prima è la più efficace, se fatta correttamente, ma è più soggetta ad errore dovuto alla variabilità dei segnali che possono essere presenti nello spettro. Ciò perché di norma viene fatta in modo automatico da opportuni software i quali non sempre riescono ad capire dove sono i segnali.

8. L'analisi statistica delle aree delle singole fettine in cui lo spettro è stato suddiviso porta ad ottenere dei grafici come quello qui mostrato in cui sono identificabili aree distinte per ogni tipo di campione analizzato. Non di rado, però, vi sono campioni che stanno in zone di confine fra aree attigue (si vedano i punti cerchiati in rosso) per cui è un tipo di analisi che, in alcuni casi, non riesce a dare un risultato certo.

Il trattamento statistico va ottimizzato attraverso l'analisi di un numero statisticamente significativo di campioni noti per cui v'è un lavoro preliminare da svolgere alquanto impegnativo. Una volta trovate le condizioni ottimali di calcolo, il metodo può essere applicato a campioni incogniti.

9. L'analisi che fa uso della ricerca di markers è di norma più affidabile perchè il marker è un indicatore specifico di una data caratteristica.

10. Quindi ci si è domandato se era possibile utilizzare la NMR anche per le matrici alimentari solide o quasi-solide.

☞ La risposta è sì,

☞ e le matrici fino ad oggi studiate sono molte ed interessano praticamente tutti i tipi di alimenti.

11. Lo scopo dell'analisi, l'approccio all'analisi ed il tipo di spettri che si eseguono sono gli stessi degli alimenti liquidi.

12. In questa diapositiva sono riportati alcune pubblicazioni, fra quelle più recenti, relativamente ad alcuni alimenti: pomodoro, meloni, pepe, l'aglio, il radicchio rosso, il caffè (in polvere) il salmone, la carne, le patate.

13. ed in quest'altra diapositiva sono riportati alcune pubblicazioni, fra quelle più recenti, relativamente ai formaggi ed alle piante medicinali.

☞ Occorre, in questa lista, aggiungere i succhi di frutta che possono contenere molta polpa e quindi non essere adatti per la spettroscopia in liquido.

14. vediamo ora un po' di spettri di alcuni alimenti: fave, mele, kiwi, farine, carni e parmigiano-reggiano.


15. In questa prima diapositiva è mostrato lo spettro  $^1\text{H}$ , acquisito a 600 MHz di un liofilizzato di fave, ripreso con  $\text{D}_2\text{O}$ . La sequenza utilizzata è stata la NOESYPR1D. E' possibile distinguere due nette zone di segnali attribuibili agli zuccheri e polisaccaridi ed ai lipidi che sono i costituenti maggioritari fra i composti a basso peso molecolare. La componente proteica, fibre e le cellulose danno origine a segnali larghi che contribuiscono alla distorsione della linea di base e che vengono eliminati dalla sequenza utilizzata.



16. Qui sono mostrati i relativi spettri bidimensionali COSY e TOCSY. Nel COSY i cross peak correlano fra loro segnali di protoni accoppiati scalarmente tra loro e distanti fra loro per 2 e 3 legami chimici, quindi protoni geminali e vicinali. Nello spettro TOCSY i cross peak correlano fra loro segnali di protoni accoppiati scalarmente tra loro, indipendentemente dal numero di legami che li separa, a parte i punti di interruzione della propagazione dell'accoppiamento scalare, quali i carboni quaternari ed i ponti ad ossigeno, ecc... Lo spettro TOCSY mostra ovviamente un numero maggiore di cross peaks dai quali ....

17 ... è agevole riconoscere diversi sistemi di spin: uno è quello degli acidi grassi, un'altro è quello relativo agli acidi insaturi coniugati, ed altri sono quelli relativi ai saccaridi e polisaccaridi.

18. Qui è mostrato lo spettro di eterocorrelazione protone-carbonio nel quale ogni cross peak è all'incrocio fra il chemical shift del protone e quello del carbonio- $^{13}\text{C}$ .

19. Lo spettro di eterocorrelazione HSQC protone-carbonio conferma i dati osservati nel precedente spettro TOCSY.

20. In particolare, diversi sono i saccaridi i cui chemical shift del  $^1\text{H}$  e del  $^{13}\text{C}$  son in accordo con le correlazioni osservate in questo spettro. In figura ne sono mostrati alcuni. . La terza correlazione è probabilmente dovuta al C1 in polisaccaridi.

