

I. Estructura de Proteínas

a) Aminoácidos

b) Proteínas

Estructura Primaria

Estructura Superiores

Estructura secundaria: α -hélice, hoja β

Estructura terciaria

Estructura cuaternaria

Interacciones:

Proteína-Proteína

Proteína Solvente

Proteína-Ligando

c) Análisis de Proteínas

Espectroscopía de absorción

Tamaño y carga de proteínas

Electroforesis, Isoelectroenfoque

Cromatografía

Exclusión molecular

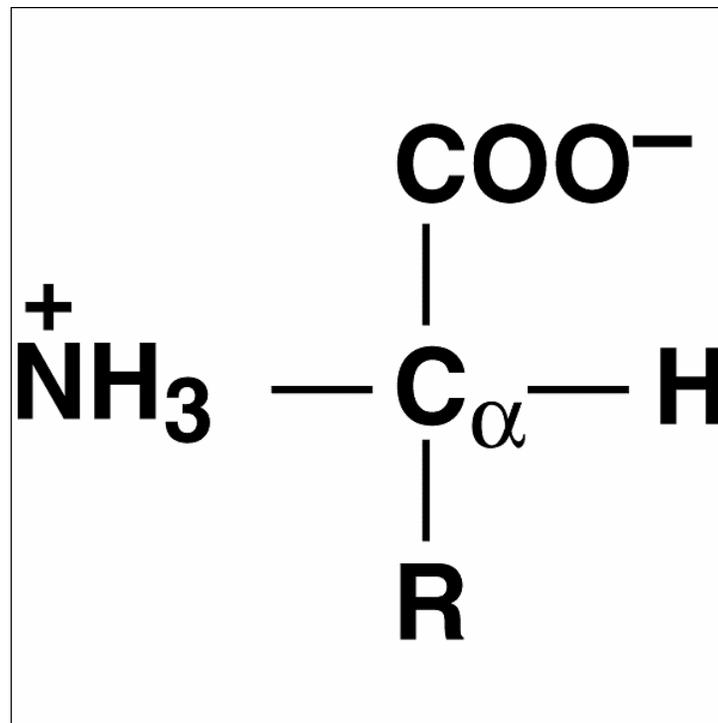
Intercambio iónico

Afinidad

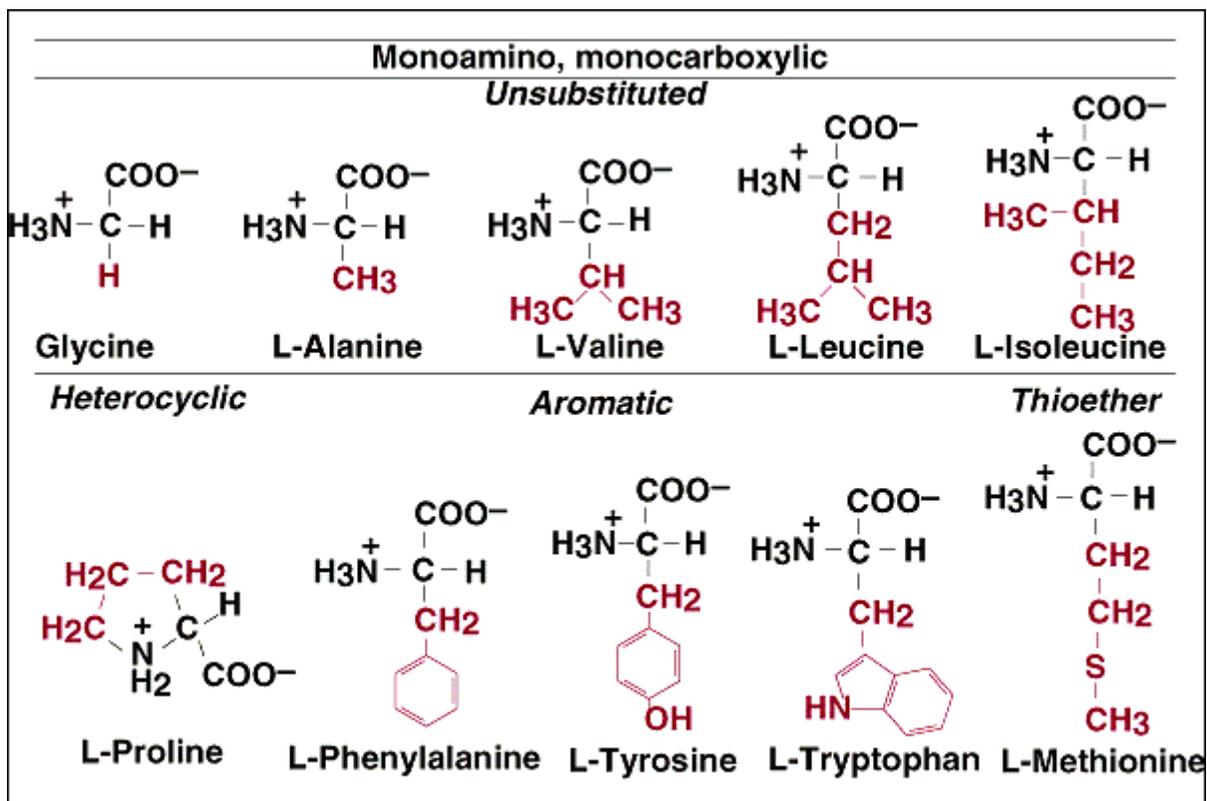
II. Enzimología

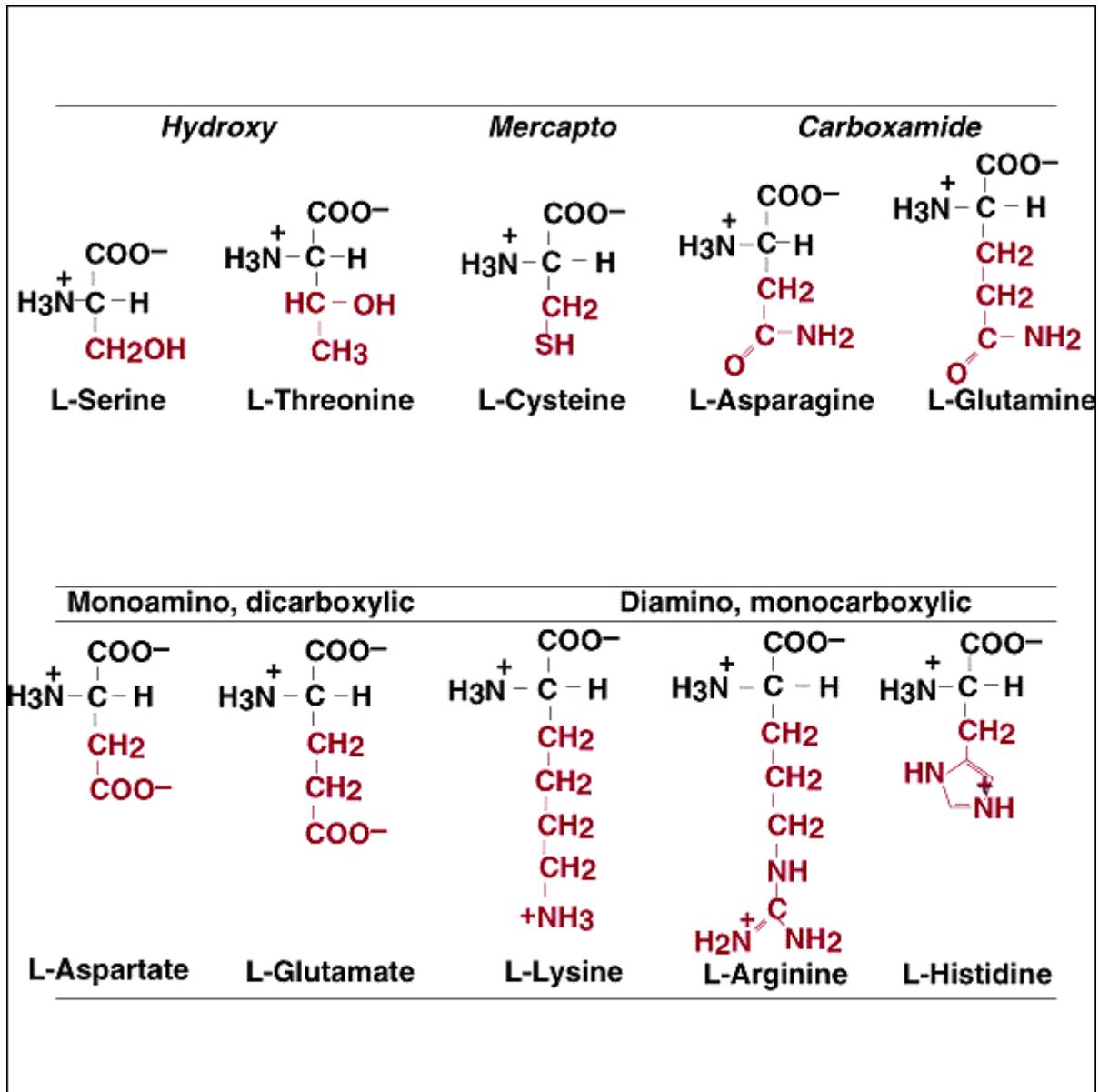
Estructura y función de enzimas:

