

FTIR

Jan Peter Ebbing, Beatrice Fiumara, Giovanni Laganà

22 Aprile 2024

Indice

1	Introduzione teorica	2
2	Apparato sperimentale	4
3	Spettro IR di solventi organici e inorganici	7
3.1	Solventi non volatili	7
3.2	Solventi volatili	11
4	Denaturazione del lisozima	16
4.1	Procedimento e analisi dati	16
4.1.1	Amine I	18
4.1.2	Amine II	20
4.2	Conclusioni	21

Abstract

In questo esperimento sono state effettuate misure di spettroscopia FTIR (*Fourier-Transform InfraRed*) per analizzare gli spettri infrarossi di alcuni solventi organici e inorganici e per osservare il processo di denaturazione termica del lisozima. Nel primo caso, un confronto qualitativo con spettri di riferimento, ha consentito di riconoscere le principali transizioni vibrazionali di legami chimici nelle bande di assorbimento dei solventi. Nel secondo caso, invece, tramite fit multi-gaussiani, si sono analizzati i picchi *Amide I* e *Amide II* dello spettro nativo e di quello denaturato, con l'obiettivo di osservare cambiamenti conformazionali nella struttura secondaria della proteina.

1 Introduzione teorica

Dal punto di vista energetico, una molecola è caratterizzata dai suoi **livelli energetici**. Le transizioni tra un livello e un altro avvengono quando la molecola assorbe o emette energia sotto forma di radiazione elettromagnetica, cioè quando assorbe o emette un fotone. La differenza di energia tra i livelli coinvolti determina la lunghezza d'onda della radiazione assorbita o emessa.

I livelli energetici di una molecola si dividono in:

- **livelli energetici elettronici**, associati al moto degli elettroni attorno al nucleo atomico;
- **livelli energetici vibrazionali**, associati alle vibrazioni degli atomi all'interno della molecola. Ciò che consente agli atomi di una molecola di vibrare è la natura flessibile dei legami covalenti che li tengono uniti. In effetti, ogni legame chimico può essere considerato un sistema oscillante, dove gli atomi si muovono periodicamente (*vibrano*) attorno a una posizione di equilibrio;
- **livelli energetici rotazionali**, associati alla rotazione dell'intera molecola attorno al suo centro di massa.

La spettroscopia infrarossa è la tecnica analitica basata sull'assorbimento della radiazione infrarossa (IR) da parte dei legami presenti in una molecola. La luce IR induce transizioni di tipo vibrazionale nella molecola irraggiata se sono verificate le seguenti condizioni:

1. i legami covalenti presenti nella molecola hanno natura polare, rendendo quest'ultima approssimabile con un dipolo elettrico;
2. il momento di dipolo elettrico della molecola cambia a seguito dell'assorbimento del fotone;
3. la frequenza della radiazione coincide con la frequenza di vibrazione di uno dei legami chimici della molecola¹.

La regione IR dello spettro elettromagnetico si suddivide in vicino, medio e lontano infrarosso (Figura [1]). Tuttavia, per la spettroscopia infrarossa, le lunghezze d'onda di interesse sono generalmente comprese tra $2.5\ \mu m$ e $25\ \mu m$ (in numeri d'onda, tra 4000 e $40\ cm^{-1}$), appartenenti al medio e al lontano IR.

¹In quanto sistema oscillante, il legame chimico è caratterizzato da una frequenza di vibrazione.

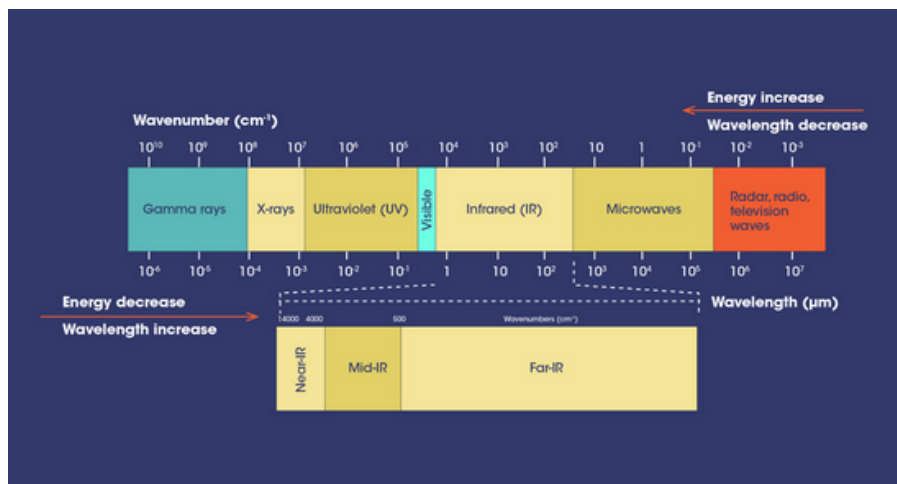


Figura 1. *Vicino, medio e lontano infrarosso.*

In spettroscopia infrarossa, luce tra i 4000 e i 1400 cm^{-1} , intervallo di numeri d'onda che prende il nome di *regione funzionale*, viene impiegata per indagare la presenza all'interno di una molecola di specifici gruppi funzionali, aventi frequenze di assorbimento IR caratteristiche. Per il riconoscimento di composti si impiega invece luce appartenente alla cosiddetta *regione di fingerprint* ($1400 - 40 \text{ cm}^{-1}$). In breve, ogni sostanza è caratterizzata da uno specifico **spettro IR**², nel quale la regione funzionale contiene bande associate alle vibrazioni fondamentali dei principali gruppi funzionali (ad esempio OH, NH, CH, CO), mentre la regione di fingerprint contiene bande dovute a vibrazioni più complesse e specifiche della struttura complessiva della molecola.

Le vibrazioni dei legami chimici, utilizzate per identificare gruppi funzionali e riconoscere composti, si suddividono in due categorie principali:

- **vibrazioni di stretching:** consistono nell'allungamento e nell'accorciamento del legame e possono essere simmetriche oppure asimmetriche (sono simmetriche, ad esempio, nel caso di una molecola d'acqua in cui i due legami $O - H$ si allungano e accorciano insieme).
- **vibrazioni di bending**, che si dividono a loro volta in
 - **wagging fuori dal piano:** due gruppi oscillano avanti e indietro fuori dal piano della molecola;
 - **twisting fuori dal piano:** due gruppi ruotano attorno al legame centrale in direzioni opposte;
 - **scissoring nel piano:** due gruppi si avvicinano e si allontanano come lame di una forbice;
 - **rocking nel piano:** due gruppi oscillano avanti e indietro in modo sincrono.

Un esempio di spettro IR è riportato nell'immagine seguente. Minimi di trasmittanza corrispondono a picchi di assorbimento di luce da parte del campione.

²Si tratta di plot *Trasmittanza* vs *numero d'onda*, o anche *Assorbanza* vs *numero d'onda*.

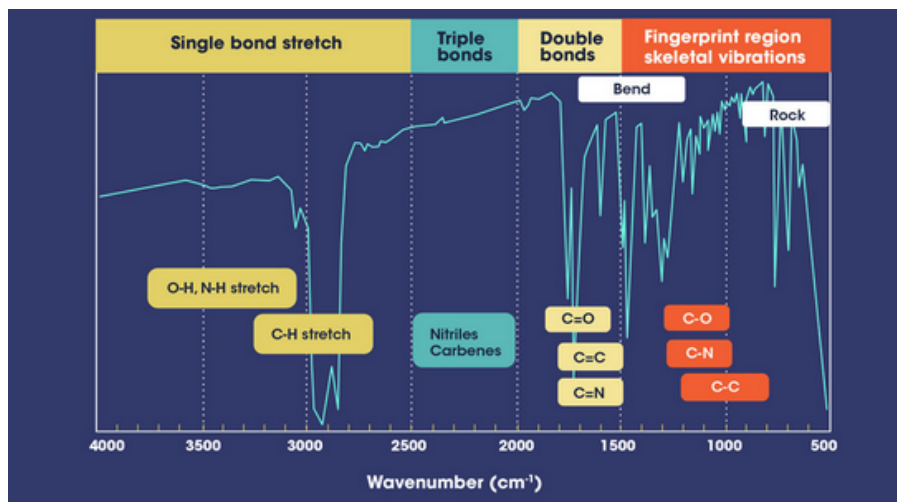


Figura 2. *Esempio di spettro IR: la trasmittanza del campione è rappresentata in funzione del numero d'onda della luce utilizzata.*

Tramite il confronto con spettri IR tabulati, se non lo si conosce a priori, è possibile identificare il campione; altrimenti il confronto consente di riconoscere l'origine, ad esempio funzionale, di alcune bande di assorbimento del campione.

