

Spettrofotometria ed Analisi dei dati

Spettroscopia di assorbimento UV/Visibile

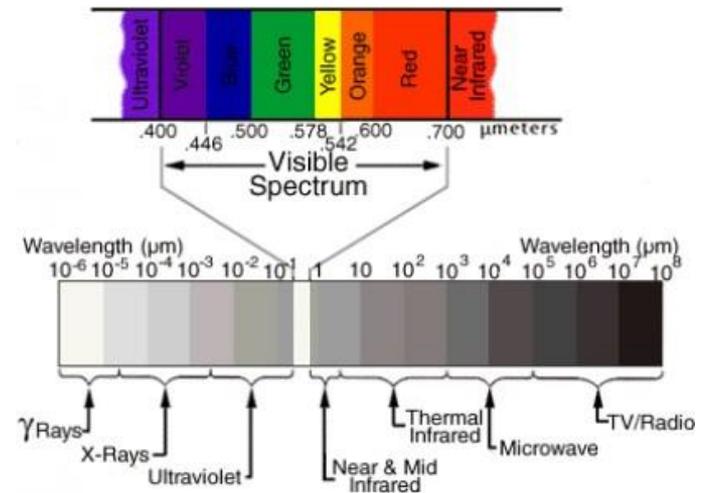
Valuta l'assorbimento selettivo da parte della materia della radiazione elettromagnetica con lunghezza d'onda compresa tra 10 nm e 780 nm

UV lontano: 10 - 200 nm (poco usato)

UV vicino: 200 - 380 nm

Visibile: 380 - 780 nm

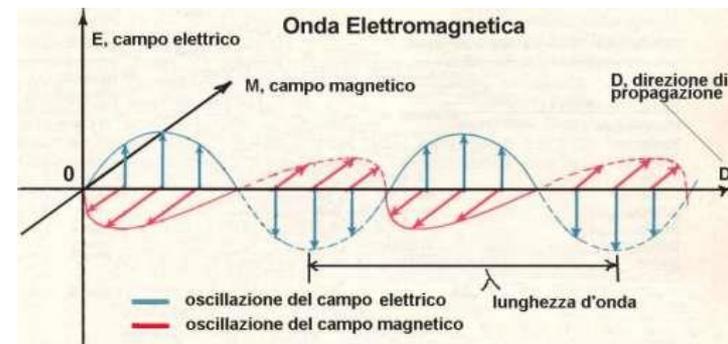
La somma di tutte le radiazioni elettromagnetiche visibili costituisce la **luce bianca**.



Fonte: Internet

Radiazione elettromagnetica:

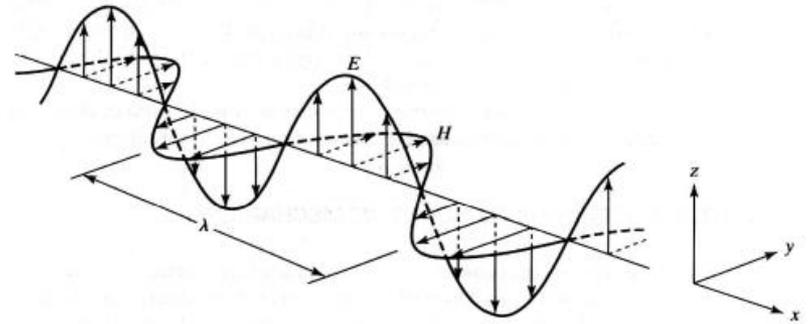
energia che si propaga in un mezzo
→ onda data dalla propagazione simultanea nello spazio di un campo elettrico (E) e di uno magnetico (M) perpendicolari tra loro e oscillanti



Fonte: Internet

Ogni onda è caratterizzata da diversi valori, tra cui:

- **Lunghezza d'onda (λ)** → distanza tra due punti in fase tra loro, espressa in nanometri ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$);
- **Frequenza (ν)** → numero di oscillazioni in un punto, nell'unità di tempo (secondo).



Lunghezza d'onda e frequenza sono legate tra loro da una relazione:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

c = velocità luce = 300000
Km/s (o $3 \cdot 10^8$ m/s)

Ogni onda elettromagnetica ha una energia direttamente proporzionale alla frequenza in base alla legge di Planck:

$$E = h * \nu = h * \frac{c}{\lambda}$$

h = costante di Planck

Ogni fotone (elettrone) ha una quantità di energia discreta (**energia quantizzata**) che dipende dalla frequenza, e quindi dalla lunghezza d'onda, dell'onda associata.

Alta Frequenza = alta Energia

oppure

bassa Lunghezza d'Onda = alta Energia

Cosa succede quando la materia viene colpita dalla luce?



Primo livello elettronico eccitato



Livello elettronico fondamentale

2 stati di un elettrone:

- 1) **Stato fondamentale:** elettrone nel più basso livello energetico permesso (minor energia).
- 2) **Stato eccitato:** elettrone che possiede un'energia maggiore di quella «normale». Instabile!!!

Cosa succede quando la materia viene colpita dalla luce?



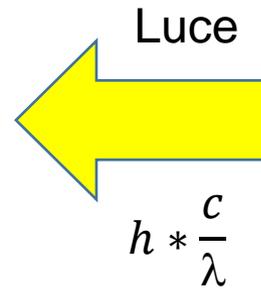
Primo livello elettronico eccitato

Le radiazioni UV-VIS che possiedono energia sufficiente per promuovere un salto elettronico **dal livello fondamentale ad un orbitale a maggior energia**, il livello eccitato, interagiscono con la materia.

Livello elettronico fondamentale

Cosa succede quando la materia viene colpita dalla luce?

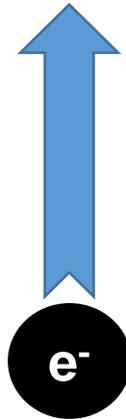
Primo livello elettronico eccitato



Livello elettronico fondamentale

Cosa succede quando la materia viene colpita dalla luce?

Primo livello elettronico eccitato



Livello elettronico fondamentale

L'elettrone passa dallo stato fondamentale a quello eccitato tramite il fenomeno dell'**ASSORBIMENTO**.

Cosa succede quando la materia viene colpita dalla luce?



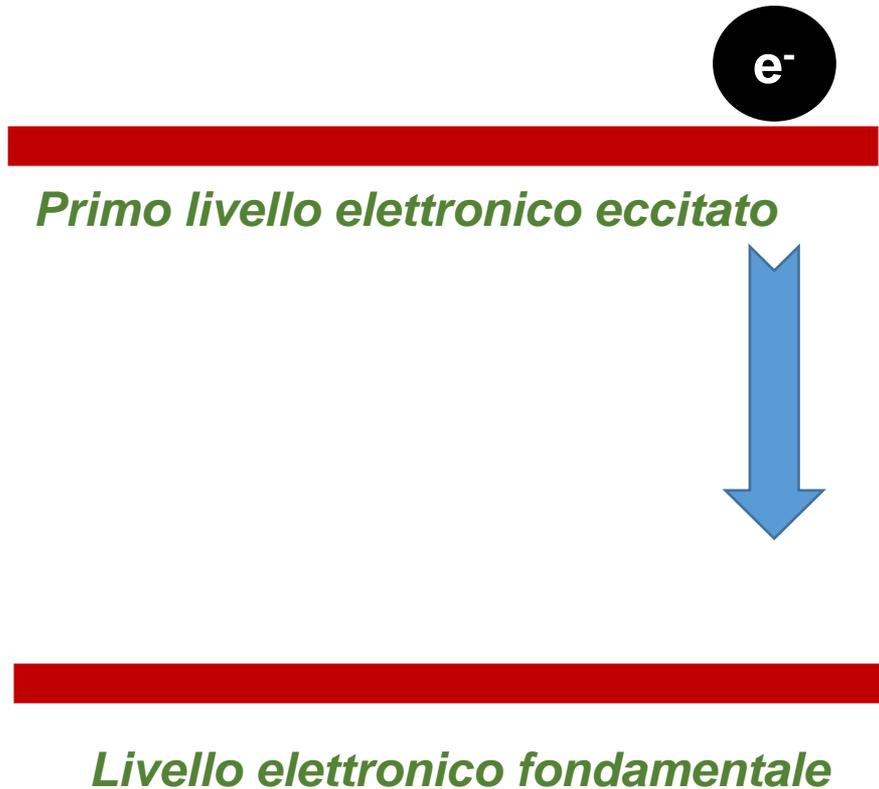
Primo livello elettronico eccitato

L'elettrone passa dallo stato fondamentale a quello eccitato tramite il fenomeno dell'**ASSORBIMENTO**.

Livello elettronico fondamentale

Dal momento che sono coinvolti anche elettroni di legame, l'energia della radiazione assorbita può essere collegata al tipo di legame presente nella molecola.

Cosa accade una volta assorbita la radiazione elettromagnetica?



Lo stato eccitato è instabile: l'elettrone ritorna spontaneamente allo stato fondamentale tramite il fenomeno di **RILASSAMENTO**.

In genere, attraverso rilascio di calore.

Cosa accade una volta assorbita la radiazione elettromagnetica?

Primo livello elettronico eccitato

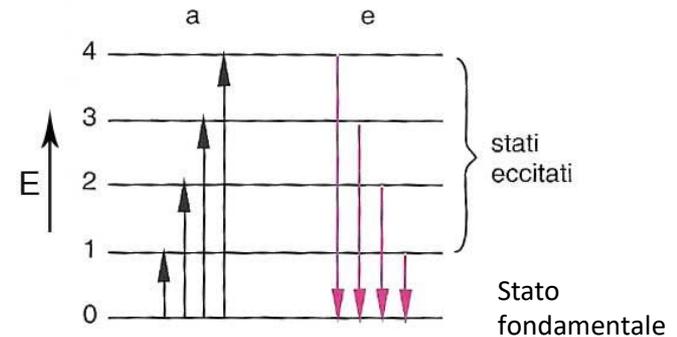


Livello elettronico fondamentale

Le specie chimiche accettano quantità determinate e discrete di energia pari ad $h \cdot \nu$

...se la transizione è permessa!

Riassumendo...

