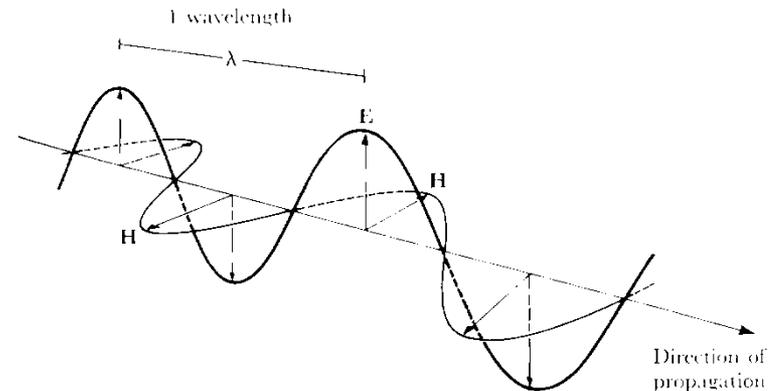


Espectrofotometría UV-Vis

- Tránsitos entre estados electrónicos que afectan a electrones en las capas mas externas, generalmente los implicados en establecer enlaces covalentes.
- La radiación usada incluye la luz “natural” visible, de ahí el término “foto”.
- Se pretende correlacionar la absorción espectrofotométrica con la estructura de la molécula objeto de estudio para su identificación y su cuantificación.
- Vuelta al modelo ondulatorio de la radiación electromagnética: La luz “natural” no es ni monocromática ni está polarizada ... complicaciones. Perdida de la dependencia con la orientación.... Uso de monocromadores para seleccionar la λ . Otras complicaciones derivadas de la naturaleza de las muestras biológicas (disoluciones con disolventes, recipientes, etc. que también absorben y deben seleccionarse con las mejores propiedades posibles para que no interfieran)

Bibliografía específica adicional recomendada:
"An introduction to Spectroscopy for Biochemists",
S.B. Brown, Academic Press.



Espectrofotometría UV-Vis

Posibilidades de interacción: complejidad.

- Luz (radiación) “dispersada”: reflexión, refracción, dispersión en sentido estricto (scattering) de varios tipos, con distinta dirección de propagación y con la misma o distinta (Raman) frecuencia. Uso de disoluciones “transparentes” en lo posible.
- Luz “absorbida” y posteriormente disipada en forma de calor (aumenta la temperatura) o de luz emitida (fluorescencia o fosforescencia). También puede haber reacciones fotoquímicas deseables (retinales en visión) o indeseables (reacciones de fotólisis de la muestra, con disociación y rotura de enlaces). Precaución con las radiaciones más energéticas ...

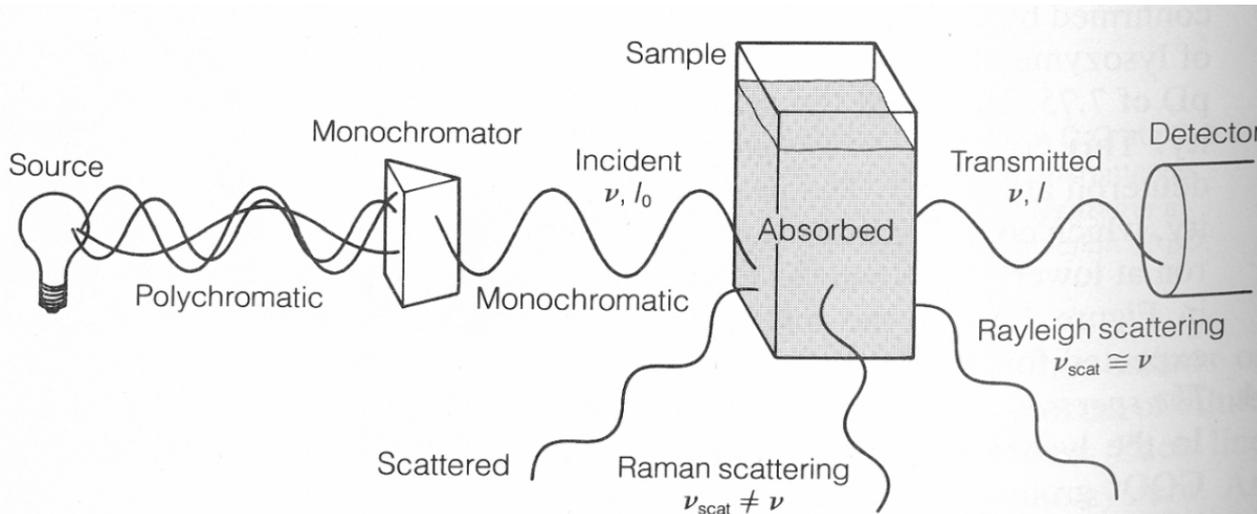


FIGURE 12 - 3

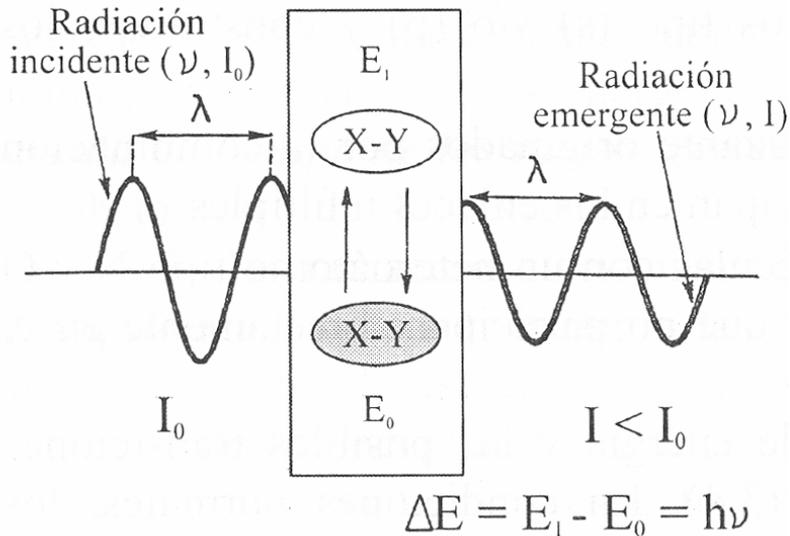
Various effects that occur when light interacts with matter. The monochromator selects light of a single frequency from the polychromatic source. Some light is absorbed, some is scattered, and some is transmitted. The transmitted intensity I is less than the incident intensity I_0 , because of absorption and scattering.

Espectrofotometría UV-Vis

Intensidad de la radiación:

-La intensidad de la radiación se define como la cantidad de energía que atraviesa por unidad de tiempo una unidad de superficie colocada perpendicularmente al eje de propagación de la radiación.

-Relación entre las intensidades de la luz incidente y saliente, asumiendo que solo se da un fenómeno de absorción



$I = I_0 \exp(-k.l)$, es decir $\log_{10}(I_0/I) = k.l$, donde k es el coeficiente de absorción y l el espesor de la muestra.

Ley de Lambert-Beer

En disolución, el coeficiente de absorción (k) es proporcional a la concentración:

$k = \varepsilon \cdot C$, es decir $\log_{10}(I_0/I) = \varepsilon \cdot C \cdot l$

$$A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)} c l$$

Espectrofotometría UV-Vis

$$\log_{10}(I_0/I) = A_\lambda = \varepsilon_{(\lambda)} c l$$

Valores límite de la absorbancia:

- Para $I_0 = I$ (no hay absorción); $\log_{10}(I_0/I) = 0$, es decir $A = 0$
- Para $I \ll I_0$ (mucho absorción); $\log_{10}(I_0/I)$ tiende a infinito.

Significado físico de $\varepsilon_{(\lambda)}$. Dado que $A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)} c l$; para $c = 1 \text{ M}$ (y $l = 1 \text{ cm}$), $A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)}$

- $\varepsilon_{(\lambda)}$ debería ser una constante, independiente de la concentración.
- Cálculo gráfico a partir de la pendiente de una representación de $A_{(\lambda)}$ versus c .
- Unidades $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Otros ε posibles, dependiendo de como se exprese la concentración.

Otras medidas de la absorción:

- Transmitancia (T): $T = I/I_0$
 - cuando $I = 0$, $T = 0$ (absorción total, no hay transmisión)
 - cuando $I = I_0$, $T = 1$ (no hay absorción, se transmite todo)
 - generalmente se expresa en porcentajes $\% T = 100 \cdot I/I_0$
- Densidad óptica (OD): es simplemente la Absorbancia para $l = 1$.

Espectrofotometría UV-Vis

Componentes de un espectrofotómetro

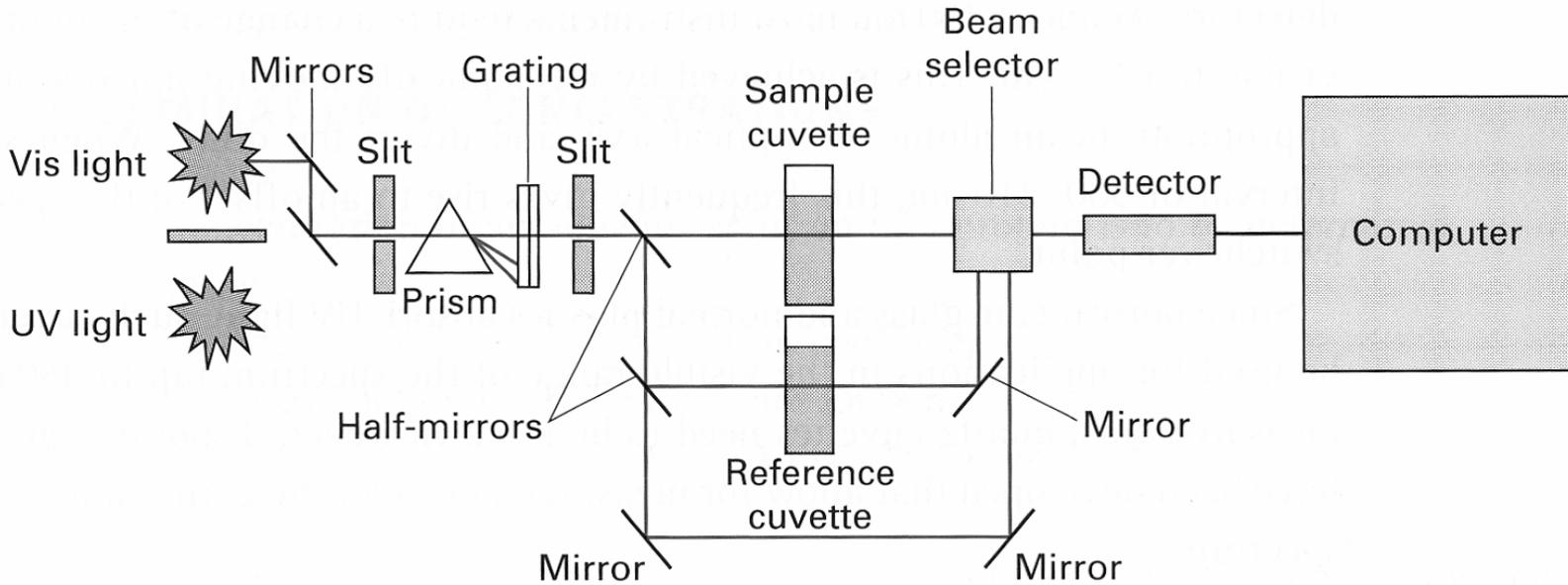
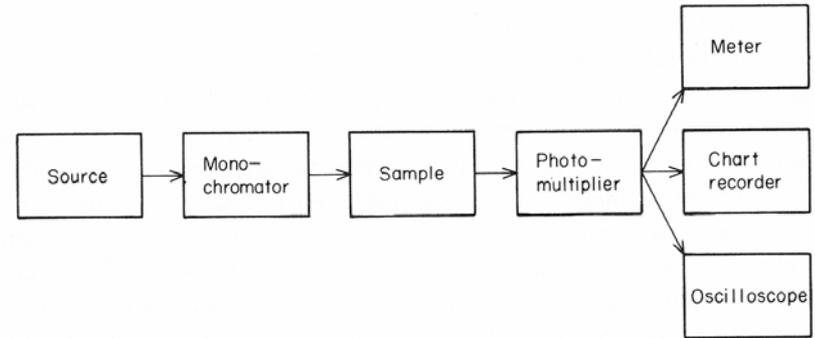


Fig. 12.6 Optical arrangements in a dual-beam spectrophotometer. Either a prism or a grating constitutes the monochromator of the instrument. Optical paths are shown as green lines.

