

Le tecniche spettroscopiche

- Introduzione
- I vari tipi di spettroscopia
- le leggi dell'assorbimento della luce
- la spettrofotometria nell'ultravioletto e nel visibile
- la colorimetria
- Informazioni sull'accessibilità dei residui ionizzabili in proteine native
- Determinazione dell'accessibilità di gruppi cromofori in proteine native: perturbazione del solvente e spettroscopia differenziale
- La spettrofluorimetria
- Il fluorimetro

Sono dette tali le tecniche che usano l'interazione delle **radiazioni elettromagnetiche** con un campione per ottenere una sua analisi.

I dati vengono ottenuti come spettri.

Lo **spettro** viene rappresentato come un grafico che riporta l'energia emessa o assorbita in funzione della lunghezza d'onda o di un altro parametro elettromagnetico (la massa, il momento, la frequenza, etc..).

La luce, il calore e altre radiazioni elettromagnetiche sono onde elettromagnetiche che viaggiano alla velocità di $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$.

Un'onda elettromagnetica è costituita da un campo elettrico e uno magnetico che viaggiano insieme l'uno perpendicolarmente all'altro.

Oltre alla luce, anche le radioonde, le microonde e i raggi X sono onde elettromagnetiche.

Un'onda elettromagnetica può essere definita in termini di frequenza della sua oscillazione, indicata con la lettera greca nu (ν). L'onda si muove lungo una linea retta con una velocità costante, indicata con **c** se si muove nel vuoto. La distanza tra due successivi picchi dell'onda è detta lunghezza d'onda, λ .

La lunghezza d'onda è determinata dall'energia contenuta in un quanto. La luce infatti può essere anche descritta come un "treno" di quanti o fotoni.

La relazione che lega l'energia dell'onda elettromagnetica e i suoi parametri:

$$E = hc/\lambda = h\nu$$

h = costante di Planck
c = velocità della luce nel vuoto
 λ = lunghezza d'onda
 ν = frequenza

Lo spettro elettromagnetico copre un 'enorme range di lunghezze d'onda, dalle più corte alle più lunghe.

La spettroscopia si basa sul fatto che le molecole interagiscono con le radiazioni di diversa lunghezza d'onda e queste interazioni originano spettri in regioni diverse. Lo spettro come già enunciato viene rappresentato come un grafico che riporta l'energia emessa o assorbita in funzione della lunghezza d'onda o di un altro parametro elettromagnetico (la massa, il momento, la frequenza, etc..). La strumentazione richiesta per gli studi spettroscopici è diversa per ogni regione dello spettro elettromagnetico.

La spettroscopia è l'uso dell'assorbimento, dell'emissione o dello scattering della radiazione elettromagnetica da parte della materia per studi quantitativi o qualitativi della materia o per studiare processi fisici. La materia possono essere atomi, molecole, ioni atomici o molecolari, solidi. L'interazione della radiazione con la materia può causare deviazione della radiazione e/o transizioni tra livelli energetici degli atomi e delle molecole.

- Assorbimento: Una transizione da un livello inferiore ad uno superiore
- Emission: Una transizione da un livello più alto ad uno più basso con trasferimento di energia dall'emettitore. Se nessuna radiazione viene emessa la transizione è detta decadimento radioattivo.
- Scattering (dispersione): Reindirizzamento della luce dovuto a interazione con la materia. Può avvenire con o senza un trasferimento energetico, es. la radiazione dispersa potrebbe (oppure no) avere una leggera differente lunghezza d'onda comparata a quella della luce che colpisce il campione.

Che informazioni si ottengono?

Uno spettro può essere usato per ottenere informazioni sui livelli energetici atomici e molecolari, sulle geometrie molecolari (accessibilità di residui ionizzabili ad esempio), sui legami chimici, le interazioni tra molecole.

Gli **spettri elettronici** sono dovuti a transizioni di livello energetico da parte degli elettroni più esterni di un atomo. Essi sono prodotti nelle regioni dell'ultravioletto e nel visibile e sono anche accompagnati, di solito, da variazioni di livello energetico rotazionale e vibrazionale.

