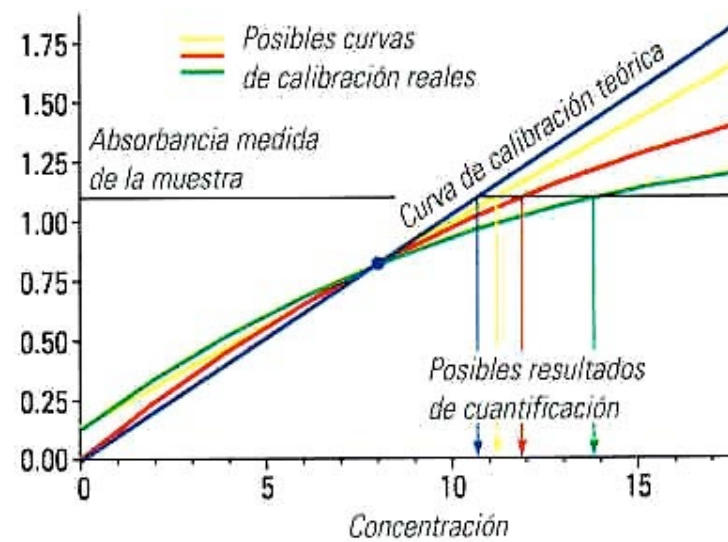


Métodos Espectroscópicos y Curva Patrón

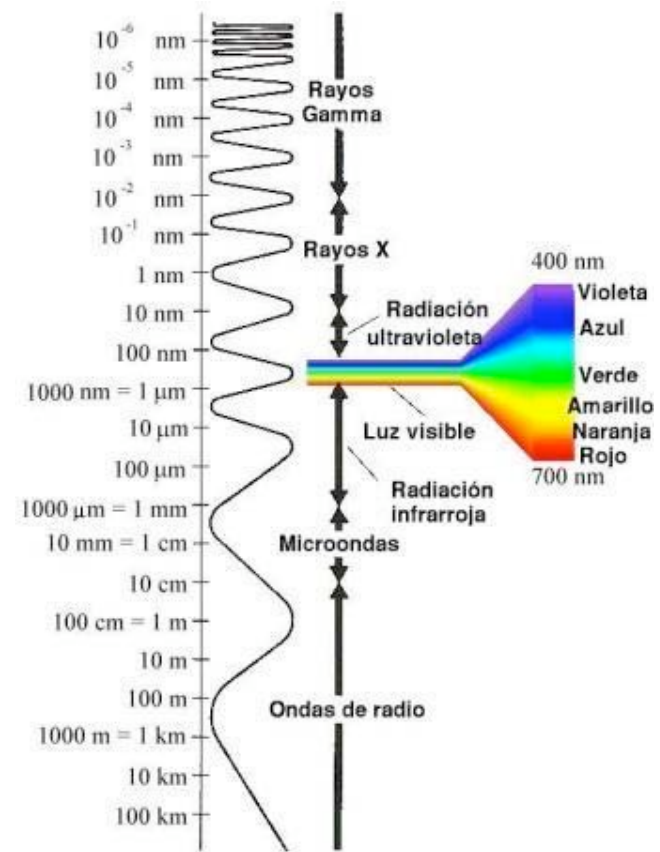


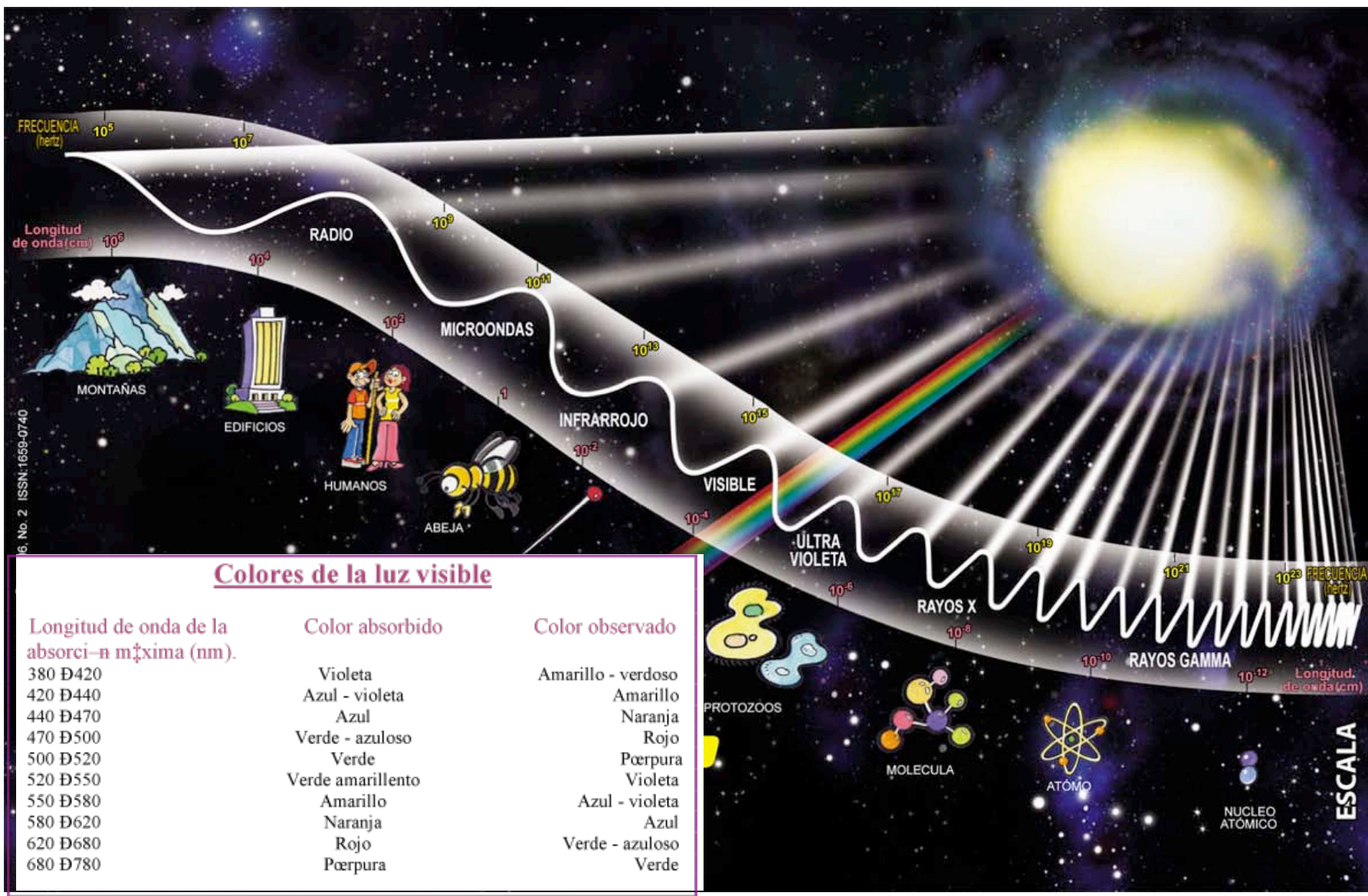
Objetivos

- Aplicar un método espectrofotométrico para medir la concentración de una proteína.
- Conocer el manejo de micropipetas y espectrofotómetros.
- Construir curvas de calibración y comprender su importancia

Espectrofotometría

Son métodos, cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y según sea la radiación utilizada como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja.





Colores de la luz visible

Longitud de onda de la absorción máxima (nm).

380 ÷ 420
 420 ÷ 440
 440 ÷ 470
 470 ÷ 500
 500 ÷ 520
 520 ÷ 550
 550 ÷ 580
 580 ÷ 620
 620 ÷ 680
 680 ÷ 780

Color absorbido

Violeta
 Azul - violeta
 Azul
 Verde - azulado
 Verde
 Verde amarillento
 Amarillo
 Naranja
 Rojo
 Púrpura

Color observado

Amarillo - verdoso
 Amarillo
 Naranja
 Rojo
 Púrpura
 Violeta
 Azul - violeta
 Azul
 Verde - azulado
 Verde