Espectrofotometría UV-Vis

Componentes de un espectrofotómetro

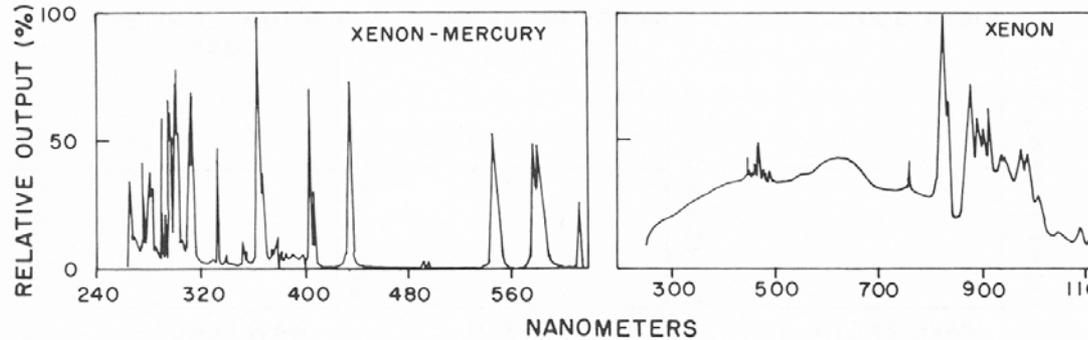
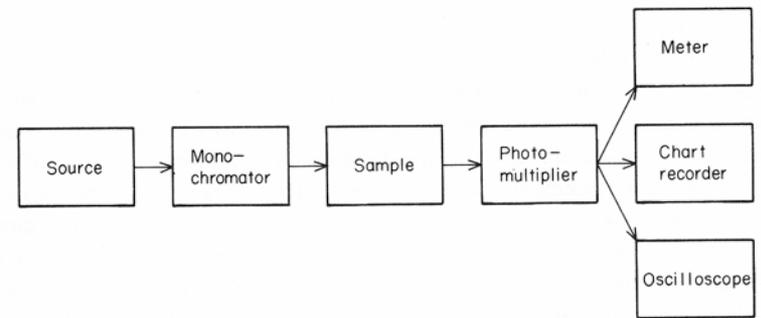
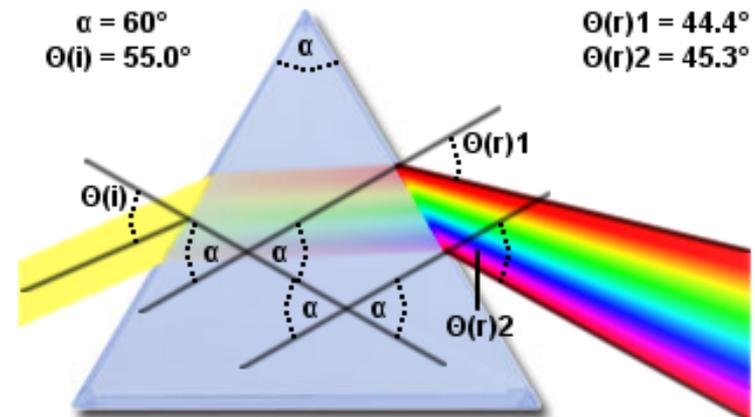


Figure 2.3. Spectral output of arc lamps. Outputs are shown for a xenon lamp and for mercury-xenon lamp. (Redrawn from Kratos technical literature.)



Espectrofotometría UV-Vis

Componentes de un espectrofotómetro

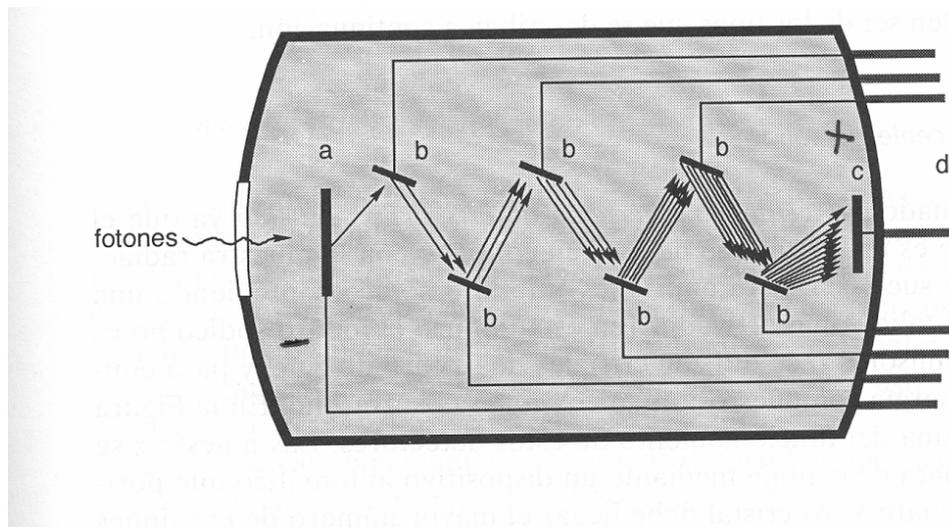
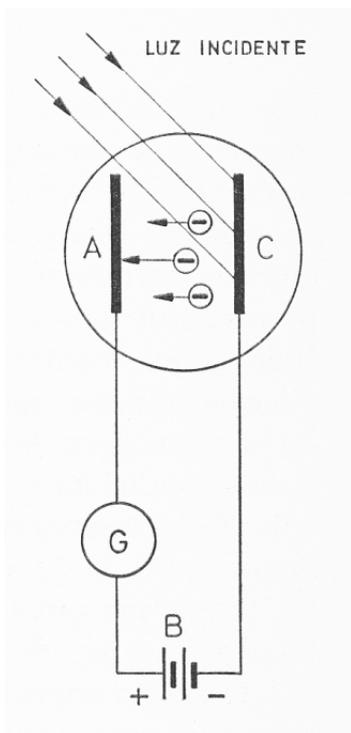
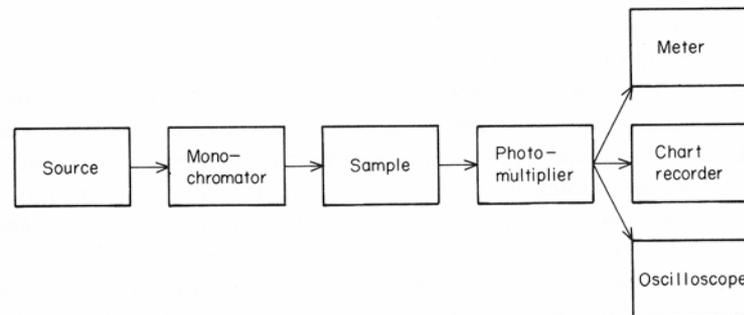
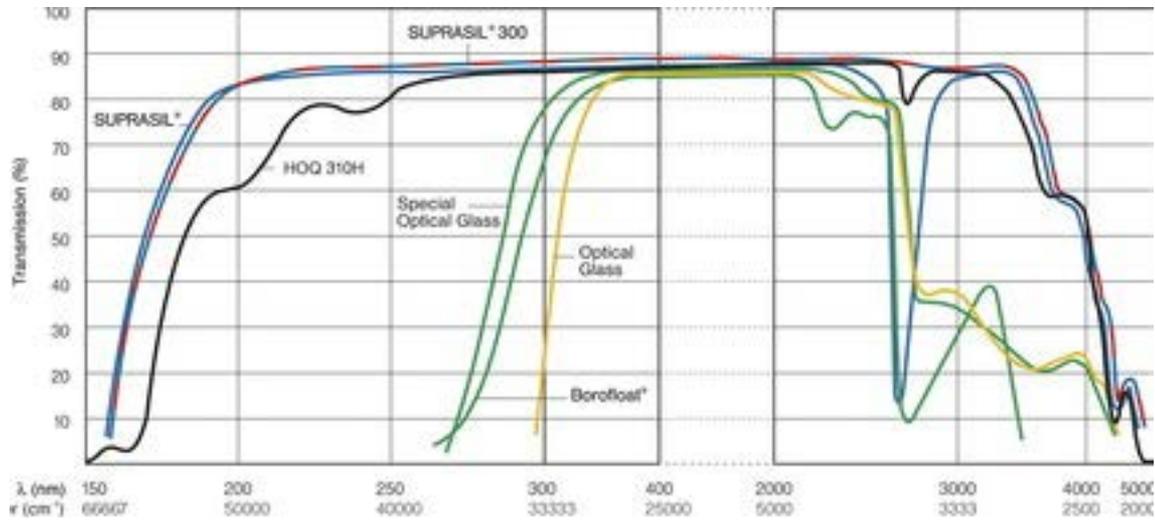
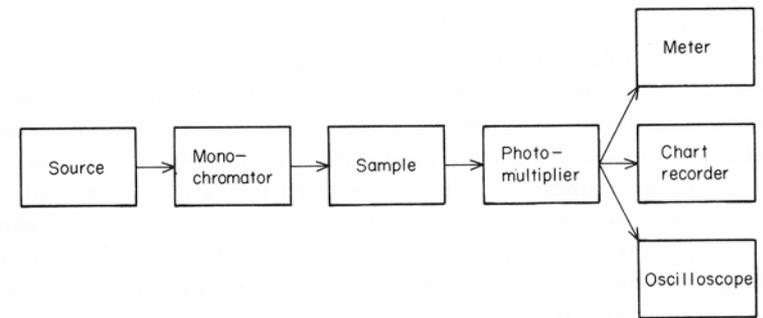


FIGURA 1.6. Esquema de un fotomultiplicador. Las flechas representan electrones liberados en cada dínodo (b). El primero de éstos es el fotocátodo (a), y el último el ánodo (c). Como resultado final, la señal luminosa se transforma en señal eléctrica (d).

Espectrofotometría UV-Vis

Componentes de un espectrofotómetro:

Breve comentario a cubetas, registros, etc.



Espectrofotometría UV-Vis

Componentes de un espectrofotómetro

- Posibilidades de medida: a una λ determinada o todo el espectro:
- Respuesta de los componentes.

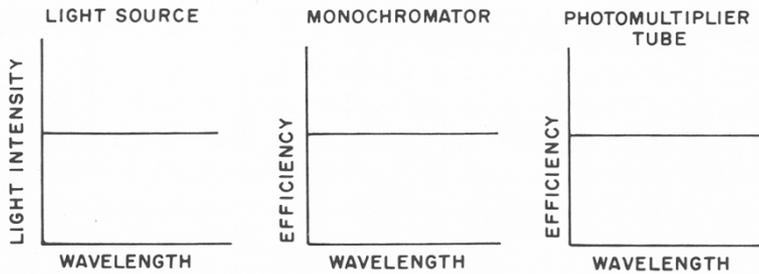
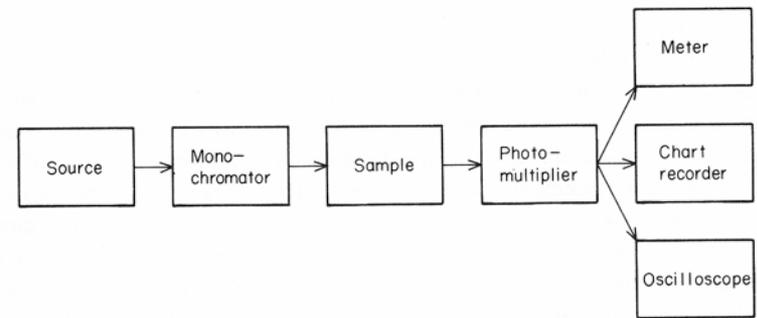


Figure 2.2. Properties of ideal components for a spectrofluorometer.