2 Apparato sperimentale

La spettroscopia FTIR (*Fourier Transform Infrared spectroscopy*) si basa sulla produzione, tramite un interferometro di Michelson, di un interferogramma che, dopo essere passato attraverso il campione, viene registrato dal detector (solitamente un bolometro). All'interferogramma registrato viene applicata la trasformata di Fourier per ottenere lo spettro di assorbimento infrarosso.

Un fascio di luce infrarossa viene prodotto da una sorgente a banda larga (che emette radiazione di corpo nero) e viene fatto passare attraverso un interferometro di Michelson (figura [3]), in cui uno dei due specchi è mobile e può traslare. Il fascio in ingresso viene diviso dal beam splitter, e variando la posizione dello specchio mobile, cambia la differenza di cammino ottico tra i due fasci prodotti e di conseguenza varia la figura di interferenza.

Dal momento che il raggio di luce prodotto non è monocromatico, la figura di interferenza, ovvero l'interferogramma, conterrà informazione su tutte le lunghezze d'onda, le quali interferiranno in maniera differente in base alla differenza di cammino ottico.

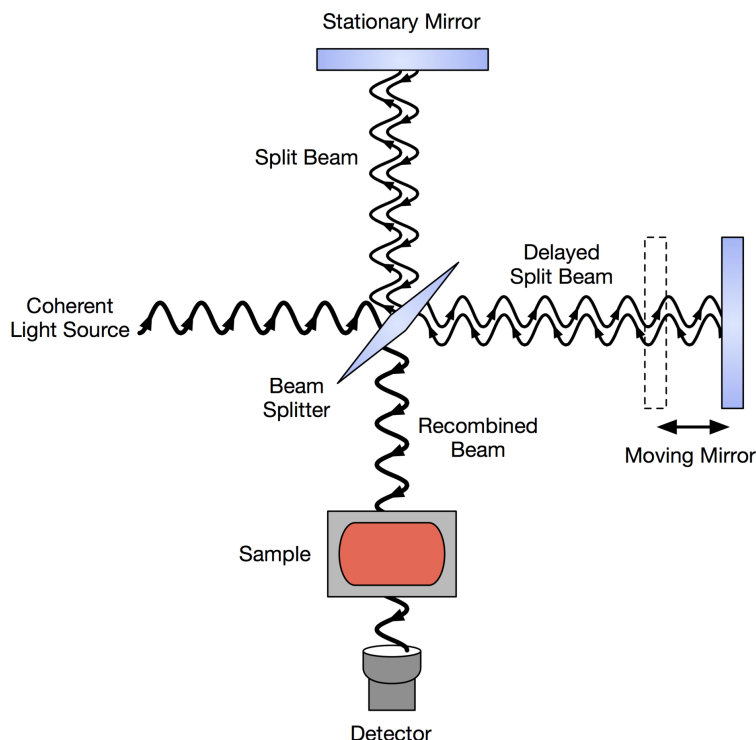


Figura 3. Interferometro di Michelson: il raggio incidente viene diviso in due dal beam splitter. Ciascuna componente raggiunge il rispettivo specchio; uno fisso e l'altro mobile. I raggi riflessi si ricombinano ed escono dall'interferometro.

Il campione viene posto al di sopra di un cristallo ATR (Attenuated transmitted reflection), ovvero un cristallo trasparente agli infrarossi (solitamente un cristallo di germanio o di seleniuro di zinco), in cui avviene la riflessione interna totale (figura [4]). Facendo incidere la radiazione infrarossa sul cristallo con un angolo di incidenza sufficientemente ampio da avere la riflessione interna totale, è possibile far attraversare al raggio infrarosso tutta la lunghezza del cristallo (solitamente avvengono in totale dalle 5 alle 15 riflessioni interne totali).

Quando il raggio riflette sulla superficie superiore del cristallo, si formeranno le cosiddette *onde evanescenti* all'interno del campione. Queste penetrano all'interno del campione fino a una profondità di circa $1\ \mu\text{m}$ con un andamento del tipo:

$$E(z) = E_0 e^{-\gamma z}$$

In questo modo, la radiazione elettromagnetica interagisce con il campione, ma anche con le molecole di solvente. Tuttavia, grazie a questo approccio, il segnale dovuto al campione non viene totalmente sovrastato da quello del solvente (le molecole di solvente sono presenti in quantità decisamente maggiore rispetto a quelle del campione), a differenza di quanto accadrebbe se la luce passasse attraverso una cuvetta. In altre parole, per via della netta superiorità numerica delle molecole di solvente rispetto a quelle del campione non si può far passare la luce attraverso una "lunghezza eccessiva" del campione, altrimenti l'interazione con il sovente sovrasterebbe completamente il segnale di interesse.

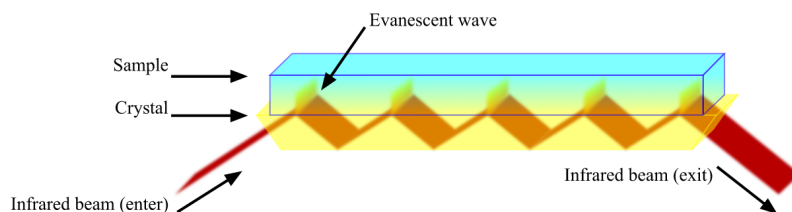


Figura 4. *Cristallo ATR:* il raggio infrarosso entra all'interno del cristallo con un angolo tale a far avvenire la riflessione interna totale. Sulla parte superiore del cristallo è posizionato il campione. Per via della presenza dell'onda evanescente parte della radiazione penetra nel campione prima di essere riflessa.

Una volta uscito dal cristallo, il raggio di luce, che contiene l'interferogramma modificato dall'interazione con il campione, arriverà su un detector. Variando la posizione dello specchio mobile dell'interferometro è allora possibile ricostruire l'interferogramma tramite il segnale di intensità registrato dal detector. Si ha quindi un segnale di intensità in funzione della posizione dello specchio, ovvero un segnale come quello riportato in figura [5].

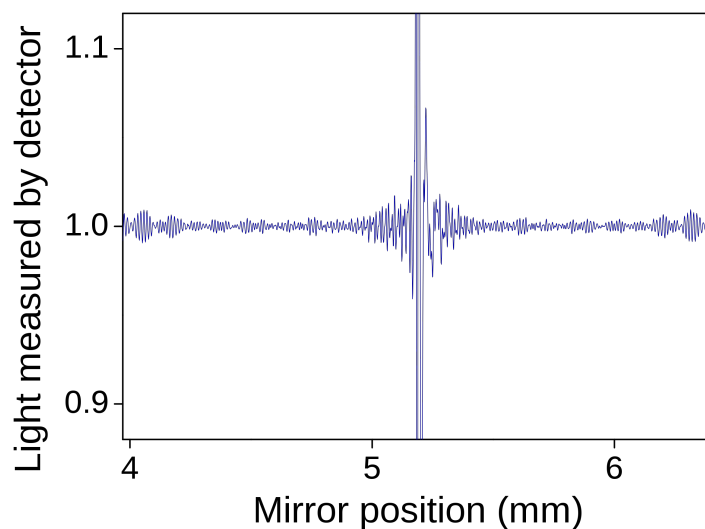


Figura 5. *Interferogramma:* esempio di un possibile segnale di un interferogramma rilevato dal detector dell'apparato di spettroscopia FTIR.

