

**REVISIÓN DE MÉTODOS
ESPECTROSCÓPICOS Y
ELABORACIÓN DE CURVA
ESTÁNDAR DE PROTEÍNA**

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.

Determinar el intervalo de sensibilidad de una curva estándar.

Espectrofotometría

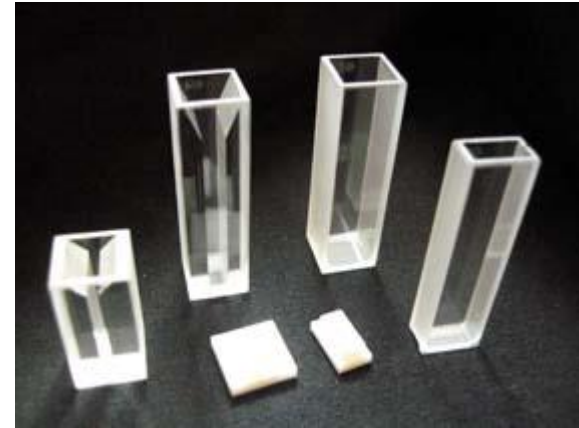
Es la medida de la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas a longitudes de onda específicas.

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas.

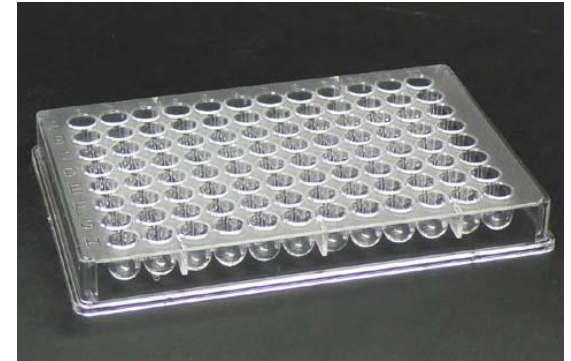
Espectrofotómetro

Es un instrumento usado en la física óptica que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia en función de la longitud de onda

