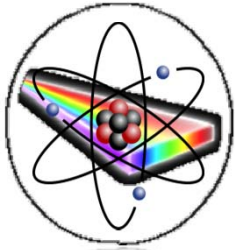


FBCB

UNL

Biofisicoquímica de Metaloproteínas

**Departamento de Física
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral
- Santa Fe -
ARGENTINA**



Espectroscopía

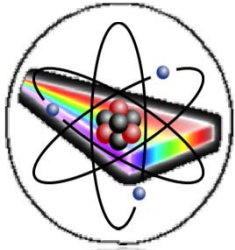
...en términos generales:

→ Rama de la ciencia que estudia cómo la radiación electromagnética interactúa con la materia:

...cuando la radiación EM incidente o emitida está en el rango UV-cercano, Visible e IR-cercano:

→ Rama de la ciencia que estudia cómo la luz interactúa con la materia:

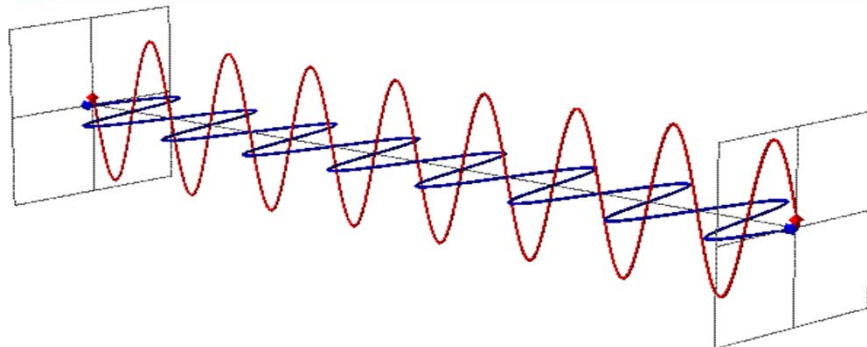
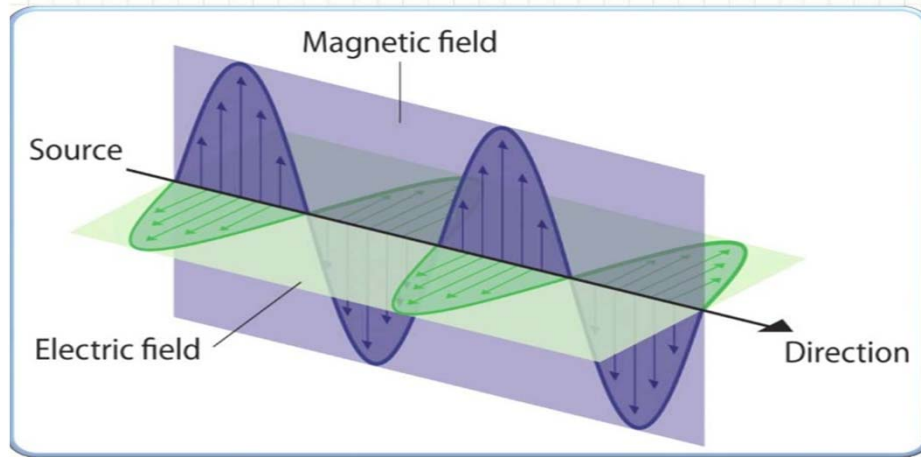
- Atomic absorption spectroscopy (AAS)
- Atomic emission spectroscopy (AES)
- Circular Dichroism (CD) and Magnetic Circular Dichroism (MCD) spectroscopies.
- Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)
- Microwave induced plasma spectroscopy
- Photoacoustic spectroscopy (PAS)
- Photoemission spectroscopy (PES)
- Photothermal spectroscopy (PTS)
- **Spectrophotometry or UV-Vis absorption spectroscopy.**
- X-ray spectroscopy (XRS) and X-ray fluorescence (XRF).



Radiación ElectroMagnética

...la radiación EM:

- Está compuesta de cuantos de energía conocidos como fotones.
- Un fotón consta de un campo eléctrico y uno magnético perpendicular, ambos en fase y oscilando a una determinada frecuencia.



Frecuencia (ν): nº de veces que el campo E o M oscila en un segundo:

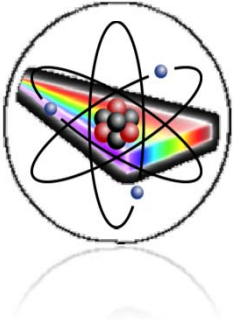
$$[s^{-1}] = [Hz]$$

Longitud de onda (λ): distancia más cercana entre dos puntos iguales de la onda en la misma fase, i.e. dos crestas, o dos valles.

$$[m] \text{ o } [nm]$$

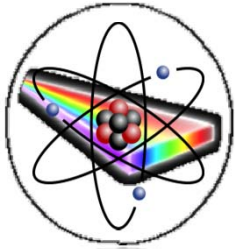
...en el vacío:

$$c = \nu \cdot \lambda \quad E = h \cdot \nu = h \cdot (c/\lambda)$$



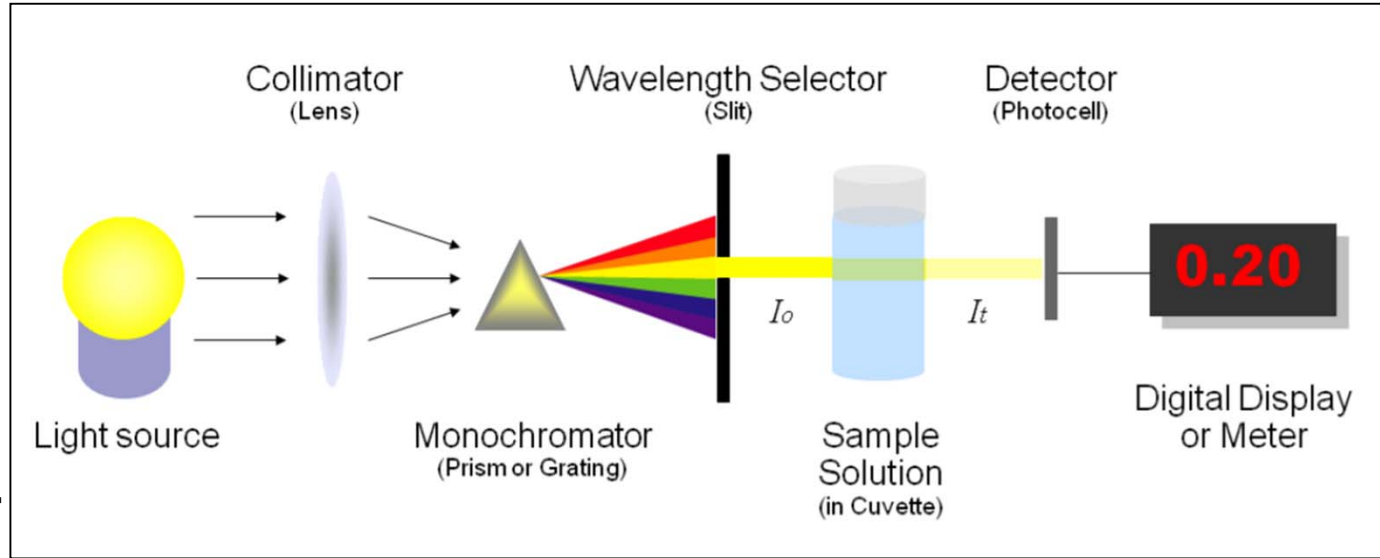
Fundamento de las Espectroscopías

- Experimentalmente, se obtiene un espectro de una muestra midiendo cómo la muestra que contiene átomos y/o moléculas interacciona con las diferentes regiones del Espectro EM.
- El espectro es una gráfica de intensidad de radiación EM absorbida o emitida en función de la frecuencia (o longitud de onda, o número de onda, etc.).
- En la espectroscopía de absorción UV-Visible-NIR la muestra es sometida a radiación EM en el rango 190-1100 nm.
- Las transiciones que resultan de la absorción de los fotones de esta región del espectro EM corresponden a saltos entre niveles de energía electrónicos.
- Generalmente, los saltos mas probables se dan desde el orbital HOMO (el último ocupado de mayor energía) hacia el LUMO (el primer desocupado con menor energía).

