

DATAZIONE ENZIMATICA DI MATERIALI CELLULOSICI

(a cura di Andrea Macchia)

<u>Argomenti:</u>	Capitolo1_ Enzimi	1.1_ Gli Enzimi. 1.2_ Cinetica enzimatica.
	Capitolo2_ Datazione enzimatica di materiali di origine cellulosica.	2.1_ Metodo carbodiimide 2.1.1_ Strumento. 2.1.2_ Metodo. 2.2_ Metodo SAMT
	Capitolo3_ Problematiche	3.1_ Problematiche

Capitolo1_ Enzimi.

1.1_ Gli enzimi.

Gli enzimi sono catalizzatori biologici. Essi influenzano la cinetica della reazione a cui prendono parte, non alterano le condizioni termodinamiche che determinano l'equilibrio chimico, restando inalterati alla fine del processo, a meno che non vengano trasformati da altre reazioni collaterali. Dal punto di vista strutturale sono catene polipeptidiche, quindi proteine, con massa molecolare molto alta e configurazione spaziale complessa. La disposizione tridimensionale della catena polipeptidica (la cosiddetta struttura terziaria) è alquanto specifica: i singoli residui aminoacidici vengono a trovarsi in posizioni ben definite, posizioni che sono indispensabili per l'attività biologica dell'enzima. La struttura terziaria di una catena polipeptidica appartenente ad enzimi costituiti da più catene, costituisce una sottostruttura, in quanto le catene non si compenetrano l'una alle altre, ma formano delle sottounità indipendenti che si aggregano nella forma oligomerica (struttura quaternaria).

Alcuni enzimi esplicano la loro funzione catalitica utilizzando esclusivamente la reattività chimica dei loro residui aminoacidici. Molti enzimi richiedono invece la partecipazione di gruppo prostetici, detti cofattori, che non sono parte della struttura proteica dell'enzima, ma sono legati saldamente, anche covalentemente, a tale struttura. Questi cofattori possono essere ioni metallici come il Fe^{2+} , il Mg^{2+} , il Mn^{2+} , o lo Zn^{2+} o complesse molecole organiche chiamate **coenzimi**. Se il cofattore viene rimosso, la proteina assume il nome di **apoenzima**, che è privo di attività.

Grazie alla propria configurazione spaziale ogni enzima è altamente specifico, cioè in grado di agire solo verso un tipo di molecola, detta substrato, o di catalizzare un unico tipo di reazione. Infatti ogni enzima è caratterizzato da una piccola regione della proteina, in genere a forma di tasca o di fessura, denominata Sito Attivo, dalla struttura spaziale ben definita complementare a quella del substrato con cui interagisce, instaurando nuovi legami, attraverso un modello del tipo chiave-serratura. Il resto della proteina enzimatica fornisce una specie di scheletro strutturale che garantisce il mantenimento dei componenti del sito attivo nella conformazione tridimensionale necessaria ad una efficiente e specifica catalisi. Molti enzimi sono stereospecifici, la discriminazione è basata sulla configurazione geometrica e stereochimica del substrato, altri sono dotati di specificità meno stretta, ed agiscono su molecole simili ma comunque con affinità e velocità diverse. Il potere catalitico di un enzima è altissimo, la velocità di una reazione catalizzata da un enzima può essere fino a 10^{14} volte superiore alla velocità

della stessa reazione non catalizzata, inoltre può essere modulata mediante l'interazione con altre molecole, attivatori o inibitori dell'enzima.

Gli enzimi sono classificati mediante un sistema internazionale di classificazione elaborato nel 1956 dalla Enzyme Commission (EC) della International Union of Biochemistry e raggruppati, basandosi sul tipo di reazione catalizzata e sul nome del substrato specifico, in 6 classi, ognuna suddivisa in sottoclassi:

Ossidoreduttasi: catalizzano le reazioni di ossidoriduzioni,

Transferasi : trasferimento di gruppi funzionali da molecole donatrici a molecole accettrici. Le cinasi sono specifiche transferasi adibite al traserimento di un gruppo fosfato.

Idrolasi: catalizzano le reazioni di idrolisi, aggiunta di acqua ad un legame con contestuale rottura

Liasi: catalizzano l'apertura dei legami C-C, C-O, C-H, C-S, ad esclusione delle reazioni di idrolisi

Isomerasi: catalizzano le reazioni di isomerizzazione

Ligasi: catalizzano la formazione di legami C-C, C-H, C-O, C-S

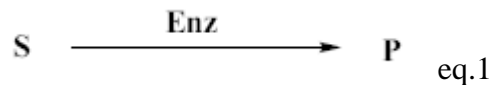
Ad ogni enzima viene associato un numero a quattro cifre, del tipo ECxxxx. La prima identifica la classe di appartenenza, mentre le altre tre cifre indicano sottoclassi.

