

Spettrofotometria

Lo spettro elettromagnetico interessato dalle analisi biologiche è quello dell'*UV-visibile*:

- **Spettro UV**: comprende radiazioni con λ compresa tra **190 e 400 nm**.
- **Spettro del visibile**: comprende radiazioni con λ compresa tra **400 e 750 nm**, quindi è utile per tutte quelle molecole che sono colorate.

Gli spettri di assorbimento nell'UV e nel visibile sono dovuti a *transizioni energetiche* degli elettroni esterni della molecola, sia non impegnati sia impegnati in legami relativamente *poco stabili*, come i legami multipli o i doppietti solitari.

La spettrofotometria è diversa dalla *spettrofluorimetria*, perché cambia il tipo di interazione della luce con la materia. Nel caso della **spettrofluorimetria**, la molecola assorbe energia e la utilizza per imporre *salti quantici* ai suoi elettroni; quando poi l'elettrone torna al suo stato fondamentale, viene rilasciata una radiazione con λ *maggiore* di quella assorbita, e contenuto energetico minore. Quindi, nel caso della spettrofluorimetria, si valuta il confronto tra la λ *di eccitazione* della molecola e quella *di emissione*, proprio perché c'è un assorbimento di energia.

Nel caso della **spettrofotometria**, invece, cambia l'*intensità* della radiazione, ma non la λ , perché non c'è un *assorbimento* di energia. Quindi, si valuterà il confronto tra l'intensità della radiazione *assorbita* e l'intensità della radiazione *emessa*, che sarà inferiore.

Si chiama **cromoforo** il gruppo funzionale dell'analita che dà origine a *picchi distinti* in uno spettro di assorbimento, cioè che assorbe una radiazione luminosa. Il motivo per cui la spettrofotometria non è una tecnica altamente specifica è che molecole diverse possono avere lo *stesso cromoforo*, e quindi dare la stessa risposta all'analisi; se determino quantitativamente un cromoforo, devo essere certa che esso non sia presente anche in un'altra molecola del campione (anche se in alcuni casi questa situazione può essere utilizzata vantaggiosamente).

Alcuni sostituenti sul cromoforo possono causare un *aumento* della λ di assorbimento di *base*, con una conseguente *diminuzione* dell'energia necessaria per la transizione elettronica; in questi casi si parla di **effetto batocromico**. Invece, una diminuzione del numero di doppi legami o la protonazione di un gruppo, portano ad una *diminuzione* della λ , con aumento dell'energia; in questi casi si parla di **effetto ipsocromico**.

Si parla invece di **effetto ipercromico** o **ipocromico** quando si osservano rispettivamente un *incremento* o una *diminuzione* dei valori di assorbanza; ciò è quindi legato all'*intensità* della radiazione emessa.

Un altro problema legato alla spettrofotometria è la scelta del solvente in cui è disciolto il campione. Infatti, esistono solventi con una λ di assorbimento, che potrebbero *interferire* con l'analisi. Il solvente ideale dovrebbe sciogliere tutti i composti presenti nel campione, ma essere trasparente alla λ di analisi. L'acqua distillata si avvicina a questa condizione, ma non è adatta a sciogliere composti organici *apolari*. Ad eccezione dell'acqua, tutti i solventi mostrano una λ **critica** (detta di cut-off) nella *regione UV*, sotto la quale assorbono troppo per consentire analisi del campione. Infatti, siccome il numero di molecole di solvente è estremamente *maggiore* di quello di analita, verrebbe rilevata solo la risposta fornita dal solvente e lo spettro ottenuto dall'analisi sarebbe coincidente con il bianco.

Alcuni solventi sono particolarmente *volatili*, quindi le provette devono sempre essere tappate, per evitare alterazioni della concentrazione dell'analita. Inoltre, l'assorbanza può dipendere anche dalla *temperatura*, quindi è importante che l'analisi venga condotta a temperatura ambiente, in modo da limitare gli errori.

Lo *spettrofotometro* è lo strumento utilizzato per eseguire analisi spettrofotometriche. Esso è costituito da diverse componenti:

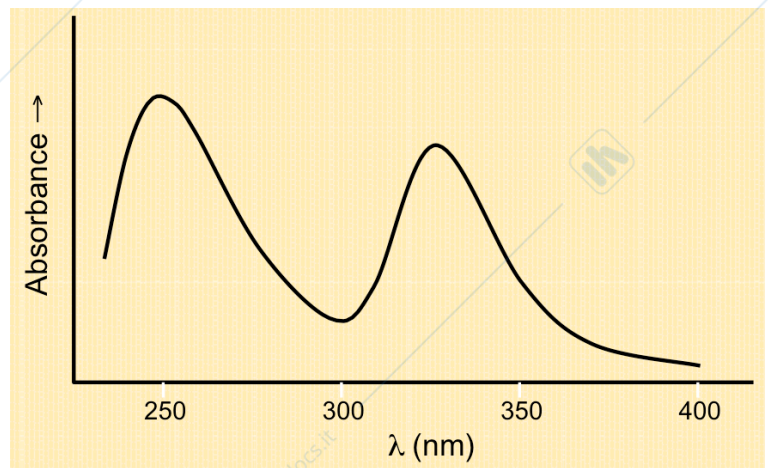
- **Sorgente luminosa:** solitamente sono presenti *due lampade*, una per l'analisi nell'UV e una nel visibile. Esistono lampade allo *xeno* (sia per UV sia per visibile), lampade al *tungsteno* per il visibile e lampade al *deuterio* per l'UV.
- **Monocromatore:** permette di *scomporre* la radiazione policroma nelle sue componenti e di selezionarne una con una *specifica* λ . In realtà, viene selezionato un intervallo di λ il più ristretto possibile; questo intervallo di lunghezze d'onda costituisce la *banda passante* del monocromatore.
- **Cuvetta:** è il contenitore in cui è posto il campione. Può essere in *quarzo*, in *vetro* o in *plastica*, con l'accortezza che il vetro non è trasparente all'UV, quindi non potrà essere utilizzato per questo tipo di analisi.
- **Fotomoltiplicatore:** *amplifica* il segnale in uscita in modo che possa essere rivelato.
- **Registratore:** converte il segnale in un output numerico.