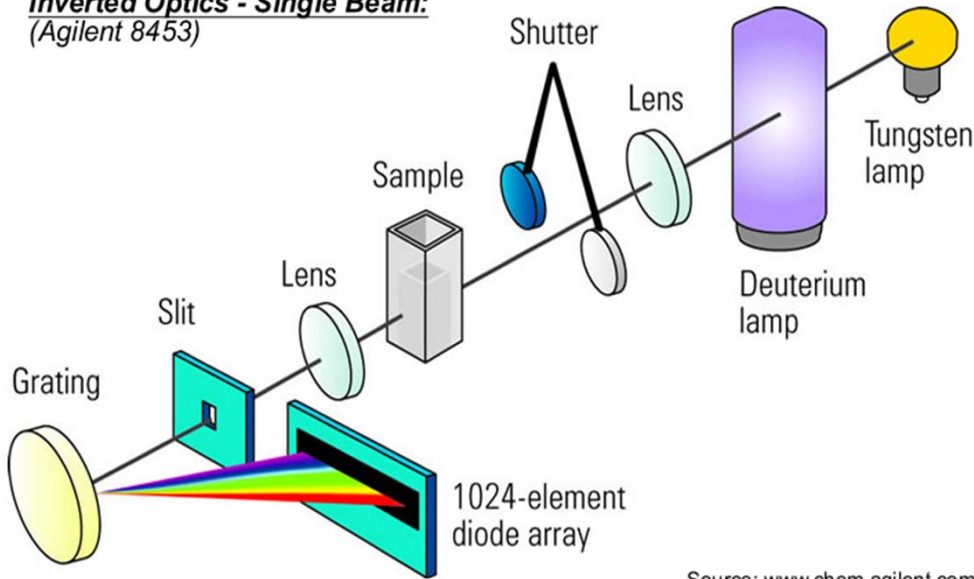


Instrumental absorción UV-Visible

Espectrofotómetro clásico

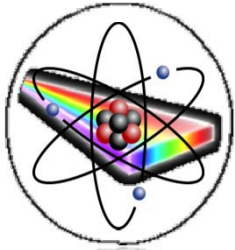


Inverted Optics - Single Beam:
(Agilent 8453)



Source: www.chem.agilent.com

Espectrofotómetro DAD



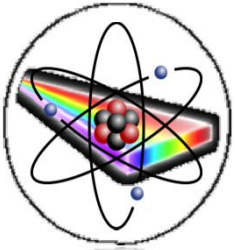
Ley de Lambert-Beer

- **Ley de Lambert (1760):** cuando una radiación EM monocromática pasa por una solución, la disminución de la intensidad es directamente proporcional al camino que recorre la radiación a través de la solución:

$$-\frac{dI}{db} \propto I \text{ or } -\frac{dI}{db} = k' I \quad \Longrightarrow \quad \log \frac{I_0}{I_T} = \frac{k'b}{2.303} \quad \text{or} \quad A = \frac{k'b}{2.303}$$

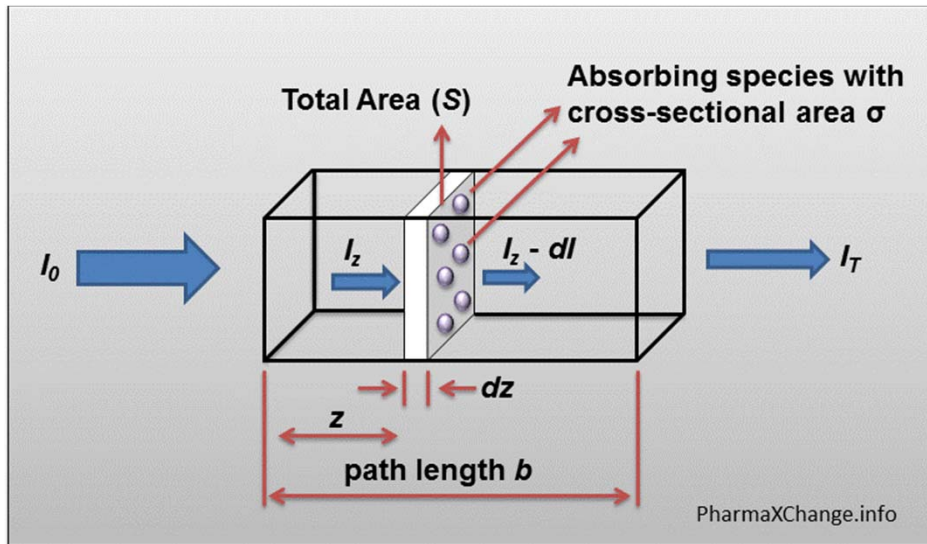
- **Ley de Beer (1852):** cuando una radiación EM monocromática pasa por una solución, la disminución de la intensidad transmitida decrece exponencialmente con la cantidad de especies (concentración) que absorben dicha radiación:

$$\log \frac{I_0}{I_T} = \frac{k''c}{2.303} \quad \text{OR} \quad A = \frac{k''c}{2.303}$$



Ley de Lambert-Beer

➤ Ley de Lambert-Beer: derivación moderna

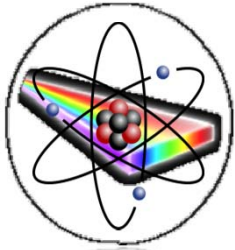


Area efectiva promedio de la molécula

$$-\log_{10} \frac{I}{I_0} = \frac{\sigma \times 6.023 \times 10^{23}}{2.303} \times b \times C$$

