



Absorção eletrônica: Lei de Beer-Lambert-Bougart e aplicações.

Caracterização de Biomoléculas - BBM5007

Profa. Dra. Patricia Targon Campana

Grupo de Biomateriais e Espectroscopia



pcampana@usp.br



sciencenebula.tumblr.com



Sala 339C – Titanic



[/Campana.PT](https://www.facebook.com/Campana.PT)



ramal: 3091-8883



[@profaPCampana](https://twitter.com/profaPCampana)



Conteúdo:

- Lei de Beer-Lambert-Bougart
- Aplicações
- Instrumentação



Pré-requisitos

- Luz
- Átomos, moléculas, soluções e modelos de moléculas
- Estrutura de biomoléculas
 - Estrutura de proteínas
 - Ácidos nucleicos
- Teoria de Grupos e simetrias em moléculas
- Polarização das nuvens eletrônicas
- Momento de dipolo elétrico (de transição)

Bibliografia auxiliar

- Biophysical Chemistry Techniques for the Study of Biological Structure and Function. Cantor e Schimmel
- Principles of Physical Biochemistry (2nd Edition). 2005 Kensal E van Holde e Curtis Johnson
- Livros de física moderna



A absorção é um fenômeno base de outros
que nos interessam muito

Technique	structural parameter
Fluorescence	
Intrinsic	Tryptophans and tyrosines vicinities
Extrinsic fluorophore binding (ANS, TNS)	Hydrophobic cores exposition
Substrate binding	Active site formation
Forster Resonance Energy Transfer (FRET)	Distance between residues
Anisotropy	Correlation time, volume



Technique		structural parameter
Circular Dichroism		
Electronic circular dichroism	Far UV (190-250 nm)	Secondary structures
	Near UV (260-400 nm)	Aromatic vicinities/ tertiary environments
Fluorescence circular dichroism		fluorescence polarization
Magnetic Circular Dichroism (MCD)		Quirality at metals vicinities
Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD)		Absorption until 140 nm (supersecondary structure)
ROA (Visível) (absorção IR)		Conformação secundária Vizinhanças s carbonos quirais

FAIXA DO ESPECTRO UTILIZADO EM ESPECTROSCOPIAS DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

λ (cm)	REGIÃO ESPECTRO	FREQUÊNCIA (Hz)	TÉCNICA/APLICAÇÃO
10^{-10}	RAIOS- γ	10^{20}	LASER/RAMAN
10^{-8}	RAIOS-X	$(10^{18}-10^{19})$	DIFRAÇÃO RAIOS-X
3×10^{-5}	U.V.	3×10^{17}	ESPECTRO ELETRÔNICO
6×10^{-5}	VISÍVEL	7×10^{14}	ESPECTRO ELETRÔNICO
10^{-3}	IR	4×10^{14}	ESPECTRO VIBRACIONAL
10^{-2}	FAR IR	10^{12}	ESPECTRO VIBRACIONAL
10^{-1}	MICROONDAS	(10^7-10^{11})	ESPECTRO ROTACIONAL
10^0	MICROONDAS	(10^7-10^{11})	EPR
10	RÁDIO FREQUÊNCIA	$(10-10^6)$	NMR