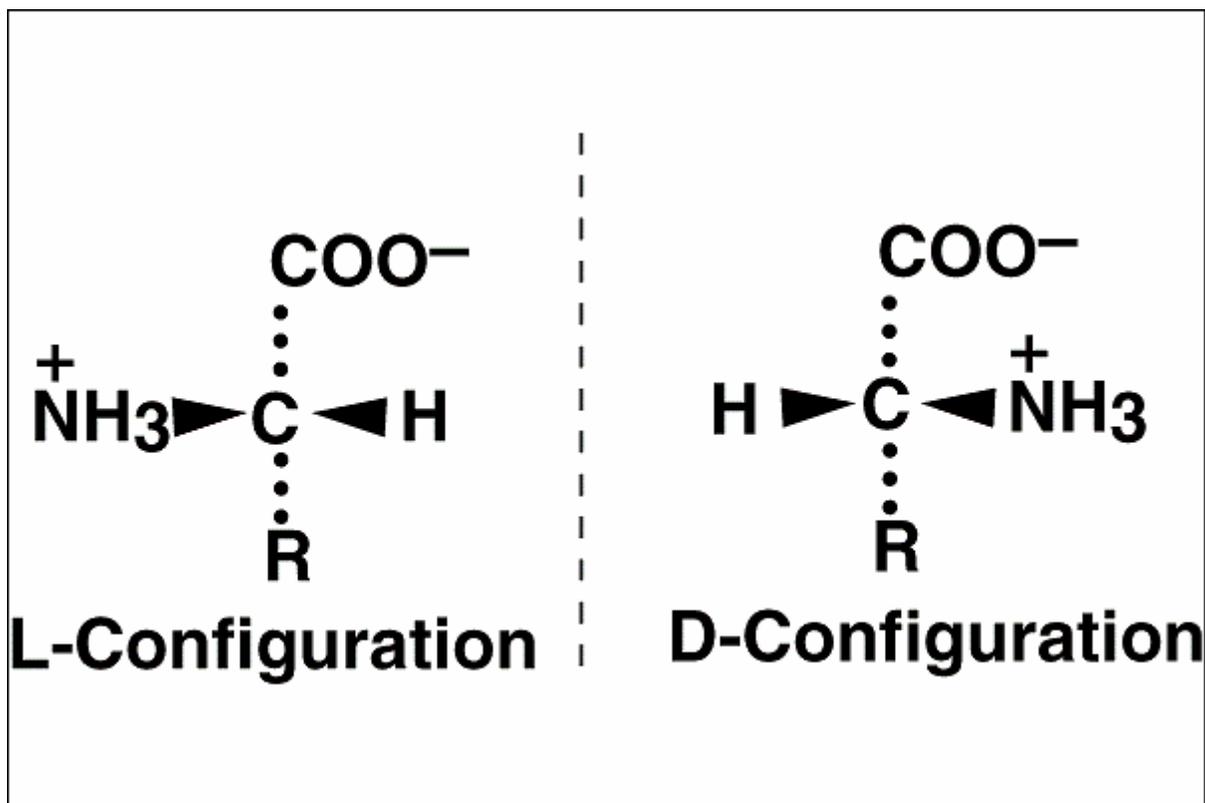
- Reacciones químicas
- Mecanismo de reacción:
 Sitio activo
- Biomoléculas con actividad catalítica
 Acticuerpos
- Enzimas inmovilidas



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.







Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

La **espectroscopía** es el estudio de las interacciones de la radiación electromagnética con átomos y moléculas. Estas interacciones, que incluyen absorción o emisión, son pruebas altamente sensibles de las estructuras atómicas y moleculares.

Dependiendo de la longitud de onda de la radiación absorbida o emitida, los métodos espectroscópicos se clasifican generalmente en:

Espectroscopía ultravioleta

Espectroscopía visible

Espectroscopía infrarroja.

Componentes del instrumento usado en espectroscopía.

La mayoría de los instrumentos espectroscópicos incluyen cinco componentes básicos:

- 1) Una fuente de energía radiante
- 2) Un selector de longitud de onda (selecciona una región del espectro para hacer la medición)
- 3) Uno o más compartimentos para la muestra
- 4) Un detector de radiación, (convierte la energía radiante en una señal medible, normalmente eléctrica)
- 5) Un sistema que procesa y lee la señal.

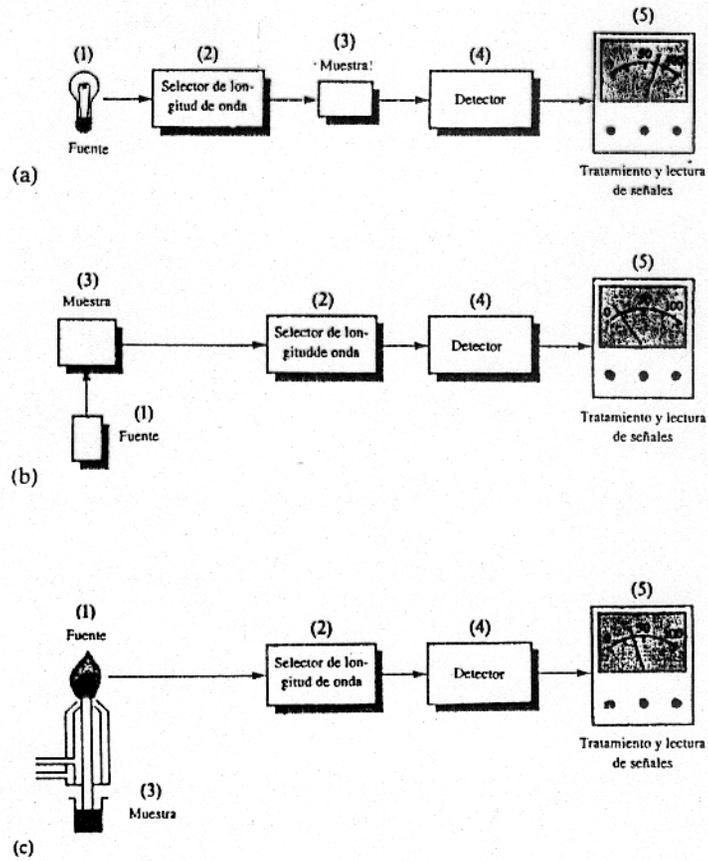


Figura 20-4
 Componentes de distintos tipos de instrumentos para espectroscopia óptica: a) espectroscopia de absorción; b) espectroscopia de fluorescencia y dispersión; c) espectroscopia de emisión.

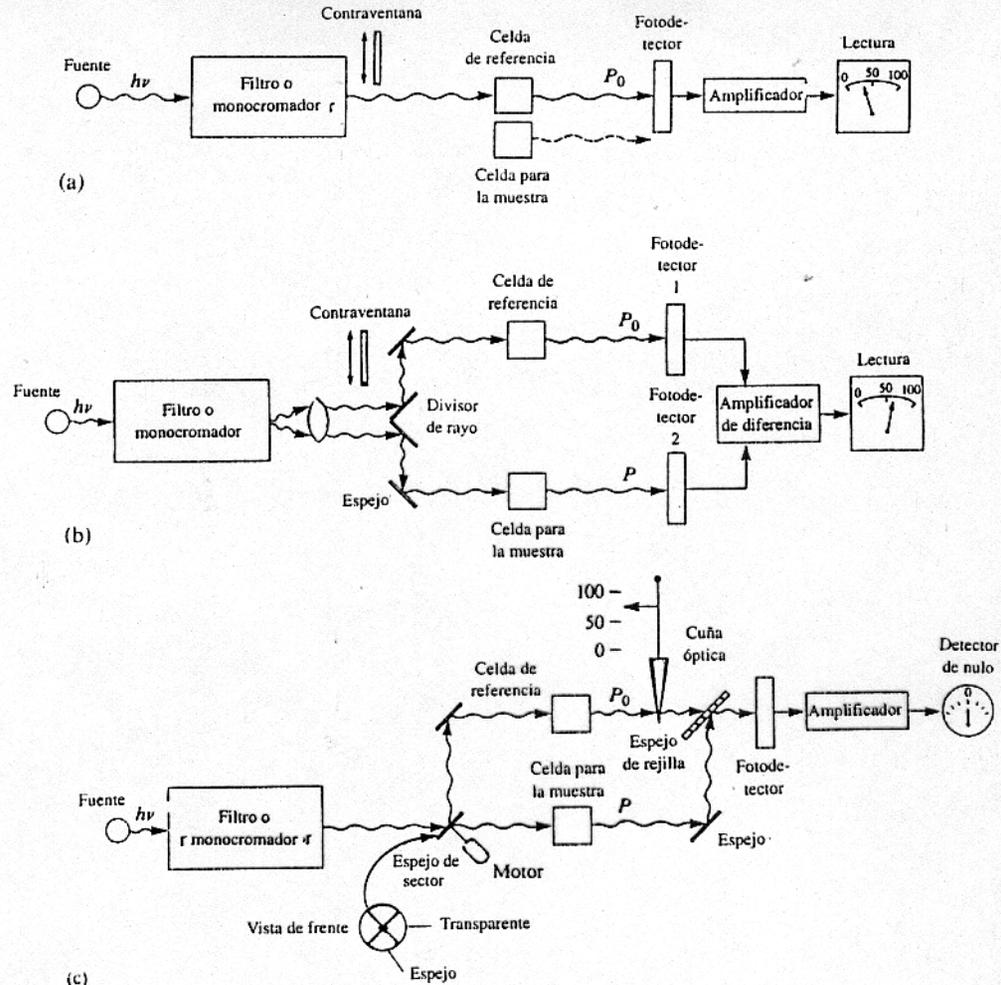
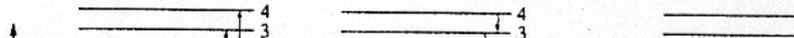