$$-\log_{10} T = \varepsilon \times b \times C$$

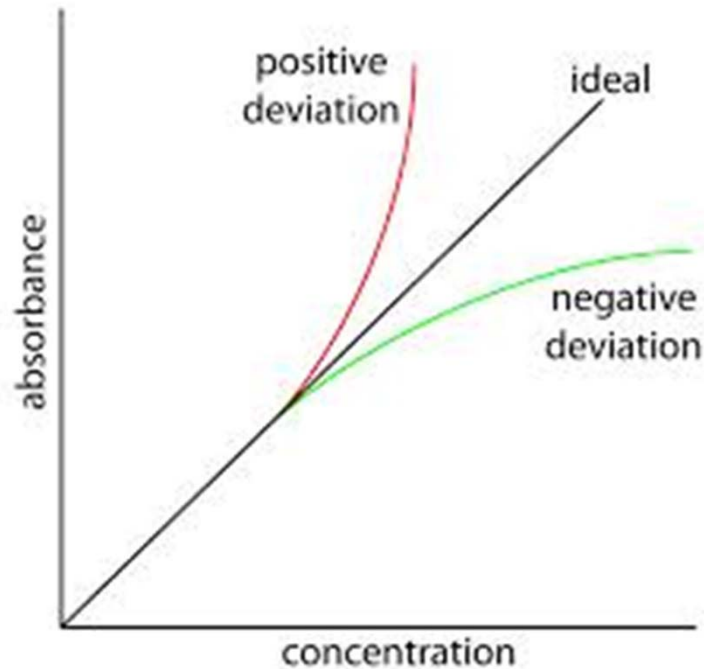
$$A = \varepsilon \times b \times C$$



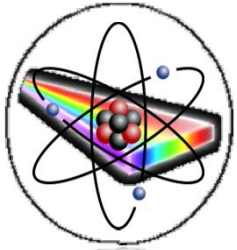
Ley de Lambert-Beer

➤ **Ley de Lambert-Beer:** desviaciones

$$A = \varepsilon \times b \times C$$



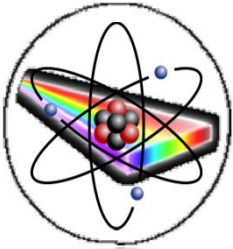
- **Desviaciones reales:** Éstas son desviaciones fundamentales debido a las limitaciones de la propia ley.
- **Desviaciones químicas:** son desviaciones observadas debido a especies químicas específicas de la muestra que se está analizando.
- **Desviaciones del instrumento:** Éstas son desviaciones que ocurren debido a cómo se hacen las medidas de la absorbancia.



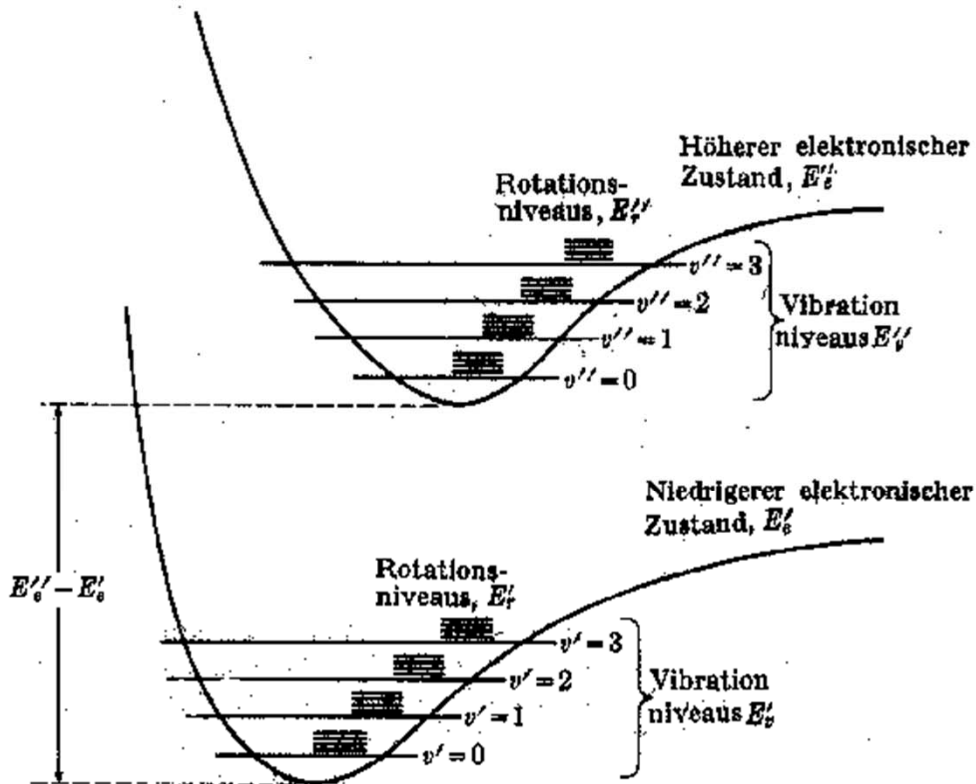
Ley de Lambert-Beer

➤ Ley de Lambert-Beer: desviaciones

- **Desviaciones reales:**
 - Concentraciones altas: las moléculas de soluto pueden causar la distribución de la carga diferente en sus especies vecinas en la solución. Absorción UV-visible es un fenómeno electrónico, concentraciones elevadas darían lugar a un cambio en la longitud de onda de absorción del analito. A veces, incluso las concentraciones de los buffers juegan un papel importante en la alteración de la absorbancia UV-visible.
 - Concentraciones de analito también pueden alterar el índice de refracción (η) de la solución, lo que a su vez podría afectar a la absorbancia obtenida → corrección: $A = \epsilon bc(\eta^2 + 2)^2$
- **Desviaciones químicas:**
 - Asociación, disociación e interacción con el solvente.
- **Desviaciones del instrumento:**
 - Debido a radiación policromática
 - Contaminación con luz espúrea
 - Cuvetas imperfectas, entre otros
 - Corriente del detector saturada, falta de sensibilidad.



Transiciones electrónicas

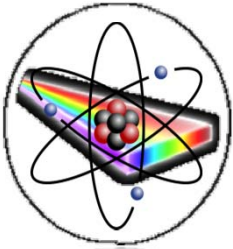


Vibrations- und Rotationsniveaus für zwei elektronische Zustände.

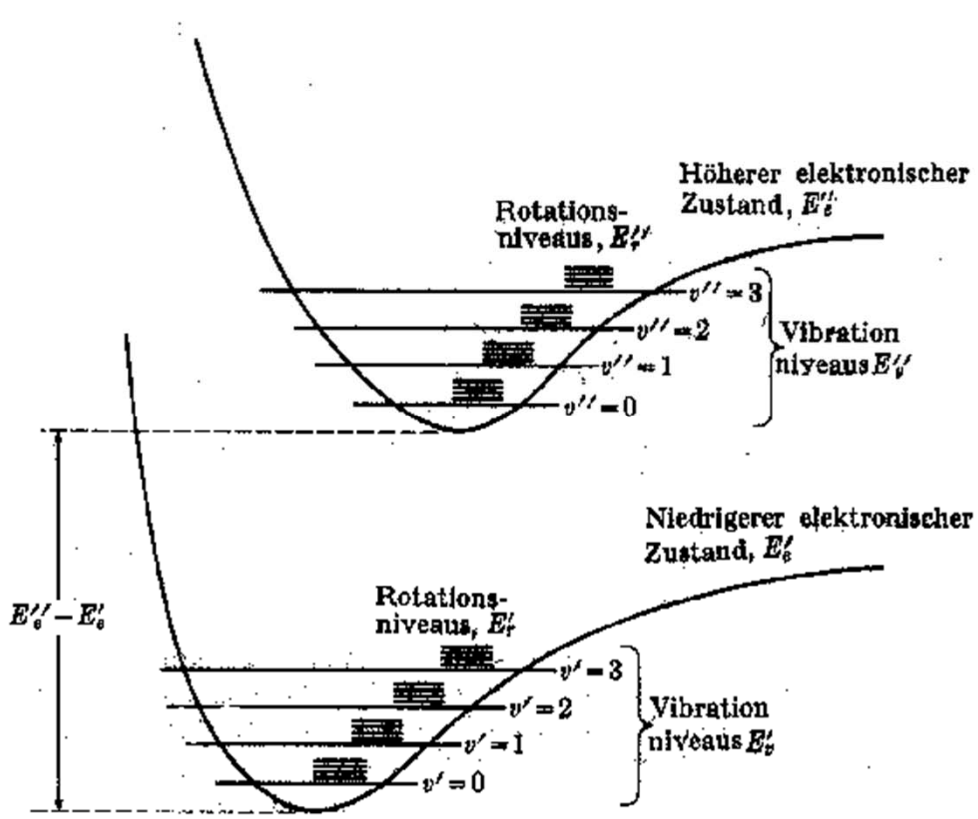
- A temperatura ambiente, las moléculas se encuentran en el estado de menor energía E_0 .
- Cuando absorben un fotón correspondiente a UV-Vis-NIR, el electrón más externo (HOMO) es excitado a un estado de energía mayor E_1, E_2, E_3 , etc.
- La diferencia $E_n - E_0$ corresponde a una transición electrónica donde:

$$\Delta E = (E_n - E_0) = h \cdot \nu$$

Calcular rango de ΔE

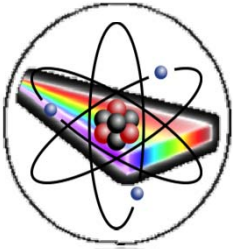


Transiciones electrónicas

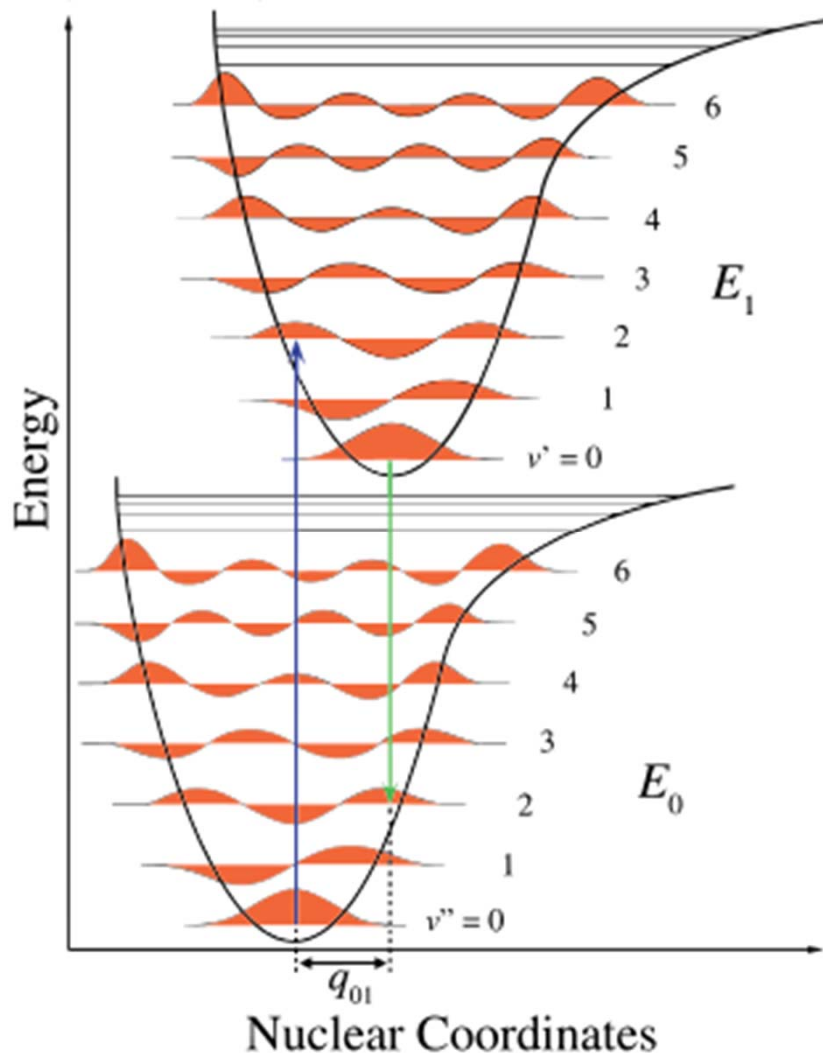


- Dentro de cada nivel de energía electrónico se encuentran los niveles de energía vibracionales y, dentro de estos los niveles de energía rotacionales
- Las transiciones entre niveles de energía vibracionales se da por la absorción de fotones en el rango IR, y entre niveles de energía rotacionales por la absorción de RF.

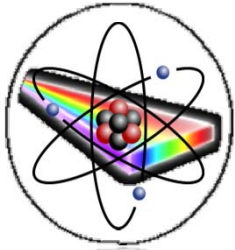
$$\Delta E_{\text{electrónico}} > \Delta E_{\text{vibracional}} > \Delta E_{\text{rotacional}}$$



Transiciones electrónicas



- **Absorción de un fotón:** la radiación EM (e.g. luz visible) promueve el salto de un electrón de un nivel de energía basal (E_0) a uno excitado (E_n).
- Las frecuencias particulares a las que la luz es absorbida son afectadas por la estructura y el ambiente del cromóforo.
- Los electrones excitados pueden regresar al estado fundamental por transiciones vibracionales a través de incrementos de energía más pequeños.
- La energía absorbida es devuelta finalmente como calor en la solución (*Phonon*).



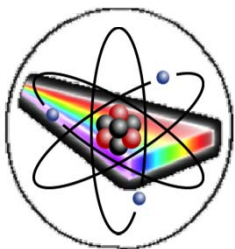
Transiciones electrónicas

→ Factores que afectan al espectro UV-Vis:

- **Auxochrome:** grupo funcional unido al cromóforo que modifica la forma cómo este último interactúa con la radiación EM.

- **Puede alterar...**
 - La longitud de onda máxima (λ):
 - Bathochromic shift (red shift): corrimiento hacia λ mayores
 - Hypsochromic shift (blue shift): corrimiento hacia λ menores