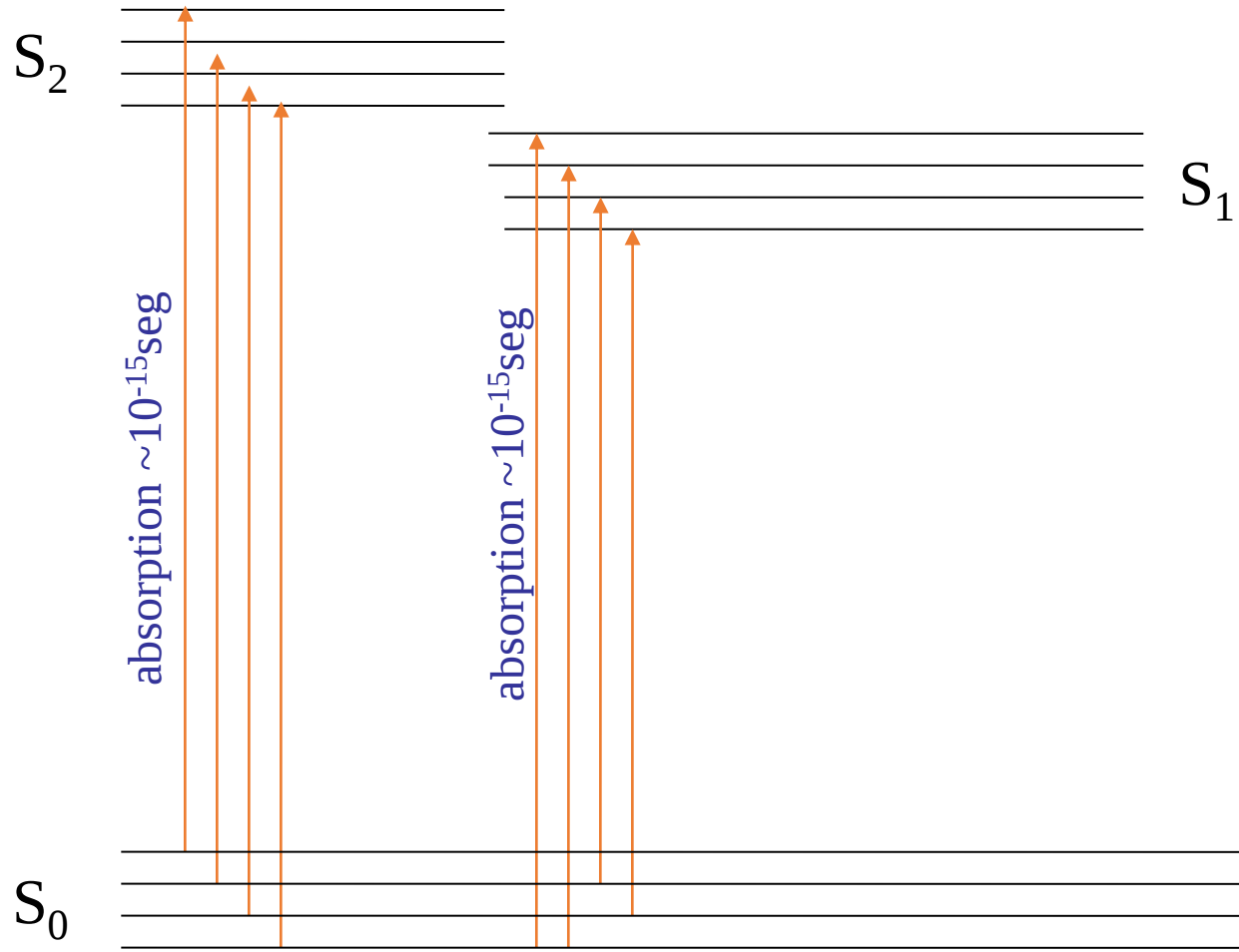


Da absorção eletrônica

Espectroscopia Óptica - relacionada com a intensidade de absorção

Espectroscopia de Fluorescência - relacionada com a intensidade de emissão

Espectropolarimetria ou Espectroscopia de Dicroísmo Circular - relaciona intensidade, espécie e grau de polarização da emissão





Luz incidente (I_0) $\rightarrow$ amostra [C] $\rightarrow$ a intensidade de I é muito baixa luz decai exponencialmente após passar pela amostra

$I = I_0 e^{-\ell C \varepsilon} \rightarrow \ln(I_0 / I) = \ell C \varepsilon$, onde ε é intrínseco de cada amostra absorvedora e ℓ é o caminho ótico cubeta (em cm)

ε : coeficiente de absorção molar (ou absortividade molar) está relacionado com a probabilidade de ocorrer a transição eletrônica de um nível de energia para outro

Conhecendo estes parâmetros pode-se quantificar a absorbância (A) ou densidade óptica (DO)