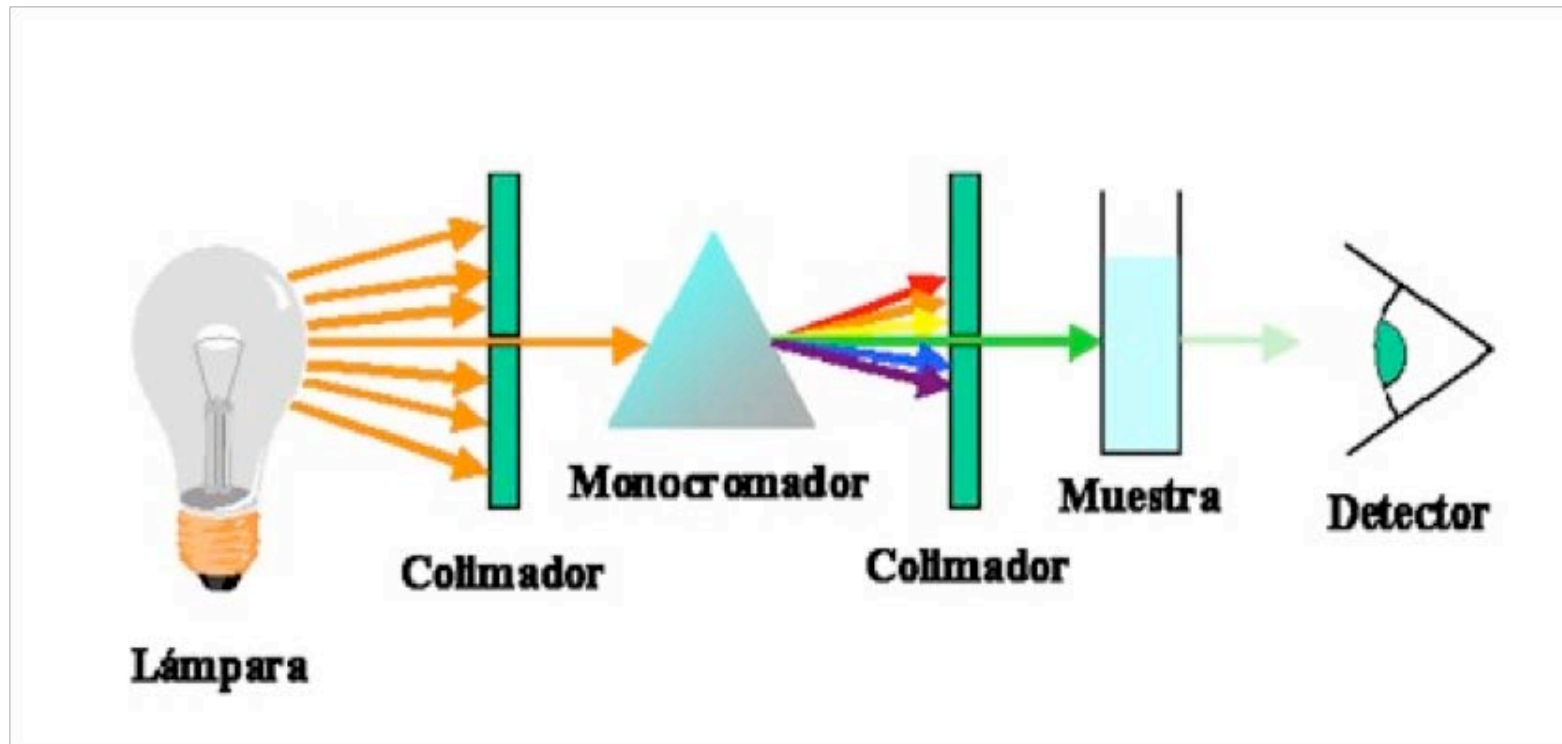
6. No. 2 ISSN: 1659-0740

ESCALA



RADIACIÓN	EFEECTO	TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA	INFORMACIÓN OBTENIDA
<i>UV-Visible</i>	Transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y moleculares	Espectroscopía ultravioleta-visible	Existencia de cromóforos y/o conjugación en la molécula a partir de las absorciones observadas.
<i>Infrarrojo</i>	Deformación de los enlaces químicos. Vibración molecular	Espectroscopía infrarroja	Grupos funcionales a partir de las absorciones observadas.
<i>Radiofrecuencias</i>	Transiciones de espín electrónico o nuclear en los átomos de la molécula.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	Grupos funcionales, subestructuras, conectividades, estereoquímica, etc... a partir de datos de desplazamiento químico, áreas de los picos y constantes de acoplamiento observadas.

Espectrofotómetro



Tungsteno (visible)
Deuterio
(UV)

Ley de Lambert y Beer

Establece que la absorbancia es proporcional al número de moléculas absorbentes por las que pasa la luz.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbancia

c = concentración

l = longitud de la celda

ε = coeficiente de extinción o absorptividad molar · ?