Esiste anche un particolare tipo di spettrofotometro in cui la cuvetta è posizionata *prima* del monocromatore (spettrofotometro **diode array**): in questo modo, il campione è attraversato da *tutte le* λ della radiazione, e la radiazione da esso *emessa* viene scomposta in intervalli di λ ristretti dal monocromatore. Questo è utile quando si lavora con un campione incognito, di cui non si conosce la λ di assorbimento *massimo*; invece, per campioni con λ di assorbimento nota, si usa solitamente uno spettrofotometro normale.

Lo **spettro di assorbimento** è il grafico che si ottiene dall'analisi spettrofotometrica e che mette in correlazione la λ della radiazione con l'intensità dell'assorbimento (*assorbanza*).

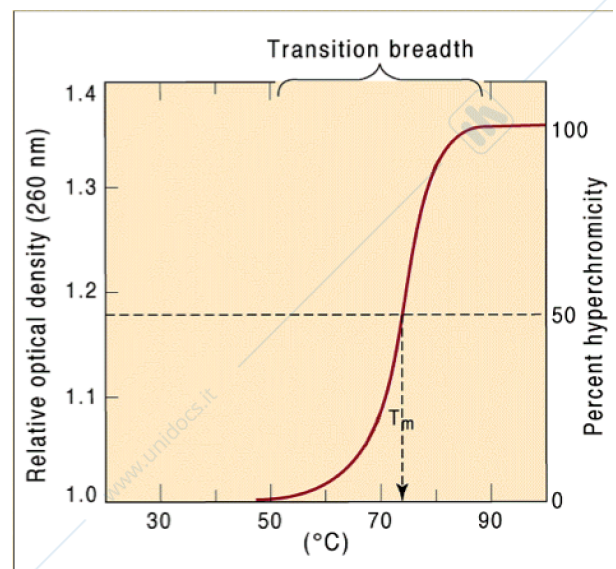
Dallo spettro di assorbimento a fianco, si può capire che l'assorbimento avviene nell'UV e che sono presenti *due picchi* di assorbimento, a λ 250 nm e circa 325 nm.

Da questo spettro si può ipotizzare che il campione sia costituito da una molecola con *due cromofori* che assorbono a λ diverse, o che siano presenti due molecole diverse, o che uno *stesso cromoforo* assorba a due λ diverse. Per capire quale ipotesi è corretta, bisognerebbe compiere altri esperimenti diversi. Si parla allora di limite della tecnica, quando la tecnica ha fornito tutte le informazioni che era possibile aspettarsi.



La denaturazione del DNA

La spettrofotometria può essere utile nello studio della *denaturazione* del DNA, cioè il processo nel quale si rompono i legami a idrogeno tra le basi azotate del DNA e le due semieliche si separano. La denaturazione avviene semplicemente aumentando la **temperatura** a cui si trova il DNA, ma per valutare a che livello si è spinta viene utilizzata la spettrofotometria. Infatti, si verifica un *effetto ipercromico* legato all'effetto cooperativo dei legami a idrogeno, per il quale, all'aumentare della temperatura, aumenta l'*assorbanza* (o densità ottica) alla λ di 260 nm, cioè quella classica del DNA.



All'aumentare della temperatura, l'assorbanza aumenta fino ad un *valore massimo*, che corrisponde alla condizione in cui *tutto* il DNA è stato denaturato.

Dal grafico è possibile ricavare un valore di temperatura specifico, la **temperatura di melting** (T_m), cioè la temperatura alla quale si è denaturato il 50% del DNA.

La T_m dipende dalla *composizione in basi* del DNA. Infatti, ogni adenina si lega ad una timina con 2 legami a idrogeno, mentre ogni guanina si lega ad una citosina con 3 legami a idrogeno; quindi, rompere un'interazione G-C richiede più energia ed una temperatura maggiore e la denaturazione comincia dalle zone del DNA ricche di A-T. Si può quindi dire che, *maggiore* è la T_m , minore sarà il numero di coppie A-T in quel segmento di DNA.

Tuttavia, per avere l'esatta composizione in basi del DNA, è necessaria un'altra tecnica che permetta di sequenziarlo.

La legge di Lambert-Beer

È un'equazione matematica che correla l'entità dell'assorbimento con la concentrazione di analita. È applicabile soltanto a molecole *pure in soluzione* o a molecole con un *cromoforo* che sia assente in tutte le altre molecole della soluzione (non devono esserci interferenze).

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I} = k d C$$

Dove:

- **A** è l'assorbanza o estinzione.
- **I_0** è l'intensità della radiazione in entrata e **I** è quella in uscita.
- **d** è il cammino ottico, dato dalla lunghezza della cuvetta (di solito 1 cm).
- **C** è la concentrazione dell'analita.
- **k** è la costante di assorbimento (tabulata).

La **trasmittanza** (T) è legata alle intensità delle radiazioni:

$$T = \frac{I_0}{I}$$

La **k** di assorbimento può essere espressa in due modi:

- **ϵ (coefficiente di estinzione molare)**: è l'assorbanza di una soluzione 1 M in un cammino ottico di 1 cm e in condizioni standard di λ , solvente e temperatura. Si esprime in $\frac{L}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$. Si usa quando è noto il *peso molecolare* dell'analita.
- **E% (coefficiente di estinzione percentuale)**: è l'assorbanza di una soluzione contenente 1 g di analita in 100 ml di solvente, in un cammino ottico di 1 cm e in condizioni standard di λ , solvente e temperatura. Si esprime in $\frac{100 \text{ ml}}{\text{g}\cdot\text{cm}}$. Si usa quando *non* è noto il peso molecolare dell'analita o si ha una miscela di analiti.

Più alto è il valore di k, maggiore è la capacità del cromoforo di assorbire, cioè maggiore è la sensibilità del sistema, perché aumenta la risposta del campione.