$$A = \log_{10} I_0 / I = \ell C \varepsilon$$

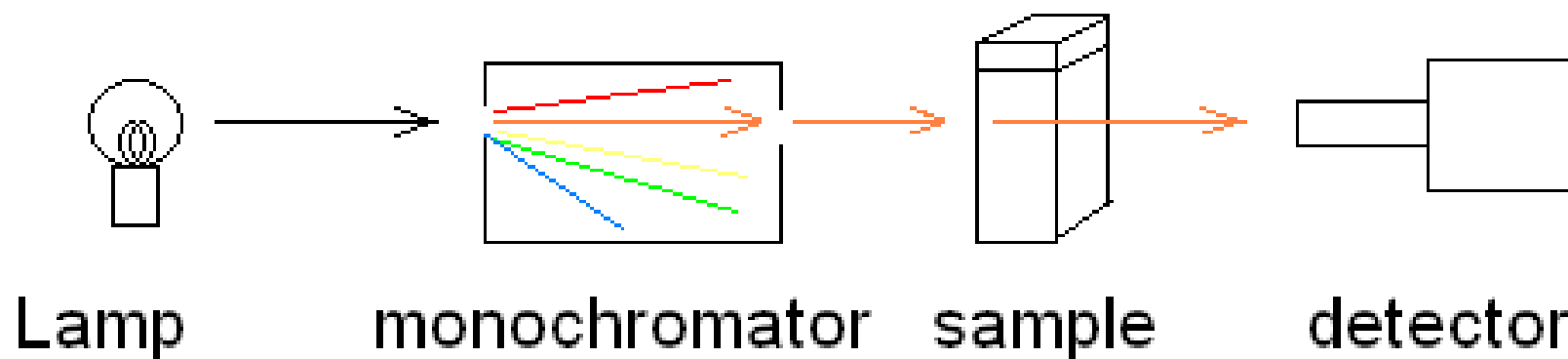
$$DO = \ell C \varepsilon(\lambda)$$

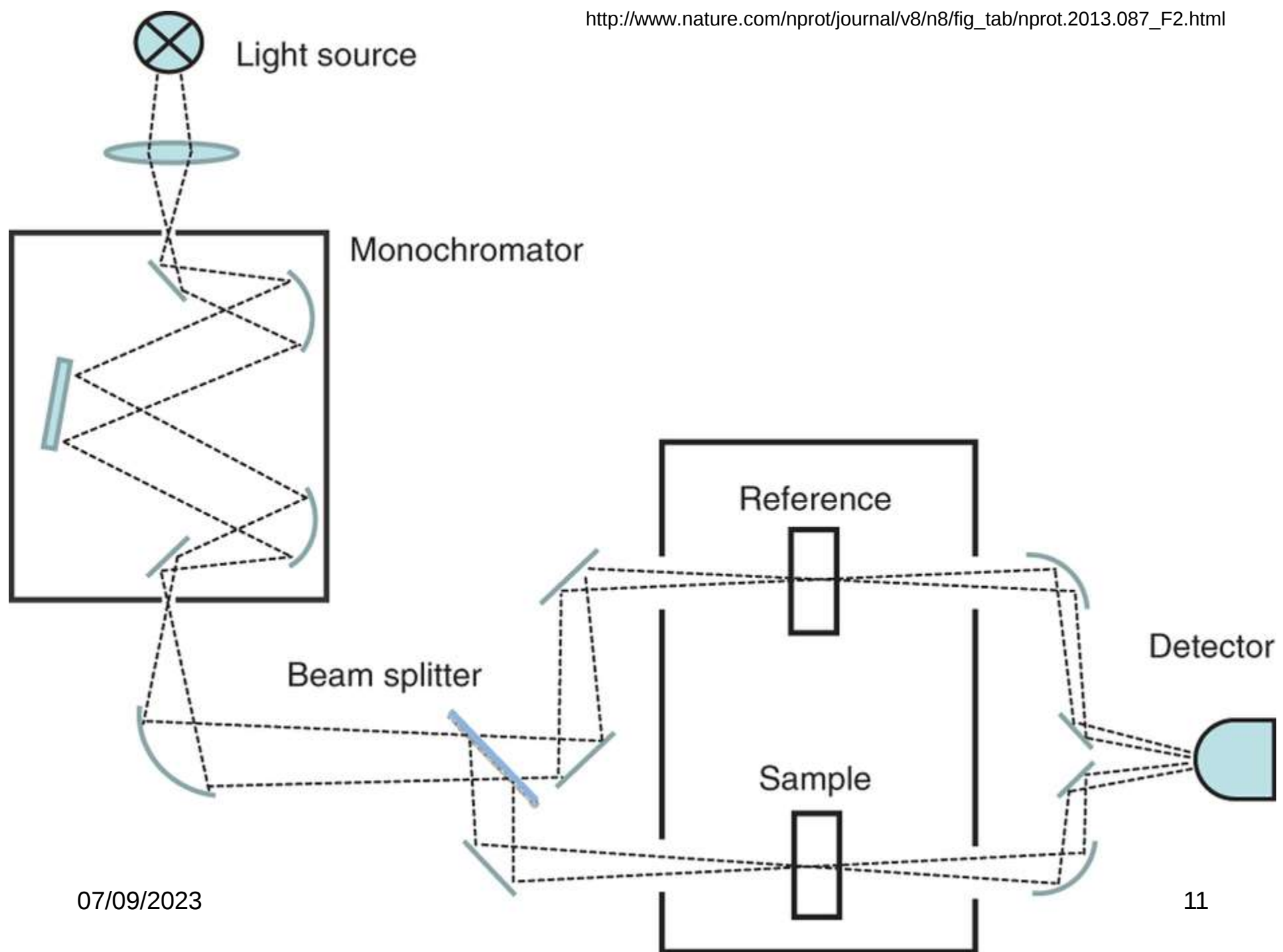
Lei de Beer-Lambert-Bouguer: o espectro de absorção é um gráfico de A em função de λ .