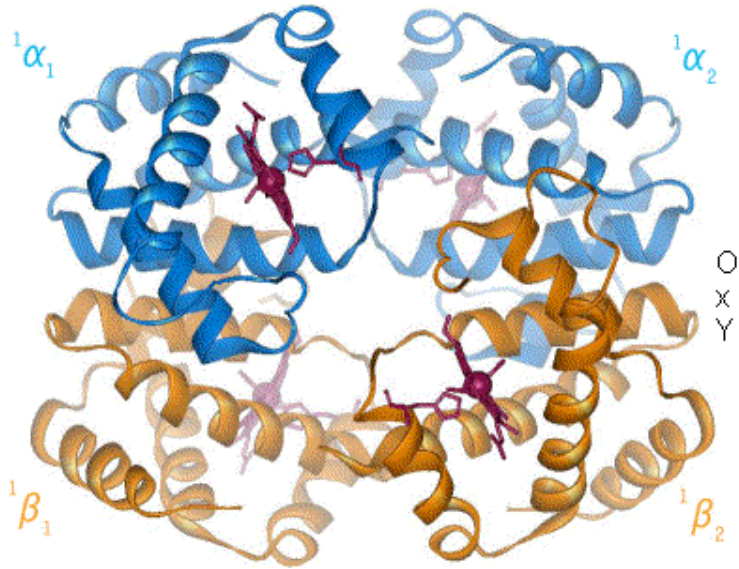
Coeficiente de extinción o absorptividad molar

Es una propiedad intrínseca de los compuestos. Es una medida de absorción de luz de las especies químicas a una determinada longitud de onda

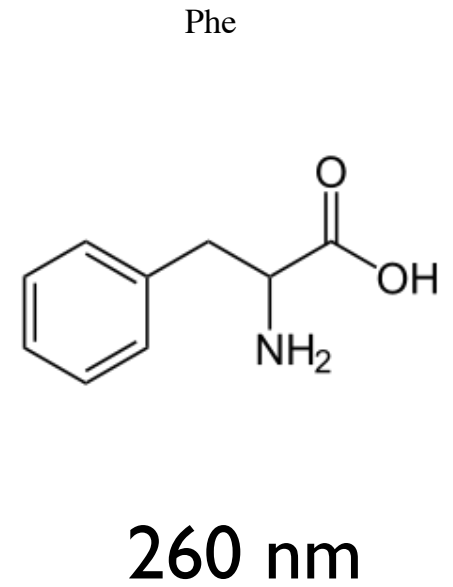
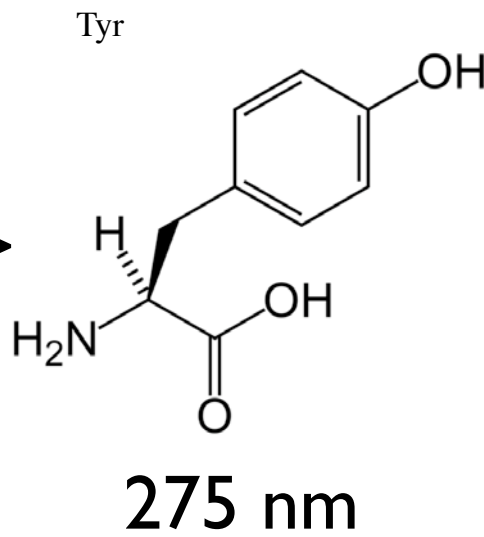
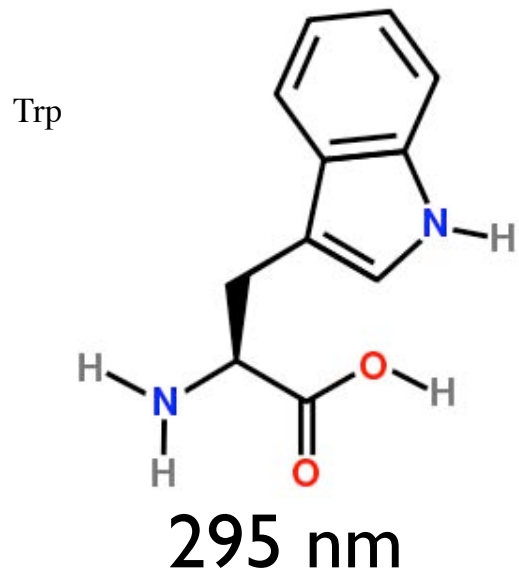
Unidades