Figura 22-3
 Diseños de instrumentos para
 fotómetros y espectrofotómetros:
 (a) instrumento de haz sencillo;
 (b) instrumento de doble haz con
 haces separados en el espacio;
 (c) instrumento de haces separados
 en el tiempo.

a) Absorción
 molecular

(b) Relajación
 no radiante

c) Fluorescencia



Espectroscopía de absorción molecular.

Toda molécula es capaz de absorber ciertas longitudes de onda características de la radiación electromagnética. En este proceso, la energía de la radiación es transferida temporalmente a la molécula y, como consecuencia de esto disminuye la intensidad de la radiación.

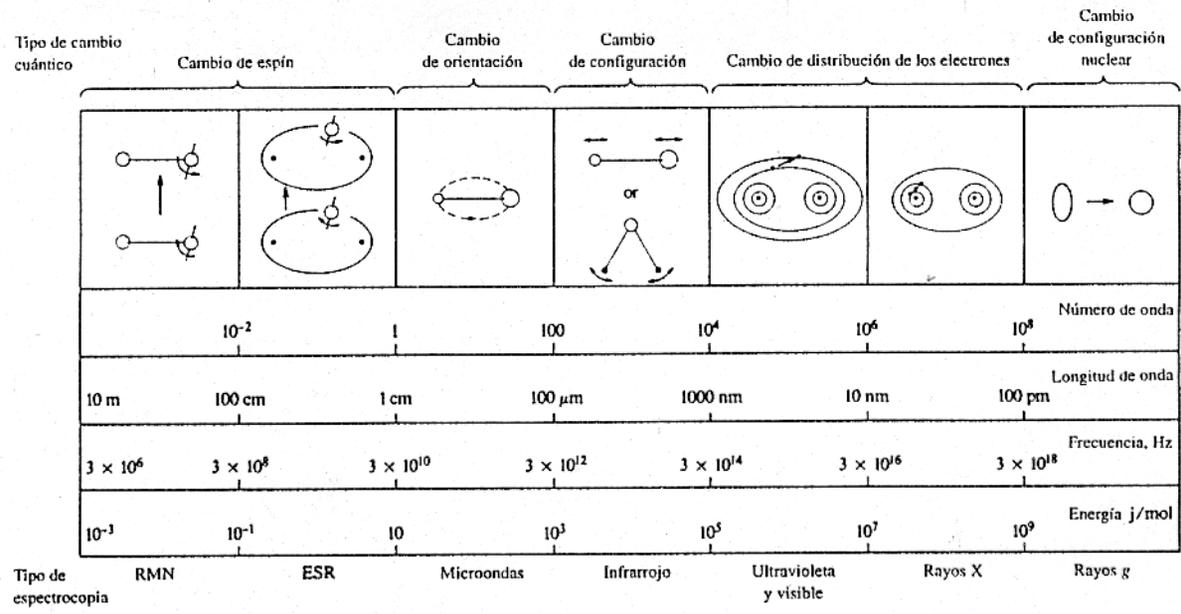


Figura 20-3
 Regiones del espectro
 electromagnético. (Tomado de C. N.
 Banwell, *Fundamentals of Molecular
 Spectroscopy*, 3a. ed., pág. 7,
 McGraw-Hill, Nueva York, 1983.)

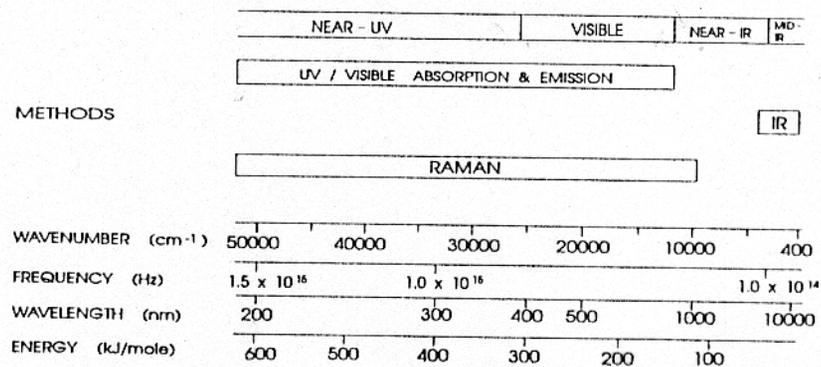


Fig. 1 Regions of the electromagnetic spectrum pertaining to methods of optical spectroscopy [ultraviolet (UV) and visible absorption and emission processes] and vibrational spectroscopy [infrared (IR) absorption and Raman scattering processes]. The corresponding ranges of wavenumber, frequency ($\text{Hz} = \text{sec}^{-1}$), wavelength, and energy are shown.

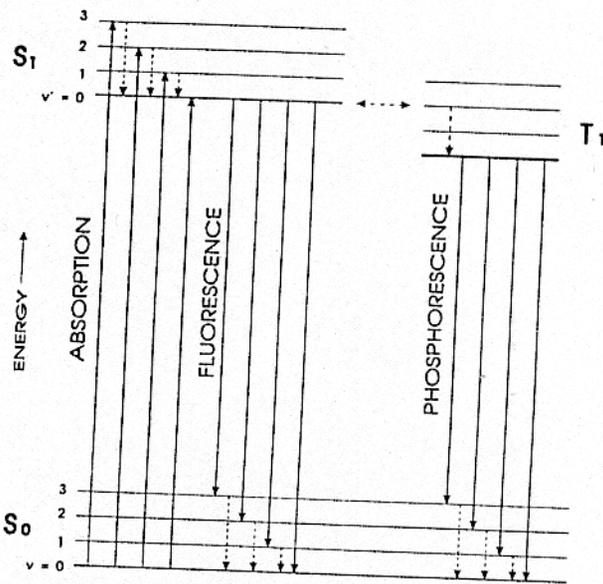


Fig. 2 Transitions of absorption and emission involving vibronic energy levels of a hypothetical molecule. Radiative and nonradiative transitions are denoted by solid and dashed lines, respectively. S_0 , Singlet ground electronic state; S_1 , singlet excited electronic state; T_1 , triplet excited electronic state; v , vibrational quantum numbers (0, 1, 2, 3, . . .) for sublevels of S_0 ; v' , vibrational quantum numbers (0, 1, 2, 3, . . .) for sublevels of S_1 .

eños de instrumentos para
 ímetros y espectrofotómetros:
 instrumento de haz sencillo;
 instrumento de doble haz con
 es separados en el espacio;
 instrumento de haces separados
 el tiempo.

