

## 4. Ajuste de bandas y estimación de sus parámetros

Existe una correlación entre un tipo de estructura que adopta un segmento peptídico y la posición de la vibración amida I del enlace peptídico (esto también es válido para la amida II). Para proteínas, a causa de la gran heterogeneidad estructural que poseen, en la amida I aparecen diversas bandas con posiciones ligeramente diferentes, reflejando, a cierto nivel, la estructura de la proteína. Esta información aparece enmarañada por el solapamiento de las bandas provenientes de diferentes estructuras. Para obtener información estructural hemos de desenmarañar las diferentes contribuciones que se dan en la zona de la amida I. Dos métodos han sido utilizados con este objetivo: a) métodos de reconocimiento de patrones y b) ajuste de bandas (principalmente de la amida I desconvulada).

Los métodos de reconocimiento de patrones se basan en la construcción de un banco de espectros de proteínas con porcentajes de estructura secundaria conocidos. Este banco es utilizado posteriormente para estimar los porcentajes de estructura secundaria de la proteína que nos interesa, utilizando diferentes algoritmos (Rahmelow y Hübner, 1996b; Sane et al., 1999; Severcan et al., 2001). Estos métodos permiten obtener unos porcentajes de las diferentes estructuras secundarias presentes en una proteína (hélices, láminas, giros y otras estructuras) con un error absoluto del 4-10% (Dousseau y Pézolet, 1990; Lee et al., 1990; Sarver y Krueger, 1991; Severcan et al., 2001) sin requerir ninguna asignación de bandas. Sin embargo, su uso no ha enraizado y poco trabajos experimentales los aplican a proteínas de estructura secundaria no conocida por difracción de rayos X. Este método supone que la amida I (o la amida II) sólo es sensible a la estructura secundaria de la proteína, y que una estructura secundaria mostrará siempre un espectro con la misma posición, anchura y forma, independientemente de en qué proteína se localice. El éxito de este método depende de que las proteínas que forman el banco de calibración sean lo más semejantes posibles a la proteína problema. Incluso en estas condiciones, la información estructural obtenible se reduce a una estimación de la estructura secundaria (sobre la posibilidad de obtener otras informaciones ver Rahmelow y Hübner (1996b)).

En el método de ajuste de bandas se realiza una desconvolución, normalmente mediante la desconvolución de Fourier (con frecuencia referida erróneamente como autodesconvolución por razones históricas), con tal de identificar el número y posición aproximadas de las bandas que componen la amida I. Con esta información se realiza un ajuste de bandas en la amida I desconvulada, y el área de una banda se asigna a una estructura de acuerdo con su posición (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh et al., 1994b; Arrondo et al., 1993). Esta asignación descansa en los intervalos de aparición aceptados para las diferentes estructuras secundarias (ver tablas 2.1 y 2.2). Este método es el más extendido, y ha sido validado para espectros de absorbancia obtenidos por transmitancia y mediante reflexión total atenuada, donde los errores absolutos en la estimación de porcentajes de estructura secundaria son del 2-9% (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh et al., 1990; Kumosinski y Unruh, 1996).

Casi desde su origen este método ha sido objeto de diversas críticas (Surewicz y Mantsch, 1988a; Surewicz et al., 1993; Jackson y Mantsch, 1995). Estas críticas han vertido dudas sobre la posibilidad real de ajustar espectros desconvulados con fines cuantitativos. Existen diversas visiones en la literatura sobre esta posibilidad, casi todas ellas negativas. Hemos recopilado algunas de ellas para ilustrar las diversas posiciones: 1) Sólo válido para un análisis cuantitativo cuando ninguna banda ha sido sobredesconvulada, para preservar el área de las bandas (Byler y Susi, 1986; Susi y Byler, 1986). 2) A pesar de que las áreas de las bandas no se ven afectadas por la desconvolución, las distorsiones que introduce en la forma de las bandas hacen sólo recomendable el ajuste del espectro original (no desconvulado) (Surewicz y Mantsch, 1988). 3) Informativo y de realización más simple, pero menos fiable que el ajuste del espectro original (Arrondo y Goñi, 1999). 4) Sólo verdaderamente aplicable para análisis cuantitativo cuando las anchuras de las bandas componentes de la amida I son iguales y conocidas (en autodesconvolución) (Arrondo et al., 1993; Cladera et al., 1992). 5) Genera incoherencias, ya que las áreas integradas de las bandas componentes se ven afectadas por los parámetros de desconvolución utilizados (Jackson y Mantsch, 1995).

Según nuestra opinión, todas estas posiciones reflejan más los errores cometidos en la combinación de la desconvolución con el ajuste de bandas que una limitación real en la combinación de ambas. La primera condición de un ajuste con sentido, es la elección de un modelo adecuado (Johnson y Faunt, 1992), la cual ha sido violada repetidamente. De manera extensiva, se han utilizado bandas Gausianas y Lorentzianas para ajustar espectros desconvulados (Byler y Susi, 1986; Goormaghtigh et al., 1990). Como demostraremos en el punto 4 de Resultados Teóricos, si el espectro original se compone de bandas Lorentzianas el uso de bandas Gausianas es sólo justificable en el límite de una autodesconvolución generalizada. Esto requiere bandas de anchura semejante y conocida, condición que equivocadamente se ha relacionado como necesaria para un análisis cuantitativo. Por otra parte, el uso de bandas Lorentzianas está sólo justificado en el límite de una fuerte infradesconvolución generalizada con factores de estrechamiento altos. Al alejarnos de estas condiciones tan concretas, las bandas Gausianas o Lorentzianas no serán un buen modelo para Lorentzianas desconvuladas, lo cual nos llevará a importantes errores en los parámetros obtenidos en el ajuste. Es necesario pues, la obtención de bandas modelo que describan fielmente bandas desconvuladas, y que puedan utilizarse en el ajuste de espectros desconvulados. Con anterioridad se ha realizado cierto trabajo en esta dirección, obteniendo modelos de bandas desconvuladas para algunos filtros (Rahmelow y Hübner, 1996a). Sin embargo, estos modelos no han sido utilizados en ajustes de espectros reales, y es difícil que lo sean, a causa de la complejidad de sus expresiones.

Algunos autores afirman que los errores introducidos en el ajuste de espectros desconvulados pueden eliminarse, o al menos reducirse, realizando el ajuste en el espectro original (no desconvulado) (Arrondo et al., 1993; Arrondo y Goñi, 1999; Tamm y Tatulian, 1997; Surewicz y Mantsch, 1988). Sin embargo, el ajuste del espectro original no estará libre de errores. En la realización de un ajuste se han de realizar

ciertas asunciones respecto al número de bandas y la forma de éstas, se ha de asumir una forma simple para la línea base y que el espectro no contiene errores sistemáticos (Maddams, 1980; Johnson y Faunt, 1992). Como demostraremos, la validez de todas estas asunciones serán generalmente más críticas en el ajuste de un espectro original, y por lo tanto el ajuste de su espectro desconvuldo será normalmente mucho más robusto (menos sensible a errores en las asunciones). Esta propiedad ya ha sido destacada con anterioridad (Griffiths et al., 1987; Pierce et al., 1990; Zhang et al., 2000), aunque con pocas pruebas.

En este punto cabe destacar el ajuste de espectros desconvuldos utilizando un factor de estrechamiento,  $k$ , igual a 1. El ajuste de este espectro se ha considerado como el ajuste de un espectro original (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1990) o como el ajuste de un espectro no desconvuldo (Goormaghtigh et al., 1994b), confundiendo estrechamiento con desconvolución. Además, estos autores afirman que en este ajuste, los posibles artefactos y errores relacionados con el ajuste de espectros desconvuldos se minimizan. En realidad, el error que se comete es doble: por un lado, el ajuste de un espectro desconvuldo con  $k = 1$  es menos robusto que el ajuste del espectro original, y por otro lado, al ajustar este espectro desconvuldo con bandas Lorentzianas (o Gaussianas) se introducirá un error en el modelo.

Una vez realizado un ajuste, obtenemos los parámetros estimados. Para muchos usuarios el análisis acaba en este punto, pero tan importante es obtener una estimación de los parámetros como una estimación del error cometido, o de su precisión. Esto nos permite, por ejemplo, comparar resultados entre dos experimentos y poder afirmar que existen diferencias significativas entre ambos, o simplemente poder determinar un intervalo en el que con gran probabilidad se encontrarán los parámetros reales de las bandas (Press et al., 1992 cap. 15; Johnson y Faunt, 1992; Straume y Johnson, 1992).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, la precisión con la que pueden estimarse los parámetros de un espectro con ruido sólo ha sido abordado para una banda aislada, y en concreto para bandas Lorentzianas y Gaussianas puras, sin ninguna limitación de resolución instrumental, apodización ni desconvolución (Marshall y Verdun, 1990 cap. 5; Liang y Marshall, 1990). Respecto a bandas solapadas, según nuestro conocimiento, no hay estudios detallados al respecto.

Por lo tanto nos interesan tres aspectos: desarrollar modelos adecuados para ajustar bandas que han sufrido cierta manipulación matemática (en concreto para la desconvolución de Fourier) de manera que podamos obtener los parámetros con gran exactitud, determinar la precisión de los parámetros en presencia de ruido, y determinar como la presencia de errores en el modelo afectan a la exactitud de los parámetros. Todo esto para bandas Lorentzianas aisladas, y posteriormente para bandas Lorentzianas solapadas. También se hablará algo sobre otros tipos de bandas, en concreto de bandas Voigtianas



objetivos

Se pretende ampliar la teoría de la autodesconvolución de Fourier a condiciones más generales, como la infradesconvolución y la sobredesconvolución. Así mismo, se pretende estudiar la capacidad de otros métodos, basados en la desconvolución, de estrechar bandas de espectros. Estos métodos de desconvolución son la desconvolución regularizada (lineal y no lineal) y la desconvolución de Fourier combinada con la predicción lineal.

Por otro lado se pretende describir qué modelos de bandas se han de utilizar en el ajuste de espectros (formados por bandas Lorentzianas o Voigtianas) que han sufrido diversas manipulaciones matemáticas, entre ellas la desconvolución de Fourier. También queremos estudiar otros aspectos relacionados con el ajuste, como son su sensibilidad a errores en el modelo o a la presencia de ruido en los datos.

Posteriormente, nuestro objetivo es aplicar gran parte de lo desarrollado en los dos puntos anteriores, al análisis de espectros de infrarrojo del transportador ADP/ATP, tanto solubilizado en dodecilmaltósido, como reconstituido en liposomas de fosfatidil colina / ácido fosfatídico. Entre los espectros analizados se pretende incluir, además de los espectros de absorbancia en presencia de H<sub>2</sub>O con radiación infrarroja no polarizada, espectros obtenidos con luz polarizada y espectros obtenidos en presencia de D<sub>2</sub>O. Con todos estos experimentos combinados con los métodos de desconvolución y ajuste pretendemos obtener información estructural del transportador.



materiales y métodos

## 1. Obtención del transportador ADP/ATP (Anc2)

El transportador ADP/ATP (Anc2) se obtiene a partir de una cepa de *S. cerevisiae* en la que las tres isoformas del transportador ADP/ATP que se expresan están delecionadas, y se ha introducido un plásmido conteniendo el gen ScANC2. Para una purificación más efectiva, el Anc2 ha sido expresado con una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal (Anc2pHis) (Fiore et al., 2000).

Para el proceso de purificación hemos contado con la colaboración de dos grupos: el grupo dirigido por Gérard Brandolin en el “Laboratoire de Biochimie (URA 1130 CNRS), Département de Biologie Moléculaire et Structurale. Centre d’Etudes Nucléaires” de Grenoble; y el grupo de Guy Lauquin, en el “Institut de Biologie Cellulaire du CNRS, Université” de Burdeos.

