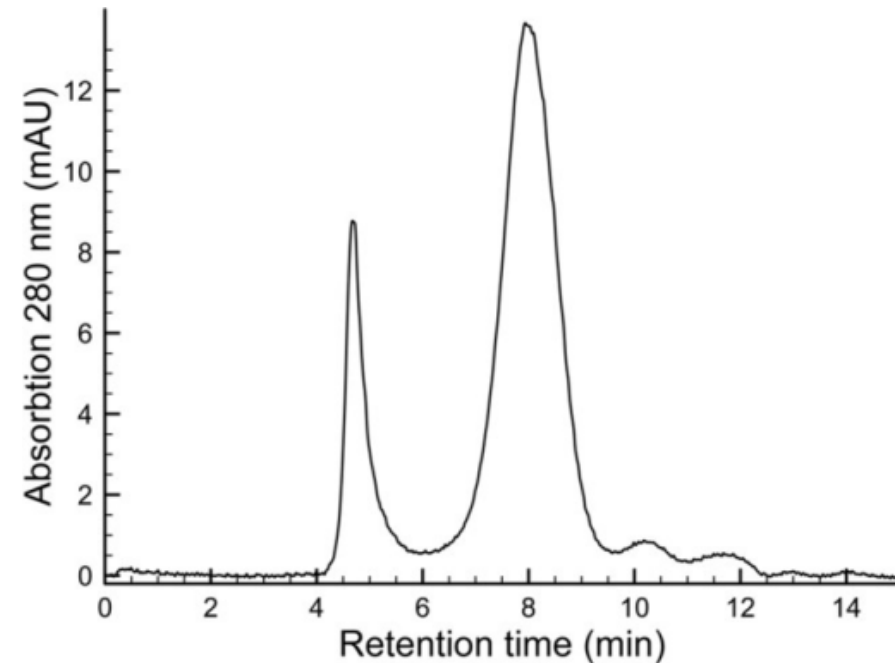
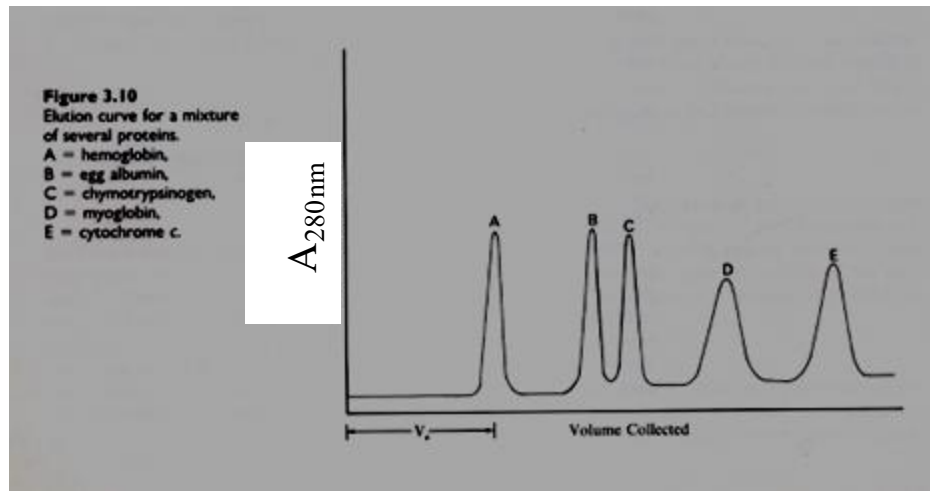


Nei diversi tipi di cromatografia il grafico di eluizione ottenuto riportava:

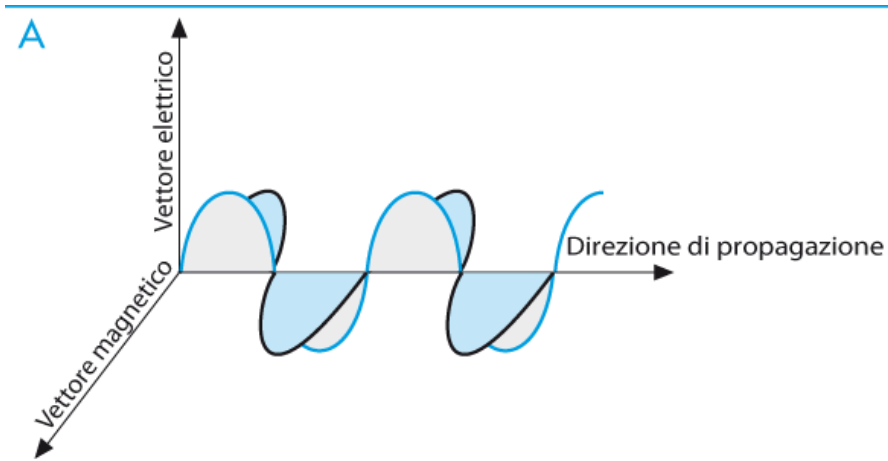
ascissa : volume, n° provette, tempo

ordinata : assorbimento a 280 nm/214 nm



Mediante le **tecniche spettroscopiche** si studiano le interazioni delle **proteine** con le radiazioni elettromagnetiche di diversa lunghezza d'onda

Le **tecniche spettroscopiche** sfruttano le interazioni tra radiazioni elettromagnetiche e materia



La radiazione elettromagnetica è un'onda composta da **un vettore elettrico** e un **vettore magnetico** che oscillano su piani perpendicolari l'uno all'altro e perpendicolarmente alla direzione di propagazione della radiazione

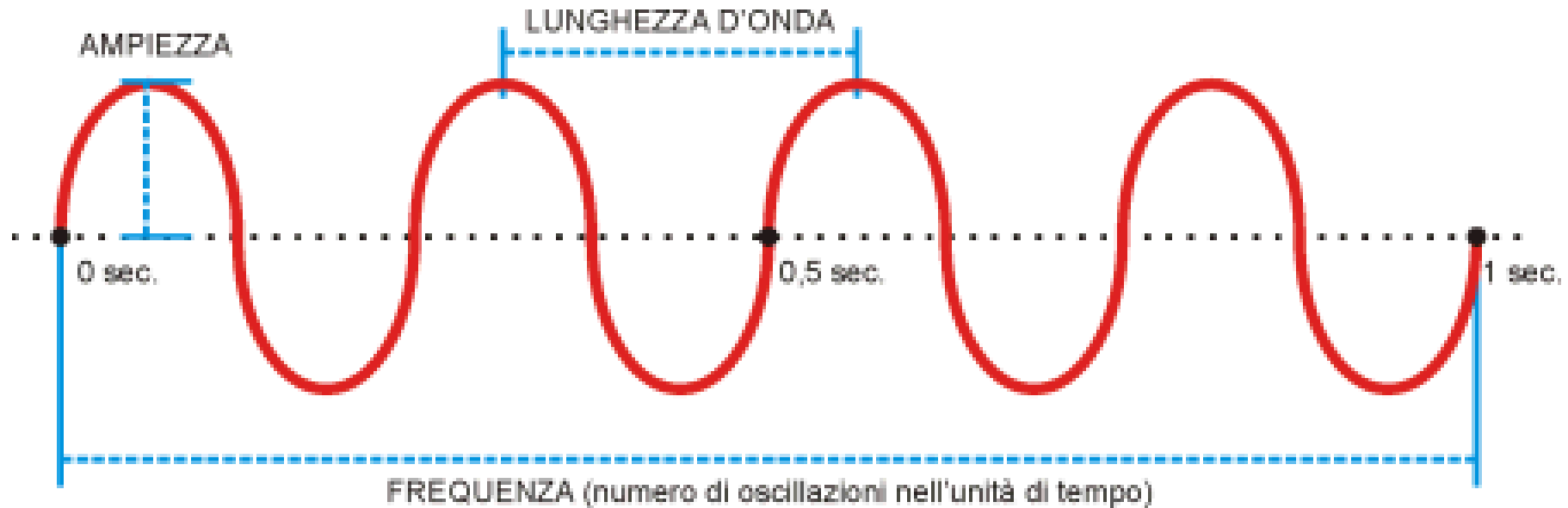
Considerando la **natura ondulatoria** delle radiazioni elettromagnetiche i parametri che le caratterizzano sono:

lunghezza d'onda (λ)

distanza tra due punti in cui l'onda raggiunge un massimo di intensità
(m e sottomultipli del metro ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$))

frequenza (ν) (Hertz)

numero di oscillazioni dell'onda nell'unità di tempo (sec)



ampiezza:

massimo valore raggiunto dall'onda

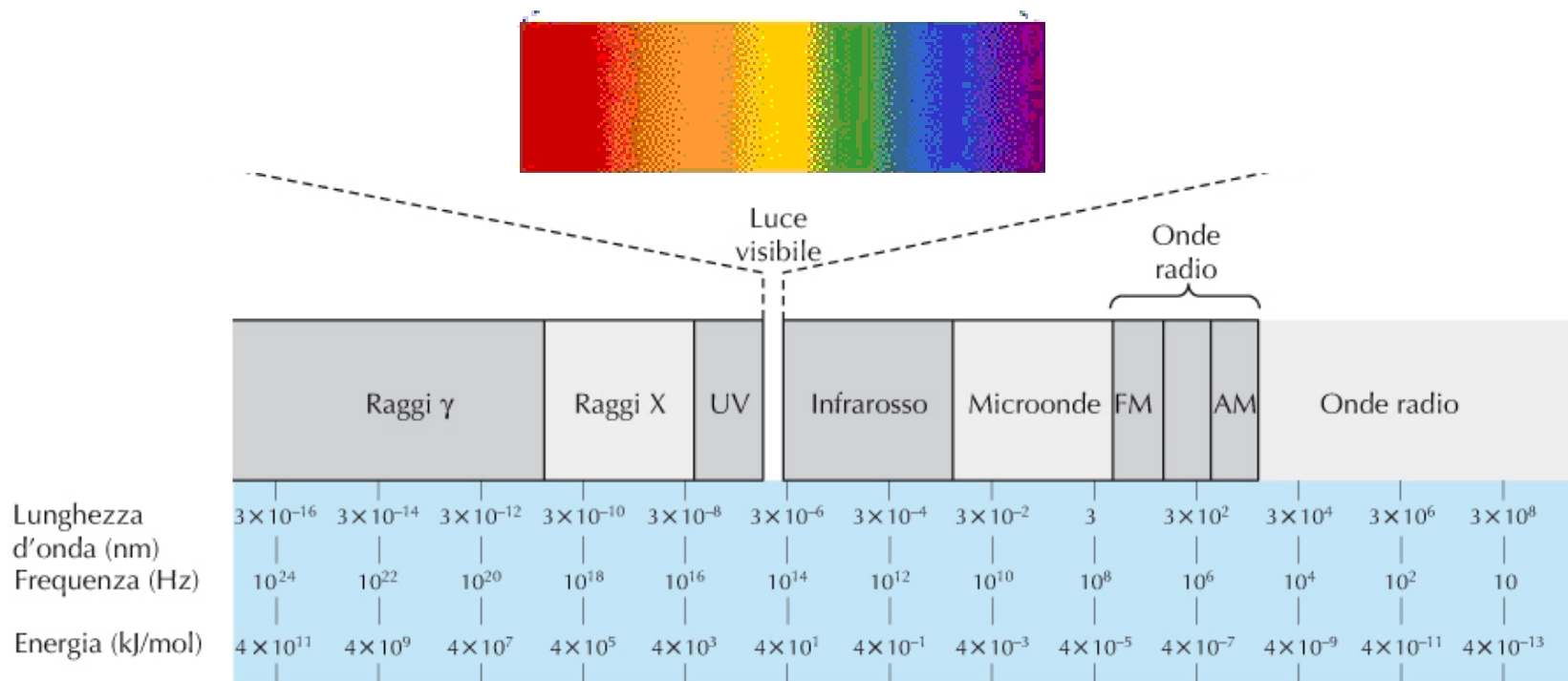
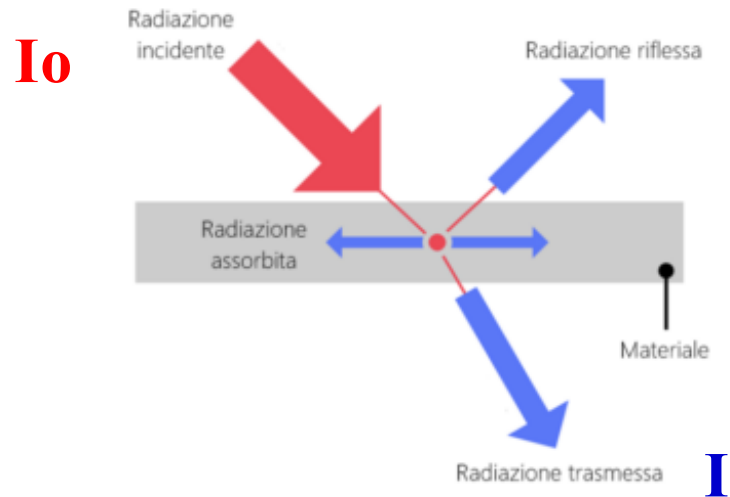


Figura 10.1 Lo spettro elettromagnetico.

Raggi X fino a 7 nm
 UV 180-340 nm
 VIS 340-800 nm
 IR 10^3 - 10^5 nm
 Onde radio 10^6 - 10^{10} nm

Quando una radiazione elettromagnetica colpisce una sostanza essa viene in parte riflessa, trasmessa e assorbita.



Se la sostanza è in soluzione, la luce riflessa è minima.

Esiste una relazione tra luce incidente (I_0) e luce trasmessa (I) dopo il passaggio attraverso la sostanza.

$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

↓

I = intensità della luce trasmessa dal campione
 I_0 = Intensità della luce incidente

Frazione di luce in grado di attraversare il campione senza essere assorbita

T = parametro adimensionale

Spettroscopia di Assorbimento UV/VIS

Trasmittanza (T) = $\frac{I}{I_0}$ I = intensità della luce trasmessa dal campione
Io = Intensità della luce incidente

↓

Frazione di luce in grado di attraversare il campione senza essere assorbita

T = parametro adimensionale

T può assumere valori compresi tra 0 e 1 oppure viene espressa in % e può assumere valori compresi tra 0% e 100% .

- se $I = I_0 \rightarrow T = I/I_0 = 1$ (100%) soluzione completamente trasparente (non assorbe la luce)
- se $I = 0 \rightarrow T = I/I_0 = 0$ (0%) soluzione completamente opaca

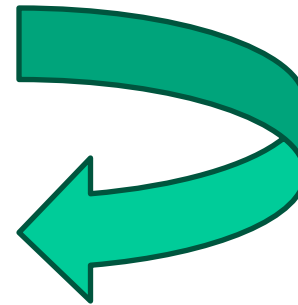
Dipende dalla
concentrazione del
campione

$$T = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}$$

l = cammino ottico, generalmente = 1 cm

ϵ = coefficiente di estinzione

c = concentrazione dell'analita



$$T = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}$$

Assorbimento (A)

$$A = -\log_{10} T$$

$$A = \log_{10} 1/T$$

legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

legge di Lambert-Beer

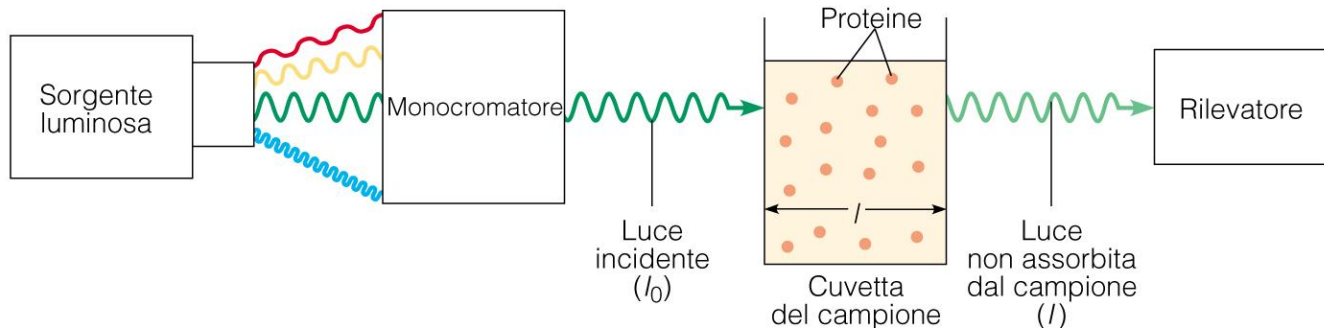
$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