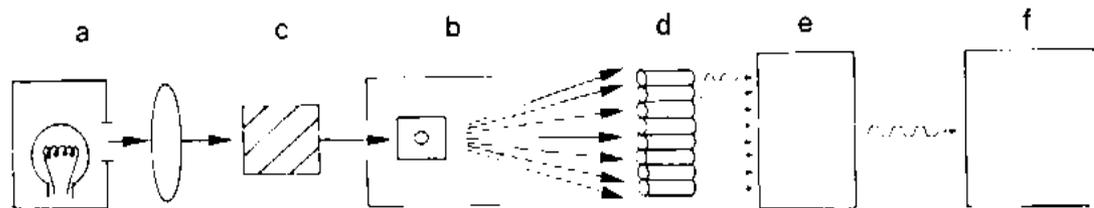


Fig. 2 Diode array spectrophotometer system: schematic diagram: a, light source; b, grating; c, sample compartment; d, diode detector array; e, amplifier and multiple memory system; f, recorder system (storage oscilloscope or printer-plotter)

Espectrofotometría UV-Vis

Incumplimiento de la Ley de Beer-Lambert: 1) Coeficiente de extinción dependiente de la concentración

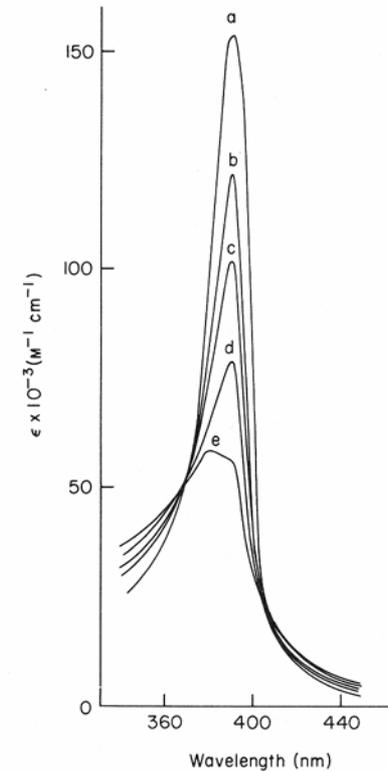
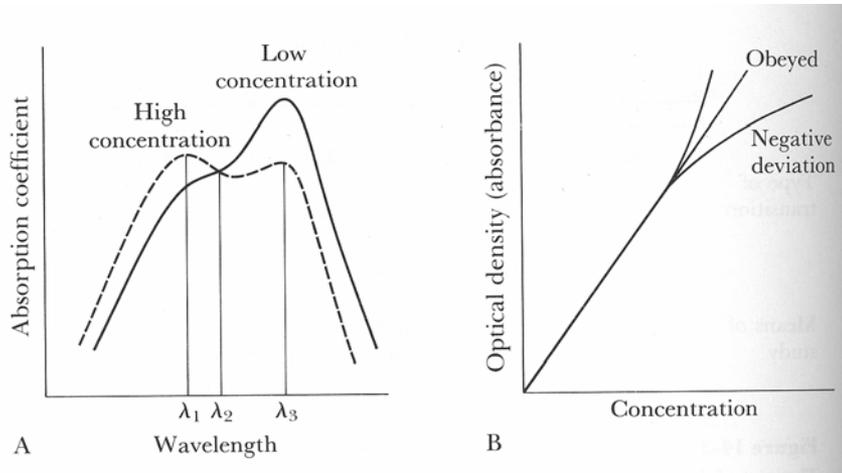


FIG. 2.24 Spectra of coproferrihaem in phosphate buffer (pH 6.97) showing variation due to aggregation. Concentrations were (a) $3.97 \times 10^{-8} \text{M}$; (b) $6.36 \times 10^{-6} \text{M}$; (c) $2.78 \times 10^{-5} \text{M}$; (d) $9.93 \times 10^{-5} \text{M}$; (e) $3.18 \times 10^{-4} \text{M}$.

Espectrofotometría UV-Vis

Incumplimiento de la Ley de Beer-Lambert: 2) Soluciones no-transparentes (scattering)

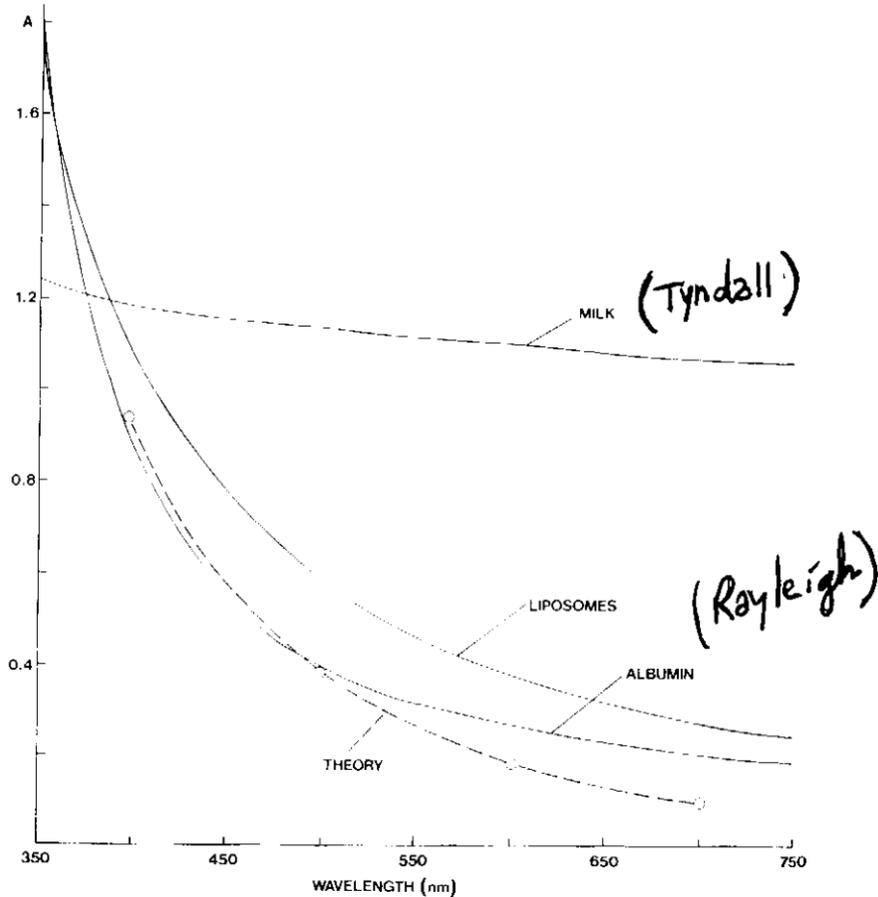


Fig. 8 Three light-scattering curves compared with the predicted Rayleigh behaviour: diluted milk (triglyceride globules), 'Tyndall' (wavelength-independent) scattering; liposomes (phospholipid vesicles, approx. 14 mg ml⁻¹ phospholipid mixture in 0.2 M phosphate buffer); protein (20% serum albumin plus 3% H₂O₂ to destroy small amounts of pigment); O---O a theoretical curve for pure 'Rayleigh' (wavelength-dependent) scattering. Pye Unicam SP800 spectrophotometer: 'distant' cuvette position (Nicholls, 1982)

Tipos de scattering:

-Raman (cambia λ ; espectroscopia Raman)

-Tyndall (diámetro $\geq \lambda/4$)

-Rayleigh (diámetro $\leq \lambda/4$; Abs. aparente = $B + C/\lambda^n$, donde n suele ser igual a 4)

Nota: No hay especies absorbentes, solo scattering.

Espectrofotometría UV-Vis

Incumplimiento de la Ley de Beer-Lambert: 2) Soluciones no-transparentes (scattering)

Correcciones

Caso habitual

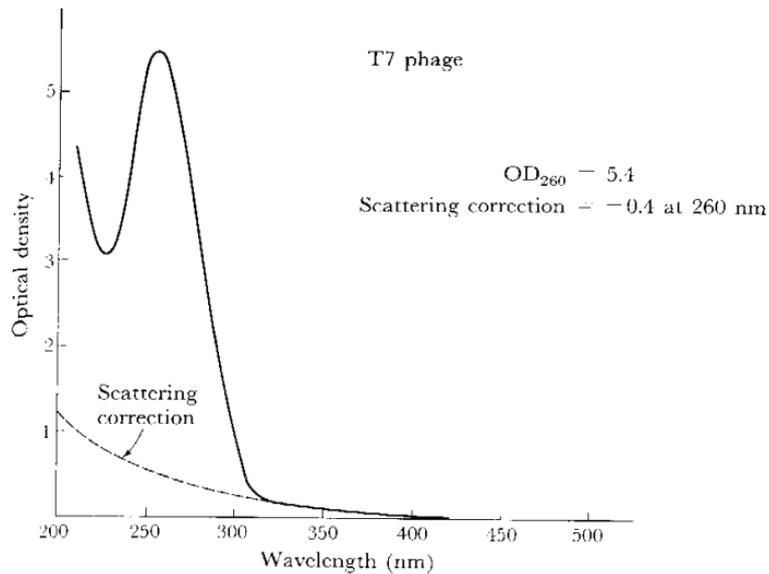


Figure 14-10
Spectrum of *E. coli* phage T7 showing the λ^{-4} Rayleigh scattering correction.

Caso mixto

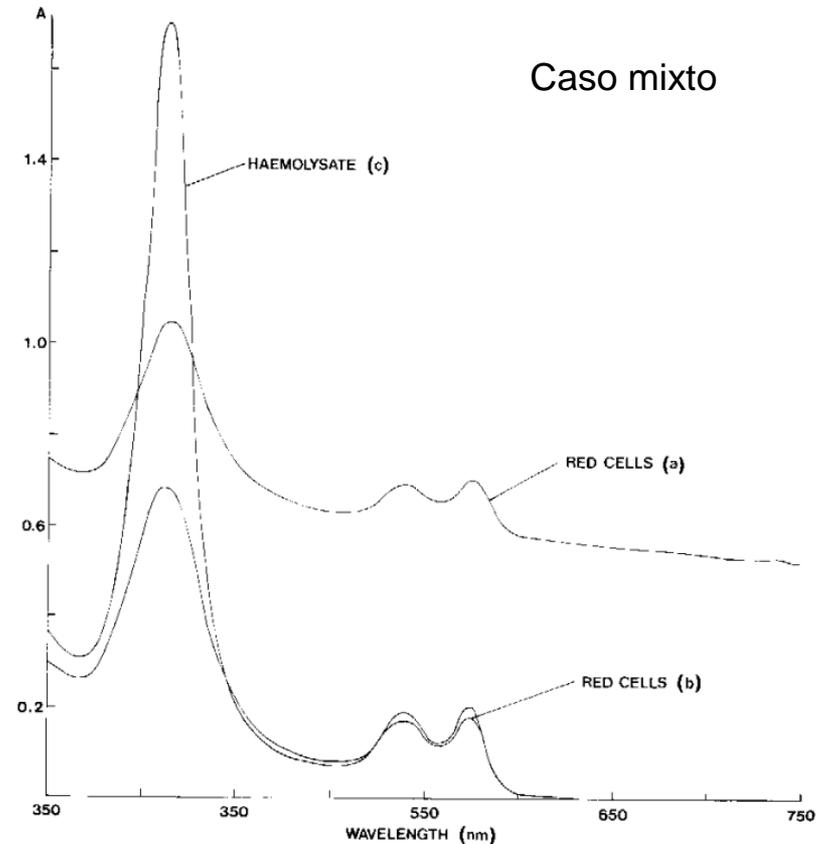


Fig. 9 Light-scattering effects in a pigment-containing system: diluted red cells compared with haemolysate. Red cells (a): human erythrocytes diluted in saline, 'distant' cuvette position; red cells (b): as in (a) but in 'close' cuvette position (near to PM tube); haemolysate (c) (cells as in (a) but with addition of a few mg sodium deoxycholate): 'distant' cuvette position. Note 'increase' in Soret (414 nm) band. Pye Unicam SP800 scanning spectrophotometer (Nicholls, 1982)

Espectrofotometría UV-Vis

Recordatorio OA: características principales e hibridación

-Capa electrónica o nivel principal:
 $n = 1, 2, 3, \dots$

-Numero cuántico secundario o del momento angular (forma del orbital: s, p, d, etc.)
 $l = 0, 1, \dots n-1$