21. In questa diapositiva sono mostrati gli spettri di campioni di fave provenienti da zone agricole differenti. E' possibile osservare differenze fra il rapporto saccaridi / lipidi con i  lipidi che variano notevolmente da campione a campione ma anche la composizione  degli zuccheri è diversa da campione a campione

22. In questa diapositiva è mostrato lo spettro di una farina, acquisito con tre diverse sequenze d'impulsi. In basso è lo spettro acquisito con la sequenza standard. Esso è dominato dai segnali larghi della cellulosa e dal segnale dell'acqua. Al centro è riportato lo spettro acquisito con la sequenza CPMG (cioè una spin-echo ripetuta diverse volte). La sequenza viene utilizzata ottimizzando il tempo tau in modo che la componente del FID relativa ai segnali più larghi, cioè quella che decade a zero più velocemente, venga eliminata prima di acquisire il segnale che, a questo punto, è dato solo dalle componenti del FID che rilassano più lentamente e quindi dai componenti a basso peso molecolare. Questo è il tipico filtro di T2. In alto è mostrato lo spettro NOESYPR1D che produce un risultato analogo a quello CPMG.

23. In questa diapositiva, invece, è mostrato lo spettro di farine acquisiti a 400 e 600 MHz. A parte le differenze dovute al fatto che si tratta di due farine diverse, gli spettri sono sostanzialmente uguali in termini di qualità ed in particolare di risoluzione. Questo accade perché comunque la risoluzione che si ottiene non è quella dei campioni in liquido e quindi le differenze di campo magnetico sono meno evidenti.

24. ...come si può osservare espandendo lo spettro nella zona dei protoni anomerici dei saccaridi.

25. qui è mostrato lo spettro TOCSY della farina che presenta caratteristiche simili, come pattern dei cross peaks, a quello delle fave. Infatti sono presenti i segnali dei lipidi e dei saccaridi. Nella zona dei saccaridi si distinguono diversi sistemi ognuno dei quali corrisponde ad un diverso zucchero.

26. lo spettro HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  conferma questa situazione osservata nello spettro TOCSY. In Particolare si osservino i chemical shift introno alle 90 ppm degli zuccheri e a 125 ppm dei CH su doppio legame. Questo è un esempio di come lo spettro del carbonio-13 conferma una situazione di segnali uno a ridosso dell'altro nello spettro del protone.

27. Gli spettri sono stati sottoposti a **bucket integration ed ad analisi statistica (PCA) Analisi delle componenti principali**). I risultati, considerando i segnali nella zona di spettro compresa fra 0.7 e 2.8 ppm, cioè la zona dei lipidi, mostrano una buona correlazione per i campioni 3-6 provenienti dalla zona di Matera e per i campioni 9-12 provenienti zona meridionale delle Puglie ed entro ognuna di questi due insiemi di campioni si possono anche distinguere raggruppamenti per tipo di cultivar. I campioni raccolti nella zona nord, invece, non danno correlazioni.

28. La stessa analisi condotta utilizzando la porzione di spettro compresa fra 3.0 e 3.4 ppm, cioè dove si affollano i segnali dei saccaridi da risultati migliori perchè è anche possibile trovare una regione del grafico caratteristica per i campioni coltivati nel nord della regione.

Risultati migliorano quando si considerano campioni provenienti da territori più diversificati sia come terreno che come clima.

29. in questa diapositiva sono mostrati i dati dell'analisi PCA di spettri  $^1\text{H}$ -HR-MAS combinati a dati di rapporti isotopici di carbonio, ossigeno ed azoto di farine provenienti da zone nord centro e sud d'Italia. Qui la differenziazione è migliore che nel caso precedente sebbene fra campioni provenienti dal centro e dal sud vi sia una parziale sovrapposizione (indicata dal cerchio in viola).

30. L'analisi condotta con la Discriminant Analysis (DA) porta a risultati decisamente buoni verificati anche con ulteriori campioni di test.

31. considerando, invece il tipo di cultivar, l'analisi statistica porta ad una discreta separazione, sebbene alcuni campioni siano nella zona errata (evitenziati dal cerchio in viola)

32. In questa diapositiva sono mostrati gli spettri dei carne liofilizzata e quindi ri presa con  $\text{D}_2\text{O}$ , acquisiti con le tre sequenze viste già in precedenza. Lo spettro standard è dominato dai segnali delle proteine e dell'acqua, mentre negli spettro CPMG e NOESYPR1D emergono i segnali dei metaboliti che, per la carne sono principalmente aminoacidi.

33. questo è lo spettro TOCSY

34. questo è lo spettro di eterocorrelazione HSQC protone-carbonio

35. e questo è l'elenco degli aminoacidi riconosciuti nello spettro del protone, attraverso l'analisi degli spettri 2D.

36. Qui sono mostrati spettri di pezzi di carne diversi. Da essi è assai difficile rilevare delle differenze, ...

37. ...anche amplificando la scala verticale.

38....maggiori differenze, invece, si hanno considerando animali di razze diverse. Anche in questo caso si procede con analisi statistiche simili a quelle viste per le farine che portano a distinguere la carne proveniente da animali diversi.

39. consideriamo ora il parmiggiano-reggiano, la cui composizione è qui mostrata. Ovviamente i componenti principali sono i grassi e le proteine e per quanto riguarda i grassi v'è una componente importante di grassi mono-insaturi.