### 1.1. Obtención de las mitocondrias

El crecimiento de la cepa de levadura fue realizado en condiciones aeróbicas a 28 °C, en un medio Yp-lac (2% bactopectona (Difco), 1% extracto de levadura, 2% lactato, y 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5), hasta una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 3.

La obtención de mitocondrias a partir de las células del cultivo de levadura ha sido realizada mediante el método descrito en Daum et al. (1982), con algunas modificaciones (Brandolin et al., 1993a).

Brevemente, tras el cultivo, las células se recogen por centrifugación (20 minutos a 750 g) y se lavan con agua dos veces. Las células centrifugadas se resuspenden en dos volúmenes de 0,1 M Tris-Cl, 0,5 M mercaptoetanol, pH 9,4, y se incuban a 30 °C durante una hora. Posteriormente, se lavan dos veces con un volumen de 1,3 M sorbitol, 1 mM PMSF (tampón de lavado). Los proteoplasmas se obtienen mediante digestión enzimática, resuspendiendo las células en tres volúmenes de tampón 1,3 M sorbitol, 20 mM KPi, 1 mM PMSF, pH 7,4, y añadiendo 2,5 mg de *Zymolyase 20T* (Calbiochem) por gramo de células. La digestión se realiza a 30 °C, y puede seguirse por el decaimiento de la D.O. a 600 nm. La incubación se alarga hasta alcanzar una D.O. 10% de la inicial, hasta un máximo de una hora. Después de la digestión de la pared celular todos los pasos se realizan a 4 °C. Se recogen los proteoplasmas (5 minutos a 2000 g), y se lavan dos veces con un volumen de tampón de lavado. Éstos se resuspenden en el mínimo volumen de un medio 0,6 M manitol, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, 0.1% BSA (libre de ácidos grasos), 1 mM PMSF y pH 7,4 (tampón de homogenización), que asegura la integridad de los orgánulos, y se disrumen mediante un homogenizador. Las mitocondrias se recuperan mediante centrifugación diferencial: Primero se centrifuga a bajas aceleraciones (5 minutos a 1000g). En el sobrenadante tenemos las mitocondrias junto con contaminantes. En el sedimento, entre otros materiales, células no rotas. Se repite el proceso de homogenización y centrifugación con este sedimento. El segundo paso de la centrifugación diferencial consiste en la centrifugación a altas aceleraciones del sobrenadante (10 minutos a 12 000 g). Al sedimento, que contiene las mitocondrias, se le repite el proceso de homogenización y centrifugación

diferencial. El nuevo sedimento se resuspende en el tampón de homogenización pero sin BSA ni PMSF. Posteriormente se congelan en nitrógeno líquido y se guardan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Antes de su congelación se retira una pequeña alícuota para calcular la concentración de proteína de las mitocondrias purificadas. El método utilizado es el del BCA (ácido bicinconínico) (Smith et al., 1985), empleando como calibración disoluciones de concentración conocida de BSA.

### **1.2. Purificación del Anc2pHis a partir de mitocondrias**

La purificación se basa en primer lugar en la poca afinidad que muestran los transportadores de la familia mitocondrial por la hidroxiapatita, cuando se hallan en presencia de ciertos detergentes, al contrario que la mayor parte de las proteínas de las mitocondrias, que quedan retenidas. La segunda parte de la purificación se basa en la afinidad del Anc2pHis por el  $\text{Ni}^{2+}$  por la presencia de la cola de seis histidinas en su extremo C-terminal (Fiore et al., 2000).

Se incuban las mitocondrias con catr (2 nmol catr por mg de proteína mitocondrial) a temperatura ambiente, durante 15 minutos. A partir de este momento todos los pasos se realizan entre  $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las mitocondrias (a 10 mg de proteína/ml) se lisan en un medio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  100 mM, TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM, dodecil maltósido (DM) 1%, *Emulphogene BC720* 2%, PMSF 1 mM, pH 7,3 (concentraciones finales). Se centrifuga a 10 000 g durante 2 minutos. El sobrenadante se hace pasar por una columna de hidroxiapatita (HTP). Esta columna contiene 1,4 gramos de HTP por cada 10 mg de proteínas mitocondriales iniciales, y se equilibra previamente con un tampón  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  50 mM, TrisCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, *Emulphogene BC720* 0,2%, PMSF 1 mM, a pH 7,3 (tampón HTP). La elución de la columna se realiza a 1 ml/min con el tampón HTP, y puede seguirse por la absorción de las proteínas en el ultravioleta. El Anc2pHis se recupera en el volumen vacío de la columna. A la fracción recogida se le añade  $\text{MgSO}_4$ , NaPi, NaCl, DM, hasta una concentración final  $\text{MgSO}_4$  0,3 mM, NaPi 50 mM, NaCl 50 mM, DM 1%, a pH 7,3.

Posteriormente se realiza el segundo paso de la purificación (también a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Se lava 1 ml por cada 10 mg de proteína mitocondrial inicial de resina Ni-NTA agarosa tres veces con tres volúmenes de una disolución NaPi 50 mM, DM 0,02%, a pH 7,3 (tampón lavado NaPi). Para separar la resina de la disolución se centrifuga durante 2 minutos a 2000 g. La resina se incuba con la fracción recogida de la columna de HTP durante una hora en agitación. La resina se lava dos veces con cinco volúmenes de tampón lavado NaPi, incubando durante 15 minutos en agitación, y a continuación se lava una vez con cinco volúmenes de una disolución NaCl 50 mM, DM 0,02%, MES 10 mM, a pH 6,8, incubando durante 15 minutos. La proteína unida a la resina se eluye dos veces con un volumen de una disolución NaCl 50 mM, DM 0,02%, MES 10 mM, imidazol 0.5 M, a pH 6,8, incubando durante 20 min. En los dos volúmenes eluidos se halla el Anc2pHis, habitualmente a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml. En este estado la proteína ya puede ser reconstituida.

Para trabajar con la proteína solubilizada (la concentración de imidazol es demasiado alta) se dializa contra 100 volúmenes de una disolución NaCl 50 mM, Mes 10 mM, DM 0,015%, a pH 6,8, y a temperatura ambiente, durante una hora; y contra otros 100 volúmenes a 4 °C toda la noche. A la concentración a la que se halla el transportador se pueden realizar experimentos de fluorescencia, pero para estudios de IR conviene una concentración mínima de 10 mg/ml.

### **1.3. Determinación de la concentración del Anc2pHis y del DM**

Tal como se describe el proceso de purificación, la muestra obtenida se halla a 0,04 mg/ml de Anc2pHis y 0,015% ( $\approx 0.15$  mg/ml) de DM, en tampón 10 mM Mes y 50 mM NaCl. La concentración de DM representa la que se halla libre (no unida a proteína), por lo que la concentración de DM total en la muestra será mayor.

Esta concentración de proteína es muy baja para realizar estudios de espectroscopia infrarroja en disolución. Incluso la preparación de películas secas puede ser dificultosa por la baja relación proteína/tampón, que puede causar la precipitación/cristalización del tampón en el proceso de secado. Por ello, la muestra fue sujeta a un proceso de concentración. La muestra se dispone en un concentrador (*Centriprep Concentrators*, Amicon) para volúmenes de 15 ml, y se centrifuga a 1500 g hasta reducir el volumen de la muestra unas 200 veces.

Este proceso no varía la concentración del tampón y la concentración de la proteína aumenta a medida que el volumen de la muestra disminuye. La concentración de DM aumentará con la reducción del volumen de la muestra, pero de una manera poco controlable, y habrá que determinarla.

Después del proceso de concentración por centrifugación se determinó la concentración de proteína. Esta concentración se obtuvo de dos formas. Mediante la absorbancia de la muestra en el UV-vis, utilizando para el Anc2pHis:  $\epsilon_{280} = 1,1 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (obtenido utilizando para el triptófano un  $\epsilon_{280} = 4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y para la tirosina un  $\epsilon_{280} = 1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). También se obtuvo mediante el método de la reactividad ante el ácido *biconchoninic* (Smith et al., 1985), dando valores similares.

La concentración de DM se obtuvo a partir de la absorbancia integrada entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  de la muestra, una vez restada la contribución del agua. Para obtener la concentración es necesario conocer el coeficiente de absorción integrado del DM para dicho intervalo, así como el paso óptico de la muestra. El coeficiente de absorción neperiano integrado se obtuvo a partir de 4 disoluciones de DM de concentración conocida (entre 200 mg/ml y 50 mg/ml), y fue de  $B_{3000-2800} = (187 \pm 14) \text{ L/g cm}^{-2}$ . El paso óptico se obtuvo utilizando la diferencia de absorción entre 2125 y 1880  $\text{cm}^{-1}$ , un valor de  $\epsilon_{2125} - \epsilon_{1880} = 1,55 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el agua y la concentración del agua. La concentración del agua se obtuvo asumiendo para los solutos una densidad de 1 g/L.

### **1.4. Reconstitución del Anc2pHis en liposomas**

Se ha realizado en una mezcla de fosfatidil colina y ácido fosfatídico de huevo (ePC y ePA). La relación ePC/ePA utilizada ha sido 9/1, y la razón lípido proteína buscada fue de 3/1 (unos 130 lípidos por monómero de Anc2pHis).\*

La reconstitución se ha realizado a partir del Anc2pHis purificado tras el paso de diálisis, mediante absorción del detergente con *Bio-Beads*, partiendo de un estado de micelas mixtas. El proceso es el siguiente: a una mezcla de DM y lípidos preequilibrados durante un par de horas a temperatura ambiente, para que formen micelas mixtas, se le añade la proteína solubilizada. Se incuba la mezcla en agitación un par de horas a 4 °C, para permitir la formación de micelas mixtas que contengan la proteína. Posteriormente se añaden los *Bio-Beads* y tras un periodo no inferior a 6 horas de suave agitación a 4 °C éstos se filtran. La solución, que aparecerá ligeramente blanquecina por la presencia de proteoliposomas, se centrifuga a 90 000 g durante una hora y media. El sedimento se resuspende en 50 mM NaCl, 10 mM Mes a pH 6,8 para limpiar el imidazol presente. La centrifugación se repite, pero esta vez el sedimento se resuspende en el volumen adecuado para los experimentos.

La cantidad de DM y lípidos preequilibrados, así como la de *Bio-Beads* se obtiene teniendo en cuenta lo siguiente: A) La relación lípido/proteína buscada es de 3/1; B) Para formar micelas mixtas es necesario una relación detergente / lípido mayor de  $\approx 2/1$  (Lambert et al., 1998); C) Un gramo de proteína solubilizada une aproximadamente un gramo de detergente (Krämer y Palmieri, 1989); D) Un gramo de *Bio-Beads* absorbe aproximadamente 150 mg de detergente, y 2 mg de lípido; y E) Conviene añadir *Bio-Beads* 5 veces en exceso, para acelerar el proceso (Lambert et al., 1998).

Los liposomas multilamelares se preparan de la siguiente manera. Las cantidades necesarias ePC y ePA se disuelven en cloroformo y se secan mediante una corriente de nitrógeno seco. Una vez bien secos se resuspenden en una disolución NaCl 50 mM, MES 10 mM, a pH 6,8, con la ayuda de un *vortex*.

---

\* Las relaciones dadas serán siempre de masas. En caso contrario será indicado explícitamente.

## 2. Adquisición de los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier

### 2.1. Formas de adquirir un espectro

Existen tres formas principales de adquirir los espectros, tanto de emisión como de absorción. Una es la dispersión, donde se mide la respuesta del sistema en función de la frecuencia de la energía. Ésta es la forma habitual de adquirir los espectros de UV-vis. Otra es la adquisición de la evolución del sistema en el tiempo tras un impulso de energía, como se realiza habitualmente en RMN. La última es la forma que se ha impuesto mayoritariamente para la adquisición de espectros en el infrarrojo, y consiste en la respuesta del sistema ante la diferencia de camino óptico entre dos haces (interferometría) (Hollas, 1996; Marshall y Verdun, 1990; Griffiths y Haseeth, 1986). Estas dos últimas formas de adquisición son convertidas en respuesta del sistema respecto a frecuencia de energía de la radiación por la transformada de Fourier (TF), y así se habla de RMN-TF e IR-TF (Marshall y Verdun, 1990; Griffiths y Haseeth, 1986). Para una visión histórica del desarrollo de IR-TF así como de su funcionamiento práctico ver Griffiths (1974), Griffiths (1983), Coates (1998), Wilks (1992) y Miller (1992).