A questo punto, per ottenere lo spettro di trasmittanza infrarossa, è sufficiente applicare la trasformata di Fourier all'interferogramma ottenuto. Infatti la variabile coniugata alla distanza dello specchio ($[cm]$) è il numero d'onda ($[cm^{-1}]$).

Visto che, come già detto in precedenza, lo spettro che ricaviamo contiene anche il contributo del solvente, a livello sperimentale bisogna andare a sottrarre allo spettro ottenuto lo spettro del solo solvente.

Inoltre, visto che lo strumento non lavora sottovuoto, ma viene mantenuto un flusso di azoto, anche il contributo dato da quest'ultimo sarà da sottrarre; per fare ciò si acquisisce un fondo senza mettere nulla sul cristallo.

3 Spettro IR di solventi organici e inorganici

L'obiettivo della prima parte dell'esperimento è un'analisi qualitativa degli spettri IR di alcuni solventi volatili e non volatili a temperatura ambiente. Confrontandoli con i relativi spettri di riferimento, si è tentato di associare i picchi di assorbimento alle corrispondenti transizioni vibrazionali.

Per ogni solvente, tramite lo spettrometro IR si è acquisito il *background* e poi lo spettro del solvente. A quest'ultimo è stato sottratto il primo, in modo da eliminare il contributo di assorbimento dell'aria, dovuto principalmente al vapore acqueo e all'anidride carbonica. Si è sempre considerato il range di numeri d'onda $4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$.

3.1 Solventi non volatili

Per i solventi non volatili è stata seguita la seguente procedura: tramite una pipetta, è stato inserito il solvente all'interno dell'opportuno alloggiamento del cristallo ATR, quindi se ne è acquisito lo spettro IR.

Acqua, H_2O

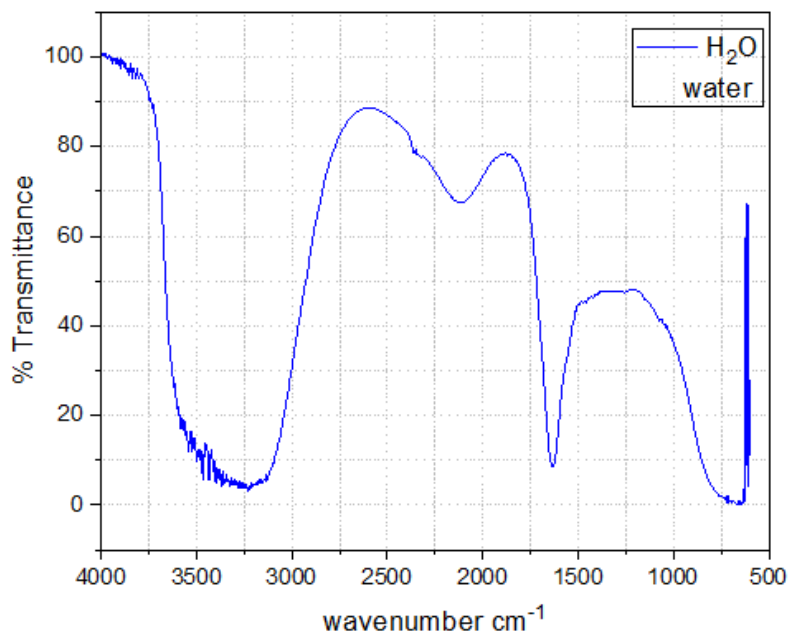


Figura 6. Acqua, spettro IR misurato.

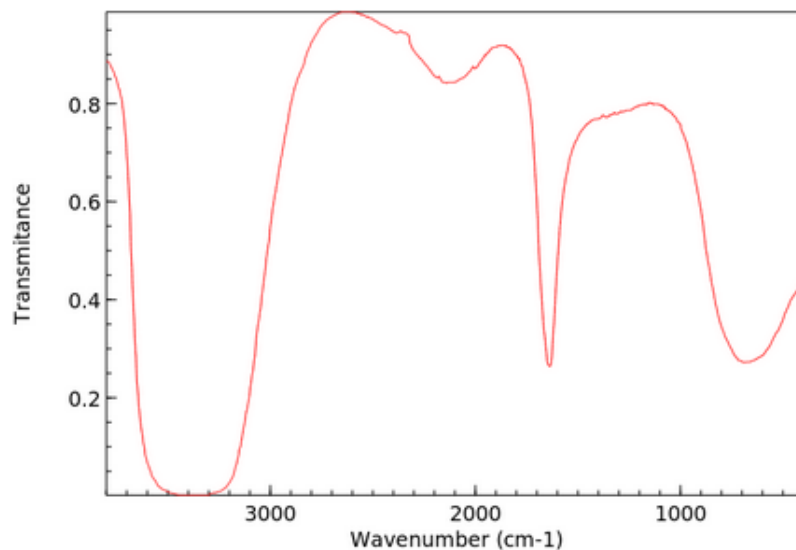


Figura 7. *Acqua, spettro di riferimento* (fonte: *NIST Chemistry Web-Book*).

Nella regione funzionale, grazie al confronto con lo spettro IR di riferimento, è stato possibile associare:

1. l'ampia banda $3700 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ all'assorbimento del gruppo OH : essa è dovuta alle vibrazioni di stretching del legame $O - H$. Sia la sua larghezza che la sua intensità sono causate dalla presenza di legami a idrogeno con altre molecole di acqua;
2. la banda di assorbimento $1650 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ alle vibrazioni di bending $H - O - H$, tipiche della molecola di acqua.

Nella regione di fingerprint, invece, l'ampia banda attorno ai 700 cm^{-1} è causata da combinazioni di vibrazioni e da sovratoni³.

³A differenza delle vibrazioni fondamentali, che coinvolgono una transizione dallo stato vibrazionale fondamentale al primo stato eccitato, i sovratoni coinvolgono una transizione a uno stato eccitato di ordine superiore. Nell'acqua, i sovratoni, così come le combinazioni di vibrazioni, possono essere osservati, anche se sono generalmente meno intensi delle vibrazioni fondamentali.

Glicole etilenico, $C_2H_6O_2$

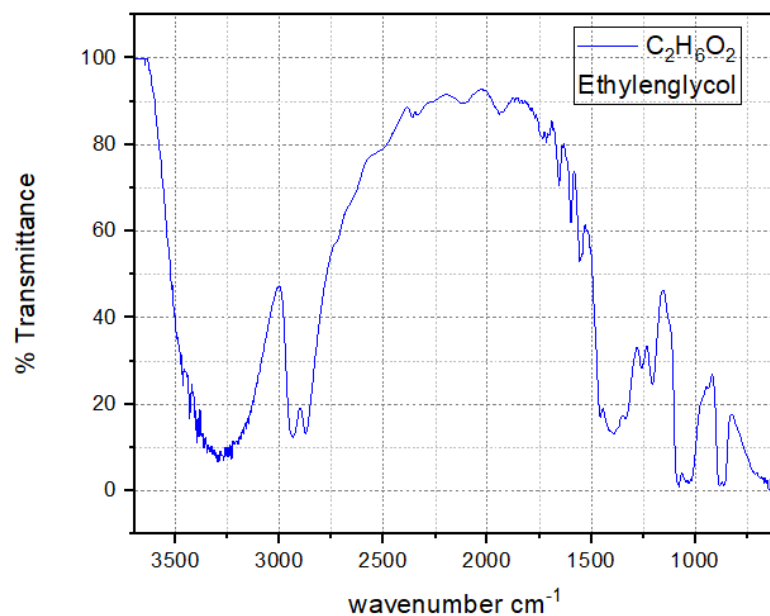


Figura 8. Glicole etilenico, spettro IR misurato.