40. lo spettro del protone mostra infatti intensi segnali delle catene alchiliche dei lipidi, oltre a numerosi segnali dei CH su doppi legami dovuti ai grassi mono insaturi e poli-insaturi. Completa la serie dei segnali principali i segnali del glicerolo.

41. In questa diapositiva sono sovrapposti lo spettro del parmiggiano a quello di un estratto della parte lipidica di un latte di vacca. La somiglianza è notevole

42. ed è ancor più notevole se amplifica la scala verticale.

43. amplificando ulteriormente la scala verticale è possibile osservare una serie di segnali di minore intensità pari a circa 0.1/0.2 per mille rispetto al segnale che  $\text{CH}_2$  di catena lipidica.

44. questi segnali sono dovuti principalmente a perossidi ed a 1,2 digliceridi. Il segnale a 7.3 ppm potrebbe essere dovuto a fenoli/polifenoli o ad aminoacidi con anello aromatico.

45. anche la zona di spettro compresa fra 2.5 e 4.5 mostra segnali minori principalmente dovuti a 1,2 e 1,3 digliceridi.

46. Si osservi che questi segnali di minore intensità possono essere i marker di qualità e tipo di latte o del formaggio o del luogo di origine, come dimostrato nel caso della differenziazione fra latte di mucca e di bufala e nella identificazione della genuinità e luogo d'origine dell'olio di oliva.

E' possibile acquisire gli spettri 2D per confermare l'assegnazione dei segnali principali e per individuare i componenti minori.

47. ad esempio questo è lo spettro TOCSY del parmigiano-reggiano

48. Consideriamo ora un po' di frutti, iniziando dalla mela. Questa è la sua composizione prevalentemente costituita da carboidrati e zuccheri.

49. Qui si riportano gli spettri di polpa di mela liofilizzata e quindi ripresa con  $\text{D}_2\text{O}$  e di polpa fresca tale quale alla quale si è aggiunta qualche goccia di  $\text{D}_2\text{O}$  per il segnale di lock. Lo spettro è molto simile nei due casi, sebbene sia più risolto quello del campione liofilizzato. In entrambi i casi, lo spettro è dominato dai segnali degli zuccheri.

50. ampliando la zona degli zuccheri si vedono bene i segnali dei CH anomerici dei diversi zuccheri presenti nella mela.

51. considerando il kiwi la situazione è analoga ma con una maggiore presenza di grassi, rispetto alle mele.

52. qui è mostrato lo spettro di polpa di kiwi tale quale alla quale è stata solamente aggiunta qualche goccia di  $\text{D}_2\text{O}$  per il segnale di lock. Si sono fatti spettri distinti per della parte di polpa verde e polpa bianca. i quali hanno fornito spettri parecchio diversi fra loro nella componente lipidica che è concentrata nella zona della polpa verde. La parte di spettro della componente zuccherina è simile a quella della mela.

53. Anche in questo caso è possibile acquisire gli spettri 2D per una più dettagliata analisi del prodotto. Questo è lo spettro TOCSY della polpa verde nel quale i cross peaks confermano la presenza dei componenti mostrati nelle precedenti slides.

54. lo spettro di eterocorrelazione HSQC protone-carbonio conferma, con i chemical shift del carbonio-13 la attribuzioni fatte. In particolare sono da osservare i chemical shift dei protoni anomerici degli zuccheri ed il CH su doppio legame dei lipidi insaturi.

-----

55. Passiamo ora alle matrici biologiche.

56. Come per gli alimenti, l'estensione della NMR alle matrici biologiche in stato semi-solido ha origine dai successi ottenuti dalla NMR nel campo dei fluidi biologici. Pressochè tutti i fluidi biologici sono stati oggetto di analisi NMR attraverso varie tecniche e lo scopo di tali analisi ha riguardato diversi argomenti: Studio della biochimica delle malattie; Diagnosi precoce delle patologie; Monitoraggio evoluzione delle patologie; Ottimizzazione delle terapie; la Farmaco-cinetica; la Farmaco-dinamica; la Tossicologia

Il tipo di analisi che si esegue è lo stesso visto per gli alimenti: cioè profilo metabolico e ricerca di markers. Anche gli spettri che si utilizzano sono gli stessi.

57. Il successo della NMR nell'analisi di fluidi biologici è testimoniato dall'incremento di pubblicazioni di tipo esponenziale che si è avuto nel corso degli ultimi 20 anni.

58. incremento che, se visto in % di crescita, ha superato parecchio l'indice di crescita dei lavori di metabonomica il quale, negli ultimi 20 anni è di circa il 200% mentre per la NMR ed MRI è di circa il 1500% che si può confrontare col il tasso di crescita di lavori di massa e metabonomica è del 800% circa. A completamento si può osservare che per la ricerca di bio-markers, il tasso di crescita dei lavori di NMR e di MRI è di circa il 4000 %. Questi valori danno indici che fanno comprendere che la NMR in questo settore è una tecnica che sta emergendo con grande velocità, soprattutto negli ultimi 10 anni e negli ultimi 5 si è avuto un'impennata molto forte.