1.2 Criteri di scelta dell'enzima.

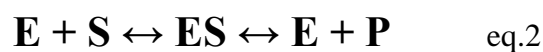
Gli enzimi, nelle preparazioni commerciali, sono venduti allo stato solido o come soluzioni, e sono ottenuti per sintesi o per purificazione, in questo caso, difficilmente, sono puri al 100%, ma in genere sono miscele di proteine, alcune delle quali non attive cataliticamente. Anche quando l'enzima è disponibile come polvere solida dobbiamo conoscere: quanto di questa polvere è effettivamente enzima? ovvero quanta polvere è dotata di attività catalica? A tal scopo il parametro da considerare, caratteristico di ogni preparazione enzimatica commerciale, è l'attività specifica, espressa in Unità di substrato trasformata per milligrammo di preparazione enzimatica in condizioni standard di temperatura e ad un certo valore di pH (l'attività enzimatica è influenzata dalle condizioni operative, quali pH, temperatura, concentrazione di substrato, e queste sono ottimali e diverse da enzima ad enzima). Più è alto il valore dell'attività specifica, maggiore è la capacità catalitica di una certa quantità di enzima.

1.3 Cinetica enzimatica.

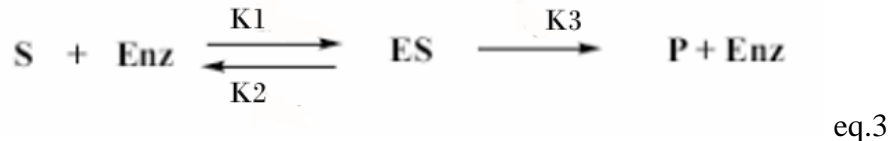
La velocità di una reazione chimica si definisce come la variazione della concentrazione dei reagenti o dei prodotti nell'unità di tempo. Le modalità di interazione tra substrato ed enzima sono state spiegate da Michaelis-Menten.



In generale, una reazione enzimatica irreversibile, consiste di almeno 3 stadi:



La prima assunzione su cui si basa l'approccio cinetico di Michaelis-Menten., assunzione nota come del "quasi equilibrio" o dell' "equilibrio rapido", è che il complesso enzima-substrato sia in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato e che questa situazione di equilibrio non sia disturbata dalla formazione del prodotto. In altre parole la velocità di formazione del prodotto a partire da ES è molto piccola rispetto alla velocità con cui ES si scinde a dare E+S. La seconda assunzione è quella nota come assunzione della velocità iniziale: la velocità della reazione viene valutata per un periodo di tempo durante il quale la reazione inversa da E + P a ES è trascurabile poiché inizialmente la concentrazione di P è estremamente piccola. La reazione può essere così schematizzata



La velocità di una reazione catalizzata è espressa, normalmente, dalla quantità di substrato che reagisce in un secondo o, in alternativa, dalla quantità di prodotto che si forma in un secondo.

*Pertanto la velocità iniziale di formazione del prodotto P è data da

$$v_o = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \quad \text{eq.4}$$

La variazione della concentrazione del complesso intermedio enzima-substrato ES è data dalla somma della sua velocità di formazione meno quella di scomparsa:

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES]$$

Utilizzando per [ES] l'approssimazione nota come assunzione dello "**stato stazionario**", introdotta da Briggs e Haldane (1925) secondo la quale il complesso ES si mantiene in uno stato stazionario durante tutto il periodo di tempo in cui si possono misurare delle velocità iniziali, la derivata di [ES] rispetto al tempo è uguale a zero:

$$d[ES]/dt = 0. \quad \text{eq.5}$$

[ES] rimane costante perchè la velocità con cui il complesso ES si forma a partire da E+S è uguale alla somma delle velocità con cui si scinde a dare E+P ed E+S.