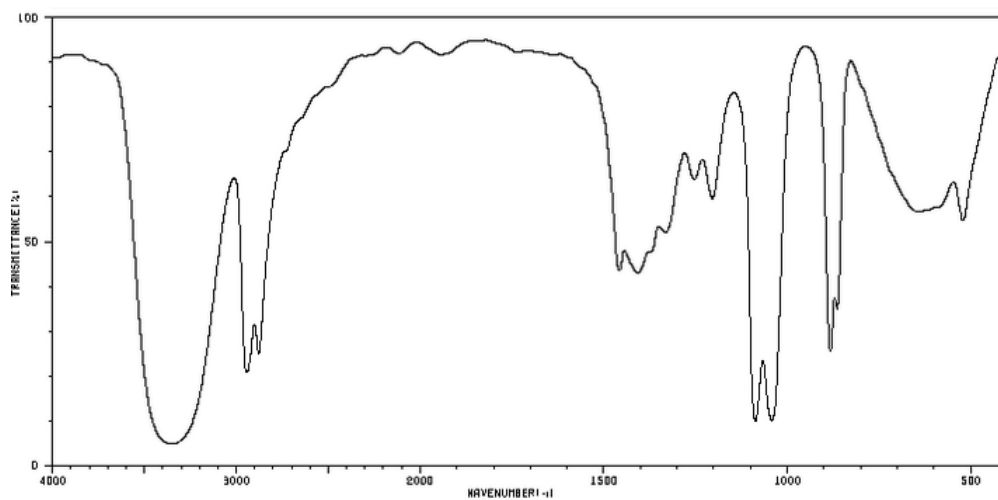


Figura 9. Glicole etilenico, spettro di riferimento (fonte: CAS DataBase).

Nella regione funzionale dello spettro IR acquisito si sono riconosciute:

1. l'ampia banda di assorbimento $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$, provocata da vibrazioni di stretching OH ;
2. la banda $3000 - 2850\text{ cm}^{-1}$, dovuta a vibrazioni di stretching dei legami $C-H$ dei gruppi metilico ($-CH_3$) e metilenico ($-CH_2-$).

Le bande a cavallo tra la regione funzionale e quella di fingerprint sono provocate da vibrazioni di bending dei gruppi metilico e metilenico. Infine, più all'interno della regione di fingerprint, si sono osservate:

1. la banda $1150-1050\text{ cm}^{-1}$, provocata dalle vibrazioni di stretching del legame $C-OH$, tipiche dei gruppi alcolici;
2. tra 900 e 800 cm^{-1} , vibrazioni di bending fuori dal piano del gruppo OH .

Glicole polietilenico (PEG), $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$

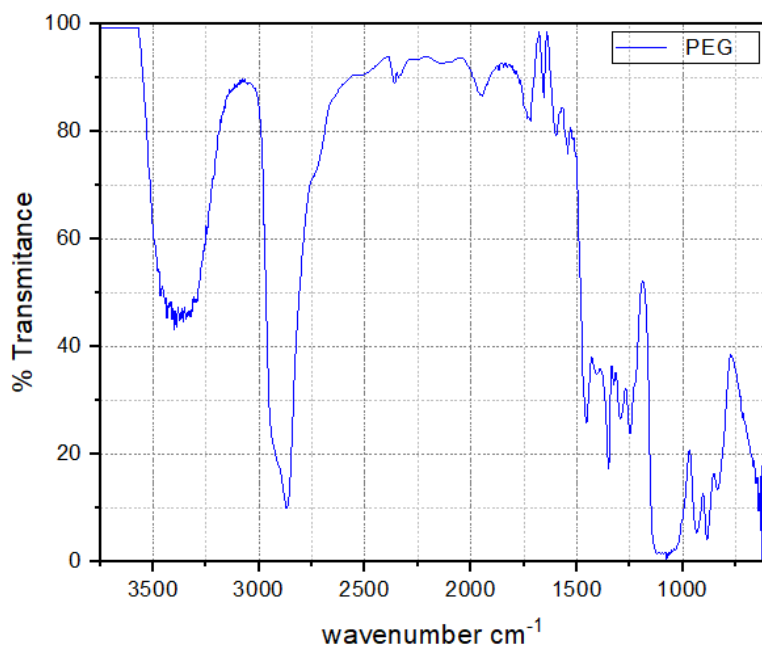


Figura 10. *Glicole polietilenico, spettro IR misurato.*

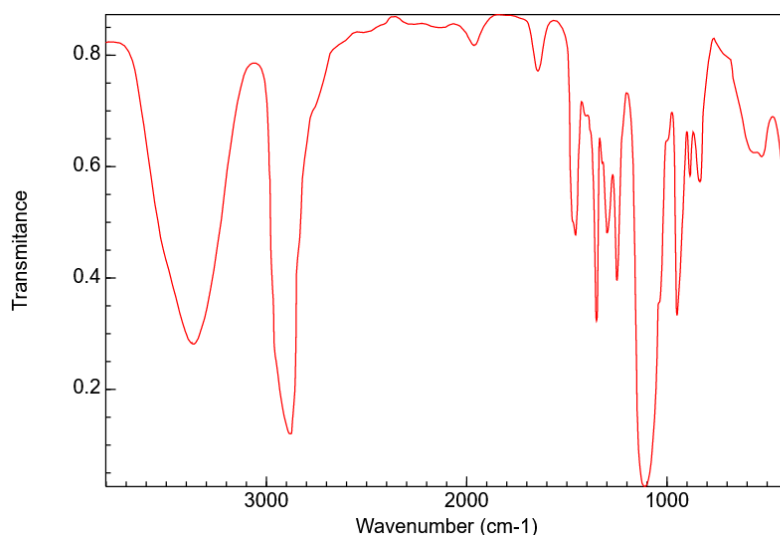


Figura 11. *Glicole polietilenico, spettro di riferimento (fonte: NIST Chemistry WebBook).*

Nella regione funzionale dello spettro IR acquisito si sono riconosciute:

1. l'ampia banda di assorbimento $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$, corrispondente a vibrazioni di stretching OH . In generale, l'intensità della banda può variare a seconda del peso molecolare e del grado di polimerizzazione del PEG.
2. la banda $2950 - 2850\text{ cm}^{-1}$, dovuta a vibrazioni di stretching $C - H$ dei gruppi metilico ($-CH_3$) e metilenico ($-CH_2-$) presenti nella catena polimerica.

I numerosi picchi nell'intervallo $1470 - 1340\text{ cm}^{-1}$, a cavallo tra regione funzionale e regione di fingerprint, corrispondono a vibrazioni di bending del gruppo metilico e del gruppo metilenico. Per quanto riguarda invece la regione di fingerprint, tra $1150 - 1100\text{ cm}^{-1}$ si è osservata la intensa banda di assorbimento provocata da vibrazioni di stretching del legame $C - O - C$ tipiche della catena del PEG.

3.2 Solventi volatili

Per i solventi volatili è stata necessaria un'accortezza sperimentale in più per acquisirne lo spettro IR. Il procedimento è analogo a quello dei solventi non volatili, tuttavia, per costringerli nel cristallo ATR, è stato necessario coprire l'alloggiamento durante la misurazione dello spettro.

1-propanolo, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

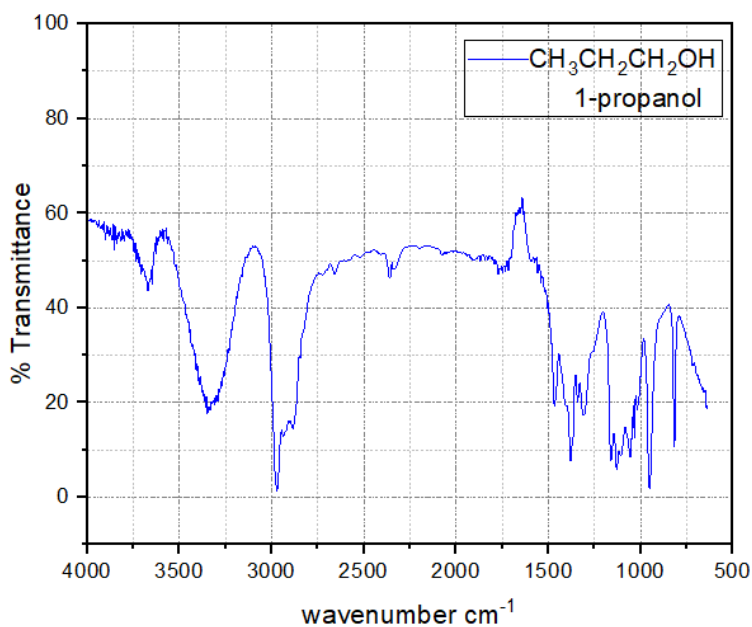


Figura 12. 1-propanolo, spettro IR misurato.