-Número cuántico magnético (orientación)
 $m = -l, \dots 0, \dots +l$

-Número cuántico de spin (giro del electrón)
 $+1/2, -1/2$

-Principio de Exclusión de Pauli

TABLA 10
 Distribución de electrones en las tres primeras capas

Capa	n	l	Sub-nivel	m	m_s	Electrones en el subnivel	Electrones en el nivel principal
K	1	0	s	0	+1/2 -1/2	2	2
		0	s	0	+1/2 -1/2	2	8
L	2	1	p	+1 0 -1	+1/2 -1/2 +1/2 -1/2	6	
		0	s	0	+1/2 -1/2	2	
		1	p	+1 0 -1	+1/2 -1/2 +1/2 -1/2	6	
M	3	2	d	+2 +1 0 -1 -2	+1/2 -1/2 +1/2 -1/2 +1/2 -1/2	10	18

Espectrofotometría UV-Vis

Regla de Hund

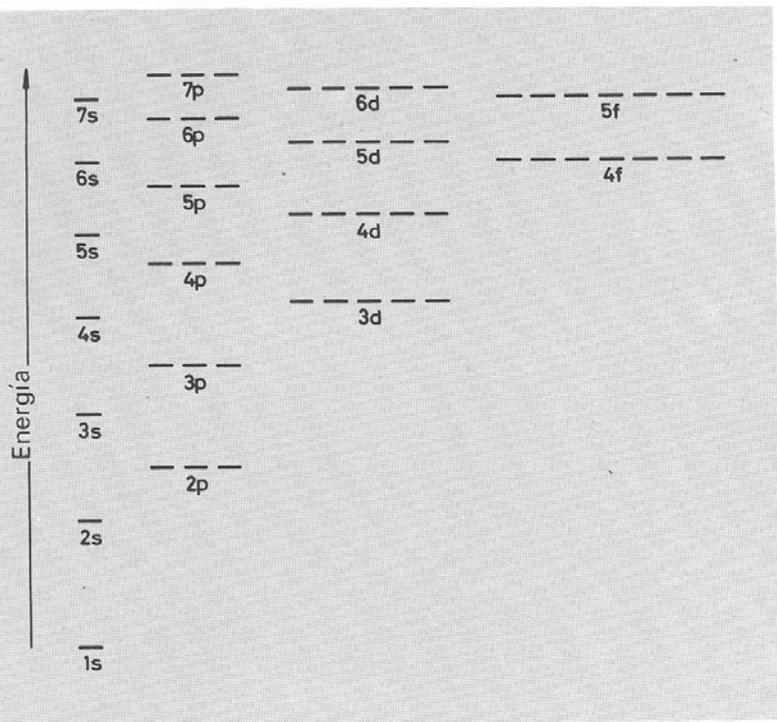


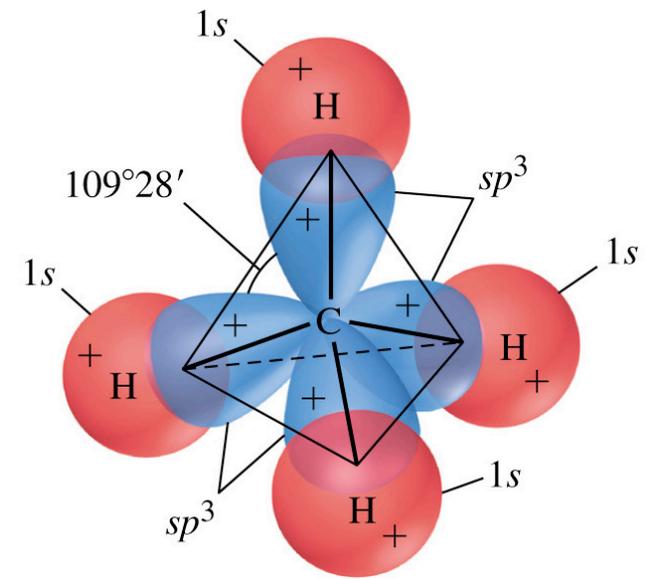
FIG. 45. Niveles de energía y degeneraciones de los orbitales atómicos.

TABLA 11
Configuraciones electrónicas de los treinta primeros elementos del sistema periódico

Elemento	Número atómico	Configuración electrónica					
		1s	2s	2p	3s	3p	3d
H	1	↑					
He	2	↑↓					
Li	3	↑↓	↑				
Be	4	↑↓	↑↓				
B	5	↑↓	↑↓	↑			
C	6	↑↓	↑↓	↑↑			
N	7	↑↓	↑↓	↑↑↓			
O	8	↑↓	↑↓	↑↑↓↓			
F	9	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑			
Ne	10	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓			
Na	11	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑		
Mg	12	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓		
Al	13	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑	
Si	14	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑	
P	15	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓	
S	16	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑	
Cl	17	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	
Ar	18	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	
K	19	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑
Ca	20	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↓
Sc	21	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑
Ti	22	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓
V	23	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑
Cr	24	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓
Mn	25	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓↑
Fe	26	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓↑↓
Co	27	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓↑↓
Ni	28	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓↑↓
Cu	29	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓↑↓
Zn	30	↑↓	↑↓	↑↑↓↓↑↓	↑↓	↑↑↓↑↓	↑↑↓↑↓↑↓

Espectrofotometría UV-Vis

Recordatorio hibridación de OA



Espectrofotometría UV-Vis

Tipos de transiciones implicadas

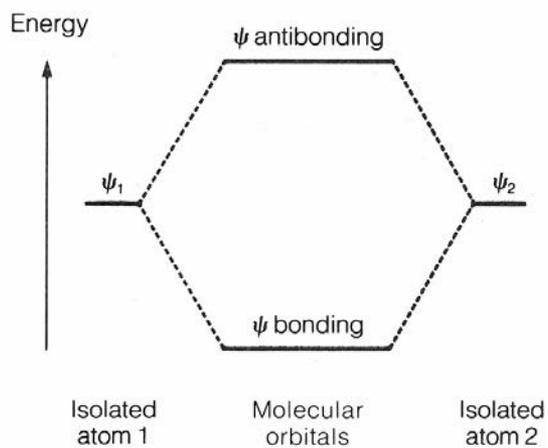
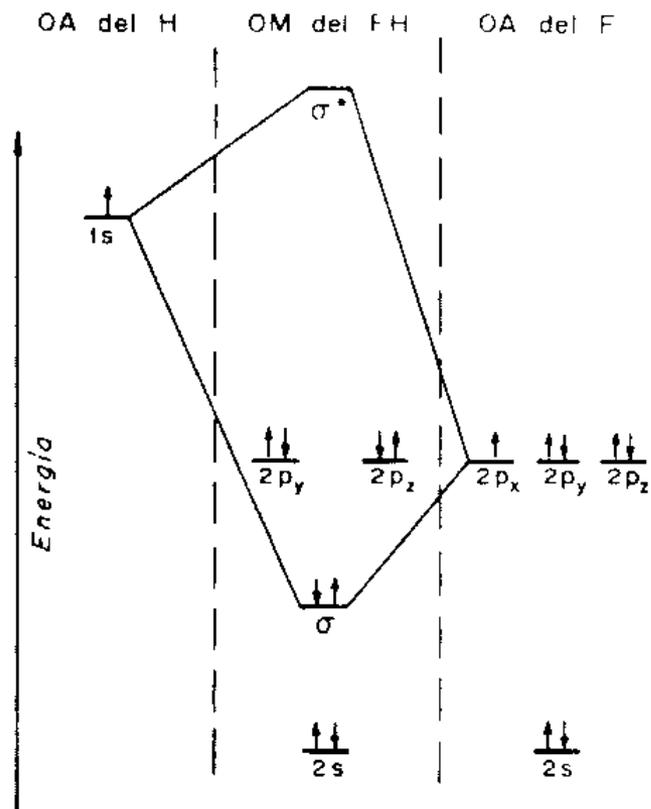


FIGURE 11-4
Formation of molecular orbitals from atomic orbitals contributed by two atoms.



Espectrofotometría UV-Vis

Características de algunos OM enlazantes y antienlazantes

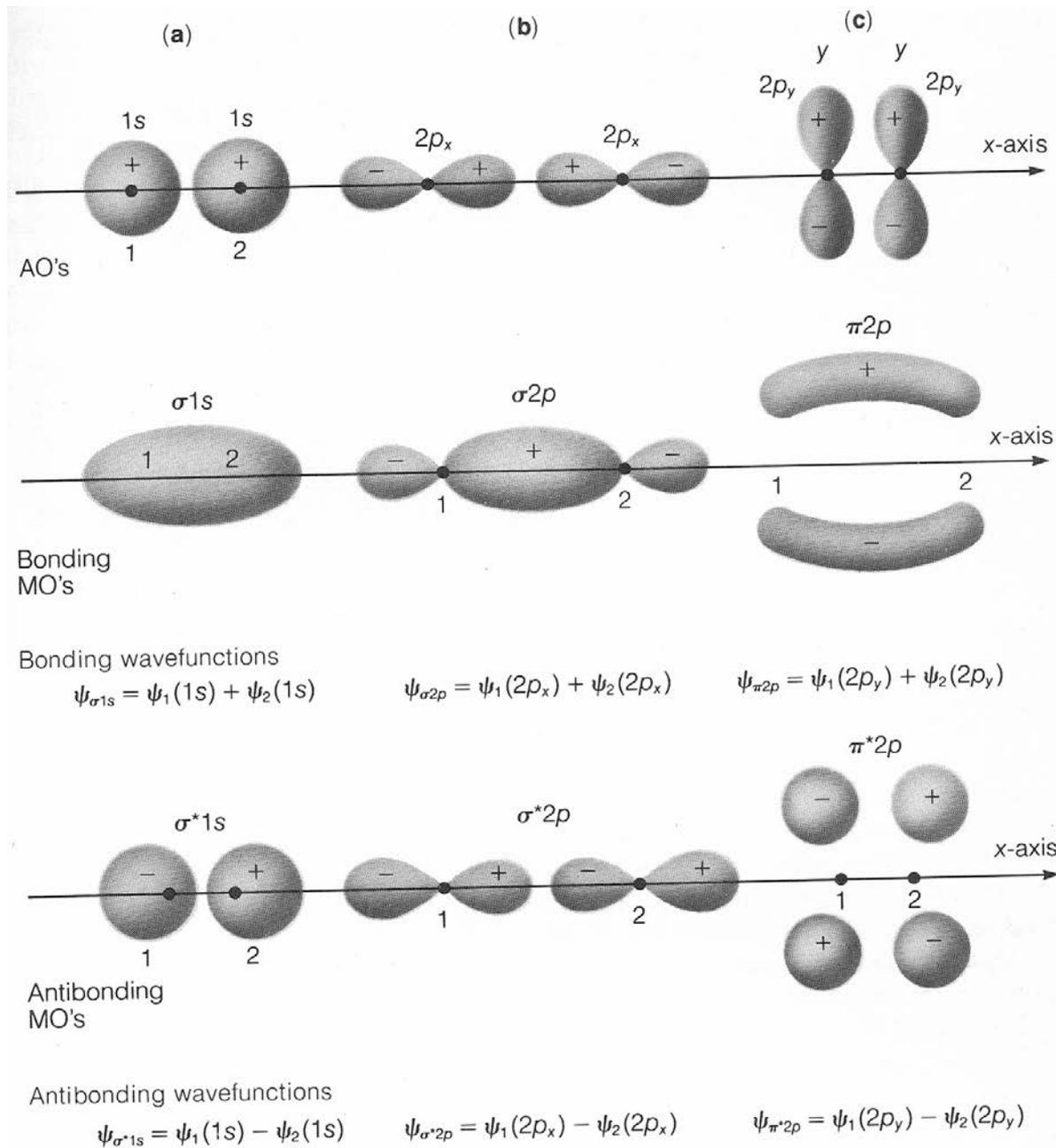


FIGURE 11-5

Formation of molecular orbitals from atomic orbitals.

Espectrofotometría UV-Vis

Orbitales y electrones disponibles para las transiciones:

- OM enlazantes (σ de enlaces simples y π de enlaces dobles): baja energía (estabilidad), ocupados por un par de electrones apareados, característicos del estado fundamental.
- OM antienlazantes (σ^* , π^*): alta energía (inestabilidad), no están ocupados por electrones, característicos del estado excitado.
- Orbitales no-enlazantes (n). Determinado elementos (oxígeno, nitrógeno, azufre, etc.) tienen además pares de electrones sin compartir en estos orbitales que también pueden transitar a estados excitados.