59. giusto per riportare un esempio, qui sono gli spettri del protone, cioè spettri che si acquisiscono in circa cinque minuti, di urine di una persona sana (spettro in cima) di una persona affetta da problemi renali (spettro al centro) e della stessa persona dopo trattamento per dialisi (spettro in basso). E' evidente la differenza degli spettri (si vedano i segnali della TMAO e del Cn) e come sia semplice monitorare lo stato del paziente e l'efficacia del trattamento dialitico. Lo stesso spettro permette il riconoscimento e la quantificazioni di oltre 60 metaboliti diversi e quindi fornisce un quadro completo dello stato del paziente.

60. quindi la domanda è se anche con matrici biologiche non liquide sia possibile ottenere risultati analoghi a quelli ottenuti con i fluidi biologici. ☹ la risposta è sì con l'utilizzo della tecnica MAS.

61. lo scopo dell'analisi  $^1\text{H}$ -MAS-NMR è molteplice.....

62. come già detto il tipo di analisi ed il tipo di spettro sono gli stessi che abbiamo già visto per gli alimenti.

63. Per quanto riguarda lo studio della biochimica cellulare qui riporto alcuni lavori che si trovano in letteratura. Essi riguardano il plasma umano, il cervello, la ghiandola surrenale, l'ipotalamo, la

bioenergetica dei mitocondri, le cellule staminali. ☞ Circa queste ultime lo studio ha riguardato la comprensione delle variazioni dell'integrità delle cellule a seguito delle manipolazioni e della loro conservazione.

64. Per quanto riguarda lo studio delle patologie tumorali, in questi pochi esempi di letteratura compaiono studi che riguardano vari tipi di tumori: melanoma, carcinoma esofageo, tumore del polmone, della tiroide, e lavori intesi a determinare il grado di malignità, cioè analisi che vanno a sostituire l'esame istologico, cioè allo scopo di trasferire il metodo alla spettroscopia in vivo e quindi poter determinare il tipo di tumore in modo non invasivo, cioè senza biopsia. ☞ Questo lavoro è un esempio di questa strategia, applicata al cancro alle ovaie, che si estende anche alla possibilità di controllare nel tempo, sempre in modo non invasivo, gli effetti delle terapie.

65. e qui riporto uno fra i vari lavori che si trovano in letteratura, ☞ di diagnosi senza biopsia del cancro alla prostata.

66. e questo è un ulteriore lavoro ☞.

67. particolare attività scientifica è dedicata ai tumori al cervello per i quali eseguire la biopsia significa di fatto eseguire l'intervento di asportazione. ☞ diversi lavori riportano l'individuazione di markers in grado di consentire di comprendere la natura e malignità della patologia. ☞ questo è un altro esempio dove si sono individuati 20 metaboliti statisticamente significativi.

68. e questa è una serie di lavori applicativi di trasferimento in vivo dei risultati ottenuti con la HR-MAS.

69. qui invece riporto alcuni lavori mirati a controllo degli effetti delle terapie sia farmaceutiche che radiologiche e ho trovato un lavoro ☞ circa lo studio di eventuali modifiche metaboliche prodotte da agenti di contrasto che vengono utilizzati in fase operatoria per evidenziare i tessuti da eliminare

70. la lista di lavori circa lo studio degli effetti delle terapie è molto lungo .....

71. .... e riguarda diverse patologie.....dalle ustioni alla cartilagine, al morbo di Alzheimer....

72. ... vediamo quindi come si presentano gli spettri....qui è lo spettro di HRBC acquisito a 600 MHz. Lo spettro in alto, acquisito con la sequenza standard, è dominato dai segnali delle proteine e dal segnale dell'acqua che nello spettro in basso scompaiono grazie all'impiego della sequenza CPMG con presaturazione del segnale dell'acqua. In questo spettro appaio solo i segnali dei metaboliti a basso peso molecolare che sono principalmente aminoacidi ed i metaboliti classici dei processi biochimici.

73. qui sono mostrate alcune assegnazioni di segnali.

74. Questi sono spettri acquisiti a 400 MHz con differenti sequenze d'impulsi. Si osservi l'effetto dell'aumento del filtro di T2 della sequenza CPMG, passando dallo spettro al centro a quello in basso i segnali dei lipidi diminuiscono in intensità.

75. gli spettri espansi acquisiti a 600 e 400 MHz non mostrano rilevanti differenze, a parte quelle dovuta al fatto che i campioni sono diversi. Come già detto per le farine, questo accade perché comunque la risoluzione che si ottiene non è quella dei campioni in liquido e quindi le differenze di campo magnetico sono meno evidenti.

