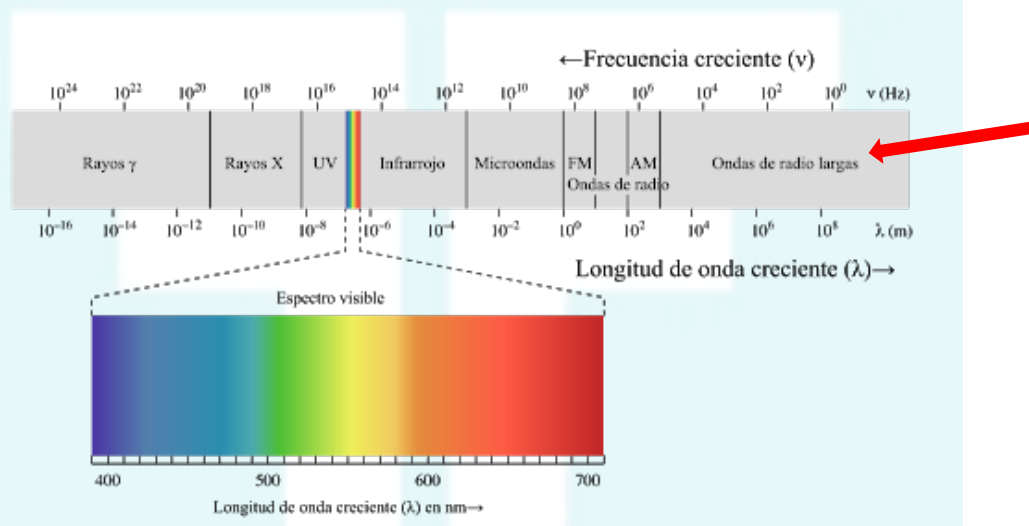


## 6. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

En la técnica RMN vamos a estudiar la absorción radiación de radiofrecuencia por parte de las moléculas cuando se encuentran situadas en un campo magnético externo.

El tipo de radiación utilizada en esta técnica se encuentra mucho mas a la derecha del espectro que la REM UV-Visible, por lo tanto tendrá una longitud de onda mucho mas elevada (4 a 900 MHz) pero una energía muy baja (son REM inofensivas). En esta técnica están implicados los núcleos de las moléculas situados en un intenso campo magnético externo, con la finalidad de que aparezcan los estados energéticos del núcleos y así poder absorber la REM. Esto es debido a que ciertos núcleos atómicos presentan espín y momento magnético, y al exponerlos a un campo magnético externo hay un desdoblamiento de sus niveles de energía, un estado fundamental y un estado excitado.



Es una técnica que nos va a dar básicamente información física, química ,electrónica y estructural de las moléculas. No es una técnica útil para todas las moléculas, deben de tener elementos capaces de absorber RMN, los núcleos más estudiados y utilizados son  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{15}\text{N}$ .

## FUNDAMENTO

Los neutrones y protones del núcleo de un átomo y los electrones al girar sobre sí mismos y de manera circular provocan campos magnéticos ( $\mu$ ), como pequeños imanes, que llevarán asociados un determinado vector del momento angular con la misma dirección y sentido. El momento angular asociado a la partícula se puede cuantificar y se describe con el número cuántico de espín ( $I$ ) que tiene unos valores determinados dependiendo del núcleo. Si el número de protones y neutrones de un núcleo es par diremos que el espín ( $I$ ) es igual a 0, estos elementos se encuentran apareados, exactamente como pasa con los electrones, y por lo tanto no se creará un campo magnético y no tendrá asociado un momento angular, este tipo de moléculas no serán útiles en RMN.

Los tipos de movimientos de los protones y neutrones que podemos encontrar, y que en combinación de ambos genera el campo magnético son: la rotación (giran sobre sí mismos) y la procesión (movimiento circular alrededor de un punto concreto a una frecuencia determinada).

Tal y como se ha comentado anteriormente en RMN interesa básicamente el número cuántico de espín ( $I$ ). No todas las partículas pueden absorber ondas radio, hay núcleos que son activo para esta técnica y núcleos que no. Las moléculas que absorben RMN deben tener un número cuántico de espín diferente a 0.