l = cammino ottico, generalmente = 1 cm

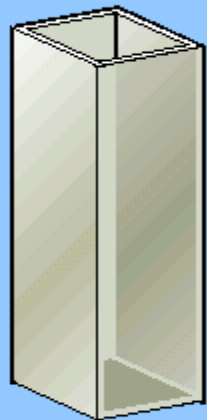
ε_{λ} = coefficiente di estinzione molare

c = concentrazione del campione

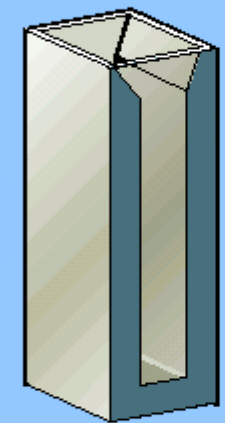
Cammino percorso dalla
luce attraverso il campione
cioè lo spessore della cella
(cammino ottico)



Cuvetta:
- contenitore
della soluzione
da analizzare



(a)



(b)

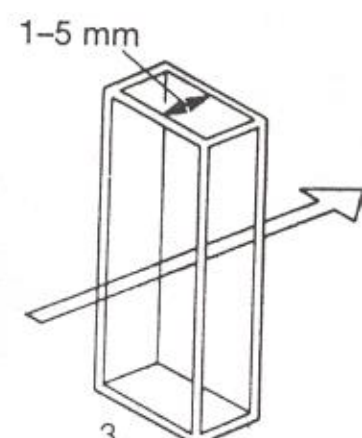
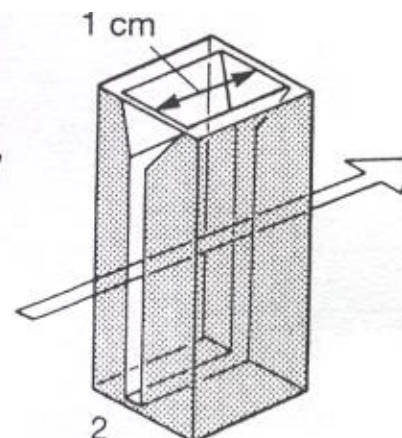
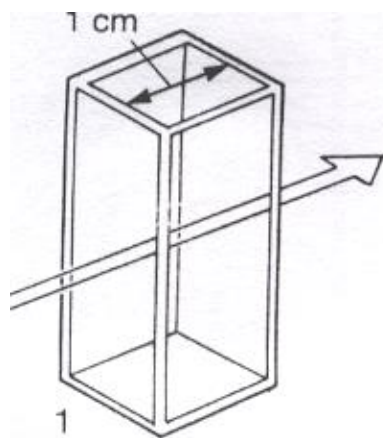


Cammino ottico (l) = distanza tra le due facce attraversate dalla radiazione

Parallelepipedo (facce laterali piane e parallele)

- vetro o plastica (VIS)

- quarzo (UV)



4 facce ottiche

oppure 2 facce ottiche + 2 facce zigrinate

legge di Lambert-Beer $A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$

l = cammino ottico, generalmente = 1 cm

ϵ_{λ} = coefficiente di estinzione molare [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] →

c = concentrazione del campione

Assorbimento di una
soluzione 1 M del
campione posto in una
cella di 1 cm di spessore

Si può esprimere anche come $\epsilon_{\lambda}^{1\%}$

1% (p/v)

In quale intervallo di concentrazioni è consigliato effettuare misure di Assorbimento?

La soluzione non deve essere:

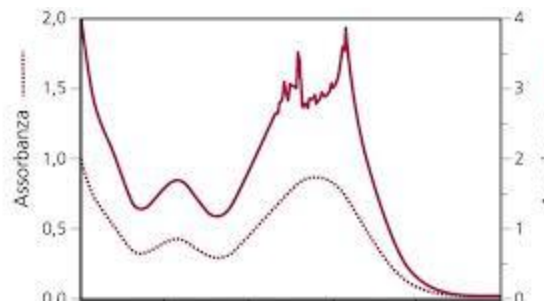
- Troppo concentrata

I (intensità luce trasmessa dal campione) ha un valore troppo elevato

- Troppo diluita

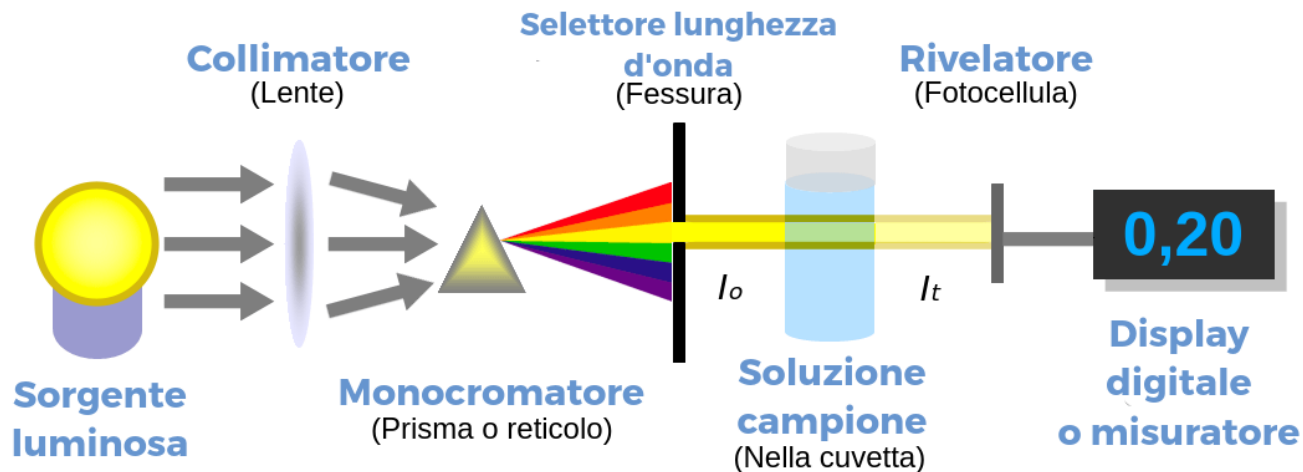
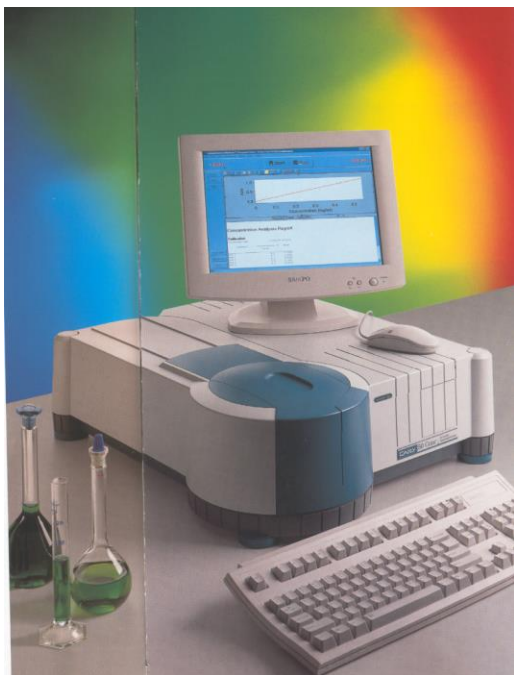
I (intensità luce trasmessa dal campione) ha un valore troppo piccolo

Determinazioni accurate della concentrazione si possono fare per range di assorbimento comprese tra 0.1 e 1.5