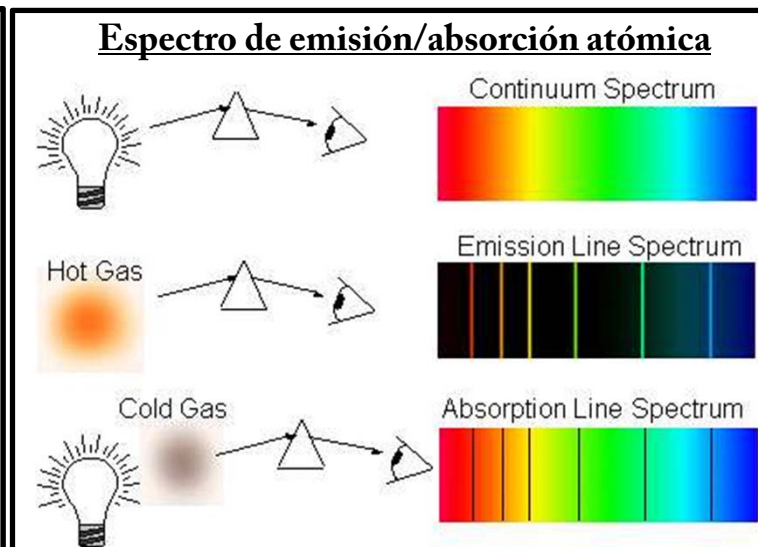
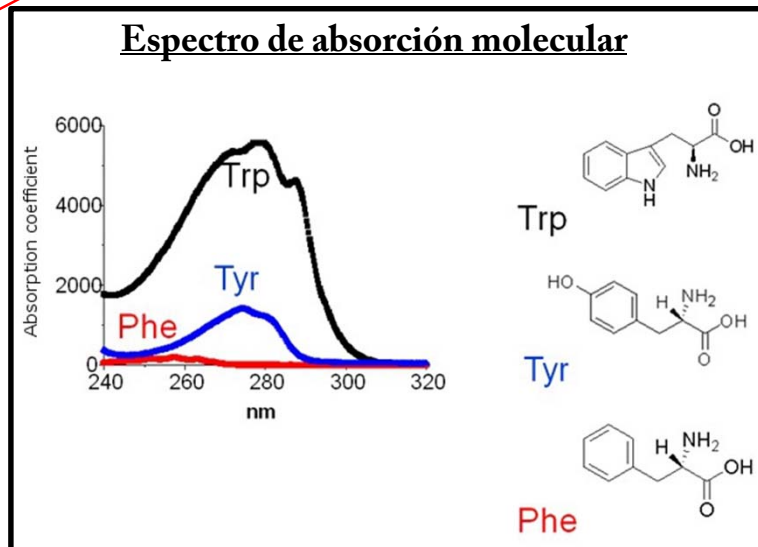
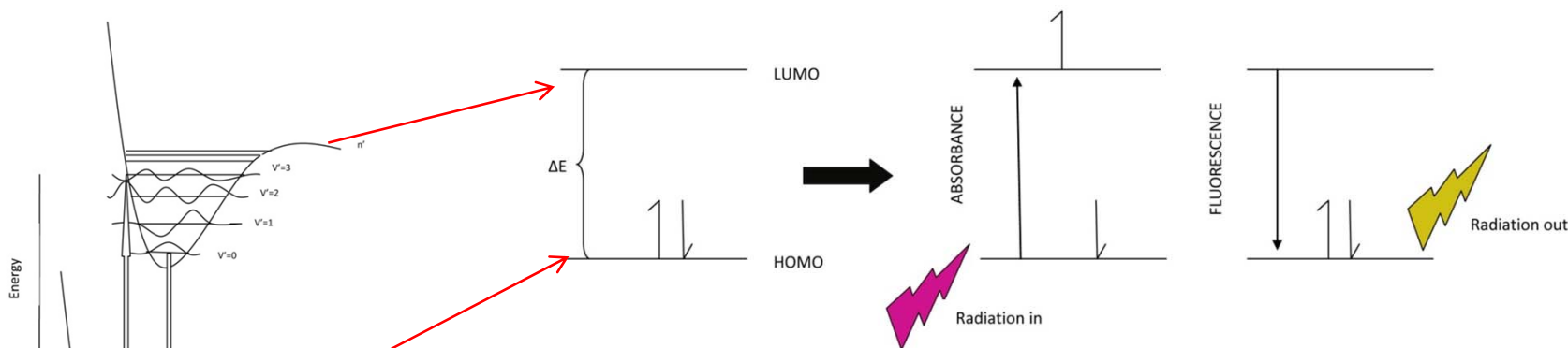
 - La intensidad de absorción (ϵ):
 - Efecto hiperocrómico: aumento del coeficiente ϵ
 - Efecto hipocrómico: disminución del coeficiente ϵ

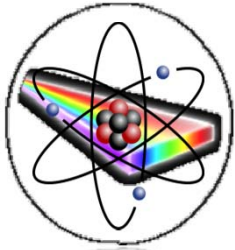


TEMA 5: Espectroscopía de absorción UV-Visible y CW-EPR.

Transiciones electrónicas

→ Porqué se observan bandas y no líneas de absorción?





Transiciones electrónicas

→ Porqué se observan bandas y no líneas de absorción?

Principio de incertidumbre de Heisenberg...

$$\Delta x \times \Delta p \geq \frac{\hbar}{2}$$



$$\Delta E \times \Delta t \geq \hbar$$



$$\Delta E \geq \frac{\hbar}{2\tau}$$

El tiempo es un parámetro, no una observable.
Por lo tanto, estrictamente hablando, no hay una relación de incertidumbre entre la energía y el tiempo...

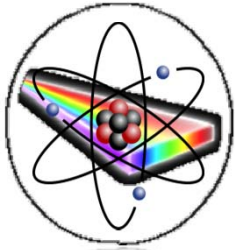
τ : Tiempo de relajación → cuánto demora la partícula en volver desde el estado excitado al fundamental

RMN → 0.1 – 10 segundos

RPE →

IR →

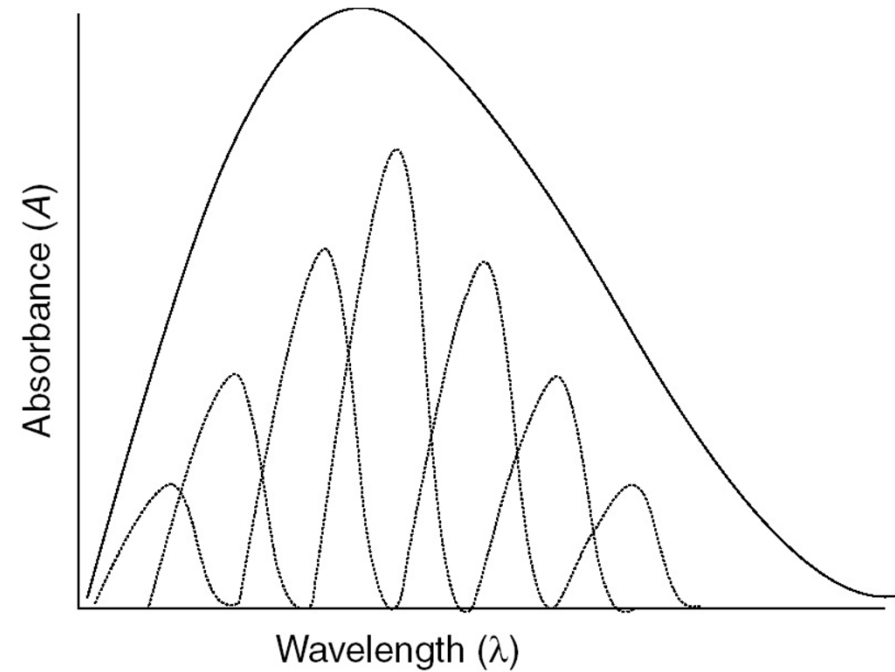
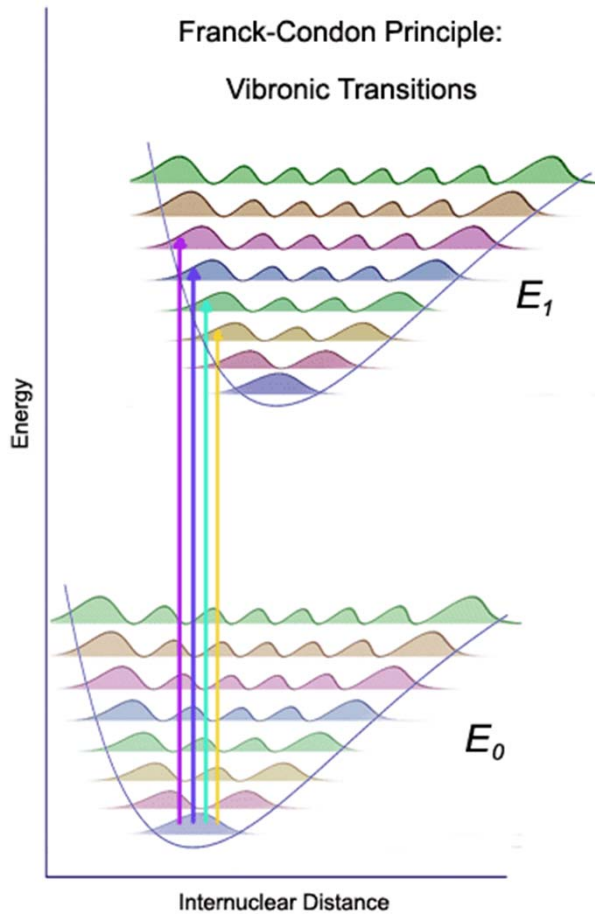
UV-Vis → 10^{-12} – 10^{-15} segundos