Los protones y los neutrones, cuando hay una combinación de partículas, pueden aparearse de manera que un elemento adquiere espín negativo y el otro espín positivo y el espín neto total será 0 y por lo tanto estas moléculas no serán capaces de absorber radiación y serán inactivas en RMN.

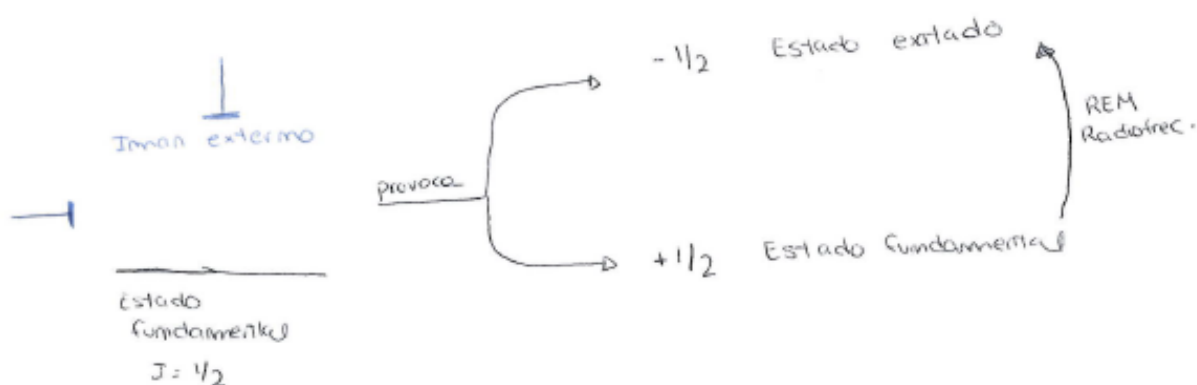
Los protones y neutrones de núcleos con números impares cuando se combinen tendrán un número cuántico de espín  $I=1/2$ , como consecuencia del giro respecto de un eje, que causa que actúen como pequeños imanes. Para estos núcleos existen dos estados de espín,  $I=+1/2$  y  $I=-1/2$ . En ausencia de un campo magnético, ambos estados tienen la misma energía, un único nivel energético por lo tanto no será posible absorber RMN. Cuando se someten a un campo magnético externo se formarán dos estados energéticos, puede haber una transición entre estos dos niveles por absorción de REM de ondas radio.

Cuando se aplica un intenso campo magnético externo todas las partículas del núcleo se pueden orientar sólo en las dos direcciones relativas al campo ( $I=+1/2$  o  $-1/2$ ), no se pueden orientar a una dirección intermedia. La orientación de un dipolo nuclear se puede cuantificar con  $I_z$ .

Si en lugar de un único núcleo y un momento magnético tenemos un grupo de núcleos y varios momentos magnéticos podemos hablar del momento magnético total. Se define como la suma de todos los momentos magnéticos individuales.

Los núcleos más estudiados para esta técnica son  $^{13}\text{C}$  o el  $^1\text{H}$  entre otros. En cambio los núcleos  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  o  $^{32}\text{S}$  no son activos para esta técnica.

PROTONES	NEUTRONES	TOTAL	ESPÍN TOTAL	EJEMPLOS
par	par	par	$I=0$ (No RMN)	$^{12}\text{C}$ , $^{16}\text{O}$ o $^{32}\text{S}$
par	impar	impar	$I=$ semientero ( $1/2$ )	$^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$
impar	par	impar	$I=$ semientero ( $1/2$ )	



## FUNDAMENTO: Efecto Zeeman

Los elemento del núcleo si no se les aplica un campo magnético externo se encuentran girando a todas direcciones, el espín esta orientado al azar. Pero cuando se les aplica un campo externo, su momento magnético se orienta en una de las dos direcciones posibles con respecto al campo magnético (Efecto Zeeman):

- Paralelo: el spin se orienta hacia arriba, en una posición más estable y menos energética.  $I = +1/2$ . (población alfa)
- Antiparalela: el spin se orienta hacia abajo, es una posición inestable y mas energética.  $I = -1/2$ . (población beta)

En esta situación, para pasar de un estado energético a otro los elementos deben absorber REM de la frecuencia de onda de radio=radiofrecuencia. Cada núcleo debe ser irradiado con una REM de radiofrecuencia característica que depende del campo magnético externo aplicado y de la constante giromagnetica.