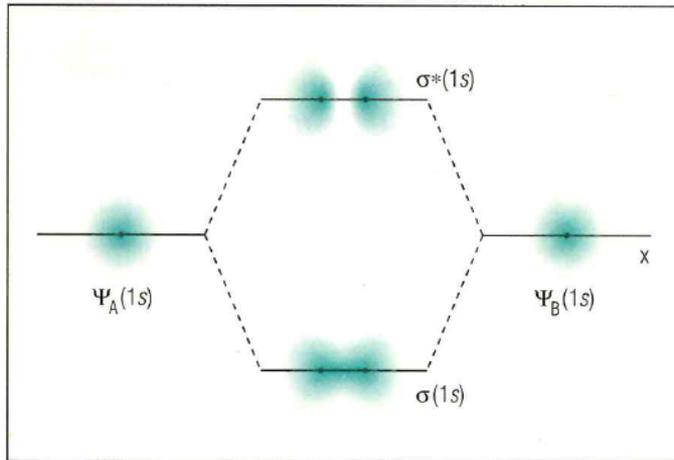


Fonte: Principi di Metodologia Biochimica, Ed. Piccin, 2009

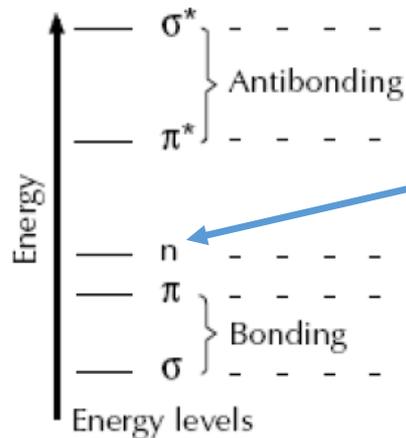
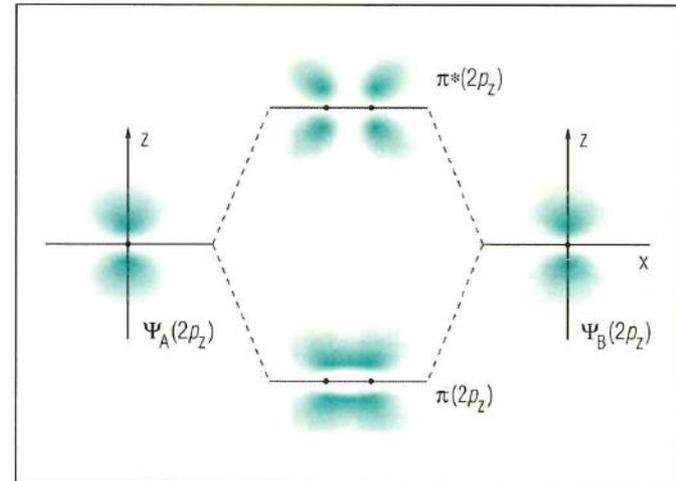
Cosa vuol dire se la transizione è permessa?

La formazione dei legami chimici viene spiegata in termini di interazioni di orbitali atomici, che **sovrapponendosi formano gli orbitali molecolari**.

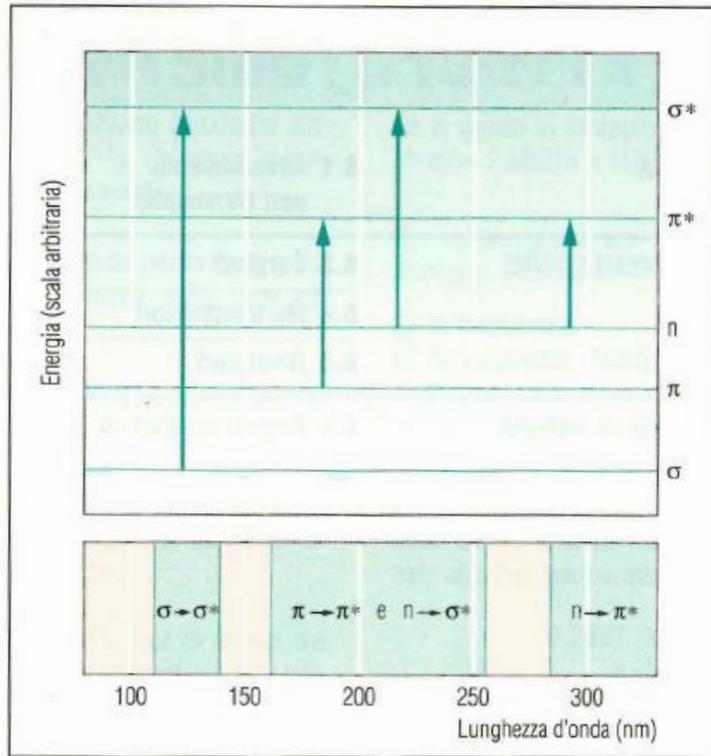
Formazione di legame σ nell' H_2



Formazione di orbitali π



Orbitali di non legame, n



Quando la radiazione elettromagnetica possiede una energia pari a $\Delta E = h \cdot \nu$, avviene la transizione elettronica.

Questo, però, non è sempre vero!

Usare una radiazione con frequenza utile a colmare ΔE non è sufficiente: si devono verificare alcune condizioni.

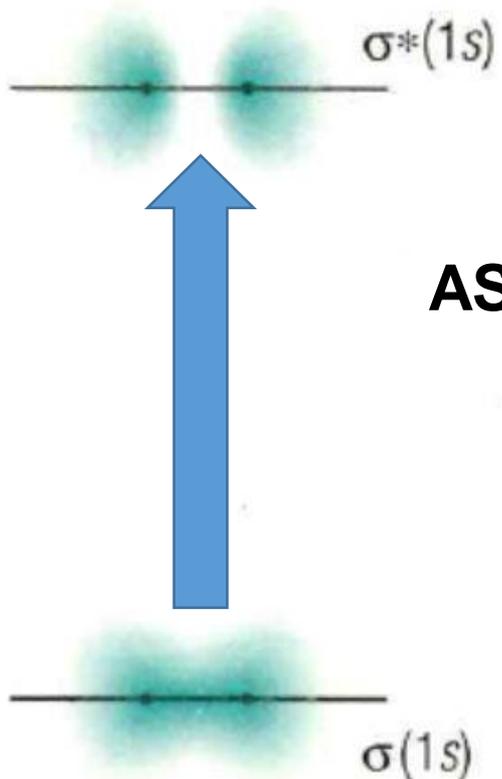
	TIPO DI TRANSIZIONE	LUNGHEZZA D'ONDA DELLA RADIAZIONE NECESSARIA PER OTTENERE LA TRANSIZIONE	La λ necessaria per la transizione è tanto maggiore quanto minore è il dislivello energetico
1	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	110 – 135 nm	
2	$\pi \rightarrow \pi^*$	160 – 255 nm	
3	$n \rightarrow \sigma^*$		
4	$n \rightarrow \pi^*$	> 285 nm	

Regole di selezione

1° regola di selezione: in una transizione elettronica, si deve avere una forte redistribuzione della carica elettrica e quindi una concreta variazione del momento dipolare \rightarrow i campi elettrici radiazione-molecola devono poter interagire.

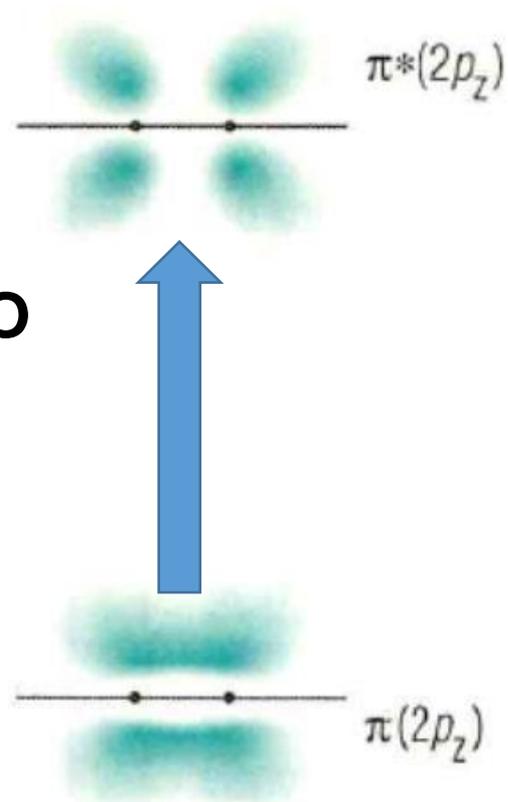
Transizione

$\sigma \rightarrow \sigma^*$



Transizione

$\pi \rightarrow \pi^*$



ASSORBIMENTO

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

Il passaggio di un orbitale molecolare all'altro influenza la distribuzione delle cariche!

La regola suggerisce che **maggiore è la redistribuzione delle cariche, più probabile sarà la transizione elettronica.**

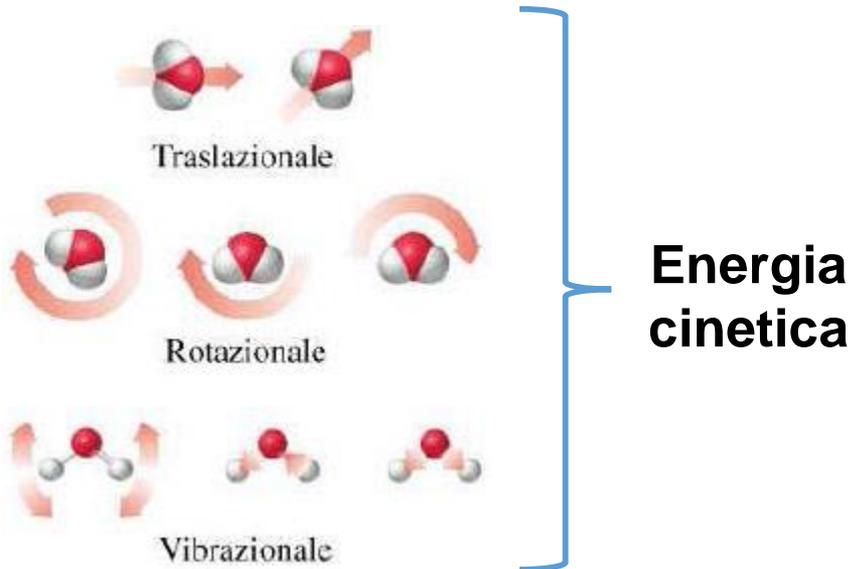
L'assorbimento della radiazione elettromagnetica (luce) da parte della materia è un processo complesso...

