

<i>Attività formativa</i>	73057 - Metodi di Caratterizzazione Strutturale
<i>Modulo didattico</i>	
<i>CFU</i>	4
<i>Ore</i>	32
<i>Metodo didattico</i>	lezioni frontali
<i>Obiettivo formativo</i>	Al termine del corso lo studente conosce gli aspetti teorici e sperimentali di: 1) Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), in particolare le basi della teoria NMR ad impulsi, gli esperimenti NMR mono- e bidimensionali e le loro applicazioni per la determinazione di una struttura complessa; 2) Spettrometria di massa e, in particolare, le tecniche di ionizzazione per determinare la massa di macromolecole. Lo studente approfondisce inoltre aspetti importanti quali il riconoscimento molecolare e cioè l'interazione fra molecole differenti, fenomeno che è alla base di molti processi vitali.

<i>Tematica</i>			<i>Lezioni</i>		
Tema	Obiettivo	Ore		Argomenti	Ore
Introduzione alla Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)	Lo studente conosce l'organizzazione del corso e le modalità di verifica dell'apprendimento. Si introducono le applicazioni e le potenzialità della tecnica NMR. Si descrive il modello vettoriale che costituisce la base degli esperimenti ad impulsi. Si descrive il moto di precessione, il vettore magnetizzazione e l'origine del segnale NMR.	4	1	Risonanza Magnetica Nucleare: applicazioni della spettroscopia NMR; si descrive il principio fisico della tecnica: lo spin, il momento angolare, il momento magnetico. Si illustrano i livelli di energia e le popolazioni. Si descrivono gli esperimenti impulsati mediante il modello vettoriale. L' Effetto Zeeman; la precessione; il vettore magnetizzazione; la frequenza di Larmor; la condizione di risonanza. Il segnale NMR.	2
			2	Si descrivono il sistema di riferimento del laboratorio e il sistema di riferimento rotante. Si illustra la scala NMR, l'equazione della costante di schermo ed il chemical shift. Si descrive il chemical shift e l'accoppiamento nel sistema rotante. Si comparano i vecchi strumenti NMR che funzionavano mediante eccitazione ad onda continua con i nuovi che utilizzano un'eccitazione ad impulso. Si illustra brevemente la Trasformata di Fourier.	2

Significato della larghezza dell'impulso in NMR	Lo studente conosce le sequenze di impulso 1D ed il significato dell'interferogramma di decadimento. Si illustra lo strumento NMR. Si descrivono i processi di rilassamento e le tecniche per misurare i tempi T1 e T2, con le relative applicazioni.	3	3	Si descrive la sequenza di impulsi 1D ed il significato della larghezza dell'impulso correlata con gli angoli di inclinazione della magnetizzazione. Si descrive il significato del FID: interferogramma di decadimento. Si fa un breve cenno alla strumentazione NMR.	1
			4	Si illustrano i tempi di rilassamento T1 e T2. La misura di T1 mediante la sequenza di impulsi inversion-recovery. Si descrive l'eco di spin e la misura di T2. Si illustrano alcune applicazioni relative alla conoscenza delle velocità di rilassamento: Magnetic Resonance in vivo (MRS) e magnetic resonance imaging (MRI). Si descrivono alcuni metodi di soppressione di solvente: impulsi binomiali.	2
Spettri di eteronuclei	Lo studente conosce gli spettri degli eteronuclei e l'esperimento ATP. Inoltre impara i metodi per aumentare l'intensità dei segnali di un eteronucleo poco sensibile basati sul fenomeno del trasferimento di polarizzazione.	4	5	Si illustrano alcuni spettri C13 NMR accoppiati e disaccoppiati. Si descrive l'equazione della costante di schermo degli eteronuclei. Si descrive l'intensità dei segnali 13C. Si mostra l'eco di spin sull'accoppiamento eteronucleare. Si descrive l'esperimento Attached Proton Test (APT) per la determinazione del tipo di carboni presenti in una struttura basato sul numero dei protoni direttamente legati. Si fa un accenno agli spettri NMR dei nuclei quadrupolari.	2
			6	Trasferimento di polarizzazione: SPT e SPI omonucleare ed eteronucleare. Trasferimento di polarizzazione non selettivo: INEPT e DEPT.	2

Accoppiamento spin-spin	Lo studente conosce l'accoppiamento scalare attraverso i diagrammi di energia per un sistema a due spin. Impara la determinazione della struttura mediante analisi delle costanti di accoppiamento spin-spin.	2	7	Si illustrano i diagrammi di energia per l'analisi di accoppiamento spin-spin. Si descrive l'analisi del primo ordine (sistema AX) e la regola della molteplicità. Si illustrano alcuni esempi. Si spiega l'equazione semiempirica di Karplus. Si descrive brevemente l'analisi del secondo ordine (il sistema AB). Si spiega la differenza fra equivalenza chimica e magnetica.	2
Spettri bidimensionali omo ed eteronucleari	Lo studente conosce come si genera un esperimento bidimensionale. Impara a leggere spettri omonucleari - COSY e 2D INADEQUATE- ed eteronucleari - HETCOR, HSQC, HMBC - basati sulla correlazione di nuclei accoppiati scalarmente.	3	8	Spettri bidimensionali: descrizione di un esperimento ideale. Si descrive la correlazione omonucleare fra protoni accoppiati attraverso legami ed il modo per leggere uno spettro COSY attraverso l'analisi dei cross-peaks. Si descrivono le correlazioni eteronucleari HETCOR, HMQC, HSQC. Si illustra la correlazione eteronucleare long-range HMBC. Si descrive un esempio di correlazione omonucleare C13: 2D-INADEQUATE. Si analizza la struttura dell'iposenolo mediante alcuni spettri mono e bidimensionali.	3