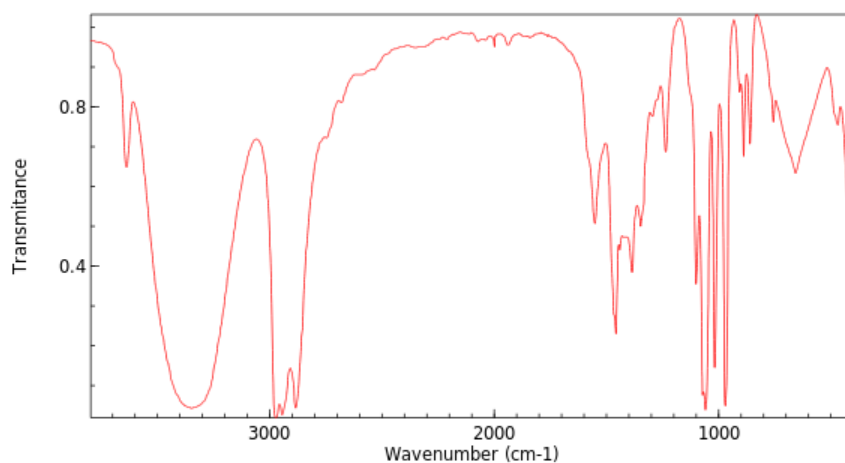


Figura 13. 1-propanolo, spettro di riferimento (fonte: NIST Chemistry WebBook).

Per la regione funzionale, grazie al confronto con lo spettro IR di riferimento, è stato possibile associare:

1. la banda $3500 - 3230 \text{ cm}^{-1}$ all'assorbimento del gruppo OH : essa è dovuta alle vibrazioni di stretching del legame $\text{O} - \text{H}$. Sia la sua larghezza che la sua intensità sono causati dalla presenza di legami a idrogeno con altre molecole di 1-propanolo;

2. la banda di assorbimento $2950 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ alle vibrazioni di stretching dei legami $C - H$ dei gruppi alchilici CH_2 e CH_3 .

Per la regione di fingerprint, invece,

1. le bande di assorbimento $1465 - 1440 \text{ cm}^{-1}$ e $1380 - 1360 \text{ cm}^{-1}$ sono dovute alle vibrazioni di bending dei legami $C - H$, in particolare quelli dei gruppi metilici e metilenici;
2. la banda $1300 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ è dovuta alle vibrazioni di stiramento del legame $C - O$ del gruppo ossidrilico;
3. la banda $1000 - 950 \text{ cm}^{-1}$ a vibrazioni di bending, in particolare di rocking, dei gruppi metilenici CH_2 ;
4. la banda $900 - 700 \text{ cm}^{-1}$ a differenti vibrazioni di bending (wagging, twisting e scissoring) dei gruppi metilenici CH_2 .

Metanolo, CH_3OH

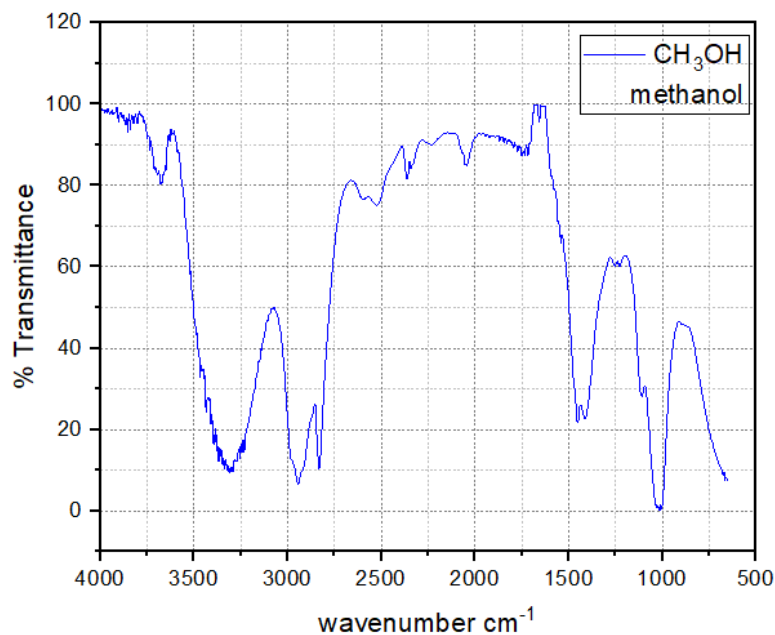


Figura 14. Metanolo, spettro IR misurato.

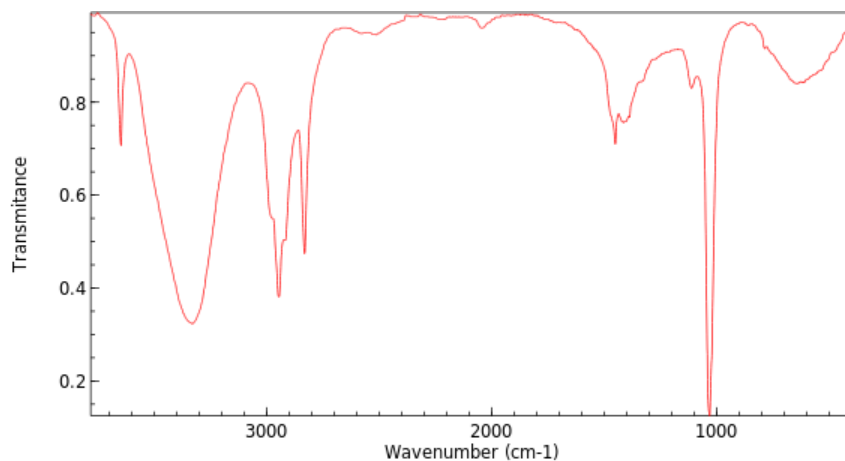


Figura 15. *Metanolo, spettro di riferimento* (fonte: NIST Chemistry WebBook).

Per la regione funzionale, grazie al confronto con lo spettro IR di riferimento, è stato possibile associare:

1. l'ampia banda di assorbimento $3400 - 3200\text{ cm}^{-1}$ a vibrazioni di stretching del legame OH ;
2. la banda di assorbimento $2950 - 2850\text{ cm}^{-1}$ a vibrazioni di stretching dei legami $C - H$.

Per la regione di fingerprint, invece,

1. tra 1460 e 1370 cm^{-1} si osservano transizioni di bending del legame $C - H$;
2. la banda di assorbimento $1050 - 1000\text{ cm}^{-1}$ è dovuta a vibrazioni di stretching dei legami $C - O$.