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad \text{eq.6}$$

Il bilancio di massa di E richiede che la concentrazione di enzima libero e di enzima legato sia uguale alla concentrazione di partenza:

$$[E]_o = [E] + [ES] \quad \text{eq7}$$

Combinando queste due relazioni si ottiene la concentrazione del complesso intermedio enzima-substrato

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_2 + k_3 + k_1[S]} \quad \text{eq.9}$$

il cui valore, inserito nell'espressione della velocità iniziale dà

$$v_o = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_1 k_3 [E]_0 [S]}{k_2 + k_3 + k_1 [S]} = \frac{k_3 [E]_0 [S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]} \quad \text{eq.10}$$

Definendo la costante di Michaelis come

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \text{eq.11}$$

è una costante cinetica correlata con le costanti di velocità, la relazione si semplifica nella seguente:

$$v_o = \frac{k_3 [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad \text{eq.12}$$

nota come equazione di Michaelis-Menten.

Questa equazione indica che la velocità iniziale di una reazione enzimatica dipende linearmente dalla concentrazione di enzima $[E]_0$, mentre varia in modo non lineare in funzione della concentrazione di substrato $[S]$, graficamente è un'iperbole rettangolare (curva a fianco).

Si distinguono tre casi.

I caso: per $[S] \gg K_m$ la velocità iniziale è

$$v_o = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [E]_0 = v_{mx} \quad \text{eq.13}$$

La cinetica è di ordine zero rispetto ad S. La costante k_3 si chiama numero di conversione (turnover), in quanto rappresenta il numero di moli di substrato S convertite nel prodotto P da una mole di enzima.

II caso: per $[S] \ll K_m$ la velocità iniziale è

$$v_o = \frac{k_3 [E]_0 [S]}{K_m} = \frac{v_{mx}}{K_m} [S] \quad \text{eq.14}$$

La cinetica è di ordine uno rispetto ad S.

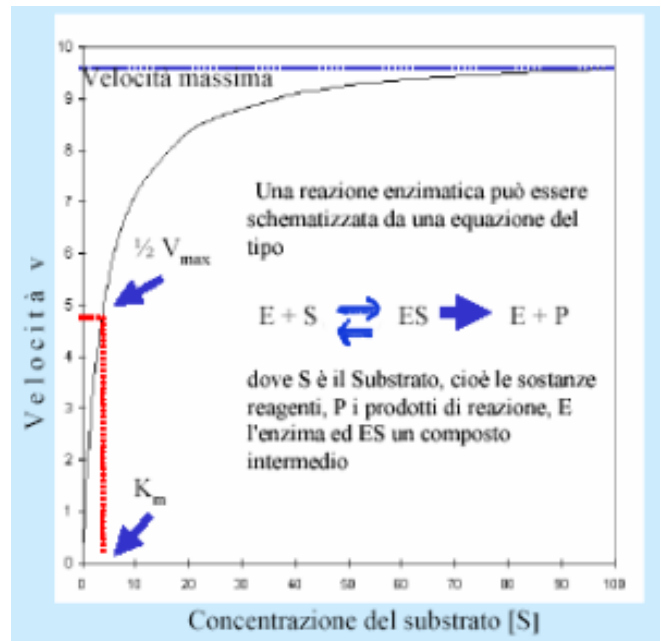


Figura 1

III caso: per $[S] = K_m$ la velocità iniziale è

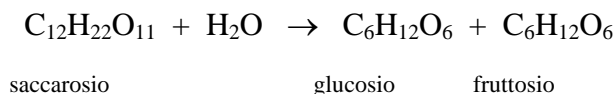
$$v_o = \frac{k_3[E]_o[S]}{2[S]} = \frac{1}{2} v_{mx} \quad \text{eq.15}$$

K_m è quindi quella concentrazione di substrato alla quale la velocità della reazione è uguale ad un mezzo di V_{max} .

La velocità della reazione enzimatica, quindi la quantità di prodotto che si forma nell'unità di tempo, è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato (tratto inizialmente rettilineo della curva nella figura1). Una volta raggiunta una certa concentrazione, quando tutte le molecole di enzima risultano impegnate nel complesso ES, ogni ulteriore aumento di substrato non fa più crescere linearmente la quantità di prodotto. La velocità della reazione si stabilizza su un valore massimo e non è più condizionata da altra aggiunta di substrato. La velocità massima si raggiunge nel momento in cui l'enzima è saturato dal substrato, ovvero il numero delle molecole di enzima risulta uguale al numero delle molecole del complesso enzima substrato. I valori di K_m variano moltissimo da enzima ad enzima ed esprimono l'affinità che l'enzima ha per il substrato. Osservando la posizione di K_m all'interno della figura_1 (velocità-concentrazione di substrato), si può notare che se K_m è bassa, in ogni istante è necessaria una bassa concentrazione di substrato per saturare metà delle molecole di enzima e questo è segno di alta affinità dell'enzima per il substrato, mentre se K_m è alta, occorre una più alta concentrazione di substrato per saturare metà delle molecole di enzima in ogni istante e questo vuol dire che l'enzima presenta bassa affinità per il substrato. Il valore di K_m è indipendente dalla concentrazione dell'enzima e dalla concentrazione del substrato

Esempio

Il saccarosio viene idrolizzato in glucosio e fruttosio, e la reazione è catalizzata dall'enzima invertasi:



La velocità di idrolisi iniziale, misurata in presenza di invertasi in concentrazione μM , varia in funzione della concentrazione di saccarosio nel modo previsto dalla equazione di Michaelis-Menten, come riportato nel grafico seguente.