CONSTANTS GIROMAGNÈTIQUES	
<i>Nucli</i>	<i>Relació giromagnètica (MHz/T)</i>
<sup>1</sup> H	2.6752·108
<sup>13</sup> C	6.7283·107
<sup>19</sup> F	2.5181·108
<sup>31</sup> P	1.0841·108

## FUNDAMENTO: Distribución de las partículas

Como ya hemos hablado en otros temas, la distribución de las partículas en un estado fundamental o a un estado excitado se puede predecir con **la ecuación de Boltzmann**.

Esta ecuación representa la relación entre la población de partículas en un estado fundamental y en un estado excitado. Se puede aplicar tanto en la espectroscopia UV-Visible como en la RMN, la máxima diferencia entre las dos técnicas es en que en la primera la mayoría de población se encuentra en el estado fundamental a diferencia de la técnica RMN donde la población esta distribuida entre el estado fundamental y el excitado, aunque las partículas tienen mas tendencia a colocarse en el estado mas estable, el de menos energía. Este hecho provoca una baja sensibilidad de la técnica, ya que no habrá tantas partículas que puedan absorber REM, muchas ya estarán excitadas. Una manera de mejorar la sensibilidad de la técnica es aumentando la temperatura, habrá mas diferencia en la proporción de partículas entre los diferentes estados.

Si las partículas están divididas mas o menos igual entre los dos estados cuando se irradie REM y las partículas vayan a un estado excitado será muy fácil que este nivel superior quede saturado.

Por todas razones se debe irradiar con la energía necesaria y concreta para pasar entre estados, una frecuencia de REM muy concreta y precisa.

$$\frac{N_j}{N_o} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}}$$

La frecuencia de REM que se necesita para pasar de un estado alfa a un estado beta se llama frecuencia de resonancia y el movimiento de los espín, de un estado fundamental a un excitado, se llama movimiento de precisión (se define exactamente como número de giros que por segundo que realiza un protón en relación al campo externo al que esta sometido).

La frecuencia necesaria para hacer esta transición entre estados, que como ya se ha visto debe ser muy concreta, se calcula igualando la ecuación de diferencia de energía entre los dos estado, esta ecuación nos da la energía necesaria para la transición, y la ecuación de energía de un fotón  $E = h \cdot \nu$ , donde  $\nu$  corresponde a la frecuencia. Por lo tanto, la frecuencia de la REM para producir resonancia en un determinado núcleo situado en un campo magnético  $B_0$  es:

$$\mathbf{n = g B_0}$$

(n=frecuencia de resonancia)

g=constante giromagnética, característica de cada elemento

$B_0$ = fuerza del campo magnético externo)

Esta frecuencia de resonancia  $n$  es la necesaria para que los elementos absorban RMN y haya una transición entre niveles, se conoce como **frecuencia de Larmor**. Las radiaciones con éstas frecuencias se encuentran en la zona del espectro de RMN.

A parte de conocer la frecuencia exacta a la que debemos irradiar la muestra también debemos controlar la energía, para evitar la saturación del estado excitado o que no sea suficiente para el salto. Para conocer la energía que necesitaremos debemos utilizar la ecuación de cuantificación de la orientación del espín  $I_z$ . La energía será igual a la constante de giromagnetica del componente y al campo magnético aplicado.

Por lo tanto para que tenga lugar la resonancia, el tránsito entre poblaciones, la REM deberá tener exactamente la energía exacta que separa los dos estados  $+1/2$  y  $-1/2$ , y la frecuencia coincida con la frecuencia de Larmor.

### **FUNDAMENTO: Campo magnético**

Tal y como se ha visto, en la técnica de RMN los dos estados energéticos están muy cerca y las partículas distribuidas casi de manera equitativamente en los dos estado. El campo magnético y la frecuencia son dos factores que influyen en la distribución poblacional de las partículas. Si se varían estos dos factores se puede aumentar la separación energética entre los dos niveles, y por lo tanto nuestra técnica será más sensible.

Como más potente sea el campo magnético más separación habrá entre los dos niveles, por lo tanto podremos decir que se aumentará la sensibilidad de la técnica. Aunque nosotros aumentemos o disminuyamos la potencia del campo magnético es importante que siempre se irradie con la energía suficiente para que tenga lugar la transición entre estados, sino se cumple la condición la técnica no se podrá llevar a cabo, .