### 2.2. Adquisición y procesamiento de un espectro por interferometría

#### 2.2.1. Fuente monocromática

En la figura 2.1 se presenta la forma habitual de adquirir un espectro con un interferómetro. Un haz de luz colimada, procedente de una fuente, se divide en dos mediante un divisor de haces. El camino óptico que recorre uno de ellos es constante, mientras que el del otro se varía mediante un espejo móvil. Los dos haces se recombinan nuevamente en el divisor de haces, donde la mitad del haz retorna a la fuente mientras que la otra mitad se conduce al detector. Para una luz monocromática este diseño causa que la energía que llega al detector oscile en función del desplazamiento del espejo móvil, debido a la interferencia entre ambos haces, con la forma (Griffiths y Haseeth, 1986 cap. 1):

$$I(x) = 0,5I(1 + \cos(2\pi\nu_0 x)) \quad (2.1)$$

donde  $x$  es la diferencia de camino óptico entre ambos haces,  $I$  es la intensidad del haz monocromático,  $\nu_0$  es la frecuencia del haz monocromático, y  $I(x)$  es la intensidad que llega al detector. Cuando la interferencia es constructiva la intensidad que llega al detector es igual a la intensidad del haz monocromático. Cuando la interferencia es destructiva la energía es cero.

---

\* Aproximadamente dos veces el desplazamiento del espejo móvil.

2.2.2. Fuente policromática

En la práctica, el detector no responde a la señal continua, sino sólo a la parte modulada (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1). La señal del detector se llama interferograma. Si además, consideramos que la fuente no es monocromática, sino policromática,  $I(\nu)$  tomará un continuo de valores. La señal del detector se tendrá que expresar en forma integral (o sumatorio de infinitos términos), adquiriendo la forma (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1):

$$I(x) = 0,5 \times \int_{-\infty}^{+\infty} I(\nu) \cos(2\pi\nu x) d\nu = 0,5 \times \mathfrak{F}_{\text{Re}}^{-1} \{I(\nu)\} \tag{2.2}$$

donde  $\mathfrak{F}_{\text{Re}}^{-1} \{I(\nu)\}$  representa la transformada coseno (real) inversa de Fourier para la función  $I(\nu)$  (Marshall y Verdun, 1990 cap. 1).

Una vez adquirido el interferograma, se puede conocer la intensidad de la fuente en función de la frecuencia mediante la transformada real de Fourier ( $\mathfrak{F}_{\text{Re}}$ ) (Marshall y Verdun, 1990 cap. 1):

$$I(\nu) = 2 \times \mathfrak{F}_{\text{Re}} \{I(x)\} = 2 \times \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) \cos(2\pi\nu x) dx \tag{2.3}$$

2.2.3. Limitaciones instrumentales

Existen ciertas limitaciones instrumentales que afectan al espectro obtenido por interferometría, y que lo hacen diferir de uno ideal (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1-3; Horlick y Malmstadt, 1970; Rahmelow, 1997b). Describiremos estas limitaciones por separado, pero se ha de tener en cuenta que todas ellas existirán simultáneamente en la práctica.

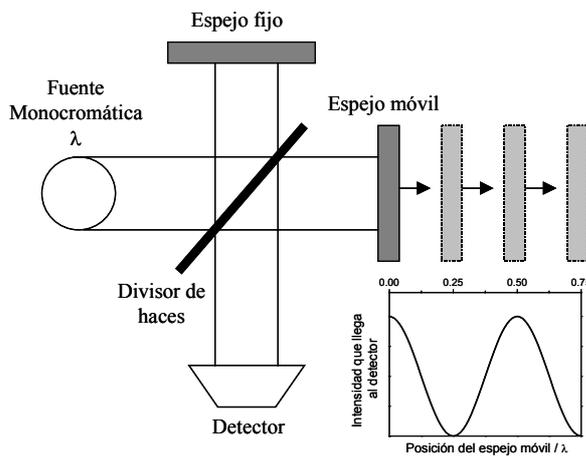


Figura 2.1. Esquema de funcionamiento de un interferómetro.

2.2.3.1. Respuesta dependiente de la frecuencia de la radiación para el detector y el divisor de haces

En la práctica no se puede obtener  $I(\nu)$ , ya que la señal del detector a una frecuencia depende, además de la intensidad del haz a esa frecuencia, de varios factores instrumentales,  $H(\nu)$ , que dependen de la frecuencia de la radiación, como son la respuesta del detector, la

reflectancia / transmitancia del divisor de haces, los filtros electrónicos, etc., que hacen que la respuesta del detector sea (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1):

$$I(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(v) \cos(2\pi vx) dv = \mathfrak{F}_{\text{Re}}^{-1} \{B(v)\} \quad (2.4)$$

donde,

$$B(v) = 0,5 \times I(v) \times H(v) \quad (2.5)$$

$B(v)$  se podrá calcular como la transformada real de  $I(x)$ . Para el cálculo de la transmitancia o reflectancia de una muestra, siempre que se mantengan las mismas condiciones instrumentales entre referencia y muestra, el uso de  $B(v)$  es equivalente al de  $I(v)$ , y los espectros obtenidos son perfectamente válidos. Esto se debe a que la transmitancia y la reflectancia implican un cociente en el que se eliminan las constantes del experimento, el 0,5 y  $H(v)$  (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1).

### 2.2.3.2. Resolución limitada

Instrumentalmente sólo resulta posible, o conveniente, medir  $I(x)$  hasta un cierto valor de  $x$ ,  $x_f$ . Esto se debe a que el desplazamiento del espejo móvil, el cual crea la diferencia de camino óptico  $x$ , esta forzosamente limitado. La consecuencia es que accedemos a  $I(v)$  con una cierta resolución. Esto se puede expresar considerando que el interferograma ideal está multiplicado por una función de truncado o apodización  $R(x, x_f)$ , que toma el valor de cero para  $|x| > x_f$  (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1):

$$I(x) = \int_{-x_f}^{+x_f} I(v) \cos(2\pi vx) dv = \mathfrak{F}_{\text{Re}}^{-1} \{I_{\text{ideal}}(v)\} \times R(x, x_f) \quad (2.6)$$

Ahora la transformada de Fourier de  $I(x)$  dará el espectro de la fuente a cierta resolución  $I(v)$ , esto es, convulado con la transformada de Fourier de la función de truncado (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1):

$$I(v) = \mathfrak{F}_{\text{Re}} \{I(x)\} = I_{\text{ideal}}(v) \otimes R(v, x_f) \quad (2.7)$$

La resolución depende de la función  $R(x, x_f)$ . Una fuente perfectamente monocromática, dará una banda en el espectro de una forma  $R(v, x_f)$ , que será la función instrumental del interferómetro (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1). La función de trunco de un interferómetro es por razones físicas la función Caja, que da una función senc como función instrumental (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1). \* Esta función no es muy adecuada como función instrumental, ya que introduce oscilaciones importantes a ambos lados de una banda limitada por la resolución. Por ello, la función de trunco Caja se sustituye por otra, en un proceso conocido como apodización. La anchura a media alzada y forma que dan diferentes funciones de apodización se han publicado (ver figura 2.4 de la introducción y Griffiths y Haseth (1986 cap. 1)). Las anchuras muestran valores cercanos a  $1/x_f$ . Este valor se define como la resolución nominal de un espectro de IR-TF (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1).

---

\* La función senc se define como:  $\text{senc}(x) = \text{sen}(x)/x$

Si el espejo móvil se mantiene lo suficientemente perpendicular al haz durante todo el recorrido, y el haz tiene un ángulo sólido lo suficientemente pequeño, la resolución nominal equivale a la resolución real del espectro (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1).

### 2.2.3.3. La corrección de la fase del interferograma

El interferograma muestra una señal que decae al aumentar la diferencia de camino óptico. Cuando  $x = 0$ , todas las frecuencias están en fase y la señal es máxima, ya que la diferencia de camino óptico entre los dos haces separados por el divisor de haces será cero. Además, la señal, al estar compuesta de cosenos es simétrica respecto a  $x = 0$ . En los interferogramas reales, no todas las frecuencias están en fase en  $x = 0$  y, por tanto, el interferograma no es simétrico. Las razones de este desfase son la dependencia del índice de refracción del divisor de haces con la frecuencia, y el tiempo de respuesta de la electrónica del sistema detector (Marshall y Verdun, 1990 cap. 9). La señal será ahora:

$$\begin{aligned}
 I(x) &= \int_{-\infty}^{+\infty} I(\nu) \cos(2\pi\nu x + \varphi(\nu)) d\nu = \\
 &= \int_{-\infty}^{+\infty} (I(\nu) \cos \varphi(\nu) \cos(2\pi\nu x) - I(\nu) \text{sen} \varphi(\nu) \text{sen}(2\pi\nu x)) d\nu = \quad (2.8) \\
 &= \mathfrak{I}_{\text{Re}}^{-1} \{ \cos \varphi(\nu) I(\nu) \} + \mathfrak{I}_{\text{Im}}^{-1} \{ \text{sen} \varphi(\nu) I(\nu) \}
 \end{aligned}$$

donde  $\varphi(\nu)$  es la fase respecto al número de onda, y  $\mathfrak{I}_{\text{Im}}^{-1}$  es la transformada seno o imaginaria de Fourier. En estas circunstancias,  $I(\nu)$  no se puede obtener directamente a partir de la transformada real de Fourier de  $I(x)$ . Si por lo contrario realizamos la transformada compleja inversa de Fourier obtenemos (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 3):

$$\mathfrak{I} \{ I(x) \} = \cos \varphi(\nu) I(\nu) + i \text{sen} \varphi(\nu) I(\nu) \quad (2.9)$$

Por lo tanto:

$$\varphi(\nu) = \arctan \left( \frac{\text{Im} \{ \mathfrak{I}^{-1} \{ I(x) \} \}}{\text{Re} \{ \mathfrak{I}^{-1} \{ I(x) \} \}} \right) \quad (2.10)$$

Normalmente, la fase varía lentamente respecto al número de onda. Por ello, el valor de  $\varphi(\nu)$  puede obtenerse a baja resolución (y por lo tanto con menos ruido), utilizando sólo un número de puntos alrededor del  $x = 0$ . Una vez conocido  $\varphi(\nu)$ , dividimos la parte real de la transformada compleja por  $\cos \varphi(\nu)$ , y obtenemos  $I(\nu)$  (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 3).

Para una frecuencia  $\nu_1$  a la que no llega señal al detector,  $I(\nu) = 0$ , la fase obtenida por la ecuación 2.10 no está definida ( $\varphi(\nu_1) = 0/0$ ). Si llega una señal muy débil, la ecuación 2.10 estará definida, pero el valor de la fase a  $\nu_1$  se obtendrá con mucho error. Como consecuencia, en un espectro de absorbancia, las bandas que muestran una absorbancia alta mostrarán errores mayores en la corrección de la fase, y distorsiones mayores en su forma.

### 2.3.4. Respuesta no-lineal del detector

En los anteriores apartados hemos supuesto que el detector responde linealmente a la intensidad de radiación recibida, es decir, que la respuesta del detector,  $G(x)$ , es:

$$G(x) = c_1 I(x) \quad (2.11)$$

En estas condiciones la transformada de Fourier de  $G(x)$  está directamente relacionada con la intensidad que llega al detector.

$$\mathfrak{F}_{\text{Re}} \{G(x)\} = c_1 I(v) \quad (2.12)$$

Además en los espectros de transmitancia o reflectancia la constante  $c_1$  se elimina, y los espectros obtenidos son perfectamente válidos.

