Metodologie biochimiche

Esame orale; relazione di laboratorio scritta a mano con grafici su carta millimetrata, dalla cui discussione inizierà l'esame orale.

"Metodologie biochimiche", Bonaccorsi di Patti-Contestabile-Di Salvo, Ed. Ambrosiana

Spettrofotometria

Una radiazione elettromagnetica è costituita da un'onda elettrica e da un'onda magnetica; i piani di queste due onde sono perpendicolari e le due onde sono in fase, ovvero a un massimo dell'onda magnetica corrisponde un massimo dell'onda magnetica e lo stesso accade per i minimi.

Un'onda elettromagnetica è caratterizzata da vari parametri, in particolare la lunghezza d'onda (la distanza tra due punti uguali dell'onda) e frequenza. La frequenza si indica con v ed è costante; tra frequenza e lunghezza d'onda c'è un rapporto di proporzionalità inversa tale che $v=c/\lambda$.

Un altro parametro è l'energia che l'onda possiede e vale $E=hv$: all'aumentare della frequenza aumenta l'energia (con h=costante di Planck).

Le onde radio sono le onde a lunghezza maggiore fino ad arrivare ai raggi gamma che sono le onde con lunghezza d'onda minore. Le onde ultraviolette sono alla base delle tecniche spettrofotometriche.

Lo spettro visibile ha lunghezze d'onda comprese tra 400 e 800 nm; al di sopra abbiamo l'infrarosso e al di sotto abbiamo gli UV. Ad ogni lunghezza d'onda è associato un colore dal violetto al rosso.

Nel corso dell'evoluzione si sono evoluti dei sistemi per la percezione di queste lunghezze d'onda, in particolare strutture recettoriali che captano queste onde attraverso particolari molecole che reagiscono con esse convertendole in un segnale elettrico. I colori vengono percepiti perché l'oggetto colpito dalla radiazione assorbe il colore complementare a quello che alla fine risulta essere il colore che vediamo (ad esempio la clorofilla colora le foglie di verde perché assorbe la radiazione rossa a 700 nm).

Una molecola biatomica ha vari livelli energia: i livelli elettronici a energia maggiore, i livelli vibrazionali e i livelli rotazionali a energia minima. Questi livelli energetici sono quantizzati.

Quando questa molecola interagisce con una radiazione elettromagnetica, se l'energia del fotone è uguale all'energia che intercorre tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato, la molecola può assorbire questa energia eccitandosi (fenomeno dell'assorbimento). L'energia necessaria per far cambiare lo stato elettronico è maggiore rispetto all'energia necessaria per far cambiare lo stato vibrazionale o rotazionale; le radiazioni infrarosse hanno un'energia sufficiente per modificare gli stati rotazionali e vibrazionali: in chimica organica si utilizzano queste vibrazioni per ottenere informazioni sulle molecole in quanto a seconda dei vari gruppi che costituiscono una molecola si hanno stati rotazionali e vibrazionali diversi. Le radiazioni nello spettro del visibile e UV modificano invece i livelli elettronici.

Alcune molecole assorbono meglio energia rispetto ad altre: ad esempio le molecole aromatiche come il benzene sono generalmente stabili, ma alcune configurazioni elettroniche favoriscono l'assorbimento, ad esempio NAD con un anello di nicotinammide che perde l'aromaticità quando viene ridotto a NADH assorbe energia elettromagnetica più facilmente.

Se $hv=\Delta E$, si ha assorbimento di energia e passaggio allo stato eccitato, che è meno stabile rispetto agli altri; quando assorbe energia, la molecola successivamente la rilascia tornando allo stato fondamentale. Il rilascio di energia avviene attraverso il calore (assorbimento vero e proprio) o attraverso la fluorescenza: la molecola assorbe la radiazione elettromagnetica e nel ritornare allo stato fondamentale emette una radiazione elettromagnetica che ha un'energia più bassa di quella assorbita, ovvero a lunghezza d'onda maggiore; ci sono molecole che assorbono nell'ultravioletto ma che poi la riemettono nello spettro del

visibile. Tra l'assorbimento e l'emissione dell'energia si ha un intervallo di tempo durante il quale parte dell'energia può essere dissipata nei moti rotazionali e vibrazionali.