Etanolo, C_2H_6O

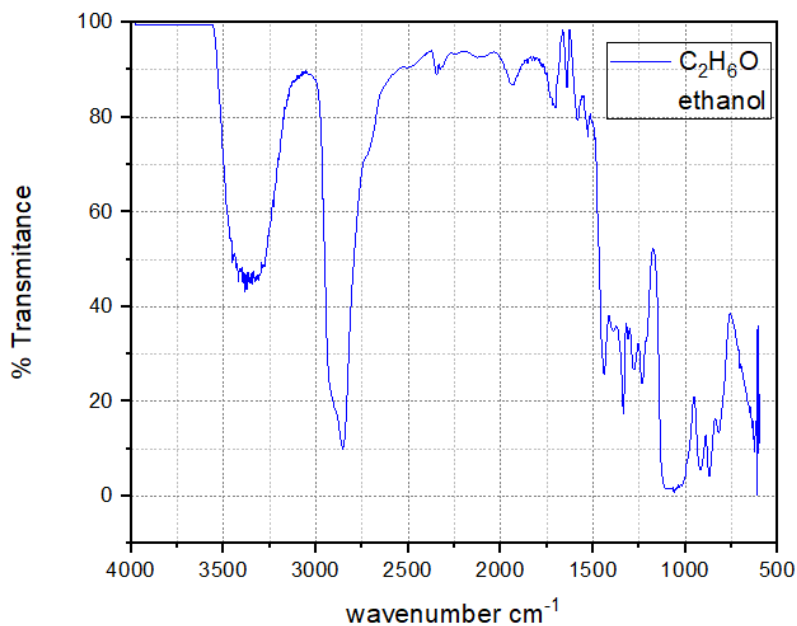


Figura 16. *Etanolo, spettro IR misurato.*

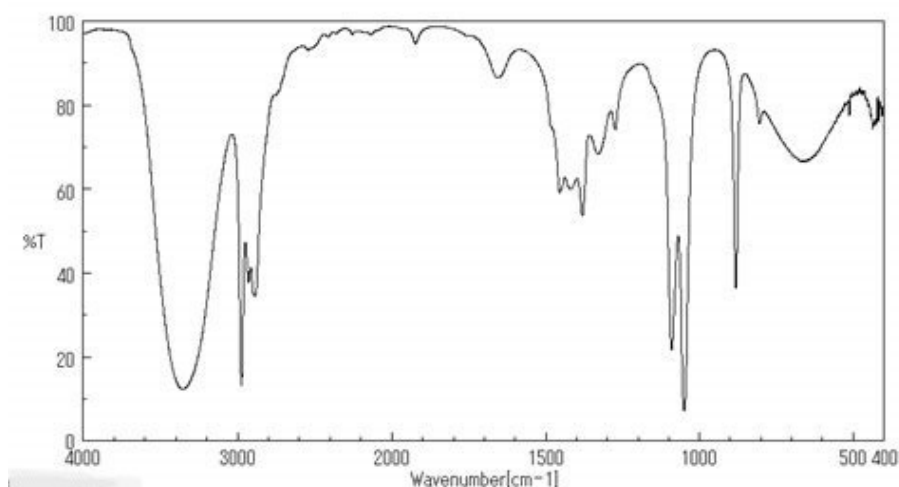


Figura 17. *Etanolo, spettro di riferimento* (fonte: CAS DataBase).

Nella regione funzionale, si osservano

1. l'ampia banda di assorbimento $3500 - 3290\text{ cm}^{-1}$, dovuta a vibrazioni di stretching del legame OH , tipiche dei gruppi alcolici;
2. la banda $3000 - 2850\text{ cm}^{-1}$ associata a vibrazioni di stretching $C - H$ dei gruppi metilico ($-CH_3$) e metilenico ($-CH_2-$) presenti nelle molecole di etanolo.

Per la regione di fingerprint, invece, si riconoscono nitidamente solo le vibrazioni di stretching del legame $C - O$, tipiche dell'intervallo $1150 - 1050\text{ cm}^{-1}$.

Commento: Gli spettri acquisiti sono accomunati dall'ampia banda di assorbimento del legame $O - H$ (sempre, indicativamente, $3600 - 3100\text{ cm}^{-1}$), in quanto tutti i solventi considerati sono dotati del gruppo ossidrilico. Sempre nella regione funzionale, un'altra banda comune a tutti i solventi, fatta eccezione per l'acqua, è quella del legame $C - H$ ($3000 - 2850\text{ cm}^{-1}$). Il motivo per cui l'unico solvente a esserne sprovvisto è l'acqua, è che nella sua molecola non sono presenti atomi di carbonio. Come suggerisce il nome, è invece la regione di fingerprint a differenziare i solventi considerati.

4 Denaturazione del lisozima

Lo spettro di assorbanza infrarossa delle proteine è legato in parte alla struttura secondaria ed alla conformazione della proteina. In particolare ci sono due picchi (figura [18]) che esprimono fortemente questa dipendenza e sono legati ai legami amminici. Questi picchi sono:

- **Amide I** (1600 and 1700 cm^{-1}): banda di assorbimento più intensa delle proteine, associata allo stretching del C=O (70-85%), allo stretching del C-N (10-20%) e al bending dell'N-H. La posizione esatta della banda dipende dalla struttura secondaria e dalla disposizione dei legami H.
- **Amide II** (1510 and 1580 cm^{-1}): più complessa, associata al bending in piano dell'N-H (40-60%) e allo stretching del C-N (18-40%) e del C-C ($\approx 10\%$), sensibile alla conformazione proteica.

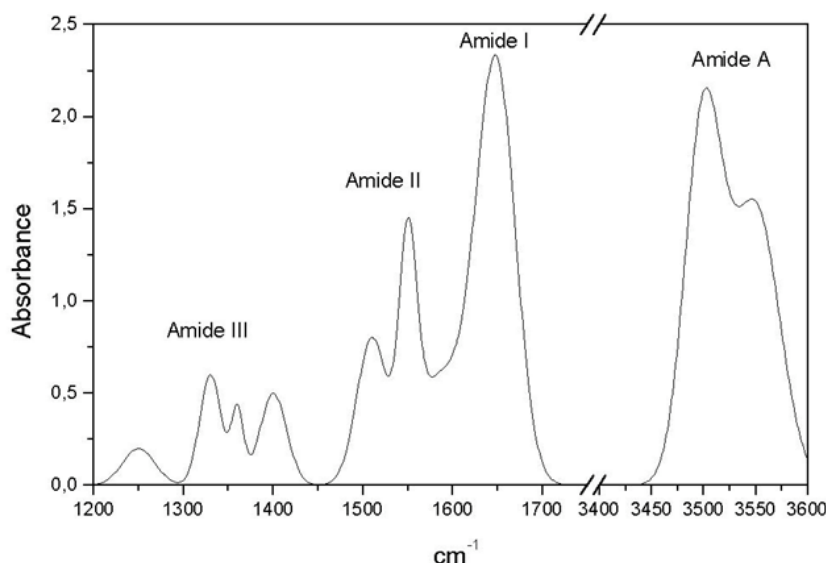


Figura 18. *Spettro di assorbanza infrarossa proteine: in questo spettro di esempio dell'assorbanza nell'infrarosso delle proteine, si osservano i due picchi: Amide I ed Amide II.*

Dato che questi picchi dipendono fortemente dalla struttura secondaria e dalla conformazione proteica, è possibile utilizzare la spettroscopia FTIR per studiare cambiamenti conformazionali delle proteine, come ad esempio la denaturazione.

Inoltre, ciascuno di questi picchi è in realtà costituito da degli spettri più fini associati ai legami nelle diverse configurazioni della struttura secondaria (α -elica, β -sheet, random coil e turns). Tuttavia, di questa struttura più fine è apprezzabile solo l'involuppo.

4.1 Procedimento e analisi dati

Inizialmente è stato acquisito lo spettro di assorbimento di una soluzione contenente tampone fosfato e lisozima. Successivamente, la proteina è stata denaturata tramite riscaldamento, e si è proceduto con l'acquisizione di un secondo spettro (figura[19]). Si noti che, come spiegato nella sezione [2], è stato necessario acquisire anche lo spettro del solo tampone fosfato per sottrarlo agli spettri di interesse.

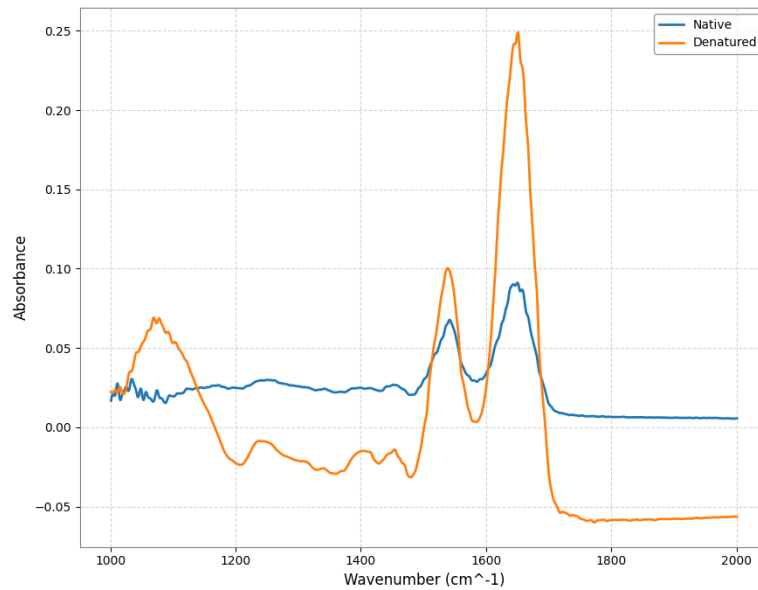


Figura 19. Spettro di assorbanza nativo e denaturato del lisozima: vengono riportati gli spettri di assorbanza acquisiti per il lisozima allo stato nativo e denaturato (per via termica). Il contributo del tampone è già stato sottratto.