Regola generale:
non bisogna
superare i valori di
 $A > 1.5$

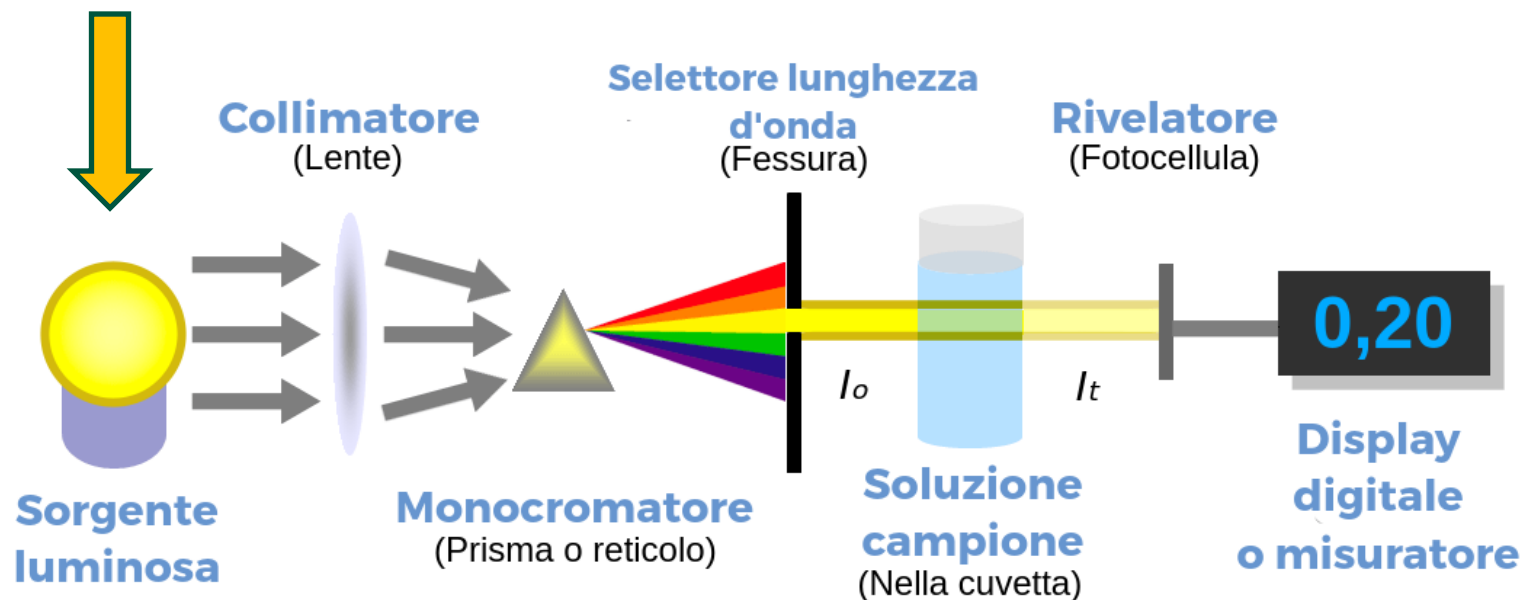
Strumenti per analisi di spettroscopia UV/VIS



- **Sorgente luminosa:** una lampada interna che genera la luce di misurazione.
- **Collimatore:** può essere uno specchio o una lente, a seconda della configurazione dello strumento. Piega la luce in modo che i fotoni viaggino parallelamente l'uno all'altro.
- **Prisma:** La rotazione del prisma modifica le lunghezze d'onda che cadono sul foro della scheda con la fessura, consentendo all'utente di selezionare una lunghezza d'onda da utilizzare.
- **Fessura o apertura:** in alcuni strumenti è possibile controllare la dimensione del foro attraverso il quale passa la luce (la "larghezza della fenditura"). Solo la luce che passa attraverso il foro cade sul campione. In questo modo è possibile selezionare una sezione specifica di lunghezze d'onda. Gli strumenti di qualità per la ricerca spesso consentono di modificare l'ampiezza della fenditura per ampliare la banda di lunghezze d'onda che colpiscono il campione.
- **Supporto campione:** è dove va inserita la cuvetta!
- **Rilevatore:** quasi sempre questi componenti sono celle fotovoltaiche e convertono l'intensità della luce che cade su di essi in una variazione di tensione in un circuito, convertendo così un segnale luminoso in un segnale elettrico che può essere interpretato da un software.

Insieme, i componenti del collimatore, del prisma e della fessura formano un'unità chiamata **monocromatore**.

Sorgente luminosa : dipende dalla regione spettrale esaminata



VIS: lampada al tungsteno (340 – 800 nm)

Filamento che riscaldato produce uno spettro continuo di radiazioni



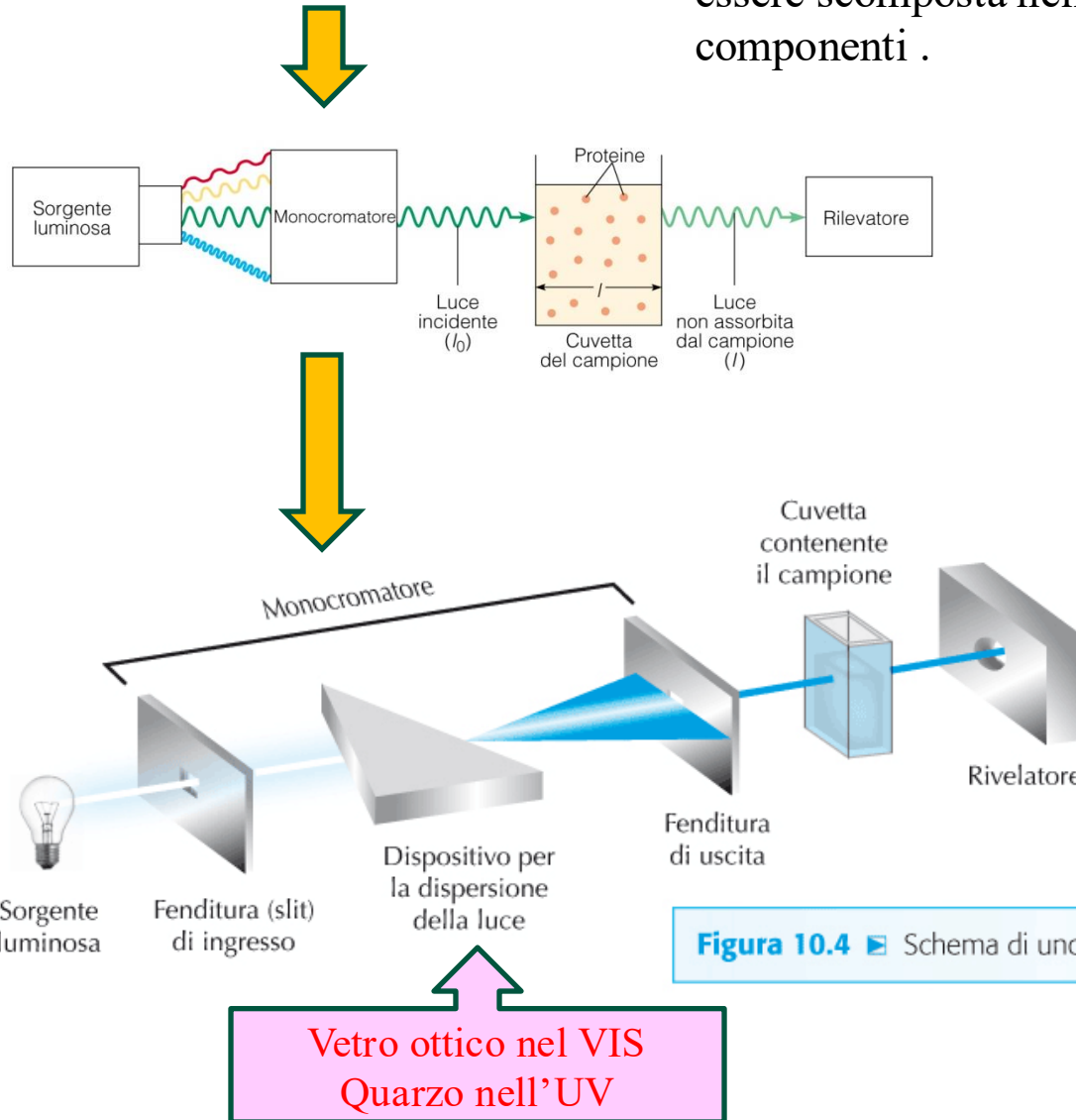
UV: lampada al deuterio o a idrogeno (200 – 340 nm)

Ampolla di quarzo che contiene il gas nella quale viene prodotta una scarica elettrica.
La scarica elettrica determina la dissociazione del gas e l'emissione di radiazioni UV



MONOCROMATORE: Selezionatore di radiazioni monocromatiche UV-VIS e permette di selezionare le λ desiderate

La luce emessa dalla sorgente deve essere scomposta nelle diverse componenti .