Infine abbiamo la fosforescenza, con un tempo di emissione della luce per un tempo prolungato rispetto alla fluorescenza: nel passare dallo stato fondamentale allo stato eccitato si ha nell'elettrone un cambiamento di spin che deve nuovamente essere invertito per tornare allo stato fondamentale; poiché il cambio dello spin non è un evento frequente, la radiazione elettromagnetica viene riemessa per tempi lunghi (finché non viene nuovamente invertito lo spin).

In un recipiente contenente molecole in grado di assorbire energia a una certa lunghezza d'onda si fa passare una certa onda elettromagnetica che è viene assorbita dalle molecole (maggiore è la concentrazione maggiore sarà l'energia assorbita): se si passa da un'intensità I_0 a un'intensità I (la prima assorbita dalle molecole e la seconda emessa dalle molecole), si ottiene sperimentalmente che $I=I_0 x\ 10^{-\varepsilon cd} \rightarrow \log(I_0/I)=\varepsilon cd$ che è una grandezza definita come assorbanza descritta dalla legge di Lambert-Beer.

Se ad esempio misuro un'assorbanza di 1, significa che $\log(I_0/I)=1$, che si ha per $I_0/I=10$: ciò significa che il 90% della radiazione iniziale è stato assorbito dalle molecole e il 10% è invece stato emesso. Per A=2, il rapporto vale tra le intensità vale 100, per cui il 99% è stato assorbito e l'1% emesso.

$A=\varepsilon cd$ dove ε=coefficiente di estinzione, c=concentrazione [mol/L] e d=cammino ottico [cm].

L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione e al cammino ottico.

Il coefficiente di estinzione dipende dalla natura del soluto in soluzione; infatti a seconda del tipo di legame, della struttura e dei gruppi presenti nella molecola cambia il grado di assorbimento dell'energia. L'unità di misura è $M^{-1}xcm^{-1}$ (perché l'assorbanza è un numero puro e quindi le altre unità di misura devono annullarsi tra loro); esso esprime l'assorbanza di una soluzione 1 M con cammino ottico di 1 cm.

Talvolta nella spettrofotometria di assorbimento si considera la trasmittanza T, che è il rapporto I/I_0 oppure la trasmittanza percentuale T% data dal rapporto I/I_0 per 100.

Tra assorbanza e trasmittanza la esiste la relazione $A=-\log T=-\log 1/T$.

Misurare la trasmittanza è più semplice perché inizialmente il calcolo del logaritmo senza calcolatrice era complicato, ma conviene usare l'assorbanza perché essa esprime la concentrazione con una relazione lineare, mentre con la trasmittanza il rapporto con c non è lineare ma una curva, più difficile da interpolare.

La legge di Lambert-Beer è valida solo se la percentuale di molecole assorbenti in ciascuno strato di campione perpendicolare alla radiazione incidente è modesto e se i singoli centri assorbenti si comportano indipendentemente l'uno dall'altro. In altre parole la legge di Lambert-Beer è valida solo per le soluzioni diluite; questo perché in una soluzione concentrata non tutte le molecole sono in grado di assorbire, ovvero la radiazione non viene percepita in maniera uniforme da tutte le molecole perché esse possono schermarsi a vicenda.

Graficamente l'effetto è una diminuzione della pendenza e la retta diventa quindi curvilinea.

Nei limiti di validità della legge di Lambert-Beer vale il principio di addittività delle assorbanze: se ho più di una specie che assorbe in soluzione, $A=A_1+A_2+A_3+...+An$.

Nello spettrofotometro troviamo una sorgente di luce, un monocromatore per selezionare con quale lunghezza d'onda emessa dalla lampada far interagire la soluzione (esso rende monocromatica la luce emessa dalla lampada), un porta-cuvette, un fototubo, che si basa sul principio fotoelettrico a livello del quale si ha la trasformazione di un fotone in un elettrone, ovvero della luce in impulso elettrico, e infine si trova lo strumento che misura la corrente elettrica e calcola il valore in assorbanza.