A parte de la energía necesaria también es importante la frecuencia de la REM que vaya a incidir, debemos utilizar la frecuencia de Larmor.

Para aumentar la sensibilidad de la técnica debemos usar la frecuencia de las ondas de radiofrecuencia (frecuencia de Larmor) y podemos variar la intensidad del campo magnético, esta segunda estrategia es mucho mas utilizada.

## INSTRUMENTACIÓN: Espectrómetros de RMN

Los espectrómetros de RMN pueden ser de dos tipos: de líneas anchas o de alta resolución.

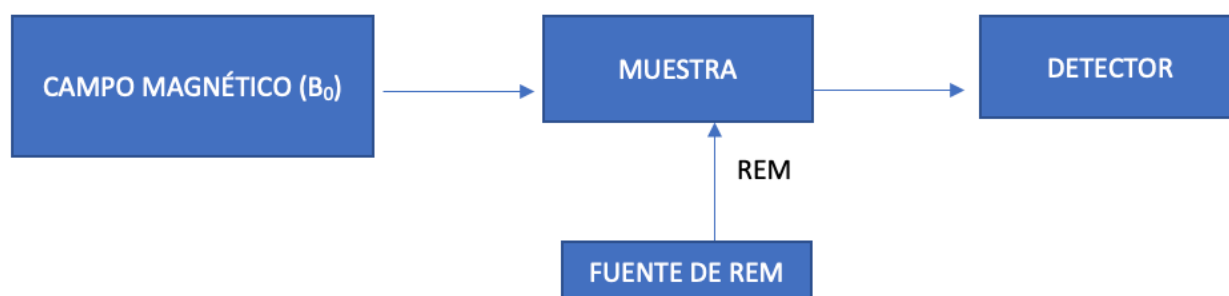
- Espectrómetro de líneas anchas: tienen imanes de baja intensidad, fuerza de unas décimas de tesla y son mas simples y económicos que los de alta resolución.
- Espectrómetro de alta resolución: emplean imanes con más intensidad y fuerzas que oscilan entre 1,4 y 14T. Nos dan los espectros de líneas anchas.

Actualmente existen dos tipos de espectrómetro de alta resolución: de onda continua y de impulsos o transformada de Fourier. En los dos se mantiene la muestra en un intenso campo magnéticos con elevada fuerza.

- Espectrómetro de onda continua: se mide la señal de absorción a medida que se varía lentamente la frecuencia de la fuente.
- Espectrómetro de impulsos: la muestra se irradia de manera periódica con bandas de REM. Los impulsos producen una señal de domino tiempo que gracias a la transformada de Fourier se convierte en una señal con dominio de frecuencia.

Antiguamente se usaban espectrómetros de alta resolución que contenían imanes o electroimanes permanentes para producir el campo magnético. Actualmente se usan espectrómetros de transformada de Fourier, el campo magnético lo proporciona unos imanes solenoides superconductores.

Los instrumentos para la RMN deben tener siempre 3 partes:



- 1) **Imanes:** la sensibilidad y la resolución de los espectros de la RMN dependen básicamente de la fuerza y la calidad del imán. Existen dos tipos de imanes diferentes:
  - Bobina superconductora=solenoides superconductores: se usan en los instrumentos más modernos y son capaces de alcanzar campos magnéticos muy elevados (14T). Para mantener sus características se debe sumergir el imán en un baño de helio líquido. Este tipo de imanes presentan una elevada intensidad de campo a parte de ser muy estables y tener bajo coste de mantenimiento. Son útiles para el RMN de  $^{13}\text{C}$  (100-850MHz).
  - Imanes permanentes: son sensibles a la temperatura, necesitan un buen aislamiento y eficaz termostatación. No son útiles para períodos prolongados de recogida de datos. Son útiles para la técnica de RMN  $^1\text{H}$ .
- 2) **Fuente de radiación de radiofrecuencia:** oscilador de cristal continua.
- 3) **Detector de radiofrecuencia:** Bobina receptora de radiofrecuencia, puede ser la misma que sirve de transmisor (bobina única) u otra distinta (método de las dos bobinas).