Sin embargo, hemos de considerar que la respuesta de un detector casi nunca es lineal respecto a la intensidad recibida. Hemos de asumir que la respuesta del detector toma la forma (Abrams et al., 1994):

$$G(x) = c_1 \left( I(x) + c_2 I(x)^2 + c_3 I(x)^3 + \dots + c_n I(x)^n \right) \approx c_1 \left( I(x) + c_2 I(x)^2 \right) \quad (2.13)$$

donde en la aproximación hemos considerado que sólo el primer término no lineal es significativo. La no-linealidad del detector vendrá determinada por el valor de  $c_2$ , que será un número negativo. Una vez determinado este valor, la respuesta del detector se puede linealizar matemáticamente:

$$I(v) \propto \mathfrak{F}_{\text{Re}} \left\{ \frac{1 \pm \sqrt{4c_2 \times G(x) + 1}}{2c_2} \right\} \quad (2.14)$$

Sin esta linealización no es posible obtener  $I(v)$  a partir de  $G(x)$ , pues (Abrams et al., 1994):

$$\mathfrak{F}_{\text{Re}} \{G(x)\} = G(v) = c_1 (I(v) + c_2 I(v) \otimes I(v)) \quad (2.15)$$

Por lo tanto, el espectro obtenido es igual a la suma de dos espectros: el espectro real  $I(v)$  y un espectro artificial  $I(v) \otimes I(v)$ . La presencia de este espectro artificial distorsiona el espectro de emitancia y por ello los espectros de transmitancia y reflectancia. Esta distorsión afectará en mayor medida a las zonas del espectro que muestran una mayor absorbancia, y desplazará la posición de la línea base del espectro (Abrams et al., 1994; Rahmelow, 1997b; Carter III et al., 1990; Zhang et al., 1997).

## 2.3. Condiciones experimentales de los espectros de IR-TF

Los espectros de transmitancia se han obtenido en un interferómetro Mattson Polaris, equipado con un detector MCT (este detector ha de refrigerarse mediante  $N_2$  líquido) (Coates, 1998). El interferograma fue obtenido a una diferencia de camino óptico máximo de 0,5 cm (resolución nominal de  $2 \text{ cm}^{-1}$ ) y apodizado con una función Triángulo antes de realizar la transformada de Fourier. La corrección de fase se obtuvo por el método de Mertz (Griffiths y Haseth, 1986 cap. 3).

Los espectros de reflectancia, obtenidos mediante un accesorio de reflexión total atenuada, se adquirieron en un interferómetro Bio-Rad FTS 6000, equipado con un detector MCT. Los espectros se adquirieron a  $2 \text{ cm}^{-1}$  de resolución nominal, se apodizaron con una función Triángulo y la fase se corrigió por el método de Mertz.



### 3. Espectros de absorbancia por transmitancia

La transmitancia de un material,  $T(\nu)$ , se obtiene como la intensidad de radiación que llega al detector cuando el haz de una radiación atraviesa un material,  $I_M(\nu)$ , dividido por la intensidad que llega al detector cuando el material no está presente,  $I_F(\nu)$  (intensidad de fondo):

$$T(\nu) = \frac{I_M(\nu)}{I_F(\nu)} \quad (3.1)$$

Cuando la variación de  $I_M(\nu)$  respecto a  $I_F(\nu)$  causada por fenómenos de dispersión, reflexión o emisión del material que atraviesa el haz es despreciable, la absorción del material se obtiene como:

$$Abs(\nu) = -\log T(\nu) \quad (3.2)$$

con la característica que si sólo una vibración de la muestra absorbe radiación, el espectro de absorción se compone de una banda, cuya posición nos da la frecuencia de oscilación de la vibración, su área está relacionada con la concentración del oscilador, el grosor de la muestra y la variación del momento dipolar del oscilador respecto a la coordenada de oscilación. Por otra parte, la anchura y forma de la banda refleja los diversos procesos de relajación o inhomogeneidades del oscilador (sin tener en cuenta las limitaciones instrumentales). Para una muestra isotrópica, el coeficiente de absorción integrado (neperiano) de una vibración,  $B$ , se obtiene como (Nakamoto, 1997):

$$B = \frac{\int Abs(\nu) d\nu}{c \times l \times \log e} \propto \left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q} \right)^2 \quad (3.3)$$

donde  $c$  es la concentración de vibradores,  $l$  es el grosor de la muestra,  $\bar{\mu}$  es el momento dipolar, y  $q$  es la coordenada en la que se realiza la vibración.  $B$  es directamente proporcional a la variación del momento dipolar respecto a la coordenada de oscilación.

Para una sustancia pura, el coeficiente de absorción (neperiano)  $\alpha$ , y su coeficiente de absorción molar (decádico)  $\varepsilon$ , cumple que (Hancer et al., 2000):

$$Abs(\nu) = \frac{\alpha(\nu) \times l}{\ln 10} = \varepsilon(\nu) \times c \times l \quad (3.4)$$

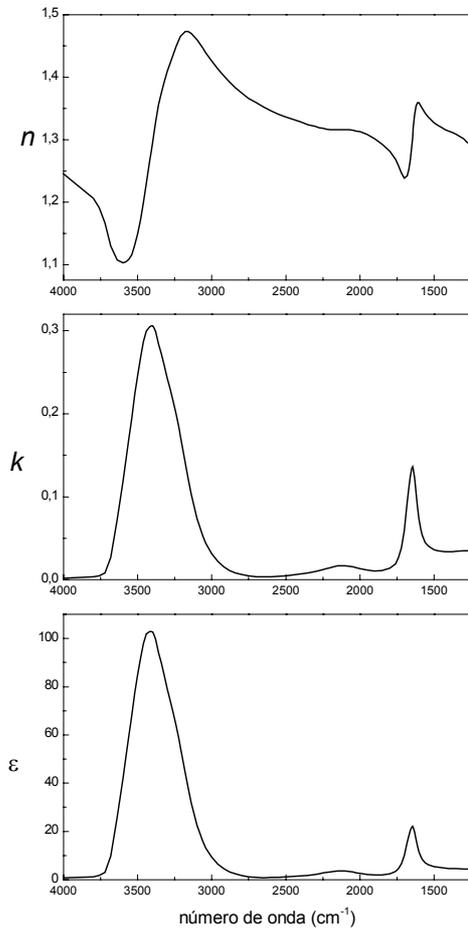
Esta ecuación se conoce como ley de Lambert-Beer. La absorbancia de dos sustancias que se mezclan de forma ideal (sin interaccionar) será:

$$Abs(\nu) = l \times (c_1 \varepsilon_1(\nu) + c_2 \varepsilon_2(\nu)) \quad (3.5)$$

#### 3.1. Distorsiones en los espectros de absorbancia obtenidos por transmitancia

Las muestras líquidas se sitúan entre dos ventanas circulares de  $\text{CaF}_2$  separadas por un espaciador. Las ventanas de  $\text{CaF}_2$  absorberán por sí mismas radiación. La absorción para materiales situados de manera consecutiva y a lo largo del haz es aditiva y la absorbancia obtenida será igual a la absorción que daría la

muestra y las ventanas por separado. Por lo tanto, esta absorción de las ventanas sólo representa un problema cuando es muy grande. Para las ventanas de CaF<sub>2</sub> este problema aparece si queremos observar la absorción de la muestra para números de onda menores de 1000 cm<sup>-1</sup> (Coates, 1998).



**Figura 3.1.** Constantes ópticas del agua (H<sub>2</sub>O):  $n$ , índice de refracción,  $k$ , índice de absorción, y  $\epsilon$ , coeficiente de absorción molar (en M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Datos de Bertie et al. (1989).

efectiva casi constante con el número de onda, ya que tanto el índice de refracción del aire como de CaF<sub>2</sub> varían lentamente con el número de onda. Las reflexiones ventana/muestra y muestra/ventana representarán un mayor problema, pues el índice de refracción de la muestra se ha de considerar complejo, con forma (Goormaghtigh et al., 1999)

$$n^*(\nu) = n(\nu) - i \times k(\nu) \quad (3.7)$$

donde  $k$  es el índice de absorción de la muestra que esta relacionado con el coeficiente de absorción de la muestra como (Hancer et al., 2000)

Además de absorber, las ventanas y la muestra pueden reflejar y dispersar la radiación. Las ventanas están pulidas, de manera que la dispersión será sólo importante si han sufrido un gran desgaste o están rayadas. La reflexión será un problema más importante, pues como veremos puede distorsionar de manera significativa las bandas en los espectros de absorción además de introducir oscilaciones.

La reflexión se da en la interfase entre medios con diferentes índices de refracción, y por lo tanto se dará en las interfaces de los materiales que atraviesa el haz: aire/ventana, ventana/muestra, muestra/ventana y ventana/aire. Cuando la entrada en una interfase es perpendicular, la absorción aparente causada por la intensidad reflejada será (Rahmelow et al., 1997a):

$$Abs_{ap} = -\log \left[ 1 - \left( \frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 + n_2^2} \right)^2 \right] \quad (3.6)$$

donde  $n_1$  y  $n_2$  son los índices de refracción de las dos fases. Las reflexiones aire/ventana y ventana/aire representarán un problema menor, pues su efecto será el de una absorbancia

$$k(\nu) = \frac{\alpha(\nu)}{4\pi \times \nu} = \frac{\ln 10 \times \varepsilon(\nu) \times c}{4\pi \times \nu} \quad (3.8)$$

donde  $\nu$  está expresado en  $\text{cm}^{-1}$ . La dependencia de  $n(\nu)$  con el número de onda está relacionada con  $k(\nu)$  mediante la transformación de Kraner-Kroning (Goormaghtigh et al., 1999). La figura 3.1 muestra para el agua los valores de  $n(\nu)$ ,  $k(\nu)$  y  $\varepsilon(\nu)$ .

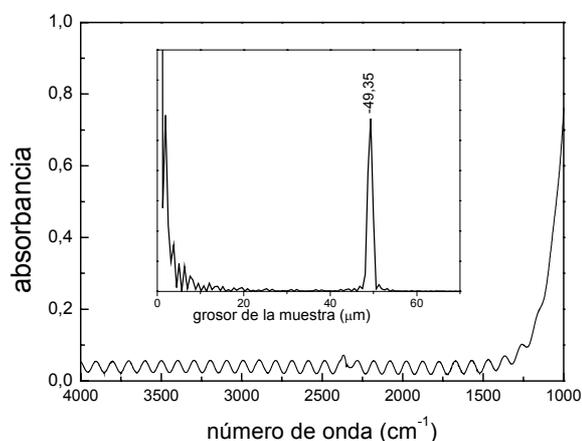
Por lo tanto el porcentaje de luz reflejada variará donde hay bandas en el espectro de absorción, y varía más cuanto mayor es el coeficiente de absorción de la banda. Por ello, la reflexión da una absorbancia aparente no constante que distorsiona el espectro de absorbancia (Rahmelow et al., 1997a). Esta distorsión se ve minimizada si  $n_1$  es semejante a  $n_2$ . Este es el caso cuando las ventanas son de  $\text{CaF}_2$  ( $n_1 \approx 1,4$ ) y la muestra es una disolución acuosa ( $n_2 \approx 1,35$ ) (Rahmelow et al., 1997a; Venyaminov y Prendergast, 1997).