Orden de energías: $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$; influencia en la ΔE de la transición.

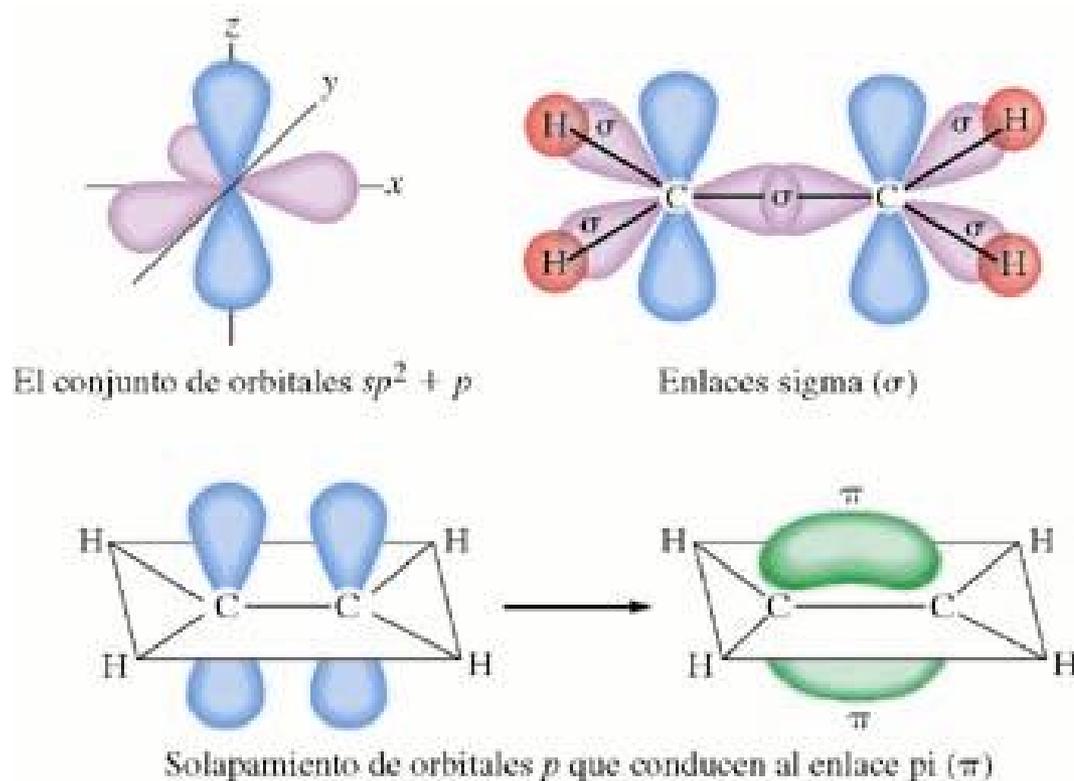
La energía concreta depende de los tipos de OA hibridados, por ejemplo: $\sigma_{1s} < \sigma_{2s} < \sigma_{2p}$

Transiciones posibles. En principio de cualquiera de los orbitales “llenos” de electrones (σ , π y n) a los “vacíos” (σ^* , π^*), pero hay transiciones prohibidas: por distinta simetría de los orbitales implicados (radial a especular, por ejemplo) o por cambio en el spín del electrón (multiplicidad). “Prohibido” quiere en realidad decir muy poco probable.

La fortaleza del enlace covalente depende del número (y solapamiento) de OM enlazantes versus no-enlazantes



Dobles o triples enlaces: Enlace C-C estabilizado por OM enlazantes σ y π : tránsitos con un menor riesgo de fotólisis



Espectrofotometría UV-Vis

TABLE 2.1 Common transitions in organic molecules

Group	Example	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Assignment
Alkane	hexane	150	—	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
Isolated olefin	ethylene	163	15 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Carbonyl	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	188	1 860	$n \rightarrow \sigma^*$
		277	12	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	CH_3NO_2	275	15	$n \rightarrow \pi^*$
Hydroxyl	CH_3OH	177	200	$n \rightarrow \sigma^*$
Sulphide	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{S}-\text{C}_2\text{H}_5$	195	4 600	$n \rightarrow \sigma^*$
Disulphide	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{S}-\text{S}-\text{C}_2\text{H}_5$	194	5 500	$n \rightarrow \sigma^*$
		250	380	$n \rightarrow \sigma^*$
Phenyl	benzene	256	230	$\pi \rightarrow \pi^*$
Carboxyl	CH_3COOH	204	45	$n \rightarrow \pi^*$
Amino	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$	195	2 500	$n \rightarrow \sigma^*$
Amide	CH_3CONH_2	205	160	$n \rightarrow \pi^*$

(The λ_{\max} value is the wavelength corresponding to the absorption peak. The values given above are only approximate since solvent effects are ignored—see p. 26)

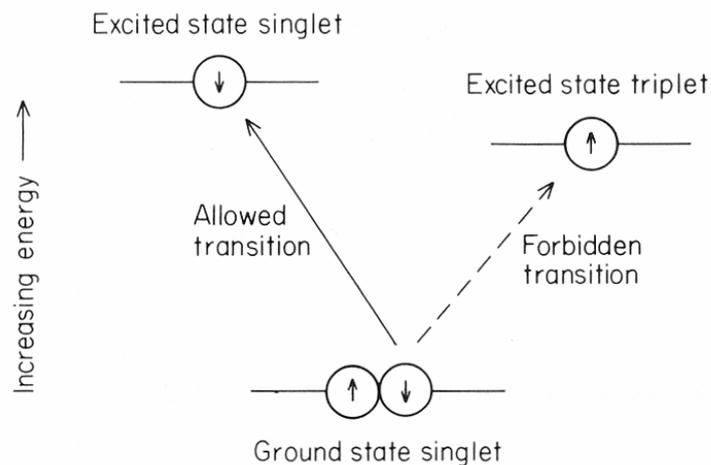


FIG. 2.1 Forbidden and allowed transitions. The selection rule also applies to the corresponding emission processes.

Espectrofotometría UV-Vis

OMs en sistemas conjugados

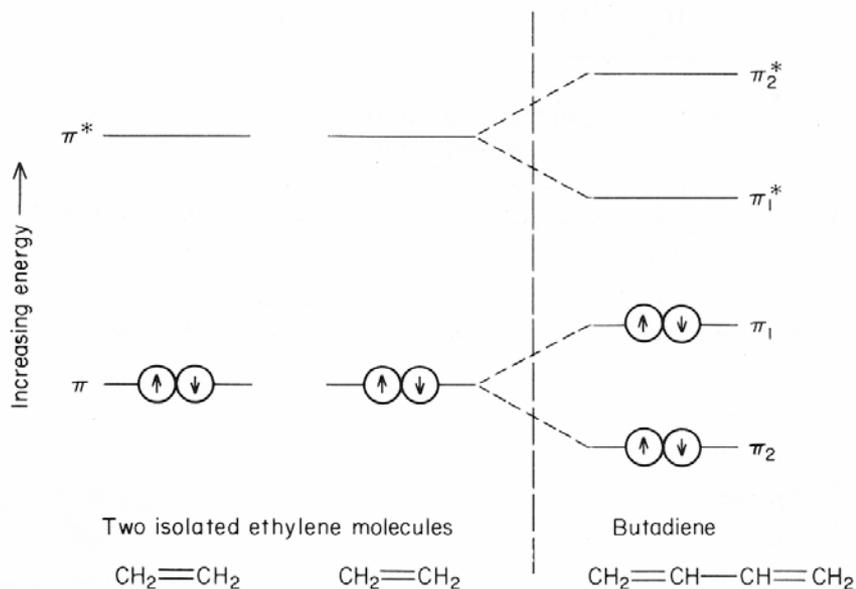


FIG. 2.2 Energy level diagram showing effect of delocalization.

TABLE 2.2 Spectral parameters of conjugated polyenes. General formula $\text{H}(\text{CH}=\text{CH})_n\text{H}$

n	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Solvent
1	163	15 000	Hexane
2	217	21 000	Hexane
3	268	56 000	Hexane
4	304	—	Hexane
5	334	118 000	Hexane
6	364	138 000	Iso-octane
7	390	—	Iso-octane
8	410	—	Iso-octane
10	447	—	Iso-octane

TABLE 2.3 Spectral parameters of aromatic conjugated systems

Compound	Structure	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Solvent
Benzene		254	204	Hexane
Styrene		282	750	Ethanol
Naphthalene		275	5 620	Ethanol
Anthracene		355	7 940	Cyclohexane
Tetracene		445	10 000	Benzene

Espectrofotometría UV-Vis

Las proteínas como cromóforos biológicos:

-El esqueleto polipeptídico

- 1)OMs π y n .
- 2)Transición dominante $\pi \rightarrow \pi^*$ a 195 nm.
- 3)Falta de selectividad y dificultades instrumentales

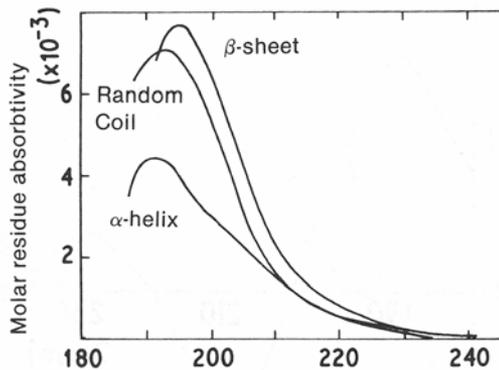
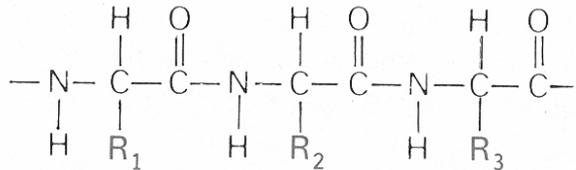


TABLE 13-2 UV Absorption Bands of Functional Groups in Proteins†

CHROMOPHORE	RESIDUES	LOCATION (nm)	log ϵ_{\max}	ASSIGNMENT
C—H	All	125 ^a	—	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
C—C	All	135 ^a	—	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
C=C	None	175 ^a	3.8	$\pi \rightarrow \pi^*$
		200 ^a	3	$\pi \rightarrow \pi^*$
O—H	{ Ser, Thr, water }	150 ^a	3.2	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
		183 ^a	2.2	$n \rightarrow \sigma^*$
N—H	{ Lys, Arg, N-terminal }	173 ^a	3.4	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
		213 ^a	2.8	$n \rightarrow \sigma^*$
S—H	CysSH	195 ^b	3.3	$n \rightarrow \sigma^*$
S ⁻	CysS ⁻	235	3.5	$n \rightarrow \sigma^*$
C—S—C	Met	205 ^b	3.3	$n \rightarrow \sigma^*$
		210 ^b	3	$n \rightarrow \sigma^*$
—S—S—	Cystine	250	2.5	$n \rightarrow \sigma^*$
		250	2.5	$n \rightarrow \sigma^*$
C=O	None	185 ^a	3	$\pi \rightarrow \pi^*$
		260	1.3	$n \rightarrow \pi^*$
COOH	{ Asp, Glu, C-terminal }	175 ^a	3.4	$n \rightarrow \pi^*$?
		205	1.6	$n \rightarrow \pi^*$
COO ⁻	{ Asp, Glu, C-terminal }	200 ^b	2	$n \rightarrow \pi^*$
		200 ^b	2	$n \rightarrow \pi^*$
CONH	{ AspNH ₂ , GluNH ₂ , peptide bond }	162 ^a	3.8	$\pi^+ \rightarrow \pi^*$
		188	3.9	$\pi^o \rightarrow \pi^*$
		225 ^c	2.6	$n \rightarrow \pi^*$
Phenyl	Phe	188	4.8	$\pi \rightarrow \pi^*$
		206	3.9	
		261	2.35	
Phenolic	TyrOH	193	4.7	$\pi \rightarrow \pi^*$
		222	3.9	
		270	3.16	
Phenolic	TyrO ⁻	200 [?]	5	$\pi \rightarrow \pi^*$
		235	3.97	
		287	3.41	
Indole	Trp	195	4.3	$\pi \rightarrow \pi^*$
		220	4.53	
		280	3.7	
Imidazole	His	286	3.3	$\pi \rightarrow \pi^*$?
		211	3.78	