La muestra la debemos colocar en una cubeta, que se encargara de ir rotando la muestra para evitar que hayan interferencias y que se produzcan ensanchamientos indeseables de las bandas.

Manipulación de la muestra: las muestras deben de estar disueltas, si se utiliza la técnica de RMN de protón el disolvente no debe contener protones, se utilizan como disolvente agua deuterada o tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ).

Las partes del instrumento de Transformada de Fourier consisten en:

- 1) Campo magnético
- 2) Emisor de radiofrecuencia
- 3) Antena receptora
- 4) Generador de impulsos
- 5) Detector de la señal conectado con un ordenador que permite hacer los cálculos matemáticos para la Transformada de Fourier.

Estos instrumentos tal y como se ha comentado son capaces de transformar la señal en dominio del tiempo a la señal en función de la frecuencia.



## ESPECTROS

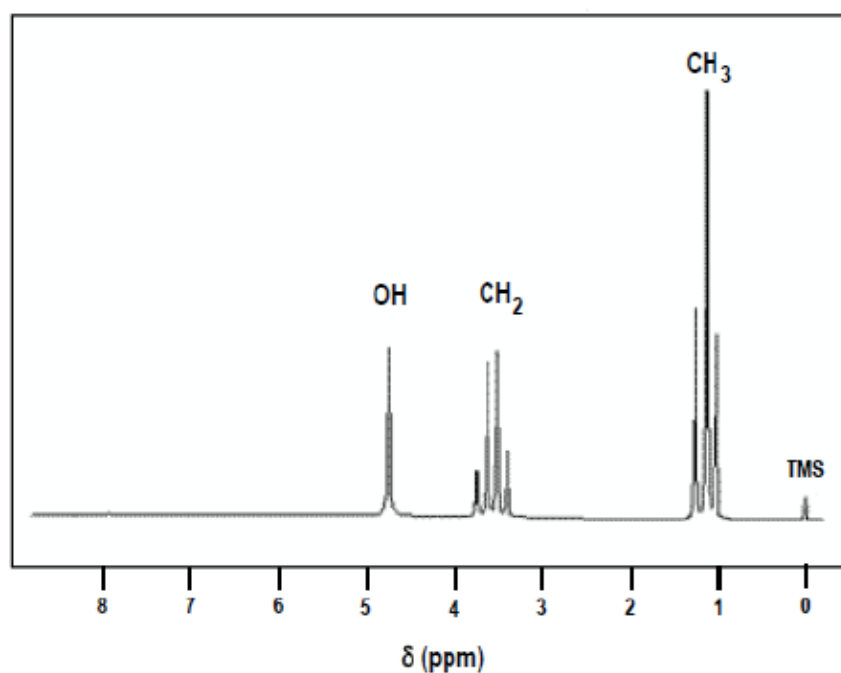
Hay dos tipos de espectros de RMN:

- Espectros de líneas anchas: la anchura de banda de la fuente de líneas es bastante grande como para enmascarar la estructura propia a causa del entorno del químico. Cada isótopo estudiado se asocia a un solo pico. Su uso es la determinación cuantitativa de los isótopos.
- Espectros de alta resolución: para una determinada molécula se encuentran varios picos, que corresponderán a la estructura de los grupos. La aparición de varios picos es a consecuencia del efecto del entorno químico, los núcleos y electrones vecinos que afectan a la señal.

Los espectros de la RMN tienen en el eje de las X el desplazamiento químico en ppm y en el eje de las Y la intensidad.

El desplazamiento químico, indica la posición de la señal en el eje de las X siempre respecto a un compuesto de referencia, no es posible hablar de desplazamiento químico si no tenemos una referencia. En esta técnica se usa el tetrametilsilano =TMS como compuesto de referencia, se encuentra en el desplazamiento 0 del eje de las X.

La intensidad (altura) también se puede normalizar teniendo el TMS como comparativa, algunas veces el pico se puede desdoblar y esto se llamará desdoblamiento de espín.



## ESPECTROS: $^1\text{H}$

- INTENSIDAD

La intensidad del pico es proporcional a la cantidad de protones equivalentes que tenga la molécula. Como más protones iguales entre ellos haya, más intensa será la señal. Si es una molécula con varios protones diferentes debemos saber que cada banda corresponderá a uno de ellos y la señal más intensa indicará el protón que está en mas proporción.

