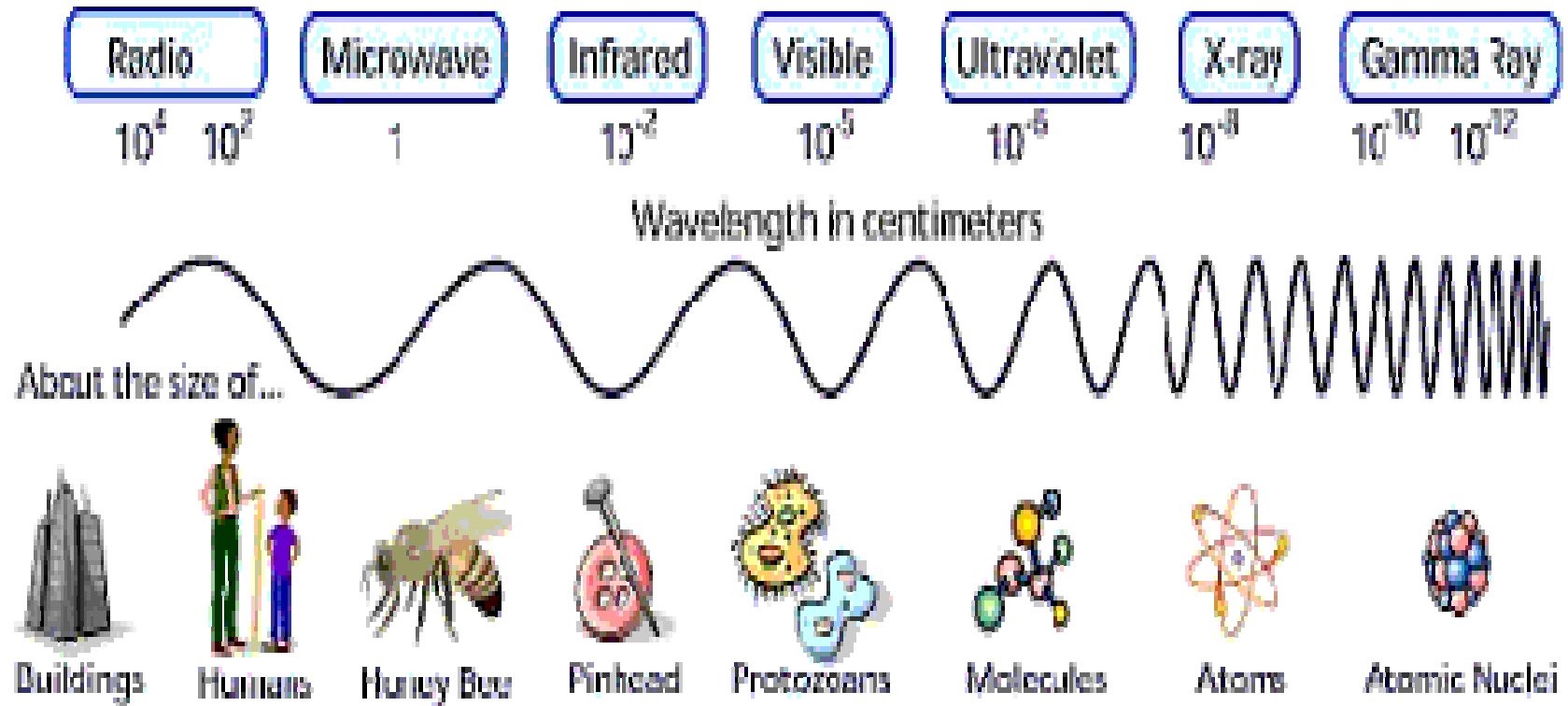


# Tema 3.-Espectroscopía de biomoléculas

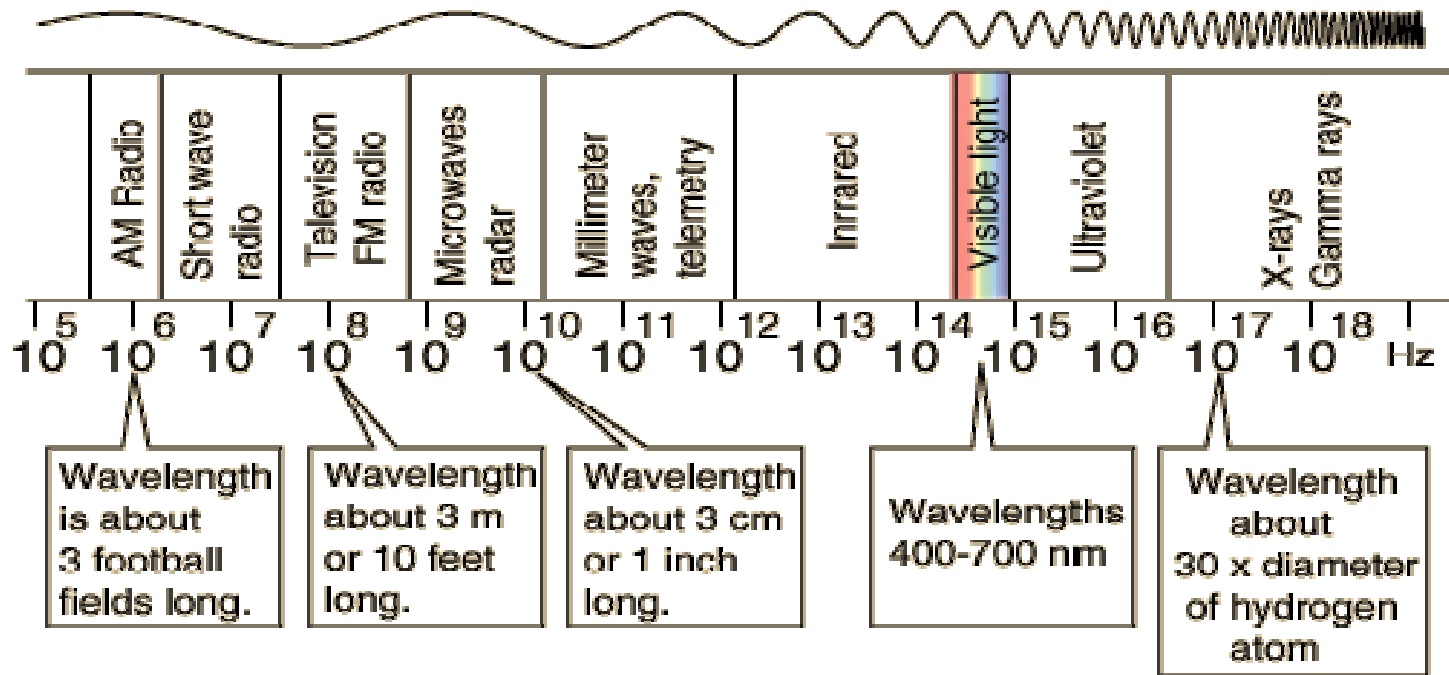
# Tema 3.-Espectroscopía de biomoléculas

- 3.1.-El espectro electromagnético
- 3.2.-Espectros de absorción y de emisión (espontánea y estimulada)
  - 3.2.1.-Momento dipolar de transición: reglas de selección
- 3.3.-Magnitudes a considerar en un espectro molecular: frecuencia, anchura de la banda, intensidad, polarización
- 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV)
- 3.5.-Espectroscopía IR y Raman
- 3.6.-Resonancia Magnética nuclear

# 3.1.-El espectro electromagnético (en longitudes de onda)



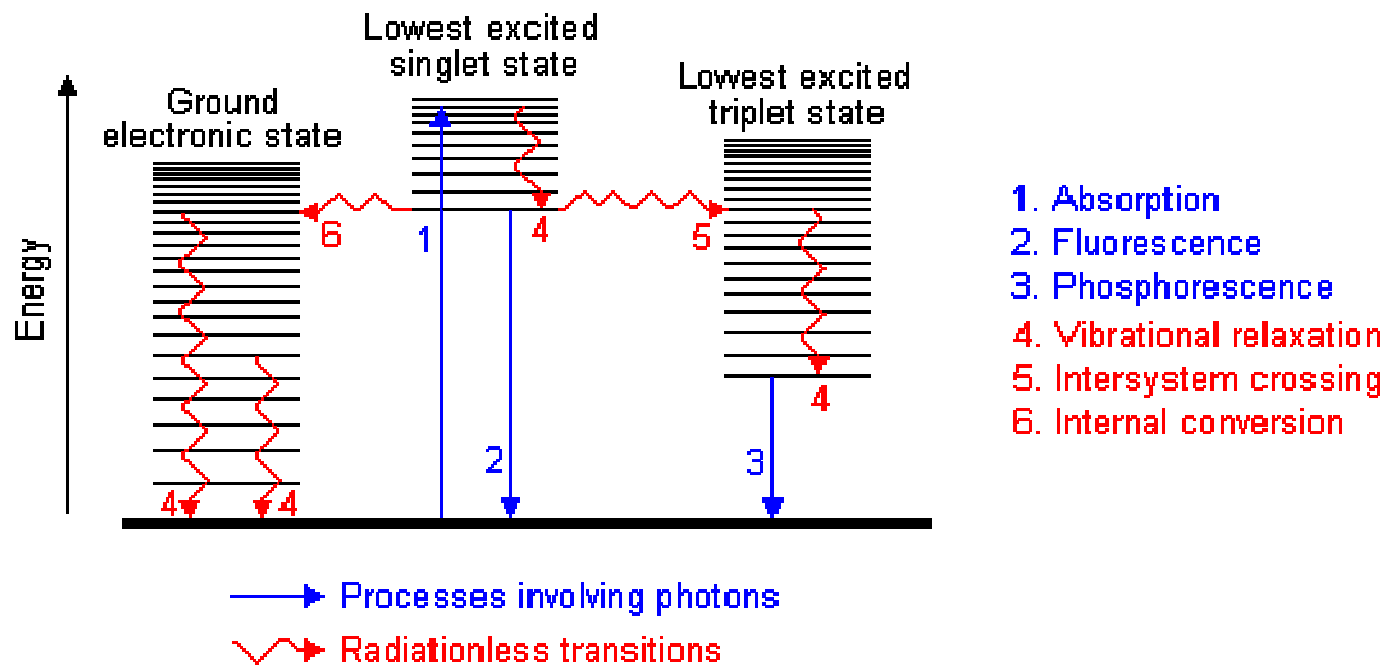
# 3.1.-El espectro electromagnético (en frecuencias)



# 3.1-El espectro electromagnético (en frecuencias, longitudes de onda y energías)

CLASS	FREQUENCY	WAVELENGTH	ENERGY
$\gamma$	300 EHz	1 pm	1.24 MeV
HX	30 EHz	10 pm	124 keV
SX	3 EHz	100 pm	12.4 keV
EUV	300 PHz	1 nm	1.24 keV
NUV	30 PHz	10 nm	124 eV
VIS	3 PHz	100 nm	12.4 eV
NIR	300 THz	1 $\mu\text{m}$	1.24 eV
MIR	30 THz	10 $\mu\text{m}$	124 meV
FIR	3 THz	100 $\mu\text{m}$	12.4 meV
EHF	300 GHz	1 mm	1.24 meV
SHF	30 GHz	1 cm	124 $\mu\text{eV}$
UHF	3 GHz	1 dm	12.4 $\mu\text{eV}$
VHF	300 MHz	1 m	1.24 $\mu\text{eV}$
HF	30 MHz	1 dam	124 neV
MF	3 MHz	1 hm	12.4 neV
LF	300 kHz	1 km	1.24 neV
VLf	30 kHz	10 km	124 peV
VF	3 kHz	100 km	12.4 peV
ELF	300 Hz	1 Mm	1.24 peV
	30 Hz	10 Mm	124 feV

## 3.2.-Espectros de absorción y de emisión (espontánea y estimulada)



# 3.2.-Espectros de absorción y de emisión (espontánea y estimulada)

Jablonski Diagram for Benzophenone

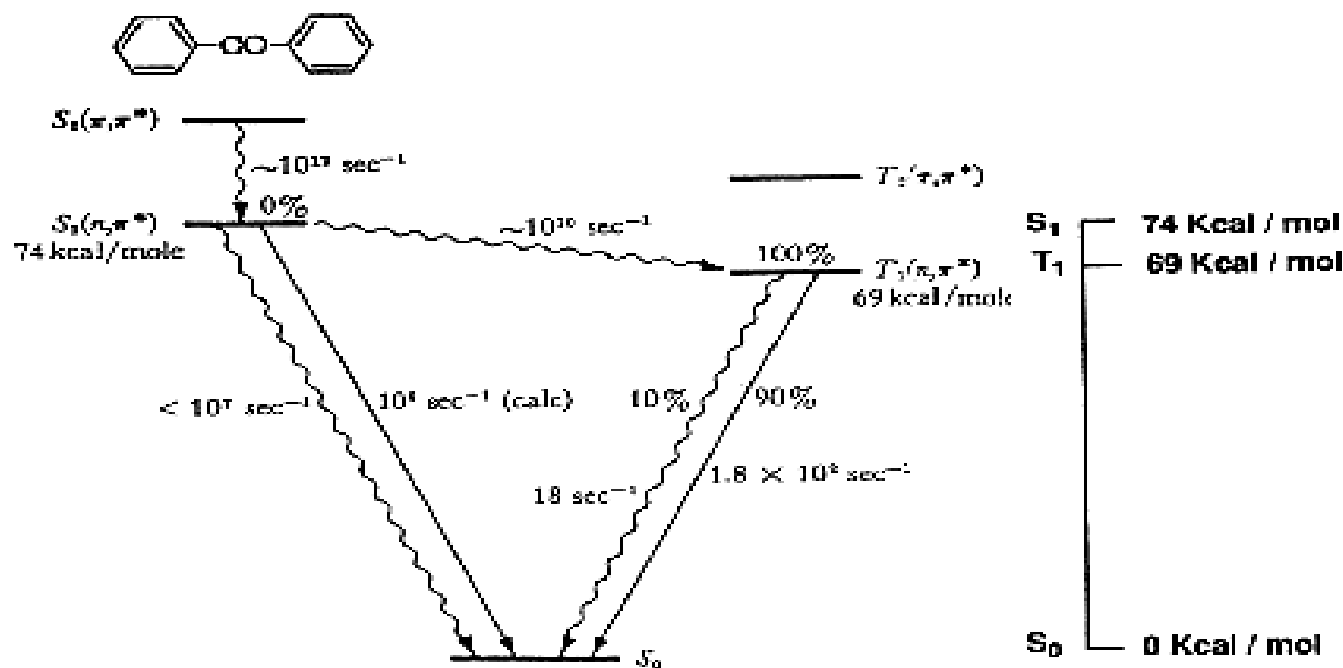


Fig. 4-15 State diagram for benzophenone at 77° K.