1) Monocromatore seleziona singole $\lambda \rightarrow$ **fotometro UV/VIS***

2) Monocromatore seleziona λ UV/VIS con variazione continua
prisma o reticolo di diffrazione
spettrofotometro UV/VIS

*Se monocromatore = filtro colorato
 $\rightarrow$ **colorimetro - solo VIS**

Figura 10.4 ▶ Schema di uno spettrofotometro a singolo raggio.

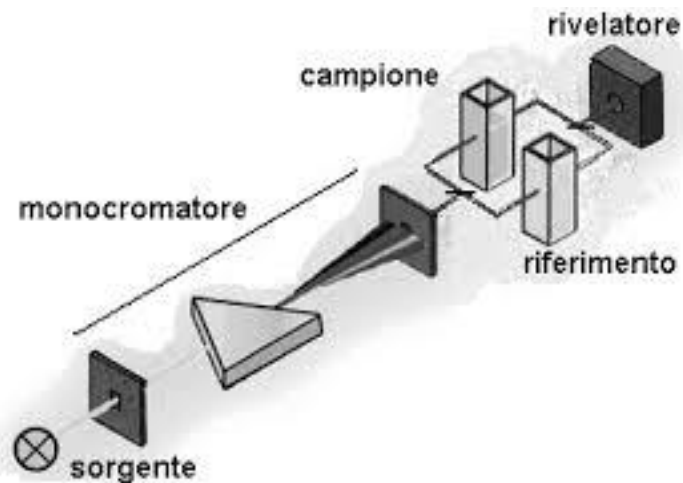
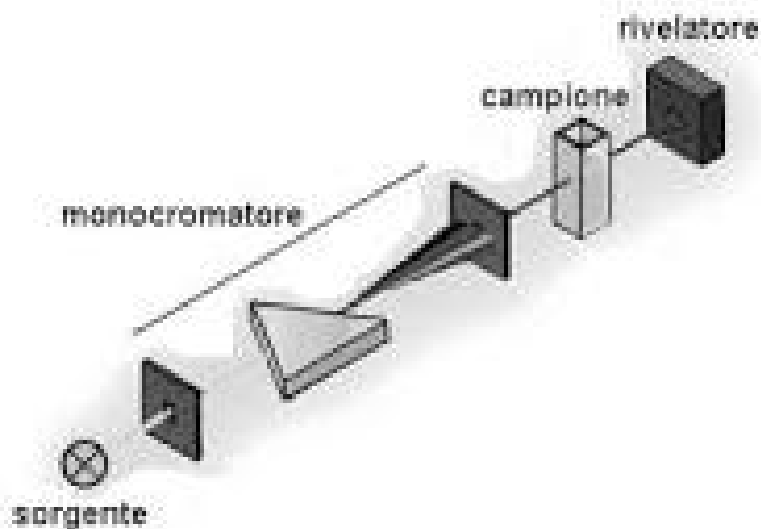
Tipi di Spettrofotometro

Esistono diversi tipi di spettrofotometro:

- spettrofotometri **monoraggio**
- spettrofotometri a **doppio raggio**
- spettrofotometri **multicanale** (solo UV-visibile)

Gli **spettrofotometri monoraggio**, sono usati prevalentemente in analisi quantitativa e non sono comodi per ottenere spettri di assorbimento. La difficoltà nell'ottenere uno spettro sta nel fatto che **per ogni misura ad ogni λ si deve ripetere l'azzeramento contro il bianco**, oppure registrare prima lo spettro del bianco, poi lo spettro del campione ed infine sottrarre al secondo il primo (procedura che può risultare macchinosa).

Negli **spettrofotometri a doppio raggio**, si ha invece un sistema che invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del bianco. Grazie a queste caratteristiche è possibile effettuare misure direttamente a qualsiasi λ senza ripetere azzeramenti, e soprattutto registrare continuativamente lo spettro. Per questo motivo il doppio raggio è preferito per le applicazioni qualitative sia in UV che in IR.



Analisi in Spettroscopia UV-VIS:

Misure di **Assorbimento a lunghezza d'onda fissa**

Fotometro



Analisi quantitative

Misure di **Assorbimento in funzione della lunghezza d'onda**

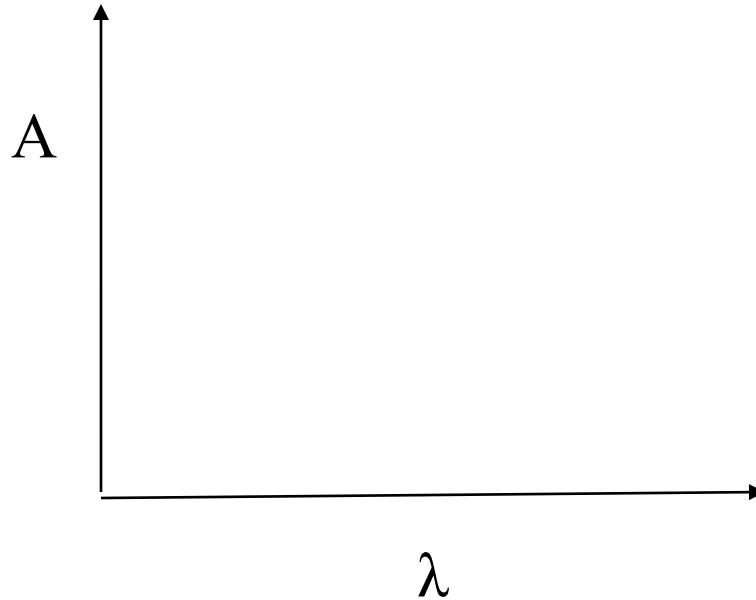
Spettrofotometro



Analisi qualitative e
quantitative
(spettro di Assorbimento)

ANALISI QUALITATIVE: spettro di assorbimento = grafico che riporta i valori di A di una soluzione di un dato analita in funzione della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica incidente.

Viene utilizzato per riconoscere gli analiti presenti in soluzione



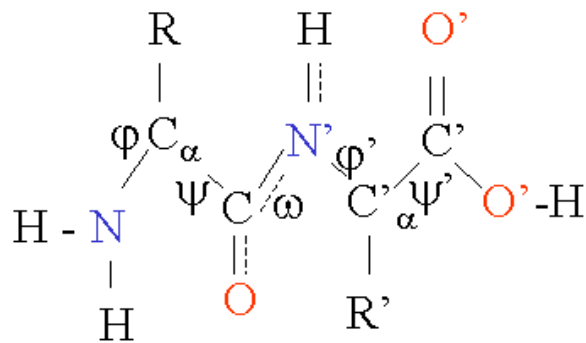
Cromoforo

Queste transizioni sono caratteristiche sia di composti organici sia di composti inorganici.

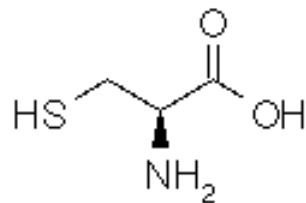
Il gruppo di atomi in cui approssimativamente sono localizzati gli orbitali molecolari tra cui avviene la transizione viene chiamato **cromoforo**

I cromofori più comuni sono caratterizzati da legami chimici multipli e sono detti perciò insaturi: tra essi il gruppo etilenico $C=C$, acetilenico $C\equiv C$, carbonilico $C=O$.