Otro efecto relacionado con la reflexión es la aparición de oscilaciones en los espectros de absorbancia. Estas oscilaciones se dan a causa de la interferencia que se produce entre el haz que atraviesa la muestra directamente en dirección al detector y el haz que lo hace después de haber sufrido una doble reflexión. La longitud de onda de las oscilaciones,  $\lambda_{osc}$ , está relacionada con el grosor del medio en el que se produce la doble reflexión,  $d$ , y su índice de refracción,  $n$ , tal que (Venyaminov y Prendergast, 1997):

$$\lambda_{osc} = \frac{10^4}{2d \times n} \quad (3.9)$$

donde  $\lambda_{osc}$  es en  $\text{cm}^{-1}$  y  $d$  en  $\mu\text{m}$ . Para una ventana de  $\text{CaF}_2$ ,  $d$  es igual a 5 mm, y por lo tanto las oscilaciones que produce la doble reflexión tienen una  $\lambda_{osc}$  de  $0,7 \text{ cm}^{-1}$ , no observables a las resoluciones habituales de trabajo. Las muestras que se disponen entre las ventanas mostrarán una  $d$  aproximada de 6  $\mu\text{m}$ , y las interferencias tendrán una longitud de onda de unos  $600 \text{ cm}^{-1}$  para disoluciones acuosas y de  $830 \text{ cm}^{-1}$  cuando no hay muestra (aire).

Para una muestra no absorbente, la amplitud de las oscilaciones estará relacionada con el porcentaje del haz que sufre la doble reflexión y de la orientación del haz respecto a la normal de la ventana. Si el haz es perpendicular a las ventanas, la amplitud de las oscilaciones en un espectro de



**Figura 3.2.** Absorbancia en ausencia de muestra cuando se utiliza un espaciador de 50  $\mu\text{m}$ . Las oscilaciones se deben a un proceso de interferencia. En el inserto se muestra la distribución de frecuencias de estas oscilaciones, las cuales nos dan el grosor real del espaciador, que es en este caso de 49,35  $\mu\text{m}$ .

absorbancia será,  $A_{osc}$  (Venyaminov y Prendergast, 1997):

$$A_{osc} = -\log \left[ 1 - \left( \frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 + n_2^2} \right)^2 \right] \quad (3.10)$$

cuando la muestra es aire la amplitud de las oscilaciones será de 0,048 unidades de absorbancia. Si las ventanas están ligeramente inclinadas el valor de la amplitud será menor. De hecho, ésta es una de las maneras de reducir este fenómeno de interferencia.

La figura 3.2 muestra la absorbancia obtenida con un espaciador de 50  $\mu\text{m}$  cuando no hay muestra. A partir de la transformada de Fourier es posible determinar la distancia real entre las ventanas, que en este caso fue de 49,35  $\mu\text{m}$ . La amplitud de las oscilaciones es de  $\approx 0,04$  unidades de absorbancia (UA).

Cuando la muestra absorbe, la amplitud de las oscilaciones estará atenuada allá donde la absorción de la muestra sea mayor, pues la parte del haz que sufre la doble reflexión pasa dos veces por la muestra antes de interferir (Venyaminov y Prendergast, 1997).

### **3.2. Determinación del paso óptico de la muestra**

Conocer el paso óptico de la muestra es necesario para determinar coeficientes de absorción a partir de los espectros de absorbancia. Este paso óptico viene determinado, en principio, por el grosor del espaciador. Este se puede obtener por la longitud de onda de las interferencias sin muestra. Este grosor no es muy reproducible cuando los espaciadores son de 6  $\mu\text{m}$ , y menos aún cuando hay muestra cargada. Por lo tanto, el paso óptico se ha de determinar para cada experimento. Cuando la muestra es acuosa, es muy difícil utilizar el fenómeno de interferencia para determinar el paso óptico, pues no es directamente visible, al hallarse escondido y atenuado por las bandas de absorción del agua, mucho más intensas que la amplitud de las oscilaciones.

La manera más fiable para determinar paso ópticos tan pequeños para muestras acuosas es utilizar el coeficiente de extinción del agua, el cual es conocido (Bertie y Ahmed, 1989; Bertie y Lan, 1996; Venyaminov y Prendergast, 1997). Con una estimación de la concentración de agua en la muestra (obtenible asumiendo una densidad para los solutos y una mezcla ideal) y la absorción a dos números de onda donde sólo absorbe el agua,\* podemos obtener el paso óptico como:

$$l = \frac{Abs(\nu_1) - Abs(\nu_2)}{(\epsilon_{H_2O}(\nu_1) - \epsilon_{H_2O}(\nu_2)) \times c_{H_2O}} \quad (3.11)$$

---

\* La necesidad de dos números de onda se debe a la incertidumbre en la línea base, causada entre otras cosas por la no-linealidad del detector (Carter III et al., 1990). Sin esta incertidumbre sólo se necesita la absorción a un número de onda.

### 3.3. Resta del agua

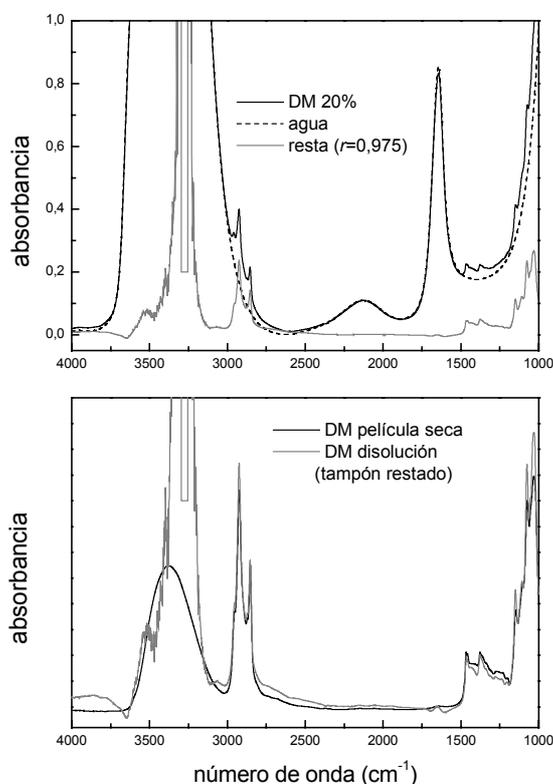
La parte del espectro que más nos interesa es la comprendida entre 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ , donde se sitúa la amida I. En disoluciones acuosas ( $\text{H}_2\text{O}$ ) la absorbancia en esta zona se debe principalmente al agua, que muestra una banda de absorción a 1645  $\text{cm}^{-1}$ . Esta contribución ha de ser restada para poder observar la absorbancia debida a la proteína. Conceptualmente, sólo es necesario restar al espectro de absorbancia de la muestra (proteína en disolución) el espectro de absorción de la referencia (tampón acuoso), con un factor adecuado:

$$\begin{aligned} Abs_p &= Abs_M - r \times Abs_R = \\ &= (\epsilon_p \times c_p + \epsilon_{\text{H}_2\text{O}} \times c_{\text{H}_2\text{O}}) \times l - r \times \epsilon_{\text{H}_2\text{O}} \times c_{\text{H}_2\text{O}} \times l = \epsilon_p \times c_p \times l \end{aligned} \quad (3.12)$$

Esta resta es siempre imperfecta. Por un lado es difícil obtener el valor del factor de resta  $r$  con

suficiente exactitud. Además si la mezcla no es ideal (solutos y disolvente interaccionan) la contribución del agua no podrá eliminarse totalmente en la resta. Por otro lado, el espectro de absorción siempre contiene distorsiones que no se compensarán necesariamente en la resta. Estas distorsiones pueden ser inapreciables respecto a la absorbancia del agua, pero crecerán en importancia respecto a la absorbancia de la proteína, que es mucho menor (Rahmelow et al., 1997a).

La situación ideal para compensar las distorsiones en la resta se da cuando  $r$  es 1. La resta también se ve favorecida si la absorbancia entre 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  no supera la unidad. (Rahmelow et al., 1997a; Dousseau et al., 1989). Además, cuanto mayor es la absorbancia, más ruido mostrará el espectro restado. La situación ideal desde el punto de vista de la relación señal/ruido del espectro de proteína se da cuando la absorción de la muestra máxima entre 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  está alrededor de 0,5 UA, lo cual requiere pasos



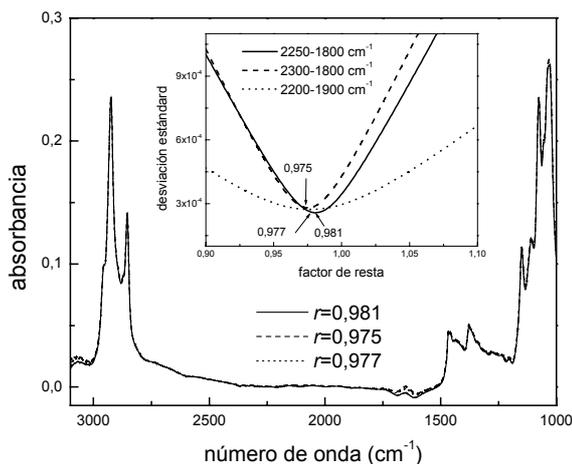
**Figura 3.3.** En la gráfica superior se muestra un espectro de absorbancia del detergente dodecilmaltósido (DM), obtenido restando el espectro de absorbancia del DM disuelto en agua, y del agua. En la gráfica inferior se compara el espectro de absorbancia del DM en disolución y en una película seca.

ópticos de  $\approx 4 \mu\text{m}$  (Venyaminov y Prendergast, 1997). Los espaciadores comerciales de menor grosor son

de 6  $\mu\text{m}$ , con lo cual, si la muestra se carga correctamente, la absorbancia en la zona de interés se sitúa sobre 0,8 UA.

Para obtener el factor de resta  $r$  hemos utilizado un método similar al propuesto por Rahmelow et al. (1997a) y Dousseau et al. (1989). El método se basa en compensar en la medida posible la banda del agua centrada sobre  $2125\text{ cm}^{-1}$ . La manera de llevar a la práctica es buscar el factor de resta que, al aplicarlo, produzca un intervalo entre  $2300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  sin bandas, que se aproxime en la mejor medida posible a un polinomio de grado dos.

Como muestra de hasta qué punto la contribución del agua en la zona de la amida I puede restarse con fiabilidad utilizando la zona entre  $2300\text{ y }1800\text{ cm}^{-1}$ , la figura 3.3 presenta el espectro del detergente DM a  $200\text{ mg/ml}$  en disolución, junto con un espectro de agua. Esta figura también muestra el espectro restado, donde aparece la absorción del DM. La figura inferior compara este espectro con el de DM obtenido mediante una película seca. Se observa que hay diferencias, parte de las cuales pueden deberse a que el espectro del DM seco será posiblemente diferente que el espectro del DM en disolución. Sin embargo, entre  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  se observa que, aunque la contribución de agua se resta muy bien, no se elimina completamente, lo que nos da una idea de los errores que introducirá la resta del agua en los espectros de absorbancia de proteínas.



**Figura 3.4.** Espectros del DM en disolución obtenidos utilizando diferentes factores de resta. El inserto muestra el proceso de determinación del factor de resta más adecuado para diferentes intervalos de compensación de la absorción del agua.

La figura 3.4 muestra las restas obtenidas utilizando diferentes intervalos como criterio para obtener el factor de resta. Los valores obtenidos son muy semejantes, y sólo las zonas en las que la absorción del agua es grande, como entre  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , se ven afectadas por los diferentes factores de resta. La figura insertada muestra cómo varía el residual del ajuste a un polinomio de grado dos en función del factor de resta. El mínimo corresponde al factor de resta que consideramos óptimo.

### 3.4. Determinación de la relación señal / ruido

El ruido en el espectro de absorbancia procede del ruido en el espectro de transmitancia, y este a su vez del ruido en el espectro de emitancia, con muestra y sin muestra:

$$\varepsilon_{Abs} = -\log \frac{(I_M + \varepsilon_{I_M}) \times I_F}{(I_F + \varepsilon_{I_F}) \times I_M} = -\log \frac{(T + \varepsilon_{I_M} / I_F)}{(1 + \varepsilon_{I_F} / I_F) \times T} = -\log \frac{(10^{-Abs} + \varepsilon_{I_M} / I_F)}{(1 + \varepsilon_{I_F} / I_F) \times 10^{-Abs}} \quad (3.13)$$

donde  $\varepsilon$  representa los diferentes tipos de ruido. La desviación estándar del ruido en el espectro de absorbancia dependerá de la absorbancia y de la relación entre la desviación estándar del ruido y la intensidad en un espectro de emitancia del fondo (sin muestra). Esta relación depende del interferómetro, y de las condiciones instrumentales, así como el número de interferogramas promediados. A causa de la adquisición del espectro de emitancia por interferometría, la desviación estándar del ruido es constante con el número de onda. Por lo tanto, para un espectro de emitancia esta relación varía con del número de onda de acuerdo con la intensidad del espectro.