L'assorbimento della radiazione elettromagnetica (luce) da parte della materia è un processo complesso...

$$E_{interna} = E_{nucleo} + E_{elettronica} + E_{traslazionale} + E_{rotazionale} + E_{vibrazionale}$$

Interessano le transizioni elettroniche

Energia elettronica = energia di legame

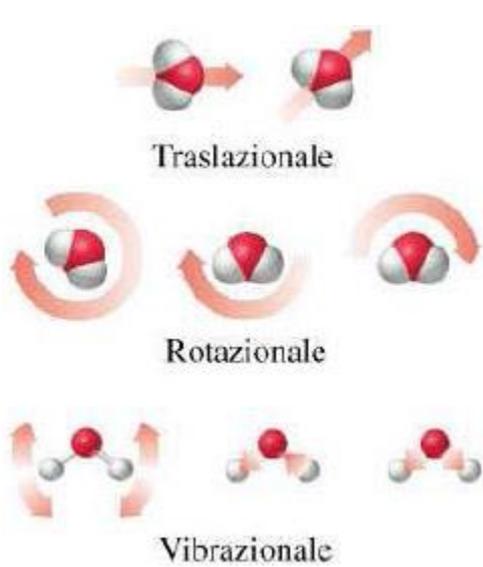


L'assorbimento della radiazione elettromagnetica (luce) da parte della materia è un processo complesso...

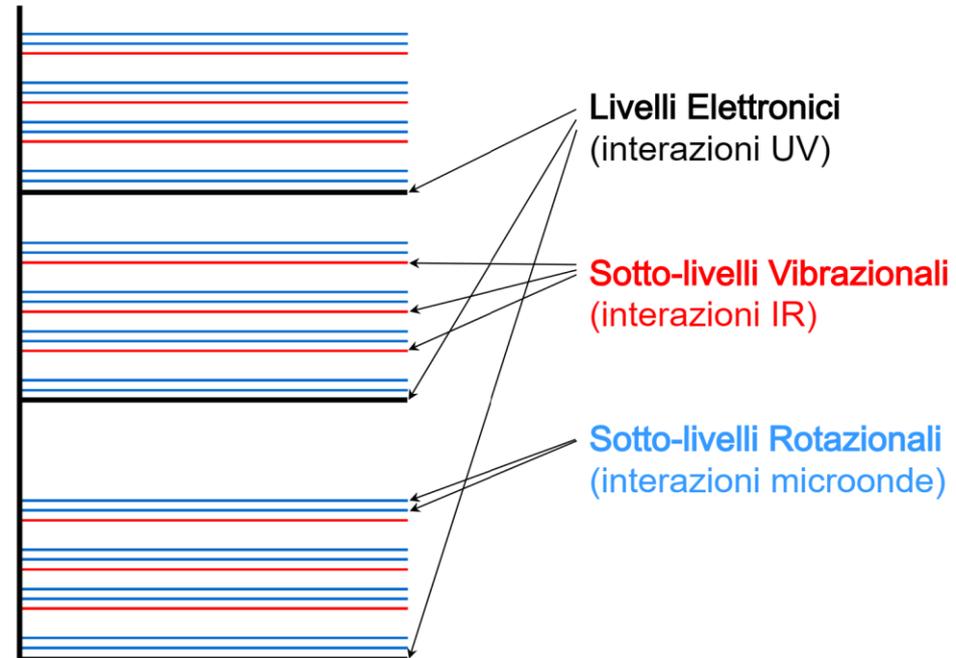
$$E_{interna} = E_{nucleo} + E_{elettronica} + E_{traslazionale} + E_{rotazionale} + E_{vibrazionale}$$

Interessano le transizioni elettroniche

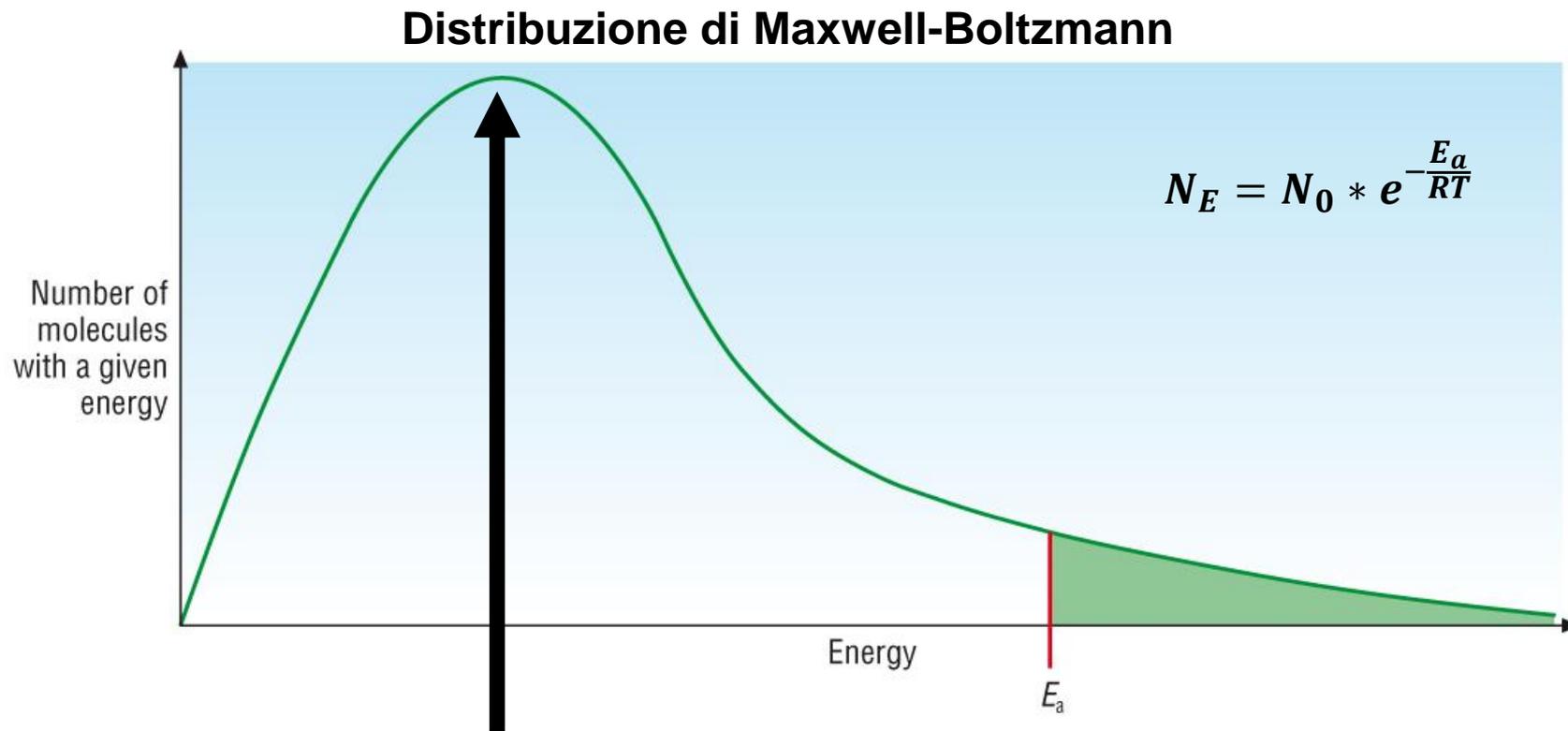
Energia elettronica = energia di legame



Energia cinetica

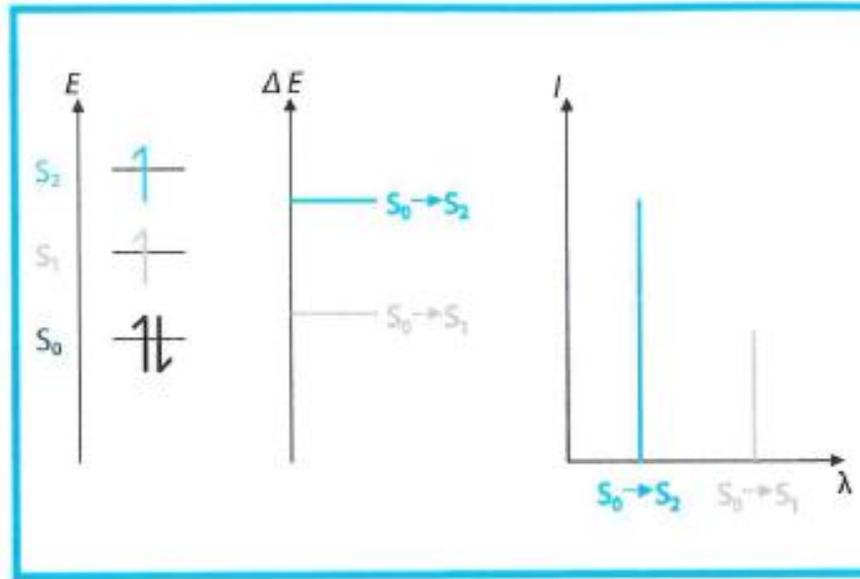


Le letture in spettrofotometria sono quindi complicate dal fatto che le molecole di un composto, anche se uguali, non possiedono tutte la stessa energia.



