

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ



METODOLOGIE BIOANALITICHE ***Modulo B (6 CFU)***

LEZIONE 5

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

METODI SPETTROSCOPICI: UTILIZZI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

- SPETTROSCOPIA IR**
- SPETTROSCOPIA RAMAN**

**STUDIO DELLE MODIFICAZIONI DI STRUTTURE CELLULARI
(DNA, PROTEINE, MEMBRANE)**

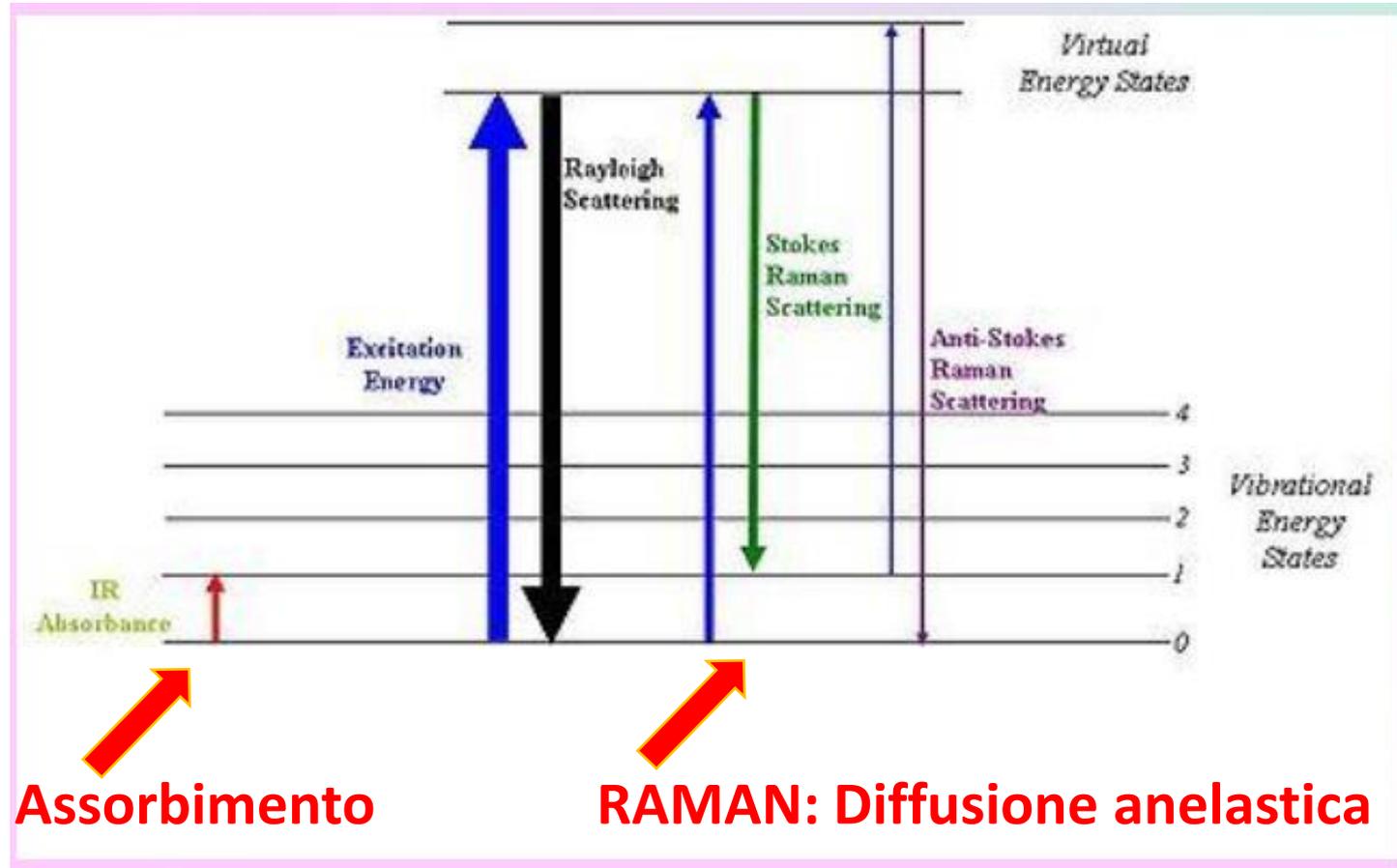
- **Monitoraggio ambientale**
- **Ricerca di base: l'esempio dell'Astrobiologia**

METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

Una data radiazione monocromatica con frequenza ν_0 che colpisce un sistema molecolare, può subire:

1. **Assorbimento**, se il suo contenuto energetico è pari ad una possibile transizione ad un livello energetico superiore (es. Uv-vis, **IR**) del materiale con cui interagisce;
2. Riflessione se non interagisce con la materia;
3. **Diffusione** se interagisce senza causare transizioni energetiche: la radiazione può essere diffusa con frequenza uguale a ν_0 (diffusione Rayleigh), oppure maggiore o minore (diffusione **Raman**) di quella incidente ν_0 .

METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

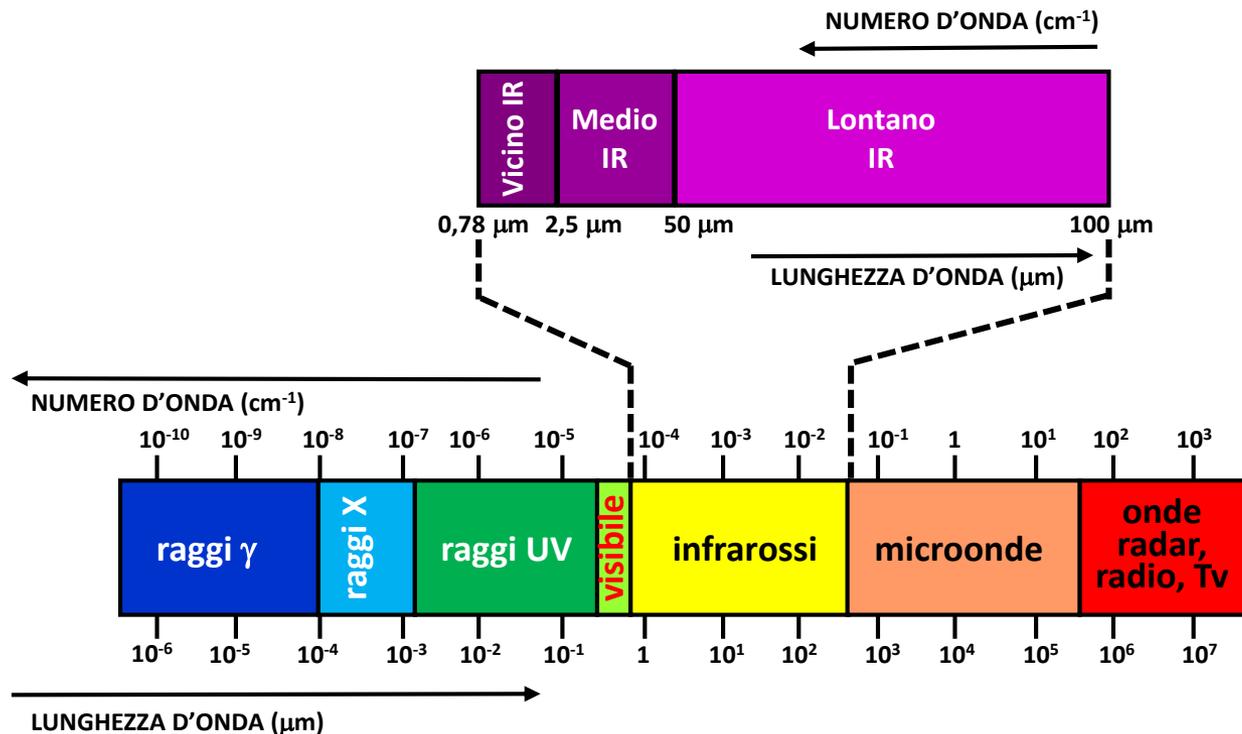


METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

Si basa sull'assorbimento di radiazioni con:

- lunghezza d'onda che va da $0,78 \mu\text{m}$ a $100 \mu\text{m}$
- la regione di maggiore interesse è quella del medio IR (MIR) ovvero quella con lunghezza d'onda che va da $2,5 \mu\text{m}$ a $50 \mu\text{m}$