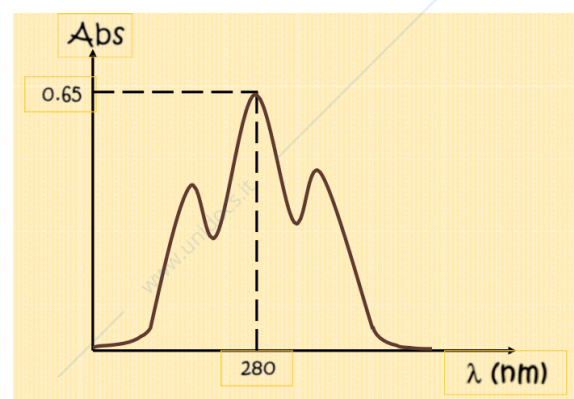
I valori di k sono *tabulati* ad una specifica λ , che è solitamente quella di *massimo assorbimento* della molecola. Nell'analisi spettrofotometrica, allora, è importante utilizzare quella λ , in modo da non commettere errori.

Esercizio

- $\epsilon = 40000 \frac{L}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$
- $A = 0.65$
- $l = 1 \text{ cm}$

$$C = \frac{\epsilon}{A d} = 16 \mu\text{l}$$

Lo spettro di assorbimento è il classico spettro di una molecola con 3 doppi legami coniugati.



Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa è il procedimento per il quale la risposta derivante dalla miscela in esame viene confrontata con quella ottenuta da una miscela di *uguale composizione*, ma contenente una concentrazione nota dell'analita da determinare (**soluzione di riferimento**).

I requisiti essenziali di un'analisi quantitativa sono:

- **Specificità:** possibilità di dosare un analita senza avere *interferenze* da parte di altre sostanze presenti in miscela.
- **Limite di determinazione:** la più piccola quantità di analita che può essere misurata ad un livello stabilito di confidenza statistica.
- **Riproducibilità:** CV% ottenuto confrontando i risultati delle misure della stessa concentrazione di analita nel campione utilizzando lo stesso metodo analitico, ma su strumenti diversi, da operatori diversi e in tempi diversi.

Il confronto tra la risposta della miscela in esame e quella di riferimento è reso possibile dall'identificazione di una *funzione matematica* che corredi il segnale alla concentrazione. Infatti, lo strumento non dà sempre una risposta lineare con la concentrazione, ma è necessario individuare l'*intervallo di concentrazioni* per il quale la risposta risulta **lineare**. Per fare questo, si costruisce una **curva di calibrazione**, che mette in correlazione la *concentrazione di analita* (asse delle x) con la *risposta strumentale* (asse delle y).

Per la corretta costruzione di una curva di calibrazione è necessario:

- Definire con sicurezza e precisione la concentrazione delle **soluzioni standard**. Lo standard è la molecola da indagare, quindi l'analita. Gli standard sono utili in quanto permettono di vedere come si comporta l'analita nelle *condizioni di analisi* e nei confronti dello *strumento* di analisi.
- Stabilire l'intervallo di concentrazione in cui eseguire l'analisi, avendo un'idea del valore di concentrazione incognita *atteso*, in modo che la curva di calibrazione comprenda quel valore nel range di linearità.
- Preparare un *numero adeguato* di campioni di riferimento: i campioni devono essere almeno 4 e, più numerosi sono, più la curva di calibrazione risulta specifica.

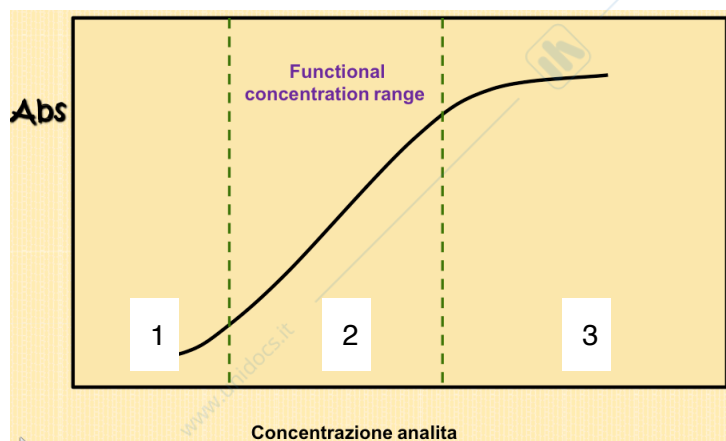
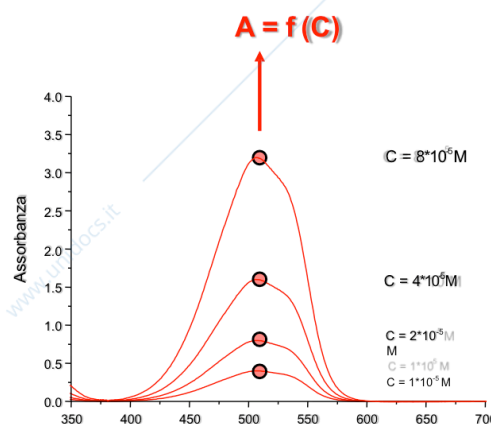
La preparazione degli standard prevede l'aggiunta di *quantità note e crescenti* di analita alla miscela di analisi; a questo punto, si procede con l'analisi su ciascuna soluzione e si costruisce la curva con i dati ottenuti. Se la risposta è *lineare*, mi devo aspettare che la risposta dello strumento aumenti all'aumentare della concentrazione di analita.

L'identificazione del *range di linearità* non è ben visibile nel grafico dello spettro di assorbimento, mentre è identificabile nel grafico che correla la concentrazione con l'assorbimento.

Nell'**intervallo 1**, la concentrazione di analita è *troppo piccola* perché ci sia una risposta adeguata; in questo caso posso aumentare la quantità di campione fino a far rientrare il valore di concentrazione nel range di linearità.

L'**intervallo 2** è il *range funzionale*, cioè l'intervallo per cui c'è una correlazione lineare tra concentrazione di analita e risposta.

Nell'**intervallo 3** l'analita risulta *troppo concentrato* per poter dare una risposta adeguata; in questo caso è possibile diluire la soluzione (per risalire alla concentrazione iniziale bisogna tener conto di tutti i *fattori di diluizione*).