Effetto Nucleare Overhauser e spettri NOE	Lo studente conosce l'effetto NOE di correlazione attraverso lo spazio e l'importanza degli esperimenti NOE stato stazionario e NOESY per la determinazione di strutture complesse.	3	9	Si descrive la causa dell'effetto Nucleare Overhauser (NOE) mediante il sistema di energia a due spin. Si illustra l'Equazione di Solomons. Correlazioni attraverso lo spazio. Si discute il caso del sistema a due spin. Si descrive l'esperimento NOE 'steady-state'. Si illustra l'analisi della configurazione assoluta di un composto beta-lattamico. Si descrive la diffusione di spin e l'utilizzo di tecniche NOE transiente e NOESY. Si effettua l'analisi monodimensionale e bidimensionale di alcune strutture che danno luogo a fenomeni di autoassociazione.	3
Spin-locking: Spettri ROESY e TOCSY	Lo studente conosce l'utilizzo dello spin-locking per effettuare spettri ROESY di correlazione spaziale su molecole di media dimensione e spettri di correlazione totale TOCSY per identificare un intero sistema di spin	2	10	Viene descritto lo Spin-locking come mezzo per ottenere nuovi esperimenti bidimensionali: TOCSY e ROESY: Viene spiegato l'esperimento TOCSY per identificare interi sistemi di spin comparando le informazioni di questo tipo di esperimento con la correlazione COSY. Viene descritto l'esperimento NOE chiamato ROESY per analisi di molecole di media dimensione e per studiare interazioni intermolecolari di complessi host-guest. Vengono descritte le informazioni che si ottengono da questo tipo di esperimenti mediante analisi di alcuni spettri TOCSY e ROESY. Come esercizio viene descritta l'analisi di strutture isomeriche attraverso l'utilizzo di molti degli spettri bidimensionali descritti.	2

NMR di peptidi	Lo studente conosce l'approccio che si utilizza per studiare la struttura di un peptide mediante spettroscopia NMR	1	11	Viene descritta brevemente l'analisi NMR di proteine. Analisi della struttura primaria e secondaria. Assegnazione dei sistemi di spin. Andamenti NOE caratteristici. Assegnazione sequenziale. Accoppiamenti ed angoli diedri. Si descrive l'analisi di un pentapeptide ciclico.	1
Spettroscopia di diffusione (DOSY)	Lo studente conosce i principi alla base della spettroscopia di diffusione molecolare e l'applicazione all'analisi di soluzioni multicomponenti.	1	12	Si descrive il principio alla base della spettroscopia di diffusione DOSY. Vengono illustrati alcuni esperimenti DOSY applicati a miscele chimiche complesse e soluzioni multicomponenti mediante la determinazione del coefficiente di diffusione molecolare dei singoli componenti la miscela.	1
NMR stato solido (HR-MAS)	Lo studente conosce i principi della spettroscopia allo stato solido e l'applicazione allo studio dei polimeri.	1	13	Si descrivono brevemente la spettroscopia NMR allo stato solido (High Resolution-Magic Angle Spinning) ed i campi di applicazione della tecnica. Si illustrano alcuni esperimenti e le condizioni per ottenere spettri risolti.	1
Spettrometria di massa	Lo studente ripassa brevemente i principi della spettrometria di massa e lo schema a blocchi dello strumento. Rivede i metodi di ionizzazione 'hard'. Conosce gli analizzatori e il rivelatore. Conosce i metodi di ionizzazione 'soft': ESI-MS, APCI, MALDI, FAB. Lo studente conosce inoltre le tecniche analitiche che accoppiano una separazione cromatografica ad una determinazione di massa.	6	14	Spettrometria di massa. Massa nominale, massa esatta, peso atomico. Schema a blocchi di uno spettrometro di massa: sorgente, analizzatore, rivelatore, sistema di elaborazione di dati, spettro di massa. Sistemi di ionizzazione: ionizzazione elettronica (EI), ionizzazione chimica (CI). Analizzatore: settori magnetici, a quadrupolo, FT-ICR, tempo di volo (TOF). Rivelatore. Risoluzione. Ione molecolare, composizione isotopica.	2

Esercitazione NMR	Lo studente conosce uno spettrometro NMR e impara a determinare la struttura di un composto mediante spettri mono e bidimensionali acquisiti dallo strumento.	2	15	Metodi di ionizzazione di macromolecole mediante desorbimento: ionizzazione elettrospray (ESI-MS). ESI-MS: meccanismo di ionizzazione, formazione di ioni multicarica, calcolo del peso molecolare di una proteina, formazione di complessi proteina-metallo. Analisi di complessi host-guest. Ionizzazione positiva o negativa. Prestazioni generali della sorgente ESI. Il metodo di ionizzazione APCI. Il processo MALDI, meccanismo di ionizzazione. Il metodo di ionizzazione FAB.	2
			16	Si descrive l'accoppiamento delle tecniche cromatografiche con rivelatori di massa: GC-MS; LC-MS. Si illustra la spettrometria di massa tandem (MS-MS). Sequenza peptidica mediante tecniche di massa tandem.	2
			17	Viene effettuata una breve esercitazione pratica su uno spettrometro NMR nella quale viene caratterizzata una struttura molecolare attraverso l'acquisizione e l'analisi di alcuni spettri mono e bidimensionali illustrati nel corso teorico.	2