Espectrofotometría UV-Vis

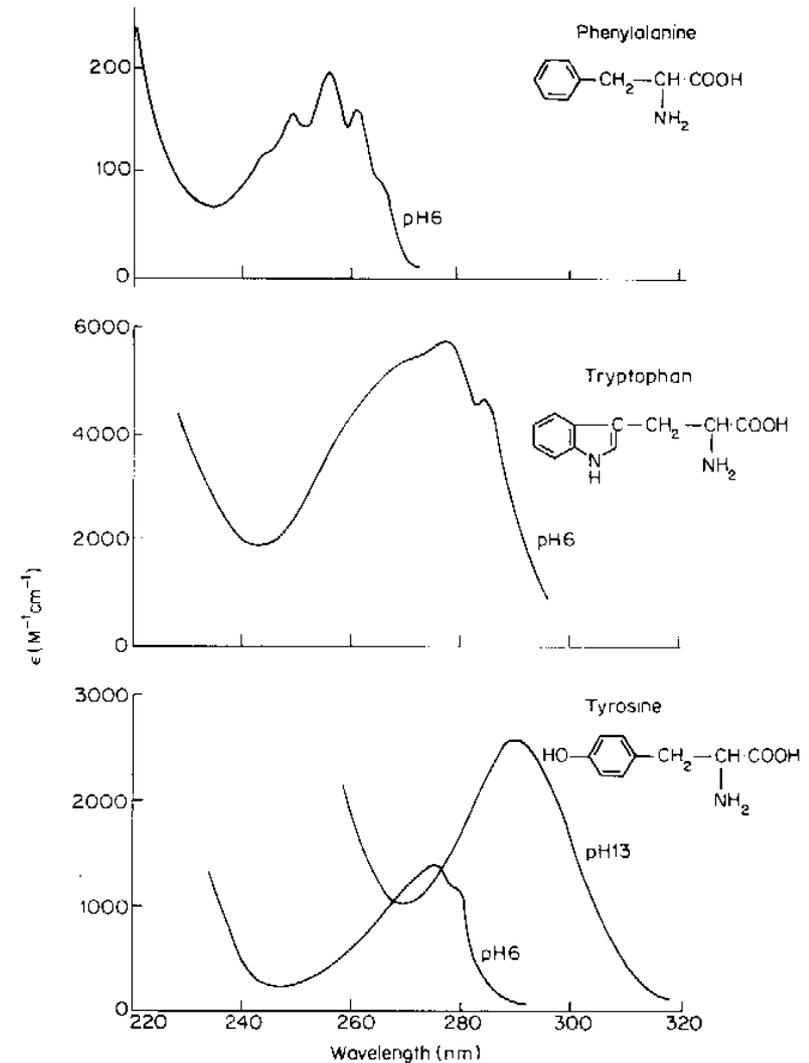
Las proteínas como cromóforos biológicos:

-Cadenas laterales que absorben en el UV lejano: sin interés.

- Cadenas laterales que absorben en el UV próximo (aminoácidos aromáticos):
“Selectividad” y “efecto del medio”.

TABLE 2.7 Spectral details of amino acids in neutral aqueous solution

Amino Acid	Chromophore	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Assignment
Cysteine	S^-	235	3 200	$n \rightarrow \sigma^*$
Cystine	$-S-S-$	250	320	$n \rightarrow \sigma^*$
Phenylalanine	phenyl	257	220	$\pi \rightarrow \pi^*$
Tyrosine	phenolic	274	1 440	$\pi \rightarrow \pi^*$
Tryptophan	indole	280	7 900	$\pi \rightarrow \pi^*$
Histidine	imidazole	211	6 300	$\pi \rightarrow \pi^*$



Espectrofotometría UV-Vis

Aplicaciones obvias de la absorción a 280 nm de los residuos aromáticos de una proteína

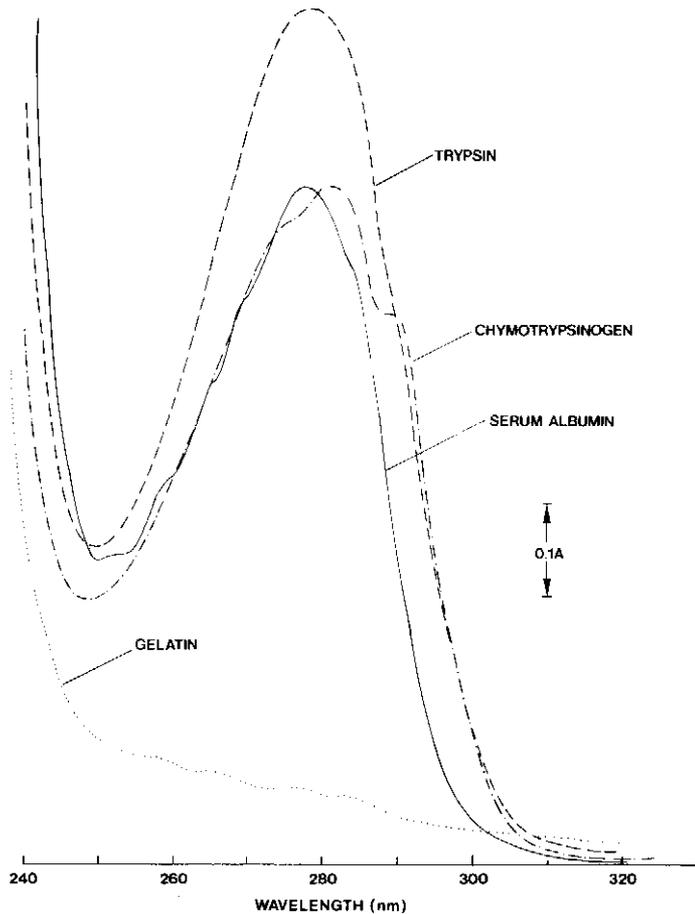


Table 4 Aromatic amino acid contents of four proteins (see Fig. 16B)

Protein	% phenylalanine	% tyrosine	% tryptophane
(a) Bovine serum albumin*	6.4	3.5	0.2
(b) Porcine trypsin*	1.8	3.6	0.9
(c) Chymotrypsinogen*	2.3	1.5	3.0
(d) Gelatin*	<1.0	<0.5	<0.1
(e) Calmodulin†	4.8–7.0	1.3	0.0

* Spectrum in Fig. 16B

† Spectrum in Fig. 3 of Jarrett and Penniston (1978)

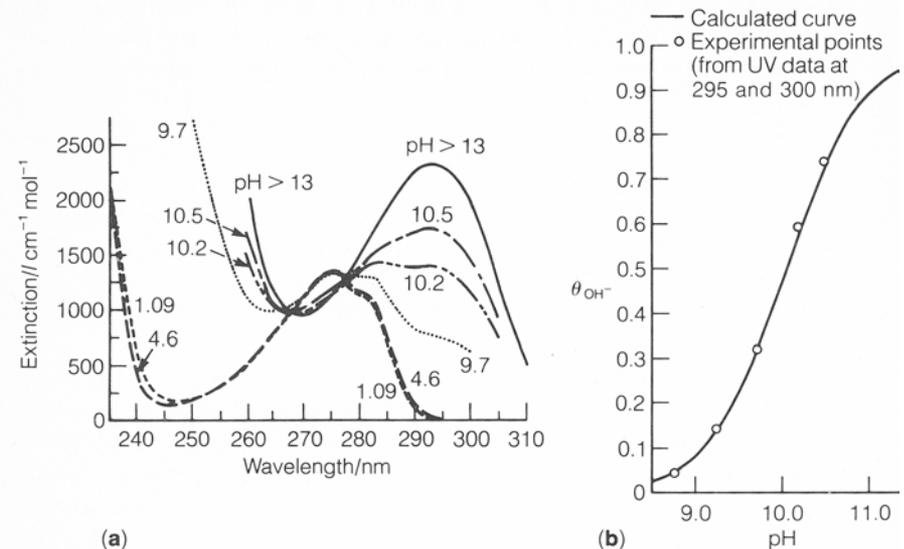


FIGURE 13-12

Spectrophotometric titration of glycyl-L-tyrosine at 25°C, with an ionic strength of 0.16. (a) Extinction spectra of the dipeptide at indicated pH values. (b) The fractional titration α of the phenolic hydroxyl group determined from the data of (a). (From Edsall and Wyman, 1958, based on data of B. H. Gibbons.)

Espectrofotometría UV-Vis

Mas aplicaciones: Determinación del número de Trp y Tyr en una proteína; soluciones simples a un problema analítico complejo.

a) A la λ_{\max} del Tyr⁻ (290 nm) hay una pequeña contribución del Trp. Se hace una medida a pH ácido y otra a pH suficientemente básico. La ΔA_{290} solo se debe a las Tyr presentes, dado que la contribución del Trp es constante

$$\Delta A_{290} = \varepsilon (\text{Tyr})_{290} \cdot C \cdot l$$

b) Hay un punto isobéptico Trp/Tyr⁻ a 294,4 nm, luego

A pH básico; $A_{294,4} = A(\text{Trp})_{294,4} + A(\text{Tyr})_{294,4} = \varepsilon_{294,4} \cdot a$; donde a es la suma de las concentraciones de Trp y Tyr⁻.

A pH neutro; $A_{280} = A(\text{Trp})_{280} + A(\text{Tyr})_{280} = \varepsilon (\text{Trp})_{280} \cdot b + \varepsilon (\text{Tyr})_{280} \cdot (a-b)$; donde b es la concentración de Trp.

Suelen utilizarse valores de ε de aminoácidos libres; preferible usar proteínas desnaturalizadas con urea, cloruro de guanidinio, etc.

Espectrofotometría UV-Vis

Efectos del disolvente y accesibilidad

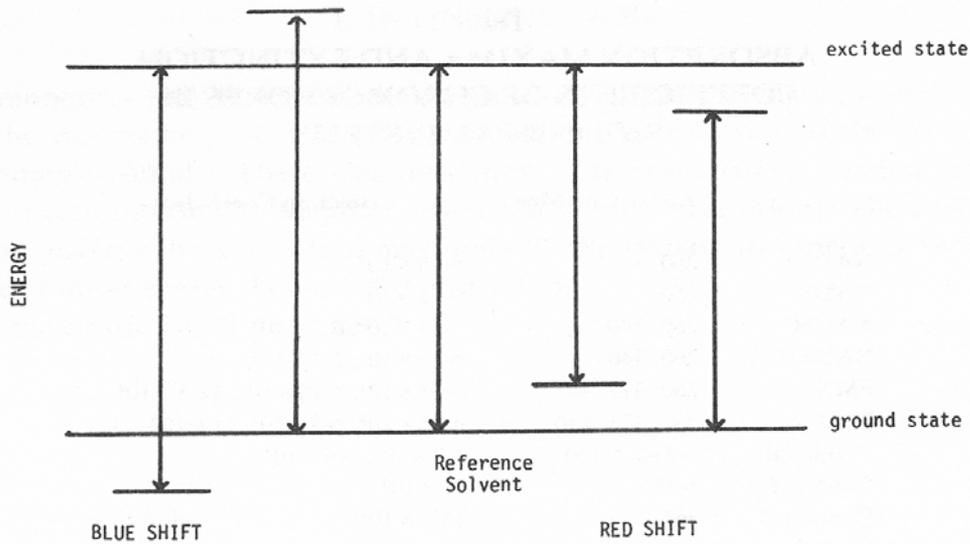


FIGURE 1. Possible solvent effects on ground state of excited state energy levels.