$$\epsilon = \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

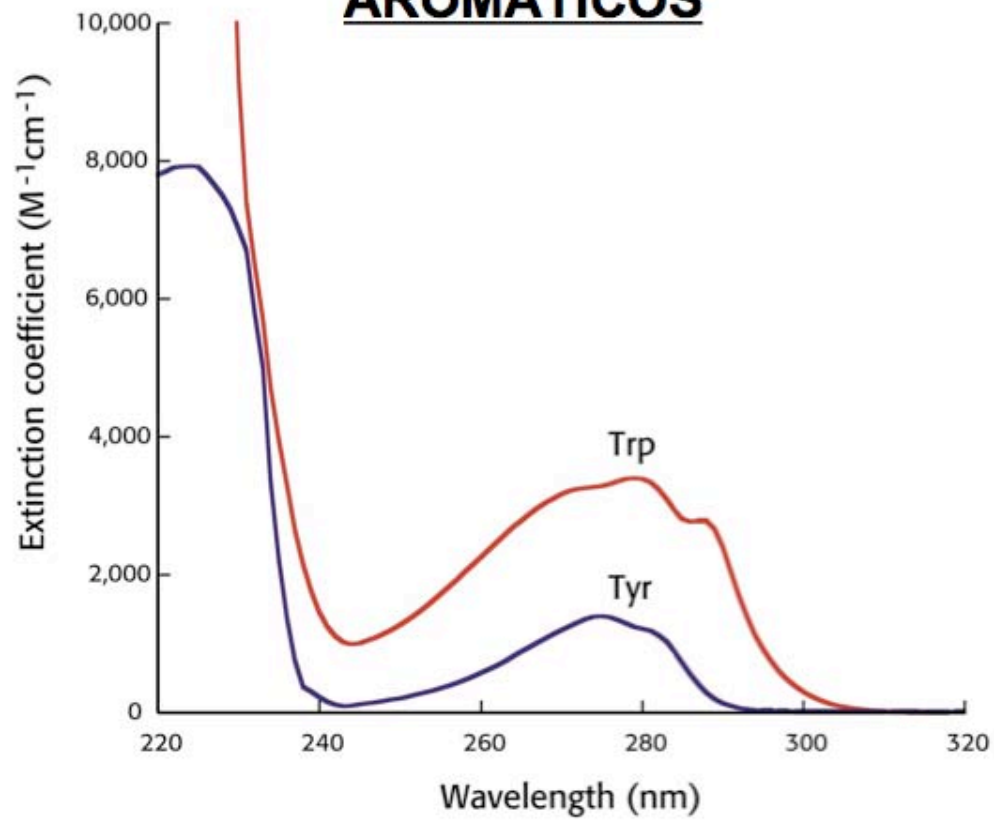
Proteínas



Son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.



ABSORCIÓN DE LA LUZ POR LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS



Determinación de la concentración de Proteína

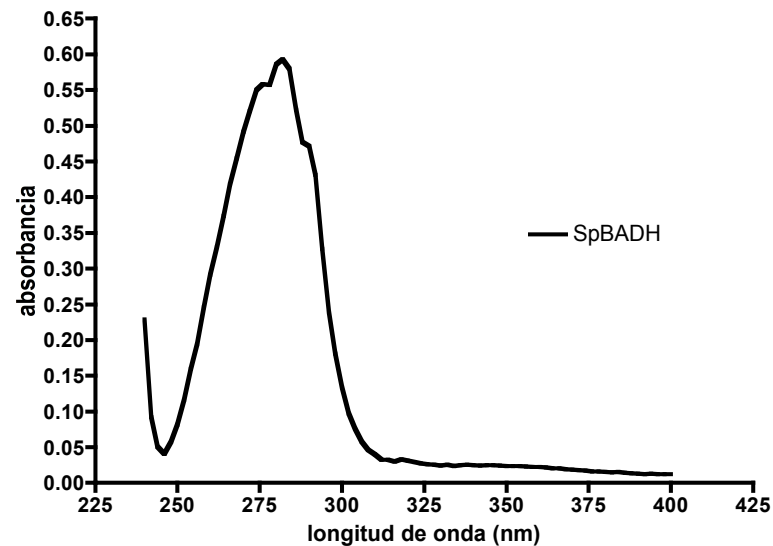
Existen diversos métodos que permiten cuantificar la concentración de proteína presente en las muestras biológicas, basados en las propiedades que muestran las proteínas en solución.