Para a maioria dos compostos existe uma relação linear entre a absorção X concentração da amostra absorvedora



Scheme of an Absorption Spectrophotometer







ANALISANDO BIOPOLÍMEROS: LIGAÇÃO PEPTÍDICA

PROTEÍNAS: Ligações peptídicas
Cadeias laterais
Grupos prostéticos

CADEIAS LATERAIS: maioria tem transições eletrônicas na mesma região ligação peptídica. Exceção as cadeias que absorvem acima 230 nm (230 - 300 nm)

AA aromáticos

Phe - 250 nm - ϵ - 250 M⁻¹ cm⁻¹

Tir - 274 nm - ϵ - 1400 M⁻¹ cm⁻¹

Trp - 240-290 (280) nm - ϵ - 5000 M⁻¹ cm⁻¹

Cys - 230 nm - ϵ - 300 M⁻¹ cm⁻¹

Grupos prostéticos: heme, flavina, piridoxal fosfato

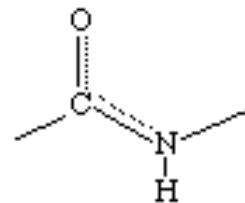
Trp e Tyr podem ser usados para quantificar proteínas

O ϵ de uma proteína pode ser estimado quando se conhece o número de Trp e Tyr

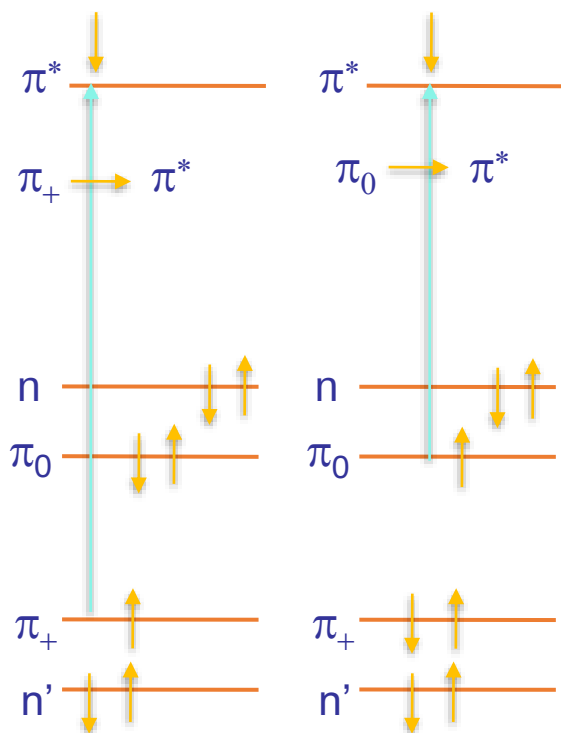


Região UV-distante (*Far-UV*)

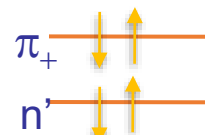
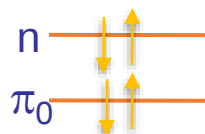
- Contribuição dominante: amidas