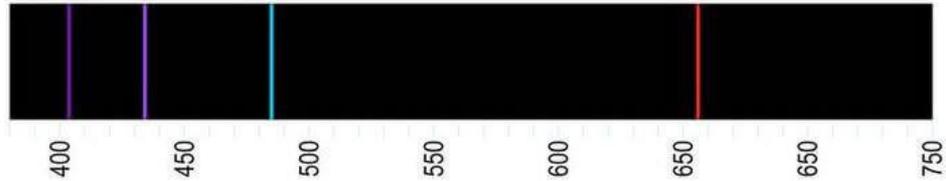
**Valore di energia più
probabile**

Molecola semplice

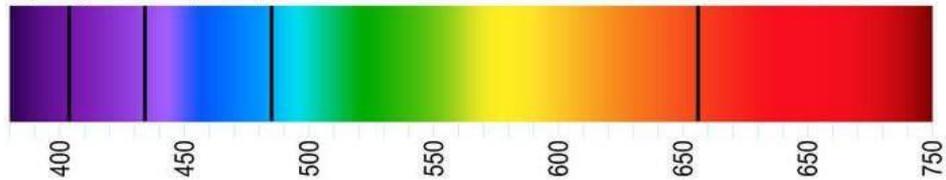


Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

Hydrogen Emission spectrum



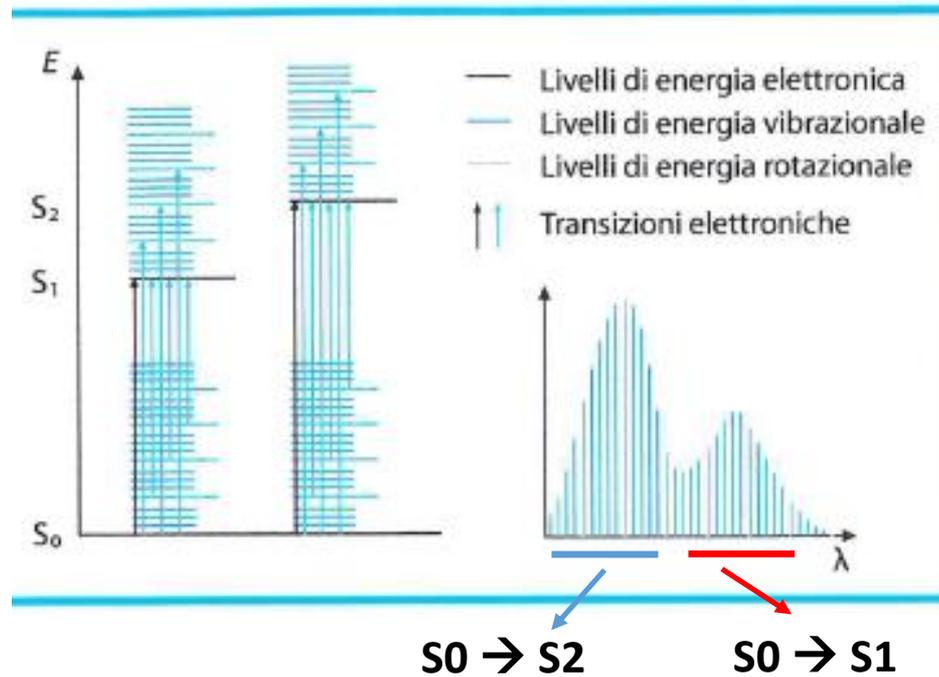
Hydrogen Absorption spectrum



Fonte: internet

Molecola complessa

L'energia assorbita è quantizzata, ma può servire a fare dei «salti» fino a livelli energetici vibrazionali.



- 1) I massimi di assorbimento corrispondono alle transizioni elettroniche
- 2) La «larghezza» del picco è dovuto a transizioni in livelli vibrazionali vicini.

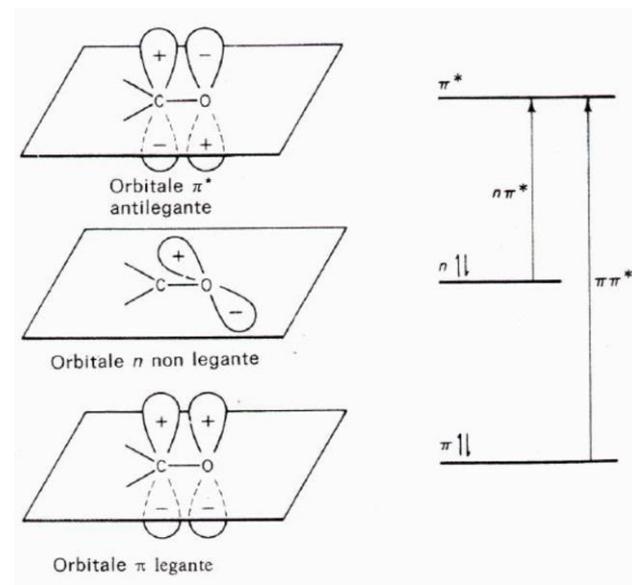
CROMOFORO: parte della molecola che determina l'assorbimento.
E' caratteristico della molecola e rappresenta una transizione elettronica.

Esempi di cromofori e transizioni elettroniche

TABLE 9.1 Summary of UV λ_{\max} and Transition Types for Simple Chromophores

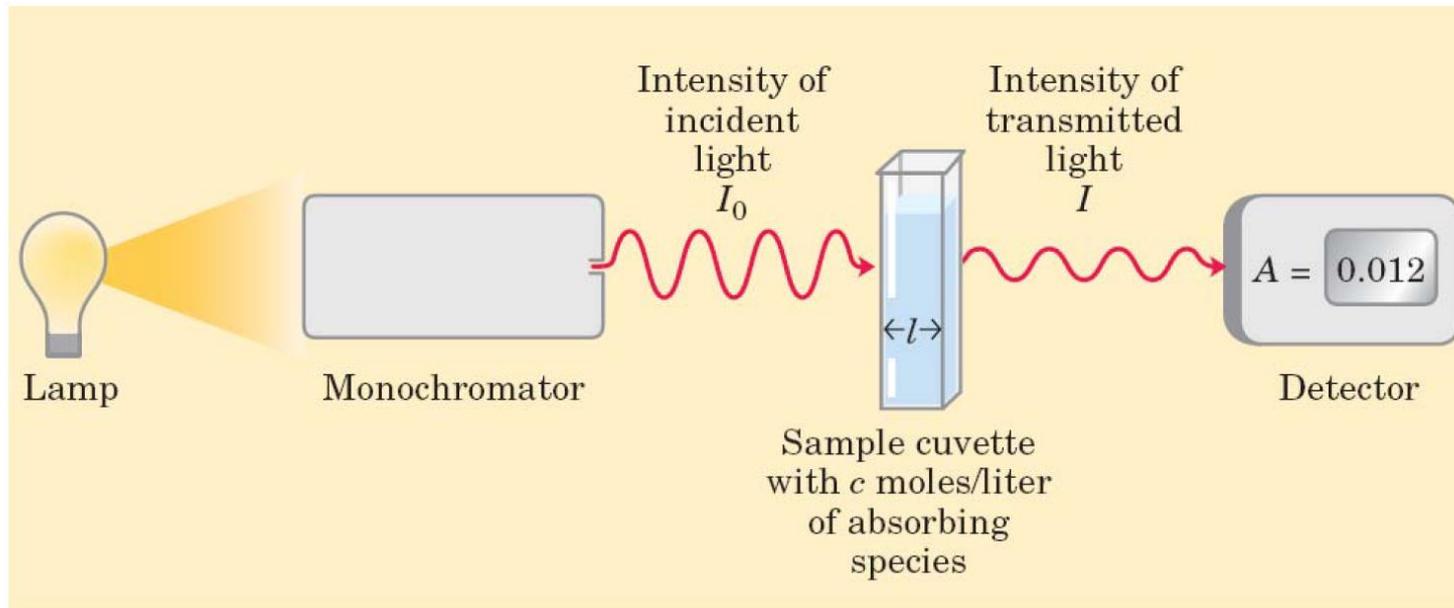
Chromophore	Compound	Transition	λ_{\max} (nm)	ϵ
C-H	CH ₄	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	122	
C-C	C ₂ H ₆	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	135	
C=C	C ₂ H ₄	$\pi \rightarrow \pi^*$	103	15000
			174	5500
C=C=C	C ₃ H ₄	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	4000
			227	630
C \equiv C	R-C \equiv C-R'	$\pi \rightarrow \pi^*$	178	10000
			196	2000
			223	160
C-O	R-O-R	$n \rightarrow \sigma^*$	180	500
C-O	R-O-R'	$n \rightarrow \sigma^*$	180	3000
C-N	Amino	$n \rightarrow \sigma^*$	190-200	2500-4000
C-S	R-S-H	$n \rightarrow \sigma^*$	195	1800
C-S	R-S-R	$n \rightarrow \sigma^*$	235	180
C=O	Aldehyde/Ketone	$n \rightarrow \sigma^*$	166	16000
		$\pi \rightarrow \pi^*$	189	900
		$n \rightarrow \pi^*$	270	10-20
C=O	Carboxylic acid	$n \rightarrow \pi^*$	200	50
C=O	Carboxylate	$n \rightarrow \pi^*$	210	150
C=O	Ester	$n \rightarrow \pi^*$	210	50
C=O	Amide	$n \rightarrow \pi^*$	205	200
C=N	(NH ₂) ₂ C=NH	$n \rightarrow \pi^*$	265	15
C \equiv N	CH ₃ C \equiv N	$\pi \rightarrow \pi^*$	<170	
N=N	Me-N=N-Me	$n \rightarrow \pi^*$	350-370	15
N=O	Me ₃ NO	$n \rightarrow \pi^*$	300	100
			665	120
N=O	Me ₃ NO ₂	$n \rightarrow \pi^*$	276	27
C=C=O	Et ₂ C=C=O	$\pi \rightarrow \pi^*$	227	360
		$n \rightarrow \pi^*$	375	20
C-Cl		$n \rightarrow \sigma^*$	173	200
C-Br		$n \rightarrow \sigma^*$	208	300
C-I		$n \rightarrow \sigma^*$	259	400

Fonte: internet

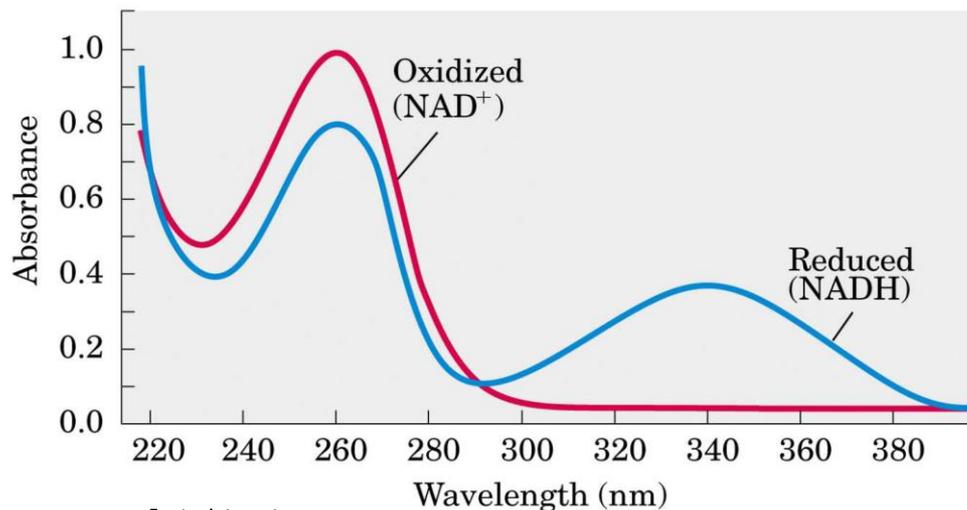


Fonte: internet

Come funziona la spettroscopia di assorbimento UV-Vis?