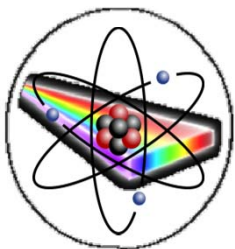


Principio de Franck-Condon

→ Porqué se observan bandas y no líneas de absorción?

Acoplamiento vibrónico...





Reglas de selección

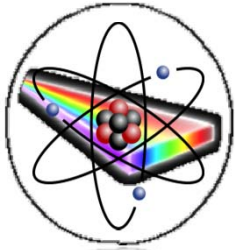
- **Regla de multiplicidad spin ($\Delta S=0$):**
 - Cambios en la multiplicidad de spin están prohibidas.
 - Transiciones entre estados singlete \rightarrow triplete, etc. están prohibidos
 - Sin embargo, debido a la interacción spin-orbita un estado (función de onda) nunca es puramente singlete, doblete, o triplete \rightarrow siempre está contaminado con algo de otra multiplicidad de spin, y por lo tanto pueden ocurrir transiciones prohibidas pero con una intensidad muy pequeña, aunque notable.

- **Regla de Laporte ($\Delta l = \pm 1$):**
 - En una transición electrónica debe existir cambio en la paridad del orbital (simetría).
 - Permitidas: $g \rightarrow u \quad \dots y \dots \quad u \rightarrow g$
 - Prohibidas: $g \rightarrow g \quad \dots y \dots \quad u \rightarrow u$
 - Sin embargo, una transición prohibida puede ser observada debido al acoplamiento vibrónico.

Expected intensities of electronic transitions

Transition type	Example	Typical values of $\epsilon / \text{m}^2 \text{mol}^{-1}$
Spin forbidden, Laporte forbidden	$[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	0.1
Spin allowed (octahedral complex), Laporte forbidden	$[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	1 - 10
Spin allowed (tetrahedral complex), Laporte partially allowed by d-p mixing	$[\text{CoCl}_4]^{2-}$	50 - 150
Spin allowed, Laporte allowed e.g. charge transfer bands	$[\text{TiCl}_6]^{2-}$ or MnO_4^-	1000 - 10^6

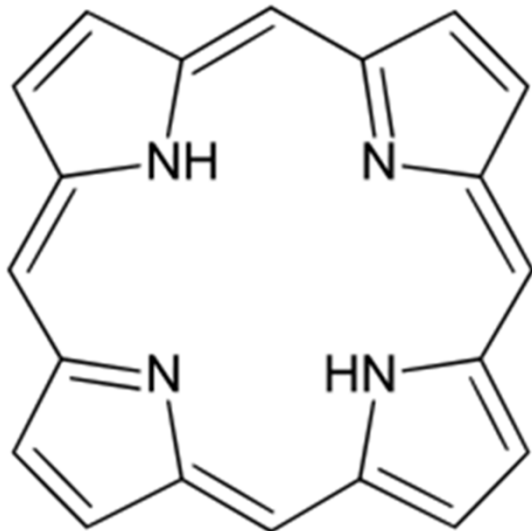
$$W_{\text{Net}} = \frac{S_{\text{Vibronic}} \times \langle f | \mu_e | i \rangle \times \rho}{\epsilon_0}$$



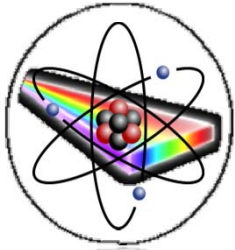
UV-Vis de Porfirinas

➤ Explicación espectro porfirinas (TCC grupo hemo)

- Las Porfirinas son una clase de macrociclo natural que pueden ser encontradas en biomoléculas importantes/claves para el metabolismo de los seres vivos.



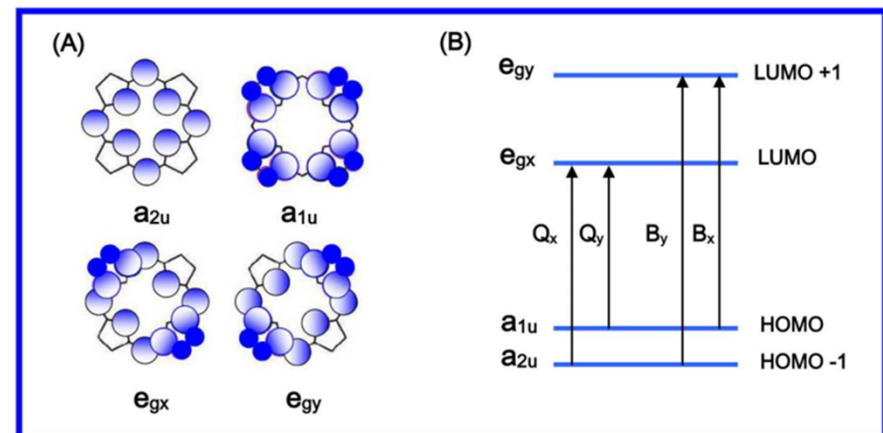
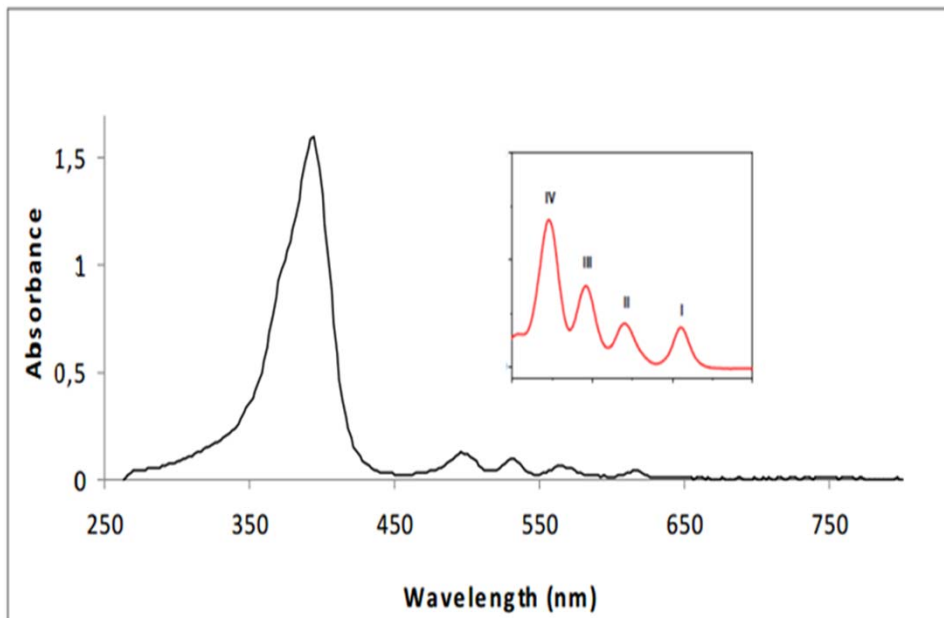
- Las porfirinas son una clase de pigmento de color intenso, de origen natural o también sintético, que constan de un anillo macrociclo aromático sustituido que se compone de cuatro anillos de pirrol unidos por cuatro puentes de metino.
- Como consecuencia de su característica estructura de anillo de dobles enlaces conjugados poseen propiedades especiales de absorción, de emisión, de transferencia de carga y capacidad de ligar moléculas, y gracias a ello las porfirinas desempeñan papeles importantes en la naturaleza.