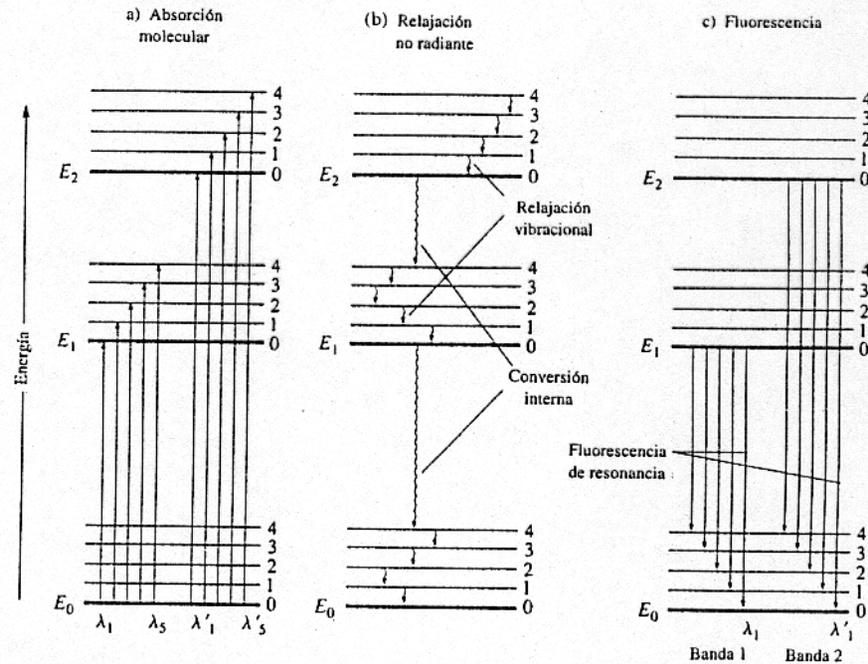


Figura 23-1
 Diagrama del nivel de energía que muestra parte de los cambios de energía que ocurren durante a) la absorción, b) la relajación no radiante y c) la fluorescencia por una especie molecular.

Transmitancia.

La transmitancia de una solución se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = P/P_0$$

Generalmente la transmitancia se expresa en porcentaje.

Absorbancia.

La absorbancia de una solución queda definida por la ecuación:

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} P_0/P$$

$$A = \log P_0/P = \log P_{\text{solvente}}/P_{\text{solución}}$$

Ley de Beer. Aplicaciones y limitaciones.

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia se relaciona linealmente con la concentración de la especie absorbente (c) y con la longitud de la trayectoria (b) del haz de luz:

$$A = abc$$

a es una constante de proporcionalidad denominada absortividad. Cuando la concentración c se expresa en moles por litro y la longitud en cm, la constante se denomina absortividad molar: ϵ , y tiene unidades de $L\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$.

La ley de Beer sólo describe adecuadamente el comportamiento de la absorción en soluciones diluidas.

Table I
Ultraviolet Absorption Characteristics of Amino Acid Residues^a

Amino acid	Absorption maxima		Absorption minima		Far-UV absorption		
	λ	ϵ_A	λ	ϵ_A	ϵ_{190}	ϵ_{197}	ϵ_{205}
Tryptophan	196.7	20.60	203.3	19.40	17.60	20.50	19.60
	218.0	46.70					
Tyrosine	192.5	47.5	208.0	4.88	42.80	35.50	5.60
	223.2	8.26					
Phenylalanine	187.7	59.60	202.5	8.96	54.50	12.30	9.36
	206.0	9.34					
Histidine	211.3	5.86	198.4	4.22	5.57	4.35	5.17
Cysteine					2.82	1.94	0.73
Half-cystine					3.25	1.76	1.05
Methionine					2.69	2.11	1.86
Arginine					13.1	6.61	1.36
Acids ^b					1.61	0.46	0.23
Amides ^c					6.38	2.06	0.40
Lysine					0.89	0.20	0.11
Leucine					0.67	0.19	0.10
Alanine					0.57	0.15	0.07
Proline					0.54	0.15	0.07
Serine					0.61	0.16	0.08
Threonine					0.75	0.18	0.10

^a Molar extinctions ($\epsilon \times 10^{-3} M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and wavelengths (nm) are from Fasman (1992). Data are evaluated at pH 7.

^b Aspartic acid or glutamic acid.

^c Asparagine or glutamine.

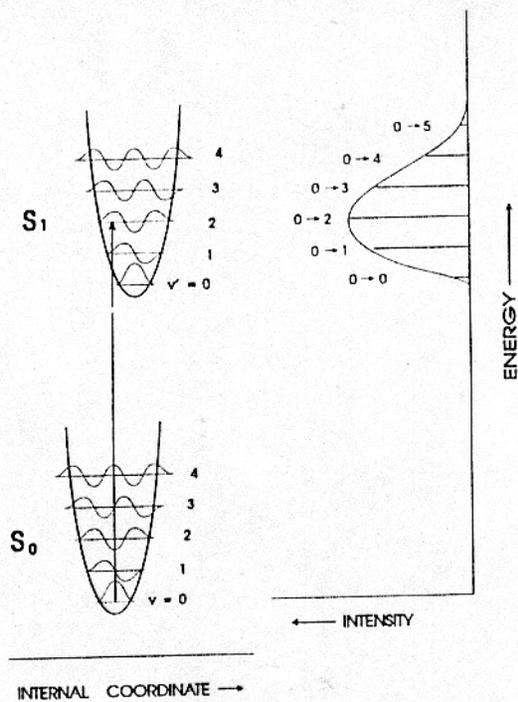


Fig. 3 Potential energy curves representing the ground (S_0) and excited (S_1) electronic states of a hypothetical molecule (left), and the profile of the corresponding absorption spectrum (right). Other notation is defined in Fig. 2. (See the Appendix.)

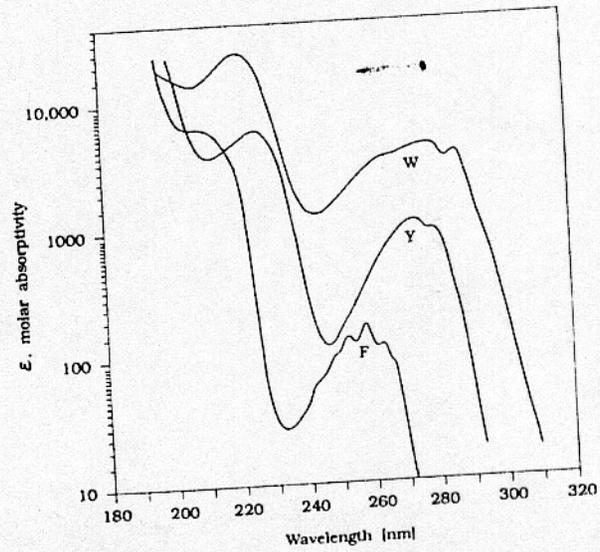


Fig. 4 Ultraviolet absorption spectra in the wavelength interval $190 < \lambda < 320$ nm of the aromatic amino acids, tryptophan (W), tyrosine (Y), and phenylalanine (F), at pH 6. The ordinate gives the molar extinction (ϵ) of each amino acid, which is equivalent to the absorbance of a 1 M solution in a 1-cm path length cell. (Note that ϵ is presented on a logarithmic scale, and thus the molar extinction of W at 280 nm is roughly five times greater than that of Y, and many orders of magnitude greater than that of F.) Adapted from Wetlaufer (1962).

Teoría de la Absorción Molecular.

Las especies moleculares tienen un número limitado de niveles de energía, siendo el nivel más bajo de energía el **estado fundamental**.

En equilibrio térmico, casi el 100% de las moléculas se encuentran en el estado fundamental, puesto que existe una gran diferencia de energía entre el **estado fundamental** y el **estado electrónico excitado** (105 – 106 J/mol).

Cuando un fotón de radiación pasa cerca de una molécula es probable que se produzca su absorción, solo si la energía de éste coincide exactamente con la diferencia de energía existente entre el estado fundamental y el estado de energía superior: **estado excitado**.

Luego de un tiempo breve (10^{-8} a 10^{-9} seg), y la especie se relaja volviendo a su estado basal, cediendo el exceso de energía a otros átomos o moléculas del medio:

Proceso no radiante

Reemisión de radiación: **Fluorescencia**



M especie en estado basal

M^* especie en estado excitado



Tipos de transiciones moleculares.

Las moléculas experimentan tres tipos de transiciones cuando absorben radiación ultravioleta (UV), visible (VIS) o infrarroja (IR):

Transición electrónica.

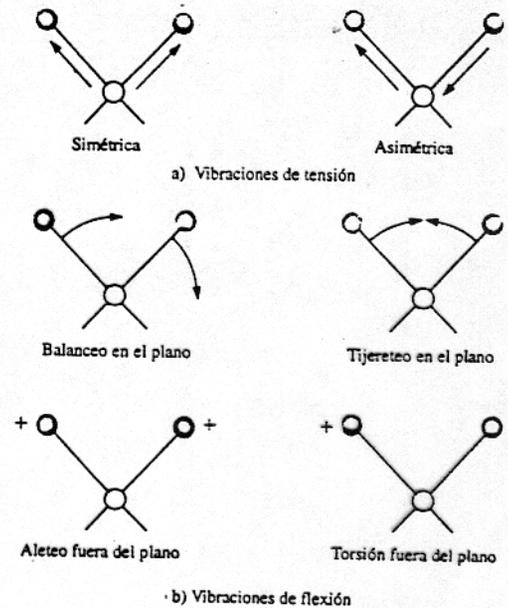
Transiciones vibracionales

Transiciones rotacionales.