La desviación estándar del ruido en el espectro de absorbancia respecto a la desviación estándar que se obtendría para una absorbancia de cero sólo depende de la absorbancia, y puede obtenerse mediante simulaciones de Monte Carlo. La figura 3.5 muestra los resultados, los cuales se ajustan muy bien a una expresión del tipo:

$$\frac{\sigma_{Abs}}{\sigma_0} \approx \frac{0,764 + 0,651 \times 10^{Abs} + 1,02 \times 10^{2Abs}}{1 + 1,437 \times 10^{Abs}} \quad (3.14)$$

Por lo tanto la relación de la desviación estándar del ruido a dos absorbancias es aproximadamente:

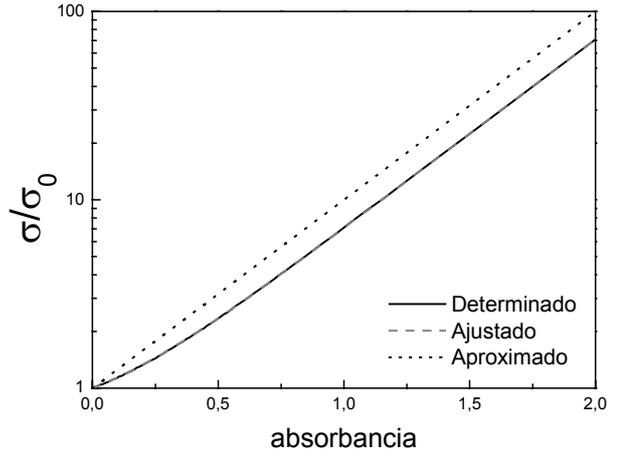
$$\frac{\sigma_{Abs_2}}{\sigma_{Abs_1}} \approx \frac{(0,764 + 0,651 \times 10^{Abs_2} + 1,02 \times 10^{2Abs_2}) (1 + 1,437 \times 10^{Abs_1})}{(1 + 1,437 \times 10^{Abs_2}) (0,764 + 0,651 \times 10^{Abs_1} + 1,02 \times 10^{2Abs_1})} \quad (3.15)$$

Con esta ecuación, conociendo la desviación estándar del ruido a una absorbancia  $Abs_1$  podemos determinar la desviación estándar del ruido para una  $Abs_2$ . Estos valores serán válidos para otros números de onda si  $I_F$  es más o menos constante en el intervalo de número de onda considerado.

Habitualmente se suele considerar que esta relación viene dada por (Venyaminov y Prendergast, 1997):

$$\frac{\sigma_{Abs_2}}{\sigma_{Abs_1}} \approx 10^{Abs_2 - Abs_1} \quad (3.16)$$

como se puede observar en la figura 3.5, esta ecuación será válida cuando



**Figura 3.5.** Dependencia de la desviación estándar del ruido en función de la absorbancia. Los valores se han normalizado respecto a la desviación estándar del ruido para una absorbancia de cero. Se muestran los valores determinados mediante simulaciones de Monte Carlo, los ajustados, correspondientes a la ecuación 3.15, y los aproximados, correspondientes a la ecuación 3.16.

### **3.5. Condiciones de adquisición de los espectros de transmitancia**

El espectro de absorbancia se obtiene a partir del de transmitancia como el logaritmo decimal cambiado de signo, y el de transmitancia como la razón del cociente del espectro de intensidad atravesando la muestra y sin atravesarla.

La adquisición de ambos espectros se realiza de modo alternado en bloques de 25-40 espectros, gracias a una lanzadera que sitúa y retira la muestra del haz, con lo que se reducen pequeñas derivas del sistema, y variaciones del vapor de agua dentro del interferómetro. El número de bloques se ajusta para que el número de espectros promediados en un espectro final sea de 1000.

Durante todo momento el interior del interferómetro se purga con aire seco de un caudal aproximado de 80 l/min (temperatura de rocío en el interior del interferómetro  $\approx -50$  °C). Como, además, la adquisición de los espectros de muestra y fondo es alternada, los espectros de absorbancia aparecen libres de bandas de vapor de agua.

La temperatura del sistema se controlada mediante un bloque termostatzado mediante un flujo de líquido de un baño Haaker. De forma habitual los experimentos han sido realizados a 25,0 °C.

El espectro de referencia, utilizado para restar la contribución del tampón de la muestra, se obtiene en las mismas condiciones instrumentales y siempre el mismo día, utilizando una disolución tan semejante como sea posible al tampón de la muestra, y con una absorbancia a  $1645\text{ cm}^{-1}$  similar, tal que el factor de resta sea próximo a la unidad.

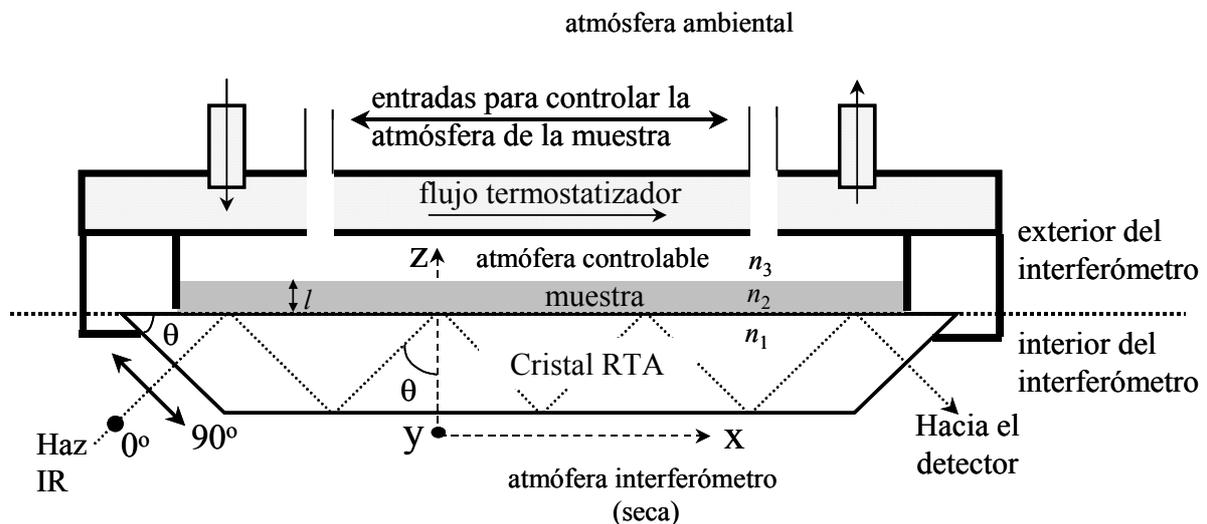
#### 4. Espectros de absorbancia por reflexión total atenuada (RTA)

En los experimentos de reflexión total atenuada el haz de radiación infrarroja se hace pasar por un cristal de elevado índice de refracción y con una absorbancia suficientemente baja en los números de onda que nos interesan. El cristal está habitualmente tallado con forma de un prisma trapezoidal. Sobre una de las superficies del cristal se sitúa la muestra, ya sea en disolución o como película. La figura 4.1 muestra un diseño del accesorio de RTA, cuyas partes se explicarán a lo largo del texto.

El sistema de reflexión total atenuada se diseña para que, debido a su geometría y propiedades ópticas, el haz sufra una serie de reflexiones totales en su interior al incidir sobre su superficie. La reflexión total se produce cuando el ángulo de incidencia respecto a la normal de la superficie,  $\theta$ , es mayor que el ángulo crítico,  $\theta_c$ . El ángulo crítico depende del índice de refracción del cristal,  $n_1$ , y del material en contacto con el cristal (la muestra),  $n_2$ :

$$\theta_c = \arcsen(n_2 / n_1) \quad (4.1)$$

En una reflexión total, el haz incidente y el reflejado forma una onda electromagnética estacionaria perpendicular a la superficie de reflexión. Por condiciones de continuidad esta onda estacionaria genera una onda evanescente en el medio exterior al cristal, como se muestra en la figura 4.2 (Goormaghtigh et al., 1999). Cuando se realiza el experimento con algún material absorbente sobre el cristal, el haz reflejado muestra una menor intensidad que el incidente. Esta energía perdida se debe a que el material puede absorber intensidad del haz evanescente (Axelsen y Citra, 1996).



**Figura 4.1.** Esquema del cristal de reflexión total atenuada. El sistema posee un control de temperatura mediante la circulación de un líquido. También permite la inyección de sustancias, y el control de la atmósfera en contacto con la muestra.

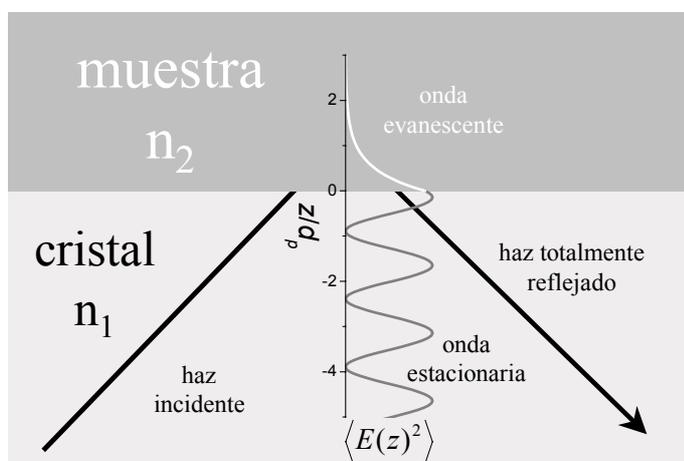
La amplitud cuadrática (intensidad) del campo eléctrico medio del haz evanescente respecto al incidente, en función de la distancia en el medio exterior,  $z$ , viene dada por (Goormaghtigh et al., 1999):

$$\langle E(z) \rangle^2 = \langle E(0) \rangle^2 \exp\left(-\frac{2z}{d_p}\right) \quad (4.2)$$

donde  $\langle E(0) \rangle^2$  es la intensidad del campo eléctrico relativo en la interfase,\* y la distancia de penetración,  $d_p$ , viene dada por (Tamm y Tatulian, 1997):

$$d_p = \frac{1}{2\pi n_1 v \sqrt{\sin^2 \theta - \sin^2 \theta_c}} \quad (4.3)$$

Más adelante se darán expresiones para obtener  $\langle E(0) \rangle^2$ .



**Figura 4.2.** Representación esquemática del decaimiento la intensidad del campo electromagnético de la onda evanescente con la distancia a la superficie del IRE ( $z$ ). Esto convierte al ATR en una técnica sensible a la superficie.

Debido a esta intensidad de la onda evanescente, que decae con la distancia de penetración en el medio externo, son las moléculas más cercanas a la superficie del cristal de RTA las que pueden absorber una mayor intensidad de luz, y tendrán una contribución mayor en la atenuación del haz reflejado. Las moléculas suficientemente lejanas no podrán absorber intensidad del haz evanescente ya que su intensidad habrá disminuido hasta casi cero, y no tendrán ninguna contribución en la atenuación. Dicho de otra manera, en el experimento de RTA sólo se ilumina el área en contacto con el cristal, pues es ahí donde el campo electromagnético es más intenso.