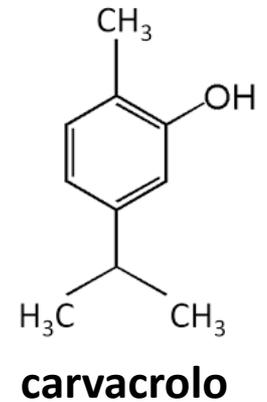
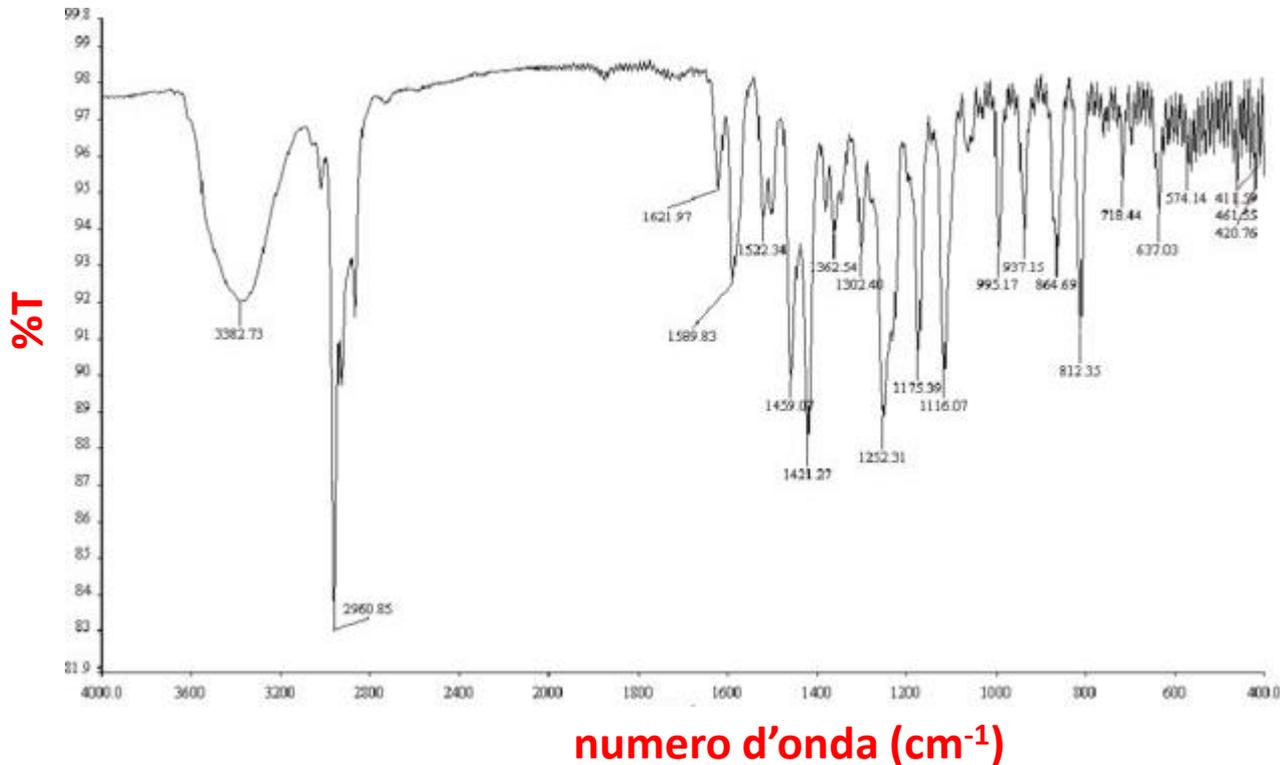


METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

Lo spettro di assorbimento è un grafico in cui abbiamo

- **Ascisse: numero d'onda** ($\nu = 1/\lambda$), per MIR va **da 4000 cm^{-1} a 40 cm^{-1}**
- **Ordinate: % di trasmittanza (%T)** cioè la % di radiazione incidente che passa attraverso il campione senza essere assorbita (ovvero la % di radiazione trasmessa)

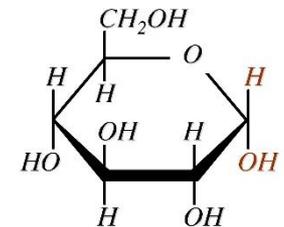
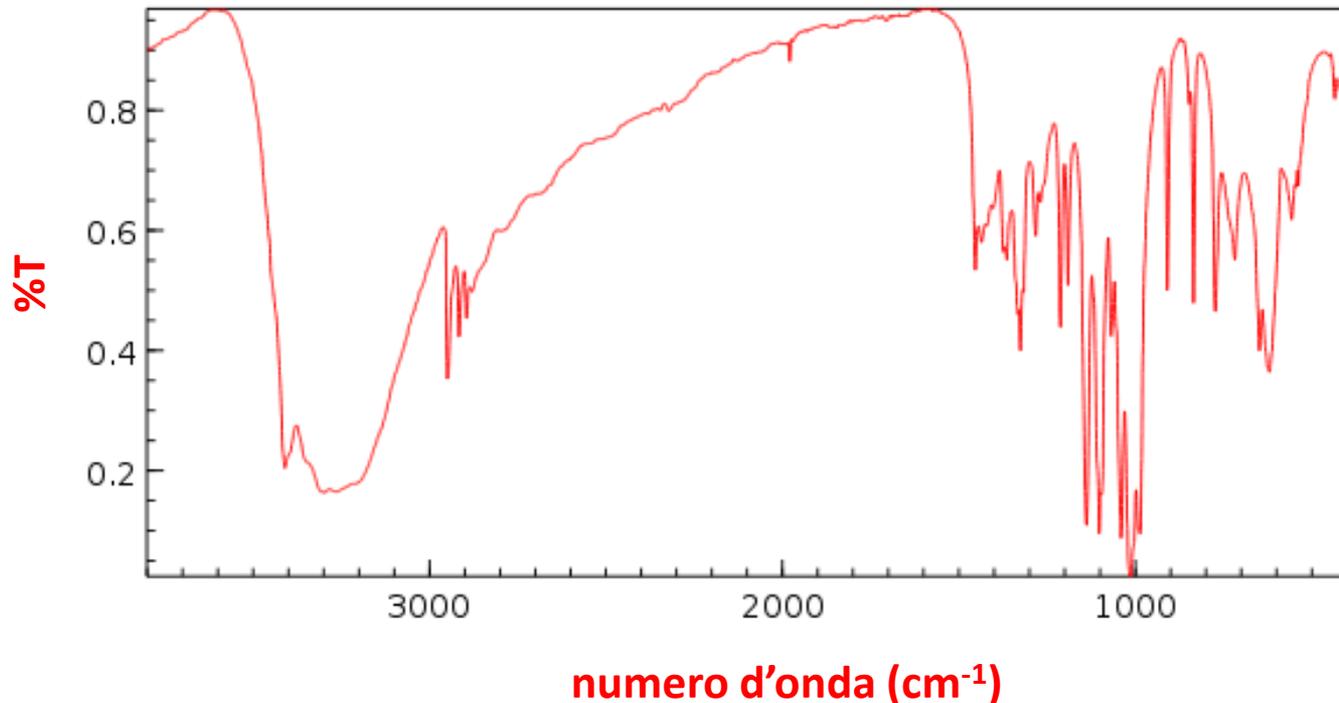


METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

Lo spettro di assorbimento è un grafico in cui abbiamo

- **Ascisse: numero d'onda** ($\nu = 1/\lambda$), per MIR va **da 4000 cm^{-1} a 40 cm^{-1}**
- **Ordinate: % di trasmittanza (%T)** cioè la % di radiazione incidente che passa attraverso il campione senza essere assorbita (ovvero la % di radiazione trasmessa)



glucosio

METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

Numero d'onda

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda$$

espresso in cm^{-1}

Per convertire $\lambda \longrightarrow \tilde{\nu}$

$$\lambda = 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$$

Talvolta negli spettri IR o nelle tabelle sono riportati i valori di λ

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}} = \frac{1 \cdot 10^4 \text{ cm}}{5} = 2000 \text{ cm}^{-1}$$

Vantaggio nell'uso dei numeri d'onda è che sono direttamente proporzionali all'energia E ed alla frequenza della radiazione assorbita

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

$$E = h\nu$$

\longrightarrow

$$\tilde{\nu} = \frac{E}{hc}$$

SPETTROSCOPIA IR

Questa tecnica:

- si basa sulle transizioni fra stati vibrazionali delle molecole
- fornisce informazioni sulle forze di legame e sulla geometria molecolare
- è utile per identificare i gruppi funzionali caratteristici delle molecole
- consente di avere informazioni sulla struttura delle molecole

METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

VIBRAZIONI MOLECOLARI

- Movimento degli atomi che, legati all'interno di una molecola mediante legami covalenti, **NON** occupano posizioni **FISSE**, ma sono in continua vibrazione.
- In conseguenza di tali movimenti o vibrazioni, la lunghezza e gli angoli dei legami cambiano continuamente
- La spettroscopia IR misura le variazioni a livello dei moti vibrazionali causati dall'irraggiamento con radiazioni che ricadono nella regione dell'infrarosso
- L'assorbimento della radiazione IR provoca l'aumento dell'ampiezza delle naturali vibrazioni dei legami chimici

VIBRAZIONI MOLECOLARI: tipologie

Stretching (stiramento)

cambiamento nella lunghezza del legame, movimento ritmico lungo la linea che unisce gli atomi, che provoca aumento o riduzione della distanza interatomica

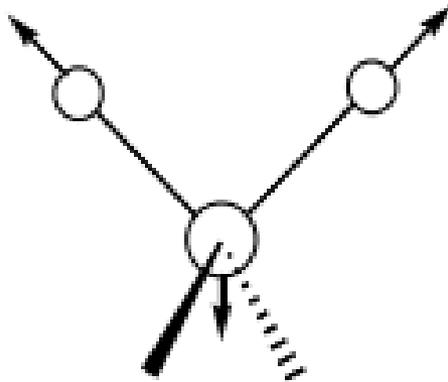
Bending (piegamento)

cambiamento dell'angolo di legame, tali vibrazioni vengono chiamate scissoring, rocking, twisting o "wig wag" motions

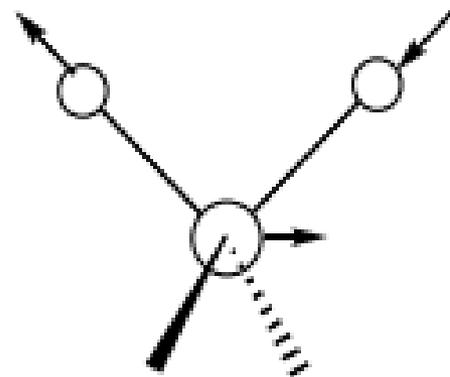
VIBRAZIONI MOLECOLARI: tipologie

Stretching (stiramento)

cambiamento nella lunghezza del legame



Stretching simmetrico

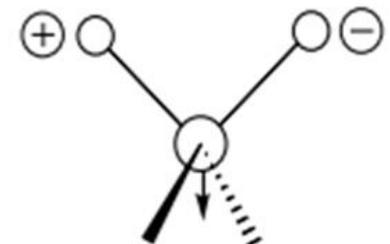
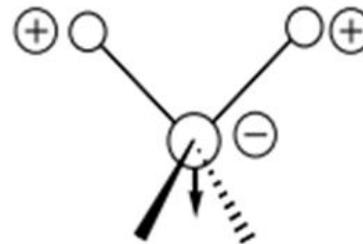
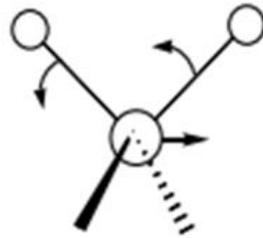
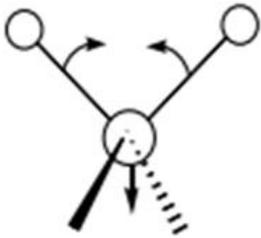