Le sorgenti luminose devono emettere nel range del visibile, quindi tra 400 e 1000 nm, come una lampada a tungsteno (350-1000 nm), o nell'UV tra 400 e 190 nm, come una lampada a deuterio, in cui il gas emette radiazione elettromagnetica per reazione con il calore; entrambe sono lampade costruite in maniera tale da rendere l'emissione luminosa il più costante possibile, e ad esempio quelle a tungsteno sono riempite di gas in maniera tale da complessare il metallo che evapora impedendo la deposizione sulla lampada. Le lampade si accendono entrambe e uno specchio serve a selezionare quale lampada usare in base alla lunghezza d'onda scelta.

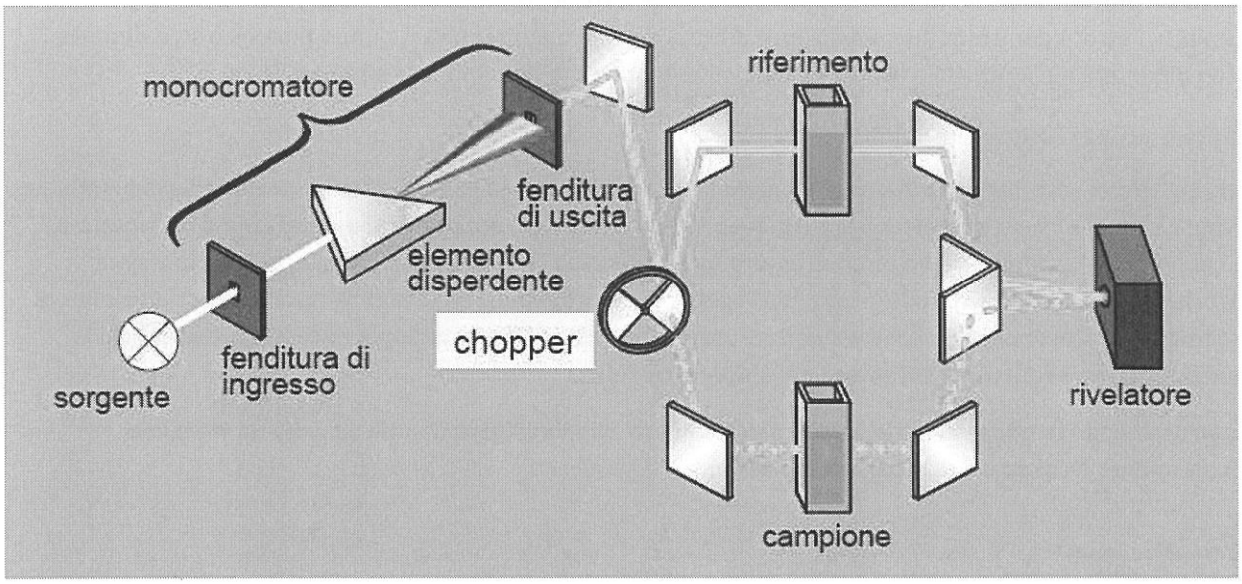
Nel monocromatore per scomporre la luce bianca e selezionare la lunghezza d'onda c'è un prisma, ma negli strumenti più sensibili vengono utilizzati reticoli di diffrazione.

Strumenti più semplici rispetto agli spettrofotometri sono i colorimetri, che coprono le lunghezze d'onda del visibile.

Cuvette di vetro e quarzo si usano per misurazioni nel visibile; per misurazioni nell'UV si devono usare necessariamente cuvette di quarzo perché vetro e plastica risultano opachi agli UV.

Per misurare l'assorbanza lo spettrofotometro misura un'intensità in entrata e una in uscita (ad esempio si può usare un bianco per misurare l'intensità in entrata).

Gli spettrofotometri possono essere a singolo o a doppio raggio.



Spettrofotometro a doppio raggio

Il chopper è uno specchietto che ruota molto rapidamente che prima invia il raggio al riferimento e subito dopo al campione, i due raggi arrivano poi al rivelatore che sottrae l'intensità del riferimento a quella del campione per calcolare l'assorbanza relativa al campione senza considerare l'assorbanza del reattivo utilizzato per la colorazione.