UV-Vis de Porfirinas

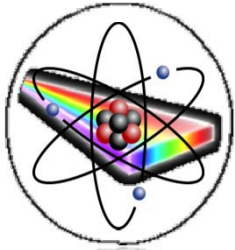
➤ Explicación espectro porfirinas (TCC grupo hemo)

- Las porfirinas muestran bandas de absorción muy intensas (banda Soret o banda B) en el rango 380-500 nm con coeficientes de extinción molar del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Además, a longitudes en el rango 500-750 nm, contiene un conjunto de bandas de absorción más débiles (bandas Q) con coeficientes de extinción molar del orden de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

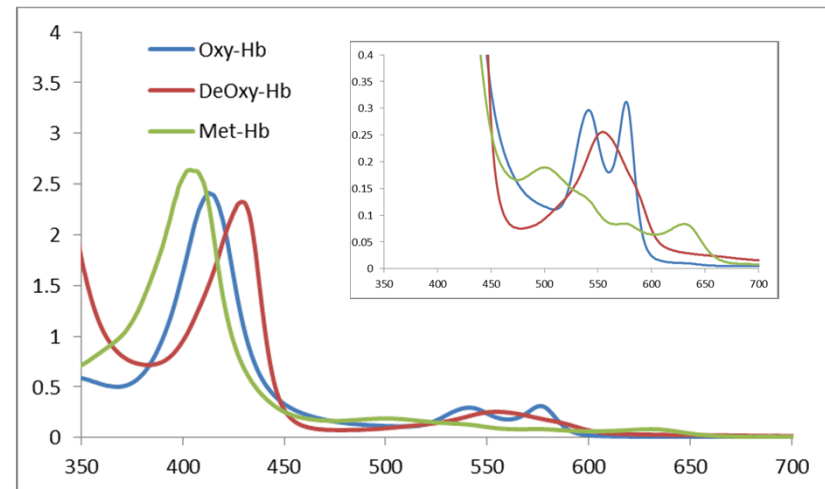
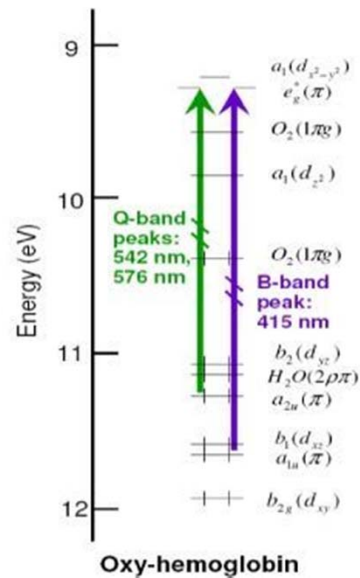
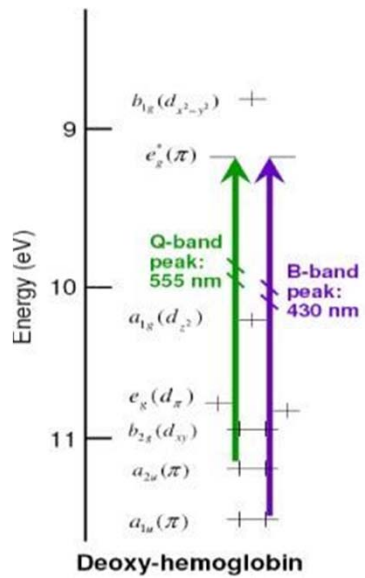
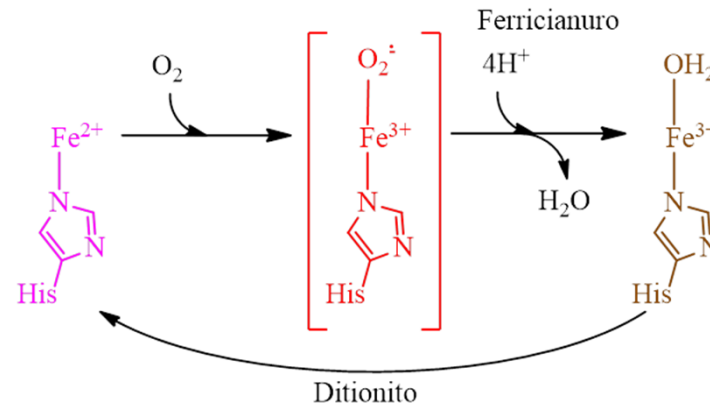
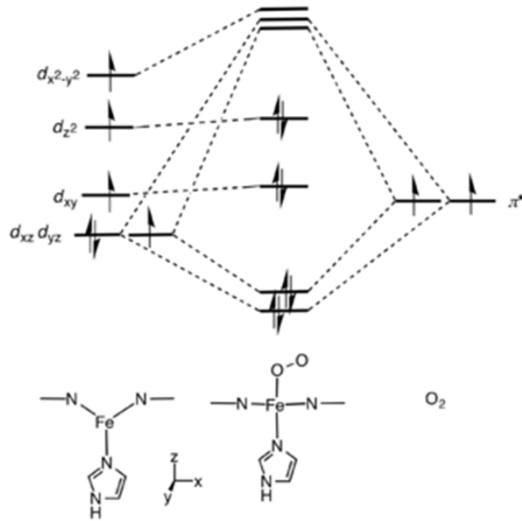


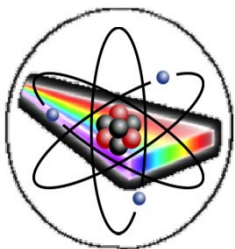
(A) Representación de los cuatro orbitales Gouterman en las porfirinas.
 (B) Esquema de niveles de energía de los cuatro orbitales de Gouterman (asumiendo simetría C_{2v} en lugar de D_{4h}).