Stretching antisimmetrico

VIBRAZIONI MOLECOLARI: tipologie

Bending (piegamento)

cambiamento dell'angolo di legame



Bending nel piano
scissoring

Bending nel piano
rocking

Bending fuori dal piano
wagging

Bending fuori dal piano
twisting

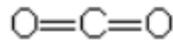
METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

VIBRAZIONI MOLECOLARI e REGOLE DI SELEZIONE*

- Non tutti i modi vibrazionali sono otticamente attivi ovvero
- Non tutti i modi vibrazionali generano un segnale nello spettro

La vibrazione di **stretching simmetrico** della CO_2 **non è attiva** all'IR perché non comporta variazione del momento di dipolo durante la vibrazione, che rimane nullo. $\Delta\mu=0$



symmetric
stretch

inactive
no dipole
change

$$(r = 0, \Delta\mu = 0)$$

l'entità dello **spostamento** degli O rispetto al C centrale è **sempre la stessa**, quindi anche se le distanze variano, la somma vettoriale dei momenti dipolari è sempre nulla!

$$\mu_1 + \mu_2 = 0$$

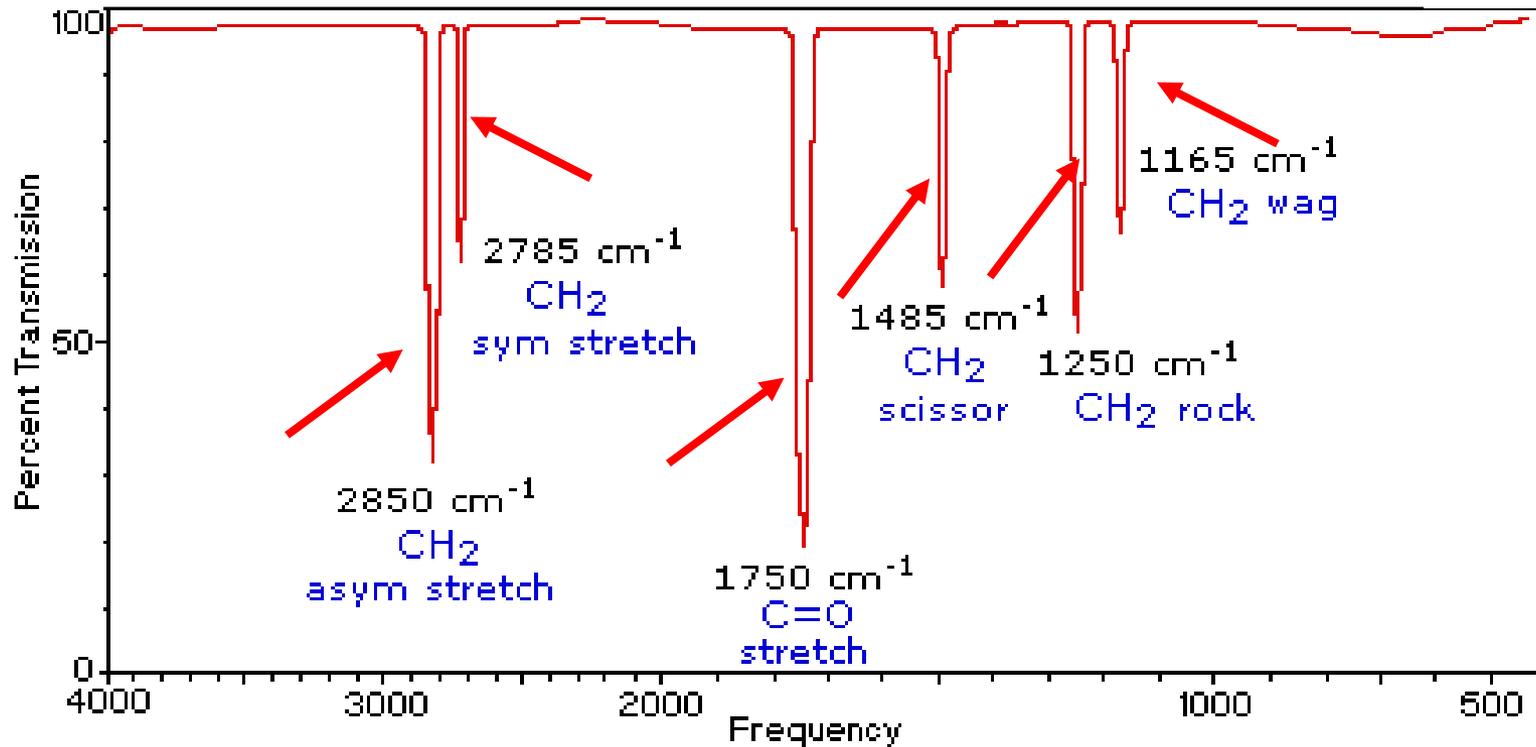
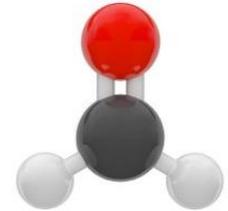
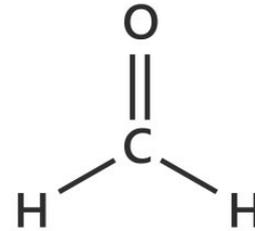
I 2 dipoli C=O quando la vibrazione è simmetrica si continuano a bilanciare in ogni momento dello stiramento.