La energía total asociada a un orbital de una molécula está dada por:

$$E = E \text{ electrónica} + E \text{ vibracional} + E \text{ rotacional}$$

Figura 21-8
Tipos de vibraciones moleculares. El signo + indica el movimiento del plano de la página hacia el lector; el signo - indica el movimiento del plano de la página alejándose del lector.



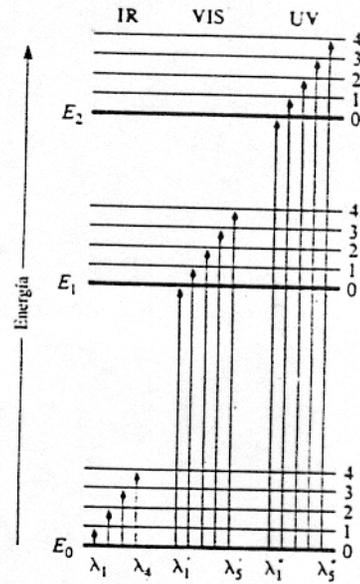


Figura 21-9

Diagrama parcial de los niveles de energía en el que se muestran algunos de los cambios de energía que se producen durante la absorción de la radiación infrarroja (IR), visible (VIS) y ultravioleta (UV). Obsérvese que con algunas moléculas, la transición desde E_0 hasta E_1 y E_2 puede necesitar radiación UV de distintas longitudes de onda. Para otras moléculas, las transiciones hasta E_1 y E_2 se pueden producir por absorción de radiación visible.

Absorción Infrarroja.

Todas las moléculas orgánicas absorben la radiación IR.

La espectroscopía IR es uno de los métodos analíticos más utilizados.

La absorción IR implica transiciones entre niveles de energía vibracional asociados con el más bajo estado electrónico excitado de las moléculas.

El número de vibraciones posibles de una molécula se relaciona con el número de enlaces que contiene y por tanto con el número de átomos que la conforman.

El número de vibraciones es grande, aún para la molécula más simple, con distintos niveles de energía.

La absorción IR ocurre no sólo con moléculas orgánicas, sino también con compuestos inorgánicos sencillos (CO_2 , CO , H_2S , SO_2), así como con distintos tipos de complejos metálicos unidos covalentemente.

Absorción de la radiación UV y VIS

La longitud de onda a la que absorbe una molécula orgánica depende de la fuerza con que están unidos sus distintos electrones.

Los electrones compartidos en enlaces simples como C-C o C-H están unidos tan fuertemente, que la absorción ocurre sólo en la región UV del espectro ($\lambda < 180$ nm). En esta región también absorben los componentes del aire, por lo cual ésta no es una región útil para hacer mediciones.

Los electrones que participan en enlaces dobles y triples no están unidos tan fuertemente, y por lo tanto, pueden ser más fácilmente excitados por la radiación. Presentan picos de absorción en la región UV ($\lambda > 180$ nm).

Los grupos funcionales orgánicos insaturados que absorben en las regiones UV o VIS se denominan *cromóforos*.

Los electrones no compartidos en elementos como **S**, **Br** y **I** están retenidos menos fuertemente que los electrones compartidos en un enlace saturado. Moléculas orgánicas que contienen estos elementos normalmente presentan bandas de absorción útiles en la región UV.

Absorción de la radiación UV y VIS.

Las moléculas absorben radiación visible de forma tal que promueven a los electrones a los niveles vibracionales del estado electrónico excitado (E1). Para promover los electrones a estados electrónicos excitados superiores (E2), se requiere una radiación de mayor energía, como la radiación UV.

Los electrones que contribuyen a la absorción de la radiación UV y VIS por las moléculas orgánicas son:

- 1) Los electrones compartidos que participan directamente en la formación
- 2) del enlace entre átomos y que además están asociados a más de un átomo, y
- 3) Los electrones no compartidos o externos que están localizados principalmente alrededor de átomos como el oxígeno, los halógenos, el azufre y el nitrógeno.

Absorción de la radiación UV y VIS.

Las características de absorción de una molécula dependen del estado en que se encuentre y del solvente en que se encuentre disuelta.

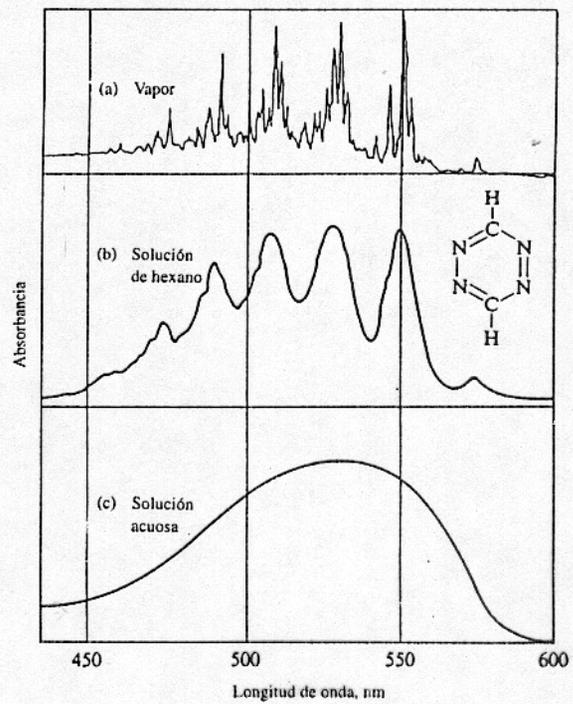
Estado gaseoso, las moléculas se encuentran lo suficientemente separadas para poder rotar y vibrar libremente; por eso se observan una gran cantidad de picos de absorción.

En solución, estado condensado, la libertad de rotación se limita enormemente, por lo que se borran las líneas debidas a las diferencias en los niveles de energía rotacional.

En presencia del solvente, las energías de los distintos niveles vibracionales se modifican de una manera irregular.

Ejemplo, en presencia de hexano se aprecian sólo los picos que corresponden a las transiciones electrónicas. En un solvente polar, agua, los picos electrónicos se mezclan dando un espectro en forma de un pico suave y ancho.

Figura 21-10
Espectros de absorción ultravioleta
comunes. El compuesto es 1,2,4,5-
tetrazina. (De S. F. Mason, *J. Chem.*
Soc., 1959, 1 265. Con autorización.)



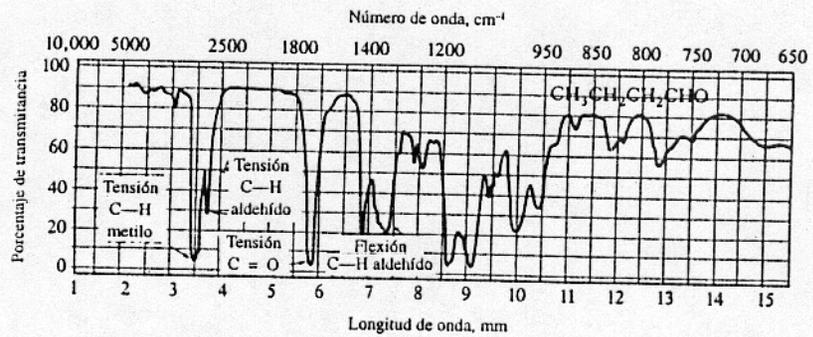


Figura 21-15
Espectro infrarrojo de *n*-butanal (*n*-butiraldehído). Obsérvese que en las ordenadas hay transmitancia en vez de absorbancia.

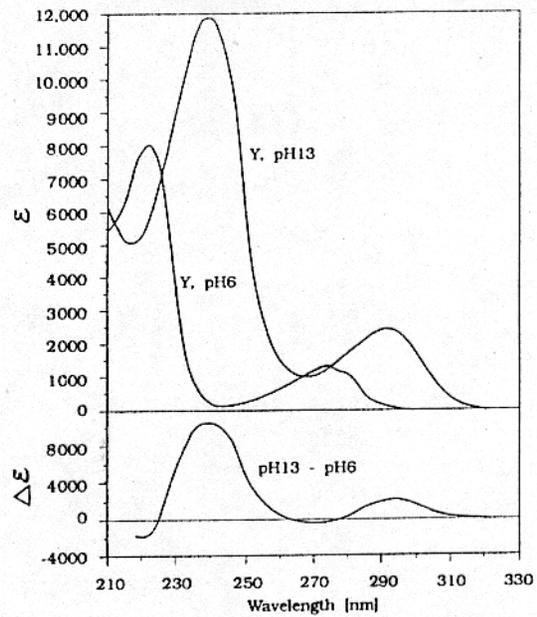


Fig. 5 Ultraviolet absorption spectra in the wavelength interval $210 < \lambda < 330$ nm of tyrosine (Y) at pH 6 and the tyrosinate anion at pH 13. The bottom trace shows the difference in absorption spectra. Note the very large increase in absorbance near 240 nm on deprotonation of the phenolic OH group and the near invariance of the spectrum to deprotonation in the region 265–275 nm. Adapted from Wetlaufer (1962).