Gli **spettri di fluorescenza** sono dovuti al medesimo tipo di transizioni energetiche.

Gli **spettri vibrazionali e rotazionali** si originano grazie alle transizioni tra livelli energetici vibrazionali

Gli **spettri di risonanza magnetica e paramagnetica elettronica** originano dalle variazioni dell'orientamento di spin in un campo magnetico rispettivamente di un nucleo e di un elettrone.

Nei termini più semplici, quindi, la spettroscopia richiede una fonte energetica (comunemente un laser) e un qualcosa che misuri il cambiamento dell'energia irradiata dopo che questa ha interagito col campione (spesso uno spettrofotometro o interferometro).

Quanti tipi di spettroscopia esistono?

Sono diversi come diversi possono essere le fonti di energia da utilizzare.

La spettroscopia d'assorbimento molecolare nel visibile e nell'ultravioletto

Dal momento che la luce colpisce il campione e si vuole misurare il cambiamento di essa in seguito all'evento, bisogna conoscere le leggi dell'assorbimento della luce.

Le leggi dell'assorbimento della luce

La **trasmissione**: è la frazione di radiazione che attraversa un mezzo che assorbe in modo uniforme.

$$T = I/I_0 = \text{radiazione trasmessa/radiazione incidente}$$

L'**assorbanza**: è l'entità della radiazione assorbita, detta anche estinzione, è uguale al logaritmo del reciproco della trasmissione.

$$A = E = \log 1/T = \log I_0/I$$

Il **coefficiente di estinzione molare**: corrisponde all'assorbanza di una soluzione 1M di un composto puro in condizioni standard di solvente, temperatura e lunghezza d'onda.

La **legge di Lambert-Beer**: esprime la relazione tra assorbanza, concentrazione della sostanza, spessore del campione.

$$A = \epsilon_{\lambda} c d$$

ϵ_{λ} = il coefficiente di estinzione molare della sostanza che assorbe la luce ad una data lunghezza d'onda λ

c = concentrazione della sostanza

d = cammino ottico della radiazione nella soluzione

NOTA: è l'equazione di una retta

Sono comunque possibili deviazioni da questa legge.

Deviazioni positive, dovute a :

- 1) aumento della concentrazione
- 2) aggregazione e scattering (dispersione)

Deviazioni negative, dovute a:

- 1) aumento della concentrazione
- 2) denaturazione a basse concentrazioni di proteine.

Lo spostamento del massimo a λ maggiori (verso il rosso) è detto effetto **batocromico**.

Lo spostamento del massimo a λ minori (verso il blu) è detto effetto **ipsocromico**.

Incremento del massimo di assorbimento: effetto **ipercromico**.

Decremento del massimo di assorbimento: effetto **ipocromico**.

Lo spettrofotometro la spettrofotometria nell'ultravioletto e nel visibile

Schema di uno spettrofotometro monoraggio

L₁ ed **L₂** sono le due sorgenti luminose, una lampada ad **idrogeno o deuterio** per l'ultravioletto ed una al **tungsteno** per il visibile.

I raggi vengono convogliati da delle **lenti**, ma negli strumenti più moderni si preferiscono gli **specchi** perchè meno costosi e perchè si ha minor perdita di radiazione.

M è il **monocromatore** che consente, partendo da una sorgente di radiazione policromatica, di ottenere un fascio di radiazione monocromatica e parallela: in teoria una radiazione composta da una sola lunghezza d'onda. Il monocromatore può essere un prisma come in figura o un reticolo di diffrazione.

F₁ ed **F₂** sono due fenditure che contribuiscono ad ottenere una luce monocromatica.

S è la **slitta** che porta gli alloggiamenti per le **cuvette** nelle quali viene posto il campione da analizzare.