**Note small S-T splitting, high intersystem crossing yield**

Source: Turro, N. J. Modern Molecular Photochemistry; Benjamin Cummings, Menlo Park, CA, 1978.

### 3.2.1.-Momento dipolar de transición: reglas de selección

- Momento dipolar de transición
- Intensidad de una transición: reglas de selección
- Requerimientos de simetría sobre la función de onda total: principio de exclusión de Fermi generalizado
- Las reglas de selección en el caso de un oscilador armónico y anarmónico: origen de las bandas calientes

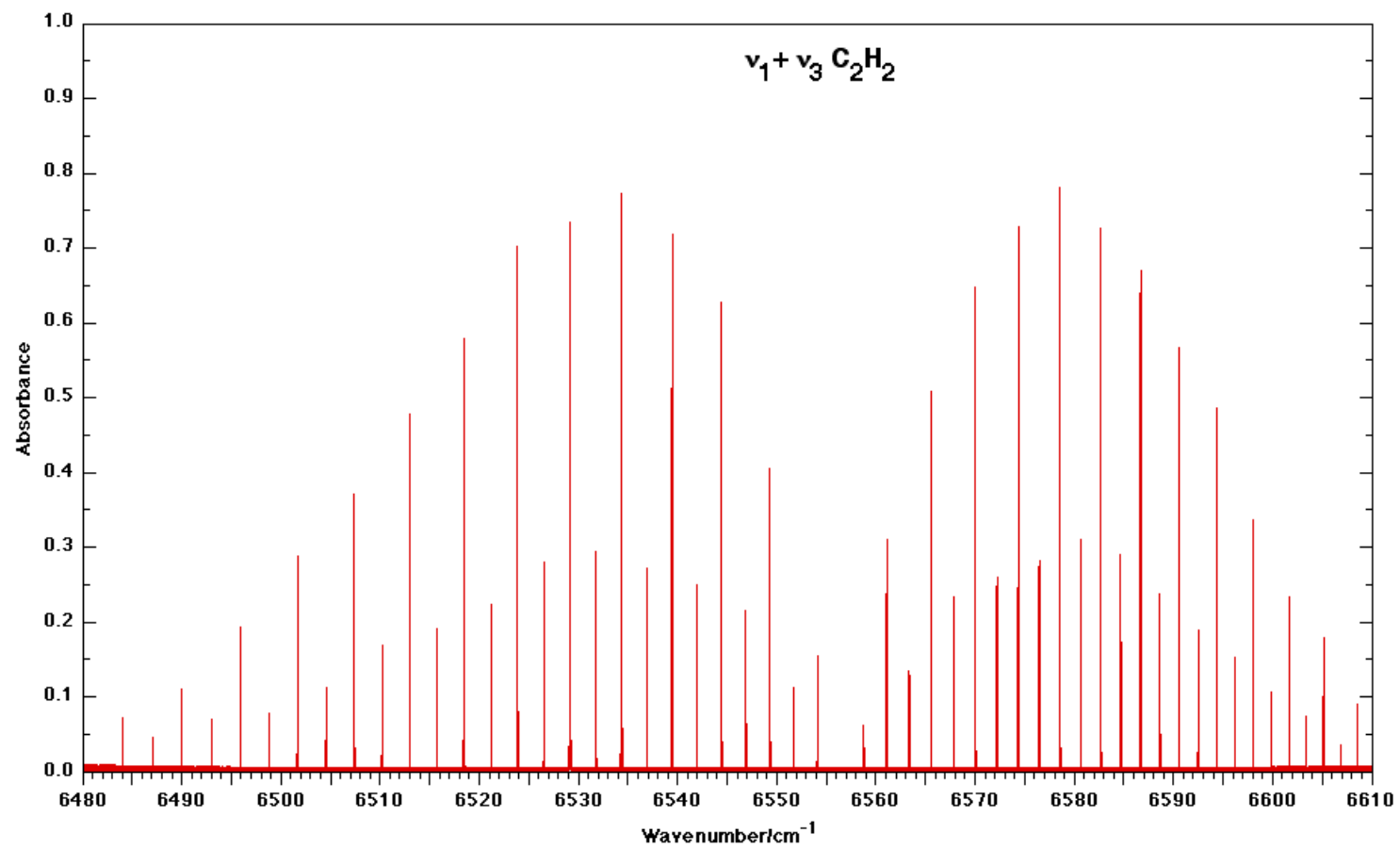


## 3.3.-Magnitudes a considerar en un espectro molecular (I)

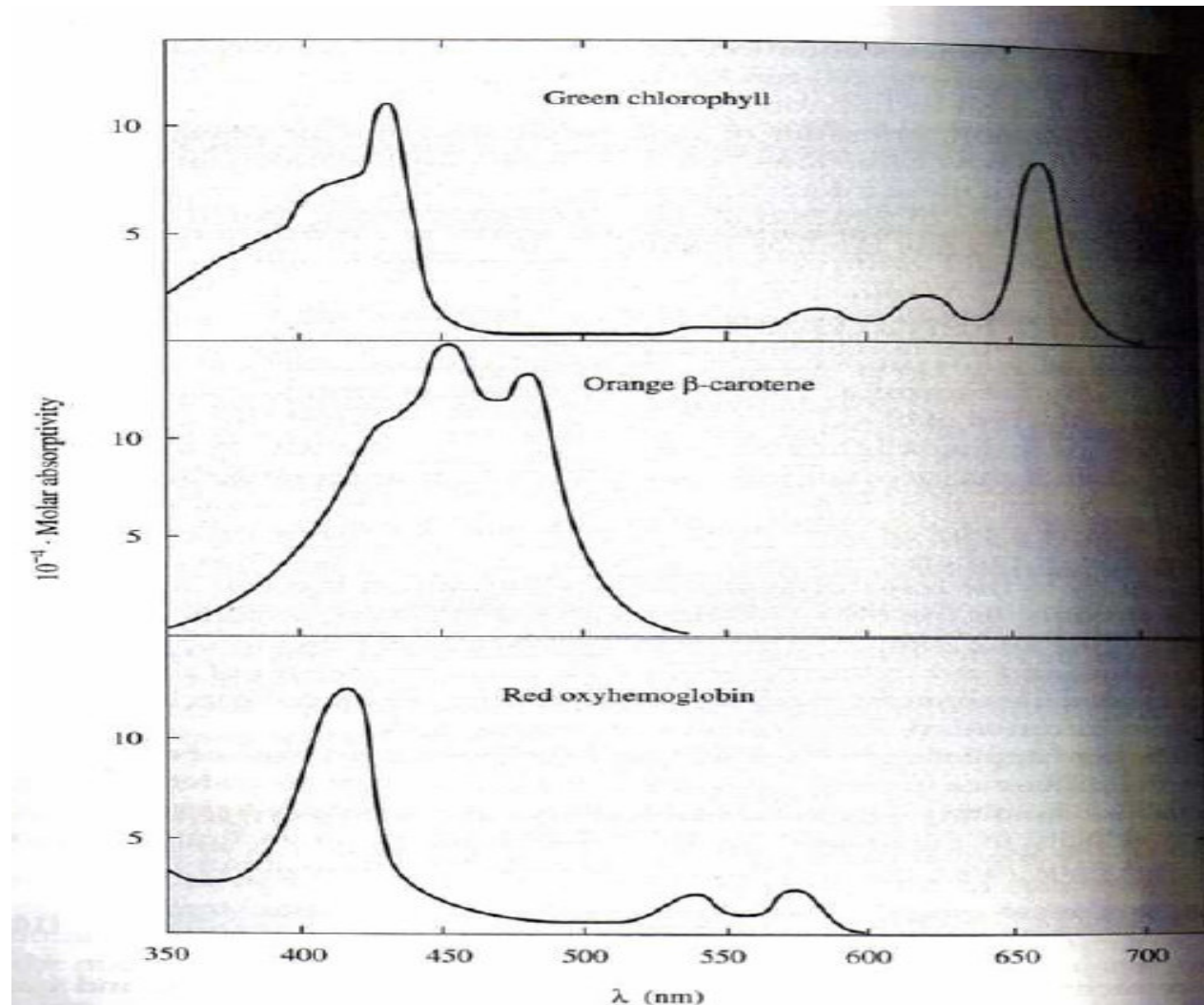
- 3.3.1.-Frecuencias de las transiciones:
- correspondencia del espectro electromagnético con las diferentes energías moleculares.
- Desplazamiento en los espectros ultravioleta
  
- 3.3.2 Anchura de las bandas:
- Anchura natural
- Estrechamiento Doppler
- Ensanchamiento gaussiano
  
- 3.3.3.-Perfil y forma de las bandas:
- sustancias en estado gaseoso
- sustancias en estados condensados. Problemas de absorción del disolvente en disoluciones

## **3.3.-Magnitudes a considerar en un espectro molecular (II)**

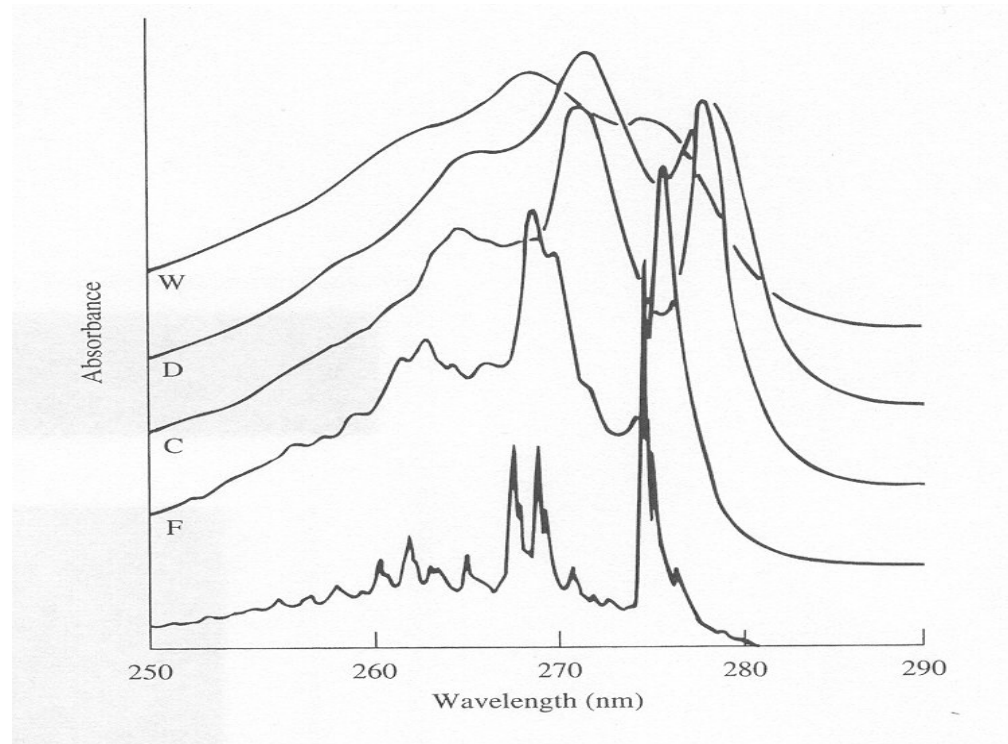
- **3.3.4.-Intensidad de las bandas:**
- **Población del nivel de partida**
- **Coeficiente de extinción. Sondas moleculares**
- **Concentración de la disolución**
- **Camino óptico: ley de Lambert-Beer**
  