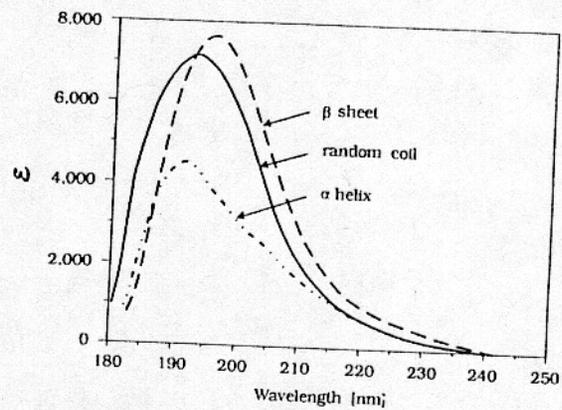


Fig. 6 Ultraviolet absorption spectra in the wavelength interval $180 < \lambda < 250$ nm of poly(L-lysine) in β -sheet (pH 10.8, 52°C), random coil (pH 6, 25°C), and α -helix (pH 10.8, 25°C) conformations. Adapted from Wetlaufer (1962), attributed to Rosenheck and Doty (1961).

Franz X. Schmid

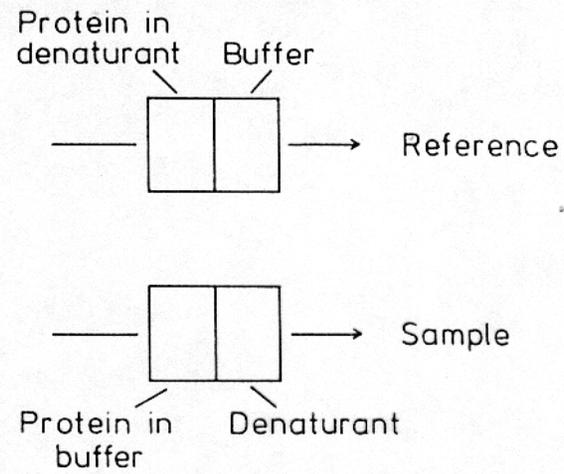


Figure 6. Tandem cell arrangement to measure difference spectra.

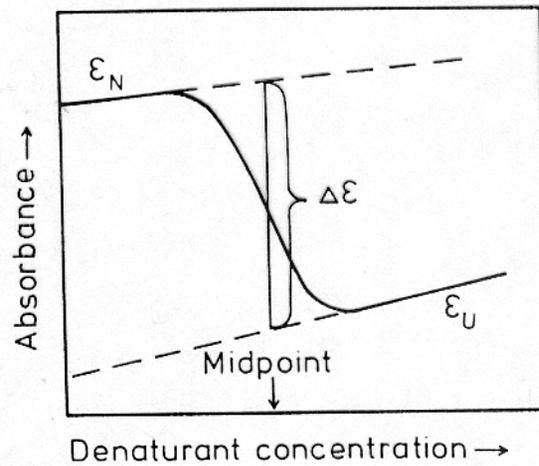


Figure 7. Sketch of a protein unfolding transition, as measured by UV difference spectroscopy. ϵ_N and ϵ_U are the absorbances of the native and the denatured form, respectively, which both depend on the concentration of denaturant. $\Delta\epsilon$ is the molar change in absorbance, observed at the midpoint of the transition; it is greater than ϵ (0 M denaturant) - ϵ (6 M denaturant).

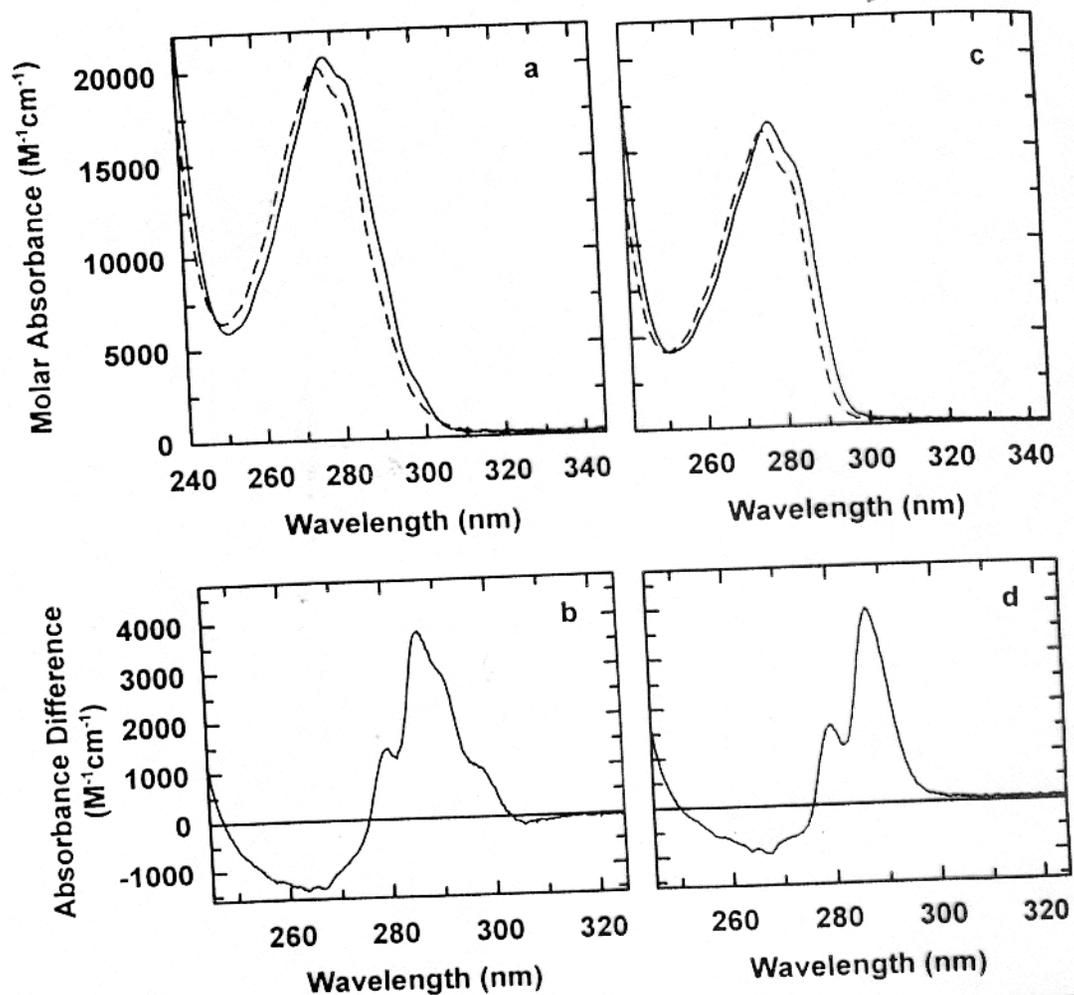
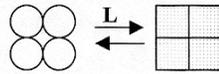
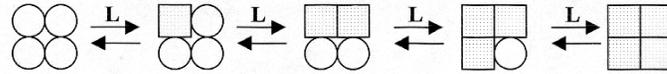


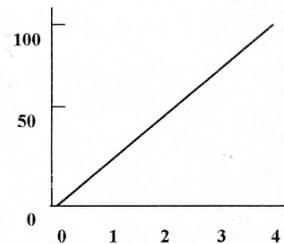
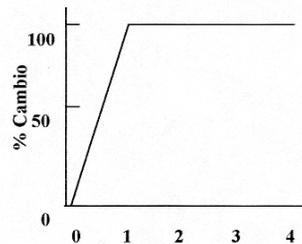
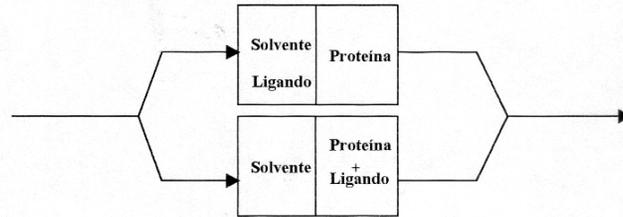
Figure 2. Ultraviolet absorbance spectra of (a) the wild-type form and (c) the Trp59Tyr variant of RNase T1. The spectra of the native proteins (in 0.1 M sodium acetate pH 5.0) are shown by the continuous lines. The spectra of the unfolded proteins (in 6.0 M GdmCl in the same buffer) are shown by broken lines. The difference spectra between the native and unfolded forms are shown in (b) and (d). Spectra of 15 μ M protein samples were measured at 25°C in 1 cm cuvettes in a double-beam instrument with a band width of 1 nm at 25°C. The spectra of the native and unfolded proteins were recorded successively, stored and subtracted.



Modelo Concertado



Modelo Secuencial



Moles de ligando/mol Proteína

Espectroscopía de Fluorescencia.

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado basal, liberando su exceso de energía como fotones.