#### 4.1. Ley de Lambert-Beer y penetración efectiva en RTA

Definimos la reflectancia,  $R$ , como la relación entre la intensidad de radiación reflejada dividido por la intensidad de luz incidente para una sola reflexión. La reflectancia está relacionada con el coeficiente de absorción del material en contacto con el cristal como (Goormaghtigh et al., 1999; Hancer et al., 2000):

$$R = 1 - \alpha \times d_e \quad (4.4)$$

\* Al ser relativo es adimensional.

donde  $d_e$  es la distancia de penetración efectiva, que definiremos más adelante. Cuando el haz sufre  $N$  reflexiones en contacto con el material absorbente, la absorbancia será (Hancer et al., 2000):

$$Abs = -\log(R)^N = -N \times \log(1 - \alpha \times d_e) \approx \ln 10 \times N \times \alpha \times d_e = N \times \varepsilon \times c \times d_e \quad (4.5)$$

Con lo que llegamos a una expresión semejante a la ley de Lambert-Beer para transmitancia. La penetración efectiva tendrá la interpretación del paso óptico necesario en transmitancia para obtener una absorbancia igual a la obtenida en RTA.

La aproximación aplicada en la ecuación 4.5 requiere que la atenuación en cada reflexión sea débil, es decir que  $\alpha \times d_e \ll 1$ . En caso contrario nos desviaremos de la ley de Lambert-Beer (Hancer et al., 2000).

#### 4.2. Cálculo de la penetración efectiva

En un experimento de transmitancia, la absorbancia debida a la presencia de una sustancia no ordenada es:

$$Abs = \varepsilon \times c \times l \quad (4.6)$$

donde  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar,  $c$  la concentración, y  $l$  el grosor de la muestra.

En RTA, la absorbancia de una sustancia no ordenada con luz polarizada a  $90^\circ$ , viene dada por (Goormaghtigh et al., 1999):

$$Abs_{90} = \frac{\varepsilon \times c \times n_2}{n_1 \cos \theta} \int_0^l \langle E^2 \rangle_{90} dz = \frac{\varepsilon \times c \times n_2 \times \langle E(0)^2 \rangle_{90} \times d_p}{2n_1 \cos \theta} \left( 1 - \exp\left(-\frac{2l}{d_p}\right) \right) \quad (4.7)$$

donde hemos utilizado la ecuación 4.2. La penetración efectiva para la luz polarizada a  $90^\circ$ , es:

$$d_{e90} = \frac{n_2 \times \langle E(0)^2 \rangle_{90} \times d_p}{2n_1 \cos \theta} \left( 1 - \exp\left(-\frac{2l}{d_p}\right) \right) \quad (4.8)$$

y para la luz polarizada a  $0^\circ$ , es

$$d_{e0} = \frac{n_2 \times \langle E(0)^2 \rangle_0 \times d_p}{2n_1 \cos \theta} \left( 1 - \exp\left(-\frac{2l}{d_p}\right) \right) \quad (4.9)$$

donde

$$\langle E(0)^2 \rangle_0 = \langle E(0)^2 \rangle_y \quad \langle E(0)^2 \rangle_{90} = \langle E(0)^2 \rangle_x + \langle E(0)^2 \rangle_z \quad (4.10)$$

tal como se ha representado la figura 4.1.

Para luz no polarizada la absorbancia será (Goormaghtigh et al., 1999):

$$Abs \cong 0,5 Abs_{90} + 0,5 Abs_0 = \varepsilon \times c \times (0,5 d_{e90} + 0,5 d_{e0}) = \varepsilon \times c \times d_e \quad (4.11)$$

La obtención de los valores de la intensidad del campo electromagnético medio en la interfase entre el cristal y la muestra (en  $z$  igual a cero) no es una tarea sencilla, pues dependen de muchos parámetros, a saber: el número de onda de la radiación  $\nu$ , el ángulo de incidencia  $\theta$ , el índice de refracción del cristal  $n_1$ , el índice de refracción complejo de la muestra  $n_2^*$  y del grosor de la muestra sobre el cristal  $l$  (Axelsen y

Citra, 1996). La figura 4.3 muestra los valores de la intensidad del campo eléctrico en la interfase obtenidos por Picard et al. (1999) en función del grosor de la película para ciertas condiciones experimentales (muy semejantes a las nuestras).

Para obtener expresiones sencillas, son necesarias dos asunciones o hipótesis. La primera de ellas es considerar el coeficiente de absorción de la muestra lo suficientemente pequeño para que el índice de refracción de la muestra se pueda considerar real y constante. Es la hipótesis del absorbente débil (Ekgasit, 1998; Citra y Axelsen, 1996). La otra asunción está relacionada con el grosor de la muestra sobre el cristal, dando lugar a la hipótesis de la película gruesa y de la película delgada (Goormaghtigh et al., 1999).

#### 4.2.1. Hipótesis de la película gruesa

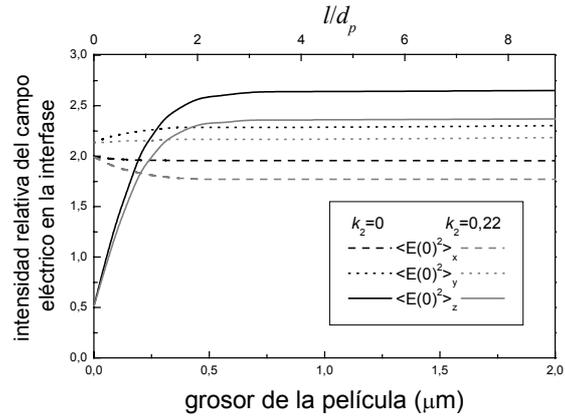
La hipótesis de la película gruesa supone que el grosor de la muestra sobre la superficie del cristal es infinito. En estas condiciones las ecuaciones 4.8 y 4.9 se simplifican a:

$$d_{e90,0} = \frac{n_2 \times \langle E(0)^2 \rangle_{90,0} \times d_p}{2n_1 \cos \theta} \quad (4.12)$$

y los valores de  $\langle E(0)^2 \rangle_0$  y de  $\langle E(0)^2 \rangle_{90}$  pueden obtenerse a partir de la ecuación 4.10, teniendo en cuenta que la intensidad del campo eléctrico en la interfase es (Goormaghtigh et al., 1999):

$$\begin{aligned} \langle E(0)^2 \rangle_x &= \frac{4 \cos^2 \theta (\sin^2 \theta - n_{21}^2)}{(1 - n_{21}^2) [(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2]} & \langle E(0)^2 \rangle_y &= \frac{4 \cos^2 \theta}{(1 - n_{21}^2)} \\ \langle E(0)^2 \rangle_z &= \frac{4 \cos^2 \theta \sin^2 \theta}{(1 - n_{21}^2) [(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2]} \end{aligned} \quad (4.13)$$

donde  $n_{21} = n_2/n_1$ . Sustituyendo las ecuaciones 4.13 y 4.10 en la ecuación 4.12 obtenemos la expresión de la penetración efectiva para las dos polarizaciones:



**Figura 4.3.** Intensidad del campo eléctrico en la interfase entre el cristal de RTA y la muestra en función del grosor de ésta. Los valores corresponden a  $n_1 = 4,0$ ,  $n_2 = 1,45$ ,  $n_3 = 1$ ,  $\theta = 45^\circ$ , y dos valores diferentes de índice de absorción de la muestra,  $k_2$ . Los valores del grosor son para un número de onda de  $2918 \text{ cm}^{-1}$ , pero los valores de  $l/d_p$  son válidos para cualquier número de onda. Estos datos corresponden a Picard et al. (1999).

$$d_{e0} = \frac{n_{21} \cos \theta}{\pi \nu n_1 (1 - n_{21}^2) \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}}$$

$$d_{e90} = \frac{n_{21} \cos \theta (2 \sin^2 \theta - n_{21}^2)}{\pi \nu n_1 (1 - n_{21}^2) [(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2] \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (4.14)$$

Se suele considerar que a una muestra en contacto con el cristal de RTA se le puede aplicar la hipótesis de la película gruesa cuando  $l/d_p \geq 1$  en el número de onda de interés (Goormaghtigh et al., 1999). Si embargo una ojeada a la figura 4.3 nos indica que este criterio es excesivamente laxo, pues para  $l/d_p = 1$  el error relativo cometido con la hipótesis de la película gruesa en la evaluación de  $\langle E(0)^2 \rangle_z$  es del casi el 20%. Para  $l/d_p = 2$ , el error relativo es del 3% y para  $l/d_p = 3$ , del 1%. Por ello consideramos que para aplicar fielmente la hipótesis de la película gruesa se ha de cumplir que  $l/d_p \geq 2$ .

En todos los experimentos se ha utilizado un cristal de germanio ( $n_1 = 4,0$ ), con un ángulo de incidencia ( $\theta$ ) de  $45^\circ$ . En estas condiciones, las expresiones para  $d_p$ , y para  $d_e$  en la hipótesis del film grueso se reducen a:

$$d_p = \frac{1}{2\pi\nu\sqrt{8-n_2^2}}$$

$$d_e = \frac{3\sqrt{2}n_2}{\pi\nu(16-n_2^2)\sqrt{8-n_2^2}} \quad (4.15)$$

En nuestro cristal de germanio se producen doce reflexiones internas sobre la superficie donde se deposita la muestra, por lo que el paso óptico efectivo total ( $d_t$ ) es doce veces  $d_e$ .

En la tabla 4.1 se presentan los cálculos realizados para  $d_p$ ,  $d_e$ , y  $d_t$  (en  $\mu\text{m}$ ) en función de varios números de onda (en  $\text{cm}^{-1}$ ) y varios índices de refracción de la muestra ( $n_2$ ).

| $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) | H <sub>2</sub> O ( $n_2 \approx 1,33$ ) |       |       | proteoliposomas ( $n_2 \approx 1,5$ ) |       |       |
|----------------------------|---|-------|-------|---------------------------------------|-------|-------|
|                            | $d_p$ ( $\mu\text{m}$ )                 | $d_e$ | $d_t$ | $d_p$                                 | $d_e$ | $d_t$ |
| 1550                       | 0,41                                    | 0,33  | 3,9   | 0,43                                  | 0,40  | 4,8   |
| 1650                       | 0,39                                    | 0,31  | 3,7   | 0,40                                  | 0,38  | 4,5   |
| 3300                       | 0,19                                    | 0,15  | 1,8   | 0,20                                  | 0,19  | 2,2   |

**Tabla 4.1:** Distancia de penetración ( $d_p$ ), de la penetración efectiva ( $d_e$ ), y de la penetración efectiva total ( $d_t$ ) en función del número de onda ( $\nu$ ) para dos valores de  $n_2$  para  $n_1 = 4,0$  (cristal de germanio). Los números de onda se presentan en  $\text{cm}^{-1}$  y las distancias en  $\mu\text{m}$ .

Hay que señalar que cuando se cumple la hipótesis de la película gruesa la absorbancia no depende del grosor de la película depositada sobre el cristal de RTA, sino sólo de su coeficiente de absorción  $\alpha$  (ver ecuación 4.5 y 4.15). También es importante recordar que para que se cumpla la hipótesis de la película

gruesa el grosor de la muestra sobre el cristal ha de ser mayor que  $d_p$ , y por lo tanto a altos números de onda es más fácil que se cumpla esta condición.

