

## 8. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas

Nieves Abril Díaz<sup>1</sup>, J. Antonio Bárcena Ruiz<sup>1</sup>,  
Emilio Fernández Reyes<sup>1</sup>, Aurora Galván Cejudo<sup>1</sup>,  
Jesús Jorrín Novo<sup>1</sup>, José Peinado Peinado<sup>1</sup>,  
Fermín Toribio Meléndez-Valdés<sup>1</sup>, Isaac Túnez Fiñana<sup>2</sup>

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,*

<sup>1</sup>*Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba,*

<sup>2</sup>*Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba.*

### RESUMEN

La espectrofotetría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

En esta práctica se darán a conocer las características generales y conceptos relacionados con la espectrofotetría. A continuación y tras la explicación del funcionamiento del espectrofotómetro se harán espectros de absorción con el fin de determinar la longitud de onda donde la muestra presenta la máxima absorción, y tras realizar las correspondientes rectas de calibrado se cuantificarán las concentraciones de distintas biomoléculas.

*Palabras clave:* Absorbancia; transmitancia; colorimetría; cromóforo; espectro; rectas de calibrado.

*Abreviaturas empleadas.* A: Absorbancia; 4-AP: 4-Aminoantipirina; FMN: flavin mononucleótido; FMNH<sub>2</sub>: forma reducida del flavin mononucleótido; I: intensidad de luz; N-NEDA: N-Naftol-1-etilendiamino; p-NP: *p*-nitrofenol; POD: Peroxidasa; T: transmitancia; UV: luz ultravioleta.

### 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

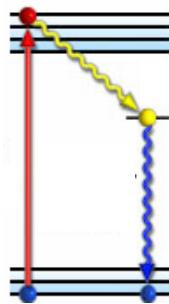
El estudio a nivel bioquímico de cualquier biomolécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica. Uno de los métodos más sencillos, accesibles, útiles y utilizados es la espectroscopía, en general, y la espectroscopía ultravioleta-visible, en particular. Se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas, con el empleo

de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

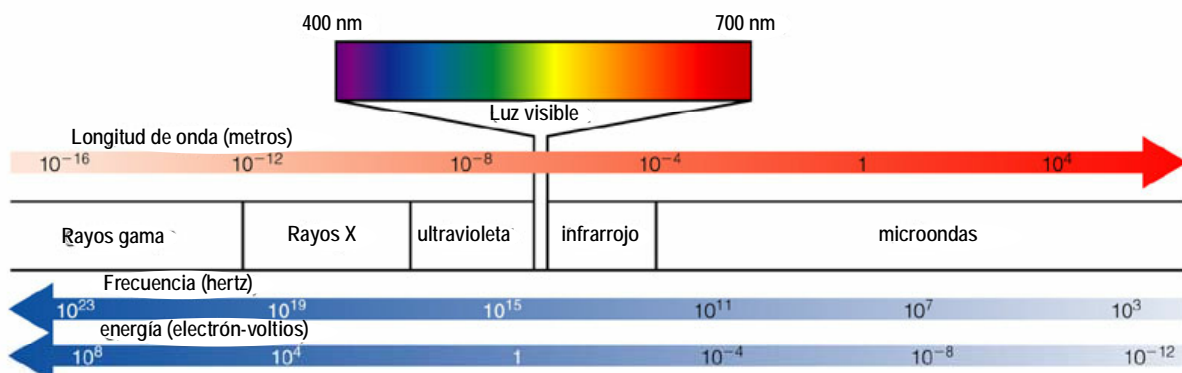
Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite poner en funcionamiento ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental,  $E_1$ , a un estado de mayor energía (estado excitado),  $E_2$ . Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula -esto es, su espectro de absorción- constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental.

$$E_2 - E_1 = h\nu$$



**Figura 1. Diagrama de niveles de energía en una molécula.** La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado fundamental ( $E_1$ ) a otro excitado ( $E_2$ ). Posteriormente la molécula relaja su energía mediante distintos mecanismos (vibración, rotación, etc.)

En espectroscopía el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm).



**Figura 2. Espectro electromagnético**

**La región UV** se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores -como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV.

La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

En la **región visible** apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite.

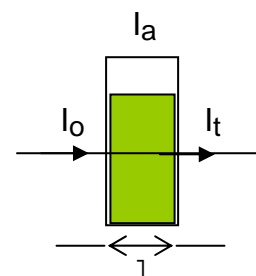
Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada.

La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm.

longitud de onda aproximada	color de luz que se absorbe	color de luz que se refleja o ve
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650 - 780	Rojo	Verde azulado

### 1.1. Transmitancia y Absorbancia

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad  $I_0$  incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o **cromóforo**, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente ( $I_a$ ) y dejará pasar el resto ( $I_t$ ), de forma que se cumple:  $I_0 = I_a + I_t$



La **transmitancia (T)** de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra,  $I_t$ , y la cantidad de luz que incidió sobre ella,  $I_0$ , y se representa normalmente en tanto por ciento:  $\% T = I_t/I_0 \times 100$

La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre  $\%T$  y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La **absorbancia (A)** es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de  $1/T$ , en consecuencia:  $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_0$ .

