

# ANALISI DI BIOMOLECOLE

Prof.ssa Cristina Airoidi

## Lezione 1

## LE TECNICHE

In ordine di difficoltà ma anche di numero di informazioni strutturali ricavabili da queste tecniche:

1. Spettroscopia infrarossa (IR)
2. Spettrometria di massa (MS)
3. Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

In tutti i casi le tecniche mi permettono sempre di ottenere un dato analitico e quindi un risultato che deve però essere interpretato e deve risultare affidabile. Nel caso in cui invece il dato analitico devo ottenerlo devo chiedermi se con la strumentazione che ho a disposizione sono in grado di ottenere il dato che cerco in senso di sensibilità, risoluzione, etc.

### SPETTROSCOPIA E SPETTROMETRIA

In tutti i casi utilizzo degli spettrometri.

Quando parlo di spettrometria fa riferimento alla misura dello spettro anche dal punto di vista quantitativo.

La spettroscopia è una tecnica che mi permette di indagare ciò che accade a seguito dell'interazione fra lo spettro elettromagnetico, la sua radiazione, e la materia. La spettroscopia osservo qual è il prodotto di un'interazione e nella misura in cui l'osservazione me lo permette posso dedurre delle caratteristiche proprie della materia in oggetto. Si realizza attraverso l'osservazione dello spettro.

### LE ONDE ELETTROMAGNETICHE

Le regioni dello spettro elettromagnetico che mi interessano sono:

- Le onde radio per NMR
- L'infrarosso per IR

Le lunghezze d'onda utilizzate in queste due tecniche sono lunghezze d'onda maggiori di quella visibile. Anche in questo caso queste onde elettromagnetiche danno origine a transizioni energetiche. Se utilizzo delle onde UV-visibile vado ad originare transizioni energetiche che riguardano gli elettroni mobili. Con IR avrò transizioni energetiche coinvolgenti i legami chimici. Nell'NMR ho transizioni energetiche che riguardano i nuclei atomici.

### L'ENERGIA IN GIOCO

L'energia trasportata da una radiazione elettromagnetica è data dal rapporto fra  $h \cdot \nu$ , da qua possiamo dedurre che l'NMR è quella con un minor utilizzo di energia. Questo significa che la probabilità che il campione venga deteriorato dalla misura stessa è prossimo a zero. Questo mi permette di riutilizzare il campione anche in seguito all'analisi. Anche l'IR non da grossi problemi di degradazione del campione esclusi i campioni che sono particolarmente termosensibili.

In generale il trasferimento di energia riguarda quanti di energia. Se fornisco un quanto di energia (energia sempre quantizzata) alla materia in grado di portare la materia allo stato energetico differente dal quale si trovano possono avvenire due transizioni: base-eccitato e eccitato-base. In un caso ho assorbimento e nell'altro ho emissione. La radiazione elettromagnetica promuove entrambe le transizioni. Di solito quello che noi osserviamo è l'assorbimento in quanto la maggior parte delle molecole che andrò ad analizzare si troveranno in uno stato di energia minore.

## SPETTROSCOPIA INFRAROSSA (IR) O SPETTROSCOPIA VIBRAZIONALE

Studia l'interazione delle onde elettromagnetiche IR e la materia.

Quello che succede ad una molecola irraggiata è che va incontro a transizioni energetiche che riguardano la rotazione e la vibrazione dei legami chimici presenti nella molecola stessa.

La regione dell'infrarosso è suddivisa in: vicino IR (14000-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), medio IR (4000-500  $\text{cm}^{-1}$ ) e lontano IR (500-20  $\text{cm}^{-1}$ ), che vengono usati per osservare diversi modi vibrazionali.

Quando sono al di sotto dei 100  $\text{cm}^{-1}$  i quanti di energia promuovono dei moti rotazionali. Sostanzialmente fanno ruotare gli atomi coinvolti nel legame. Gli spettri che io osservo sono spettri costituiti da linee molto strette (ognuna di queste rappresenta una transizione rotazionale). Quando io lavoro in una regione dell'IR tra 100 e 10000  $\text{cm}^{-1}$  riesco ad avere anche moti vibrazionali e quindi a far vibrare i legami chimici; tuttavia in questa regione gli spettri ottenuti presentano delle bande molto allargate perché ogni moto vibrazionale sottende anche al moto rotazionale. *Gli spettri IR vengono chiamati spettri vibro-rotazionali.*

Vogliamo correlare le bande di assorbimento dello spettro con la natura dei legami in studio. Questo posso farlo perché le frequenze alle quale avvengono gli assorbimenti dei diversi legami dipendono da parametri strutturali fondamentali:

- Masse relative degli atomi coinvolti nel legame
- Costanti di forza dei legami
- Geometria degli atomi

Sulla base della frequenza di assorbimento presente nella banda dello spettro IR posso dedurre che nella molecola vi siano diverse tipologie di legami.