Fonte: internet

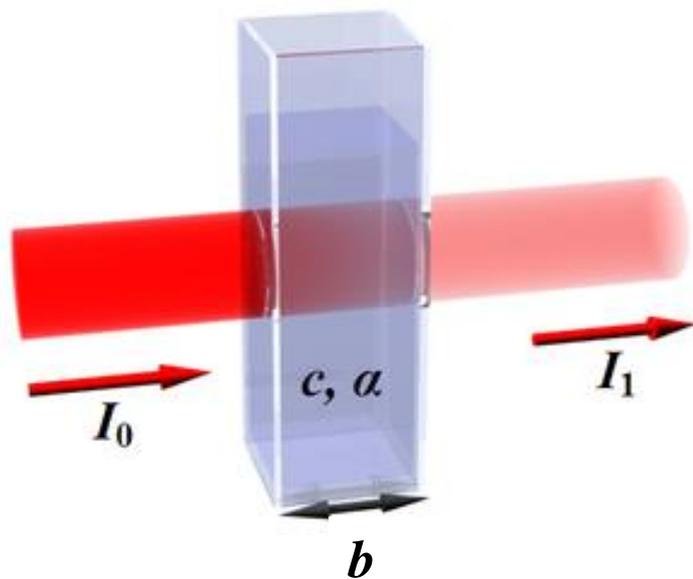


Fonte: internet

I dati sono riportati come **spettri di assorbimento**: l'assorbimento della luce in funzione della lunghezza d'onda fornita.

Lo strumento «legge» due parametri essenziali:

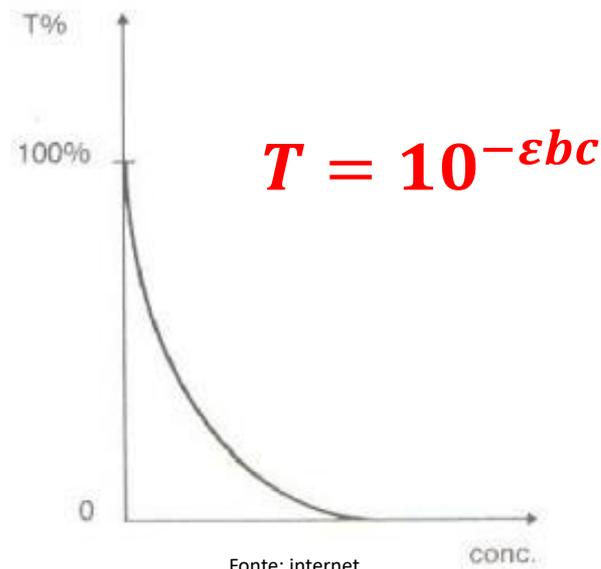
- 1) Intensità della luce incidente $\rightarrow I_0$
- 2) Intensità della luce uscente $\rightarrow I_1$



Fonte: Internet

TRASMITTANZA \rightarrow rapporto tra luce emergente dal campione (I) e luce incidente (I_0).

$$T = \frac{I_1}{I_0} \rightarrow T\% = \frac{I_1}{I_0} * 100$$



Fonte: internet

$$A \text{ (assorbanza)} = -\log T = \log (I_0/I_1)$$

Legge di Lambert-Beer: La quantità di energia luminosa assorbita è proporzionale al numero di molecole che la radiazione incontra sul suo cammino

$$A = \varepsilon_{\lambda} * b * c$$

In cui:

A = assorbanza

b = cammino ottico (in cm)

c = concentrazione della soluzione

ε = coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda considerata

Metodi colorimetrici

Metodi analitici che si basano sull'interazione tra la radiazione elettromagnetica e la materia.

Sfruttano i principi di assorbimento che abbiamo visto fino ad ora.

Permettono di quantificare un cromoforo a concentrazione incognita in due casi:

- 1) Si conosce il coefficiente di estinzione molare, ϵ .
- 2) Non si conosce il coefficiente di estinzione molare, ma si possiede l'analita purificato.

Come si fa a determinare la concentrazione di un cromoforo incognito?

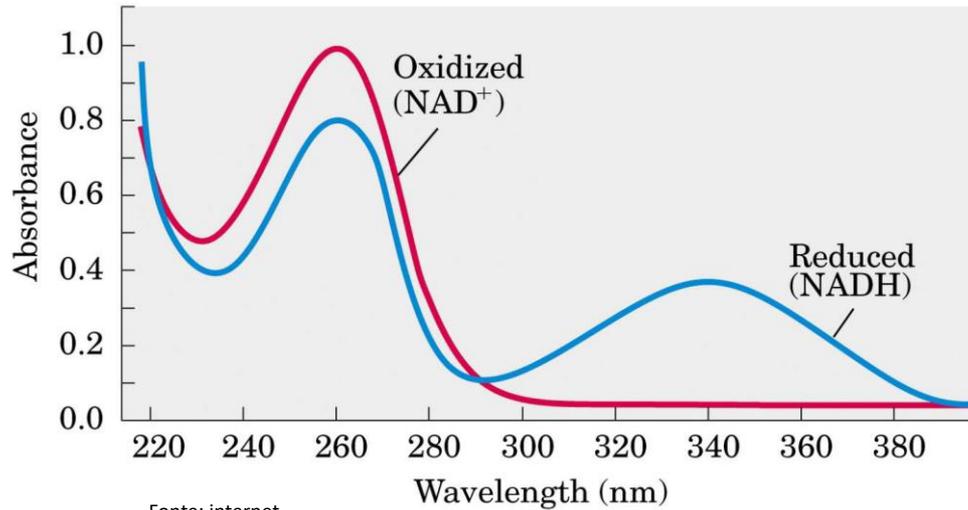
Due metodi principali:

Primo metodo

Si conosce già il coefficiente di estinzione molare, mM o E1% (sono tutti metodi per definire il coefficiente ϵ).

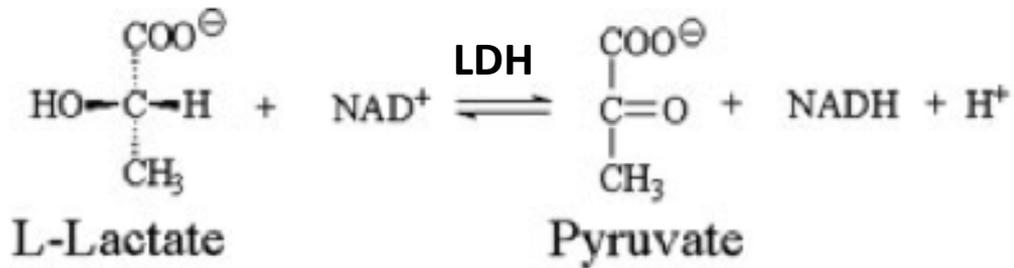
- a) Si corregge l'assorbanza del campione incognito per il rumore di fondo o **BIANCO DI REAZIONE** (rappresentato da tutto ciò che è presente nella reazione colorimetrica ad esclusione dell'analita).
Es. comassie+tampone
- b) Si applica la formula inversa di $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, risolvendo per $c \rightarrow c = A / (\epsilon \cdot b)$
- c) Si moltiplica per eventuali fattori di diluizione