Idrolisi del saccarosio

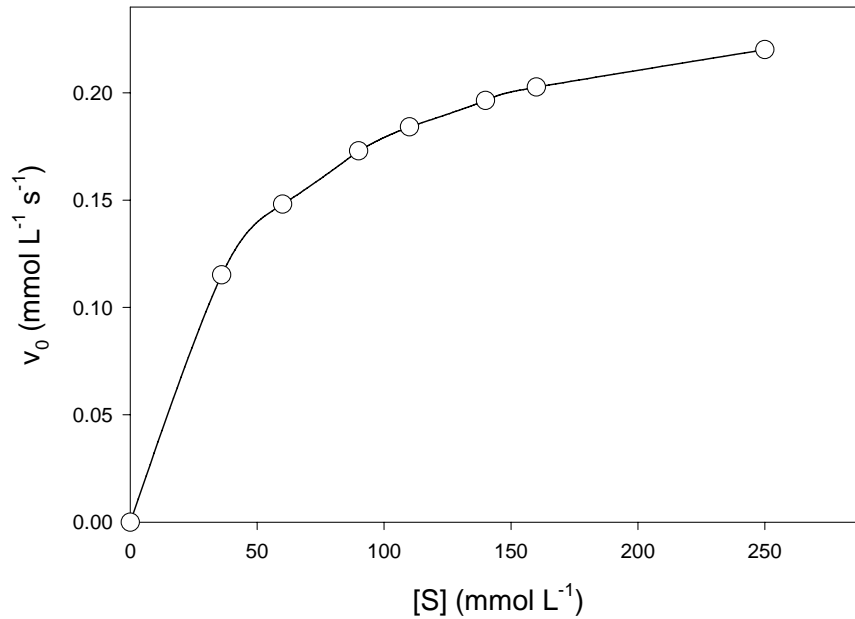


Diagramma dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk

Per determinare dai dati sperimentali i parametri cinetici è conveniente trasformare l'equazione di Michaelis-Menten in un'equazione lineare. Uno dei metodi più usati è quello di **Lineweaver-Burk** che usa la forma reciproca dell'equazione di Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{[S] + K_m}{V_{max} [S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

eq.16

ove le variabili sono $1/v$ e $1/[S]$ e $1/V_{max}$ è l'intercetta sull'asse y e $-1/K_m$ è l'intercetta sull'asse x .