Cromofori nelle proteine

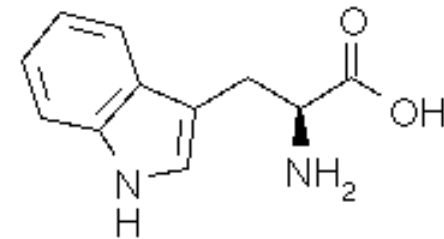


Il legame peptidico
(**214 nm, lontano UV**)



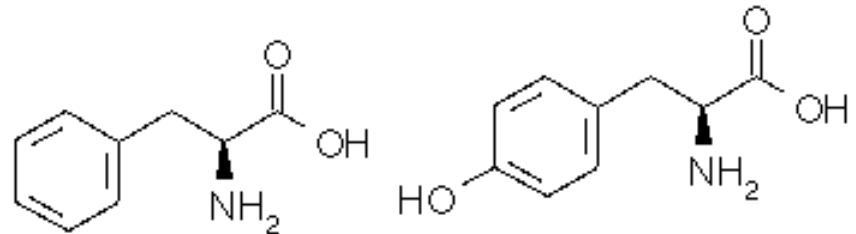
cys c Cystein

Ponte disolfuro
(**250 nm**)



trp w Tryptophan

Anello aromatico
(**280 nm, vicino UV**)



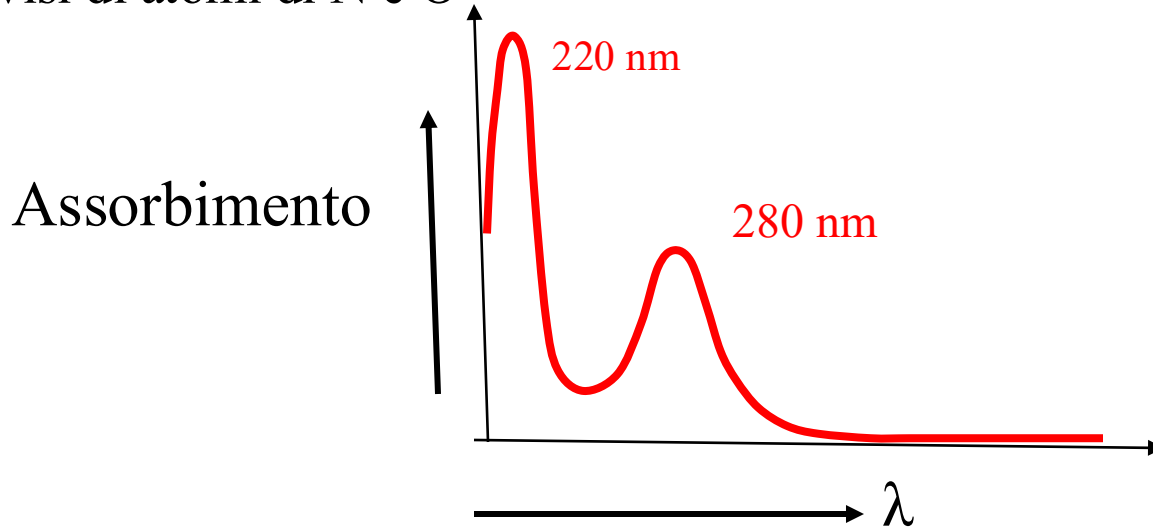
phe f Phenylalanin

tyr y Tyrosin

Maggiore è il numero dei doppi legami coniugati, maggiore è la λ di assorbimento

ANALISI QUALITATIVE: spettro di assorbimento =

Spettri di assorbimento UV/VIS derivano da transizioni degli elettroni più esterni, generalmente da elettroni delocalizzati π di $C=C$ e da doppietti elettronici non condivisi di atomi di N e O



LEGAME PEPTIDICO:

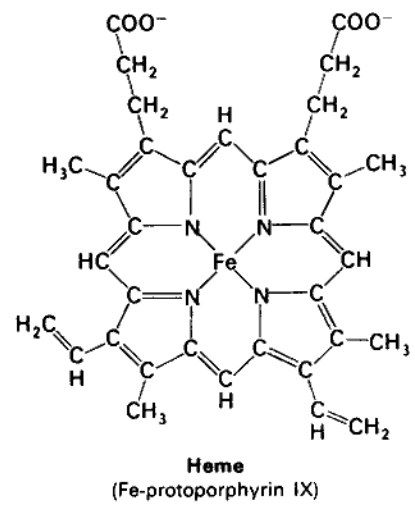
- Transizione elettroni di legame $\pi \rightarrow$ assorbimento di radiazioni con $\lambda = 190 \text{ nm}$
- Doppietti elettronici non di legame su O, N, S $\rightarrow$ assorbimento di radiazioni con $\lambda = 210\text{-}220 \text{ nm}$

AA AROMATICI:

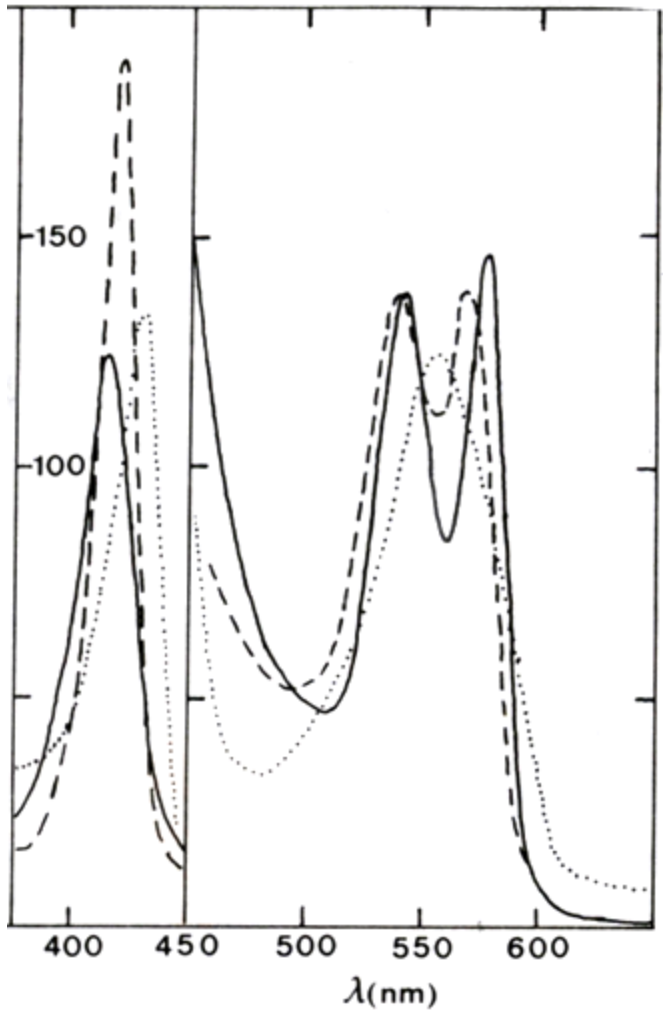
- Phe, Tyr, Trp assorbono a $\lambda > 230 \text{ nm}$ p.es 260 nm , 280 nm

Spettro di Assorbimento dell'EMOGLOBINA: Gruppi cromofori:

VIS •Gruppi prostetici (proteine coniugate): p.es gruppo eme 410-415 nm, 500-600 nm



Maggiore è il numero dei doppi legami coniugati, maggiore è la λ di assorbimento ->VIS



Oxy-Hb (—)
Deoxy-Hb (.....)
Carboxy-Hb (-----)

ANALISI QUANTITATIVE

Legge di Lambert-Beer

$$A = \underline{\epsilon} \cdot l \cdot \underline{c}$$

1) Determinazione della concentrazione di una **soluzione di un analita puro** se si conosce il valore di ϵ dell'analita

2) Determinazione della concentrazione di una **soluzione di un analita puro** se **non** si conosce il valore di ϵ dell'analita

1) Determinazione della concentrazione di una soluzione di un analita puro se si conosce il valore di ϵ dell'analita

Se ϵ_λ è noto ????

ϵ_λ = coefficiente di estinzione molare [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

$$\epsilon_{540}^{\text{mM}} \text{HbO}_2 = 13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

risulta che $A_{540} = 13.5$

Assorbimento di una soluzione
1mM di HbO₂ e cammino ottico 1cm

Calcolare la concentrazione di una soluzione di Hb con un $A_{540} = 0.135$

legge di Lambert-Beer **$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$**

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

Se $l = 1 \text{ cm}$

$$c = \frac{A}{\varepsilon}$$

$$c = \frac{0.135}{13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = 0.01 \text{ mM}$$

ANALISI QUANTITATIVE

Determinazione concentrazione totale di **proteine in miscela** : ??????

legge di Lambert-Beer?