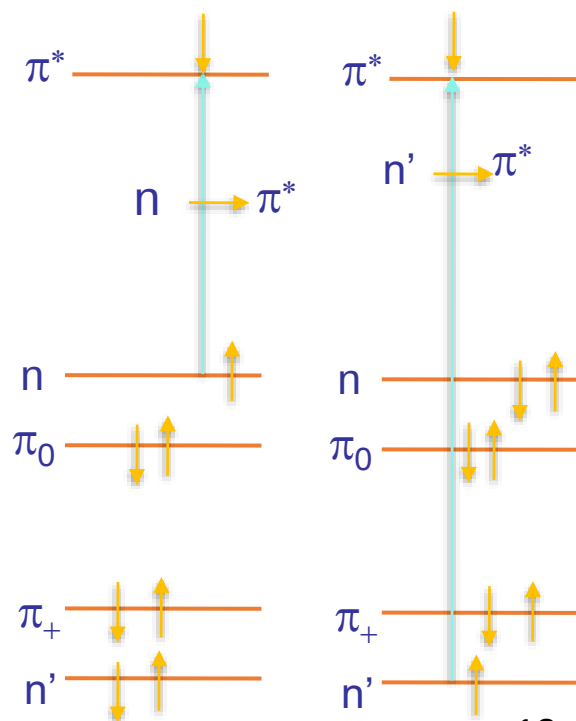
$\pi \rightarrow \pi^*$
140 nm e 190 nm

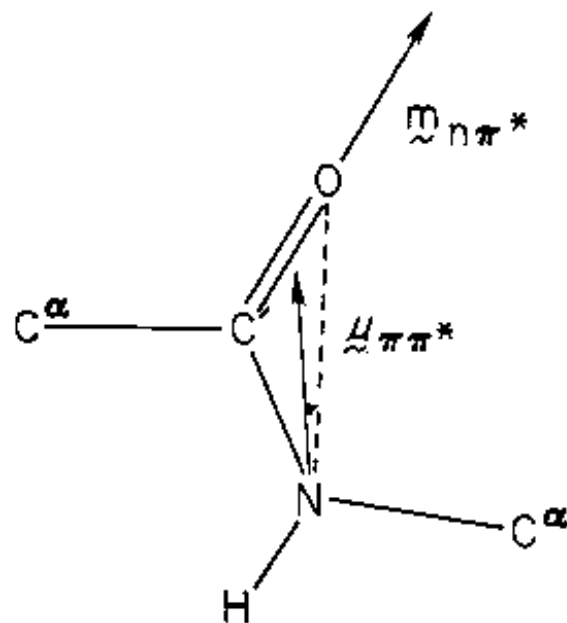


π^*



$n \rightarrow \pi^*$
220 nm





- $n-\pi^*$ (~ 220 nm):
 - apesar de proibida, possui um m muito grande
 - Muito afetada pelo solvente (230nm: apolar e 210nm: polar)
- $\pi-\pi^*$ (~ 190 nm):
 - Permitida
 - Não é afetada pelo solvente



Região UV-próximo (*Near-UV*)

- Contribuição dominante: aromáticos
 - Benzenos e seus derivados

4 transições $\pi \rightarrow \pi^*$

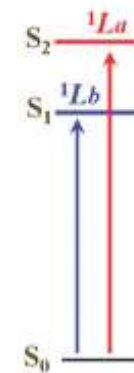
L_a L_b 

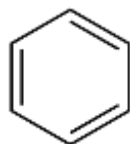
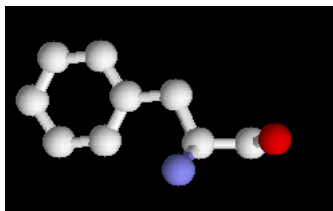


Acoplamento vibrônico:
 L “empresta” a energia de B

B_a B_b 

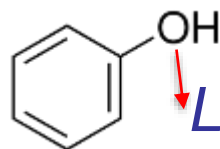
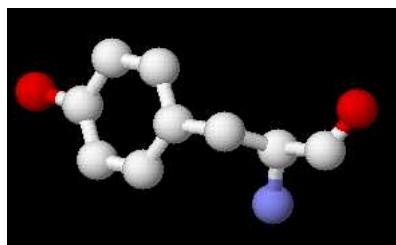
~250 nm





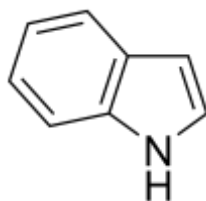
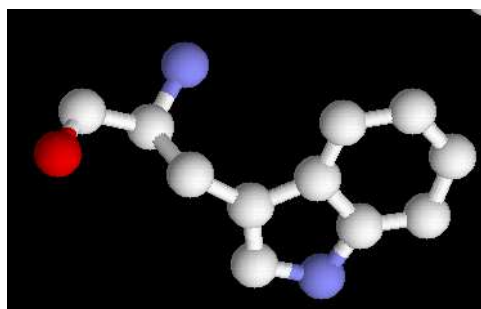
$$L_a = 210 \text{ nm} \quad L_b = 260 \text{ nm}$$

$$B_a \text{ e } B_b = 185 \text{ nm}$$



$$L_a = 230 \text{ nm} \quad L_b = 275 \text{ nm}$$

$$B_a \text{ e } B_b = 190 \text{ nm}$$



$$L_b \text{ e } L_a \text{ entre } 270 \text{ e } 280 \text{ nm} \quad B_b \sim 225 \text{ nm}$$