Los métodos más usuales son:

- Absorción en el ultravioleta.**
- Reacción del Biuret.**
- Método de Lowry.**
- Método de Bradford.**
- Método del ácido Bicincónico.**

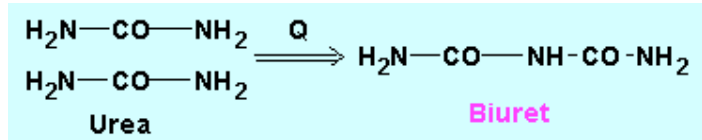
Absorción en el ultravioleta

- Las proteínas poseen una banda de absorción a 280 nm como consecuencia de la absorción de los residuos de tirosilo y triptofanilo en esta región del espectro.
- Es un método no destructivo.
- El rango de concentración que se puede determinar depende del contenido de los aminoácidos Tyr y Trp, y oscila entre 0,05 y 2 mg/ml.
- La presencia de sustancias absorbentes a 280 nm conduce a interferencias.



Método de Biuret

El nombre de la reacción procede del compuesto coloreado formado por la condensación de dos moléculas de urea con eliminación de amoníaco.

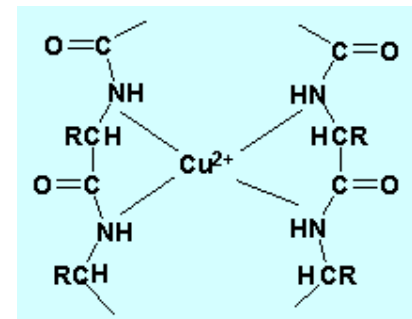


Reacción del Biuret

Si una solución fuertemente alcalina de sulfato cúprico (CuSO_4) se añade a una solución de proteína se forma una complejo entre el ion cúprico y los enlaces peptídicos, con aparición de una coloración **violeta-púrpura**, que presenta un máximo de absorción a 540 nm.

Las características más importantes de la reacción son:

- La reacción del Biuret se aplica, a partir de los tetrapéptidos, a todos los péptidos y proteínas.
- Su rango de determinación es de 1 a 6 mg/ml.
- No depende de la composición de aminoácidos.
- Algunos compuestos (NH_4^+ , Tris, etc.) dan la reacción.



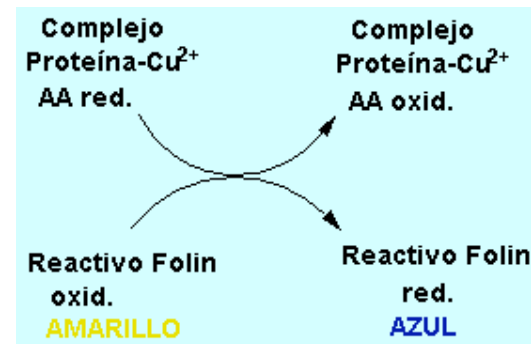
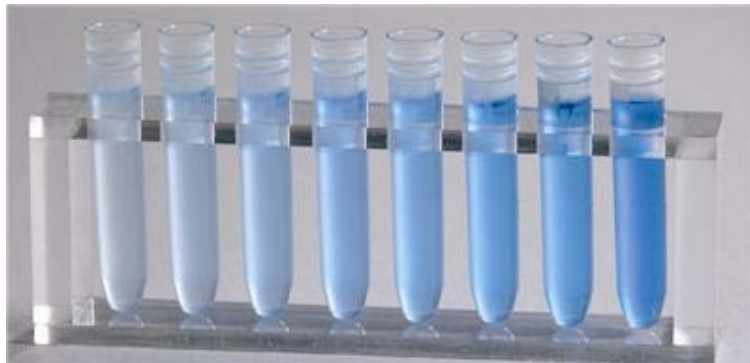
Violeta-púrpura
Complejo proteína-Cu(II)

Método de Lowry

Para aumentar la sensibilidad de la reacción del biuret, el complejo proteína- Cu^{2+} se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando una **coloración azul**, con un máximo de absorción a 650 nm. Esta coloración se atribuye a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a azul de heteropolimolibdeno de composición no definida, por medio de los residuos tirosilos, triptofanilos, y en menor grado, cisteinilos e histidilos de las proteínas que forman el complejo con el Cu^{2+} .

Las características del método son:

- La intensidad de la coloración varía con la composición de aminoácidos de la proteína.
- Es más sensible que el ensayo del biuret. El rango es de 0,1-1 mg/ml.
- La modificación de Hartree incrementa la sensibilidad de 0,015-0,15 mg/ml.
- Presenta muchas interferencias.



Método de Bradford

- Consiste en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante Azul Coomassie.
- Absorbe luz a 595 nm.
- El rango de determinación de proteína es de 1-10 mg/ml (ensayo micro) y de 0,5 -1,4 mg/ml (ensayo estándar).
- La intensidad de absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.