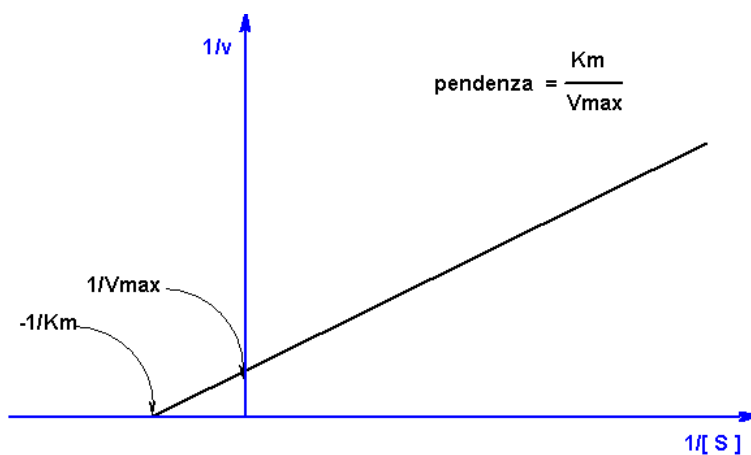


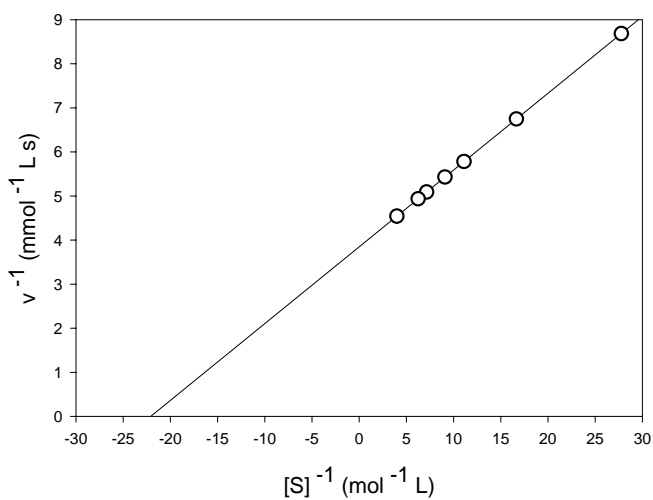
Figura 2_Tal figura è stata presa dal sito del Prof. Sergio Marchesini Appunti di Enzimologia; <http://www.med.unibs.it/~marchesi/enzimologia/>

Esempio.

Per la reazione di idrolisi del saccarosio del precedente esempio si hanno i dati seguenti :

[S] (mol L ⁻¹)	0.036	0.060	0.090	0.11	0.14	0.16	0.25
v _o (mmol L ⁻¹ s ⁻¹)	0.115	0.148	0.173	0.184	0.196	0.203	0.220
1/[S] (L mol ⁻¹)	27.8	16.7	11.1	9.09	7.14	6.25	4.00
1/v _o (L s mmol ⁻¹)	8.69	6.75	5.78	5.43	5.09	4.94	4.54

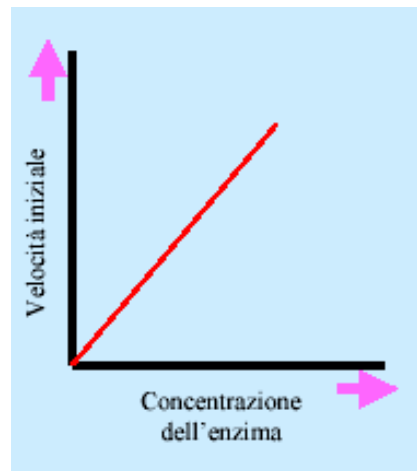
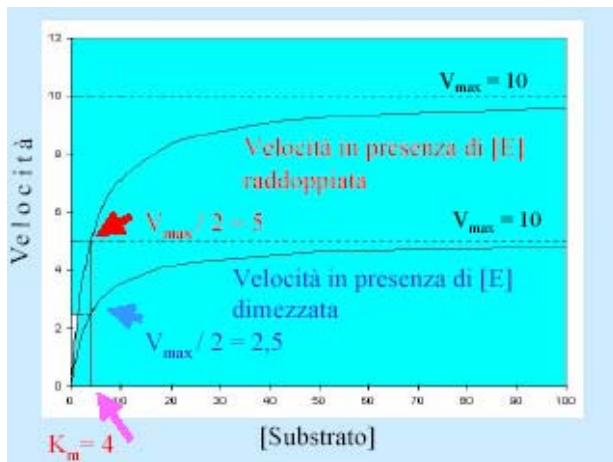
da cui si ottiene il seguente diagramma dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk:



Dal diagramma si ricava l'intercetta sull'asse verticale 3.85 , il cui reciproco dà il valore della velocità massima $v_{mx} = 0.26 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La pendenza della retta è 174 s, da cui $K_m = 174 \times 0.26 = 45.2 \text{ mmol L}^{-1}$.*

La V_{max} di una reazione enzimatica è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima. In presenza di una concentrazione alta di substrato, ogni molecola di enzima è legata ad una molecola di substrato. Aumentando la concentrazione dell'enzima aumenta anche la formazione del prodotto. Se si raddoppiano le molecole di enzima, legando queste il doppio delle molecole di substrato, raddoppierà anche la velocità di reazione, la stessa cosa accade triplicando la concentrazione di enzima triplicherà anche la velocità di reazione enzimatica, Quindi tra $[E]$ e V si è diretta proporzionalità e il grafico che le mette in relazione è una retta.



Per determinare la concentrazione incognita di enzima conosciuto devo prima costruire la retta di calibrazione tra $[E]$ e V , quindi nella mia soluzione con concentrazione incognita di enzima aggiungo substrato, attraverso i dati mi costruiscila curva tra velocità e concentrazione di substrato, vedo se l'enzima segue il meccanismo di Michaelis e Menten, calcolo V_{max} , immetto il valore nella curva di calibrazione (concentrazione enzima-velocità max) ed ottengo la concentrazione dell'enzima incognita.