Este concepto nos permite hacer un análisis cualitativo, aunque no se usa mucho ya que puede haber interferencias del medio.

- DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

La posición donde encontraremos cada pico en el espectro dependerá del desplazamiento químico.

El desplazamiento químico se puede definir como la posición donde se encontrará el pico del protón estudiado respecto al patrón (TMS). Este concepto viene relacionado con el apantallamiento.

El campo magnético al que se somete un núcleo se ve reducido a causa de algún campo magnético opuesto que se forma en la misma molécula. En las moléculas complejas, los electrones dan vueltas alrededor del núcleo creando un campo magnético contrario al campo magnético externo, este fenómeno reduce el campo magnético total. Esta reducción en el campo magnético se denomina apantallamiento, como mayor sea la densidad de electrones mayor será el apantallamiento.

Es prácticamente imposible conocer con exactitud la intensidad del campo magnético y su reducción, mientras sí que se puede determinar con exactitud los cambios de intensidad de forma relativa utilizando un patrón interno que se mide a la vez.

En el caso del patrón el TMS todos los protones están al máximo de apantallados, el S es más electropositivo que el C. Así cuando se aplica un campo intenso este compuesto proporciona un solo pico, intenso y bien separado, saldrá a 0ppm, desplazamiento 0.

De que depende principalmente el apantallamiento:

- De la electronegatividad grupos vecinos.
- El campo magnético inducido por los grupos vecinos.

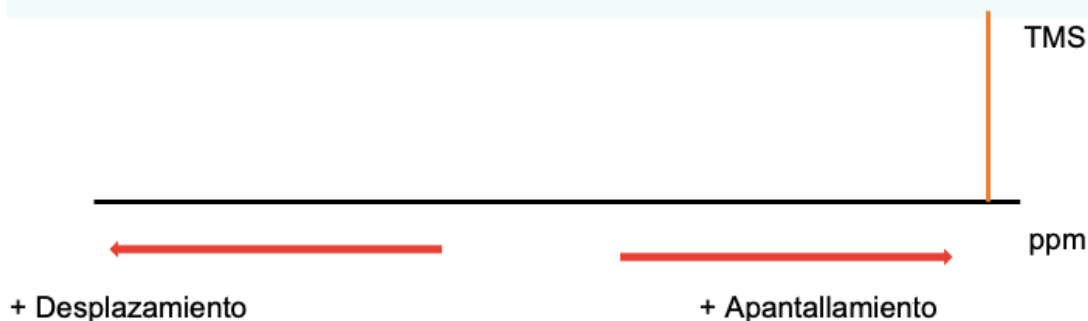
El desplazamiento químico ( $\delta$ ) es adimensional y se define como el desplazamiento relativo en partes por millón:

$$\delta = (n_r - n_i) * 10^6$$

( $n_r$  = constante de apantallamiento del núcleo de referencia H de los TMS)

( $n_i$  = constante de apantallamiento del núcleo considerado H del grupo)

Puesto que cada H de un grupo funcional tiene una constante de apantallamiento diferente, tendrá un desplazamiento químico concreto, que nos permitirá identificar los diferentes tipos de H. Se utiliza principalmente esta característica para identificar diferentes grupos. Hay muchas gráficas y tablas que correlacionan la estructura química con el desplazamiento químico. La mayoría de picos de los protones se encuentran entre el intervalo de 0 a 13ppm.



En resumen los protones que estén más apantallados por los núcleos vecinos saldrán más a la derecha y cerca del TMS, a diferencia de los protones menos apantallados que saldrán a la izquierda del eje (+ desplazamiento).

- DESDOBLAMIENTO ESPÍN-ESPÍN

El desdoblamiento de los picos o multiplicidad puede explicarse si asumimos que el momento magnético de un núcleo interacciona con los momentos magnéticos de los núcleos vecinos. Cuando tiene lugar esta interacción hay un desdoblamiento de los niveles de energía y múltiples transiciones. La combinación de los espines de los núcleos originan aumento, disminución o no tienen efecto sobre los campos magnéticos. Estos cambios influyen sobre los núcleos vecinos, estos quedarán sometidos a la influencia de diferentes campos magnéticos que darán lugar al desdoblamiento de espín. Es decir, que dependiendo de los núcleos vecinos habrá un desdoblamiento de la señal ya que la combinación de estos puede provocar cambios en el momento magnético.