76. A titolo di esempio, questo è lo spettro TOCSY di HRBC acquisito a 400 MHz.

77. Qui, invece, sono mostrati gli spettri di una linea cellulare LOVO in vitro, acquisite con le tre sequenze diverse, già viste in precedenza. Come per altri campioni, la CPMG è la NOESYPR1D sono da preferire per l'abbattimento del segnale delle proteine e, grazie alla presaturazione, anche del segnale dell'acqua.

78. La zona espansa dello spettro permette di identificare alcuni metaboliti.

79. Qui, invece, sono mostrati gli spettri di cellula di adenocarcinoma con la sequenza standard e la CPMG

80. Anche in questo caso lo spettro espanso consente di individuare alcuni metaboliti.

81. qui invece sono mostrati gli spettri di una biopsia effettuata su diversi ratti. Mantenendo a pari intensità il segnale indicato dalla freccia gialla si vedono evidenti differenze nell'intensità dei rimanenti segnali che compongono lo spettro.

82. Diversità sono osservabili anche considerando biopsie prelevate in zone diverse della stessa massa tumorale. I segnali indicati con le frecce sono presi a pari intensità nei due spettri.

83. e questo è lo spettro COSY di una delle due biopsie precedenti. Si può osservare lo stesso sistema di cross peaks osservato per la parte lipidica degli alimenti (in viola). Sono anche visibili i cross tipici del lattato e dell'alanina.

84. Questi spettri possono essere utilizzati per l'analisi statistica considerando tutto lo spettro oppure come varia l'intensità dei segnali di alcuni metaboliti che fungono da markers, una volta individuati attraverso gli spettri 2D.

-----

85. sempre rimanendo in campo di applicazioni biologiche consideriamo lo studio dell'accumulo cellulare. Distinguiamo un territorio (cioè un comparto) extracellulare ed uno intracellulare. Per diversi motivi è importante sapere come i metaboliti e i farmaci si distribuiscono in questi due comparti i quali sono separati dalla membrana cellulare che, in condizioni sane, è semi-impermeabile per cui le sostanze nei due comparti sono fra loro in equilibrio.

☞ generalmente, per determinare il contenuto di  $X_{in}$  e  $X_{ex}$  si procede in questo modo:

- si centrifugano le cellule
- si separano le cellule dal fluido extra-cellulare
- si analizza il fluido extra-cellulare
- si lavano le cellule e si centrifugano per eliminare il liquido di lavaggio



- si lisano le cellule
- si analizza il fluido delle cellule lisate

☞ Essendo attivo l'equilibrio  $X_{in} \rightleftharpoons X_{ex}$ , questo metodo presenta vari e rilevanti aspetti di scarsa rappresentatività e riproducibilità perchè quando si lava un po' di ciò che è dentro la cellula inevitabilmente esce, essendo che si va ad alterare l'equilibrio.

86. La domanda è se è possibile studiare sistemi biologici compartimentalizzati (cellule, tessuti) senza alterare gli equilibri in corso e senza alterare le condizioni fisiologiche, cioè in vitro e/o in vivo ?. ☞ La risposta è sì attraverso l'uso della HR-MAS NMR

87. Nei sistemi non compartimentalizzati l'espressione che fornisce la frequenza di risonanza può essere semplificata perchè un dato numero di termini sono trascurabili. ☞ nel caso di compartimenti, ☞ ancora è possibile trascurare alcuni termini ma il contributo dovuto alla variazione di campo magnetico di bulk, cioè dell'ambiente, è diverso per i diversi compartimenti.

88. ciò determina il fatto che se consideriamo un sistema a tre compartimenti, l'acqua presente nei tre comparti, fornisce tre distinti segnali, uno caratteristico per ogni comparto.

89. Ciò è quanto può accadere anche nei sistemi biologici. Il fatto che accada o non accada dipende da ☞ quanto velocemente ciò che sta esternamente scambia con ciò che sta internamente. Se lo scambio è lento, sulla scala NMR, si vedono due segnali distinti, altrimenti, se lo scambio è veloce, si vede un unico segnale che è la media pesata delle due situazioni.

90. Generalmente, la membrana cellulare rende lenti questo scambio e quindi, considerando ad esempio dei globuli rossi, si distinguono due segnali dell'acqua, che si riferiscono al comparto intra-cellulare ed extra-cellulare. Il segnale più largo è quello intracellulare.

91. qui sono mostrati i segnali dell'acqua negli spettri di globuli rossi nello spettro acquisito a 600 e 400 MHz. Nei due casi la larghezza di riga è la stessa e cambia leggermente la separazione fra i picchi dovuto al diverso campo magnetico utilizzato.

92. Questa separazione non è tale da poter distinguere le diverse acque che possono esserci nei vari comparti che esistono all'interno della cellula sebbene...

93. .... a 800 MHz, siano state osservati tre diversi segnali dell'acqua.