- **3.3.5.-Polarización de la radiación: dispersión rotatoria y dicroísmo**



## 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV) (I)

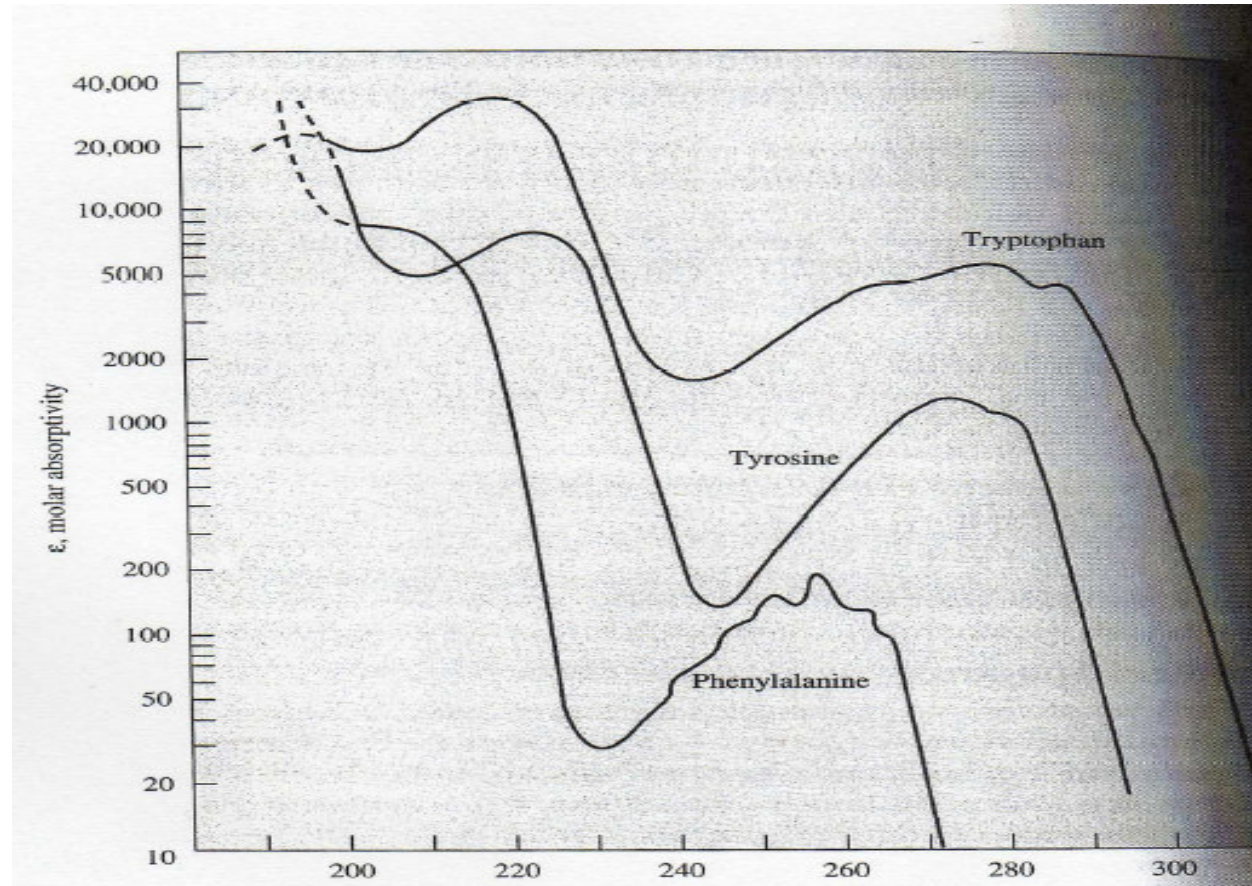


## 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV) (II)



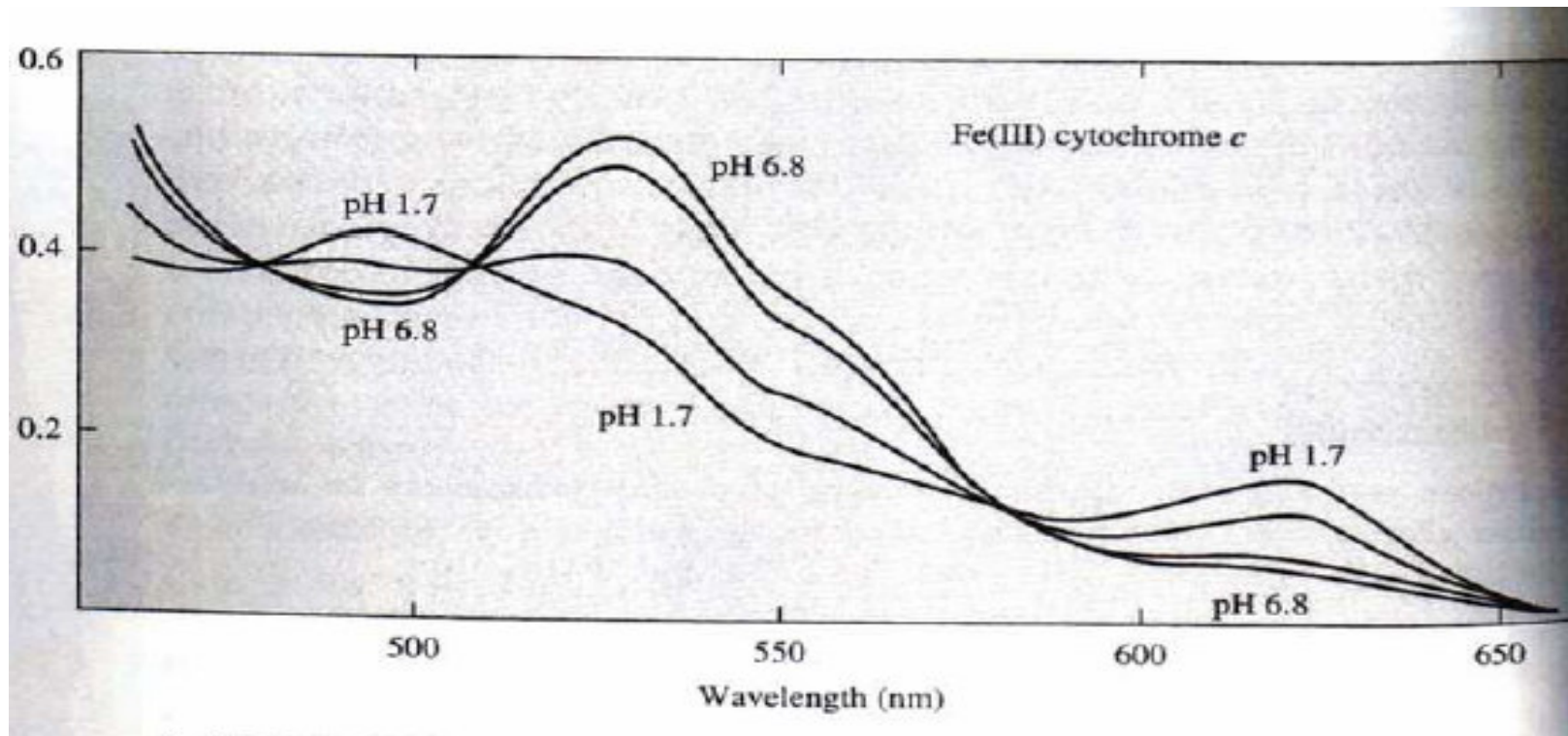
Espectro UV del anisol gaseoso y en diferentes disolventes

## 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV) (III)



Espectros VUV de los aminoácidos aromáticos

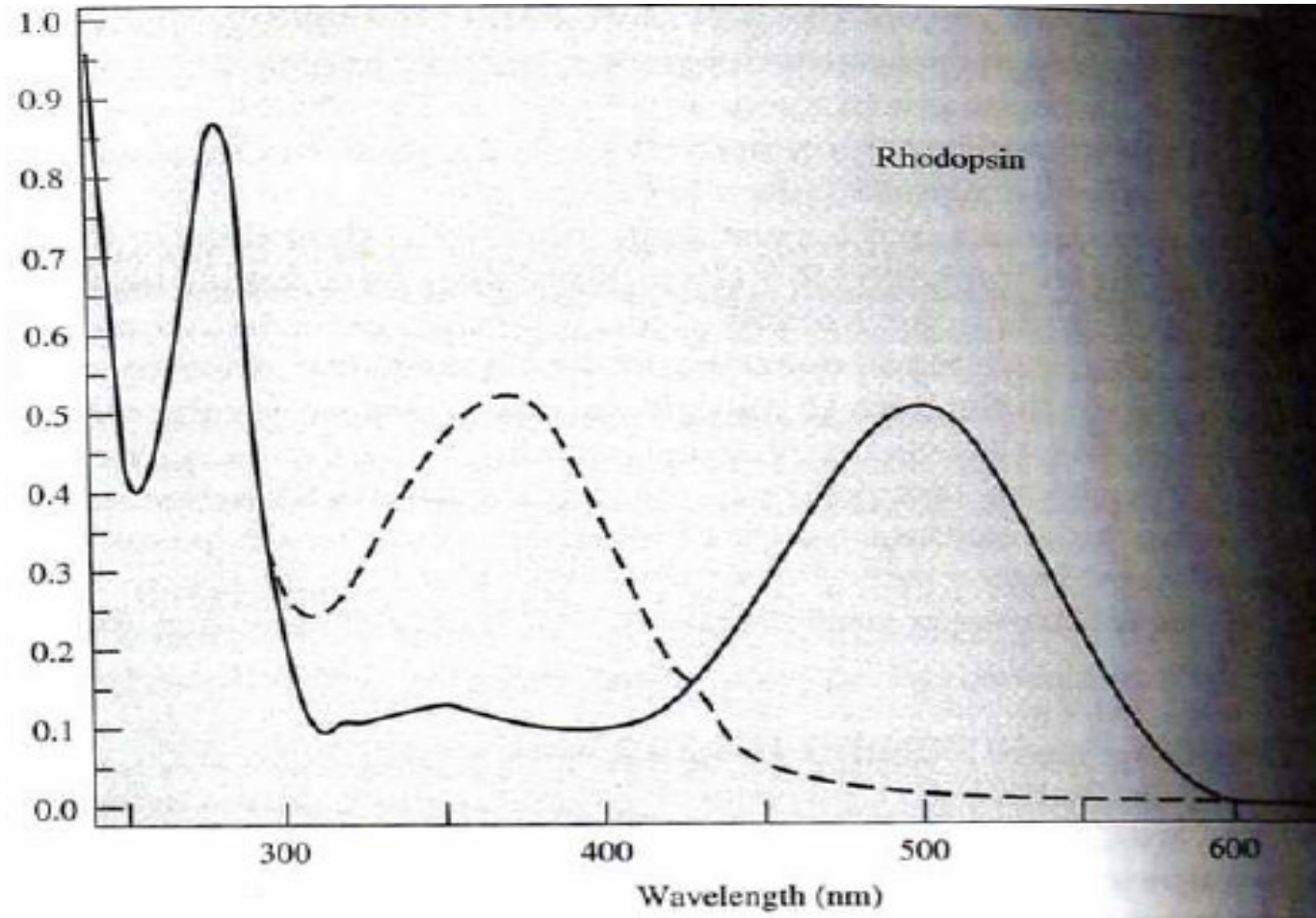
### 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV) (IV)



Espectro VUV del citocromo c-Fe(III) a varios pH: puntos isobéuticos



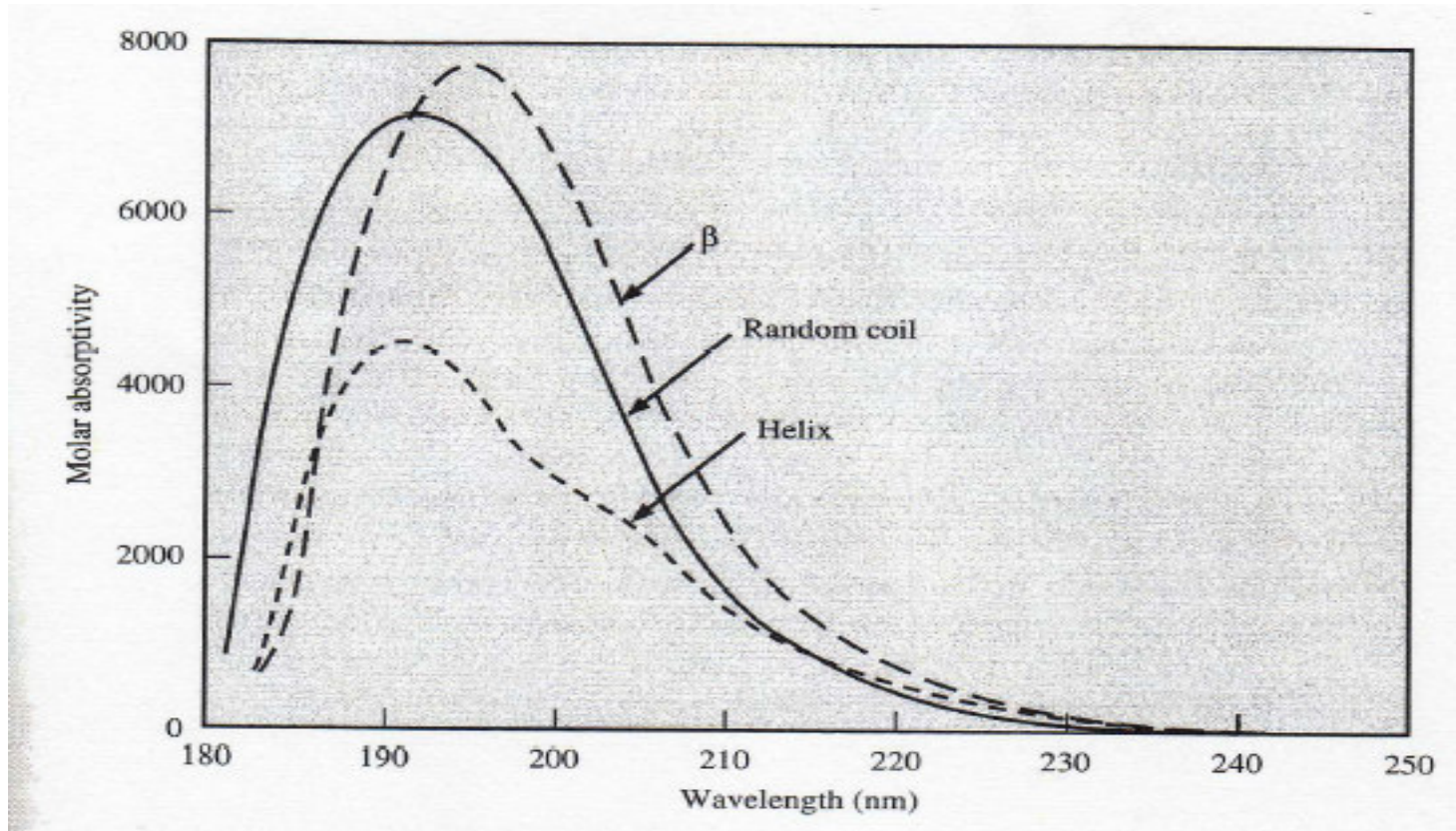
## 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV) (V)