V è la **cella fotoelettrica**. La spettrofotometria si basa infatti sul fatto che *il potenziale in una cella fotoelettrica è proporzionale all'intensità della radiazione che arriva alla fotocella stessa*. Le fotocelle convertono i quanti della radiazione luminosa in energia elettrica che può poi essere amplificata, rilevata e registrata.

le cuvette:

- quando si lavora nell'**ultravioletto** si devono utilizzare cuvette di **quarzo o di silice** perchè sono trasparenti a lunghezze d'onda superiori ai 180 nm
- quando invece si lavora nel **visibile** si possono utilizzare quelle di **vetro o plastica** poichè assorbono le radiazioni al di sotto dei 340 nm.
- affinchè la misura sia accurata si deve sempre verificare che le due cuvette appartengano alla stessa serie ottica.
- per tarare lo strumento a zero di estinzione bisogna predisporre una cuvetta di riferimento otticamente identica a quella di misura e con il medesimo solvente.

spettrofotometri speciali: spettrofotometri a doppio raggio

Possono eseguire sia uno spettro sia misurare variazioni di assorbanza. La principale differenza rispetto a quelli monoraggio è la presenza di un componente che sdoppia il raggio, per cui è possibile avere il confronto simultaneo tra assorbimento della cuvetta contenente il campione e cuvetta di riferimento.

La colorimetria:

è in biochimica tra le applicazioni più importanti dello spettrofotometro. Numerose sostanze non hanno un coefficiente d'estinzione significativo nel visibile, ma possono reagire quantitativamente con un'altra sostanza a formare un prodotto colorato.

Questa proprietà viene sfruttata per la determinazione quantitativa di tali sostanze.

La formazione del prodotto colorato (cromoforo) deve avvenire in condizioni standardizzate secondo un rapporto stechiometrico con la sostanza e si misura quindi l'estinzione dei campioni rispetto a quella di un bianco, contenuto nella cuvetta di riferimento e costituito da tutti i reagenti tranne la sostanza da determinare.

E' necessario prima della misurazione dei vari campioni azzerare contro il bianco.

Si pongono poi i valori delle varie letture in funzione della **quantità** o della **concentrazione della sostanza** in esame che forma il prodotto colorato.

Questo grafico è la **curva di taratura**. A questo punto è possibile dosare quantità ignote della sostanza facendo avvenire la reazione colorimetrica nelle stesse condizioni, misurando l'estinzione ed estrapolando l'altro valore dalla curva di taratura.

Normalmente si usa l'albumina di siero bovino (BSA) per la costruzione della curva di taratura ed il Coomassie Brilliant Blue come colorante specifico per le proteine. Lo spettro di questo cromoforo presenta un massimo a 465 nm a pH acido.

Il suo complesso con le proteine presenta invece un massimo a 595 nm a pH acido.

Il metodo Bradford

Questo metodo è molto popolare perchè semplice, rapido, economico e sensibile. Esso si basa sull'azione del **Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG)** che si lega specificatamente a residui di **arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina**. Da notare che agisce primariamente con i residui di arginina (8 volte più che con gli altri residui elencati) quindi se si ha una proteina ricca in arginina è preferibile utilizzare uno standard che sia anch'esso ricco in arginina. Il CBBG si lega a questi residui in una forma anionica, con assorbanza massima a 595 nm. Il colorante nella soluzione madre si trova infatti in forma cationica che ha un massimo di assorbanza a 470 nm.

E' da sottolineare che gli spettri di assorbimento delle due forme del colorante si sovrappongono. Questo fa sì che il saggio non risponda in modo lineare nella curva standard. Quando viene tracciata la curva si nota infatti che una curva di secondo ordine si adatta meglio di una curva lineare. Il saggio risulta lineare a concentrazioni basse della proteina. Bradford stesso sottolinea che il saggio non sia lineare nell'intero range dell'articolo originale.

Una parte cruciale di questo saggio è il **bianco**. Dal momento che il saggio non risponde linearmente è molto importante "bloccare" il punto zero. Dal momento che questo punto è molto importante per la curva è fortemente raccomandato che vengano eseguiti almeno due bianchi.

La scelta dello standard per questo tipo di saggio è cruciale per il suo successo. Molti ricercatori hanno notato anomalie utilizzando diversi standard con questo metodo. la BSA è stato lo standard originale ed è quello che usualmente si trova con l'acquisto dei vari kit. Tuttavia, è stato notato che la BSA piuttosto che una risposta "normale" dà un'altra risposta e potrebbe non sempre essere affidabile. Svariati ricercatori tendono perciò ad usare **l'immunoglobulina G (IgG)** come standard.