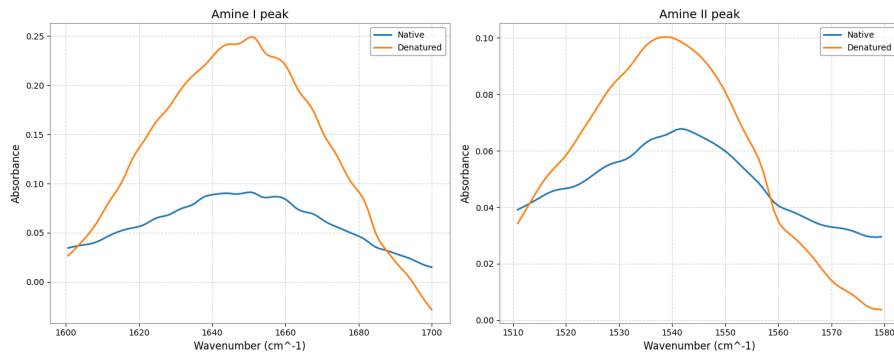


Figura 20. Picchi Amide I e Amide II: sono stati isolati i picchi utilizzando i range teorici, sia per lo spettro della proteina allo stato nativo che per quella denaturata.

Dagli spettri sono stati isolati i picchi (figura [20]), utilizzando i range teorici: $(1600 - 1700) \text{ cm}^{-1}$ per il picco dell'Amide I e $(1510 - 1580) \text{ cm}^{-1}$ per il picco dell'Amide II.

Per analizzare i picchi, si sono eseguiti fit multi-gaussiani, allo scopo di distinguere le componenti fini. A seguito della denaturazione, si prevede un aumento delle componenti associate ai *random coil* ed una diminuzione delle strutture più ordinate, come le α -eliche e i β -foglietti.

I fit sono stati impostati utilizzando, come valori iniziali per le medie delle gaussiane, i valori teoricamente attesi, riportati nella tabella seguente:

	Amide I	Amide II
α -elica:	1652 cm^{-1} (1649 – 1658)	1548 cm^{-1}
β -foglietti antiparalleli:	1629 e 1696 cm^{-1}	1530 cm^{-1}
β -foglietti paralleli:	1640 cm^{-1}	1540 cm^{-1}
turn:	1680 cm^{-1}	-
coil:	1656 cm^{-1}	1535 cm^{-1}

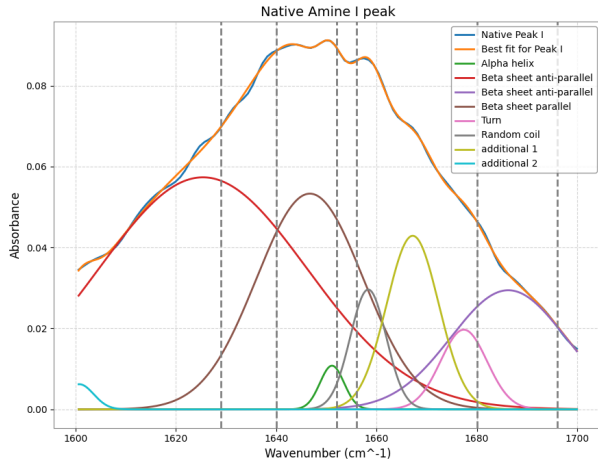
Tabella 1. *Picchi teorici:* picchi della "struttura fine" che ci si aspetta di trovare nei picchi Amide I ed Amide II dello spettro di assorbimento.

Inoltre, sono state aggiunte altre gaussiane in corrispondenza di ulteriori picchi visibili "ad occhio" sullo spettro di assorbimento impostando indicativamente il loro centro come valore iniziale per il valor medio. Nelle sezioni che seguono vengono riportati e discussi i risultati dei fit, rispettivamente per il picco Amine I ed Amine II.

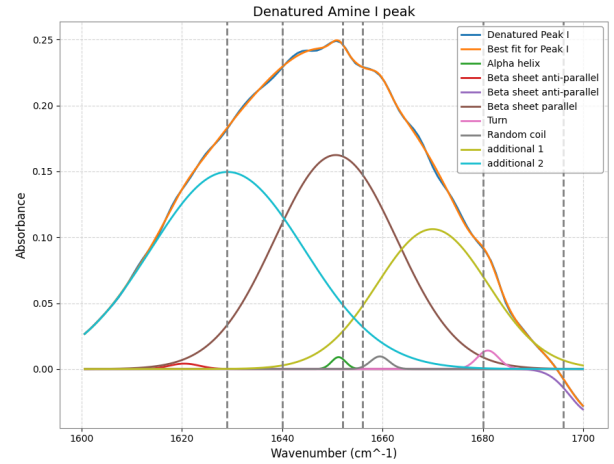
Il valore iniziale per il parametro dell'ampiezza è stato preso come il valore dello spettro in corrispondenza del valor medio iniziale moltiplicato per una costante ϵ . Il valore di tale costante è stato scelto essere $\epsilon = 0.9$ tramite trial and error.

Per quanto riguarda invece i valori iniziali delle σ , si sono scelti uguali per tutte le gaussiane e si è utilizzato un approccio di tipo "grid search"; ovvero si sono provati 20 valori nell'intervallo 1 – 15 e si è tenuto il fit con il minor χ^2 .

4.1.1 Amine I



(a) Fit del picco Amine I con lisozima nativo.



(b) Fit del picco Amine I con lisozima denaturato.

Figura 21. *Fit del picco Amine I:* sono riportati i fit multigaussiani fatti sui picchi Amine I dello spettro di assorbimento del lisozima nativo e denaturato. Le righe grigie tratteggiate rappresentano i picchi teorici riportati nella tabella [1]. Si noti che la legenda è basata sui valori della media della gaussiana impostati prima del fit.

Si osserva che la forma dei picchi più evidenti è stata ben catturata dal fit multigaussiano, mentre alcuni dei picchi sulle "spalle" non vengono ben descritti. Inoltre nel fit dello spettro denaturato (figura [21b]) si osserva che una delle gaussiane ha assunto un valore di ampiezza negativo; questo è dovuto al fatto che lo spettro del picco ha una coda con valori di assorbimento negativa. Chiaramente ciò è indice di un problema con la normalizzazione della baseline, effetto osservabile anche nello spettro completo per il lisozima denaturato in figura [19].

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1651	0.4	2.4	0.3	0.011	0.003
1625	7	21	5	0.057	0.007
1686	3	11.4	1.8	0.0294	0.0034
1647	1	10.6	1.8	0.053	0.025
1677	2.4	4.62	1.3	0.02	0.02
1658	0.7	3.5	0.6	0.030	0.012
1667	0.6	5.2	1.9	0.043	0.006
1601	1	2.8	0.9	0.0062	0.0022

Tabella 2. Risultati fit picco Amine I lisozima stato nativo: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [21a].

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1651	0.2	1.4	0.3	0.009	0.001
1621	1	3.0	0.9	0.004	0.001
1702	1	-4.3	0.6	-0.033	0.004
1651	2	12.2	2.2	0.16	0.05
1681	0.1	2.2	0.2	0.014	0.001
1659	0.2	1.9	0.3	0.0095	0.0014
1670	3	11.1	0.8	0.11	0.04
1629	3	15	1	0.15	0.02

Tabella 3. Risultati fit picco Amine I lisozima denaturato: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [21b].