Colorimetria

La colorimetria è la parte della spettrofotometria che si occupa delle analisi nello *spettro del visibile*. Alcune molecole sono già di per sé dotate di un *cromoforo* che assorbe ad una certa λ nel visibile, ma questi sono casi rari. Solitamente, infatti, l'analita non ha un cromoforo, quindi è necessario che esso crei un *addotto* con un reattivo che abbia un suo cromoforo, in modo che si possa poi analizzare per via spettrofotometrica il complesso così formato. Anche in questo caso, per determinare la concentrazione incognita di analita, si ricorre alla costruzione di una curva di calibrazione. Infatti,

La determinazione quantitativa delle **proteine** in una miscela si effettua mediante *colorimetria*. Infatti, le proteine presentano due λ di assorbimento: una a 230 nm e una a 280 nm. Una radiazione con λ di 230 nm ha un'energia sufficiente per permettere la transizione $\sigma \rightarrow \sigma^*$ che caratterizza il legame peptidico, mentre una radiazione con λ di 280 nm permette la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, che caratterizza le catene laterali aromatiche degli amminoacidi (come tirosina e triptofano). Tuttavia, la spettrofotometria in UV per le proteine non si utilizza, in quanto la loro λ di assorbimento rimane molto simile a quella del **DNA**. Il DNA ha due λ di assorbimento nell'UV ed, essendo l'assorbanza *additiva*, se esso fosse analizzato in presenza di proteine alla λ comune, si otterrebbe un valore di assorbanza dato dal contributo di entrambi.

Per effettuare l'analisi colorimetrica delle proteine si utilizzano *diversi metodi*, che prevedono l'aggiunta di reattivi per creare un addotto che assorba nel visibile.

Metodo di Lowry

Questo metodo usa il **reattivo di Folin-Ciocalteu**, cioè una miscela di *acido fosfotungstenico* e *fosfomolibdico*, che è in grado di legarsi agli *anelli aromatici* degli amminoacidi presenti nel campione; in questo modo si forma un addotto che assorbe a **660 nm**.

Infatti, il gruppo fenolico dei residui tirosinici reagisce con il reattivo a *pH basico*. Questo causa però una complicanza: se nel campione sono presenti *amminoacidi liberi*, essi possono creare interferenza nell'analisi, perché possono reagire anch'essi con il reattivo. Per questo, è necessario fare il *bianco* utilizzando la matrice esatta del campione, che eventualmente contiene anche gli amminoacidi interferenti, in modo poi da sottrarla alla risposta data dal campione.

Un altro problema è la necessità di avere il **pH basico**; infatti, non tutte le proteine sono solubili a pH basici e, se c'è un *precipitato proteico*, il metodo non è efficace e non si può utilizzare.

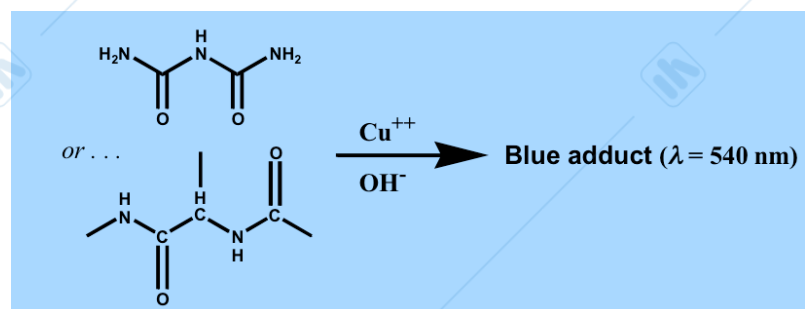
Lo sviluppo del colore non è immediato: il colore compare dopo circa *mezzora* dall'aggiunta del reattivo e, durante questo intervallo di tempo, il campione deve essere lasciato al buio. Inoltre, il colore *non è stabile*, ma tende a cambiare nel tempo, quindi è necessario analizzare i campioni in tempi rapidi per non commettere errori.

Infine, vengono analizzate tutte le proteine presenti nel campione senza distinzione e la sensibilità arriva fino a 10 mg/L.

Metodo del biureto

Come il metodo di Lowry, il metodo del biureto richiede **pH basico**. Il reattivo utilizzato è lo ione rame (Cu^{2+}), che può creare un *addotto* interagendo con gli atomi che formano il *legame peptidico* nelle proteine; per questo, gli amminoacidi non possono fare da interferenti in questo caso. In questa reazione si forma un *complesso di coordinazione* con 4 gruppi $-\text{NH}$ di altrettanti legami peptidici, che assume un colore blu intenso.

Questo metodo è *più specifico* di quello di Lowry, proprio perché non può interferire con gli amminoacidi, ma risulta meno sensibile, perché arriva soltanto a 1 g/L.



Metodo di Bradford

È chiamato anche “metodo del blu Coomassie”, proprio perché utilizza come colorante il **blu di Coomassie**, che è in grado di complessare *amminoacidi basici* presenti nelle proteine, in presenza di *acido fosforico* (per questo, a differenza dei precedenti due metodi, richiede un **pH molto acido**). Il complesso che si forma assorbe a **595 nm**.

Questo metodo presenta il vantaggio che il colore si sviluppa *immediatamente* all'aggiunta del reattivo (senza tempi di attesa) e rimane *stabile* nel tempo, quindi gli errori nell'analisi sono limitati. Lo svantaggio principale sta nel fatto che non tutte le proteine sono solubili a pH acido, quindi, in alcuni casi, è necessario ricorrere ad altri metodi.

La *sensibilità* è molto migliore del metodo del biureto, perché arriva fino a 50 mg/L, una concentrazione paragonabile alla concentrazione fisiologica di proteine a livello cellulare.

La colorimetria è utilizzata anche per l'analisi dei **lipidi**, in particolare del colesterolo e dei trigliceridi.

- **Determinazione del colesterolo totale.**

Utilizza un metodo *spettrofotometrico* che si basa sul lavoro di *enzimi specifici*.

La maggior parte del colesterolo presente nell'organismo è in forma di *estere*, ma l'enzima che agisce nella determinazione del colesterolo agisce proprio a livello dell'**-OH** in 3 del colesterolo, che quindi deve essere *liberato*. Quindi, si utilizza un'*idrolasi* che idrolizza i legami esteri del colesterolo, per ottenere *colesterolo libero*. A questo punto, siccome il colesterolo come tale non assorbe, viene trattato con la *colesterolo ossidasi*, che lo ossida in posizione 3 a **colesenone** e produce **acqua ossigenata**.