Il testo compreso tra gli asterischi è stato acquisito, per la chiarezza espositiva, ed ampliato dall'indirizzo: <http://www.uniurb.it/MedChem/Gatti/cinetica/cinetic4.doc> che rimanda agli [Appunti delle lezioni del Prof. Luigi Gatti](#) dell' [Istituto di Chimica Farmaceutica Facoltà di Farmacia Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"](#)

Le immagini a colori e relative spiegazioni sono state acquisite dal sito: [Gaetano Graziano_ Gli Enzimi](http://www.suardo.it/Unit%C3%A0%20didattiche/Gli%20enzimi.pdf) (<http://www.suardo.it/Unit%C3%A0%20didattiche/Gli%20enzimi.pdf>) docente dell' [Istituto Suardo](#)

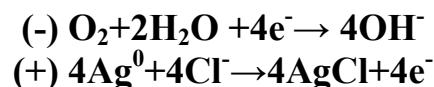
Capitolo2_Datazione enzimatica di materiali di origine cellulosica

Numerosi materiali, utilizzati nei beni culturali, quali la carta, il legno ed i tessuti, sono costituiti di fibre cellulosiche, derivanti da varie specie vegetali, sia arboree che erbacee. La cellulosa è un polisaccaride lineare con massa molecolare alta, costituito da unità monometriche di glucosio (200-1500) legate assieme da legami 1,4-beta-glucosidici, a formare lunghe catene non ramificate, disposte parallelamente, che si legano tra loro tramite numerosissimi ponti H (legame idrogeno) a formare fibrille resiste. Tali materiali sono sottoposti ad un inevitabile processo naturale di degrado che si svolge con modalità e intensità fortemente condizionate dall'ambiente nel quale il manufatto è vissuto e si è conservato (i fattori ambientali che agiscono sulle fibre tessili deteriorandole progressivamente sono luce, calore, umidità, agenti chimici e microrganismi ambientali). Gli effetti di tale degrado, nel tempo, sono l'indebolimento delle fibre, che si spezzano, depolimerizzarsi, fino a raggiungere poche unità di glucosio. I processi di invecchiamento naturale che si considerano per la costruzione di curve archeometriche sono: la carbossilazione e la metossilazione dei gruppi OH dei monomeri glucosidici della cellulosa ad opera dei microrganismi presenti nell'ambiente circostante.

2.1_Metodo carbodiimmide.

2.1.1_Strumento.

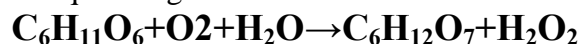
Il metodo prevede l'utilizzo di un biosensore, si tratta di un dispositivo analitico composto da un trasduttore elettrochimico, di tipo amperometrico o potenziometrico, accoppiato ad un enzima. Il trasduttore rappresenta l'elemento che traduce il segnale di riconoscimento biologico in un segnale elettrico. Viene utilizzato un elettrodo amperometrico per l'ossigeno del tipo di Clark, che funziona come una cella elettrolitica, con catodo di Platino e anodo d'Argento-Cloruro d'Argento immersi in una soluzione di KCl. Tra i due elettrodi viene imposta dall'esterno una differenza di potenziale tra 650mV e 790 mV, al catodo (polo-) avviene il processo di riduzione dell'ossigeno, mentre all'anodo si forma AgCl:



Ci sarà un passaggio di corrente in soluzione e quindi nel circuito esterno che viene misurata attraverso un micro-amperometro; maggiore è la concentrazione di ossigeno in soluzione maggiore è il passaggio di corrente, secondo una legge lineare del tipo:

$$i = K[\text{O}_2] \quad \text{EQ.17}$$

Per proteggere l'elettrodo di Clark da sostanze interferenti di varia natura, composti elettroattivi che darebbero, se arrivassero all'elettrodo di lavoro, un segnale elettrico che falserebbe la misura in esame, si utilizza una membrana gas permeabile. Nel biosensore, l'elettrodo di Clark si accoppia ad un enzima, che per le misure archeometriche, è la glucosio-ossidasi, enzima che catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico ed acqua ossigenata:

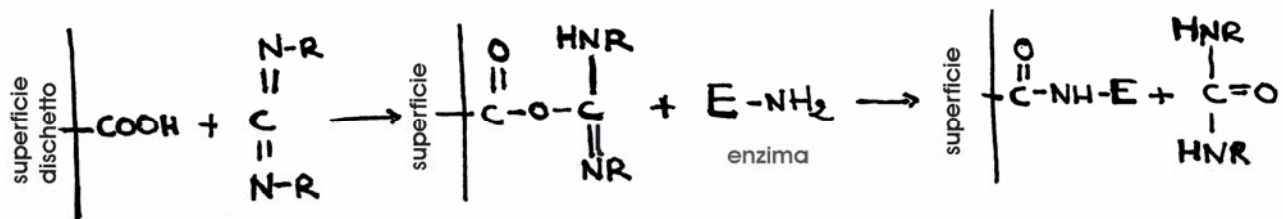


L'enzima viene immobilizzato sulla superficie del sensore per via chimica, attraverso legami covalenti, o per via fisica. Infine vi è una membrana da dialisi che permette il passaggio di piccole molecole secondo un meccanismo di esclusione molecolare.

Il meccanismo di funzionamento di un biosensore è relativamente semplice: se alla soluzione a contatto con il mio biosensore aggiungo glucosio, questo tramite la membrana da dialisi viene a contatto con l'enzima glucosio-ossidasi, si innesca la reazione di trasformazione del glucosio con consumo di ossigeno dell'elettrodo di Clark, quindi essendo la corrente proporzionale alla concentrazione dell'ossigeno si ha un decremento dell'intensità di corrente.

2.1.2_Metodo.

Il metodo è ancora in via di sperimentazione, finora applicato su reperti lignei, si cerca di estenderlo anche ai materiali cartacei e tessili. Si basa su un processo naturale d'invecchiamento della cellulosa ovvero sulla carbossilazione dei monomeri glucosidici della cellulosa. Tramite misura del grado di carbossilazione effettuata attraverso misura dell'attività enzimatica è possibile costruire una scala di tipo archeometrico. La cellulosa è costituita da unità monomeriche di glucosio, le quali sono dotati di gruppi OH. Si parte dal presupposto che tanto più un campione è antico, tanto maggiore è la quantità di CO₂ fissata dai microrganismi presenti nell'ambiente circostante e quindi tanto maggiore è la quantità di gruppi ossidrilici ossidati a gruppi carbossilici, attraverso un meccanismo ancora non del tutto chiarito. Più antico il reperto maggiore è la concentrazione di gruppi carbossilici. Tali gruppi, rispetto agli ossidrilici, permettono di immobilizzare l'enzima chimicamente in maniera covalente. Tanti più gruppi carbossilici ci sono tante più molecole di enzima posso immobilizzarsi, maggiore sarà la risposta del sensore. A differenza del normale biosensore, per cui si utilizzano dei supporti sintetici per fissare l'enzima, nel biosensore, per la datazione, si utilizzano i reperti stessi per immobilizzare l'enzima. Si intuisce che possibili errori possono derivare da un eventuale impoverimento del contenuto di gruppi carbossilici in campioni a contatto con terreni ricchi di enzimi oppure campioni che hanno subito un effetto termico anomalo. Le applicazioni di tale metodo riguardano specialmente i legni, in cui è possibile effettuare un campionamento in profondità, mentre ci sono notevoli difficoltà per i materiali cartacei ed i tessuti, in cui il campionamento interessa la superficie del reperto ed è quindi più soggetto ad eventuali interferenze. In genere per la misura si utilizza un dischetto di diametro 0,5 cm e spessore pochi micron. Tale dischetto viene inserito in opportune atmosfere, in modo da condizionarne l'umidità, pesato al fine di standardizzare il processo in base al peso. Il primo passo consiste nel porre a contatto la cellulosa con il carbodiimide, attivatore, in corrispondenza dei gruppi COOH e successivamente viene immobilizzato l'enzima glucosio-ossidasi che si lega chimicamente ai gruppi al gruppo NH₂ attraverso questa reazione:



Tale dischetto viene inserito davanti all'elettrodo ed il biosensore ottenuto inserito in un becker con una quantità nota di glucosio. Tante più molecole di enzima si sono immobilizzate tanto più glucosio si trasforma, e tanto più ossigeno dell'elettrodo si consuma, maggiore sarà il decremento di corrente nel micro-amperometro. Misuro la velocità di consumo dell'ossigeno che sarà proporzionale alla velocità di reazione enzimatica e quindi risalgo all'attività enzimatica che è proporzionale alla quantità di enzima presente. Per eseguire misure di questo genere nella curva di Michaelis-Menten mi posiziono nella zona ad alte concentrazioni di substrato, e quindi lavoro in eccesso di glucosio. Misuro la

variazione della concentrazione di ossigeno in un tempo stabilito (100s) e registro un segnale di questo tipo (Fig.5):