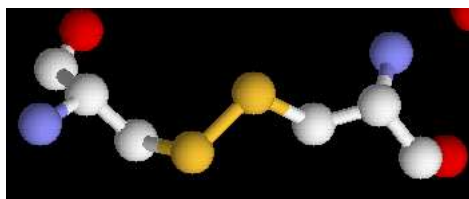
(com componente vibrônico)

$$L_a \text{ é muito sensível à vizinhança}$$

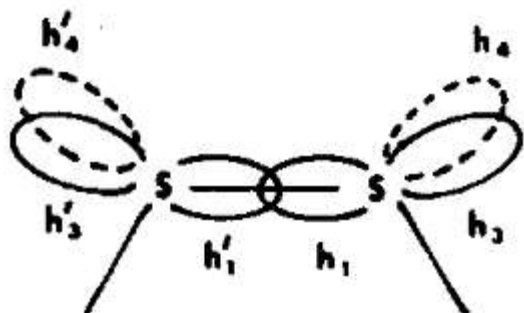


2 transições $n \rightarrow \sigma^*$

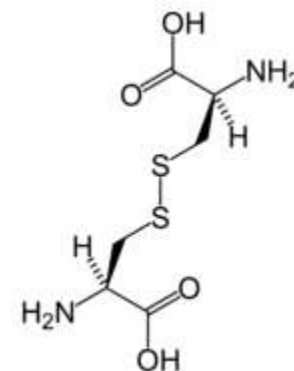
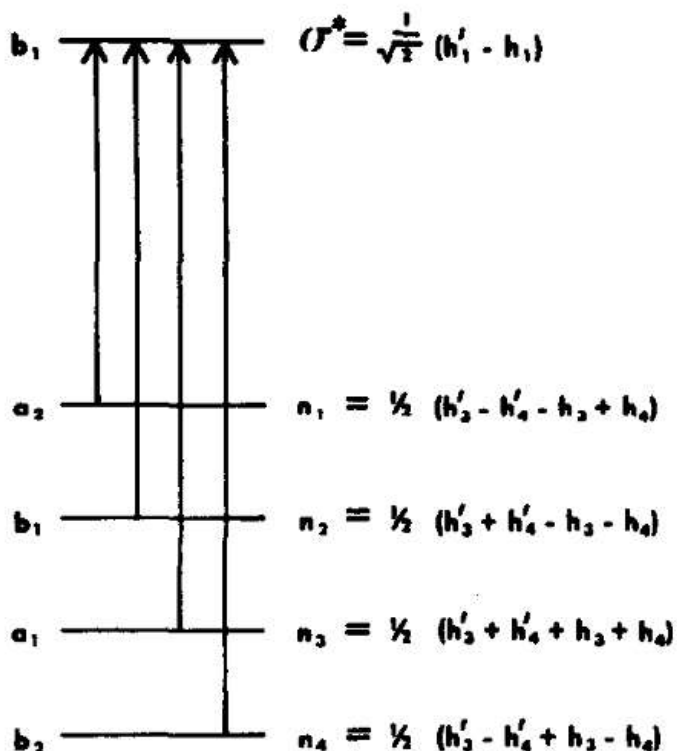
- apesar de proibidas, possuem m muito fortes, dependendo do ângulo diedral
- ~230-240 nm