Il colesenone non assorbe, ma l'acqua ossigenata, in presenza di una *perossidasi* e *aminoantipirina*, produce la **chinoneimina**, un colorante che assorbe a 500 nm.

Quindi, la determinazione del colesterolo avviene in maniera *indiretta* (attraverso la determinazione dell'acqua ossigenata), mentre quella delle proteine era diretta.

Questo processo di determinazione può essere *automatizzato* e, benché la reazione non sia altamente specifica per il colesterolo, le interferenze sieriche sono minime.

- **Determinazione dei trigliceridi.**

I *trigliceridi* non assorbono come tali. Inizialmente vengono idrolizzati mediante la *lipasi*, con formazione di glicerolo e acidi grassi liberi. Il *glicerolo* viene trattato con *glicerochinasi* in presenza di ATP, con formazione di *glicerofosfato* e *ADP*. Mediante l'aggiunta di *glicerofosfato ossidasi*, si ottiene **diidrossiacetone fosfato** e **acqua ossigenata**, che, sempre in presenza di *perossidasi* e *aminoantipirina*, produce la **chinoneimina**, che viene poi determinata per via spettrofotometrica.

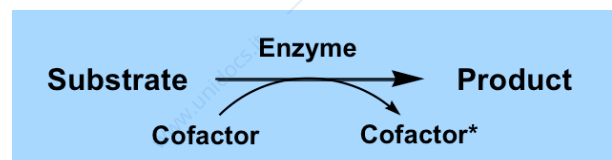
In un campione di plasma, sono presenti sia trigliceridi sia colesterolo e il prodotto finale della determinazione è sempre lo stesso, cioè la *chinoneimina*. L'analisi del primo o dei secondi singolarmente è possibile grazie al fatto che si arriva alla chinoneimina mediante l'azione di *enzimi specifici*, che agiscono selettivamente o sul colesterolo o sui trigliceridi.

Dosaggio dell'attività enzimatica

L'attività enzimatica può essere studiata per via *spettrofotometrica*, perché molti substrati, prodotti o cofattori assorbono nell'UV o nel visibile. Quindi, se questi composti presenti in *miscela* possiedono picchi di assorbimento diversi e se la legge di Lambert-Beer è valida, si può assumere la differenza di assorbanza tra una misurazione iniziale ed una finale come base per il *dosaggio* dell'attività enzimatica.

L'andamento di una reazione enzimatica (e quindi l'attività enzimatica) può essere seguito valutando:

- La *scomparsa* del substrato.
- La *formazione* del prodotto.
- La *conversione* di un cofattore.

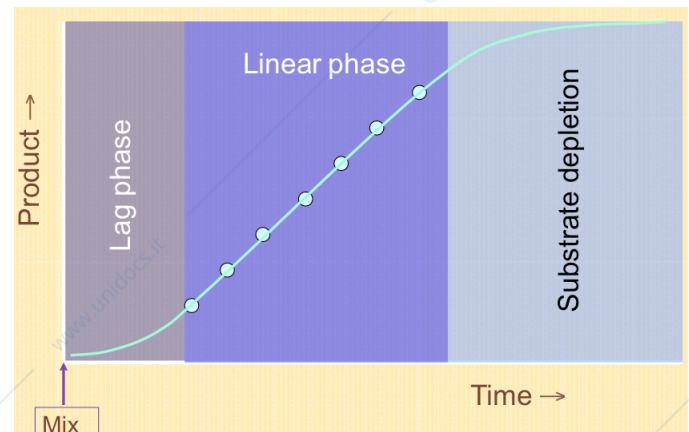


Chiaramente, per dosare l'attività enzimatica è necessario che almeno uno di questi tre elementi abbia un *cromoforo*.

Se l'**enzima** è in eccesso, la velocità di reazione dipende dalla concentrazione del *substrato* (in presenza di concentrazione costante di cofattori), mentre, se il **substrato** è in eccesso, la velocità di reazione dipende soltanto dall'*attività dell'enzima*; quindi, per valutare l'attività enzimatica, si lavorerà nel secondo caso. In ogni caso, si vede che è possibile utilizzare una *stessa reazione chimica*, in due possibili condizioni, per dosare l'enzima o il suo prodotto.

Il grafico a lato mostra il profilo di una reazione enzimatica, che esprime come varia la concentrazione di *prodotto* nel tempo.

Inizialmente, quando si forma la miscela di reazione, non c'è ancora un andamento lineare tra la formazione del prodotto nel tempo, e si parla di **lag phase**. Successivamente, si entra nell'*intervallo lineare* (**linear phase**), in cui la concentrazione di prodotto aumenta all'aumentare del tempo. Infine, si trova la *fase di deplezione del substrato* (**substrate depletion**), in cui la concentrazione di prodotto raggiunge il *massimo* in quanto non c'è più substrato da convertire in prodotto.



Non è importante solo la fase lineare dal punto di vista analitico, perché anche le altre due fasi possono avere caratteristiche *interessanti*. Ad esempio, alcune patologie sono riconoscibili perché hanno una lag phase più lunga, quindi l'analisi sarà effettuata in questa fase. Invece, per valutare l'efficacia di un attivatore o inattivatore, sarà utilizzata tutta la curva per l'analisi.

L'attività enzimatica viene calcolata mediante un'equazione che rappresenta una modificazione della *Lambert-Beer*:

$$UE = \frac{\Delta E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda} \cdot b \cdot n} \cdot \frac{a}{x}$$

Nell'equazione:

- **UE**: sono le *unità enzimatiche*.
- ΔE_{λ} : è la differenza di assorbanza tra il campione *bianco* e il campione letto dopo un certo intervallo di tempo, ad una determinata λ .
- ϵ_{λ} : è il coefficiente di estinzione molare alla λ definita.
- **b**: è il cammino ottico della cuvetta (solitamente 1 cm).
- **n**: è la stechiometria della reazione.
- **a e x**: sono i *fattori di diluizione*. Infatti, quando si lavora con un enzima, è necessario che tutte le molecole presenti nel campione siano in soluzione, quindi spesso il campione deve essere *diluito*. In particolare, **a** è il *volume totale* della miscela di dosaggio, cioè del fluido biologico che contiene tutto quello che serve perché la reazione avvenga in modo corretto (analita, cofattori ecc.). Invece, **x** è il volume di fluido biologico *prelevato* e nel quale si trova il campione.