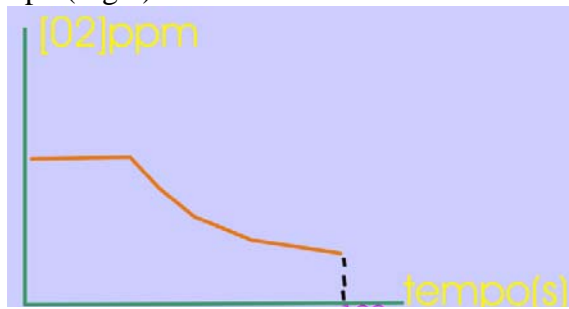


Figura 3

Quando l'elettrodo si è stabilizzato (prima parte della curva) aggiungo glucosio (seconda parte), ottengo la velocità media che mi permette di calcolarmi l'attività media. Posso anche considerare la velocità in diversi istanti, esempio tra 10 e 20 secondi, in modo tale che la pendenza della curva sia più costante possibile. Per datare un reperto, devo prima riconoscere il tipo di legno, e costruire delle curve archeometriche, diverse per ogni

legno, con standard già datati. Si riscontra che già nel legno fresco (appena tagliato) vi è una certa attività che sembra costante anche per legni di età superiore e quindi non influisce sulla datazione. Dalla curve di calibrazione, analizzando la deviazione standard relativa si è visto una differenza nell'utilizzare il metodo considerando 100s o 10s. Nel primo infatti la deviazione standard relativa è abbastanza costante e migliora con l'antichità del campione. Il secondo presenta, per campioni moderni, un'imprecisione notevole (RSD 40%), ma inferiore al primo per campioni antichi.

2.2_Metodo SAMT

IL metodo russo SAMT sfrutta un'altro processo di invecchiamento della cellulosa: la metilazione. Nella cellulosa, con il passare del tempo, oltre alla sostituzione dei gruppi OH con gruppi carbossilici, avviene la sostituzione dei gruppi idrossido con gruppi metossilici, definiti nel metodo metilici. Anche questo processo avviene gradualmente, per cui si può ritenere che la concentrazione dei gruppi metilici sia proporzionale all'età del campione, più gruppi metilici ci sono più è vecchio il reperto. Il metodo è basato sull'enzima S-adenosina, metionina transmetilasi, questo enzima a contatto con la cellulosa ed in presenza di un opportuno cofattore (SAM_ s-adenosina metionina) e di acido tetraidrofolico (THFA), catalizza la sottrazione dei gruppi metilici dalla cellulosa, con formazione di adenosina e omocisteina, secondo questa reazione:



Più gruppi metilici ci sono più adenosina si forma, quest'ultima viene quindi dosata attraverso cromatografia su strato sottile (TLC) e misurata con un densitometro ottico a luce UV (254 nm), per leggere la macchia prodotta sulla lastra cromatografica.

Capitolo3_Problematiche.

3.1_Problematiche.

Entrambi i metodi sono ancora in fase di sperimentazione. Il metodo del carbodiimmide presenta pochi problemi, infatti la procedura è semplice, la misura della concentrazione dell'ossigeno è abbastanza precisa e le uniche perplessità riguardano il confronto dei diversi campioni, che essendo di origine organica possono essere diversi da loro, tenendo presente che per ogni tipo di legno, deve essere messa appunto una scala archeometrica diversa. Il metodo del SAMT presenta uno sviluppo inferiore e diverse difficoltà. Il metodo è notevolmente laborioso. L'enzima utilizzato nel metodo non si trova in commercio, inoltre la rilevazione avviene con un metodo semiquantitativo, basterebbe sostituirlo con HPLC, e la reazione sembra non essere interamente spostata verso destra e non è l'unica reazione che può dare l'adenosina. Comune ai due metodi è il problema di reperire campioni di riferimento con età nota per costruire le curve archeometriche.

Bibliografia.

- *Paolo Cremonesi*_L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome (Prato 2002)
- LE NUOVE FRONTIERE DELLA SENSORISTICA DALLA PROTEZIONE AMBIENTALE ALLA RICERCA SPAZIALE
(<http://www.scienzefn.uniroma1.it/conferenze/Sensoristica.doc>)
- *Gaetano Graziano*_ Gli Enzimi
(<http://www.suardo.it/Unit%C3%A0%20didattiche/Gli%20enzimi.pdf>)
- *Prof. Sergio Marchesini*_Appunti di Enzimologia
<http://www.med.unibs.it/~marchesi/enzimologia/cinetica7.html>