- Transiciones hacia orbitales eg dan lugar a las bandas B y Q.



UV-Vis de la Hb



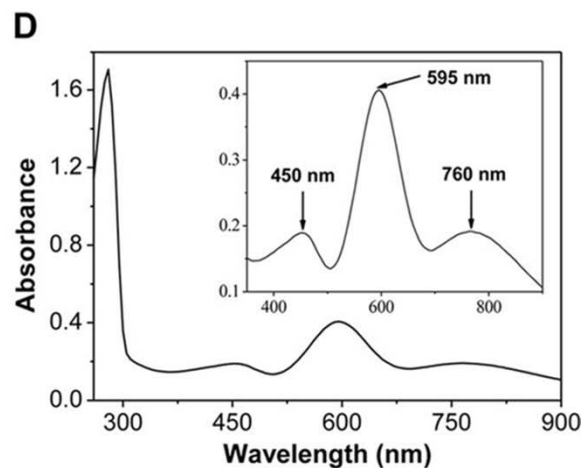
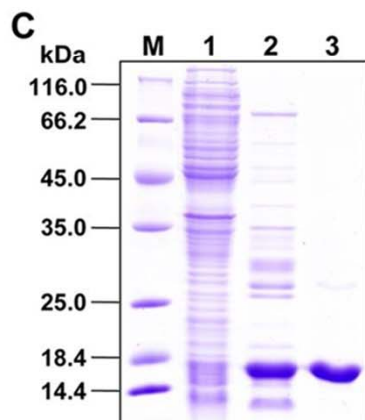
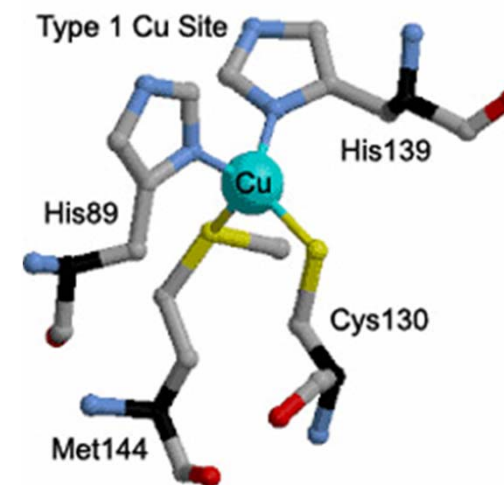


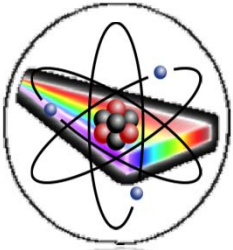
UV-Vis de proteínas de Cu

➤ Espectro absorción Pseudo-azurina

A

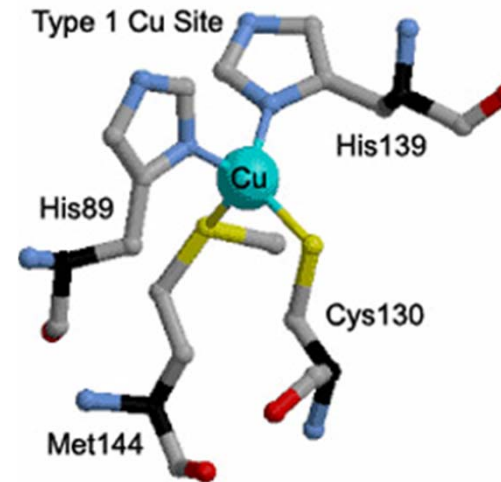
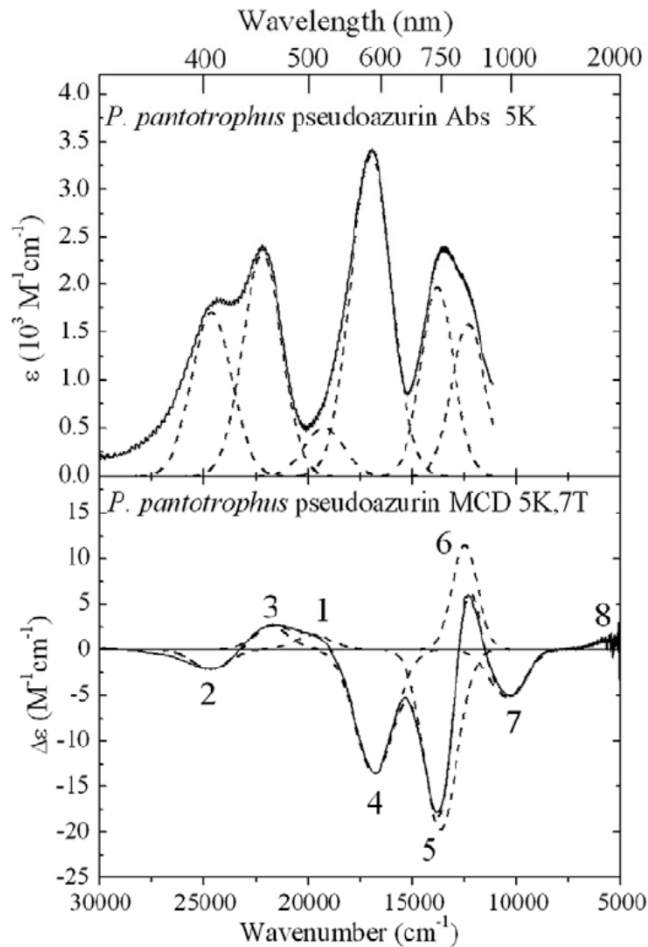
	60	70	80	100	110	120
<i>A. tumefaciens</i>	FILKDKGHNSASIKNAIPDGAM			PGVYVYQCTPHFAMGMIGAIIVAG-E		
<i>S. meliloti azu2</i>	FVAKDKGHNSALMKGGAPGAE			PGVYMYQCAPHVGMGMIGAIIVVG-E		
<i>A. cycloclastes</i>	FIPTDKGHNVETIKGMI PDGAE			PGVYGVKCTPHYGMGMVGVVQVGDA		
<i>A. faecalis</i>	FIPVDKGHNVESIKDMI PEGAE			PGAYLVKCTPHYAMGMIALIAVGDS		
<i>H. denitrificans</i>	FVPTDKSHNAESVREVVPEGVA			EGLYVLKCAPHYGMGMVVLVQVG-K		
<i>P. pantotrophus</i>	FVPTDKSHNVEAIKEILPEGVE			PGLYGVKCTPHFGMGMVGLVQVGDA		
<i>M. extorquens</i>	FLPTDKGHNVETIKGMAPDGAD			EGVYGFKCAPHYMMGMVALVVVGDK		





UV-Vis de proteínas de Cu

➤ Espectro absorción Pseudo-azurina



Band	Assignment	Wavenumber	$\varepsilon(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
		Paz	Paz
8	d_{z^2}	~5100	
7	d_{xy}	10400	
6	d_{xz+yz}	12500	1580
5	d_{xz-yz}	13500	1970
4	$S_{\text{Cys}} \pi$	16850	3360
1	S_{Met}	18700	500
3	$S_{\text{Cys}} \sigma$	22100	2330
2	$N_{\text{His}} \pi$	24600	1700