Espectrofotómetro

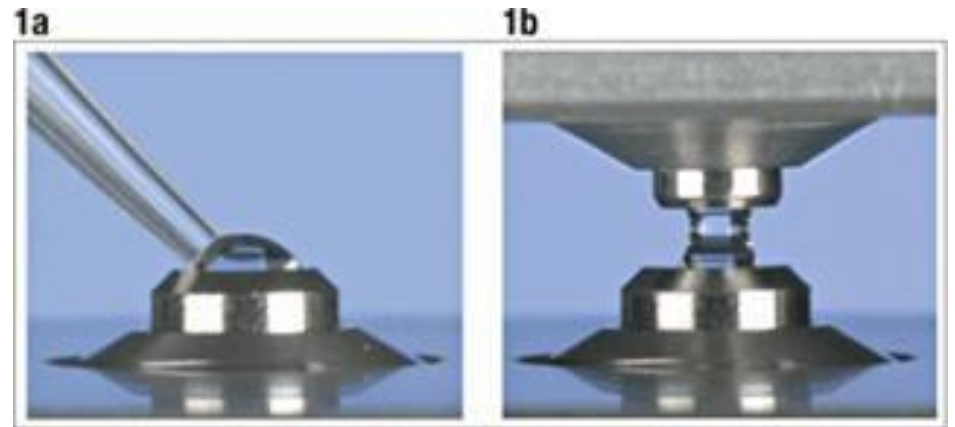


Plástico
Vidrio
Cuarzo



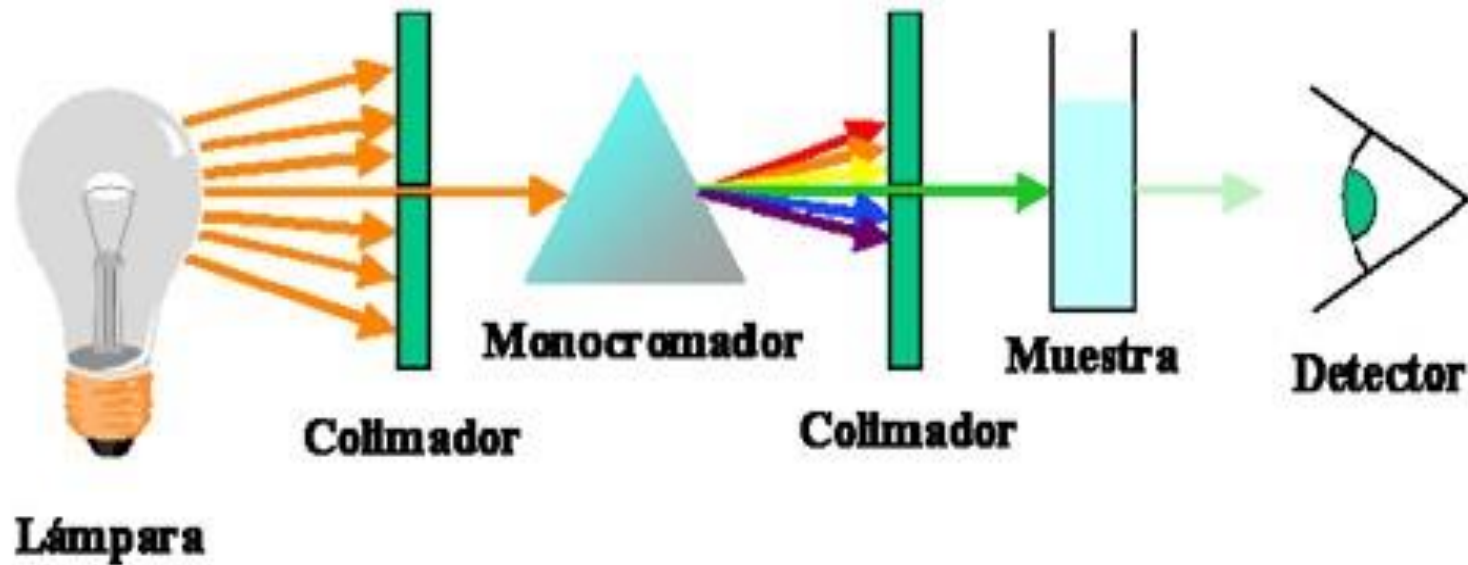
Microplacas

Nanodrop



0.5 - 2 μ L de muestra

Componentes básicos del espectrofotómetro



Deuterio – Región de UV
Tungsteno – Región visible

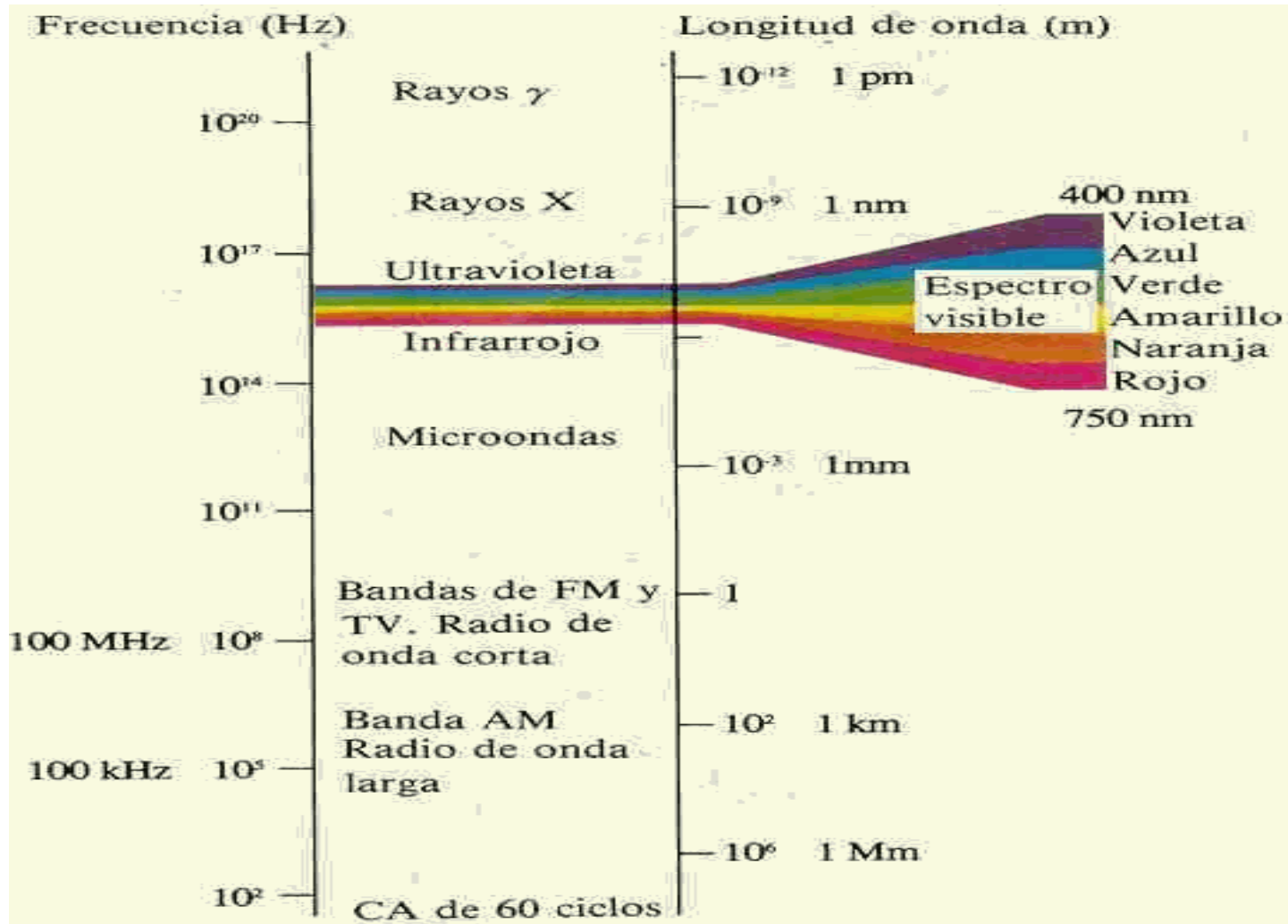
Métodos Espectroscópicos

- Los métodos espectroscópicos se consideran como una de las mejores y más utilizadas técnicas instrumentales a disposición del científico, para la adquisición de información tanto cuantitativa como cualitativa.

Los métodos espectroscópicos se clasifican según la región del espectro electromagnético que esté implicada; siendo las más importantes las regiones de:

- rayos X,
- ultravioleta,
- visible,
- infrarroja,
- microondas
- Radiofrecuencia.

El Espectro Electromagnético



Transmitancia

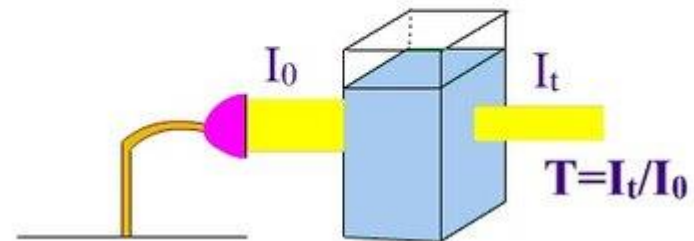
Es la fracción de luz incidente, a una longitud de onda específica, que pasa a través de una muestra, por lo general la transmitancia se expresa en porcentaje. Esta definida por la ecuación:

$$T = I / I_0 \quad T = 10^{-A} \quad \%T = T * 100$$

(I) - Intensidad de luz cuando está interpuesta la muestra

(I₀)-Intensidad de luz cuando no está la muestra o está un “blanco”.