Esempio: I dosaggi che sfruttano il NAD⁺/NADH



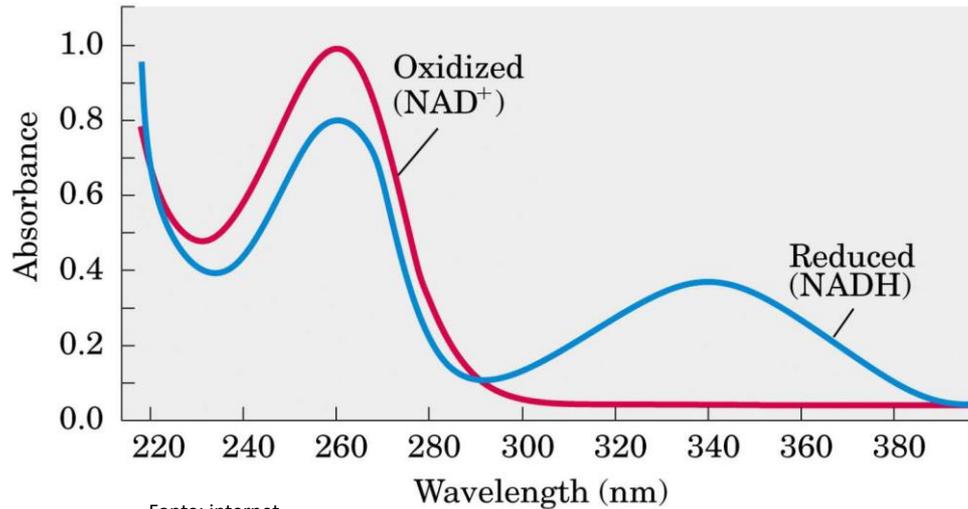
Fonte: internet

$$\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



Fonte: internet

Esempio: I dosaggi che sfruttano il NAD⁺/NADH

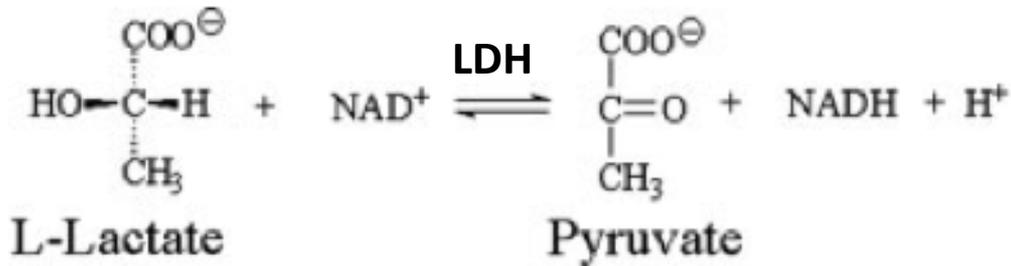


$$\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Campione diluito 3 volte

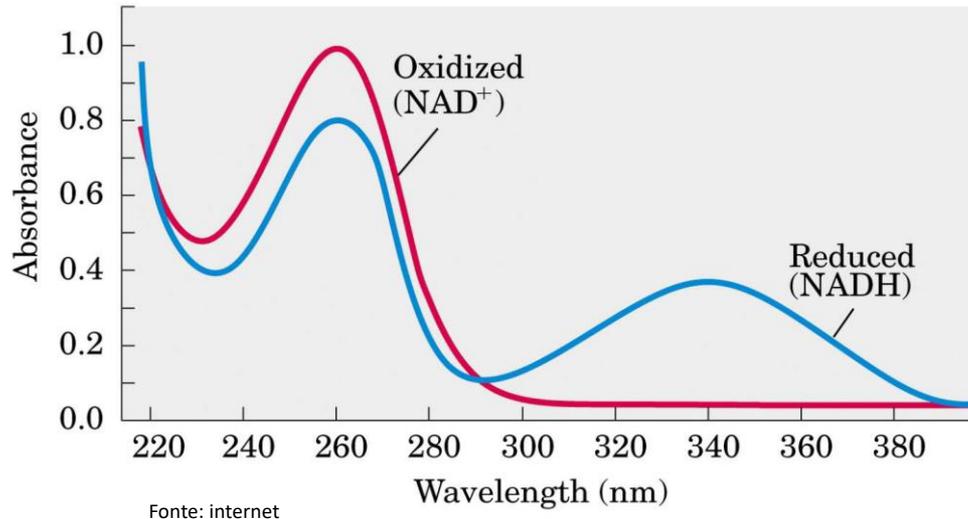
A campione = 0.350

A bianco = 0.05



Fonte: internet

Esempio: I dosaggi che sfruttano il NAD⁺/NADH



$$\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

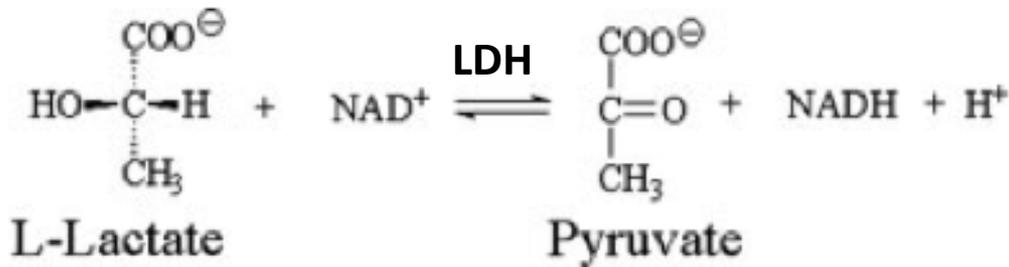
Campione diluito 3 volte

$$A_{\text{campione}} = 0.350$$

$$A_{\text{bianco}} = 0.05$$

$$A_{\text{netta}} = 0.350 - 0.05 = 0.3$$

$$\text{Conc} = (0.3 / 6.22) * 3 = 0.144 \text{ mM}$$



Fonte: internet

Secondo metodo

Se non si conosce già l' ϵ , **bisogna costruire una «retta di taratura» o «curva di calibrazione».**

- 1) Si utilizzano quantità note di analita (standard) a concentrazione crescente.
- 2) Si esegue la reazione colorimetrica per lo standard, per il bianco e per il campione incognito **ESATTAMENTE NELLE STESSE CONDIZIONI SPERIMENTALI.**
- 3) Si costruisce un grafico (di solito una retta) delle concentrazioni note in funzione dell'assorbanza.
- 4) Si determina la concentrazione del campione usando la formula inversa dell'equazione della retta.

Esempio pratico (dosaggio proteico)

BSA (mg/ml)	OD	netti
0	0,322	
0,08	0,362	0,040
0,12	0,370	0,048
0,16	0,399	0,077
0,2	0,417	0,094
0,24	0,424	0,101
0,4	0,540	0,217
0,8	0,74	0,417
Campione 1	0,476	0,154

Campione 1: diluito 3 volte

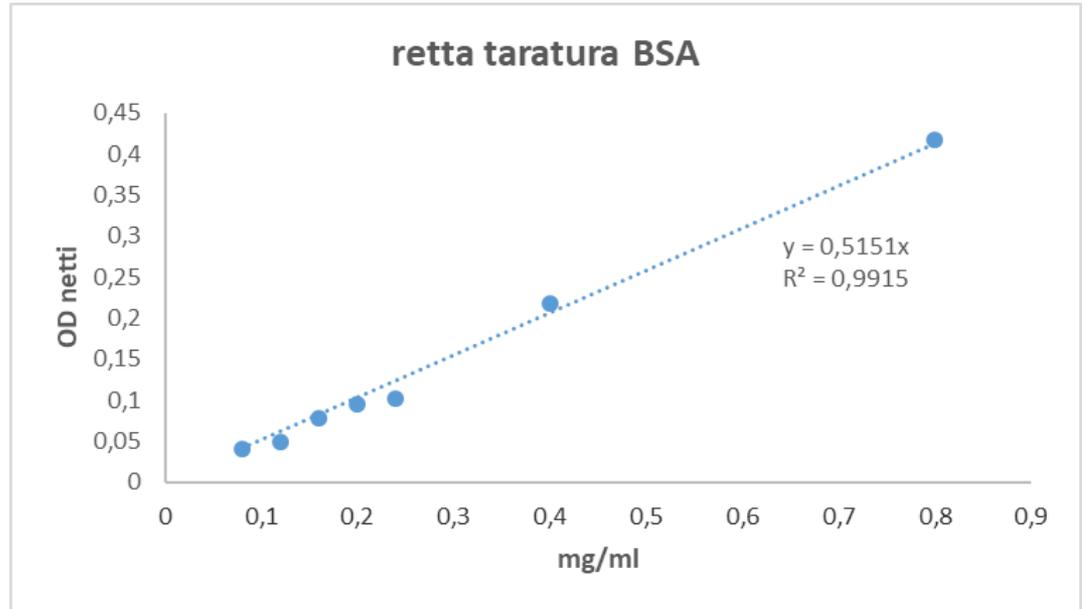
1) Faccio i netti

2) Costruisco la retta di taratura

3) Trovo la concentrazione nel campione incognito

Esempio pratico (dosaggio proteico)

BSA (mg/ml)	OD	netti
0	0,322	
0,08	0,362	0,040
0,12	0,370	0,048
0,16	0,399	0,077
0,2	0,417	0,094
0,24	0,424	0,101
0,4	0,540	0,217
0,8	0,74	0,417
Campione 1	0,476	0,154



Campione 1: diluito 3 volte

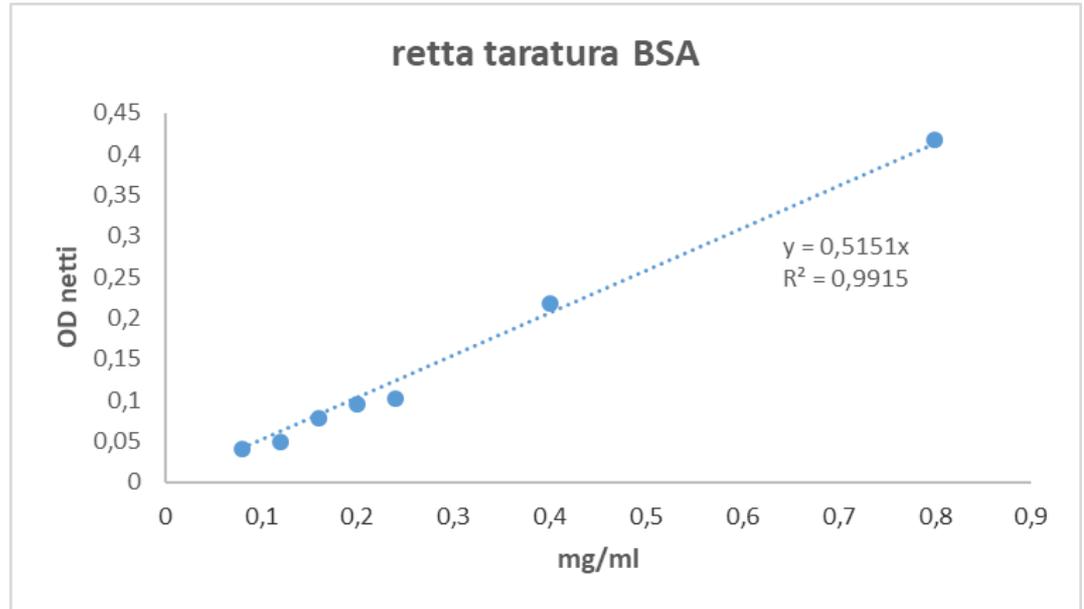
1) Faccio i netti

2) Costruisco la retta di taratura

3) Trovo la concentrazione nel campione incognito

Esempio pratico (dosaggio proteico)

BSA (mg/ml)	OD	netti
0	0,322	
0,08	0,362	0,040
0,12	0,370	0,048
0,16	0,399	0,077
0,2	0,417	0,094
0,24	0,424	0,101
0,4	0,540	0,217
0,8	0,74	0,417
Campione 1	0,476	0,154



Campione 1: diluito 3 volte

- 1) Faccio i netti
- 2) Costruisco la retta di taratura
- 3) Trovo la concentrazione nel campione incognito



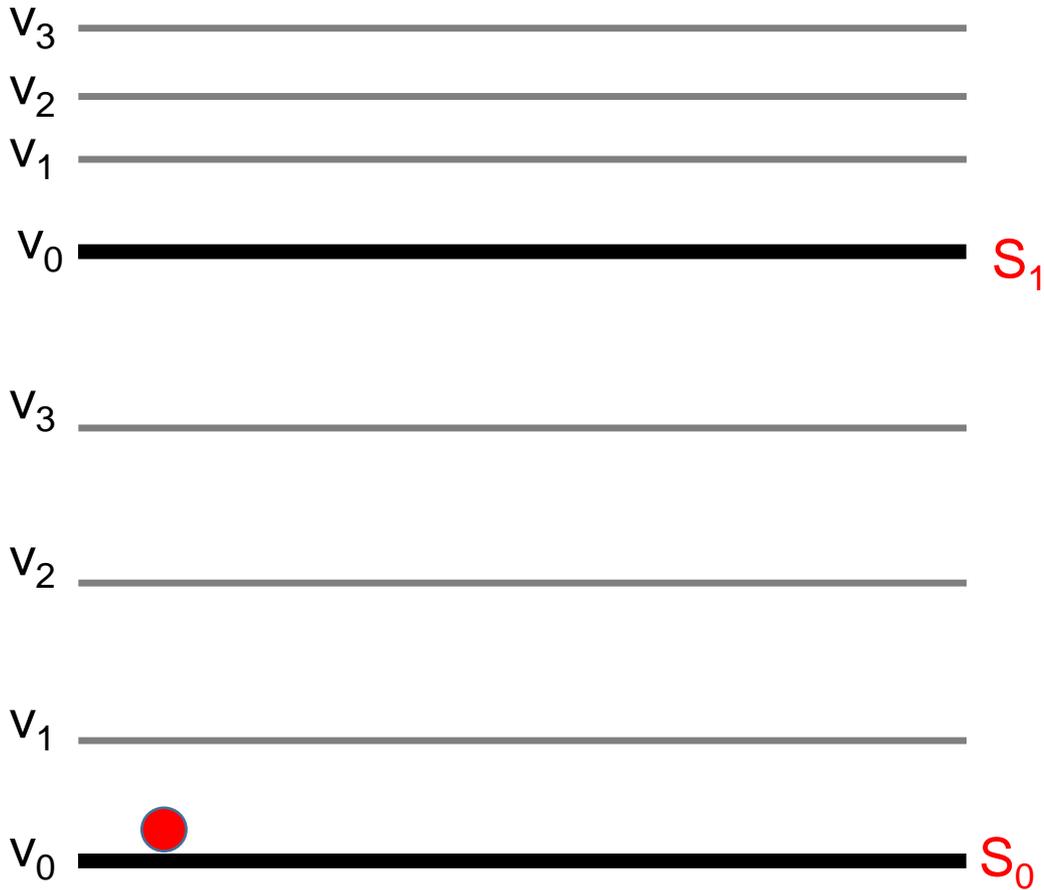
Sapendo che $A = 0,5151 \cdot \text{conc}$ (mg/ml)

