

ESTRUCTURA DEL SEMINARIO:

S1.1.	Introducción a la espectrofotometría	1
S1.2.	Radiación electromagnética	1
S1.3.	Espectroscopía ultravioleta/visible	2
S1.4.	Colorimetría	5

S1.1. Introducción a la espectrofotometría

⇒ **ESPECTROFOTOMETRÍA:** Medida de propiedades moleculares basada en la interacción materia-radiación electromagnética (espectroscopía)

⇒ **Propiedades:** concentraciones, variaciones del entorno (polaridad, pH), variaciones estructurales, interacciones moleculares, ...

⇒ **"Materia"** = **MUESTRA:** moléculas biológicas en disolución acuosa (proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos, ... etc.)

S1.2. Radiación electromagnética

⇒ Características de la radiación electromagnética

⇒ Naturaleza ondulatoria y corpuscular

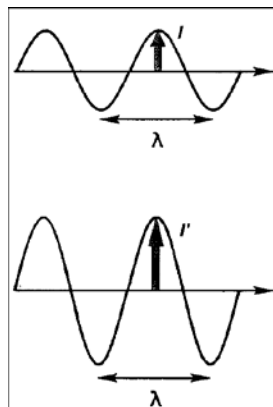
⇒ Se caracteriza por:

⇒ Su energía, definida a través de:

⇒ Su frecuencia (ν , en s^{-1}), su longitud de onda (λ , en nm) o su número de onda (ν , en cm^{-1}):

$$E = h \cdot \nu$$
$$E = h \cdot \left(\frac{c}{\lambda}\right)$$
$$E = h \cdot c \cdot \nu$$

⇒ Su intensidad (I) (número de fotones)

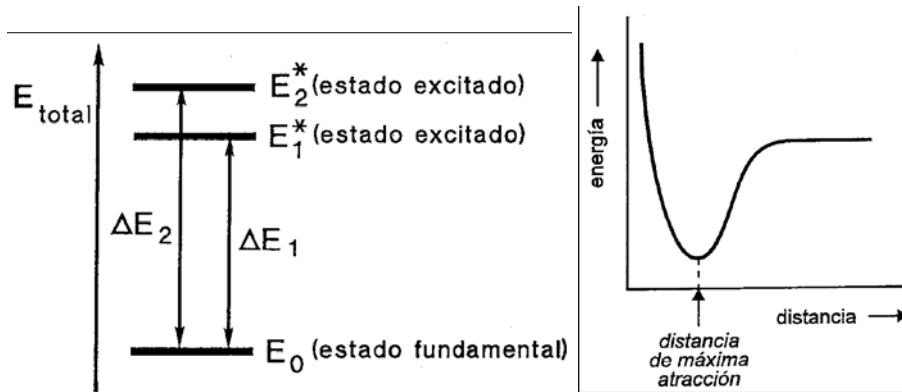


⇒ Energía de una molécula

⇒ Depende de la interacción entre partículas (átomos, núcleos, electrones, ...)

⇒ Caracteriza los distintos "estados" de la molécula

⇒ Representación:



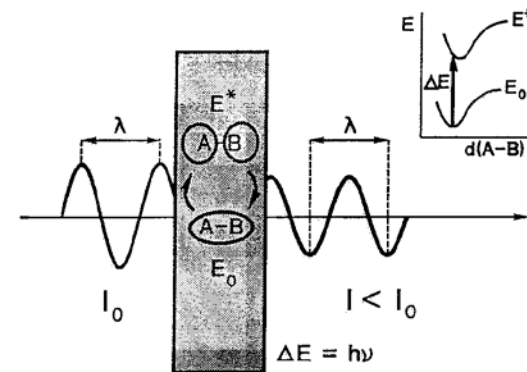
⇒ Interacción materia - radiación electromagnética

⇒ Dispersión (difracción)

⇒ Absorción

⇒ La energía de la luz incidente ($h\nu$) es igual a la variación de energía entre dos estados electrónicos de las moléculas de la muestra (ΔE)

⇒ Las moléculas que absorben se llaman cromóforos



⇒ Emisión

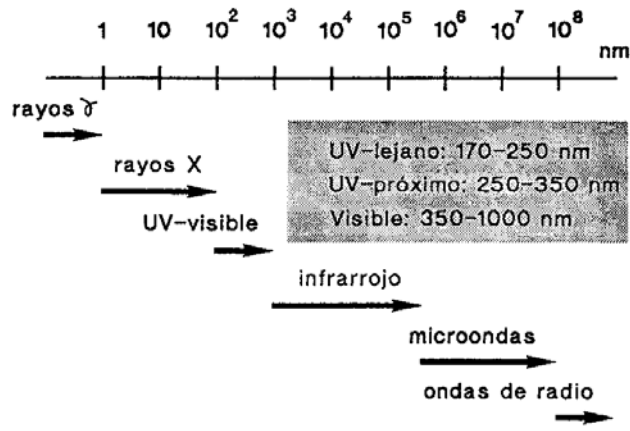
S1.3. Espectroscopía ultravioleta/visible