Principio de la Transmitancia



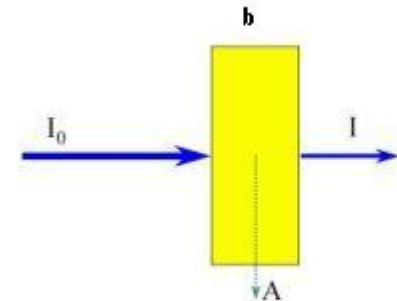
Absorbancia

Es la medida de la energía radiante que es absorbida por un material o una superficie como función de la longitud de onda de dicha energía. A diferencia de la transmitancia, la absorbancia de una solución que aumenta la atenuación del haz esta definida por la ecuación:

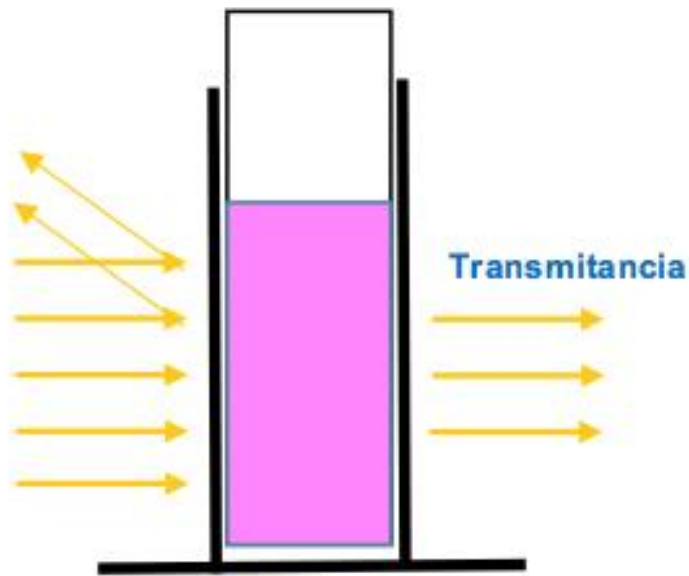
$$A = \text{Log } I_0 / I$$

$$A = \text{Log } 1/T$$

(I) - Intensidad de luz cuando está interpuesta la muestra
(I_0)-Intensidad de luz cuando no está la muestra o está un “blanco”.



Reflectancia



Transmitancia

Absorbancia

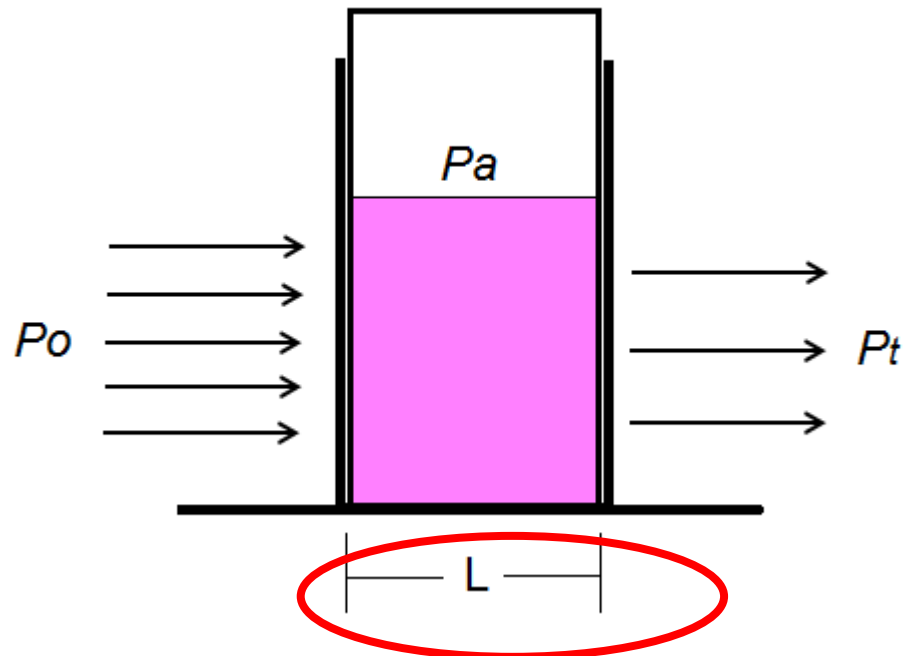
Leyes Fundamentales de la Absorción

- Se denomina absorción al proceso por el cual una especie, en un medio transparente, capta selectivamente ciertas frecuencias de la radiación electromagnética.

Leyes Fundamentales de la Absorción

- **Ley de Lambert:** cuando un haz de luz atraviesa un medio absorbente de concentración constante, la cantidad de energía luminosa absorbida por el medio varía en forma **directamente proporcional a la distancia recorrida**.

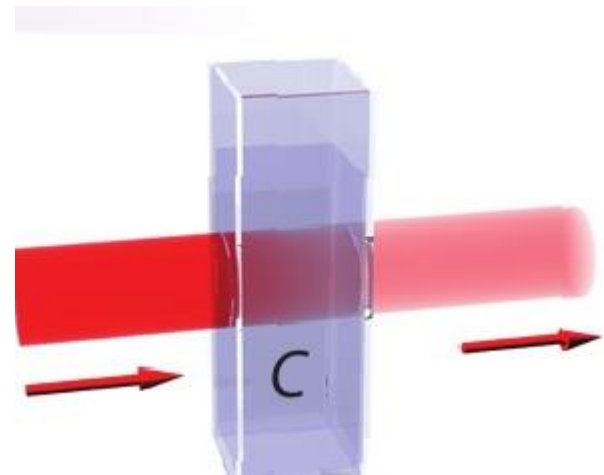
Energía absorbida $\propto l$



Leyes Fundamentales de la Absorción

- **Ley de Beer:** cuando un haz de luz atraviesa un medio absorbente de espesor constante, la cantidad de energía luminosa absorbida por el medio varía en forma **directamente proporcional a la concentración del absorbente en el medio**

Energía absorbida $\propto [C]$



Ley de Lambert - Beer

- Relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.