***REGOLE DI SELEZIONE: condizioni necessarie affinché avvenga l'assorbimento ovvero la molecola interagisca con la radiazione IR**

METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

Spettro IR della formaldeide



Ogni gruppo funzionale risuona ad uno specifico valore del numero d'onda, dai segnali di uno spettro IR quindi si può risalire a quali siano i principali gruppi chimici in una sostanza e dedurne informazioni circa la struttura

SPETTROSCOPIA IR

Microspettroscopia infrarossa



RESEARCH ARTICLE

[← Previous](#)

Synchrotron infrared microspectroscopy reveals the response of *Sphagnum* cell wall material to its aqueous chemical environment

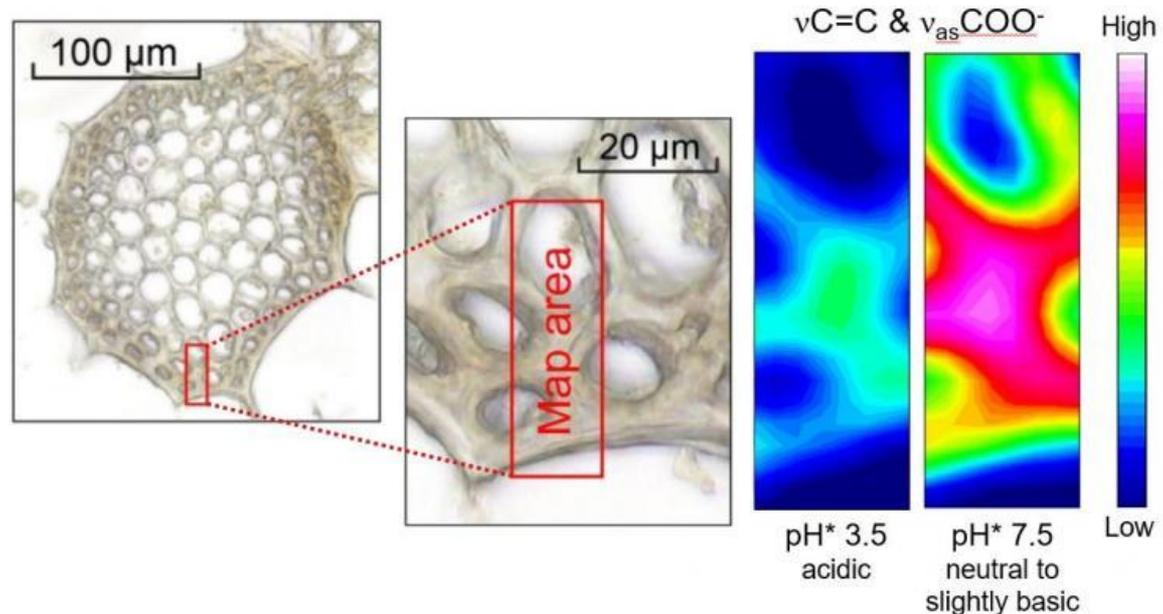
Ewen Silvester  ^{A D G}, Annaleise R. Klein ^{A E}, Kerry L. Whitworth ^B, Ljiljana Puskar ^{C F} and Mark J. Tobin ^C

METODI SPETTROSCOPICI PER LO STUDIO DI SISTEMI CELLULARI

SPETTROSCOPIA IR

Microspettroscopia infrarossa

Environmental application with liquid cell sample holder (transmission):
Sphagnum moss