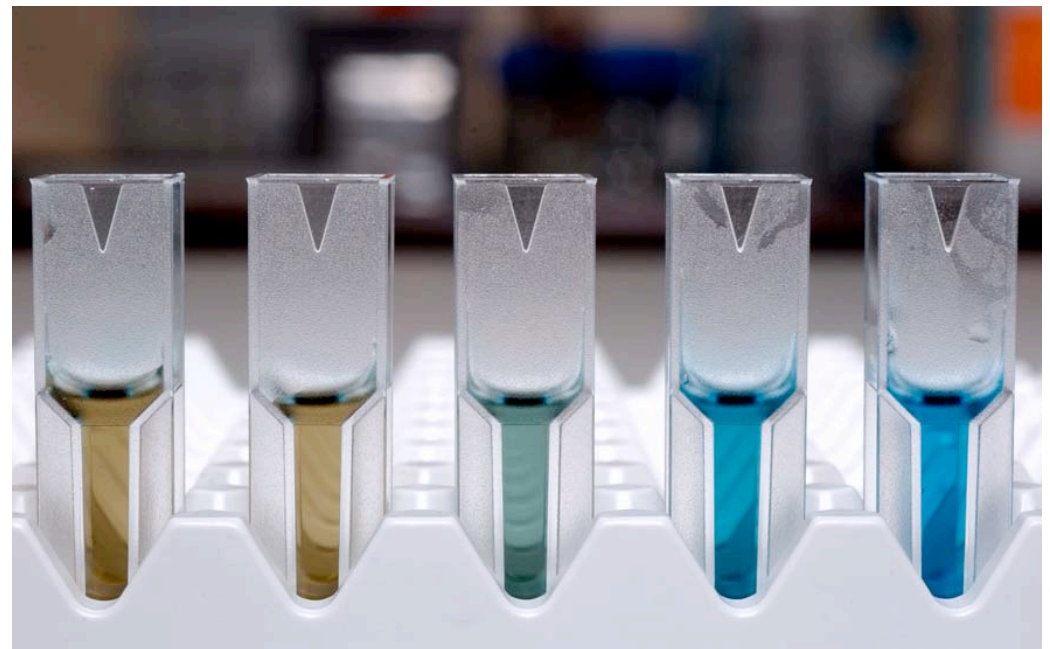
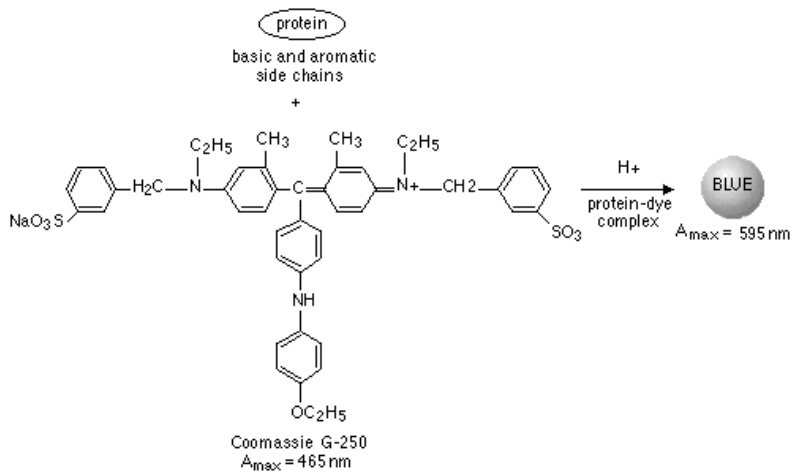
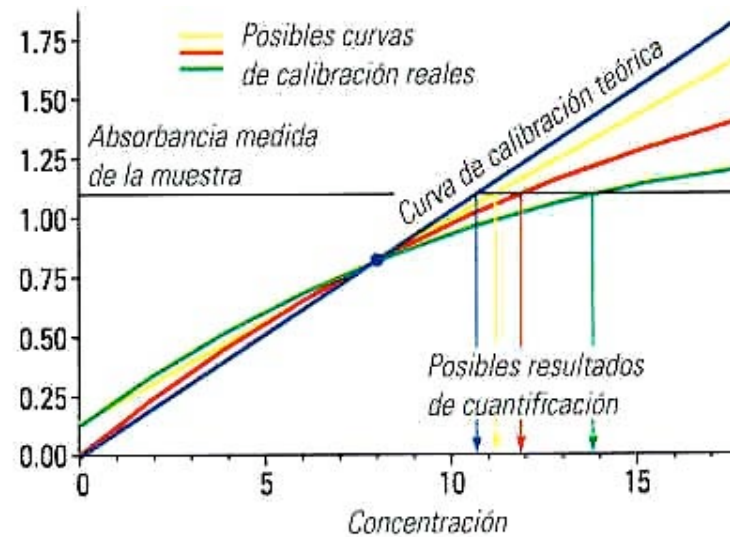
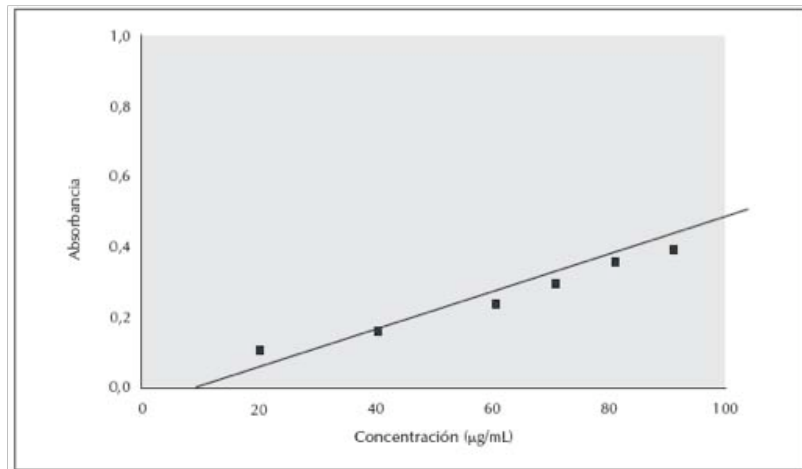