NO

coefficiente di estinzione ?????

Determinazione della concentrazione delle proteine totali

- Metodo del **Biureto**
- Metodo di **Lowry**
- Metodo di **Bradford**
- Metodo dell'**acido bicinconinico (BCA)**

•Metodo di Bradford

si sfrutta la variazione nello spettro di assorbimento tra:

- soluzione in ambiente acido di Coomassie Brilliant Blue
- soluzione in ambiente acido di Coomassie Brill Blue + proteine

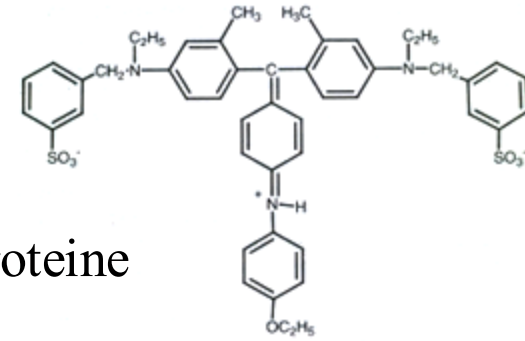
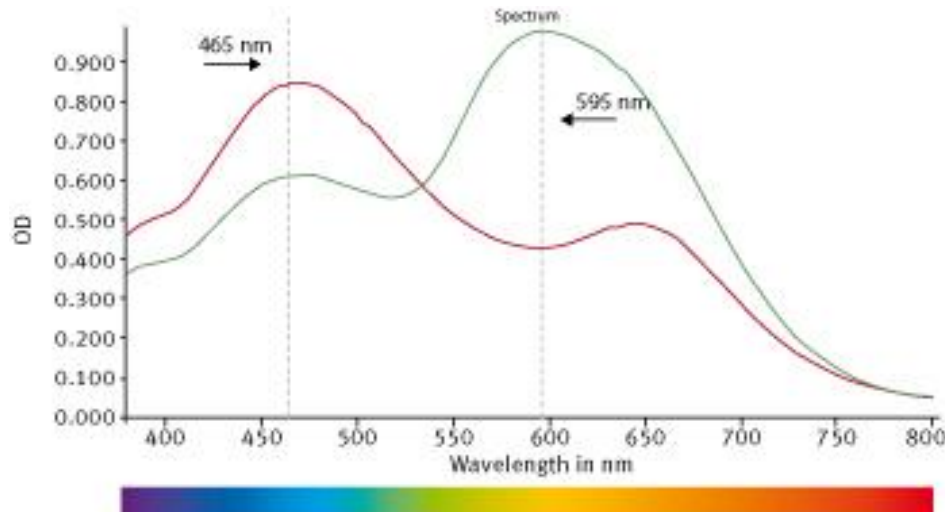


Figura 3.3 Coomassie® Brilliant Blue G-250.



In ambiente acido forma cat. Coomassie
Complesso Coomassie-Proteine

- Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue* G-250 alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (Bradford, 1976)
- Il metodo è un semplice procedimento costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina l'assorbanza a 595 nm

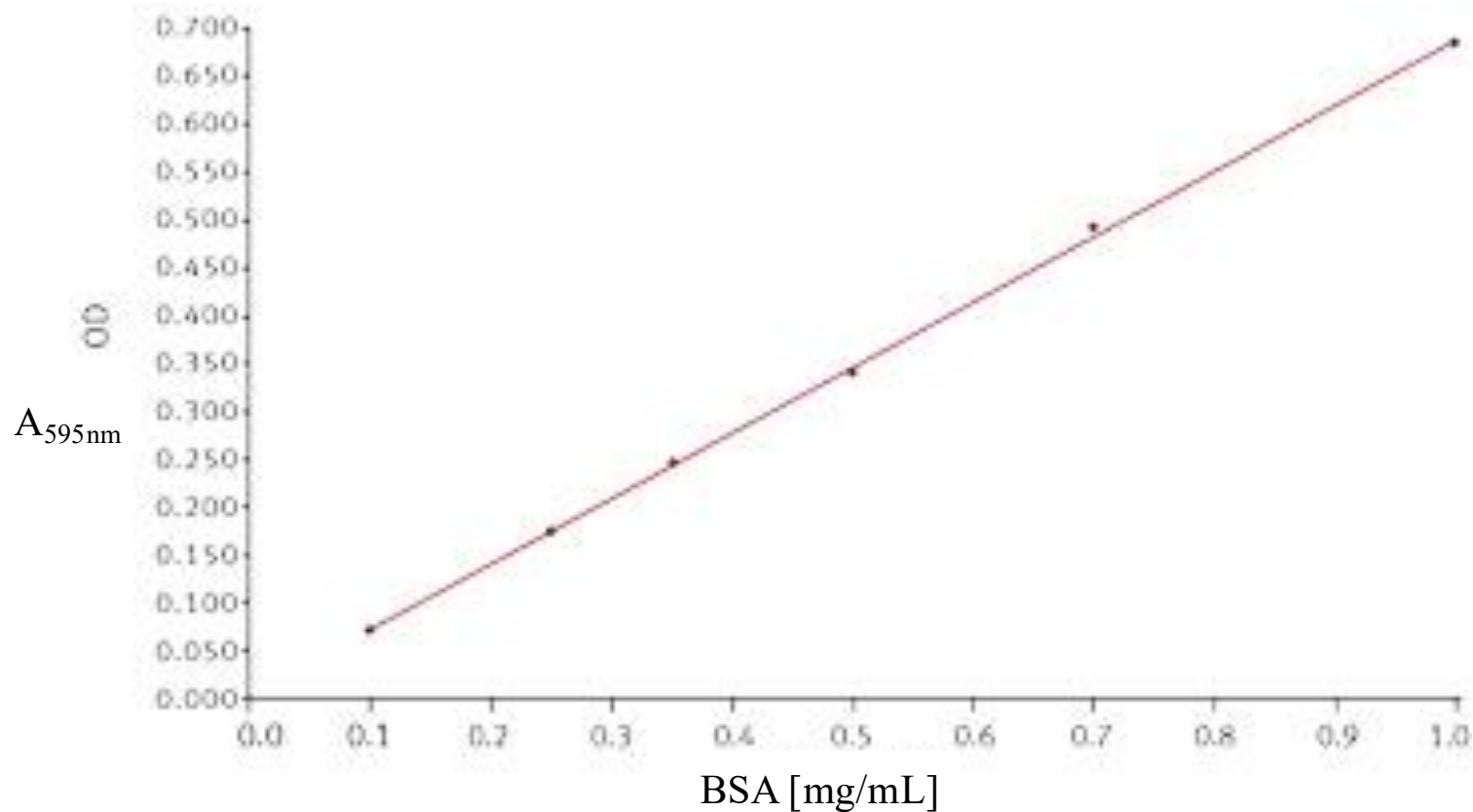
- Interazioni elettrostatiche tra SO_3^- del Coom Brill Blue con residui basici delle proteine (Arg)
- Interazioni idrofobiche con Tyr Trp Phe

- La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione.
- Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