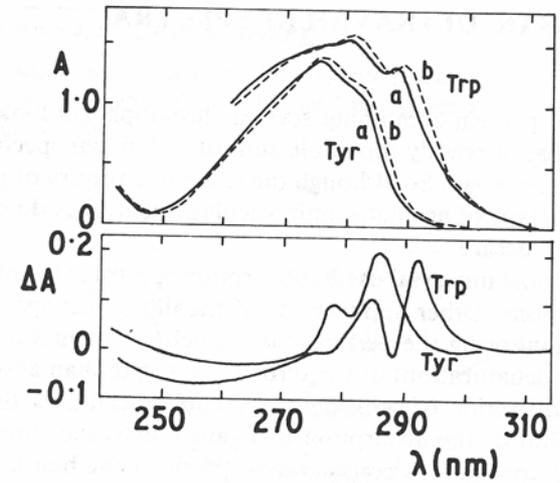


Figure 4.8 Absorption spectra of tryptophan and tyrosine in water (solid line), and 20% dimethyl sulphoxide (dotted line) and the resulting difference spectra

Espectrofotometría UV-Vis

Table 14-2

Empirical rules for the interpretation of the absorption spectra of biological macromolecules.

1. If the amino acids tryptophan, tyrosine, phenylalanine, and histidine are shifted to a less polar environment, λ_{\max} and ϵ increase. Hence:
 - a. If the spectrum of an amino acid in a protein in a polar solvent shows that λ_{\max} and ϵ are higher than they are for the free amino acid in the same solvent, then that amino acid must be in an internal region of the protein ("buried") and surrounded by nonpolar amino acids.
 - b. If the spectrum of a protein is sensitive to changes in the polarity of the solvent, the amino acid showing the change in λ_{\max} and ϵ must be on the surface of the protein.

To make use of this rule, it must be ascertained that the change in polarity does not cause a conformational change that could bring an internal amino acid to the surface. Such changes do not usually occur with the solvents used.

2. For amino acids, λ_{\max} and ϵ always increase if a titratable group (e.g., the OH of tyrosine, imidazole of histidine, and SH of cysteine) is charged. Hence, when the pH is changed:
 - a. If no spectral change is observed for one of these chromophores and if the pH change is such that titration of a free amino acid would have occurred, the chromophore must be buried in a nonpolar region of the protein.
 - b. If the spectral change as a function of pH indicates that the ionizable group has the same pK as it would if free in solution, then the amino acid is on the surface of the protein.
 - c. If the spectral change as a function of pH indicates a very different pK, then the amino acid is likely to be in a strongly polar environment (e.g., a tyrosine surrounded by carboxyl groups).
3. For purines and pyrimidines, ϵ decreases as their ring systems become parallel and nearer to one another (more stacked). The value of ϵ decreases in the following series: free base > base in an unstacked single-stranded polynucleotide > base in a stacked single-stranded polynucleotide > base in a double-stranded polynucleotide.

Espectrofotometría UV-Vis

Espectroscopia de diferencia

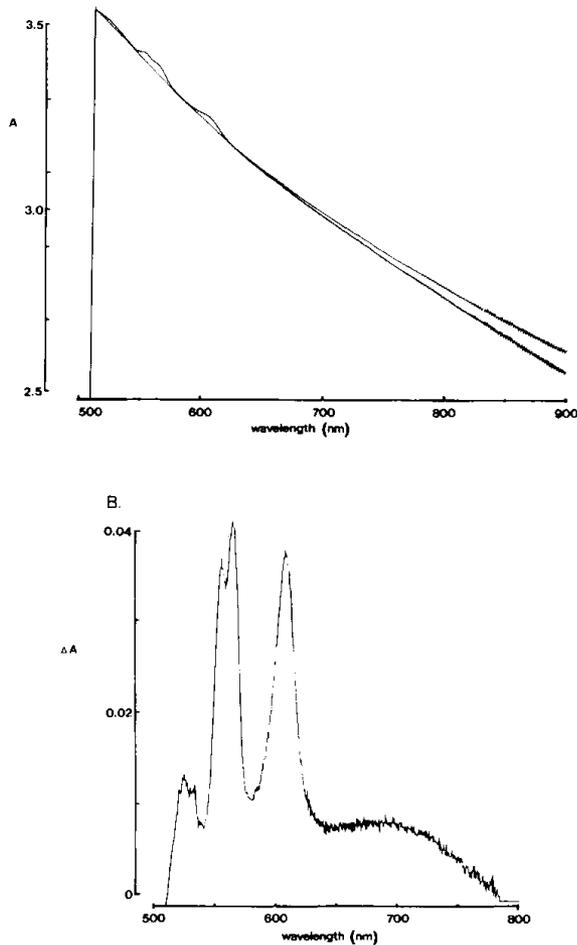


Fig. 10 Absolute and difference spectra of turbid suspensions. Submitochondrial particles (Keilin-Hartree beef heart type) in phosphate buffer treated with $K_4Fe(CN)_6$ (oxidized) or $Na_2S_2O_4$ (reduced). A, absolute spectra of oxidized and reduced samples from 480 to 900 nm; B, difference spectrum (reduced *minus* oxidized) of samples as in A. E.G. & G. (Princeton) diode array scanning spectrophotometer (Nicholls, 1982) (courtesy E.G. & G. Instruments)

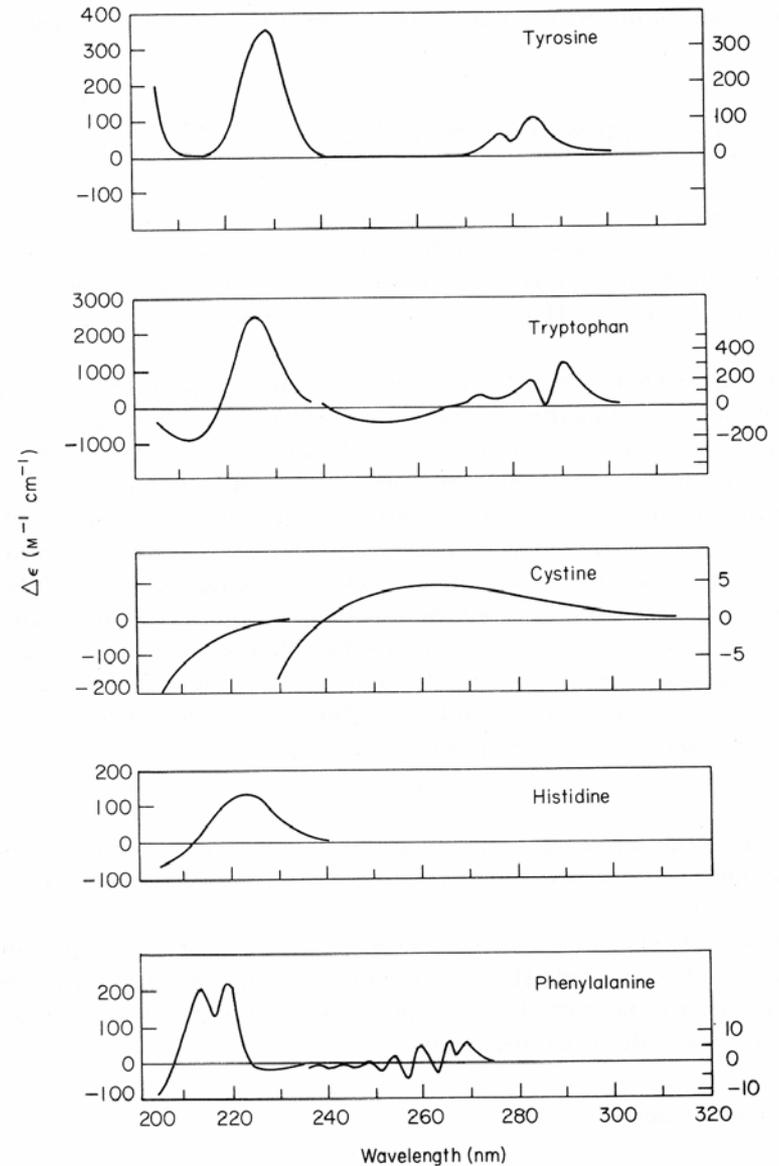
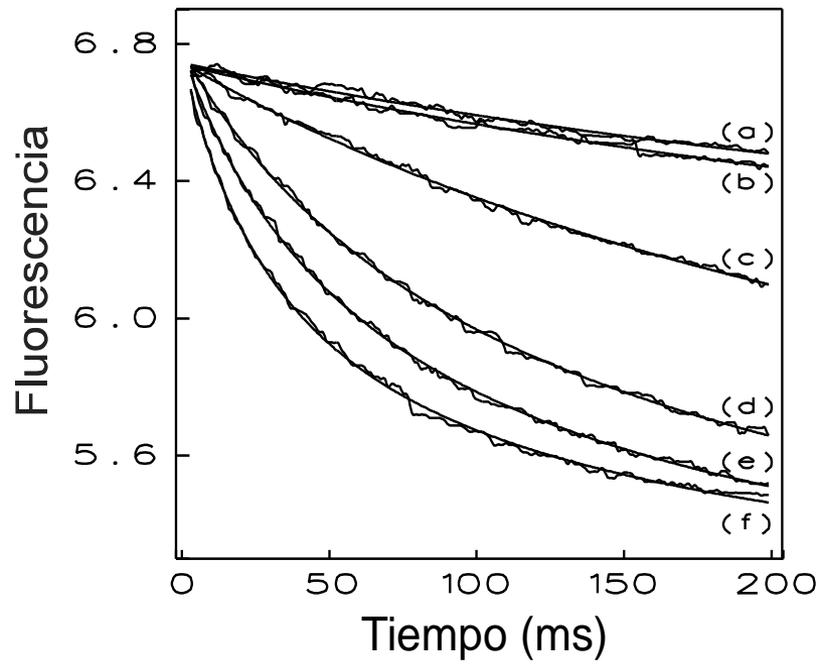
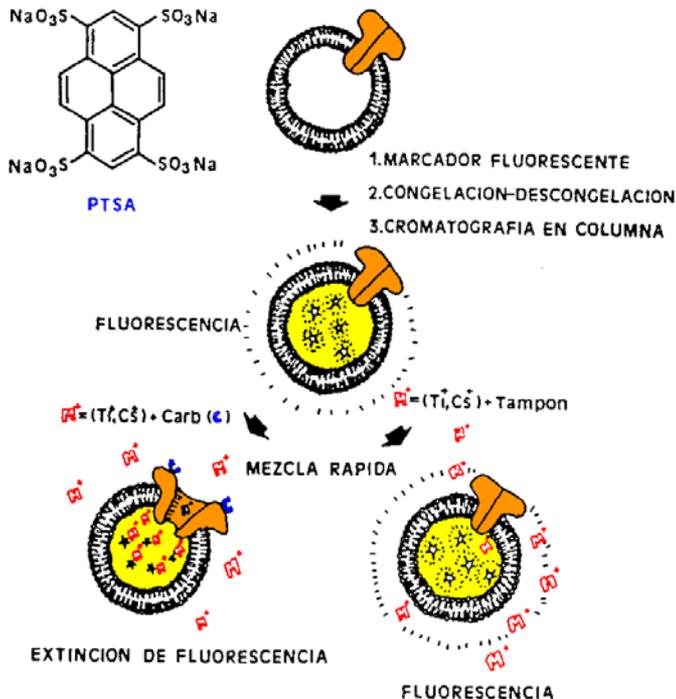
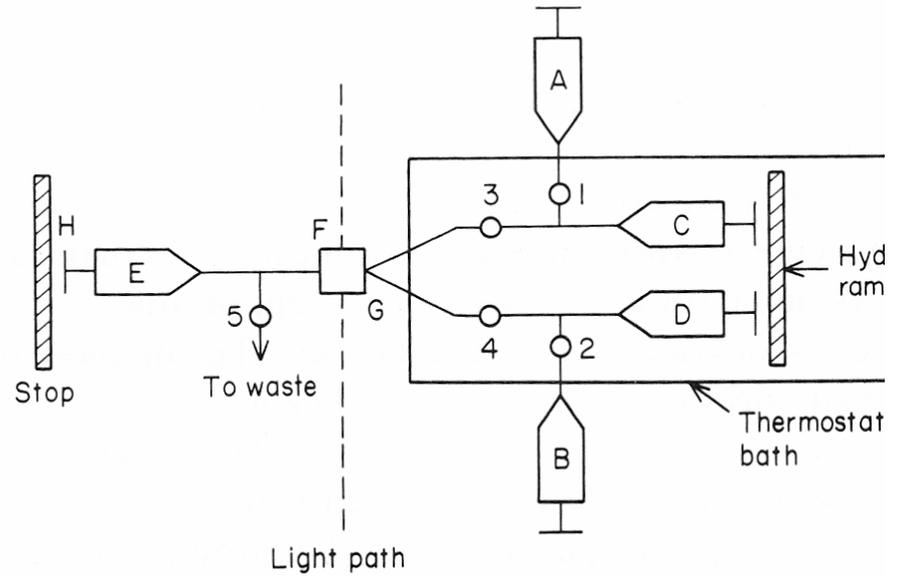