### ASSORBANZA E TRASMITTANZA

La rappresentazione dello spettro possono avere le bande verso l'alto allora in ordinata ho l'intensità di assorbimento. In altri casi potremmo osservare delle bande che puntano verso il basso; in questo caso gli spettri vengono rappresentati in trasmittanza e non in assorbanza. Sono valori correlati ma diversi. Tradizionalmente troviamo gli spettri di composti organici a basso peso molecolare in trasmittanza mentre spettri di macromolecole in assorbanza.

### NUMERO D'ONDA

In ascissa viene riportato il numero d'onda: è una grandezza inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda e direttamente proporzionale alla frequenza. È un metodo diverso di esprimere la frequenza. Viene espresso in  $\text{cm}^{-1}$ . Questo valore ha lo stesso andamento della frequenza.

### MODI DI VIBRAZIONE MOLECOLARE CHE OSSERVIAMO

- Stretching: questo prevede l'allungamento e accorciamento del legame in modo ritmico
- Bending: prevede la variazione dell'angolo di legame. Vi sono anche una serie di sottotipologia.

In entrambi i casi possiamo avere moti simmetrici e moti asimmetrici. Il moto posso osservarlo ogni volta che le vibrazioni mi portano ad una variazione del momento di-polo della molecola in studio.

Tutte le frequenze associate ai moti di stretching dei legami chimici possono essere descritte attraverso la legge di Hooke (legge dell'oscillatore armonico); le grandezze fisiche di questa formula che ci interessano sono  $M_x$  e  $M_y$  (masse degli atomi coinvolti nel legame) e  $F$  (costante di forza del legame). **Per ogni tipologia di legame posso attraverso questa legge correlarla ad una frequenza dello stretching del legame stesso.** Da questa legge quindi possiamo dedurre che

Tipo di legame	Regione di assorbimento ( $\text{cm}^{-1}$ )
C-C, C-O, C-N	1300-800
C=C, C=O, C=N, N=O	1900-1500
alchini, azidi, nitrili	2300-2000
C-H, O-H, N-H	3800-2700

di assorbimento caratteristiche.

la forza del legame è direttamente proporzionale alla frequenza mentre è inversamente proporzionale alle masse.

**La combinazione degli atomi coinvolti, massa e differenza di elettronegatività, fa sì che ogni legame abbia una frequenza di vibrazione prevedibile.** Diverse tipologie di legame hanno regioni

### LEGAMI AD IDROGENO

Vi possono essere dei legami deboli: il legame ad idrogeno. Possono far variare in modo significativo le frequenze di stretching.

Se l'idrogeno è coinvolto in un ponte idrogeno è come se fosse trattenuto e quindi di fatto il suo legame covalente con l'eteroatomo è impedito nella vibrazione. Tipicamente quando la molecola è coinvolta in legami HH osservo una variazione nelle frequenze di stretching dei legami negli atomi che sono coinvolti nel legame stesso. Questo perché il legame HH modifica la costante di forza di entrambi i gruppi di atomi coinvolti.

La formazione di legami HH intramolecolari si generano praticamente sempre mentre il legami HH intermolecolare esso è strettamente dipendente dalla concentrazione (diluendo dovrei riosservare la frequenza di stretching analoga a quella attesa in assenza del legame).

L'IR è fondamentale per lo studio di motivi di strutture secondarie delle proteine. Alla base della loro struttura vi sono i legami idrogeno e quindi avere una tecnica che ci consente di rilevarne la presenza è fondamentale.

### FINGER-PRINT

Inoltre vi è una regione finger-print: tale regione cadono assorbimenti legati al bending dei legami che non sono immediatamente riconducibili ad un tipo di legame ma sono molto caratteristiche di ogni molecola. Tale regione non mi permette di ricavare informazioni strutturali ma posso identificare univocamente la mia molecola a prescindere dalle condizioni sperimentali nelle quali si opera (es. stato fisico, diluiti/concentrato, solvente, etc.). Le altre regioni invece sono più informative da un punto di vista strutturale ma potrebbero variare al variare delle condizioni sperimentali.

Le analisi le posso fare con il campione in diversi stati fisici. Posso operare su campioni liquidi, gassosi o solidi. Questo è un punto a favore dell'IR. Non è sempre possibile es. MS.

### REGOLE GENERALI

- Le frequenze di stretching sono in generale più alte delle corrispondenti frequenze di bending
- Atomi legati ad idrogeno hanno frequenze maggiori che se legati ad atomi più pesanti
- Carboni con tripli legami hanno frequenze maggiori di quelli con doppi legami, i quali hanno frequenze maggiori di quelli con legami semplici

Lezione 2

### SPETTRI IR

Bande di assorbimento caratteristiche di alcuni gruppi funzionali presenti nella molecola.

**ALCOLI E FENOLI:** sono caratterizzati dalla presenza di un legame -OH e legame -CO. Il legame singolo CO assorbe in una regione ampia tra 1300 e 1200; tale regione non è molto diagnostica perché nella stessa regione vi posso trovare anche numerosi bending. Il legame OH invece, in assenza di fenomeni di legami H/H, questo legame ha stretching in regioni comprese tra 3650 e 3580 e da delle bande peculiari anche per forma. Sono bande molto ampie e profonde.