Dai risultati dei fit (tabella [2] e tabella [3]), in maniera qualitativa, si sono associate le gaussiane che sembravano corrispondere ai picchi teorici (che sono rappresentati dalle linee grigie tratteggiate verticali in figura [21]). Le righe dei parametri corrispondenti alle gaussiane selezionate sono stati evidenziati colorandoli dello stesso colore della gaussiana nell'immagine dei fit. Di seguito viene riportata l'area delle gaussiane⁴ corrispondenti alle strutture: α -elica, β -foglietto e random coil.

	α -elica	β -foglietto	random coil
Nativa	0.07 ± 0.02	3 ± 0.8	0.3 ± 0.1
Denaturata	0.032 ± 0.008	5.6 ± 0.8	0.05 ± 0.01

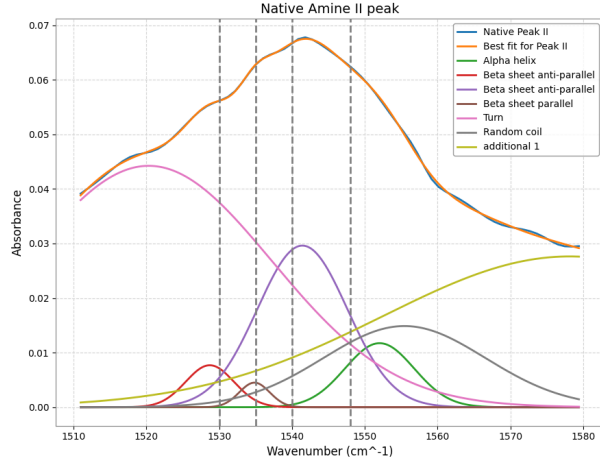
Si osserva che, come atteso, l'area della gaussiana legata alle α -eliche diminuisce quando la proteina viene denaturata. Tuttavia, contrariamente a quanto previsto, l'area relativa ai random coils non aumenta, ma anzi diminuisce. Invece l'area relativa ai β -foglietti aumenta al posto che diminuire.

Tuttavia il fit multi-gaussiano è molto sensibile al numero di gaussiane utilizzate; potrebbe essere, quindi, che non è stato utilizzato il numero corretto di gaussiane per poter descrivere tutti i picchi e questo potrebbe aver portato alcune delle gaussiane a "tentare di descrivere picchi che non gli competono".

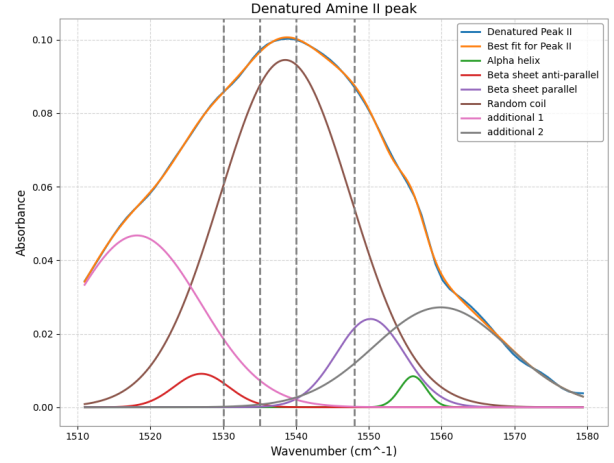
⁴L'area della gaussiana viene calcolata come: $A\sqrt{2\pi}\sigma$, con A ampiezza della gaussiana. L'errore viene propagato tramite:
 $\Delta \text{Area} = \sqrt{(\sigma\sqrt{2\pi}\Delta A)^2 + (A\sqrt{2\pi}\Delta\sigma)^2}$

4.1.2 Amine II

Si è proceduto in maniera del tutto analoga a quanto fatto per il picco dell'Amine I. Di seguito vengono riportati i grafici e le tabelle relative ai fit⁵.



(a) Fit del picco Amine II con lisozima nativo.



(b) Fit del picco Amine II con lisozima denaturato.

Figura 22. Fit del picco Amine II: sono riportati i fit multigaussiani fatti sui picchi Amine II dello spettro di assorbimento del lisozima nativo e denaturato. Le righe grigie tratteggiate rappresentano i picchi teorici riportati nella tabella [1]. Si noti che la legenda è basata sui valori della media della gaussiana impostati prima del fit.

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1552	3.0	4.7	3.5	0.012	0.054
1529	0.9	3.3	0.8	0.008	0.006
1541	6.0	6.2	2.5	0.030	0.106
1535	0.3	2.1	0.6	0.005	0.004
1520	143	16.9	58.3	0.044	0.449
1555	113	11.1	171.8	0.015	0.832
1578	637	25.6	791	0.028	0.195

Tabella 4. Risultati fit picco Amine II lisozima stato nativo: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [22a].

⁵Si noti che per far convergere il fit del picco dello spettro denaturato si è dovuta rimuovere una delle gaussiane aggiuntive (in particolare quella inizializzata con media 1575 cm^{-1}). Inoltre si è fatta variare la σ tra 1 e 20 prendendo 30 differenti valori.

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1556	0.12	1.8	0.24	0.008	0.002
1527	0.73	3.8	1.24	0.009	0.011
1550	0.71	4.7	1.69	0.024	0.031
1539	0.89	9.0	4.82	0.094	0.016
1518	4.18	8.7	1.74	0.047	0.019
1560	4.36	9.2	1.23	0.027	0.012

Tabella 5. Risultati fit picco Amine II lisozima denaturato: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [22a].

Di nuovo, analogamente a quanto fatto prima, in maniera qualitativa, si sono associate le gaussiane trovate ai picchi teorici. Di seguito viene riportata l'area delle gaussiane.

Si noti che in questo caso per il picco nello spettro nativo sono presenti sia i β -foglietti anti-paralleli che quelli paralleli; si è allora considerata la somma delle due aree.

Inoltre la gaussiana marrone in figura [22b] potrebbe essere associata sia al picco teorico a 1535 cm^{-1} , che corrisponde ai random coils, sia al picco a 1535 cm^{-1} , che corrisponde ai β -foglietti paralleli. Si è scelto allora di associarlo ad entrambi considerando il suo contributo equi-partito su queste due componenti.

	α -elica	β -foglietto	random coil
Nativa	0.14 ± 0.64	0.5 ± 1.7	0.026 ± 0.022
Denaturata	0.28 ± 0.38	0.27 ± 0.83	0.27 ± 0.83

È evidente che i valori ottenuti non permettano di effettuare nessun tipo di confronto in quanto l'errore relativo è praticamente sempre superiore al 100%. Anche in questo caso probabilmente il problema è legato al numero ed all'inizializzazione delle gaussiane.

4.2 Conclusioni

Osservando la variazione del picco Amine I mediante fit di multi-gaussiane si è riusciti ad osservare che la quantità di α -eliche nella struttura secondaria diminuisce, come atteso teoricamente. Tuttavia si è osservato un incremento della quantità dei β -foglietti ed un decremento dei random coil; ovvero l'opposto di quanto atteso.

Inoltre il fit sul picco Amine II ha prodotto risultati con errori relativi sulle aree delle gaussiane superiori al 100%.

Tutto ciò suggerisce che in entrambi i casi la soluzione trovata al problema di fitting ricada in realtà in un minimo locale e non sia fisicamente significativa. Si ipotizza che la problematica principale sia legata al numero di gaussiane che è stato scelto basandosi sulle aspettative teoriche (si sono inizializzate delle gaussiane centrate nei picchi teorici riportati in tabella [1].) e su un'osservazione qualitativa dello spettro dei picchi. Un migliore approccio sarebbe stato quello di utilizzare un algoritmo di peak finding in modo tale da inizializzare delle gaussiane centrate sui picchi trovati da quest'ultimo.

Inoltre un'ulteriore possibilità di migliorare l'adattamento dei fit potrebbe essere quella di normalizzare gli spettri dei picchi prima di effettuare le interpolazioni; ciò potrebbe aiutare con la convergenza.