Espectro VUV de la rodopsina



## 3.4.-Espectroscopía visible-ultravioleta (VUV) (VI)



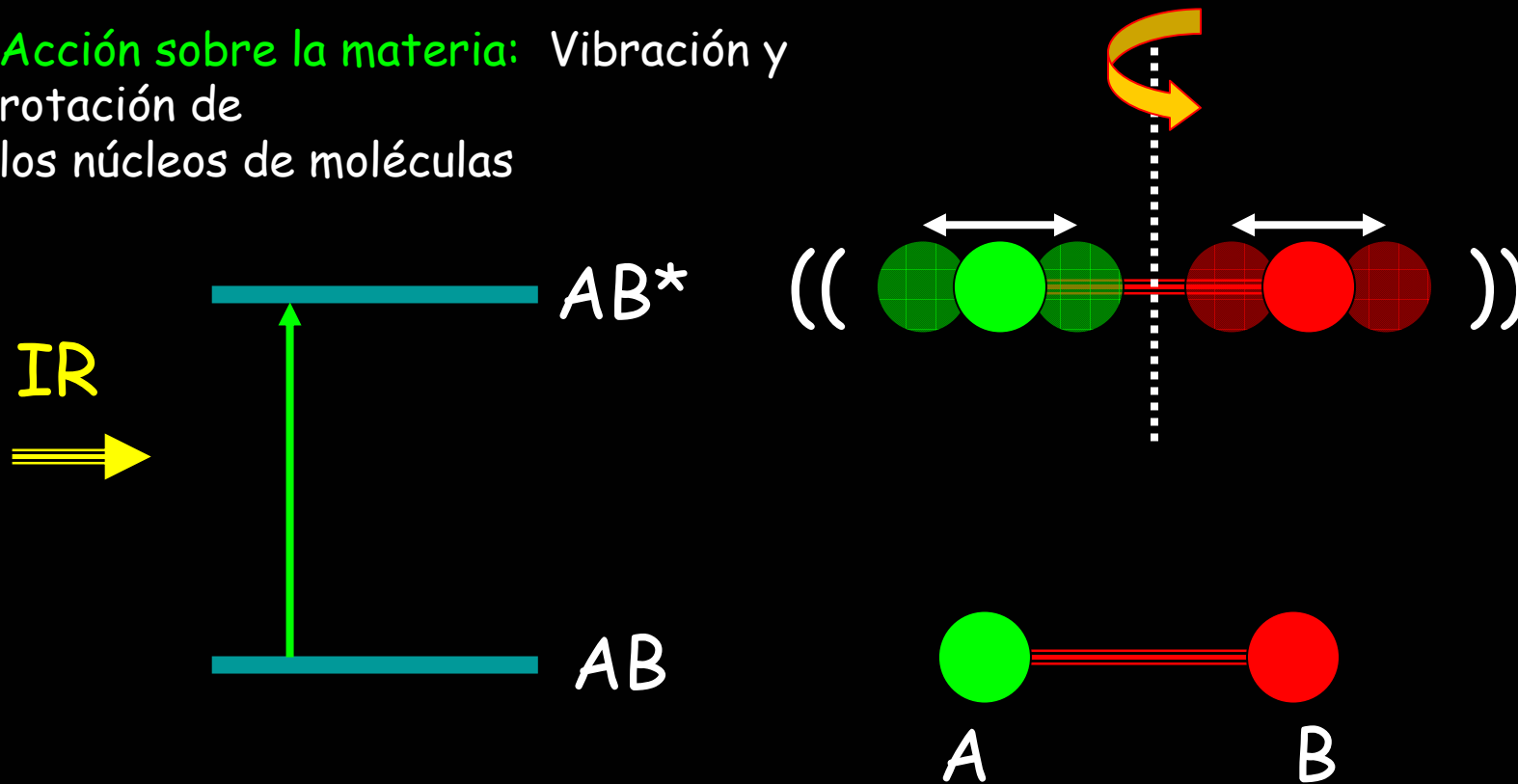
Espectro VUV del hidrocloreto de poli-L-lisina en disolución acuosa a diferentes pH y temperaturas (Tinoco pag.551)

# 3.5.-Espectroscopía IR y Raman

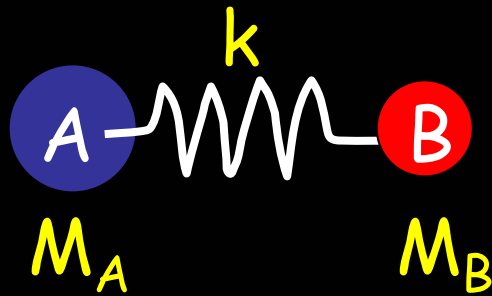
**Espectroscopía infrarroja:**  $800 \text{ nm} < \lambda < 1 \text{ mm}$

Unidad habitual:  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\mu\text{m}$

Acción sobre la materia: Vibración y rotación de los núcleos de moléculas



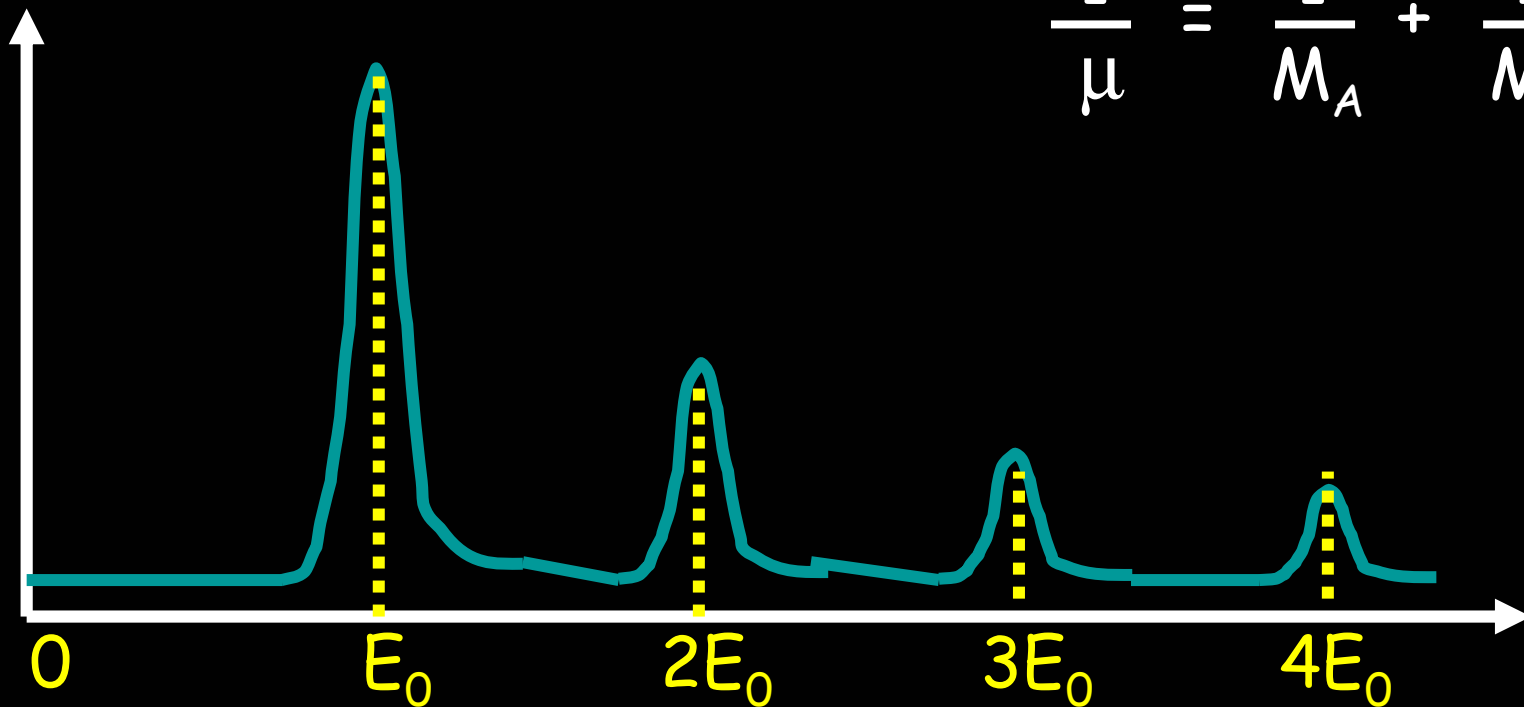
## Espectro de vibración de un enlace A-B



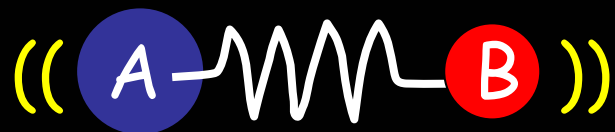
$$E_0 \approx \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

← fuerza de enlace  
← masa reducida

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{M_A} + \frac{1}{M_B}$$



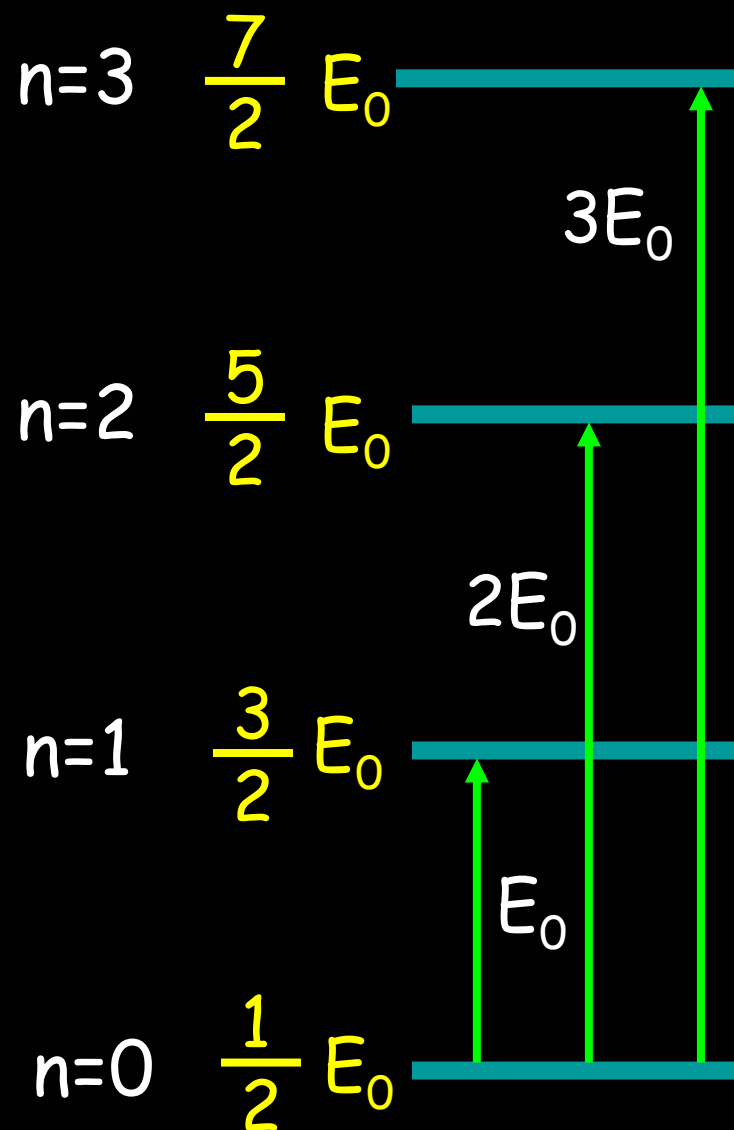
## Estados de vibración de un enlace A-B