⇒ Espectroscopía UV - Visible

⇒ E_0 y E^* son estados electrónicos

⇒ $\lambda = 170-1000$ nm

⇒ Espectro de la radiación electromagnética:



⇒ Ley de Lambert-Beer

$$I = I_0 I_a$$

- $I \rightarrow$ Intensidad emergente
- $I_0 \rightarrow$ Intensidad incidente
- $I_a \rightarrow$ Intensidad absorbida

$$I = I_0 \cdot e^{-2.303 \cdot \epsilon \cdot C \cdot l}$$

- $\epsilon \rightarrow$ Coeficiente de extinción ($M1cm1$)
- $C \rightarrow$ Concentración
- $l \rightarrow$ Distancia atravesada por la luz (cm)

Medida de la absorbancia (A)

$$A = \log I_0 / I$$

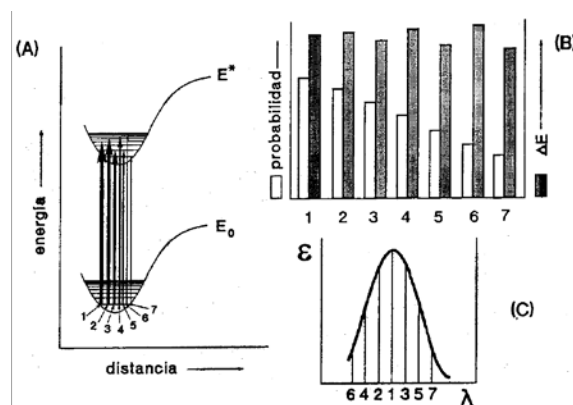
⇒ Ecuación de Lambert-Beer

$$A = \epsilon C l$$

Relación lineal entre la absorbancia y la concentración

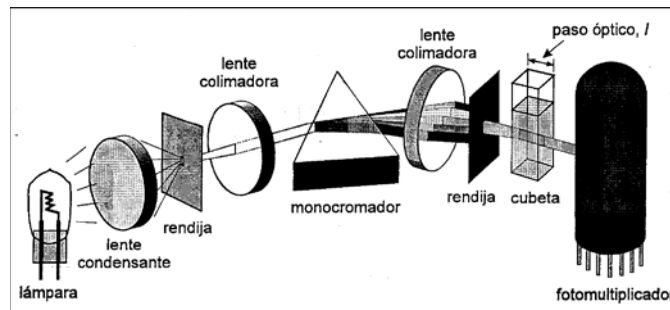
⇒ Espectros de Absorción

- ⇒ Registro de A (o e) a longitudes de onda (l) variables
- ⇒ Dan lugar a bandas anchas caracterizadas por un máximo (I_{max})
- ⇒ Cada cromóforo presenta su espectro característico

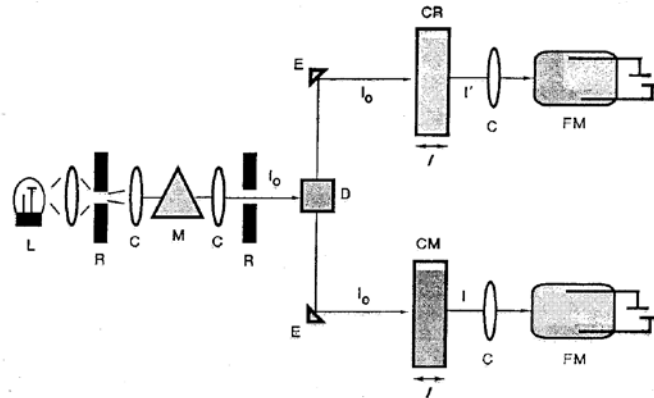


⇒ Espectrofotómetro de Absorción

⇒ Esquema general:



⇒ Espectrofotómetro de doble haz



⇒ Aplicaciones analíticas en muestras biológicas

⇒ Caracterización de moléculas biológicas:

⇒ En proteínas

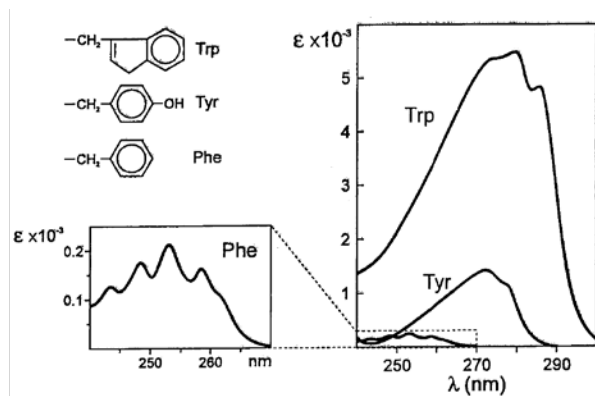
⇒ Cromóforos:

⇒ Grupos peptídicos (~200 nm)

⇒ Aminoácidos aromáticos (250 - 300 nm)

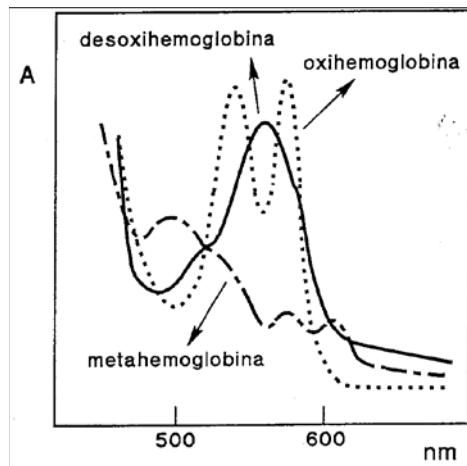
⇒ Grupos prostéticos: hemo, centros metálicos, (absorben en la región visible). NAD⁺ / NADH (absorben en la región ultravioleta)

⇒ Aplicaciones: Determinación de concentraciones, estudios estructurales (desnaturalización, cambios conformacionales), unión de ligandos, reacciones enzimáticas...

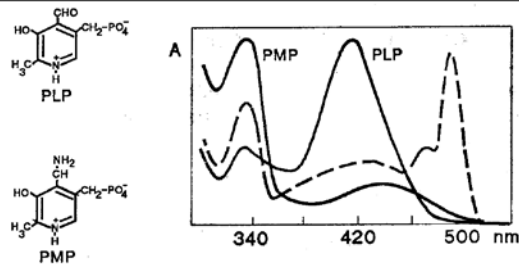


⇒ Espectros de proteínas con grupos prostéticos:

⇒ Hemoproteínas

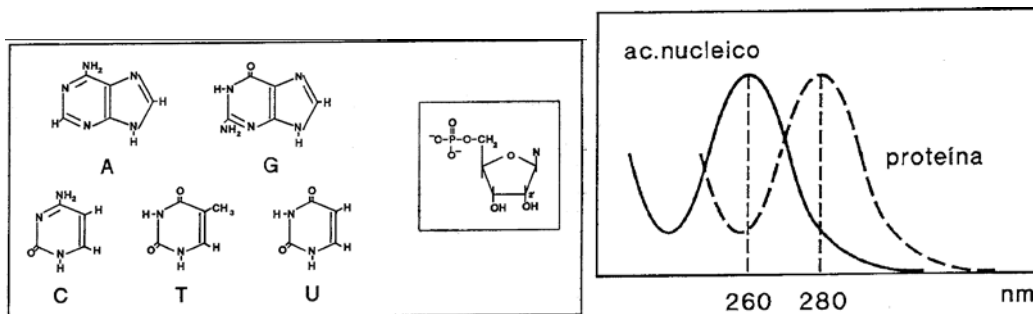


- ⇒ D - aminoácido aminotransferasa. Grupo prostético:
 - ⇒ Vitamina B6
 - ⇒ Fosfato de piridoxal (PLP)
 - ⇒ Fosfato de piridoxamina (PMP)



A **B**
D-alanina + PLP piruvato + PMP (Paso I)
 α -cetoglutarato + PMP D-glutamato + PLP (Paso II)
D-alanina + α -cetoglutarato piruvato + D-glutamato (Global)

- ⇒ Espectros UV - Vis de ácidos nucleicos
 - ⇒ Cromóforos: Bases nitrogenadas



S1.4. Colorimetría

- ⇒ Colorimetría
 - ⇒ Determinación de concentraciones proteicas (colorimetría)
 - ⇒ Si se conoce ϵ para una λ característica
 - ⇒ Aplicación de la ecuación de LambertBeer
 - ⇒ Medir Absorbancia a la longitud de onda característica

⇒ Aplicar: $C = A / (\epsilon \times 1 \text{ cm})$

⇒ ϵ desconocido

⇒ Utilización de una recta patrón

⇒ A partir de disoluciones de la proteína de concentración conocida

⇒ A partir de disoluciones de concentración conocida de una proteína patrón (albúmina de suero bovino, BSA)

⇒ **Método de Lowry**

⇒ Incubación con reactivo de Folin de muestras patrón (BSA 0100 mgr/ml) y muestras problema

⇒ Medida de Absorbancia a 660 nm de todas las muestras

⇒ Representación gráfica de los valores del patrón (*Absorbancia* frente a *Concentración*)

⇒ Interpolación de la *Concentración* de las muestras problema