$$\text{Conc} = (0,154/0,5151) \cdot 3 = \mathbf{0,90 \text{ mg/ml}}$$

Fluorescenza e fluorimetria

● = elettrone

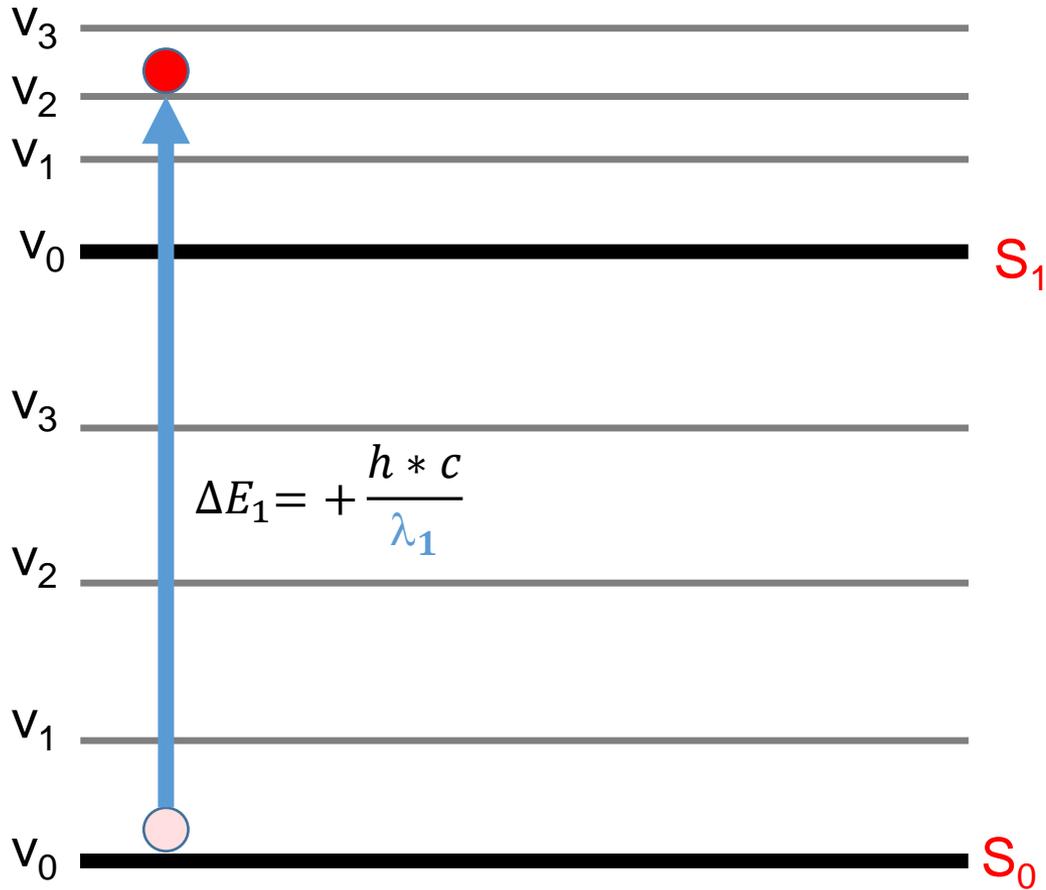
→ = conversione interna



Fluorescenza e fluorimetria

● = elettrone

→ = conversione interna

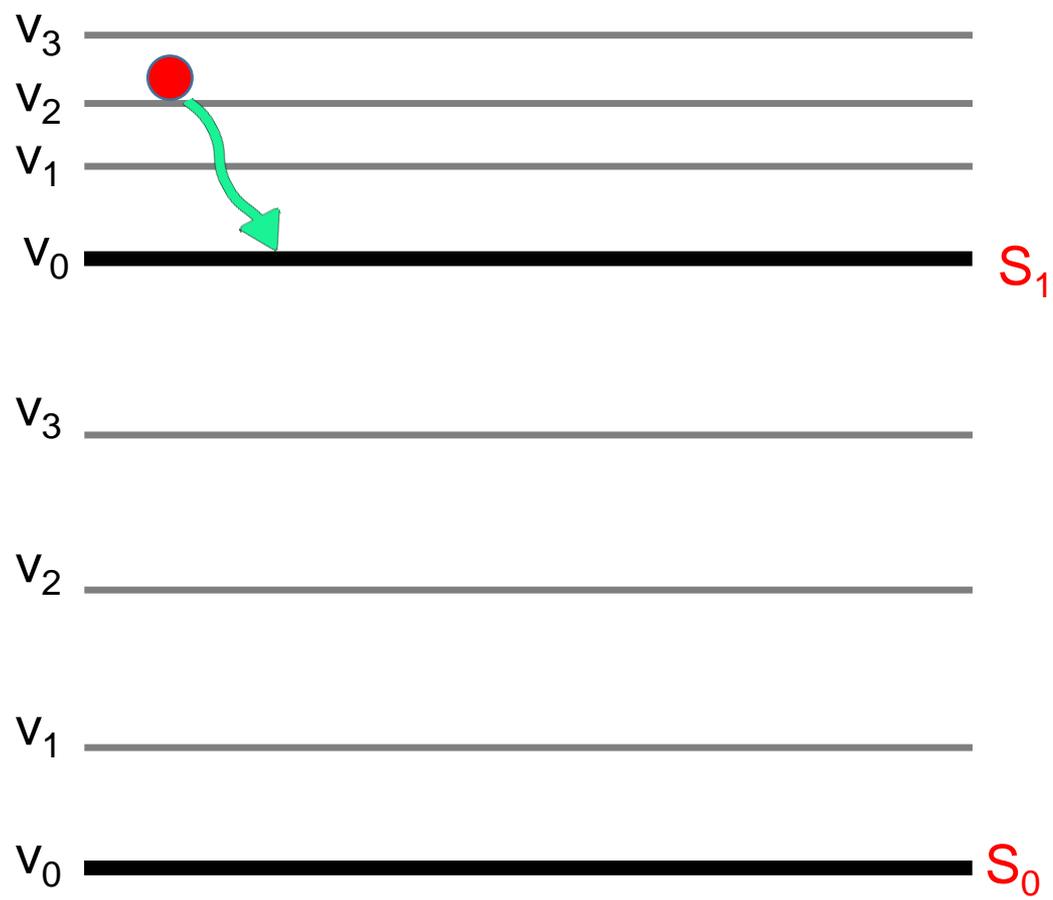


Es. $\lambda_1 = 450 \text{ nm}$

Fluorescenza e fluorimetria

● = elettrone

→ = conversione interna

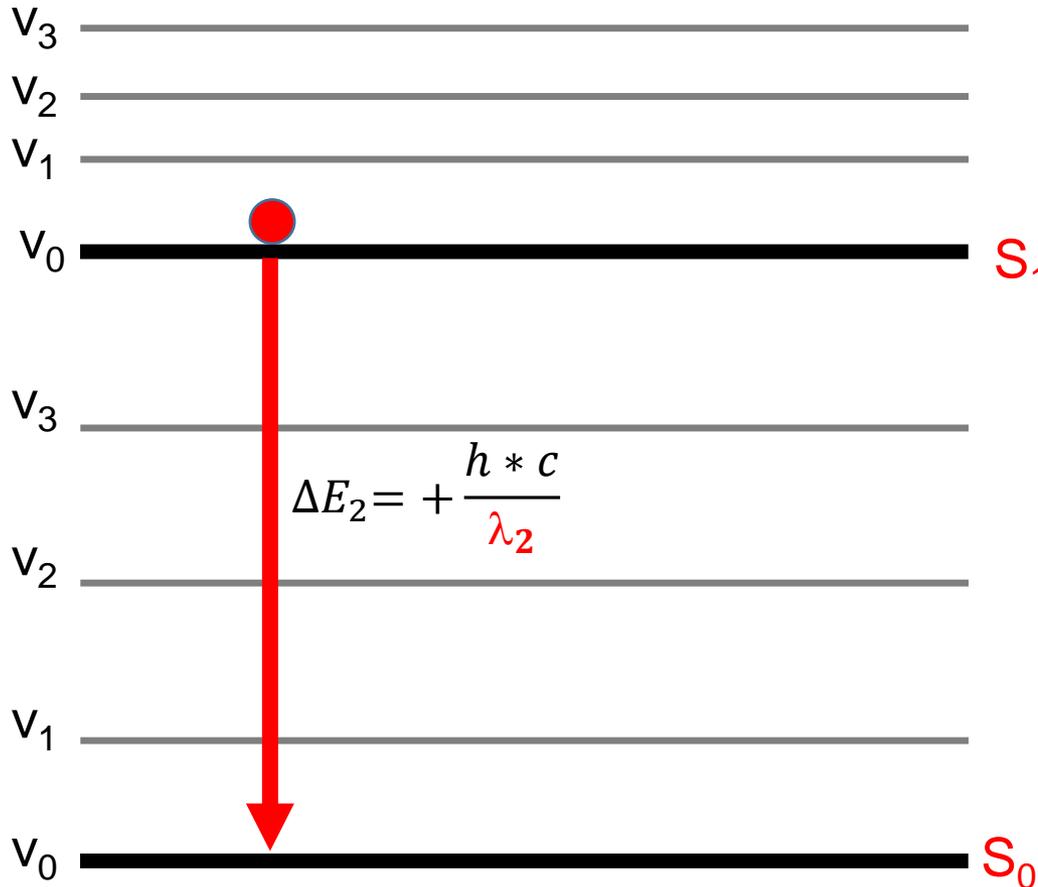


Conversione interna: la molecola eccitata passa allo stato vibrazionale più vicino ad energia minore rilasciando calore (**rilassamento vibrazionale**).