Cada señal del protón se desdoblará en  $n+1$  picos de los átomos vecinos, donde  $n$  son el número de protones diferentes que hay unidos directamente. Si un protón tiene  $n$  protones equivalentes sobre el carbono vecino su señal de absorción se desdobra en  $n+1$  picos.  $n+1$  se denomina multiplicidad.

Si es el caso que el número de grupos vecinos que contienen protones son dos, la multiplicidad vendrá dada por  $(n+1)(n+1)$ , las  $n$  representan el número de protones de cada grupo vecino que estarán unidos al protón estudiado.

### **ESPECTROS: $^{13}\text{C}$**

Se estudio por primera vez en 1957 pero se tardo bastante tiempo en poner en marcha por la complicación de la instrumentación.

El espín nuclear del  $^{12}\text{C}$  es  $I=0$ , por lo tanto no es útil para la RMN, a diferencia del  $^{13}\text{C}$  que tiene un  $I=1/2$ . Por lo tanto podemos usar este elemento para la técnica de RMN. La señal de la técnica tiene poca intensidad a causa de la poca proporción de estos isótopos en el medio. Este inconveniente se puede superar utilizando imanes de alta intensidad de campos o instrumentos de transformada de Fourier.

Esta técnica es útil para conseguir información de la estructura de las moléculas orgánicas. Los espectros de esta técnica aparecen a 220ppm de desplazamiento química respecto al de referencia (TMS), no hay superposición de los picos y estos picos no sufren desdoblamiento de espín-espín ya que es muy poco probable encontrar dos átomos  $^{13}\text{C}$  vecinos en la misma molécula, todos los picos que salen son únicos.

## APLICACIONES

El uso de estas técnicas es básicamente un estudio cualitativo, permitiendo identificar los grupos que formarán molécula y la estructura. Esa información se obtiene con:

- Desplazamiento químico: nos permite conocer el grupo funcional.
- Multiplicidad: permite conocer los grupos funcionales vecinos.
- Intensidad: según la intensidad de la señal podremos determinar el número de protones iguales en la molécula.

Su principal aplicación será la identificación de las moléculas orgánicas, aunque muchas veces esta técnica por sí sola no es suficiente para identificar completamente un compuesto, debemos utilizarla conjuntamente con otras técnicas.

Aunque no es tan habitual usarlo, esta técnica también nos permitirá hacer un estudio cuantitativo, gracias a la intensidad que el área de la banda equivale al número de protones de la molécula, y también podremos hacer un análisis de mezclas con la integración de bandas.

Algunas aplicaciones que se le pueden dar a la técnica son:

- Estudio de estereoquímica.
- Mecanismo de reacción.
- Conformación de proteínas y nucleótidos.
- RMN de imágenes (traumatología, oncología...)

En el caso de la técnica de  $^{13}\text{C}$  la aplicación más importante consiste en determinar la estructura de especies orgánicas, estudiando el desplazamiento químico de cada tipo de carbono.

## RMN DE IMAGEN

Técnica instrumental que se usa para pruebas diagnósticas. Es una prueba muy útil y no invasiva para obtener información sobre la estructura interna del cuerpo.

Para poder obtener la imagen del cuerpo se dividen las áreas en pequeños cubos de la menor medida posible, denominados vóxels. Para formar la imagen se codifica la energía de los vóxels en diferentes niveles de gris que determinarán la intensidad de cada pixel. La calidad de la imagen vendrá dada por la relajación de los protones una vez se deja de aplicar un campo magnético externo.

La intensidad del campo y el tiempo de aplicación dependerán del tipo de tejido que se quiera estudiar. La RMI es una técnica de resonancia 3D, se aplica el campo magnético en tres dimensiones.

El funcionamiento de los instrumentos será el mismo que ya se ha contado anteriormente. Se debe aplicar un campo magnético externo, dependiendo de este campo y el momento magnético del núcleo, se determinan la energía y frecuencia necesaria para separar las poblaciones en dos niveles bien diferenciados. Seguidamente se aplicará una radiación de radiofrecuencia justo a la frecuencia necesaria y con el detector y el modelo matemático de la transformada de Fourier se observará la señal que acabará dando la imagen.