Quando si parla di enzimi, è importante la nomenclatura:

- **Attività enzimatica**: è la capacità dell'enzima di convertire nel tempo l'unità di massa. Infatti, si esprime in unità che indicano le μmoli di substrato trasformate in un minuto, in determinate condizioni di dosaggio.
- **Unità di attività enzimatica (UE)**: è il valore di attività che caratterizza la trasformazione di una μmole di substrato in *un minuto*.
- **Katal**: è il valore di attività enzimatica che catalizza la trasformazione di *una μmole* di substrato in un secondo.
- **Attività specifica**: attività totale dell'enzima diviso il *contenuto proteico* totale del campione

Di norma gli enzimi vengono *purificati* dal tessuto biologico da cui sono estratti e nel quale sono presenti moltissime altre proteine. A seconda di quanto è purificato l'enzima, a parità di peso di campione, un campione può contenere più quantità di enzima: per questo si parla di *contenuto proteico totale*. Per capire se un campione è più o meno puro, si guarda l'*attività specifica*. È importante che il campione sia il più puro possibile perché, talvolta, nella miscela proteica possono essere presenti proteine che influenzano l'attività enzimatica.

Nell'equazione dell'attività enzimatica, nel momento in cui si sta valutando l'attività enzimatica di una serie di campioni *uguali*, in cui varia soltanto la *concentrazione di enzima*, molti parametri risultano costanti e possono essere raggruppati in un unico parametro, chiamato **fattore di correzione** (fc):

$$fc = \frac{1}{\epsilon \lambda} \cdot b \cdot n \cdot \frac{a}{x}$$

Quindi, l'equazione si riduce soltanto a:

$$UE = \Delta E_{\lambda} \cdot fc$$

È bene sottolineare che fc non è l'inclinazione della curva di calibrazione, anche se la comprende al suo interno. Infatti, se si utilizza il *fattore di correzione* si dà per scontato di essere nell'intervallo di linearità della curva.

End point assay

È un metodo che prevede l'analisi dell'attività enzimatica quando la curva del profilo di reazione ha già raggiunto il *plateau*, quindi quando l'attività enzimatica è massima e la reazione è al punto finale.

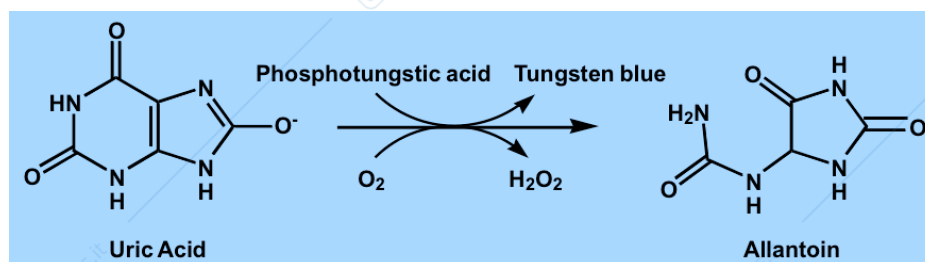
In realtà, quindi, è necessario eseguire *due letture* allo spettrofotometro: una non appena la miscela di reazione è stata aggiunta, e un'altra quando la reazione ha raggiunto la completezza. La prima lettura va fatta dopo l'aggiunta della miscela, e non prima, perché è possibile che nella miscela ci siano molecole con un *Cromoforo* che assorbe alla stessa λ interessata dalla reazione enzimatica, ma che darebbe un valore di assorbanza aspecifica, perché non direttamente implicata con la reazione. Quindi, questa prima misurazione funge da bianco e andrà sottratta alla seconda lettura, in modo da ricavare l'assorbanza specifica.

Come detto, per valutare l'attività enzimatica, si può osservare la *scomparsa del substrato*, la *formazione del prodotto* o la *conversione del cofattore*.

1. Scomparsa del substrato.

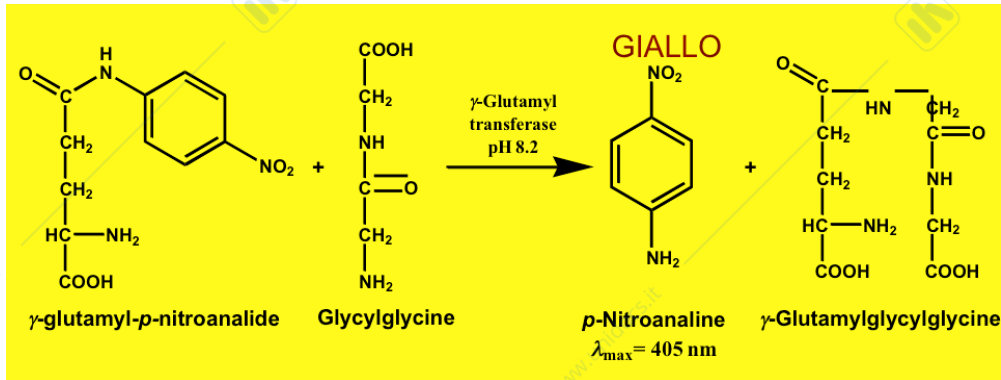
L'*uricasi* è l'enzima che catalizza la decarbossilazione ossidativa dell'acido urico, con formazione di *allantoina*. La reazione avviene in presenza di ossigeno e acido fosfotungstenico, che viene convertito in blu tungsteno.

Siccome l'allantoina non assorbe, mentre l'**acido urico** sì, si può valutare l'attività dell'uricasi guardando la *diminuzione* dell'assorbanza a 585 nm, cioè la λ dell'acido urico. In alternativa, si può anche valutare l'assorbanza del *blu tungsteno*, che aumenterà con il tempo (in questo caso si segue la modificazione del cofattore).