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ( $I_0 = I_t$ ), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces  $A$  vale  $\log 1 = 0$ .

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste.

## 1.2. Ley de Lambert-Beer

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución –a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará-; y por último, depende de  $\epsilon$ , una constante de proporcionalidad -denominada coeficiente de extinción- que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de  $\epsilon$  dependen de las de c y l. La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_M$ ). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo  $g \cdot L^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo  $g^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$ , y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico ( $\epsilon_s$ ).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

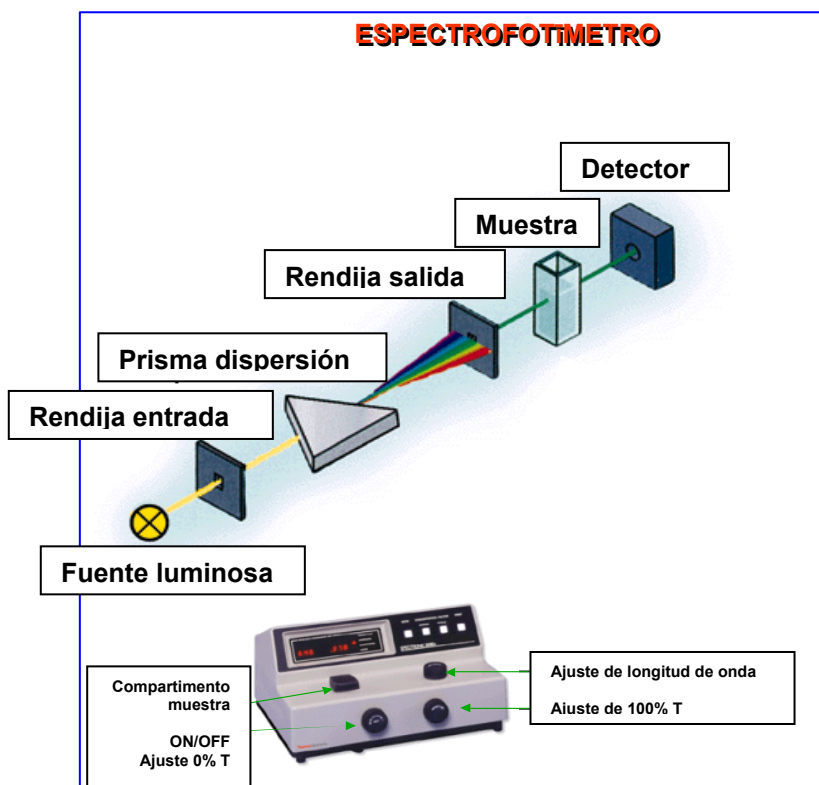
## 1.3. Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible y ultravioleta: espectrofotómetro UV-visible

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra. Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos.

Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas); en nuestro caso se trabajará con los de un solo haz.

Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ( $I_o = I_t$ ), y por tanto la absorbancia es cero. A continuación se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee la absorbancia de ésta.

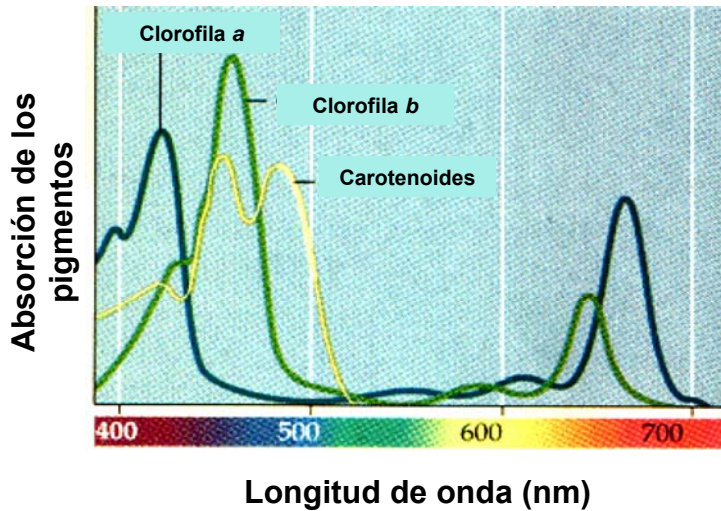


#### 1.4 Obtención de un espectro de absorción

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida ( $\epsilon$ ) a diferentes valores de  $\lambda$ .