Fluorescenza e fluorimetria

● = elettrone

→ = conversione interna



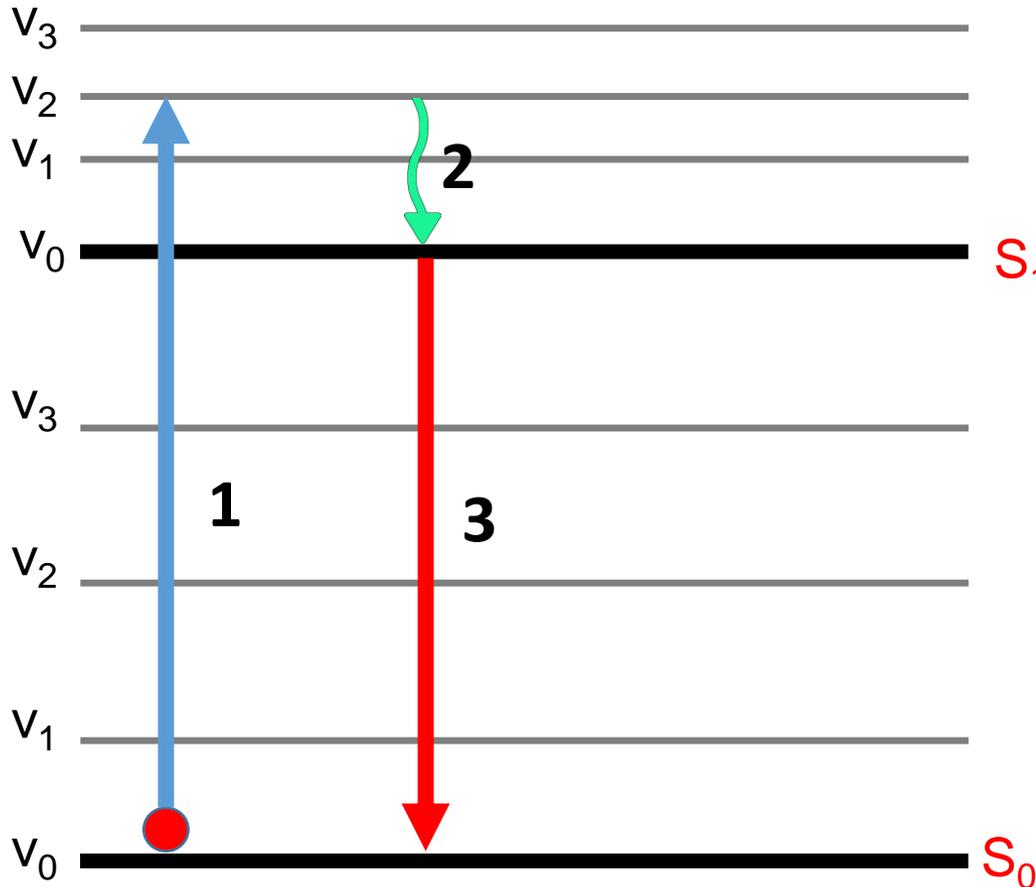
Fluorescenza: la molecola eccitata (assorbe luce), per tornare allo stato fondamentale emette luce ad una lunghezza d'onda maggiore, quindi a minore energia di quella assorbita.

Es. $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$

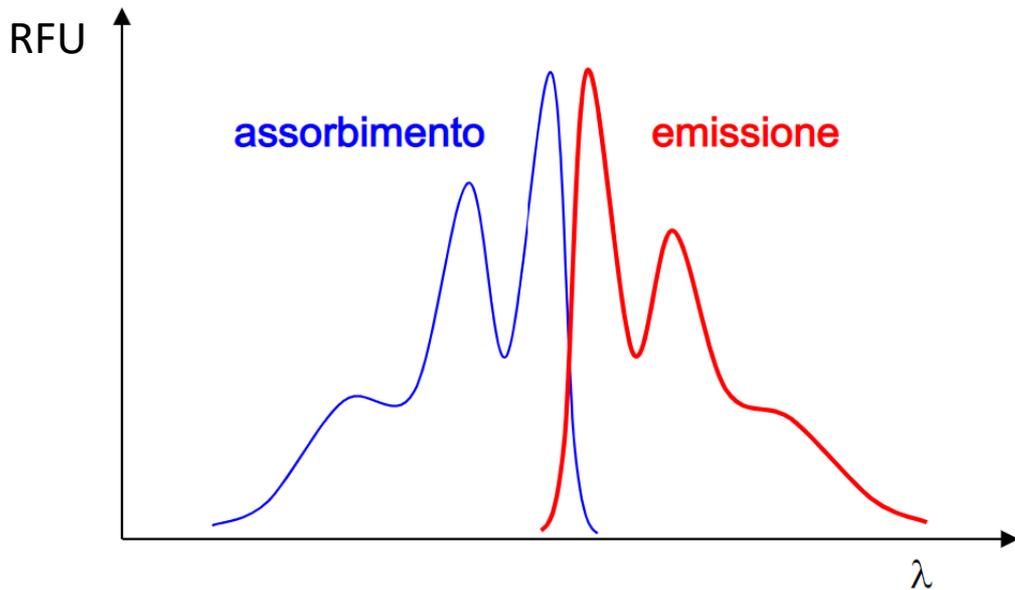
Riassumendo...

● = elettrone

→ = conversione interna



- 1) L'elettrone assorbe luce ad una lunghezza d'onda λ_1 , passando allo stato eccitato.
- 2) Tramite conversione interna, avviene il rilassamento vibrazione ossia perdita di energia tramite calore.
- 3) L'elettrone torna allo stato fondamentale emettendo luce ad una lunghezza d'onda λ_2 .

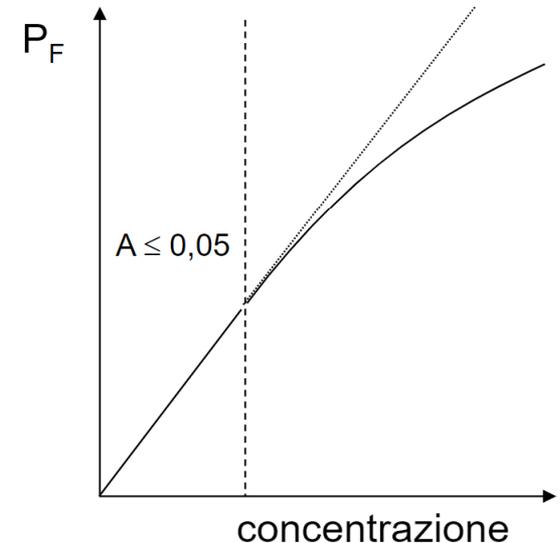


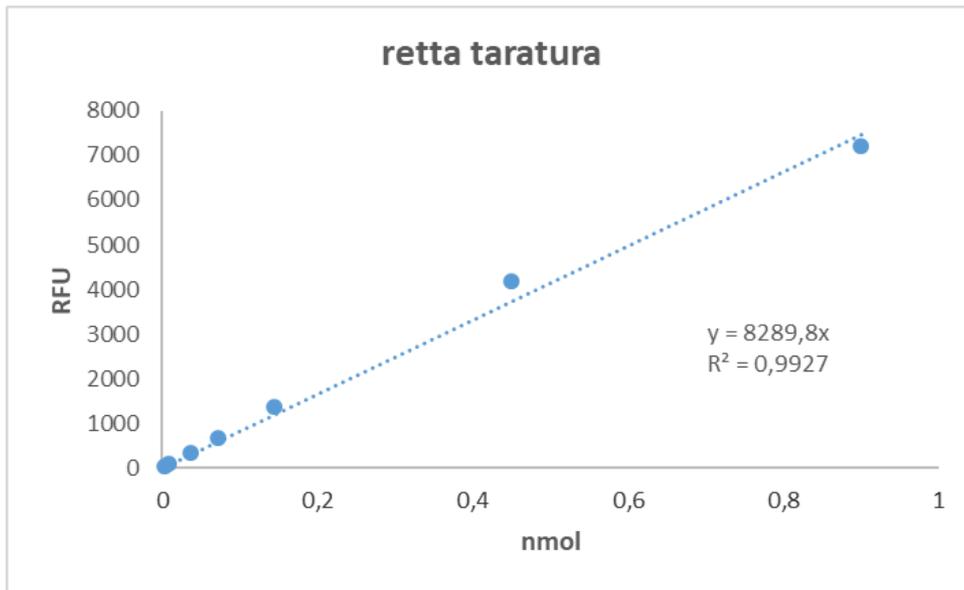
Si identificano 2 spettri:

- 1) Spettro di assorbimento
- 2) Spettro di emissione

Per effettuare le analisi, si utilizzano in genere le λ_{\max} assorbimento ed emissione, con $\lambda_{\text{Exc}} < \lambda_{\text{Em}}$

- La fluorimetria è una tecnica molto sensibile, più della spettrofotometria (pg proteine rispetto a μg).
- In linea di massima, **per soluzioni abbastanza diluite**, la fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione.
- **Necessita sempre di una retta di taratura con fluoroforo a concentrazione nota.**





1) Costruisco la retta di taratura con concentrazioni note di fluoroforo e ne valuto la fluorescenza

NOTA: la fluorescenza dello standard deve essere determinata nelle stesse condizioni di temperatura e pH del campione!!!

2) Determino la fluorescenza dei campioni e del bianco di reazione, correggo i valori dei campioni e trovo la quantità di fluoroforo dalla retta di taratura.

Es. RFU campione = 6750; bianco = 750.

RFU campione netti = 6000

nmol fluoroforo campione = $6000/8289,8 = 0,724$ nmol

Corso di laurea in Scienze Biologiche

Corso di laurea magistrale in Scienze Biomolecolari e dell'Evoluzione

Materiale didattico di supporto

Questo e tutto il materiale fornito a supporto delle lezioni, reperibile nel minisito dell'insegnamento o sulla piattaforma online UniFE o mediante altre piattaforme utilizzate dal docente, deve essere inteso come traccia degli argomenti svolti, e non sostituisce il libro di testo

Raccomandazione importante: questo materiale didattico è per uso personale dello studente, ed è coperto da copyright. Ne è severamente vietata la riproduzione, la diffusione o il riutilizzo, anche parziale, ai sensi e per gli effetti della legge sul diritto d'autore.