Energías posibles

$$E_{\text{VIB}} = \left(n + \frac{1}{2}\right) E_0$$

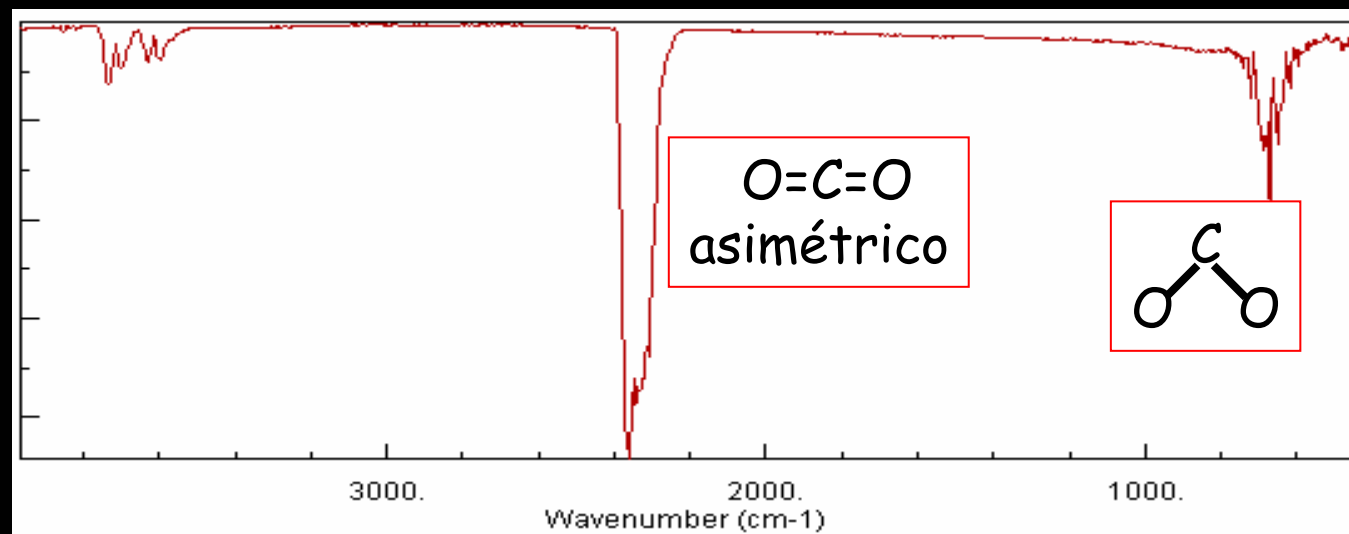
$$n = 0, 1, 2, 3, \dots$$



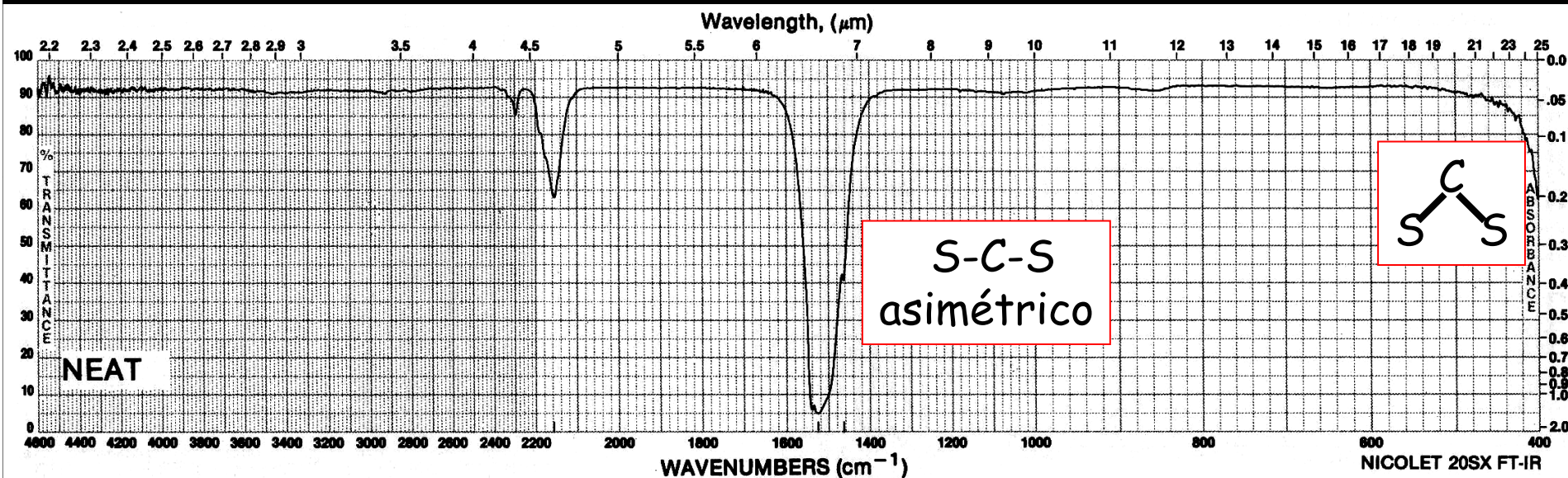
# Insuficiencia de un modelo de oscilador armónico

- Bandas calientes
- Sobretonos
- Importancia para el medio ambiente:
- Intensidad de las líneas espectrales
- Fuerza del oscilador