Per campo dinamico di uno strumento di misura si intende l'intervallo di valore di misura compreso tra il valore minimo e il massimo misurabili con una determinata accuratezza e precisione. Nel caso dello spettrofotometro, il campo dinamico è l'intervallo tra l'assorbanza minima e quella massima misurabile con un errore percentuale dell'1%.

L'errore nel caso dell'assorbanza è il rapporto tra la differenza tra assorbanza misurata Am- assorbanza teorica At e l'assorbanza teorica At (x100); l'assorbanza teorica è calcolabile attraverso la legge di Lambert-Beer e la curva ottenuta (con y=errore e x=Am) è una sorta di parabola: prima discendente fino a un punto

di minimo e poi ascendente, ovvero per valori di Am molto grandi o molto piccoli l'errore è elevato; sull'asse delle ordinate individuo il valore 1% al di sotto del quale ho il campo dinamico dello spettrofotometro.

A bassi valori di assorbanza, il campo dinamico è limitati dal rumore di fondo dello strumento, che dipende dalle fluttuazioni statistiche nell'intensità di luce emessa dalle lampade e dal rumore elettronico dell'amplificatore del fotorivelatore; questi fattori introducono un'incertezza nel valore di zero della scala di assorbanza. Ad alti valori di assorbanza, il campo dinamico è limitato da un altro fattore detto luce diffusa o stray light, definita come la quantità di luce misurata dal fotorivelatore al di fuori di quella trasmessa lungo l'asse ottico.

Esempio 1: per azzerare lo spettrofotometro dobbiamo avere A=0, ovvero il logaritmo del rapporto tra le due intensità vale 1, ad esempio un amplificatore dà 1000 e l'altro per il rumore di fondo dà 1001, per cui il rapporto non sarà 1 ma A diventerà -0,0004; stessa cosa se non ci fosse rumore di fondo ma l'emissione della lampada non fosse costante. La quarta cifra decimale in uno spettrofotometro non rimane costante durante la lettura ma oscilla.

Esempio 2: I_0=1000 e I=100 per cui A=1 (At), ma Am tenendo conto della luce diffusa sarà log(1000/101) perché è come se il fototubo ricevesse un protone in più, quindi A=0,996, con errore uguale a 0,4%; per I=10, se il fototubo riceve un protone in più avrò Am=1,959 anziché 2, con errore 2%; per I=1, se il fototubo riceve un protone in più avrò Am=2,699 anziché 3, con errore 10% → più aumenta l'assorbanza più aumenta l'errore per il fenomeno della luce diffusa. Se voglio aumentare il campo dinamico strumentale, devo diminuire il più possibile la luce diffusa, ovvero privo di riflessioni nel cammino ottico.

Applicazioni della spettrofotometria

Uno spettro di assorbimento di una sostanza è il grafico che riporta l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda λ. Quello che si può ottenere è il grafico di una curva che rappresenta la variazione di A rispetto a λ, in cui possiamo evidenziare un picco di assorbanza che indica la lunghezza d'onda a cui si ha massima assorbanza: a λmax corrisponde εmax; negli spettri di assorbimento è preferibile riportare il coefficiente di estinzione piuttosto che l'assorbanza perché usando questo coefficiente non è necessario che indichi la concentrazione in quanto è sottintesa nella definizione di ε.

Negli spettri posso anche avere più di un picco e quindi due lunghezze d'onda a cui ho un massimo assorbimento a cui posso associare due massimi ε.

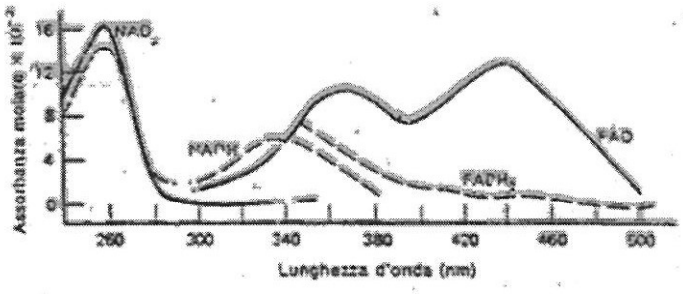


Fig. 4-59. Spettri di assorbimento dei coenzimi niacinici e flavinici. La forma ridotta del NAD (NADH) presenta un forte assorbimento a 340 nm, mentre le forme ossidate dei coenzimi flavinici mostrano un forte assorbimento a 450 nm. Pertanto, la velocità di riduzione del NAD^+ può essere seguita osservando la cinetica di aumento dell'assorbimento della luce a 340 nm e quella del $FADH_2$ dalla diminuzione di assorbimento a 450 nm.