94. In generale, per metaboliti diversi dall'acqua, si è nelle situazioni qui mostrate.

95. In NMR è ultra-noto da sempre, l'utilizzo degli agenti di shift, cioè ☞ dei metalli lantanidi il cui paramagnetismo attiva ☞ il termine  $\Delta B_p$  che di norma trascuriamo, e che dà origine ad un forte spostamento del chemical shift, detto LIS, per cui gli spin che si trovano nelle vicinanze di un lantanide ☞ modificano, anche di molto, la loro frequenza di risonanza.

96. In presenza di lantanide, considerando ad esempio l'acqua che può coordinare a tali metalli, se l'equilibrio di coordinazione è lento lo spettro mostra due segnali, se è veloce, mostra un unico segnale. Di norma è veloce e quindi si osserva un solo segnale la cui posizione è data dalla media delle posizioni dell'acqua libera e di quella coordinata, cioè legata, al lantanide.

97. Nei sistemi cellulari, nei quali consideriamo due compartimenti: extra ed intra-cellulare, il comportamento dei lantanidi è interessante perché i principali e più utilizzati mezzi di contrasto utilizzati nella tecnica diagnostica di Risonanza Magnetica per Immagini sono complessi del gadolinio, cioè un lantanide e comprendere se tali mezzi di contrasto si accumulano o no all'interno delle cellule è un dato rilevante per la loro efficacia (qualora l'accumulo cellulare fosse di tipo organo-selettivo) e per la loro tossicità perché se la loro permanenza nella cellula fosse irreversibile o se all'interno della cellula avessero luogo dei processi di degradazione del complesso, vi sarebbero problemi gravi essendo che i metalli lantanidi sono estremamente tossici e la quantità di agente di contrasto iniettata in vena durante gli esami clinici è di parecchi grammi.

98. Il valore del LIS dipende da diversi termini che si possono raggruppare in una componente isotropica ed una anisotropica. La componente anisotropica fa sì che se il lantanide è presente solo in uno dei compartimenti cellulari, esso provoca un debole LIS anche per gli spin presenti nell'altro compartimento cellulare, come riportato da decine di lavori riportati in letteratura su sistemi biologici. Questo effetto annulla la possibilità di comprendere se un lantanide, e quindi il mezzo di contrasto, sta in un solo compartimento o se in parte sta anche nell'altro.

Attraverso il MAS, la componente anisotropica viene annullata dalla rotazione ad alta velocità all'angolo magico e quindi rimane solo la parte isotropica alla quale contribuiscono lo shift iperfine per contatto e lo shift iperfine dipolare i quali agiscono solo su spin che sono in diretto contatto o molto vicini al metallo. Cioè, attraverso il MAS si rende il LIS attivo solo per gli spin presenti nello stesso comparto cellulare in cui il lantanide è presente e quindi il MAS permette di capire in quale comparto sta il mezzo di contrasto a base di lantanide.

Il LIS è proporzionale alla quantità di metallo presente e quindi la sua misura fornisce la quantità di lantanide presente nei diversi compartimenti. Poiché il minimo LIS misurabile dipende dalla larghezza di riga dei segnali, qui il MAS aiuta ulteriormente perché lo spettro è ad alta risoluzione e quindi sono misurabili LIS di pochi Hz, cioè è possibile misurare la presenza di quantità micromolari di agente di shift.

99. Quindi, se il lantanide aggiunto al sistema biologico sta solo nel comparto extra-cellulare, si osserva LIS solo per il segnale relativo all'acqua extracellulare.

100. Se il lantanide aggiunto al sistema biologico entra anche nel comparto intra-cellulare, si osserva LIS per entrambi i segnali dell'acqua.

101. Quindi, il segnale dell'acqua soggetto a LIS è nel comparto contenente il lantanide ed il valore di LIS fornisce la concentrazione di lantanide presente nel comparto cellulare.

Il segnale dell'acqua consente, quindi, di determinare quantitativamente, in modo non-invasivo e senza modificare i sistemi all'equilibrio, l'accumulo cellulare dei mezzi di contrasto per MRI, a base di gadolinio.

102. Questa è la struttura del BOPTA-Gd, un dei vari mezzo di complessi di gadolinio usati normalmente in diagnostica medica su umani. Il Gd ha come effetto solo quello di allargare il segnale ma non di spostarlo. E' quindi preferibile utilizzare un suo complesso isostrutturale nel quale si sostituisce il Gd col Dy.


103. Questo è lo shift prodotto sul segnale dell'acqua prodotto da diversi complessi del disprosio in diversi contesti.


104. e questi sono gli spettri dell'acqua in globuli rossi dopo aggiunta di quantità crescenti di Dy-BOPTA. Si osserva bene che il segnale dell'acqua intra-cellulare non si sposta, cioè per esso non c'è LIS, e quindi il Dy-BOPTA non entra nella cellula. Al contrario, il segnale dell'acqua extra-cellulare si sposta progressivamente all'aumentare della quantità di Dy-BOPTA aggiunta. Questo segnale subisce anche un piccolo allargamento di riga per l'effetto dovuto al paramagnetismo del metallo.