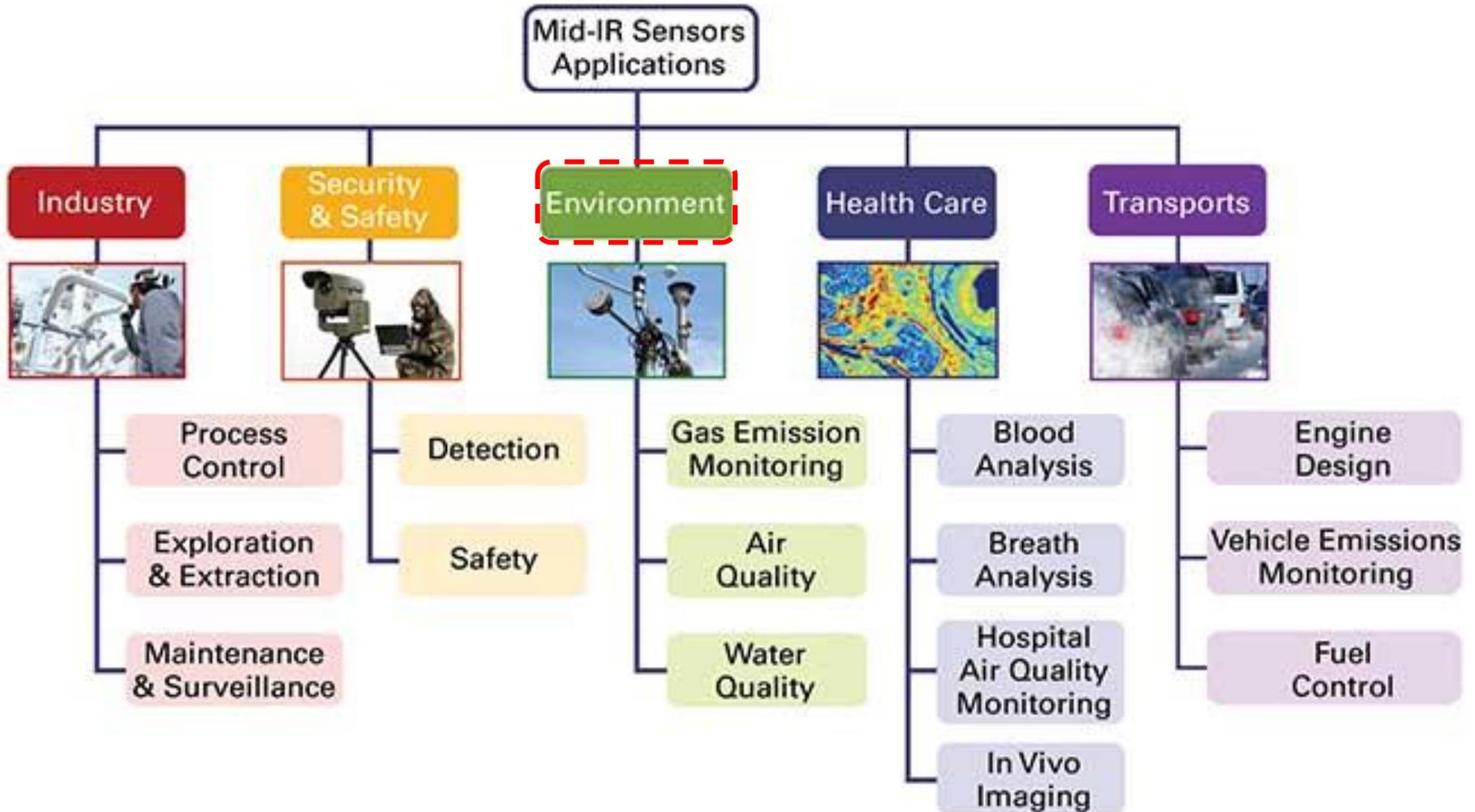


Sphagnum is a dominant species of moss in peatlands, including in the Australian alpine region.

Understanding the cellular response of *Sphagnum* to different aquatic conditions will help predict the impact of a **changing environment** on its distribution and survival.

SPETTROSCOPIA IR

Applicazioni



SPETTROSCOPIA IR

Applicazioni

INFRARED SPECTROSCOPY IN ENVIRONMENTAL ANALYSIS

1

Infrared Spectroscopy in Environmental Analysis

Tom Visser

National Institute of Public Health and The Environment, Bilthoven, The Netherlands

1	Introduction	1
2	History	2
3	Sampling and Measurement Techniques	3
4	Environmental Applications	5
4.1	Indoor Air	5
4.2	Atmosphere and Stratosphere	5
4.3	Smoke Stacks and Exhaust Gases	7
4.4	Terpenes and Biogenic Aerosols	8
4.5	Volcanic Emissions	8
4.6	Biomass Burning	8
4.7	Volatile Organic Compounds	9
4.8	Industrial Contaminants	10
4.9	Pesticides	10
4.10	Phenols	12
4.11	Polyaromatic Hydrocarbons	13
4.12	Dioxins, Dibenzofurans and Polychlorinated Biphenyls	13
4.13	Oils and Greases	14
4.14	Soil Characterization	15
4.15	Inorganics and Asbestos	15
4.16	Polymer Characterization	15
4.17	Quality Assurance	16
4.18	Chemometrics and Model Studies	16
5	Current Position and Future	

occur at more or less localized positions in the spectrum which are correlated to the presence of characteristic structural features of the sample under study. This similarity and transferability of spectral characteristics and the corresponding structural features, makes IR a powerful tool for functional group analysis. On the other hand vibrations, and thus the exact peak positions, are sensitive to the local environment which also makes IR spectra unique molecular fingerprints, highly suited for the unambiguous identification of a sample by comparison with reference spectra. Finally, IR spectroscopy obeys Beer's Law and can thus be used for quantitative purposes too.