Ley de Lambert - Beer

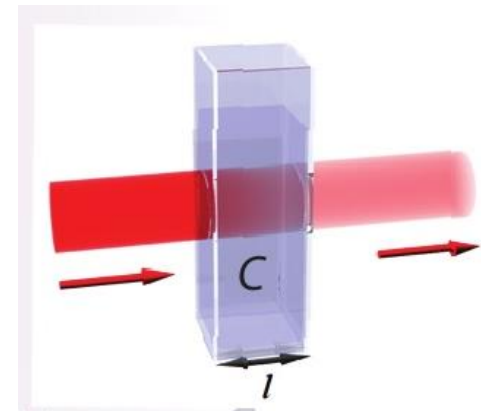
La ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa.

Si conocemos l y A , la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.

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

Donde:

- A = absorbancia
- ε = Coeficiente de extinción molar
- l = longitud de la celda
- c = concentración



COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR

Es una medida de la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración.

Un compuesto con un alto valor de coeficiente de extinción molar es muy eficiente en la absorción de luz de la longitud de onda adecuada y, por lo tanto, puede detectarse por medidas de absorción cuando se encuentra en disolución a concentraciones muy BAJAS.

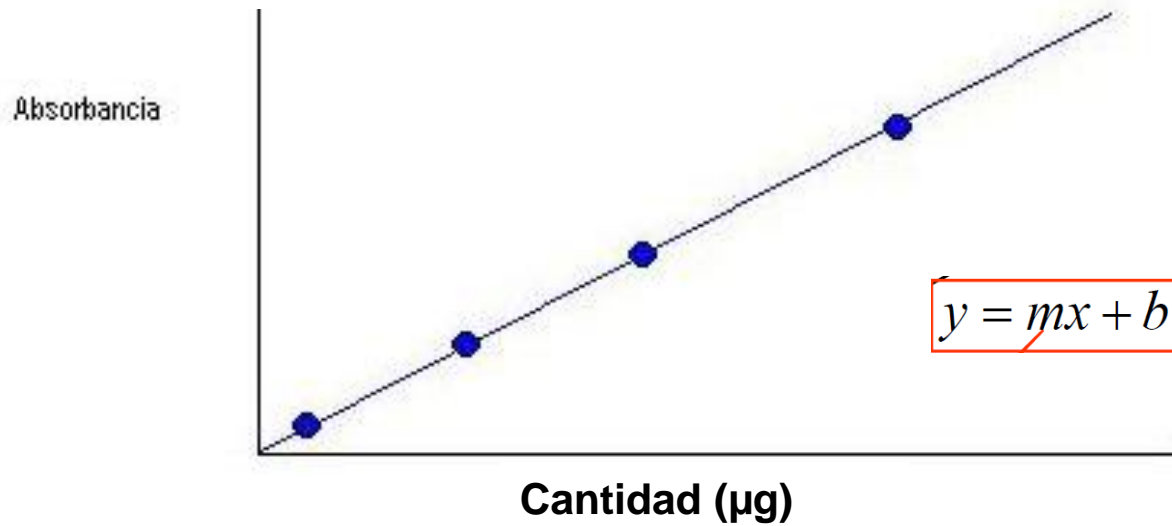


Curva Patrón

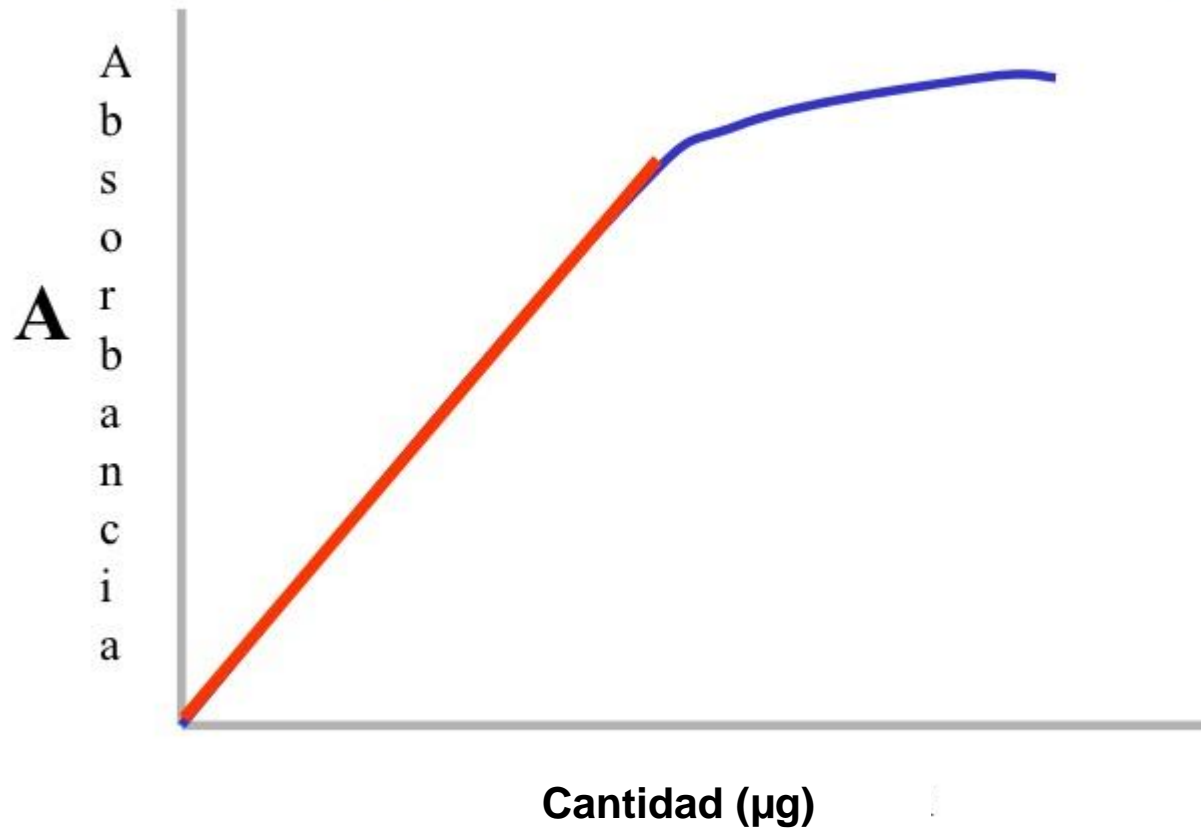
Es un marco de referencia que se construye de cantidades conocidas de una sustancia (por ejemplo la albúmina sérica de bovino) que se utiliza para determinar la cantidad de proteínas presente en una muestra incógnita.