## Espectro IR del dióxido de carbono $O=C=O$

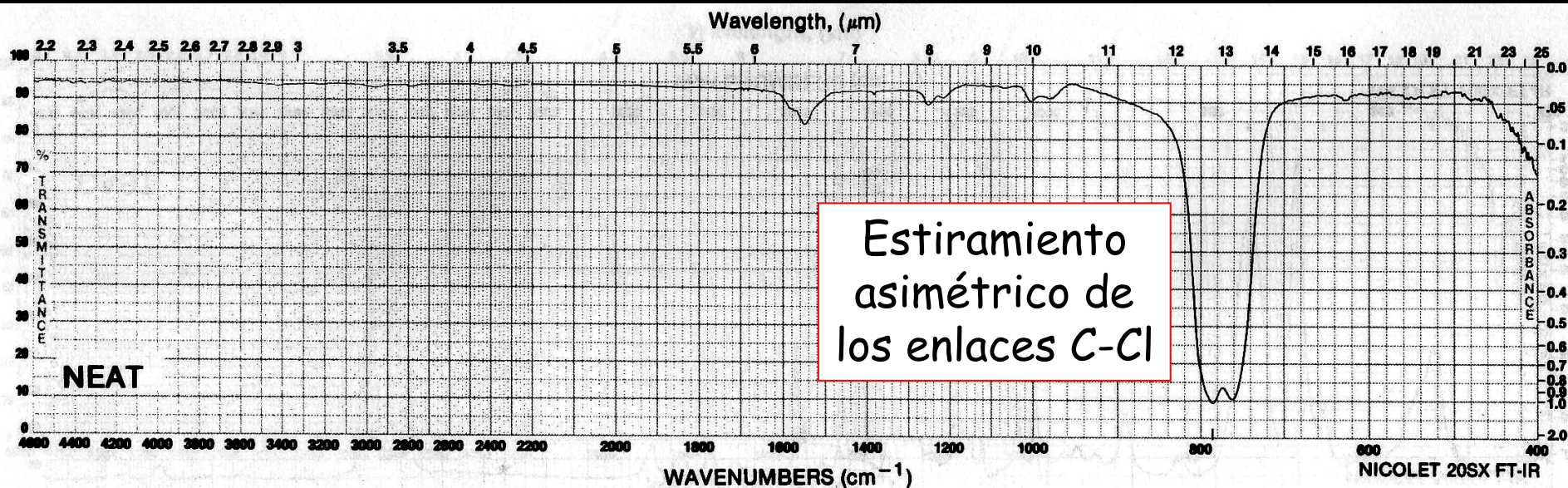


## Espectro IR del disulfuro de carbono $S=C=S$

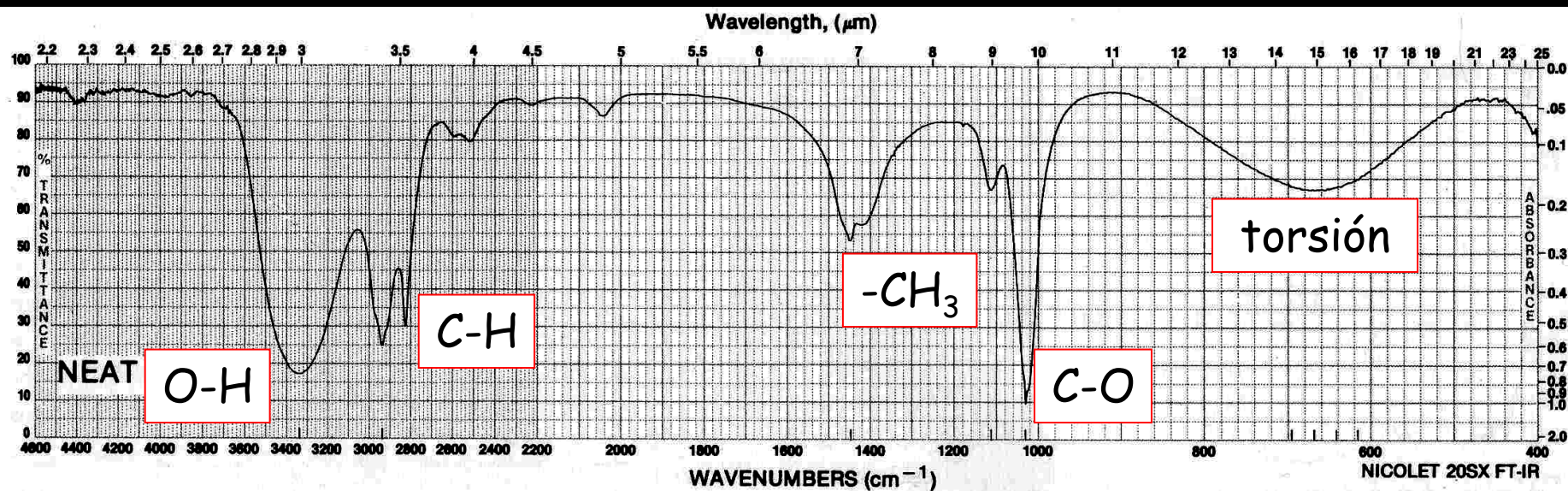




# tetracloruro de carbono $Cl_4C$

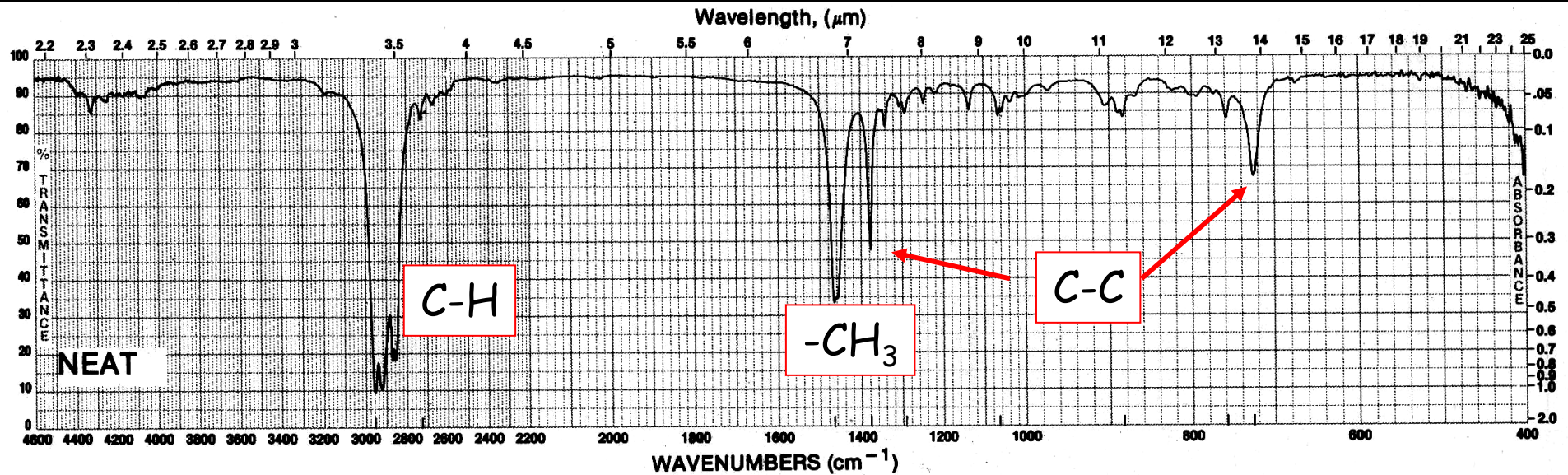


# metanol $H_3C-OH$

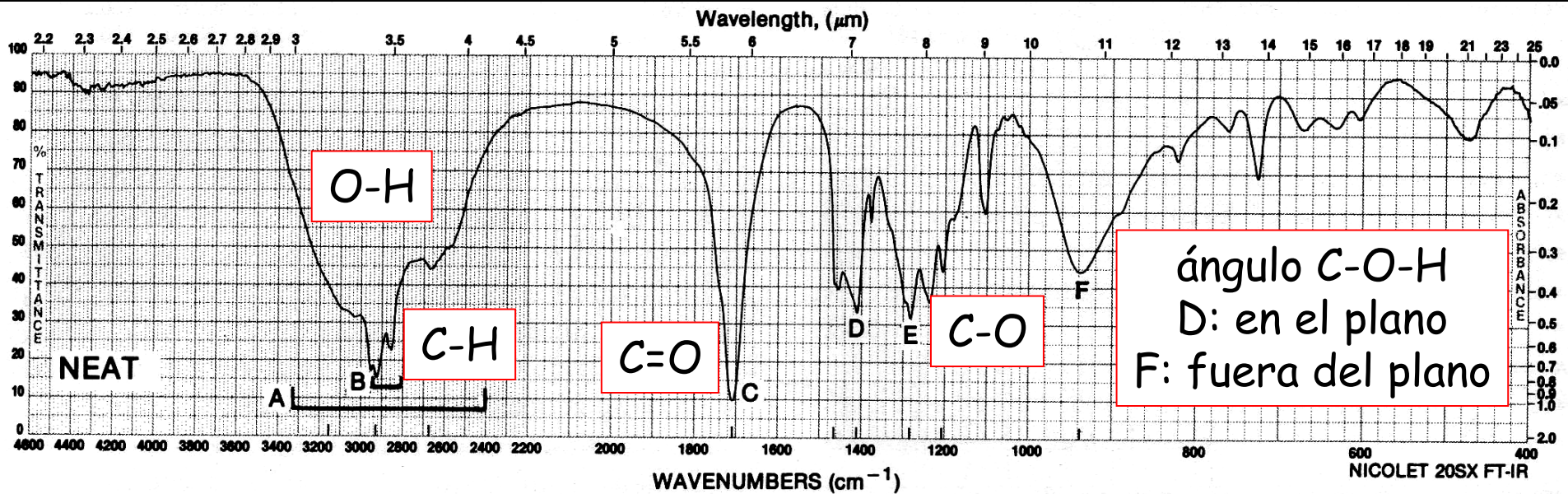




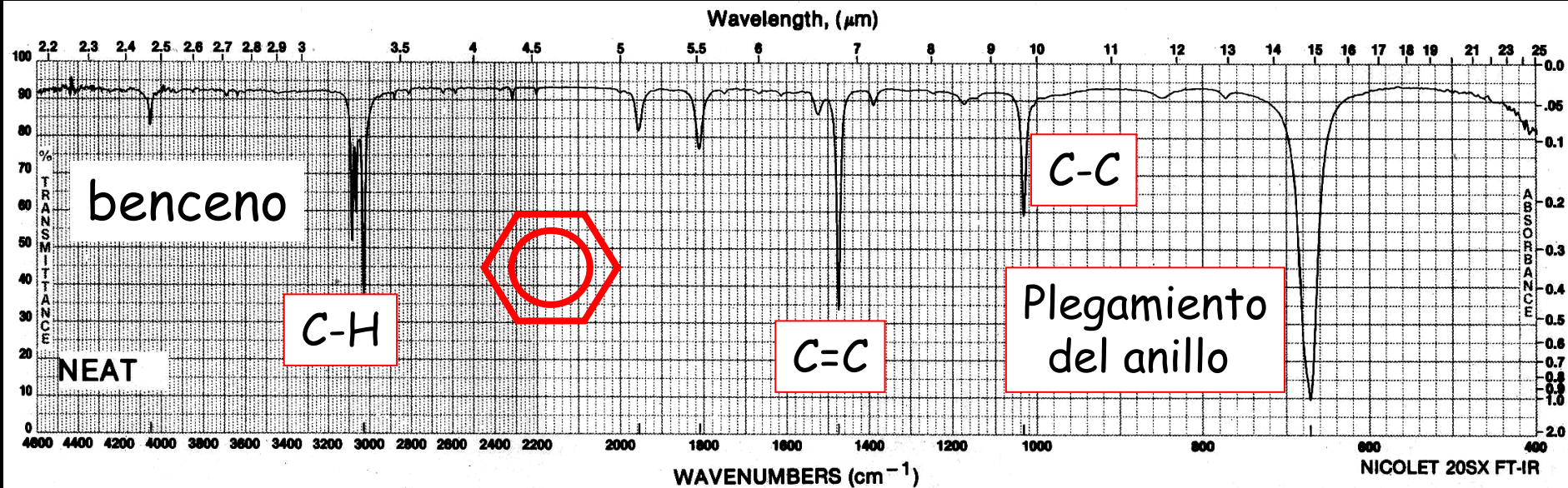
# Hexano $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$



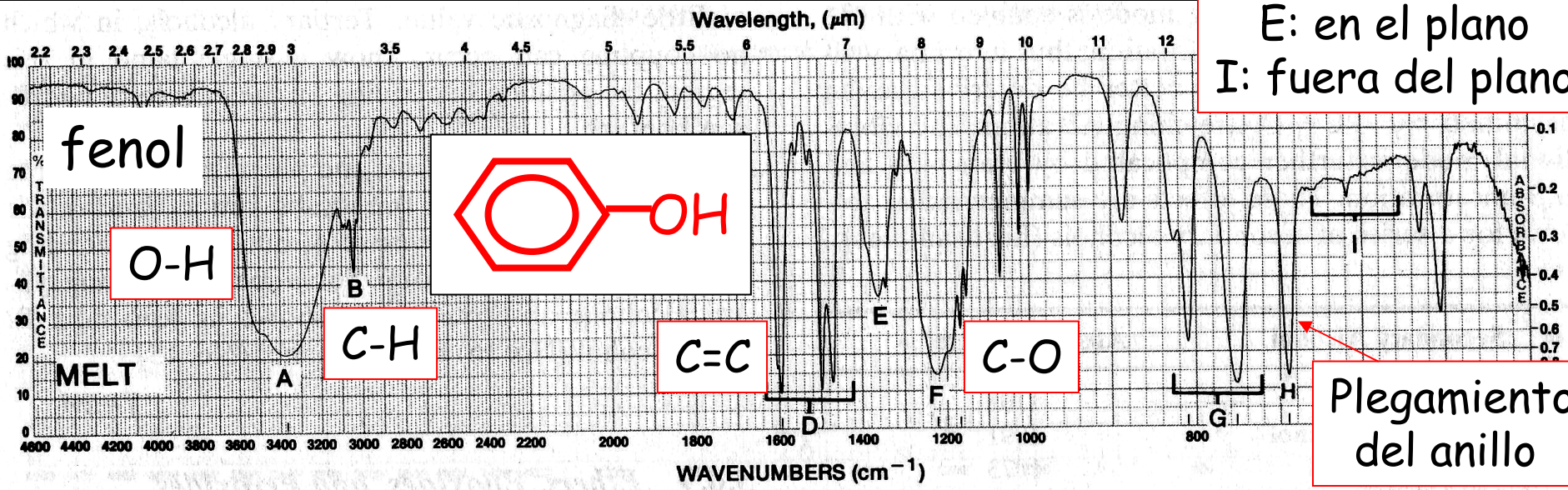
# Ácido heptanoico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$



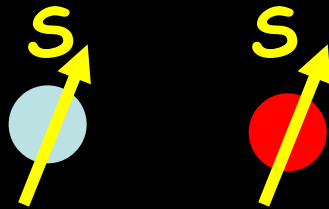




ángulo C-O-H  
 E: en el plano  
 I: fuera del plano

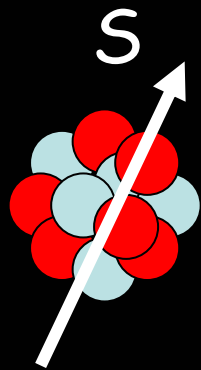


# 3.6.-Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)



Espín de protones y neutrones  $I = \frac{1}{2}$

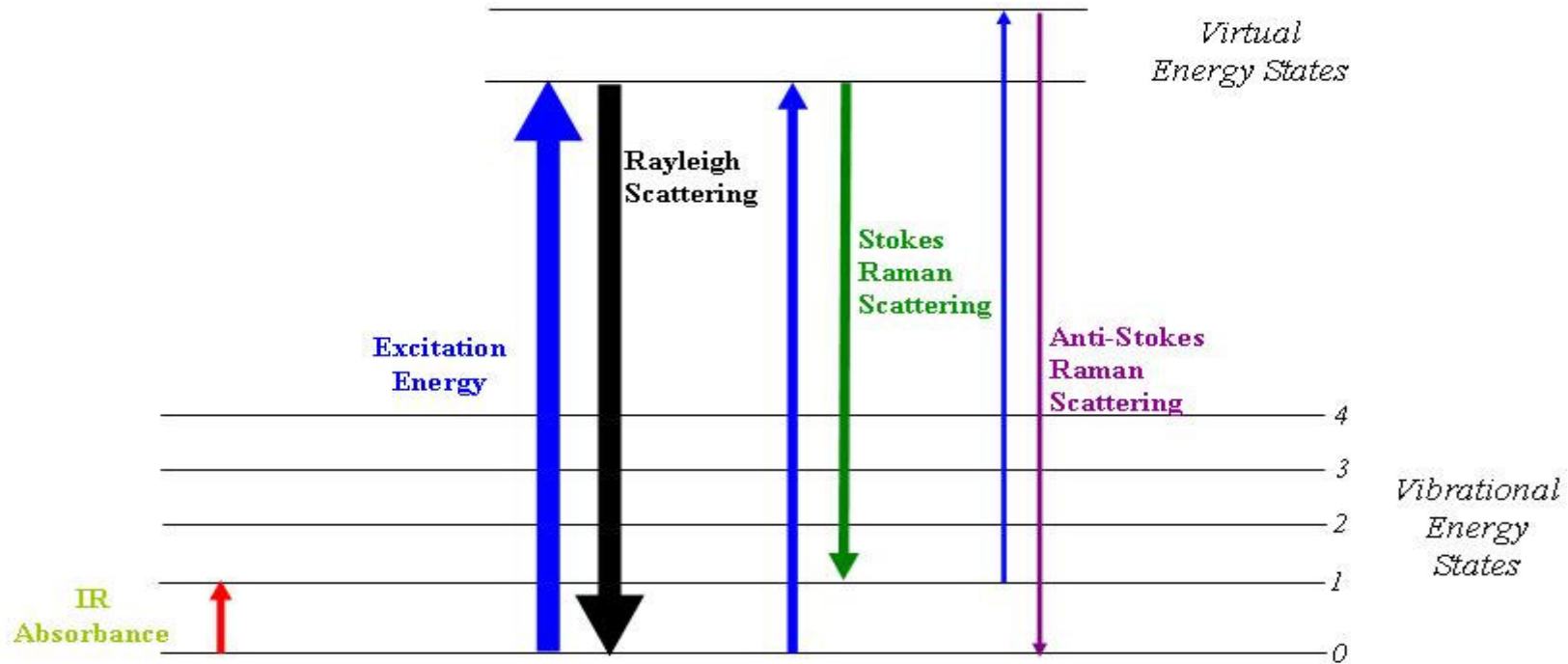
$$|S|^2 = I(I+1) \hbar^2$$



## Espín total de un núcleo

espín total	número másico	número atómico	ejemplos
Cero ↑ ↓	par	par	$^{12}\text{C}, ^{18}\text{O}, ^{34}\text{S}$
Semi-entero I=1/2, 3/2, ... ↑	impar		$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{17}\text{O}, ^{19}\text{F}, ^{31}\text{P}$ I=1/2    I=5/2
Entero I=1, 2, ... ↑ ↑	par	impar	$^2\text{H}, ^{14}\text{N}$ (I=1)

# 3.5.1.-Espectroscopía Raman



## 3.5.1.-Espectroscopía Raman

- Origen de las transiciones Raman: momento dipolar inducido y polarizabilidad
- Intensidad de las líneas Rayleigh, Stokes y anti-Stokes
- Fuentes excitatrices en Raman
- Reglas de selección en Raman
- Complementariedad de las técnicas de Raman e infrarrojo (IR).
- Transiciones activas en Raman e IR. Simetría molecular y las tablas de caracteres

## 3.6.-Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

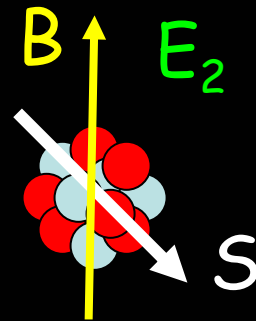
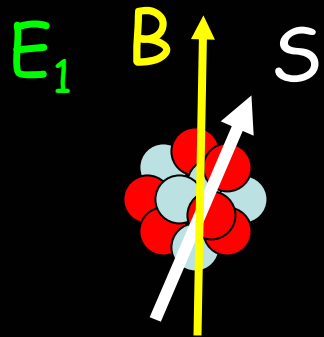
Isotope	Natural % Abundance	Spin (I)	Magnetic Moment ( $\mu$ )	Magnetogyric Ratio ( $\gamma$ ) *
$^1\text{H}$	99.9844	1/2	2.7927	26.753
$^2\text{H}$	0.0156	1	0.8574	4,107
$^{11}\text{B}$	81.17	3/2	2.6880	--
$^{13}\text{C}$	1.108	1/2	0.7022	6,728
$^{17}\text{O}$	0.037	5/2	-1.8930	-3,628
$^{19}\text{F}$	100.0	1/2	2.6273	25,179
$^{29}\text{Si}$	4.700	1/2	-0.5555	-5,319
$^{31}\text{P}$	100.0	1/2	1.1305	10,840