105. Quindi questo mezzo di contrasto non si accumula nei RBC del paziente.

106. Qui è mostrata la ripetizione della misura utilizzando direttamente il Gd-BOPTA. In questo caso i segnali non si spostano ma quello dell'acqua esterna si allarga progressivamente all'aumentare della quantità di Gd-BOPTA aggiunta. L'effetto è però meno netto di quello che si ha utilizzando lo shift del segnale anziché il suo allargamento.

107. Le stesse si misure possono essere effettuate su altri tipi di cellule, ad esempio quelle tumorali, per comprendere se l'agente di contrasto ha una specificità per tali cellule. In questo esempio l'acqua intra-cellulare non subisce LIS e quindi non c'è specificità. Osservate che in questo caso, in assenza di agente di shift, i due segnali dell'acqua sono inizialmente non separati, indice del fatto che la membrana di queste cellule "lavora" in modo diverso da quella degli RBC.

108. Una volta trovato, con le misure appena viste, un agente di shift che non penetra nel comparto intracellulare, lo stesso tipo di misura può essere utilizzata per altri metaboliti. Ad esempio  per il sodio la cui quantificazione del sodio intra ed extra-cellulare...

109. ... è un dato rilevante per la pompa biologica sodio-potassio e quindi per monitorare l'effetto di eventuali farmaci su questa vitale equilibrio biologico. La misura può essere estesa ad altri metalli biologicamente importanti, quali potassio, calcio e magnesio.  il passaggio dal campione nel tubo NMR alla tecnica HR-MAS porta benefici in termini sensibilità della misura, e di minimo impatto sul sistema biologico perchè sono sufficienti quantità micro-molari di agente di shift.

110. Lo stesso tipo di misura può essere utilizzata anche per determinare la distribuzione compartimentale di altri metaboliti. Qui è riportato il caso del lattato relativamente ai globuli rossi. In basso è lo spettro tale quale, ove si vedono due coppie di doppietti ed in alto è mostrato lo spettro dopo aggiunta di agente di shift. Si comprendere bene quali sono i segnali relativi al lattato intra-cellulare e quelli dovuti al lattato extra-cellulare.

111. Lo stesso tipo di misura può essere utilizzata anche per determinare l'accumulo cellulare di farmaci. Qui è riportato il caso dell'aspirina relativamente ai globuli rossi. Questa è la porzione di spettro in cui cade il metile dell'aspirina a pH = 7 in acqua. Dove appaiono due forme di acetato.

112. ...e qui, partendo dal basso verso l'alto, sono mostrati gli spettri dei globuli rossi, globuli rossi più aspirina e globuli rossi più aspirina più agente di shift. E' evidente la presenza di aspirina nei due compartimenti cellulari ed è possibile la quantificazione dei due segnali delle due forme di acetato.

113. questi sono i dati del relativo brevetto.

114. passiamo all'ultima parte della presentazione relativa ai preparati farmaceutici e cosmetici .

115. Innanzitutto diciamo che .....

116. Questo grafico mostra il tipo di contraffazione, e si commenta da solo, e ☹️ questi sono i farmaci che prevalentemente sono oggetto di contraffazione, e si commenta da solo. ☹️ Esiste quindi una grande richiesta di controlli sulla qualità dei prodotti in commercio. Ciò significa lavorare su prodotti formulati tali quali.

117. Mostriamo quindi alcuni esempi di analisi di preparati farmaceutici e cosmetici in gel e pomata che sono stati fatti per questo seminario, a titolo di esempio e quindi senza la pretesa di pervenire alla identificazione di tutti i componenti, cosa che avrebbe richiesto un tempo macchina e uomo non giustificabile per un seminario.

In generale lo scopo dell'analisi è: la caratterizzazione della composizione del preparato, studio della stabilità nel tempo del prodotto e caratterizzazione dei prodotti di degradazione. Il tipo di analisi richiede l'acquisizione spettri 1D e 2D analoghi a quelli della spettroscopia in liquido.

118. Iniziamo con un esempio di preparato farmaceutico, il Lassoactive la cui composizione è qui mostrata. Il principio attivo è presente al 10%.

119. questi sono gli spettri del protone del gel, acquisito con tre diverse sequenze.

120. Amplificando la scala verticale dello spettro acquisito con la CPMG, si osserva bene, nella zona dei protoni aromatici, i segnali 4 e 5 del p.a. ed amplificando ulteriormente la scala verticale, si distinguono bene anche i segnali 19,21 e 18,20 del para-ossibenzoato di metile e del para-ossibenzoato di etile (indistinguibili fra loro). Si osservi la sensibilità dello spettro che mostra, ed è possibile quantificare, segnali che sono pari allo 0.5 % del segnale del p.a. (segnale della banda  $1H/^{13}C$  del picco 5).

121. Nella zona dei protoni alifatici sono ben distinguibili tutti i segnali del p.a. e di tutti gli eccipienti. Tutti i segnali sono agevolmente quantificabili per integrazione.