Tabla II. Principales métodos para la cuantificación de proteínas, principales ventaja e inconvenientes

Método	Ventajas	Inconvenientes
<i>Métodos de Absorción</i>	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
<i>Métodos Derivados Colorimétricos</i>		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
Bradford	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA	Es el método mas sensible Es el que muestra menos interferencias	
<i>Métodos Derivados Fluorimétricos</i>		
o-ftalaldehido	Muy sensible	La interferencia de aminos contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

Curva Patrón

Es un marco de referencia que se construye de cantidades conocidas de una sustancia (por ejemplo la albúmina sérica bovina) que se utiliza para determinar la cantidad de proteínas presente en una muestra incógnita.



Determinación de proteínas por absorbancia a 280 nm

1. Rotular los tubos de microfuga
2. Añadir los volúmenes del estándar de BSA que se indican en la tabla y completar con agua.
3. Encender el espectrofotómetro por lo menos 15 minutos antes de la determinación y seleccionar la λ de 280 nm.
4. Utilizar celda de cuarzo para realizar las mediciones.
5. Ajustar el espectrofotómetro a cero con agua.
6. Realizar las lecturas.
7. Llenar la tabla con los datos de absorbancia.
8. Calcular la concentración de proteína de acuerdo al volumen añadido de la solución estándar.

Tubo	H ₂ O	BSA (1mg/mL)	A _{280nm}	Proteína (μ g)
0	1000 μ L	—		
1	990 μ L	10 μ L		
2	980 μ L	20 μ L		
3	970 μ L	30 μ L		
4	960 μ L	40 μ L		
5	950 μ L	50 μ L		
6	940 μ L	60 μ L		
7	930 μ L	70 μ L		

Determinación de proteínas por Lowry

1. Rotular los tubos de vidrio y adicionar los reactivos en el orden que se indica en la tabla.

Importante: mezclar con el vórtex después de añadir cada una de las disoluciones.

2. Encender el espectrofotómetro, seleccionar la λ de 750 nm.

3. Utilizar las celdas de plástico para realizar las mediciones.

4. Ajustar el espectrofotómetro con la disolución del primer tubo de la tabla (sin BSA).

5. Realizar las lecturas.

6. Llenar la tabla con los datos de absorbancia.

7. Construir las gráficas de absorbancia vs concentración de proteína (μg).

Tubo	H ₂ O	BSA (1mg/mL)	Reactivo A	Reactivo B	Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos	A _{750nm}	Proteína (μg)
1	900 μL	—	1000 μL	500 μL			
2	890 μL	10 μL	1000 μL	500 μL			
3	880 μL	20 μL	1000 μL	500 μL			
4	870 μL	30 μL	1000 μL	500 μL			
5	860 μL	40 μL	1000 μL	500 μL			
6	850 μL	50 μL	1000 μL	500 μL			
7	840 μL	60 μL	1000 μL	500 μL			
8	830 μL	70 μL	1000 μL	500 μL			