Nel caso in cui il campione è preparato in modo tale che nel campione siano presenti legami H/H si viene a modificare la frequenza di assorbimento; tale legame fa sì che la massa apparente dell'idrogeno aumenta e quindi la vibrazione armonica del legame è differente con diminuzione della frequenza di vibrazione. Abbiamo numero d'onda (nota bene le frequenze diminuiscono da sinistra destra) leggermente inferiori. L'assorbimento del -CO si noti come cade in una regione già affollata: posso identificarlo come potrei non notarlo.

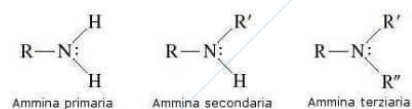
Da questo spettro non ho indicazioni strutturali ma questi spettri sono spesso complementari ad altri spettri quali NMR.

### ALDEIDI E CHETONI

I legami caratteristici è C doppio legame O. Tale legame ha un assorbimento legato allo stretching che differisce un po' a seconda che si tratti di un aldeide o di un chetone: di fatto l'intorno chimico è differente e cambia la massa apparente del carbonio.

Nelle aldeidi abbiamo un banda di assorbimento dello stretching compresa fra i 1740 e 1720  $\text{cm}^{-1}$  mentre per i chetoni va da 1725 a 1705. Ho una regione di parziale sovrapposizioni.

### AMMINE



Legami: NH e CN

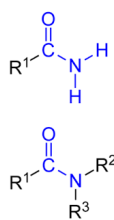
Bande di assorbimento di stretching: NH 3400-3500 (due bande per le primarie, 1 banda per le secondarie e nessuna banda per le terziarie; anche in questo caso in presenza di legami HH avremo bande spostate a frequenze d'onda leggermente più basse) mentre per CN 1200-1350 (regione caratteristica ma spesso affollata).

### ACIDI CARBOSSILICI E DERIVATI

- OH: 2500-3300
- C doppio legame O: 1710

Questi composti caratteristici per due stretching di legame. Le bande di assorbimento di questi due sono abbastanza caratteristiche. Tale legame ha una banda di assorbimento del CO hanno bande molto strette e che cadono in zone molto definite. Nel caso dell'OH abbiamo bande che cadono a frequenze molto diverse da quelli di alcoli e fenoli e in genere sono meno profonde. La probabilità di avere legami HH è estremamente probabile; il contributo di questi è molto più significativo a meno che il campione sia impedita la dimerizzazione.

## AMMIDI



Le ammidi sono abbastanza distinguibili perché spesso ho più bande diagnostiche: abbiamo la banda CO la banda CN e anche la banda NH (ad eccezione delle ammidi terziarie). Nei legami ammidici ho delle bande di assorbimento specifico che si chiamano ammide 1 e ammide 2.

## IR DI PROTEINE

Lo spettro IR di una proteina lo posso ricavare in termini di assorbanza e quindi con le bande rivolte verso l'alto. Nello spettro di una proteina in acqua si nota come, il range di numeri d'onda ristretto (2600/1000), posso notare un picco evidente a 1645 e un banda molto basso e allargato a 2135. Non ci ricavo nulla. La maggior parte del contributo dello spettro è dovuto all'acqua. Per riuscire ad apprezzare lo spettro della proteina devo sottrarre lo spettro dell'acqua. Altra soluzione è quello di acquisire spettri IR di proteine in acqua deuterata.

Solo a questo punto posso apprezzare le bande di assorbimento IR delle proteine:

- Banda di assorbimento con forma frastagliata, assorbimenti sovrapposti, dove assorbono i motivi saccaridici delle glicoproteine tra 1200-1000
- Bande di assorbimento di ammide 1 e ammide 2. Queste sono rispettivamente l'assorbimento ammide 1 dell'assorbimento di stretching del doppio legame CO e ammide 2 il bending del legame NH (lo stretching ce lo aspettiamo a oltre a 3000). Queste tra 1700 e 1500.

Da questi spettri posso derivare la presenza di motivi strutturali specifici, motivi glicosidici ed elementi relativi alla struttura secondaria delle proteine in virtù dell'analisi di questa regione spettrale di ammide 1 e ammide 2. Le strutture secondarie delle proteine, alfa elica e beta foglietti, derivano dalla formazione di legami HH, che mi daranno modifiche dell'assorbimento di ammide 1 e ammide 2. A seconda della presenza o meno di strutture secondarie e dalla loro natura avrò variazioni nell'assorbimento di ammide 1 e ammide 2 della proteina.

Facendo la derivata seconda dello spettro e ottengo uno spettro differente ma ove posso cogliere diversi contributi di uno stesso picco. Le differenze in termini di numero d'onda sono piccole ma sufficiente per determinare se si tratta di specifici motivi strutturali secondari. Posso identificare i contributi di alfa eliche, random coil, beta sheet intramolecolari e intermolecolari. Posso ottenere informazioni dettagliate sulle strutture secondarie presenti all'interno della proteina e come queste si possono modificare al variare di specifici parametri. Ovviamente con IR non mi è possibile né identificare in modo univoco la proteina o risolvere la struttura 3D della proteina stessa.

Es. posso seguire il processo di denaturazione di una proteina o il processo di folding.