Ya que en el estado excitado parte de la energía siempre se pierde en procesos no radiantes (transiciones vibracionales), la luz emitida es siempre menor que la luz absorbida, y la fluorescencia de un cromóforo ocurre a una longitud de onda mas larga que su absorbancia.

La emisión fluorescente es mucho más sensible que la absorción de luz a los cambios del ambiente. Un amplio rango de interacciones o perturbaciones pueden afectar este estado y por consiguiente el espectro de emisión. Otro factor a considerar en la fluorescencia es la transferencia de energía entre residuos

Espectroscopía de Fluorescencia.

Las ventajas principales de este método son:

- a) su sensibilidad, uno o dos órdenes de magnitud mayor que la espectroscopía de absorción, y
- b) los grandes intervalos lineales, los cuales son mayores que la espectroscopía de absorción.

Normalmente, el tiempo de vida de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su nivel basal.

- Relajamiento no radiante y
- Relajación fluorescente.

Relajación no radiante

Colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del solvente.

En estas colisiones, el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas de solvente: pequeño incremento de la temperatura.

La relajación vibracional es un proceso eficiente. El tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de aproximadamente 10-15 s.

Fluorescencia.

Las moléculas electrónicamente excitadas se pueden relajar a cualquier estado vibracional del estado electrónico basal.

Las bandas de fluorescencia están formadas por bandas de longitud de onda mas larga, (menor energía) que la banda de radiación de excitación:

corrimiento de Stokes.

La fluorescencia es uno de los mecanismos mediante los cuales una molécula vuelve al estado basal después de que ha sido excitado.

Todas las moléculas tienen el potencial para fluorescer. La mayoría no lo hace porque su estructura proporciona vías no radiantes por las cuales puede ocurrir la relajación a una velocidad mayor que la emisión fluorescente.

El rendimiento de cuantos de fluorescencia molecular (Φ) corresponde a la proporción del número de moléculas que fluorescen en relación al número total de moléculas excitadas.

$$\Phi = R_f / R_f + R_r$$

R_f , relajación fluorescente
 R_r , relajación no radiante

Fluorescencia y estructura.

Los compuestos que tienen anillos aromáticos fluorescen, y su eficiencia cuántica aumenta con el número de anillo y su grado de condensación.

La fluorescencia se ve particularmente favorecida por la rigidez de la molécula. La rigidez de la molécula disminuye la velocidad de la radiación no radiante al punto en el cual la relajación por fluorescencia tiene el tiempo suficiente para ocurrir.

En la mayoría de las moléculas la eficiencia cuántica de la fluorescencia disminuye

Con el aumento de la temperatura,
Una disminución de la viscosidad del solvente.

En ambos casos hay aumento de frecuencia de las colisiones.

La energía de la radiación fluorescente es proporcional a la energía de excitación absorbido por el sistema y proporcional a la concentración de la especie emisora, a concentraciones bajas.

Cuando la concentración aumenta (absorbancia > 0.05 , o $T < 90\%$) se pierde la linealidad, quedando la fluorescencia bajo la línea recta: hay **autoapagamiento**. Las moléculas de la especie fluorescente absorben la radiación producida por otras moléculas de la misma especie.

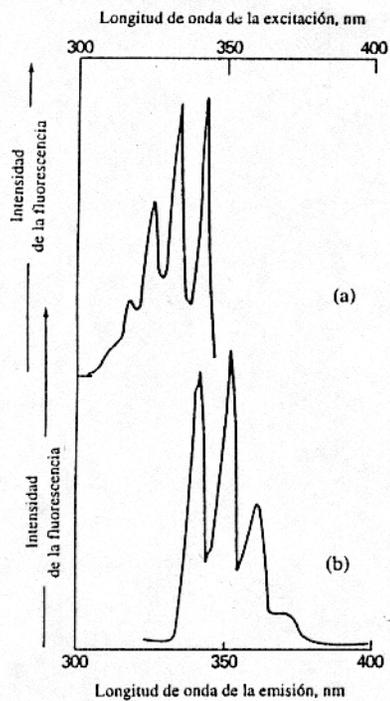


Figura 23-2
Espectro de fluorescencia para 1 ppm de antraceno en alcohol: (a) espectro de excitación; (b) espectro de emisión.

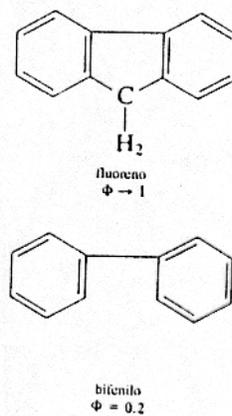


Figura 23-5
Efecto de la rigidez sobre el rendimiento cuántico.

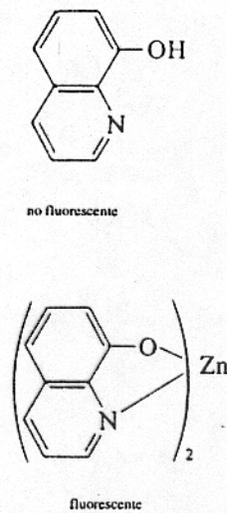
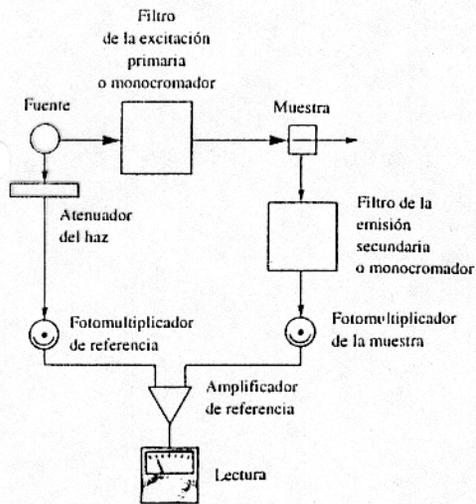


Figura 23-6
Efecto de la rigidez sobre la fluorescencia.



Figuras 23-8
Componentes de un fluorómetro
o de un espectrofluorómetro.

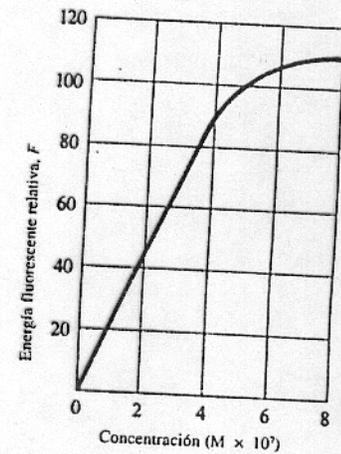


Figura 23-7
Curva de calibración para la
determinación espectrofluorométrica
de triptofano en proteínas solubles del
cristalino de un ojo de mamífero.

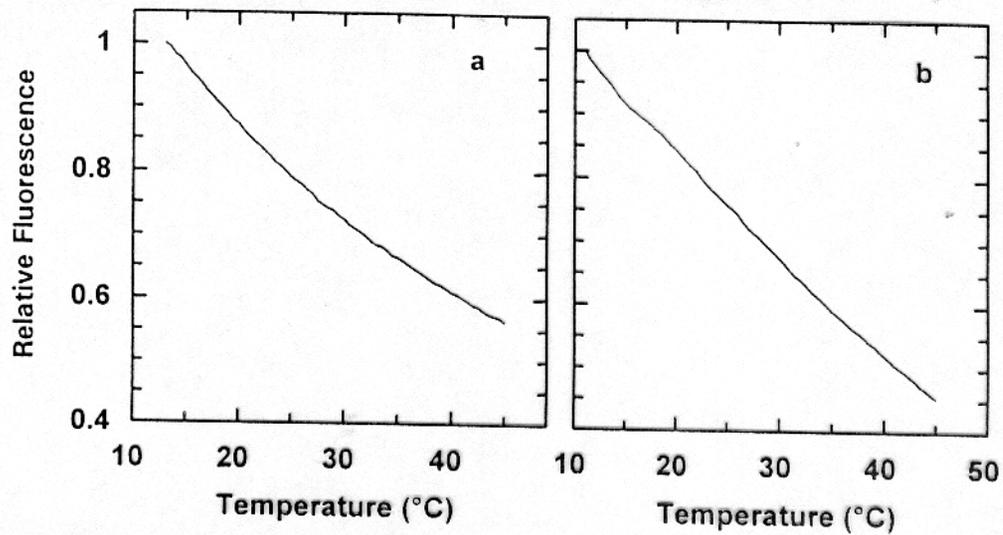


Figure 11. Dependence on temperature of the relative fluorescence of (a) tyrosine (6 μM) at 303 nm (excitation at 274 nm) and of (b) tryptophan (1 μM) at 355 nm (excitation at 278 nm). The free amino acids were in 0.01 M potassium phosphate pH 7.0. Spectra were recorded as described in *Figure 9*.