pares não-ligados em σ^*

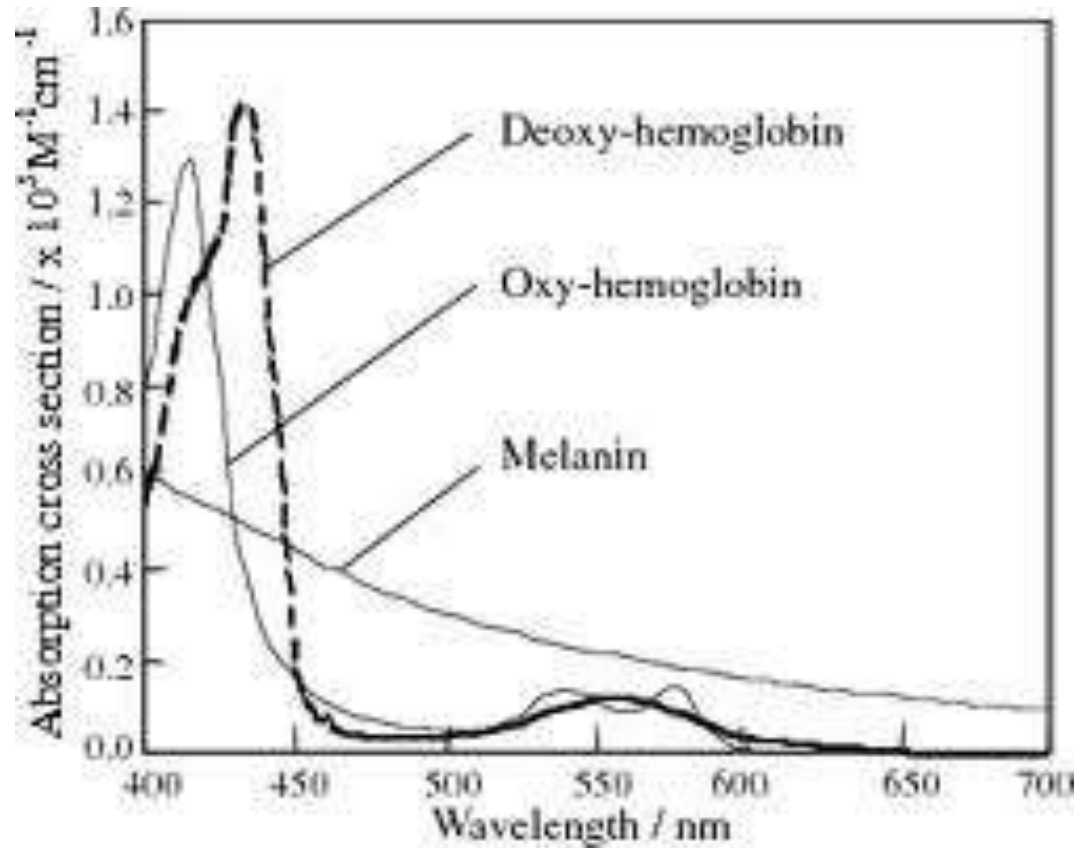


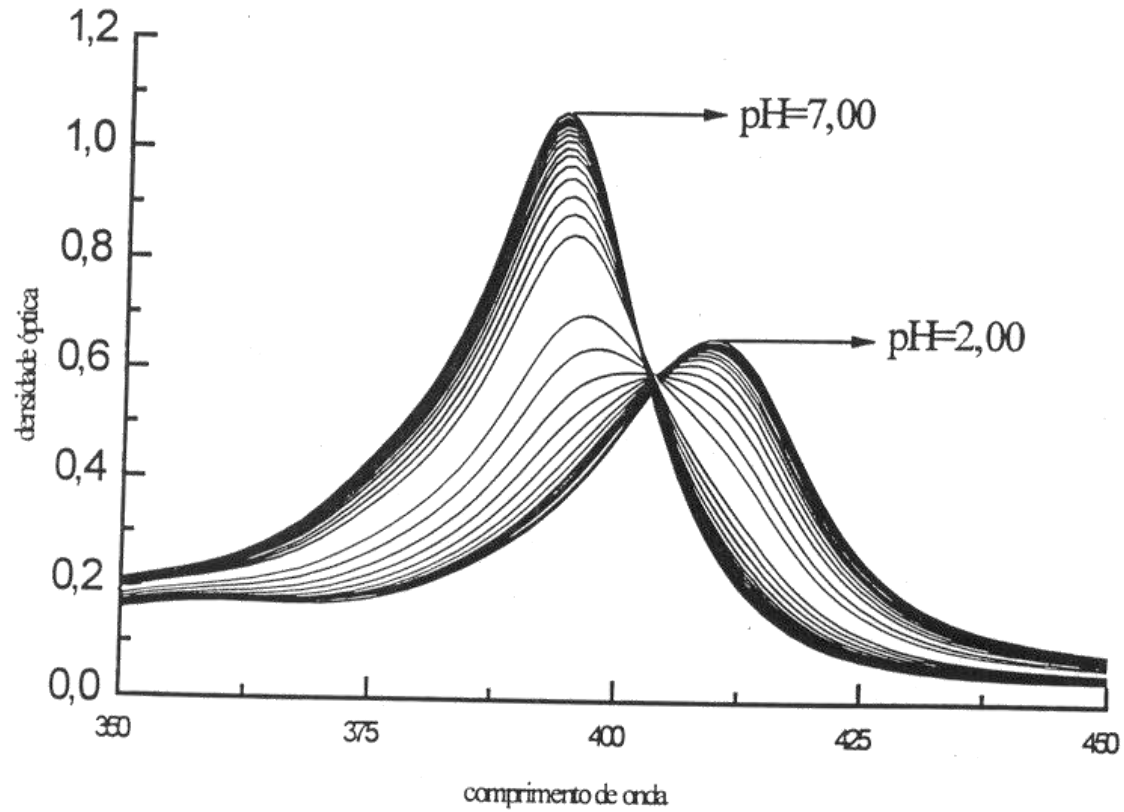
$$\sigma^* = \frac{1}{\sqrt{2}} (h_1' - h_1)$$