Se cumple una relación proporcional entre la magnitud o **intensidad de color** que da una reacción y la **cantidad del reactivo** que la provoca.

Curva patrón



Curva de calibración



Cuantificación de Proteínas

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta.

- cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática,
- para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos.

Cuantificación de Proteínas

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en:

- a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV,
- b) la formación de derivados químicos, o
- c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

Proteínas

- Aminoácidos aromáticos: el ultravioleta cercano de proteínas.
- En cuanto a las cadenas laterales de los aminoácidos, las bandas de absorción más significativas se encuentran en el ultravioleta cercano, en el intervalo de longitud de onda entre 230 y 300 nm. **Concretamente absorben en este intervalo las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, la histidina y la cistina.**
- La cistina presenta una banda centrada a 250 nm, $n \rightarrow s^*$ ($\epsilon_{\text{max}} \sim 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), pero apenas se puede considerar, ya que es muy débil y el porcentaje relativo de puentes disulfuro es muy pequeño en una proteína.

Proteínas

Los aromáticos absorben de 260-290 nm.

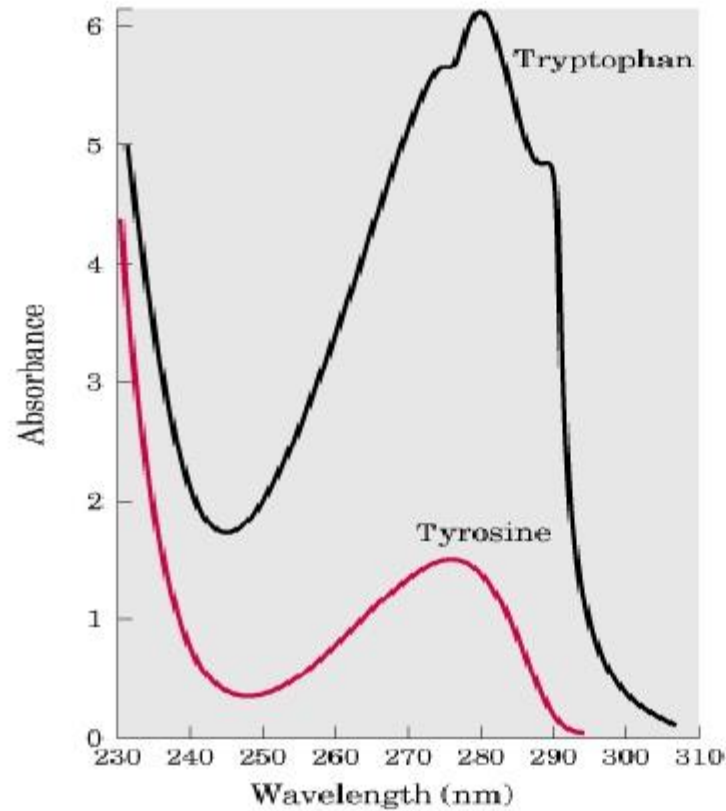
La fenilalanina. Es el menos importante cuantitativamente, aunque muestra un espectro complejo con múltiples bandas diferenciadas en torno a 250-260 nm. Presenta también bandas de mayor energía que solapan con el espectro del enlace peptídico en 215 y 180 nm. Sin embargo como no absorbe por encima de 280 nm **su contribución al espectro en la zona del ultravioleta cercano de proteínas suele ser pequeña.**

La tirosina presenta un máximo a 275 nm con un hombro a 285 nm. La banda se desplaza a mayores longitudes de onda cuando se produce la desprotonación del OH del anillo aromático.

El triptófano agrupa al menos tres bandas diferentes bajo el espectro centrado a 280 nm. También presenta bandas en la zona del UV lejano.

Un cambio de pH produce grandes efectos en los espectros de tirosina y triptófano ya que el lugar de protonación afecta directamente a la conjugación electrónica de la cadena lateral.

Absorción de luz UV por aa aromáticos



**Absorbancia a
longitud de onda
de 280 nm.**

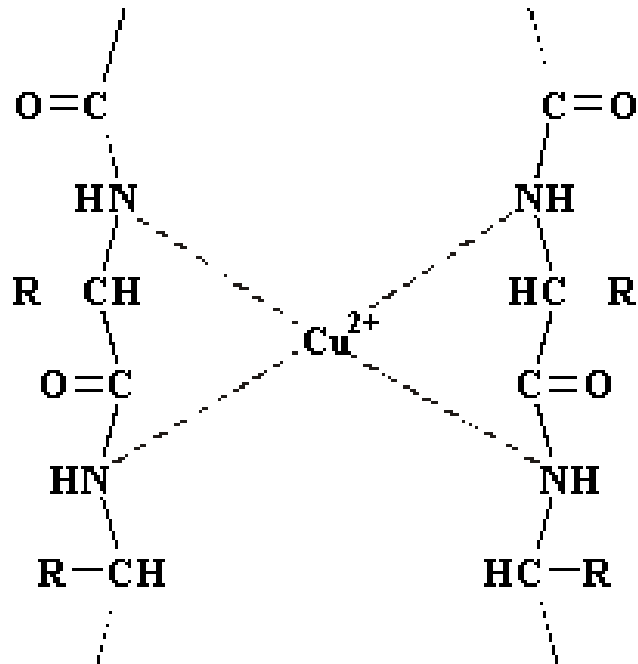
Cuantificación de Proteínas

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en:

- a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV,
- b) la formación de derivados químicos, o
- c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

BIURET

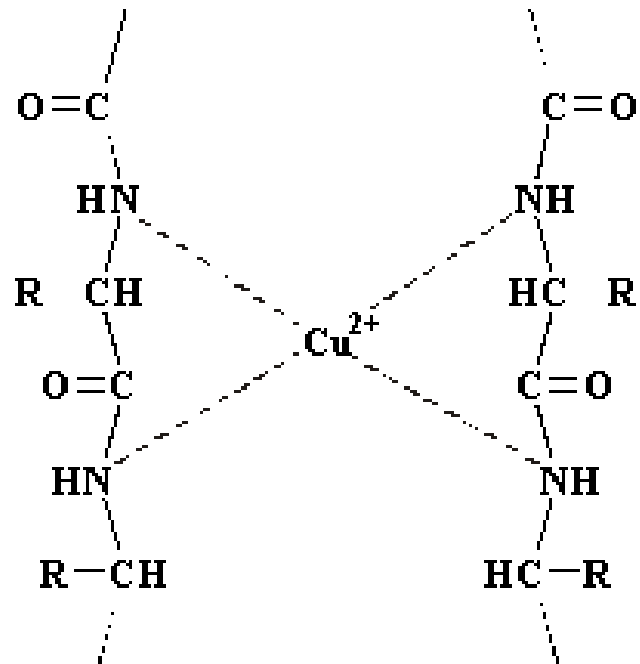
La reacción debe su nombre al Biuret, una molécula formada a partir de dos de urea ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$).



Se basa en la reacción de sales de Cu^{2+} con los pares de **electrones no compartidos del nitrógeno** que forman parte de los enlaces peptídicos en un medio fuertemente básico.

El Cu^{2+} se acompleja con 4 NH.

El Cu^{2+} es **reducido a Cu^{1+}** formando complejos color púrpura que tienen un máximo de absorción a 540 nm



La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren.

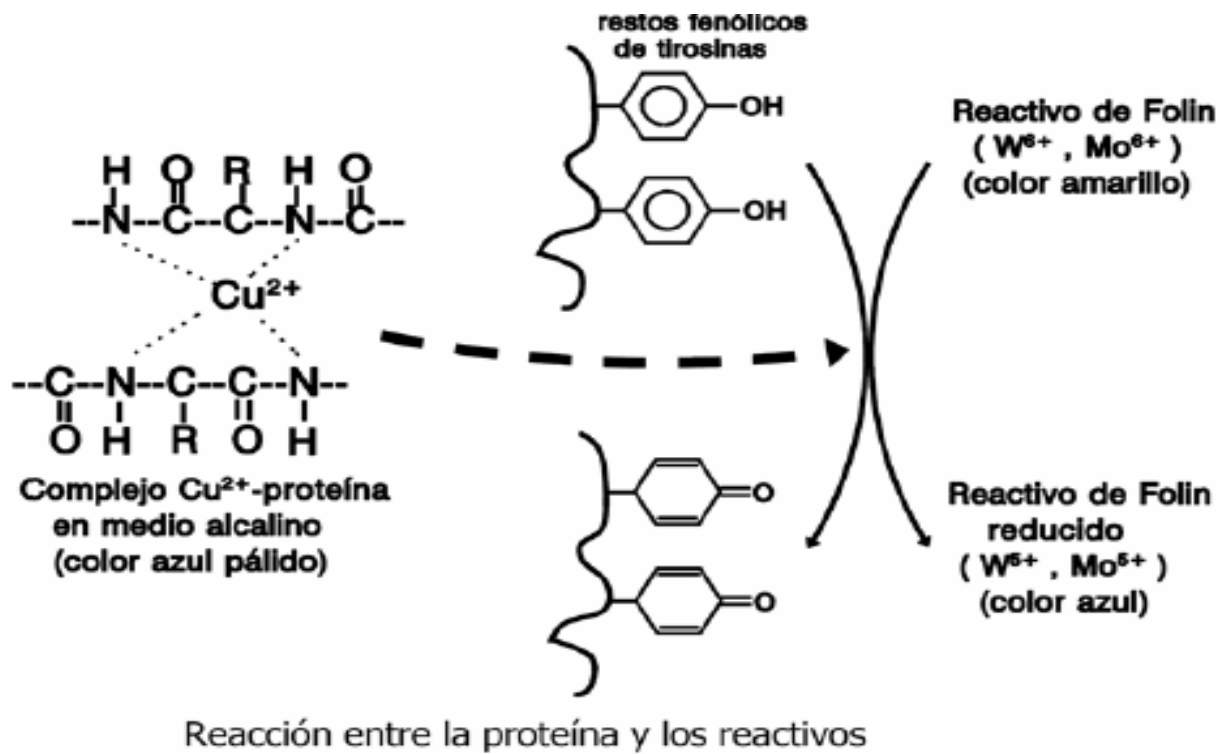
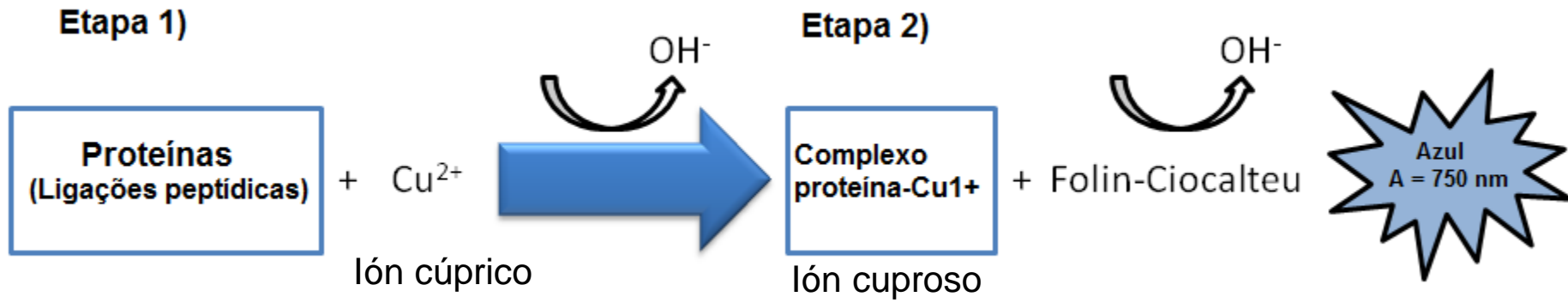
BIURET