122. Questo è lo spettro COSY per confermare l'assegnazione dei diversi segnali.

123. Vediamo un altro prodotto, il Gentalin, dopo lunga scadenza, nel quale il principio attivo è presente allo 0,1 %, quindi 100 volte in meno del prodotto precedente.

124. Questi sono gli spettri del protone, dominati dalla presenza dei segnali della vaselina. In verde è lo spettro simulato. Si vede che non sono osservabili segnali del p.a. ma appare un intenso segnale di protoni aromatici che nulla a che fare col p.a. e con gli eccipienti dichiarati. Potrebbe essere il prodotto degradato.

125. Vediamo un altro prodotto, il loicodon, anche qui il p.a. è presente solo al 0.1 % e vi sono parecchi eccipienti

126. Questi sono gli spettri del protone acquisiti con due sequenze. Ancora lo spettro è dominato dai segnali della vasellina.

127. Amplificano lo spettro CPMG, e confrontano lo spettro con quello simulato del p.a. si può osservare i segnali a 5.65 ppm ed a 4.15 ppm che potrebbero essere del p.a..

128. in questa altra zona di spettro diversi sono i segnali che potrebbero corrispondere al p.a. considerando che piccole differenze di chemical shift fra spettro reale e spettro simulato sono da considerare inevitabili dato lo stato fisico del campione e l'impossibilità di previsione dei chemical shift con precisione al centesimo di ppm. In questo caso si sarebbero dovuti eseguire spettri 2D e 2D selettivi ma il tempo non ci ha permesso di farlo perché, essendo segnali a bassa concentrazione occorre parecchio tempo macchina.

129. vediamo ora una crema protettiva la cui composizione è parecchio complessa.

130. queste sono le strutture dei diversi ingredienti da cui si comprende la complessità del prodotto.

131. questo è lo spettro del protone acquisito a 400 MHz,

132. e qui è sovrapposto agli spettri simulati (in verde) dei componenti. Lo spettro è suddiviso in due set di composti perché il programma non riesce a simulare insieme tutti questi componenti. Poiché lo spettro simulato considera tutti i componenti a pari concentrazione (è possibile anche assegnare concentrazioni diverse ai diversi prodotti ma per semplicità qui si è considerato di imporre che tutti siano a pari concentrazione) è evidente dal confronto con lo spettro reale che vi sono grandi differenze di concentrazione fra i diversi costituenti il prodotto in esame.

133. questa è la zona di spettro dei protoni aromatici.

134. la sovrapposizione con lo spettro simulato (in verde) mostra che non è immediato riconoscere i segnali sebbene alcuni siano molto simili a quelli dello spettro simulato.

135. inoltre, diversi sono le possibili combinazioni.

136. anche nella zona dei protoni alifatici la difficoltà è notevole. Questo è lo spettro con due scale verticali..

137. ....e qui è lo spettro sovrapposto a quello simulato (in verde).

138. .... e queste sono le assegnazioni che si possono fare sulla sola base degli spettri simulati.

Sia nella zona aromatica che alifatica vi sono molti segnali ben distinguibili per cui è altamente probabile che spettri DOSY e spettri 2D porterebbero ad identificare i segnali dei principi attivi e di buona parte degli eccipienti. Questa parte di lavoro, discretamente impegnativa come tempo macchina non è stata fatta per motivi pratici.

139. sempre come esempio di preparati complessi e che richiedono un'analisi NMR impegnativa, mostriamo un'altra pomata.

140. il cui spettro assomiglia molto a quello del eucerin visto precedentemente.

141. anche in questo caso sono visibili molti segnali ben risolti, sia nella zona aromatica

142. che in quella alifatica.

143. Questo è lo spettro TOCSY, che evidenzia la possibilità di individuare diversi picchi di correlazione indicati dalle frecce gialle e grigie

144. e dalle frecce blue..

145 ... e l'analisi può diventare più dettagliata considerando le espansioni dello spettro... Anche in questo caso sarebbe necessario un lavoro con spettri DOSY e 2D per identificare i diversi segnali che compongono lo spettro 1D.

146. Infine l'esempio di un prodotto per difendersi dalle punture delle zanzare.

147. questo è lo spettro del protone

148. e le sue espansioni: zona aromatica

149. zona alifatica. a diverse scale verticali. Come sopra sono visibili molti segnali ben risolti che meriterebbero spettri DOSY e 2D per la loro identificazione.

150. in conclusione anche nel caso di preparati farmaceutici e cosmetici, in molti casi è possibile arrivare alla completa analisi del prodotto ma anche quando questo non è possibile per la complessità dello spettro lo spettro 1D del protone può essere utilizzato come impronta digitale, come si è mostrato nel caso degli alimenti e quindi, attraverso l'analisi statistica dei segnali, comprendere quando il campione è quello originale oppure se esso è stato contraffatto.

151. con questo è tutto e vi ringrazio per l'attenzione