# Energía de un espín en un campo magnético externo

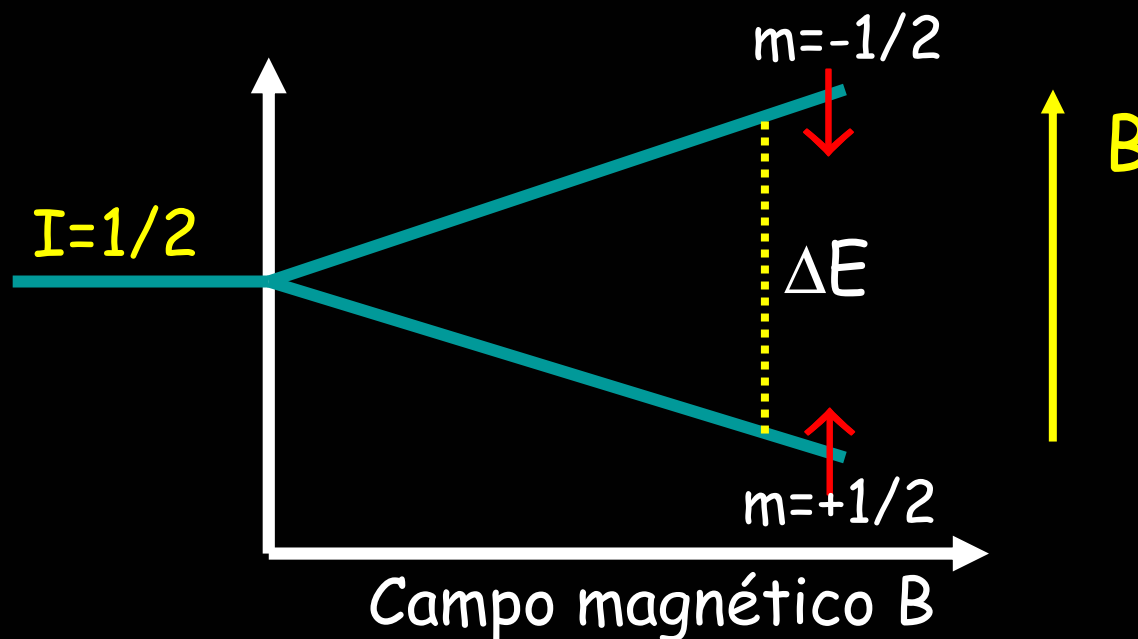
El espín tiende a alinearse con el campo magnético externo

menor energía

mayor energía

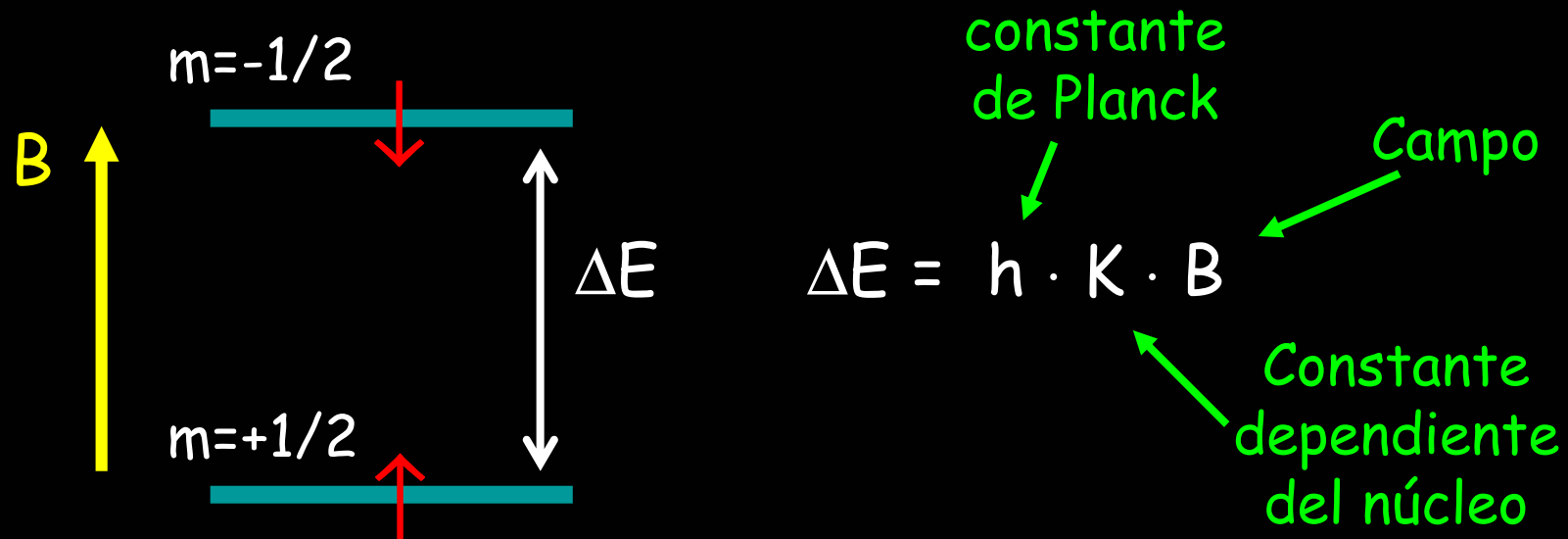


$$\Delta E = E_2 - E_1 > 0$$





# Espectroscopía RMN en presencia de un campo magnético



Se pueden excitar transiciones  
 $m = +1/2 \rightarrow m = -1/2$   
por absorción de luz de frecuencia

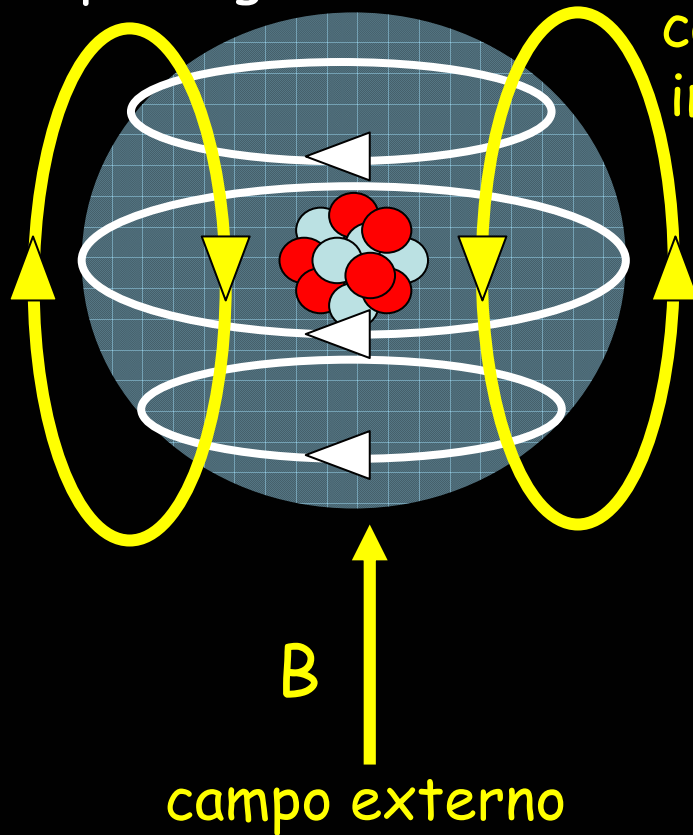
$$\nu = K \cdot B$$

Para  $B = 1$  Tesla  
 $^1\text{H}$   $\nu = 42.6$  MHz  
 $^{13}\text{C}$   $\nu = 10.7$  MHz

## Aspecto fundamental del RMN:

Los electrones apantallan el campo externo

Giro de los electrones  
inducido por el  
campo magnético externo



campo magnético  
inducido por los  
electrones

Campo efectivo que  
"siente" el núcleo

$$B_{ef} = B \cdot (1 - \sigma)$$

$\sigma$  : constante de apantallamiento

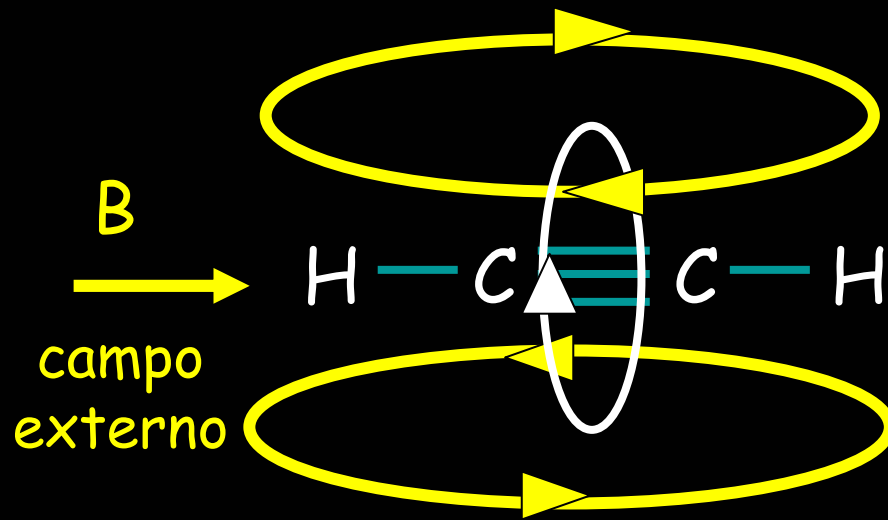
frecuencia de resonancia

$$\nu = K \cdot B \cdot (1 - \sigma)$$

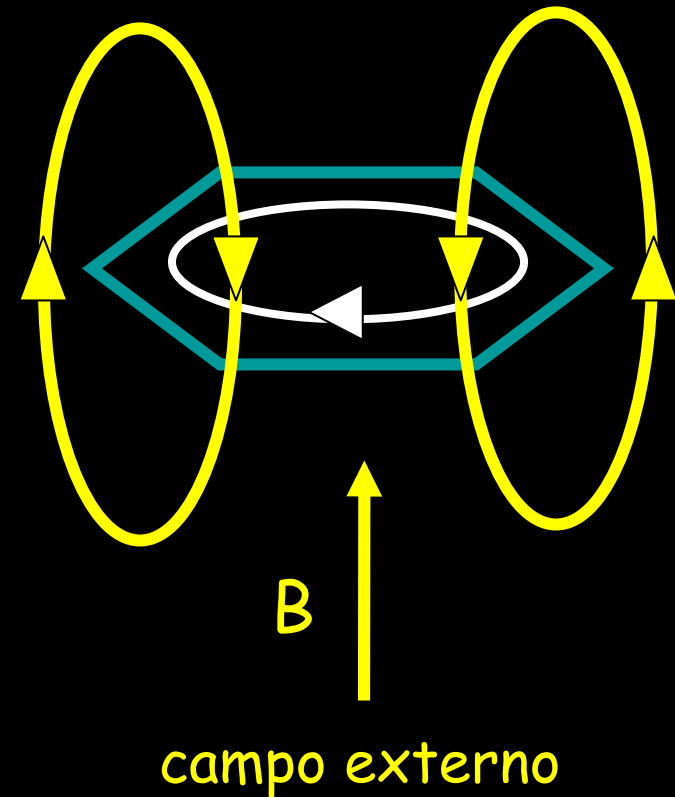


# El apantallamiento depende del entorno químico del núcleo

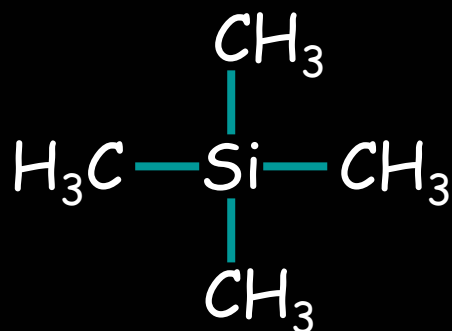
alquinos



anillo bencénico



apantallamiento de referencia



tetrametilsilano (TMS)

$$\nu_0 = K \cdot B \cdot (1 - \sigma_0)$$

(apantallamiento grande:  
C más electronegativo que Si)

Para un  $^1\text{H}$  o un  $^{13}\text{C}$  en cualquier otro compuesto

$$\nu = K \cdot B \cdot (1 - \sigma) \quad \text{en general } \sigma < \sigma_0$$