<https://www.youtube.com/watch?v=HnI2t0MvU0s>

LOWRY

Este procedimiento involucra la formación de un complejo cobre-proteína en solución alcalina (**Reacción de Biuret**)

Este complejo reduce al reactivo fosfomolibdico-fosfotungstato (Folin-Ciocalteu) por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina lo que produce una intensa coloración azul.



El ensayo de Lowry se basa en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas – **Reacción de Biuret**

BCA

- El ácido bicinchonínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorear el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret).
- La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

OH^-



Etapa 1)

Proteína
(resíduos de cistina,
cisteína, triptofano e
tirosina)

+ Cu^{2+}

Reação dependente
de temperatura

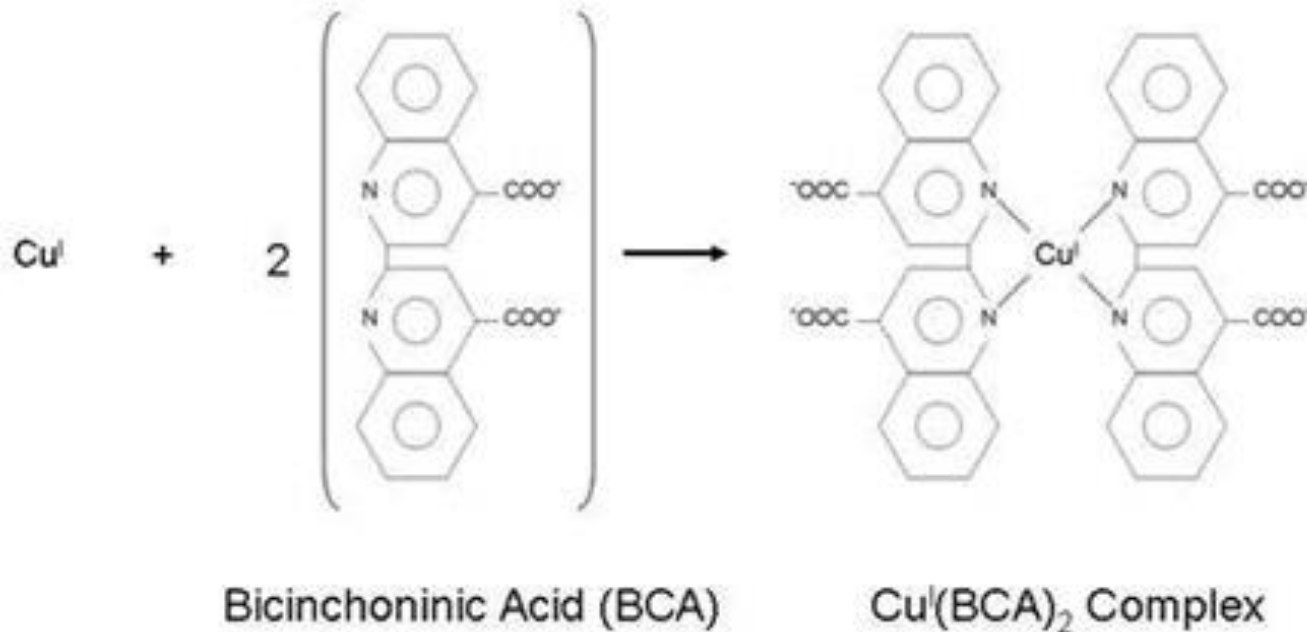


Etapa 2)

2 BCA



**Complexo
BCA-Cu¹⁺**



Tanto el ensayo de BCA como el de Lowry se basan en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas – **Reacción de Biuret**

La cantidad de Cu^{2+} reducido - es función de la **concentración de proteínas** y puede ser determinada espectrofotométricamente

Cuantificación de Proteínas

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en:

- a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV,
- b) la formación de derivados químicos. o
- c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

BRADFORD

Se basa en la unión de un colorante, **Comassie Blue G-250** a las proteínas.

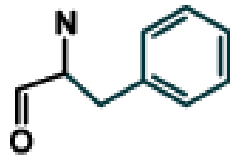
El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja.

Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

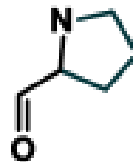
Phenylalaninyl molecule

L-phenylalanine



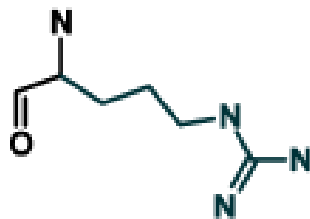
Prolyl molecule

L-proline



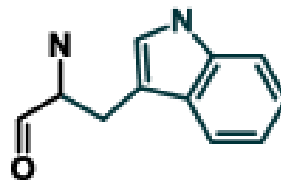
Arginyl molecule

L-arginine

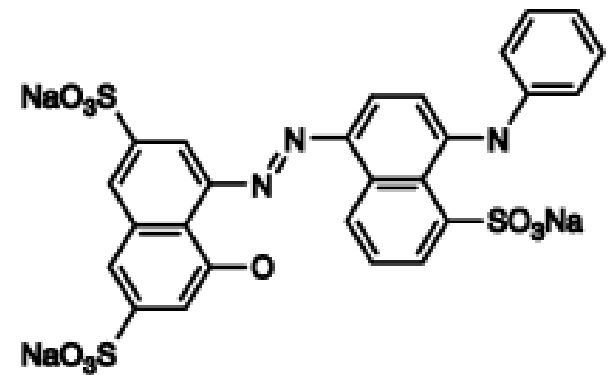


Tryptophanyl molecule

L-tryptophan

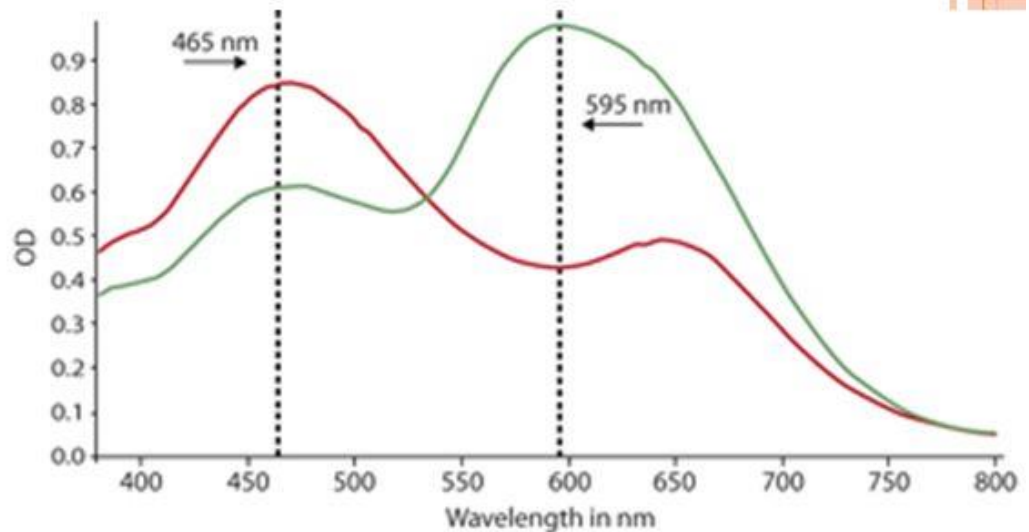


Coomassie molecule



CAMBIO DE ABSORBANCIA DEL COOMASIE BLUE

- Los aminoácidos que son reconocidos por el colorante son arginina, fenilalanina, triptofano y prolina.
- El azul de Coomasie libre se detecta a 470 nm mientras que la forma unida a proteínas a 595 nm. Lo anterior debido a que el Coomassie se une preferencialmente a los aa mencionados y cambio de un estado catiónico a uno iónico



Cuantificación de Proteínas

Método	Rango de sensibilidad (µg)	Coefficiente de extinción o Cálculo de la concentración
Métodos de Absorción A_{280} A_{205} $A_{280} - A_{260}$ $A_{235} - A_{280}$ $A_{224} - A_{236}$ $A_{215} - A_{225}$	100-3000 3-100 100-3000 25-700 5-180 2-45	$\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$ $\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$ Proteína (mg/mL) = $(1.55A_{280} - 0.76A_{260})$ Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$ Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{236})/0.6$ Proteína (µg/mL) = $144(A_{215} - A_{225})$
Métodos Derivados Colorimétricos		
Biuret	1000-10000	$\epsilon_{545} = 0.06 \text{ mL/mg cm}$
Lowry	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Usar curva estándar
Bradford	1-15	$\epsilon_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$
BCA	0.5- 10	Usar curva estándar
Métodos Derivados Fluorimétricos		
o-ftalaldehido	1-5 $\lambda_{\text{excitación}}$ a 340 nm $\lambda_{\text{emisión}}$ a 475 nm	Usar curva estándar

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

Método	Ventajas	Inconvenientes
Métodos de Absorción	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
Métodos Derivados Colorimétricos		
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	
Métodos Derivados Fluorimétricos		
o-ftalaldehido	Muy sensible	La interferencia de aminos contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

Determinación de proteínas por el método de Lowry

Tabla 1.1. Reactivos y cantidades a añadir para realizar una curva patrón de BSA y la determinación de la concentración de proteínas de una muestra problema, utilizando el método de Lowry para su determinación.

Tubo	H ₂ O	BSA (1mg/mL)	Reactivo A	Reactivo B	Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos	A _{750nm}	
1	450 µL	—	500 µL	250 µL			
2	445 µL	5 µL	500 µL	250 µL			
3	440 µL	10 µL	500 µL	250 µL			
4	435 µL	15 µL	500 µL	250 µL			
5	430 µL	20 µL	500 µL	250 µL			
6	425 µL	25 µL	500 µL	250 µL			
7	420 µL	30 µL	500 µL	250 µL			
8	415 µL	35 µL	500 µL	250 µL			
Tubo	H ₂ O	Muestra Problema*	Reactivo A	Reactivo B	A _{750nm}	**Cantidad de Proteína(µg)	
9	425 µL	25 µL	500 µL	250 µL			
10	400 µL	50 µL	500 µL	250 µL			

* La muestra problema la prepararán y entregarán los profesores.

** Calcular la cantidad de proteína que contiene cada tubo de acuerdo a los µL que se añadieron del estándar de BSA. En el caso de la muestra problema, calcular la cantidad de proteína utilizando los datos de la regresión de la curva estándar generada.

Reactivo A. Se prepara inmediatamente antes de usarse con partes iguales de CTC, 10% SDS, 0.8 N NaOH y H₂O destilada.

Solución de carbonato-tartrato-cobre (**CTC**; 10% Na₂CO₃, 0.1 % CuSO₄ y 0.2 % de tartrato de Na+ y K+)