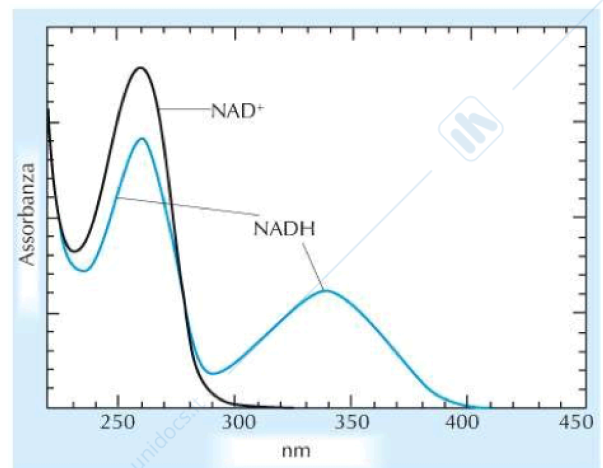
2. Formazione del prodotto.

La γ -glutamyltransferasi (γ -GT) è un enzima importante per la diagnosi di una patologia epatica. Per determinarla, si utilizza un substrato sintetico, costruito sul *glutamide*, cioè il substrato naturale della γ -GT. La reazione avviene in presenza di *glicilglicina*. La γ -GT taglia il substrato sintetico, generando la **para-nitroanilina**, che assorbe a 405 nm e la cui concentrazione può essere ottenuta misurando nel tempo l'*assorbanza*. Quindi, si può risalire alla concentrazione di enzima nel campione.



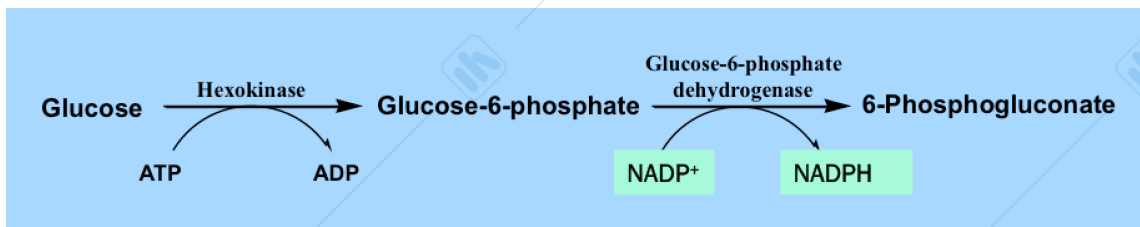
3. Conversione di un cofattore.

Il **NAD⁺/NADH** (così come il **NADP⁺/NADPH**) presenta uno spettro di assorbimento. In particolare, il NADH presenta *due massimi* di assorbimento: uno a **260 nm**, *comune* al massimo di assorbimento del NAD⁺, e uno a circa **350 nm**. Questo significa che l'assorbanza misurata a 260 nm risulta la *somma* del contributo di NAD⁺ e NADH e quindi rimane *costante* durante tutto il corso della reazione, mentre l'assorbanza misurata a 350 nm consente di valutare *soltanto* la concentrazione di **NADH**. Se il NAD⁺ viene convertito in NADH nella reazione, allora l'assorbanza a 350 nm *aumenterà* nel tempo, se invece è il NADH ad essere convertito in NAD⁺, l'assorbanza *diminuirà*.



Tuttavia, non tutte le reazioni enzimatiche sono accoppiate all'uso di NAD⁺/NADH. In questi casi, è possibile associare la reazione da studiare ad un'*altra reazione enzimatica*, che invece utilizza NAD⁺/NADH.

Un esempio è la misura indiretta del **glucosio**, mediante lo studio dell'attività enzimatica dell'*esochinasi*.



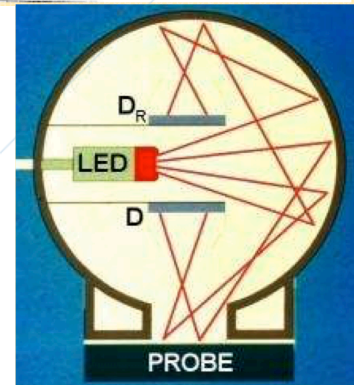
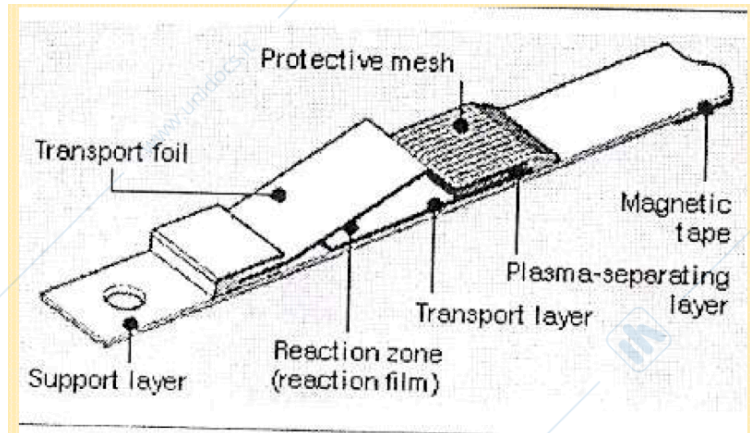
L'*esochinasi* fosforila il glucosio in posizione 6, a spese di un'ATP. Tuttavia, né il glucosio né l'ATP assorbono, quindi la reazione come tale non può essere analizzata mediante spettrofotometria. È possibile però associarla alla reazione catalizzata dalla *glucosio-6P deidrogenasi*, che converte il glucosio-6P in **6-fosfogluconato**, convertendo un NADP⁺ in NADPH (reazione iniziale dello shunt dei pentoso fosfati).

Si procede tenendo come incognita l'attività enzimatica dell'*esochinasi*, quindi si lavora in presenza di un eccesso di glucosio e ATP; una volta formato il glucosio-6P si lavora in eccesso di glucosio-6P deidrogenasi e NADP⁺, in modo che la quantità di 6-fosfogluconato e NADPH formati dipenda *unicamente* da quanto glucosio-6P si era formato, vale a dire dall'attività enzimatica dell'*esochinasi*. Quindi, valutando l'*aumento* dell'assorbanza del NADPH a 350 nm è possibile risalire indirettamente all'attività enzimatica dell'*esochinasi*. Questa è la principale metodica utilizzata per l'analisi dell'*esochinasi*.

La dry chemistry

La dry chemistry ("chimica secca") comprende una serie di metodiche per *determinazioni analitiche* che evitano l'utilizzo di solventi, ma lavorano utilizzando reagenti fissati su una striscia, che, dopo la reazione, può essere letta da un apposito strumento che fornisce il risultato.