master COPY COPISTERIA

NAD+ e NADH assorbono entrambi a 260 perché entrambi hanno una porzione adeninica che assorbe a 260 nm; il NADH rispetto al NAD+ assorbe anche a 340 nm perché con la riduzione ha perso l'aromaticità (che impedisce l'assorbimento a quelle lunghezze d'onda).

Le proteine assorbono nelle lunghezze d'onda degli UV perché è a queste lunghezze d'onda che assorbono gli aa, soprattutto il triptofano, che è l'aa che assorbe di più e che ci permette di determinare in maniera rapida seppur grossolana la concentrazione proteica in un campione, misurandone l'assorbanza a 280 nm (lunghezza d'onda a cui assorbe il triptofano). Per misurare la concentrazione di acidi nucleici si effettuano misurazioni a 260 nm.

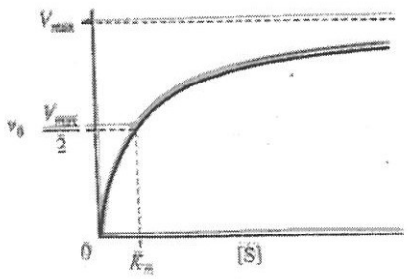
Conoscendo lo spettro di assorbimento di un composto possiamo calcolare la concentrazione, misurando l'assorbanza a λmax e applicando la legge di Lambert-Beer conoscendo il coefficiente di estinzione a λmax.

Se non conosco il coefficiente di estinzione oppure esso varia a determinate condizioni di pH o temperatura, posso fare uso di uno standard, ovvero una soluzione a titolo noto di cui conosco la concentrazione: misuro l'A dello standard e quella del campione di cui conosco la concentrazione, faccio il rapporto tra le due misure e ottengo che il rapporto tra le due assorbanze è uguale al rapporto tra le due concentrazioni applicando la legge di Lambert-Beer; per cui la concentrazione dei campione sarà uguale al rapporto tra A del campione e A dello standard moltiplicato per la concentrazione dello standard. Un limite di questo metodo è il fatto che effettuando una sola misura può verificarsi un errore che si riflette sui risultati che calcolo: per minimizzare l'errore posso fare più misure a concentrazioni diverse diluendo lo standard (primo lab biochimica, le proteine non assorbono e devo aggiungere un reattivo per poter misurare A), da cui costruisco una retta di taratura (A deve entrare nel campo dinamico e il valore della concentrazione deve rientrare nella retta di calibrazione).

Determinazione della concentrazione proteica

- Metodo del biureto: è il metodo sopra citato, semplice anche se non molto sensibile; si basa sulla formazione di un complesso blu-violetto quando al campione proteico di aggiunge una soluzione alcalina di solfato di rame. Gli aa e i dipeptidi non danno questa reazione.
- Metodo di Lowry: si basa sul fatto che i fenoli riducono il complesso fosfotungstomolibdico (reattivo di Folin-Ciocalten) in un prodotto di intenso colore blu. Nelle proteina la reazione è essenzialmente dovuta alla presenza di tirosina. Le cisteine, le cistine e le istidine sono anch'esse reattive ma in maniera minore. Il metodo è più sensibile del primo, ma manca in specificità.

Per misurare la concentrazione di enzimi in soluzione si deve tener conto che gli enzimi, a meno che non siano purificati, si trovano in soluzione insieme ad altre proteine perché vengono estratti da tessuti o colture cellulari in cui sono presenti anche altre sostanze. Posso valutare però la velocità della reazione catalizzata dall'enzima per misurare la concentrazione dell'enzima stesso.



$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

master COPY LUPISTERIA

SE [S]>> K_M, $v_0 \cong V_{max} = k_{+2}[E_T]$ IN ALTRE PAROLE IN CONDIZIONI SATURANTI LA VELOCITA' MISURATA DIPENDE DALLA CONCENTRAZIONE DI E.