Il CBBG si lega alle cuvette di quarzo abbastanza fortemente. Di conseguenza, dovrebbero essere utilizzate le cuvette di vetro o plastica.

Esistono due principali "formati" del saggio ognuno con un differente range di funzionalità. Il **microsaggio** ottimizzato per concentrazioni proteiche che vanno da 1-20 microgrammi/microlitro ed il

Il **macrosaggio** ottimizzato per concentrazioni proteiche che vanno da 20 a 100 microgrammi/microlitro.

Generalmente è più conveniente usare il microformato e diluire la proteina fino al range di concentrazione. Il microsaggio consente di sprecare meno materiale e consente al concentrato di durare più a lungo.

Una considerazione: usare un pò di NaOH nel saggio per aiutare a solubilizzare la proteina (vale soprattutto per quelle idrofobiche, di membrana).

Quali sono i gruppi cromofori presenti nelle proteine?

A) Nei **legami peptidici** si osservano le seguenti transizioni:

- 1) $n \rightarrow \pi^*$ a **210-220 nm** , dai livelli di non legame n a quelli di antilegame π^*
- 2) $\pi \rightarrow \pi^*$ a **190-210 nm** , da un livello di legame π ad uno di antilegame π^*
- 3) $n \rightarrow \sigma^*$ a **175 nm** , dai livelli di non legame n a quelli di antilegame σ^*

B) Nelle **catene laterali**:

a parte le transizioni comuni al legame peptidico e quindi poco osservabili, sono da ricordare i **gruppi aromatici (260-280 nm)**, Trp, Tyr, Phe

C) I **gruppi prostetici**

Quali sono i fattori che influenzano le proprietà di assorbimento di un cromoforo?

- 1) **pH** - il pH del solvente determina lo stato di ionizzazione di cromofori ionizzabili
- 2) **la polarità** - per cromofori polari, il valore di λ_{\max} per le transizioni $n \rightarrow \pi^*$ è minore in solventi polari (H₂O, alcool) e maggiore in solventi non polari.
- 3) **caratteristiche geometriche** - la diversa organizzazione strutturale dei gruppi cromofori influenza fortemente sia ϵ che λ_{\max} .

Informazioni sull'accessibilità dei residui ionizzabili in proteine native.

Dal momento che modificando il pH cambia lo stato di ionizzazione dei cromofori ionizzabili, cambiano anche i rispettivi λ_{\max} e ϵ .
Perciò se cambiamo il PH:

a) se non si osservano cambi spettrali per questi cromofori a pH tali per cui devono essere in forma ionizzata, questo significa che sono nascosti in una regione non polare della proteina.

b) se il cambio spettrale è osservato significa che i cromofori in questione sono accessibili e, dall'esame delle curve di titolazione spettrofotometriche è possibile capire se si trovano in un intorno polare facilmente accessibile o in un intorno formato da residui apolari e poco accessibili al solvente.

Ad esempio questo è lo spettro di assorbimento della **tirosina** a pH 6 e 13. Nota che sia il λ_{\max} che il ϵ aumentano quando l'OH fenolico è dissociato.

La curva **A** corrisponde all'ipotetica proteina che abbia tutte e 5 le tirosine esposte: lo spettro cambia in funzione del pH come lo spettro della tirosina libera

La curva **C** corrisponde all'ipotetica proteina che abbia 3 tirosine interne in un intorno polare facilmente accessibile al solvente

La curva **B** corrisponde all'ipotetica proteina che abbia 3 tirosine interne in un intorno non polare (non accessibile). Il valore del primo plateau è 2/5 del valore del plateau finale. Il profilo della curva si impenna a valori di pH elevati ad indicare che le 3 tirosine interne diventano esposte al solvente in seguito a denaturazione della proteina

Determinazione dell'accessibilità di gruppi cromofori in proteine native: perturbazione del solvente e spettroscopia differenziale

Solventi perturbanti: **80% H₂O + 20% solvente apolare** (dimetilsolfossido, diossano, etilenglicole, glicerolo)