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de  $\lambda$  al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ( $\lambda_{max}$ ). Dicho  $\lambda$  se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

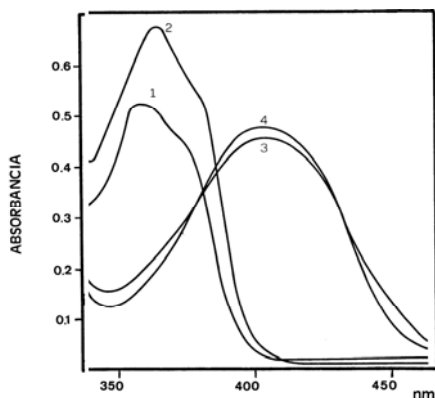
El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula.



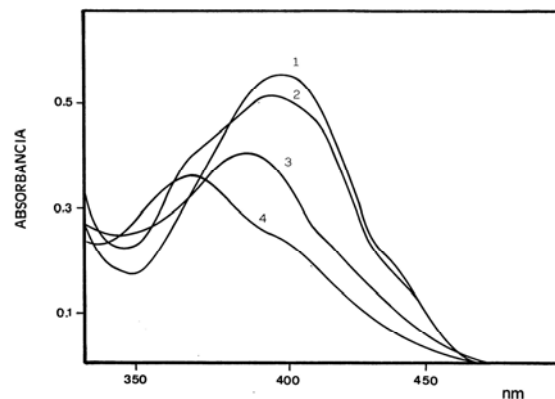
Espectros de absorción de tres pigmentos fotosintéticos cloroplastídicos.

Observar que un compuesto puede tener más de un pico de absorción ( $\lambda_{\max}$ ).

No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de  $\lambda_{\max}$  y  $\epsilon_M$ , entre los que se incluye el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de los cromóforos vecinos; y cada uno afecta de forma particular. Por ejemplo, variaciones originadas por cambios de pH son debidas al efecto de éste sobre la ionización del compuesto. A continuación se muestran como ejemplo los espectros de absorción de HNTS (un reactivo empleado para la determinación de especies oxidantes) y comprobándose que por espectrotometría se puede seguir el efecto que ejercen el pH y los oxidantes.



*Efecto del pH en la absorción de HNTS.* Espectros 1 y 2 en medio ácido (máximo de absorción a 370 nm); espectros 3 y 4 en medio básico (máximo a 410 nm).



*Desplazamiento del máximo de absorción y descenso de absorción cuando el HNTS se incubaba con  $H_2O_2$  a distintos tiempos (0, 5, 10 y 15 minutos).*

### 1.5 Curvas de calibrado

Para obtener una curva de calibrado de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a  $\lambda_{\text{max}}$ . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de abscisas (eje de x) y los de concentración en el eje de ordenadas (eje de y). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables.

La representación de Lambert-Beer,  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ , nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta.

## **1.6. Objetivos**

### **Espectros de absorción**

Se van a realizar espectros de absorción de distintas sustancias para determinar su  $\lambda_{\text{max}}$  y comprobar que un cambio en la estructura de la molécula, por ejemplo su reducción, supone una modificación en su espectro.

### **Ley de Lambert-Beer**

Se aplicará la ley de Lambert-Beer y tras hacer una recta de calibrado para dos sustancias, se calculará gráficamente el valor de los correspondientes coeficientes de extinción molar.

### **Determinaciones colorimétricas específicas de compuestos**

Se aplicarán reacciones específicas para la determinación colorimétrica de sustancias.

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

### **2.1. Material de uso general**

- Espectrofotómetro.
- Agitador de tubos de ensayo.
- Balanza.
- pHmetro.
- Tijeras

### **2.2. Material para cada grupo**

- Gradillas con tubos de ensayo.
- Juego de pipetas (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 25.0 ml).
- Prepipetas (dos juegos).
- Probetas (100 y 250 ml).
- Vasos de precipitado (100 y 500 ml).

Frasco lavador con agua destilada.  
Recipientes para muestras biológicas de 50 ml.  
Papel de filtro.  
Papel de parafilm.  
Rotulador para vidrio.  
Pipetas Pasteur de plástico (cuatro).  
Guantes de latex.  
Cubetas de plástico para medir en el espectrofotómetro.

### **2.3. Reactivos**

#### **Espectos de absorción**

Solución de *p*-nitrofenol 0,20 mM en agua destilada.  
Solución de NaOH 0,50 N.  
Solución de *p*-nitrofenol de concentración desconocida.  
Solución de flavín mononucleótido (FMN) 0,25 M en agua destilada.  
Ditionito sódico.

#### **Determinación colorimétrica de glucosa y nitrito mediante reacciones específicas**

Glucosa  
Glucosa oxidasa  
Peroxidasa  
Fenol  
4 amino-antipirina  
Tampón fosfato  
Nitrito potásico  
Sulfanilamida  
Dicloruro de N-naftol-1-etilendiamino  
Ácido clorhídrico