FIG. 2.26 Solvent difference spectra of amino acids produced by 20% (v/v) ethylene glycol/water. (Spectra taken from J. W. Donovan, (1969). *J. Biol. Chem.* **244**, 1961)

Espectrofotetría UV-Vis

Cinética rápida: instrumentos de “flujo detenido” (stopped-flow”); también instrumentos de salto de presión o de temperatura (“P-jump” and “T-jump”)



Espectrofotometría UV-Vis

Acidos nucleicos

TABLE 2.8 Spectral characteristics of bases and nucleosides in neutral solution

		λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	pH
<i>Base</i>				
Adenine	(Pu) ^a	261	13 300	7.0
Guanine	(Pu)	246	10 700	7.0
Uracil	(Py) ^b	276	8 150	7.2
		259	8 100	
Thymine	(Py)	265	7 890	7.2
Cytosine	(Py)	267	6 130	7.2
<i>Nucleoside</i>				
Adenosine	(Pu)	260	14 900	6.4
Guanosine	(Pu)	253	13 700	6.0
Uridine	(Py)	262	10 100	7.2
Thymidine	(Py)	267	9 650	7.2
Cytidine	(Py)	271	9 100	7.2

^a Pu = purine

^b Py = pyrimidine

Data taken from Beavan, G.H., Holiday, E.R. and Johnson, E.A. (1955). "The Nucleic Acids", Vol. I, (Eds Chargaff, E. and Davidson, J.N.), 493-545. Academic Press, New York and London.

Table 5 Extinction coefficients at wavelengths of maximal absorbance for nucleotides and nucleic acid

Nucleotide or nucleoside	pH	λ_{\max} (nm)	E ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Adenosine	6.4	260	14.9
Guanosine	6.0	253	13.7
Uridine	7.2	262	10.1
Thymidine	7.2	267	9.65
Cytidine	7.2	271	9.1
Calf thymus DNA	7.0	257	6.8*
Calf thymus DNA	2.0	262	8.7*
Calf thymus DNA	12.3	260	8.2*

Ref. Beavan *et al.* (1955)

* per residue

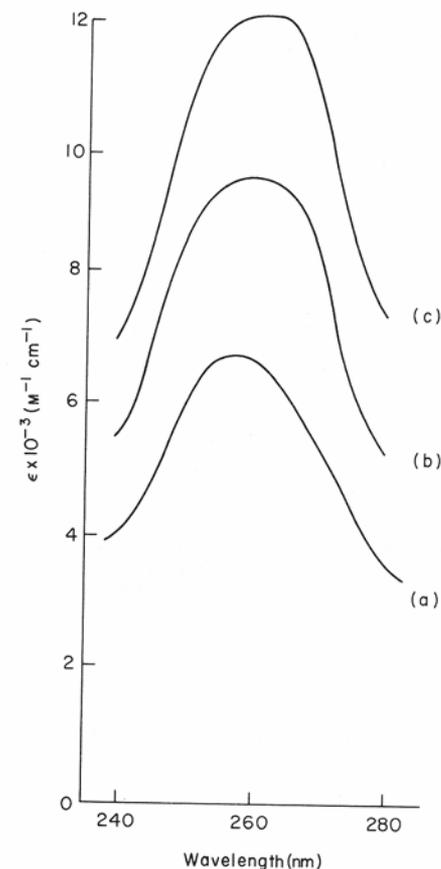


FIG. 2.32 Hyperchromism of DNA from *E. coli* in 51% methanol. (a) Spectrum obtained at room temperature; (b) spectrum obtained at 95°C; (c) reconstructed spectrum of the component deoxyribonucleotides of *E. coli*. (Data taken from H. R. Mahler, B. Kline and B. D. Mehrotra, (1964). *J. Molec. Biol.* **9**, 801.)

Espectrofotometría UV-Vis

Acidos nucleicos

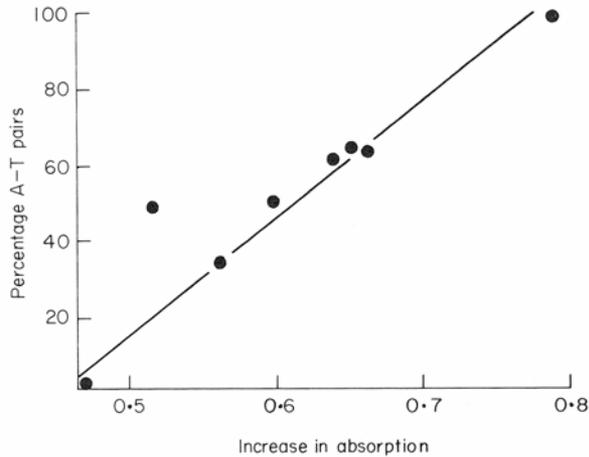


FIG. 2.33 Correlation of DNA hyperchromism with number of A-T pairs. (Data taken from H. R. Mahler, B. Kline and B. D. Mehrotra, (1964). *J. Molec. Biol.* **9**, 801.)

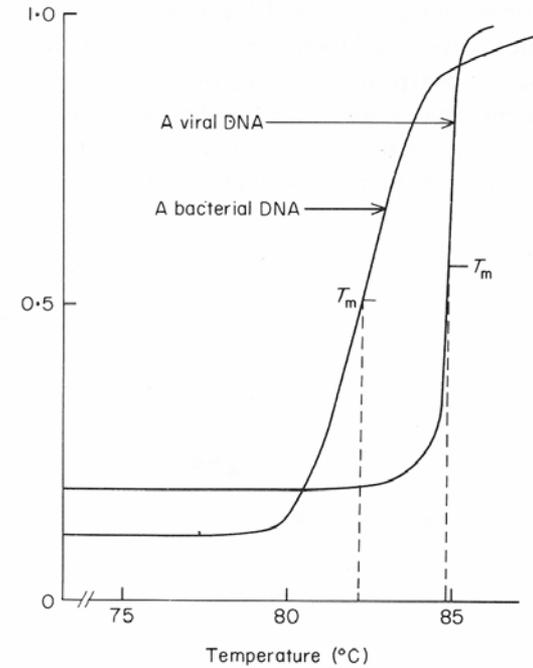


FIG. 2.34 Melting of DNA, Characteristic melting curves for a viral DNA and a bacterial DNA. The former, being smaller, shows a sharper transition. (Taken from A. Lehninger, (1975). "Biochemistry", 875. Worth Publishers, New York.)

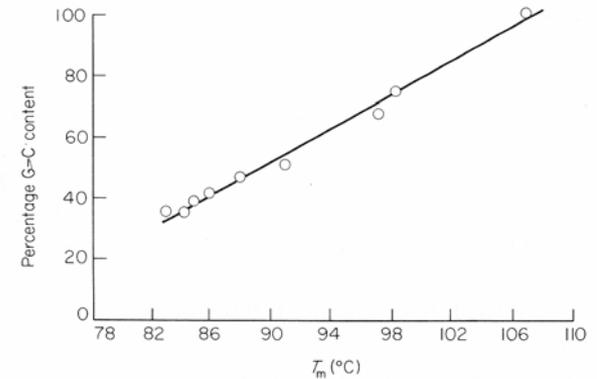


FIG. 2.35 Variation of T_m with G-C content for various species of DNA. (Data taken from H. R. Mahler, B. Kline and B. D. Mehrotra. (1964). *J. Molec. Biol.* **9**, 801.)

Espectrofotometría UV-Vis

Otros cromóforos biológicos:
Especificidad y sensibilidad.

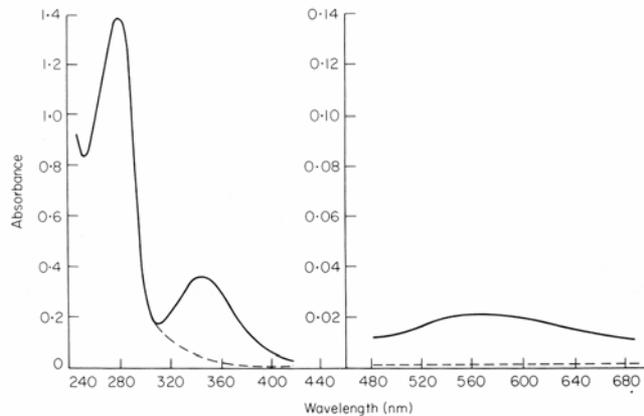
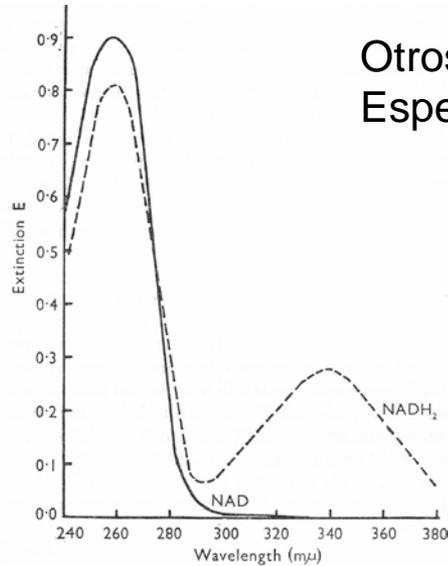


FIG. 2.16 Spectra of mollusc haemocyanin in aqueous buffer. Oxyhaemocyanin (—), deoxyhaemocyanin (---).

TABLE 2.10 Spectral data for human haemoglobin derivatives

Derivative	λ_{\max} (nm)	ϵ_{mM} ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 10^{-3}$) ^a
Oxyhaemoglobin	415	125
	542	14.4
	577	15.3
Deoxyhaemoglobin	430	133
	555	13.1
Carbonmonoxyhaemoglobin	419	194
	539	14.2
	569	14.3
Cyanmethaemoglobin	420	116
	543	11.1

^a Absorption coefficients refer to one haemoglobin subunit. (Data taken from M.R. Waterman, (1978). In "Methods in Enzymology", vol. LII, (Eds. S. Fleischer and L. Packer), p. 460. Academic Press, London and New York.)

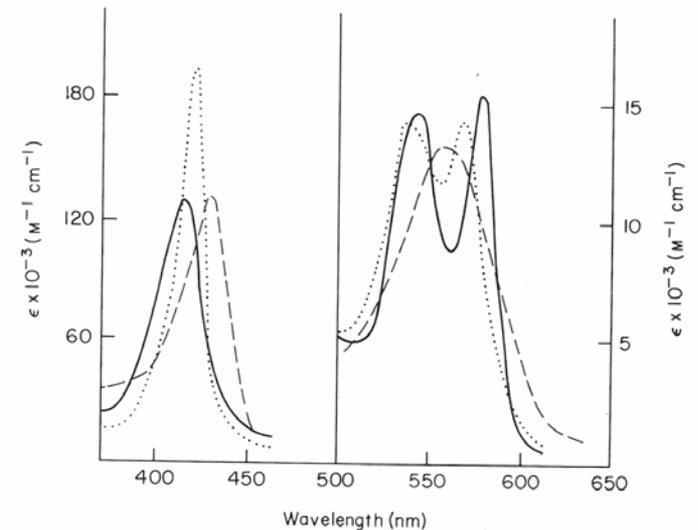


FIG. 2.12 Absorption spectra of haemoglobin derivatives. Oxyhaemoglobin (—), deoxyhaemoglobin (---), carbonmonoxyhaemoglobin (· · · · ·). (Spectra taken from M. R. Waterman, (1978). In "Methods in Enzymology", Vol. LII, (Eds: Fleischer and L. Packer), 16. Academic Press. London and New York.)

Espectrofotometría UV-Vis

Detección de intermediarios en el mecanismo de actuación de transaminasas dependientes de PLP