Spettroscopia differenziale:

cuvetta 1: campione + H₂O ↔ **cuvetta 2:** campione + solvente perturbante

Uno spettro di differenza "non zero" si ottiene solo se il campione è perturbato dal solvente

ESEMPIO: determinazione della posizione dei **Trp** in una proteina

campione in H₂O Conc.=1M lunghezza del cammino ottico =1 cm $\epsilon_{280}=5.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
↓
 $A_{280}=0.028=28 \times 10^{-3}$ quindi la proteina ha $28 \times 10^{-3}/5.6 \times 10^{-3}= 5$ Trp totali

campione in **80% H₂O + 20% solvente apolare** Conc.=1M lunghezza del cammino ottico =1 cm $\epsilon_{292}=0.2 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
↓

$A_{292}=0.006=0.6 \times 10^{-2}$ quindi la proteina ha $0.6 \times 10^{-2}/0.2 \times 10^{-2}= 3$ Trp perturbati dal solvente

**gli
altri
2
sono
inter
ni**

La scelta del perturbante si basa sulle dimensioni molecolari delle sue molecole.

ESEMPIO:

Nella prima figura entrambi i residui vengono modificati da una molecola piccola presente nel solvente

Nel secondo caso molecole di dimensioni maggiori possono interagire solamente coi residui di tirosina in posizioni esposte.

=> la tirosina presente nella fessura è modificata dalle molecole piccole ma non da quelle più grandi

La spettrofluorimetria

La fluorescenza è un fenomeno di emissione in cui si misura la trasmissione energetica all'interno della molecola da un livello energetico più alto ad uno inferiore, rilevando la radiazione emessa piuttosto che quella assorbita.

Il principale vantaggio dell'utilizzo della fluorescenza rispetto alle misure di assorbimento è la maggiore sensibilità dal momento che il segnale di fluorescenza parte da un background pari a 0. Le applicazioni analitiche includono misurazioni quantitative di molecole in soluzione e l'impiego in cromatografie liquide.

Affinché vi sia fluorescenza la molecola deve essere "eccitata" mediante l'assorbimento di luce di lunghezza d'onda minore (cioè a maggiore energia) rispetto a quella emessa (a minore energia). La differenza tra questi due λ è nota come **shift di Stokes** ed i generali migliori risultati sono ottenuti con quei composti che presentano degli spostamenti molto ampi. È possibile anche che un composto assorba nell'ultravioletto ed emetta nel visibile.

Transizioni tra livelli energetici elettronici molecolari:

Molte molecole organiche assorbono nel visibile e nell'U.V. ma solo poche di esse sono fluorescenti. Tuttavia molte di queste sono di interesse biologico. Gruppi fluorescenti nelle proteine sono: Trp, Tyr, Phe.

La fosforescenza è un fenomeno associato alla fluorescenza ma ha tempi di decadimento maggiori ed in genere permane anche quando l'energia di eccitazione non è più applicata.

Si definisce **efficienza quantica**:

$$Q = \text{quanti emessi} / \text{quanti assorbiti}$$

e a basse concentrazioni ($<10^{-5}M$) è valida la legge:

$$I_f = k 2.3 I_0 \epsilon_\lambda c d Q$$

Dove:

I_f = intensità di fluorescenza,

I_0 = intensità radiazione incidente,

ϵ_λ = coefficiente di estinzione molare alla lunghezza di assorbimento,

c = concentrazione,

d = cammino ottico,

k = fattore geometrico strumentale

La relazione mostra che **l'intensità della fluorescenza è linearmente proporzionale alla concentrazione dell'analita.**

Determinare la concentrazione dalla fluorescenza emessa da un campione richiede la calibrazione del fluorimetro con uno **standard** (per determinare k e Q) o l'impiego di una **curva di lavoro**.

Il fluorimetro

Un tipico fluorimetro contiene una **sorgente d'eccitazione**, una **cella per il campione**, un **rilevatore**. Le molecole in soluzione sono normalmente eccitate da raggi UV e la sorgente d'eccitazione è una lampada di deuterio o xenon. La luce proveniente dalla lampada passa attraverso un monocromatore. La fluorescenza viene dispersa da un'altro monocromatore e rivelata da un tubo fotomoltiplicatore.