- Metodo di **Bradford**

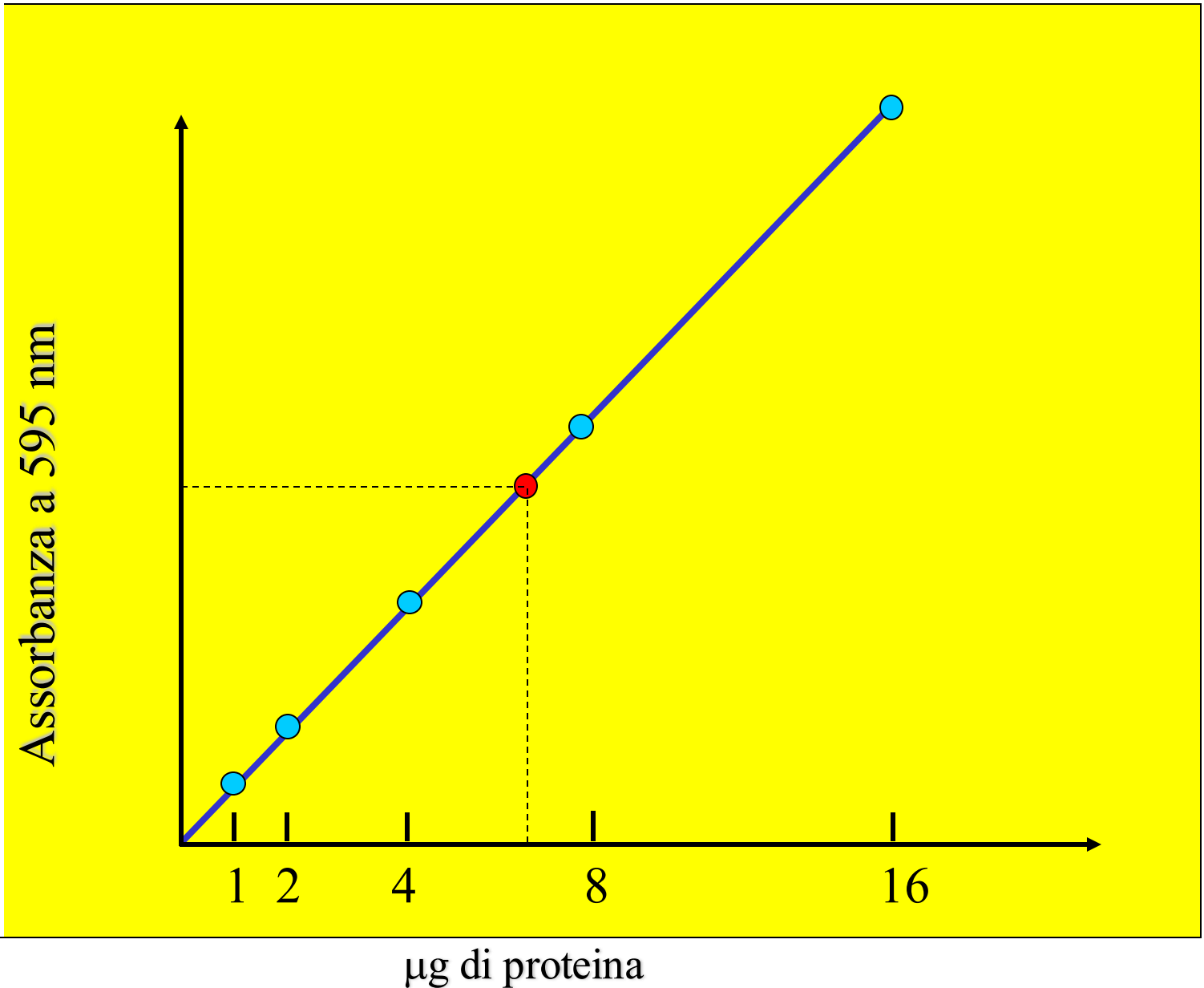
Retta di taratura con standard relativo

BSA : Albumina serica bovina

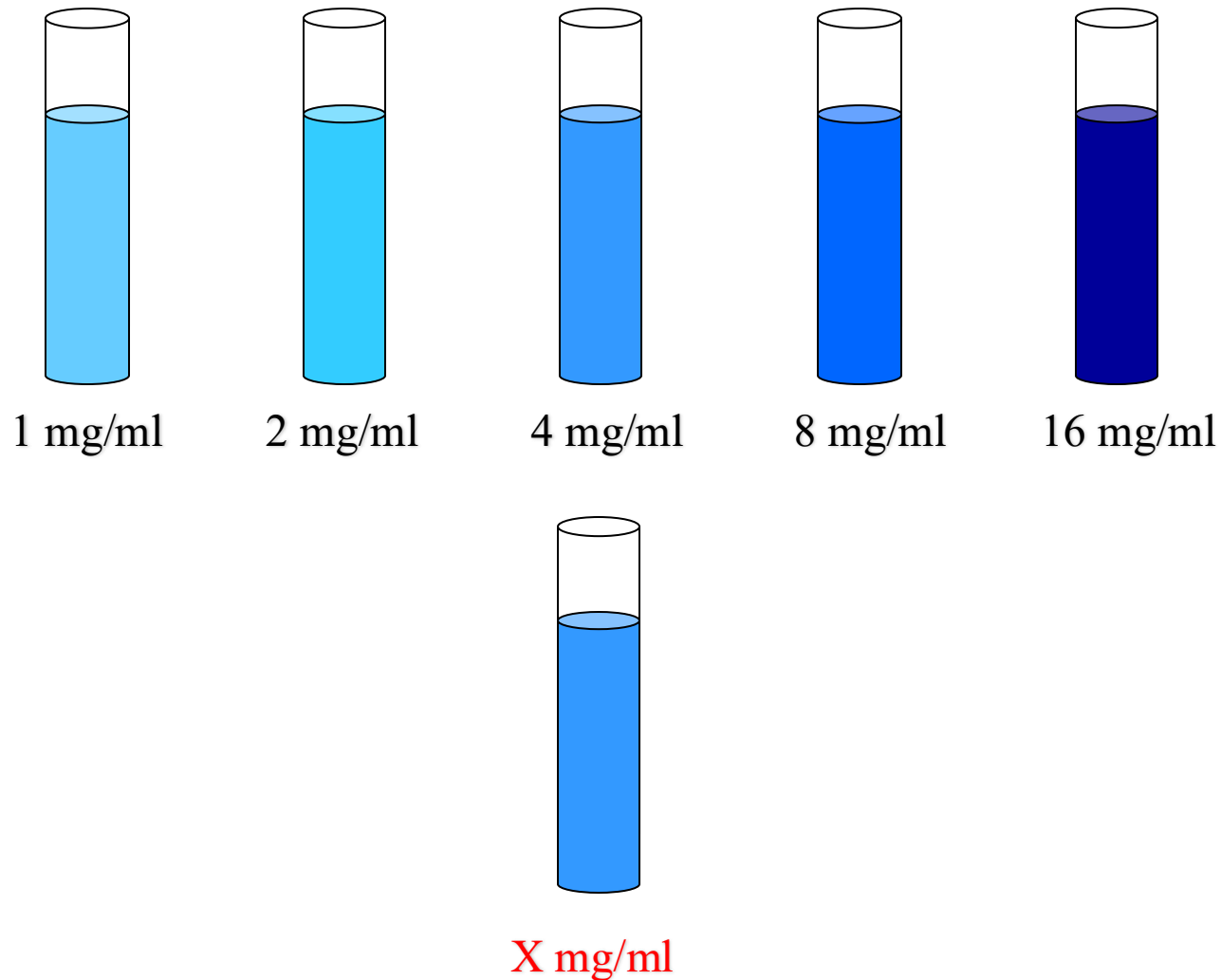


- Metodo di **Bradford**

BSA : Albumina serica bovina



Poiché l'intensità della colorazione non è lineare in una vasta gamma di concentrazioni di proteine, si raccomanda fortemente di preparare una curva *standard* per ogni saggio.



VANTAGGI DEL METODO

- ☐ Semplicità di preparazione del reattivo
- ☐ Sviluppo del colore immediato
- ☐ Stabilità del complesso
- ☐ Elevata sensibilità (fino a 22 µg/ml)
- ☐ Il saggio è compatibile con la maggior parte dei tamponi comuni, degli agenti denaturanti come guanidina·HCl 6M e urea 8 M e dei preservanti come sodio azide

SVANTAGGI

- ☐ Il reagente colora le cuvette ed è piuttosto difficile da rimuovere
- ☐ La quantità di colorante che si lega alla proteina dipende dal contenuto in aminoacidi basici → ciò rende difficile la scelta di uno *standard*
- ☐ Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida

Protocollo:

- 1) Utilizzando una soluzione a concentrazione nota di Albumina bovina (**2 mg/ml**)
- 2) preparare una serie di diluizioni a concentrazione nota
- 3) Miscelare Albumina bovina e Coomassie Brilliant Blue
- 4) Vorticare
- 5) Incubare a temperatura ambiente per 5 min
- 6) Misurare il valore di $A_{595 \text{ nm}}$ delle soluzioni a concentrazione nota e della soluzione a concentrazione incognita

Riportare in un grafico i dati ottenuti per calcolare il valore di concentrazione incognito