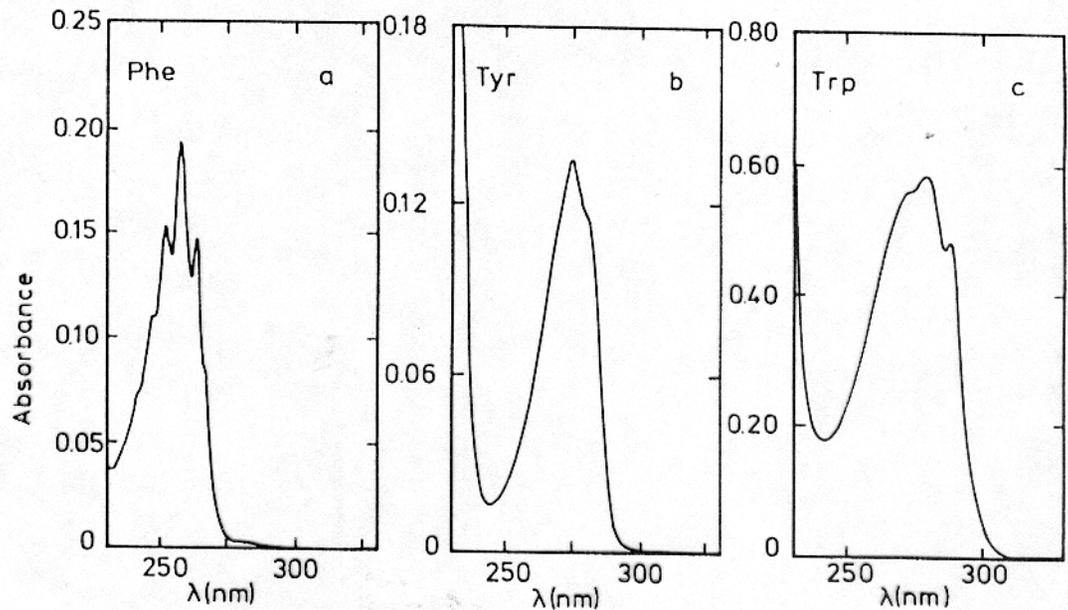


Figure 1. Ultraviolet absorbance spectra of the aromatic amino acids in a 1 cm cell in 0.01 M potassium phosphate buffer pH 7.0 25°C. (a) 1 mM phenylalanine; (b) 0.1 mM tyrosine; (c) 0.1 mM tryptophan.

Table 1. Absorbance and fluorescence properties of the aromatic amino acids^a

Amino acid	Absorbance		Fluorescence		Sensitivity
	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	φ_F^b	$\epsilon_{\max} \times \varphi_F^b$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Tryptophan	280	5600	355	0.13	730
Tyrosine	275	1400	304	0.14	200
Phenylalanine	258	200	282	0.02	4

^a In water at neutral pH; data are from ref. 10.

^b φ_F , Fluorescence quantum yield.

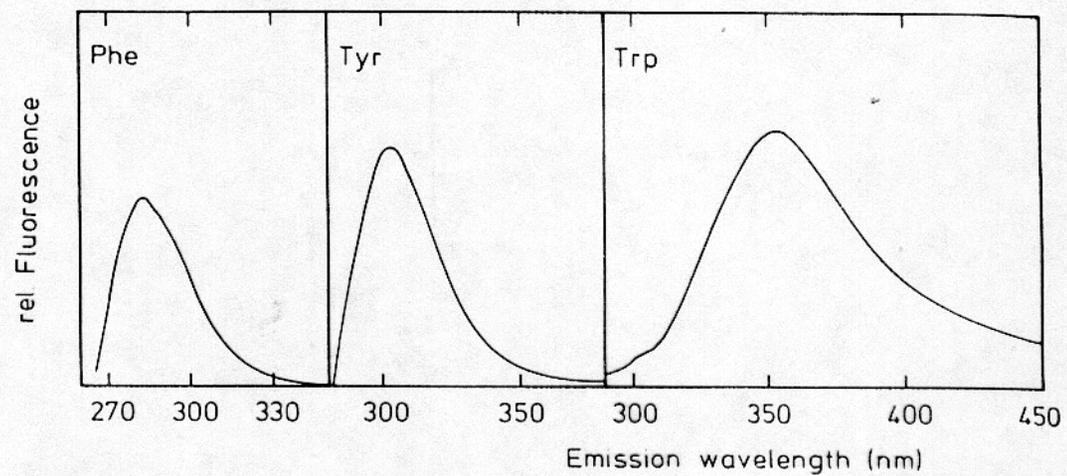


Figure 8. Fluorescence spectra of the aromatic amino acids in 0.01 M potassium phosphate buffer pH 7.0 at 25°C. For the measurements, 100 μM phenylalanine, 6 μM tyrosine, and 1 μM tryptophan were used, with excitation at 257 nm, 274 nm, and 278 nm, respectively.

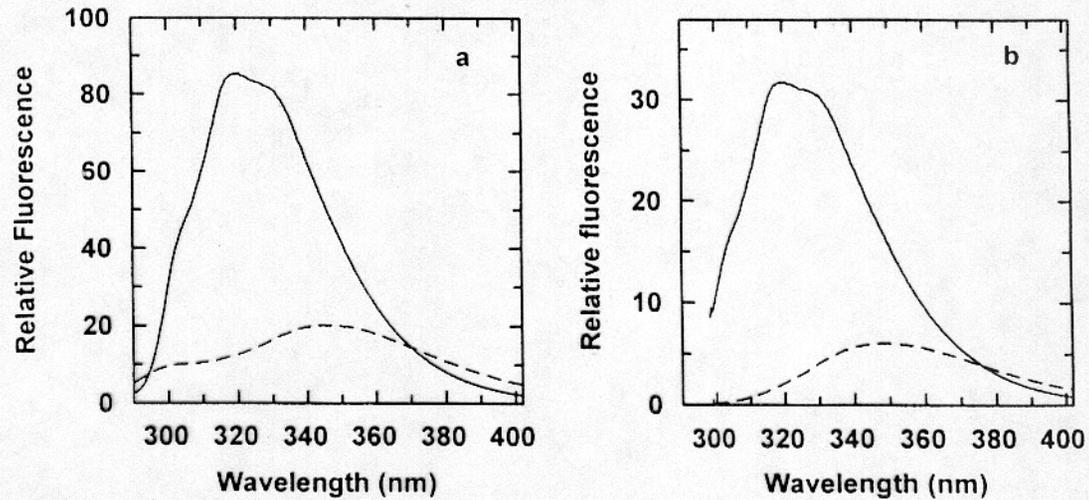


Figure 9. Fluorescence emission spectra of native (—) and unfolded (---) RNase T1. Native RNase T1 (1.4 μ M) was in 0.1 M sodium acetate pH 5.0; the sample of unfolded protein contained 6.0 M GdmCl in addition. Fluorescence was excited at (a) 278 nm and (b) 295 nm. The band widths were 3 nm for excitation and 5 nm for emission. Spectra were recorded at 25°C in 1 \times 1 cm cells in a Hitachi F-4010 fluorimeter.

Ventajas:

Su sensibilidad es uno o dos órdenes de magnitud mayor que la espectroscopía de absorción.

Intensidad de Fluorescencia:

$$F = P_o \Phi a b c$$

Φ rendimiento cuántico de fluorescencia

Se puede aumentar la intensidad aumentando P_o , con lo cual se aumenta la sensibilidad.

Absorbancia:

$$A = \log(P_o/P)$$

$$A = abc$$

$$c = k \log(P_o/P)$$

$$k = 1/ab$$

Al aumentar P_o aumenta también P , por lo tanto no aumenta la sensibilidad.

Ventajas y desventajas de la espectroscopía electrónica.

Ventajas

1. La absorción y emisión de luz por los cromóforos de las proteínas es muy intensa. Los aminoácidos aromáticos tienen coeficientes de extinción relativamente altos.
2. Grupos prostéticos presentes en muchas proteínas como cofactores absorben fuertemente en UV y VIS.
3. Se pueden detectar concentraciones muy pequeñas de moléculas orgánicas.
4. El agua es transparente a radiación UV y VIS. Se pueden analizar las moléculas biológicas en soluciones acuosas sin interferencia del solvente.
5. La transición entre dos estados electrónicos que acompaña la absorción UV y VIS ocurre en una escala de tiempo muy breve (10-15 sec). Un gran número de procesos biológicos pueden ser analizados por espectroscopía electrónica.

Desventajas.

1. Generalmente no se obtiene una información detallada de la estructura de la molécula.
2. La fluorescencia es muy sensible para analizar cambios estructurales de macromoléculas, pero su intensidad es afectada por la temperatura. No sirve para estudiar cambios dependientes de temperatura.
3. Debido a la sensibilidad de la espectroscopía de absorción UV y VIS, la muestra debe tener una pureza muy alta.