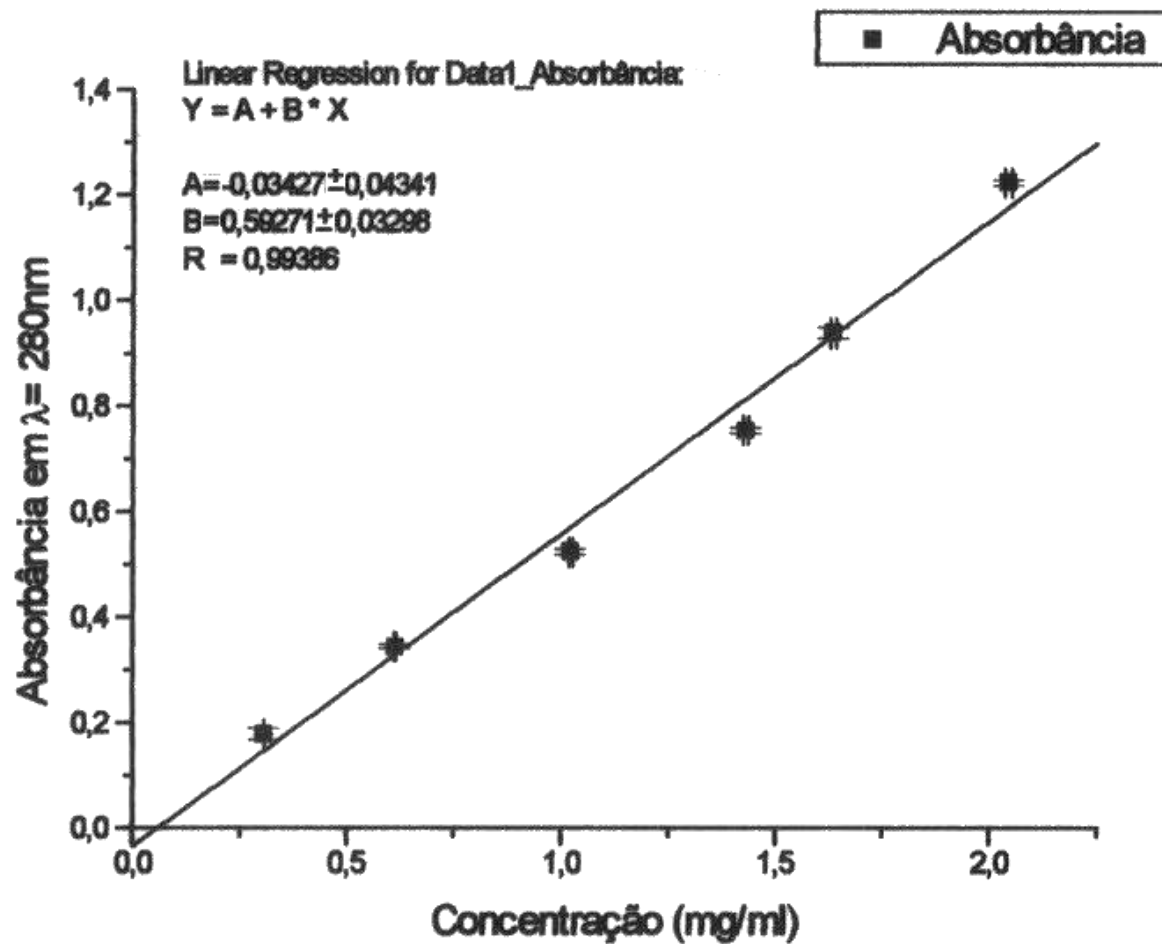




ESPECTROS DE ABSORÇÃO









Referências

Além das citadas nos *slides* temos:

1. Principles of Fluorescence (J.R. Lakowicz)
1. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (G.D. Fasman)
1. Circular Dichroism: Principles and Applications (Nina Berova, Koji Nakanishi, Robert W. Woody)
1. Principles of Physical Biochemistry (Kensal van Holde)