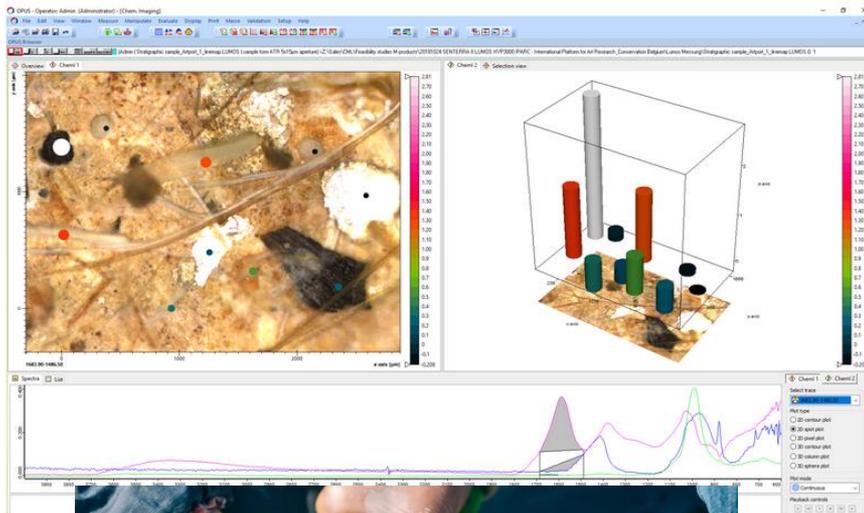
The major advantage of IR over other spectroscopic techniques is that practically all compounds show absorption/emission and can thus be analyzed both quantitatively and qualitatively. Besides, IR spectroscopy is nondestructive and admits in situ and remote measurement of almost any sample, irrespective the physical state and without elaborate preparations. A broad variety of advanced accessories and technologies, such as IR microscopy, optical fibers, remote sensing, reflection and emission equipment and the combination with gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) and supercritical fluid chromatography (SFC) sampling and measurement techniques are available to tackle a diversity of problems. The absolute sensitivity is about 50–500 picograms, which is sufficient to solve many problems in trace analysis.

IR spectroscopy is used in a broad range of environmental applications. The technique is a viable tool in remote measurements of gases, liquids and solids and as a fast and reliable method for the characterization and indicative structure classification of a wide variety of samples. Besides, IR is widely applied for identification purposes either to confirm results of other techniques or for reasons

SPETTROSCOPIA IR

Applicazioni: identificazione e tracciamento delle microplastiche

Analyzing Microplastics on Any Filter or Matrix by FT-IR



In recent years, tiny microplastic particles have been observed in seawater, drinking water and even in the atmosphere. They are washed out of the air by rain and snow and are spreading even to remote regions as the Arctic and the Alps.

When analyzing microplastics in water, the selection the filtration process is almost as important as the sample preparation itself. FT-IR microscopy offers you the possibility to analyze smallest polymer particles on all kinds of filters and independent of the matrix. It offers:

- Particle type, size and number
- Automated particle recognition



SPETTROSCOPIA IR

Applicazioni: identificazione e tracciamento delle microplastiche

Particelle di natura polimerica con un diametro inferiore ai 5 mm, che a seconda della loro origine si suddividono in primarie e secondarie

Le Microplastiche Primarie sono generate da attività industriali quali ad esempio microsferi usate in cosmetica per il peeling facciale.

Le Microplastiche Secondarie si formano in seguito a processi di degradazione chimica, fisica e biologica di oggetti macroscopici di plastica.

Il secondo gruppo è la principale sorgente di microplastiche che vengono poi rilasciate nell'ambiente, difatti esse si generano a partire da materiali non correttamente smaltiti ma rilasciati senza controllo nell'ambiente, dai processi di abrasione e lavaggio delle fibre sintetiche.

Le microplastiche si ritrovano come agenti inquinanti in una moltitudine di ambienti fino ad arrivare alla catena alimentare: fiumi, ghiacci dell'artico, fertilizzanti naturali, suoli, acque potabili.

SPETTROSCOPIA IR

Applicazioni: identificazione e tracciamento di inquinanti organici

Oil and Grease Analysis by Solid Phase Extraction and FT-IR

Organic toxic waste (oil and grease) causes ecology damages for aquatic organisms, plant, animal, and equally, mutagenic and carcinogenic for human being. Therefore, whenever oil and grease are handled industrially and on a larger scale (e.g. offshore oil-rigs) their discharge into the environment should be monitored closely.

The ASTM approved method D7575 describes convenient approach by using infrared spectroscopy. Watersamples are simply passed through a solid phase extractor and immediately analyzed for their oil and grease content. The analysis allows direct evaluation of the amount of oil contamination and its origin.