Esistono *striscette* (chiamate, per l'appunto, "striscette"), che permettono l'analisi di alcuni **metaboliti** presenti nel sangue, come la *glicemia*, la concentrazione di *colesterolo* e di *trigliceridi*. Su di esse si posiziona un'unica goccia di sangue (quindi non è necessario un prelievo venoso invasivo), che entra in contatto con una serie di film sovrapposti, sui quali si trovano gli *enzimi* necessari. In generale, i prodotti delle reazioni enzimatiche sono *colorati*, quindi possono essere analizzati per via spettrofotometrica, in modo da fornire il valore della dose. Infatti, una volta posizionata la goccia di plasma sulla striscetta, questa viene posta in una *piccola macchina*, nella quale è presente un led impostato su una **specifico** λ , caratteristica del metabolita che deve essere dosato. La luce emessa dal led è riflessa dalle pareti di una sfera, rivestite di specchi, ed è portata ad interagire con un *campione bianco* e con il campione dell'analisi; mediante il calcolo della differenza di assorbanza tra i due campioni, si risale alla concentrazione di metabolita. È fondamentale che, saltuariamente, la macchina venga *tarata* mediante l'utilizzo di striscette di taratura, in modo da verificare che il valore restituito sia attendibile.



Il **wipe test**, invece, viene utilizzato per valutare rapidamente la presenza di *droghe* nei liquidi corporei, in particolare nella saliva e nel sudore, che possono essere ottenuti facilmente. Infatti, il campione di liquido è posto all'estremità della *striscetta* e diffonde per capillarità fino al sito in cui sono presenti gli *enzimi*; in presenza di stupefacenti, sulla striscetta si sviluppa una *reazione colorimetrica*, che può poi essere dosata quantitativamente. In questo modo, è possibile rilevare droghe assunte entro poco tempo dall'analisi.



L'**alcol test** (il palloncino) è un piccolo *spettrofotometro*, che rileva l'alcol etilico presente nell'alito. Per poter misurare correttamente il livello di alcol, bisogna tenere in considerazione che il nostro organismo assorbe tutto l'alcol entro un'ora dall'assunzione e che, essendo molto lento il suo metabolismo, esso resta in circolo per molte ore, diminuendo pian piano (10-15 ml all'ora). La

proprietà più importante dell'etanolo è che, quando il sangue contenente alcol attraversa i *polmoni*, ne espelle una porzione *proporzionale* alla concentrazione ematica mediante l'espiazione; per questo, è possibile rilevare alcol etilico nell'espurato.

L'etilometro contiene al suo interno una fiala con **sali** che reagiscono con l'alcol etilico, nel momento in cui questo sia presente nell'espiazione. La reazione di *ossidazione-riduzione* che avviene comporta una *variazione di colore* dei sali, che può essere misurata per via spettrofotometrica; l'assorbanza misurata è proporzionale all'alcol che ha reagito perché, tanto più alcol sarà presente, tanto più colorati diventeranno i sali.

È possibile calcolare in modo approssimativo il proprio tasso di alcolemia in questo modo:

$$\text{Tasso alcolico } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{\text{Ga} \cdot \text{V} \cdot 0.008 \cdot 1.055}{\text{P} \cdot \text{K}}$$

Dove:

- **Ga**: grado alcolico della bevanda.
- **V**: volume di bevanda ingerito (ml).
- **P**: peso corporeo (in kg).
- **K**: coefficiente di diffusione. Esso è pari a 0.73 per i maschi e 0.66 per le femmine (quindi esiste un'effettiva differenza nella tolleranza all'alcol nei due sessi).
- **1.055**: peso specifico del sangue.

Spettrofluorimetria

Si differenzia dalla spettrofotometria principalmente perché si evidenzia una **variazione** nella λ della radiazione in ingresso e quella della radiazione in uscita dal campione. In questo caso, quindi, si ha un vero e proprio *assorbimento* seguito da *emissione*:

- Inizialmente si ha un fenomeno di **eccitazione**, causato dall'interazione tra la radiazione e la materia e dovuto all'*energia stessa* della radiazione (che è correlata inversamente alla sua λ).
- Dopo l'eccitazione si verifica l'**emissione**, perché gli elettroni tendono a tornare dallo stato eccitato a quello *fondamentale*, e lo fanno riemettendo una radiazione luminosa caratterizzata da un'energia inferiore a quella assorbita, e quindi da una λ maggiore.

L'emissione di radiazioni fluorescenti, allora, avviene a λ *maggiori* rispetto alle radiazioni assorbite (fenomeno che prende il nome di *spostamento* o *shift di Stokes*). La differenza di energia tra la radiazione assorbita e quella emessa è dissipata sotto forma di calore, mediante gli urti tra le molecole.

Lo **spettrofluorimetro** è costituito da una lampada allo *xeno*, che emette una radiazione luminosa che, attraversando il monocromatore per la radiazione di eccitazione, viene separata nelle sue componenti di λ . Un solo ristretto intervallo di λ attraversa la cuvetta, in cui si trova il campione, dal quale viene emessa un'altra radiazione luminosa, che attraversa un *secondo monocromatore* (monocromatore per la radiazione di emissione) prima di raggiungere il fotomoltiplicatore.

La spettrofluorimetria si basa sulla presenza di un **fluoroforo**, che rende la molecole fluorescente. Le molecole fluorescenti, a differenza di quelle dotate di cromoforo e usate nella spettrofotometria, sono molto più *rare*. Spesso, per analizzare mediante spettrofluorimetria una molecola non fluorescente, la si associa ad un *fluoroforo* (come il **bromuro d'etidio** nel caso del DNA). Questo risulta utile perché la spettrofluorimetria è molto più *sensibile* della spettrofotometria, proprio perché sono poco numerose le molecole fluorescenti, quindi è possibile arrivare a determinare concentrazioni molto piccole di analita.

L'analisi quantitativa in spettrofluorimetria è analoga alla spettrofotometria: è necessaria una **curva di calibrazione**, ottenuta analizzando soluzioni standard con quantità note e crescenti di analita. In questo caso, però, nel grafico avremo in y l'*entità di emissione* (e non l'assorbanza) e in x la *concentrazione* di analita.