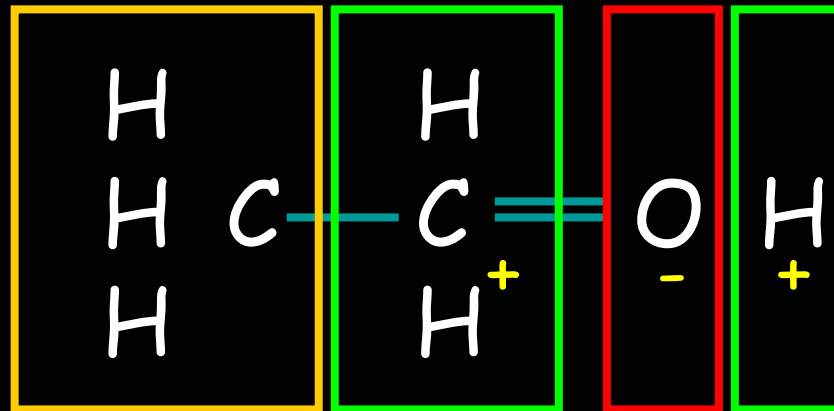
desplazamiento  
químico

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu} 10^6 \text{ ppm}$$

en general  
 $\delta > 0$

átomos no equivalentes en una molécula  
tienen desplazamientos químicos distintos

etanol



H<sub>α</sub>  
C<sub>a</sub>

H<sub>β</sub>  
C<sub>b</sub>

H<sub>γ</sub>

Densidad electrónica  
apantallamiento  
Desplazamiento químico

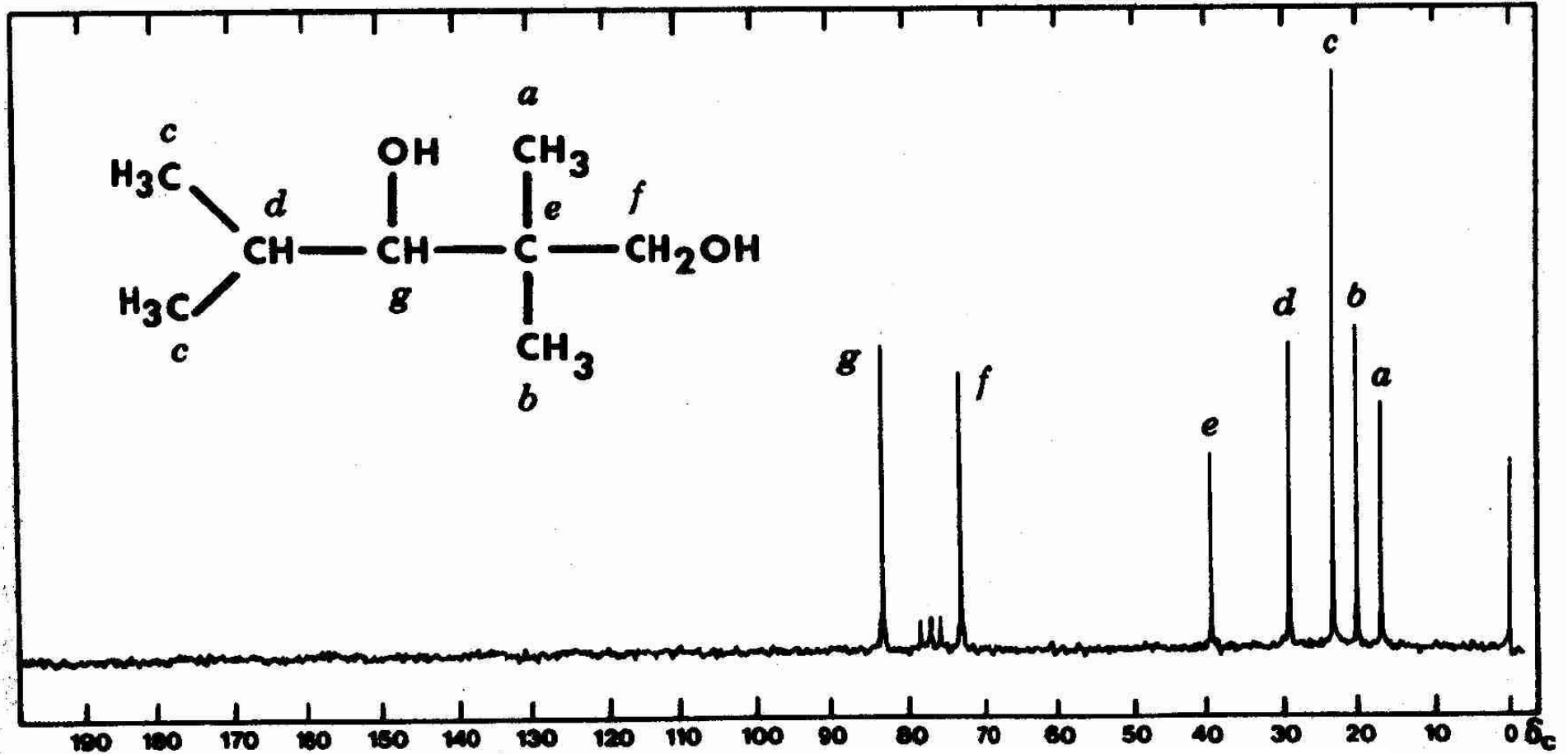
media  
medio  
medio

baja  
pequeño  
grande

alta

baja  
pequeño  
grande

# Carbonos no equivalentes y sus desplazamientos Químicos: espectro RMN



Desplazamiento químico

← apantallamiento pequeño

apantallamiento grande

# Desplazamientos químicos del C en alcoholes

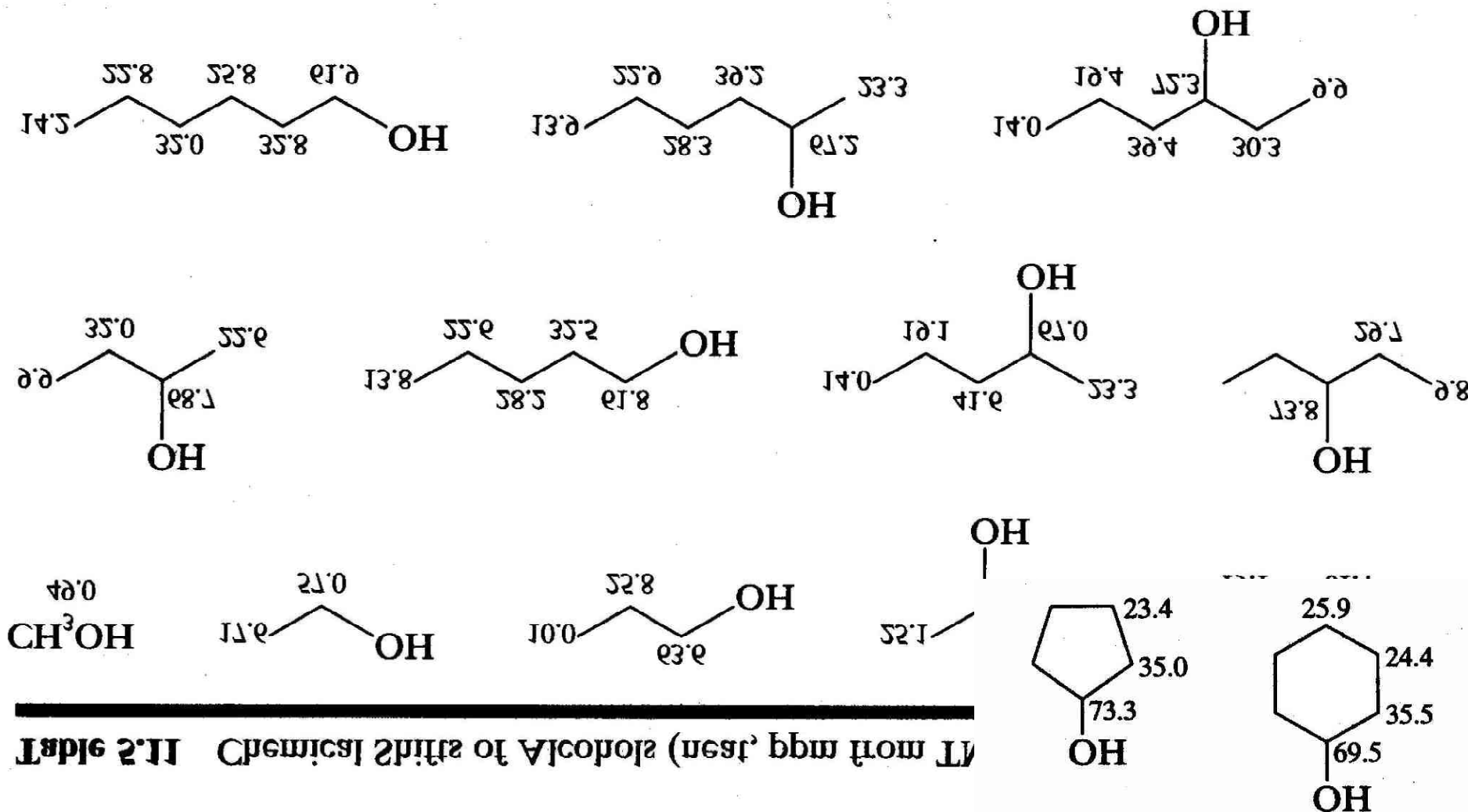
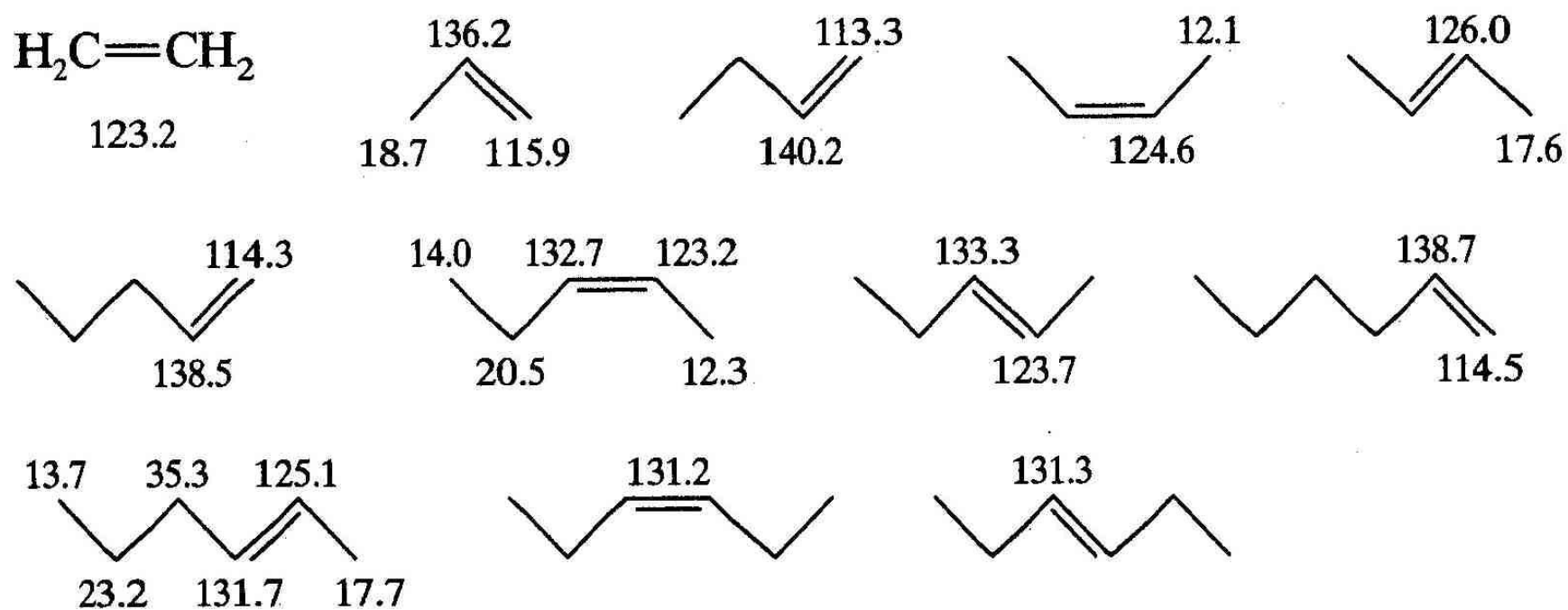


Table 2.11 Chemical Shifts of Alcohols (near, ppm from TMS)

# Desplazamientos químicos del C en alquenos

**Table 5.6** Alkene and Cycloalkene Chemical Shifts (ppm from TMS)



# Nuevos desarrollos en RMN

- Técnicas de pulso en RMN
- Tiempos de relajación spin –red y spin-spin
- Imagen de resonancia magnética
- Efecto Overhauser nuclear
- RMN bidimensional (espectroscopía de correlación)
- Procedimiento PEMD, experimentos COSY y NOESY

# ¿Qué debo saber ahora?

- **Identificar a qué región del espectro electromagnético corresponde una frecuencia (o una longitud de onda o un número de ondas)**
- **Relacionar movimientos moleculares con regiones del espectro**
- **Conocer el significado de las reglas de selección y su origen**
- **Los significados de la anchura de banda, la intensidad y la polarización de una línea espectral. Ley de Lambert-Beer**
- **Los fundamentos y aplicaciones de la espectroscopía de ultravioleta-visible**
- **Los fundamentos y aplicaciones de la espectroscopía de vibración- rotación (IR y Raman)**
- **Los fundamentos y aplicaciones de la resonancia magnética nuclear**



# Ejercicios propuestos para el tema 3

- Estudio de algún artículo que utilice transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET) (2 puntos).
- Estudio de algún artículo que utilice la anisotropía temporal de la fluorescencia (1,5 puntos)
- Estudio de algún artículo que utilice la espectroscopía Raman o de IR para muestras sólidas (2 puntos)
- Estudio de algún artículo que utilice la espectroscopía Raman o de IR para moléculas precursoras de aminoácidos en el espacio exterior (2 puntos)
- Estudio de algún artículo que utilice los tiempos de relajación spin-spin y spin-red en RMN (1,5 puntos) .
- Estudio de algún artículo que utilice la RMN para alguna reacción química (1 punto)
- Estudio de alguna técnica espectroscópica no descrita en el curso (Mössbauer, microondas,EPR) (1,5 puntos)
- (Para cualquier ejercicio: ¡¡Máximo 6 páginas!!)