### 2.4.2.2. Hipótesis de la película delgada

La hipótesis de la película delgada supone que la película de muestra es tan delgada que el valor de  $\langle E(z) \rangle^2$  es constante en toda la muestra, es decir  $l \ll d_p$ . En estas condiciones las ecuaciones 4.8 y 4.9 se simplifican a:

$$d_{e90,0} = \frac{n_2 \times \langle E(0) \rangle_{90,0}^2 \times l}{n_1 \cos \theta} \quad (4.17)$$

y los valores de  $\langle E(0) \rangle_0^2$  y de  $\langle E(0) \rangle_{90}^2$  pueden obtenerse a partir de la ecuación 4.10, teniendo en cuenta que la intensidad del campo eléctrico en la interfase es (Goormaghtigh et al., 1999):

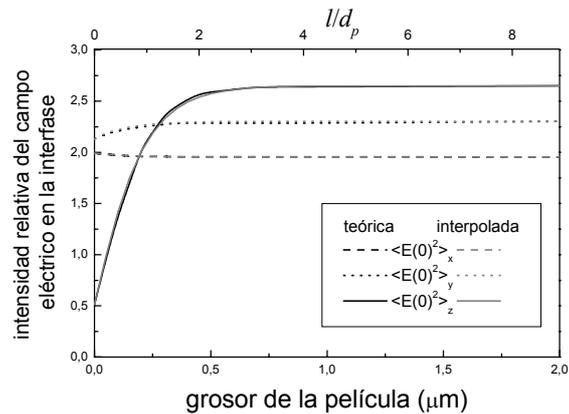
$$\begin{aligned} \langle E(0) \rangle_x^2 &= \frac{4 \cos^2 \theta (\sin^2 \theta - n_{31}^2)}{(1 - n_{31}^2) [(1 + n_{31}^2) \sin^2 \theta - n_{31}^2]} ; \quad \langle E(0) \rangle_y^2 = \frac{4 \cos^2 \theta}{(1 - n_{31}^2)} ; \\ \langle E(0) \rangle_z^2 &= \frac{4 n_{32}^4 \cos^2 \theta \sin^2 \theta}{(1 - n_{31}^2) [(1 + n_{31}^2) \sin^2 \theta - n_{31}^2]} \end{aligned} \quad (4.18)$$

donde  $n_{31} = n_3/n_1$ ,  $n_{32} = n_3/n_2$  y  $n_3$  es el índice de refracción del material que se halla a continuación de la muestra, normalmente aire.

Se considera que la aplicación de la hipótesis de la película delgada requiere que  $l/d_p < 0,1$ . Dado el pequeño valor de  $d_p$  (ver tabla 4.1) la hipótesis de la película delgada será raramente aplicable en nuestros experimentos.

### 4.2.3. Interpolación entre la hipótesis de la película delgada y la gruesa

Para grosores de películas que se hallan entre la hipótesis de la película delgada y la gruesa las expresiones para obtener la intensidad media del campo magnético en la interfase en función del grosor de la película,  $\langle E(0,l) \rangle^2$ , son muy complejas (Axelsen y Citra, 1996). Fringeli (1992) ha propuesto una formula semiempírica para obtener las amplitudes del campo magnético en la interfase en función del grosor de la muestra  $l$ . Nosotros hemos realizado la misma



**Figura 4.4.** Intensidad del campo eléctrico en la interfase en función del grosor de la película para las condiciones de la figura 4.3. Los valores corresponden a los valores teóricos obtenidos por Picard et al. (1999), y a los interpolados utilizando la ecuación 4.19.

interpolación para obtener la intensidad media del campo magnético en la interfase para una película de grosor  $l$  utilizando los valores  $\langle E(0,0) \rangle^2$  (película delgada) y  $\langle E(0,\infty) \rangle^2$  (película gruesa).

$$\langle E(0,l) \rangle_{x,y,z}^2 \approx \left[ \sqrt{\langle E(0,0) \rangle_{x,y,z}^2} + \left( 1 - \exp\left(-\frac{1.63l}{d_p}\right) \right) \left( \sqrt{\langle E(0,\infty) \rangle_{x,y,z}^2} - \sqrt{\langle E(0,0) \rangle_{x,y,z}^2} \right) \right]^2 \quad (4.19)$$

La interpolación se ajustó para que los valores de  $\langle E(0,l) \rangle^2$  obtenidos por interpolación se aproximaran a los obtenidos por Picard et al. (1999), que resolvieron el problema en función del grosor de la película (sin aproximaciones). La figura 4.4 muestra los valores de  $\langle E(0,l) \rangle^2$  teóricos e interpolados.

Considerando nuestras condiciones de trabajo ( $n_1 = 4,0$ ,  $n_3 = 1,0$  y  $\theta = 45^\circ$ ) y  $n_2 = 1,5$ , y combinado las ecuaciones 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.13, 4.18 y 4.19, la penetración efectiva en función de  $l$  y  $\nu$  será aproximadamente

$$d_e \approx \frac{84,08}{\nu} \left( \begin{aligned} &-3,52 \exp(-24,6l\nu) - 7,31 \exp(-30,1l\nu) + \exp(-49,1l\nu) \\ &+ 3,52 \exp(-54,7l\nu) - \exp(-79,3l\nu) + 731 \end{aligned} \right) \quad (4.20)$$

### 4.3. Distorsiones en el espectro de absorbancia por RTA

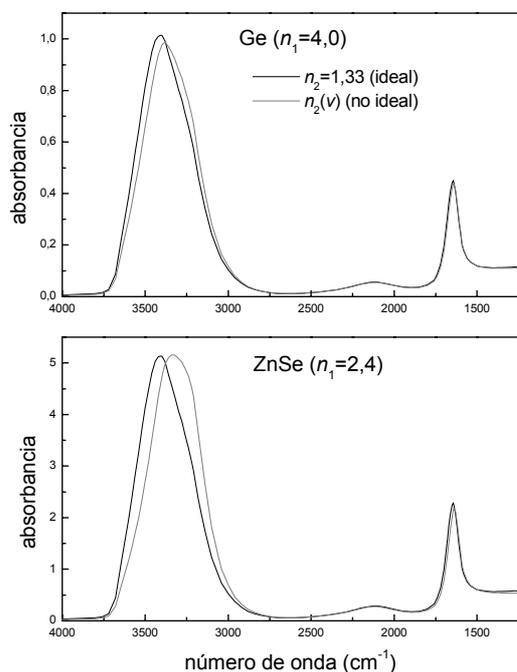
Todas las ecuaciones anteriores se basan en que el coeficiente de absorción de la muestra,  $\alpha$ , es pequeño (absorbente débil), y por lo tanto  $k_2$  es aproximadamente cero y  $n_2$  es aproximadamente constante (el límite del absorbente débil). Sin embargo por muy débil que sea el coeficiente de absorción de una muestra, éste no será cero, y por lo tanto ni  $k_2$  se puede aproximar a cero ni  $n_2$  se puede considerar constante, sin que se introduzcan ciertas distorsiones en los espectros de absorbancia. Existirán dos tipos de distorsiones en los espectros de absorbancia obtenidos a partir de la reflectancia.

La primera de las distorsiones está relacionada con la aproximación de la ecuación 4.5. A medida que el valor de  $\alpha$  aumenta, esta aproximación será menos correcta, y nos desviaremos de la ley de Lambert-Beer. En nuestras condiciones experimentales ( $n_1 = 4,0$ ,  $n_2 \approx 1,5$  y  $\theta = 45^\circ$ ) la desviación sólo es importante para  $k_2 > 0,4$  (Ekgasit, 2000).

El segundo tipo de distorsión en el espectro de absorbancia se observa mejor al fijarnos en la expresión de la penetración efectiva (ver las ecuaciones 4.14 y 4.15). Esta penetración depende del valor de  $n_2$ . El rango de variación de  $n_2$  para una banda depende del índice de absorción máximo de la banda  $k_2^{\max}$  (como ejemplo ver la figura 3.1 y la ecuación 3.8). A causa de ello, el espectro quedará distorsionado (desplazamiento de posiciones y distorsiones en la forma e intensidades relativas de las bandas del espectro), pues la penetración efectiva variará a lo largo de la banda.

Como ejemplo, la figura 4.4 muestra las distorsiones que se dan en la posición y forma de las bandas en el espectro de absorbancia del agua obtenido por RTA. El espectro ideal representa la situación de que el índice de refracción del agua es constante (absorbente débil). La única distorsión presente respecto a un espectro de absorbancia por transmitancia es el efecto  $1/\nu$ , es decir, la penetración efectiva varía inversamente con el número de onda. El otro espectro representa la situación real, en la que el índice de

refracción del agua varía con el número de onda. A parte del efecto  $1/\nu$ , se observan desplazamientos de los máximos a números de onda menores y distorsiones en la forma de las bandas.



**Figura 4.5.** Espectros sintéticos de absorbancia del agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) obtenidos por RTA, para un cristal de germanio y para uno de seleniuro de zinc. Se muestra la situación ideal en la que el índice de refracción del agua es constante con el número de onda, y la situación realista en la que el índice de refracción del agua varía de acuerdo con la figura 3.1.

$\epsilon^{\max} \approx 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , suponiendo que la densidad de una proteína es aproximadamente  $1400 \text{ g/l}$ , y que la masa molar media de un aminoácido es  $110 \text{ g/mol}$  (por lo tanto  $c \approx 13 \text{ M}$ ), el valor de  $k_2^{\max}$  será aproximadamente de  $0,6$  (este valor concuerda con el obtenido experimentalmente para la bacteriorodopsina (Blaudez et al., 1999)). En la práctica, la concentración de enlaces peptídicos nunca es tan alta, pues siempre queda agua retenida, y el medio contiene lípidos o detergente. En nuestras condiciones experimentales, la concentración de enlaces peptídicos en películas secas de proteína se estimó de  $\approx 2,4 \text{ M}$ , lo que nos lleva a valores de  $k_2^{\max}$  para la amida I próximos a  $0,1$ , y por lo tanto los espectros de absorbancia obtenidos por RTA no presentarán distorsiones importantes (excepto por el efecto  $1/\nu$ ).

Estas distorsiones son mayores para bandas con valores de  $k^{\max}$  mayores, pues la banda que muestra mayores distorsiones es la banda situada a  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , la cual posee una  $k^{\max}$  de aproximadamente  $0,3$ . Sin embargo, el valor de  $n_1$  también juega un papel importante, pues las pequeñas distorsiones de la banda a  $3400 \text{ cm}^{-1}$  para un cristal de germanio se amplifican enormemente para uno de ZnSe. Para el cristal de germanio, la banda a  $1645 \text{ cm}^{-1}$ , con  $k_2^{\max} \approx 0,15$ , no muestra distorsiones aparentes.

Por lo tanto, la magnitud de estas distorsiones depende principalmente del valor máximo de  $k_2$  para una banda, y de la diferencia entre el ángulo de incidencia sobre el cristal de RTA,  $\theta$ , y el ángulo crítico  $\theta_c$  (Goormaghtigh et al., 1999). En nuestras condiciones, el ángulo de incidencia es  $23^\circ$  mayor que el ángulo crítico, y bandas con valores de  $k^{\max} \approx 0,15$  no parecen sufrir ninguna distorsión.

En la zona de la amida I, para una proteína pura, utilizando para el enlace peptídico

#### **4.4. Condiciones de adquisición de los espectros de RTA**

El accesorio de RTA (figura 4.1) está compuesto por un cristal de germanio con forma trapezoidal, con un ángulo de  $45^\circ$  y dimensiones máximas de  $50 \times 20 \times 10$  mm (longitud/anchura/grosor). La superficie del cristal en el lado donde se deposita la muestra es de  $1 \text{ cm}^2$ . Sin embargo la superficie expuesta a la muestra es de  $\approx 0.4 \text{ cm}^2$ . El resto de la superficie queda tapada por una goma que sujeta el cristal a una carcasa metálica.

El espectro de absorbancia se obtiene a partir del de reflectancia como el logaritmo decimal cambiado de signo, y el de reflectancia como la razón del cociente del espectro de intensidad con la muestra en contacto con el cristal de RTA y sin ella (del fondo).

La adquisición del espectro de emitancia del fondo se realiza normalmente al inicio del día, promediando 2000 espectros para reducir su ruido. Los espectros de emitancia con muestra se obtienen a lo largo del día, y en ellos la cantidad de espectros promediados es más variable, entre 1000 y 2000.

A pesar que el interior del interferómetro se purga continuamente con un caudal de 40 ml/min de aire seco (temperatura de rocío en el interferómetro  $\approx -40^\circ\text{C}$ ), como la adquisición de ambos espectros no se alterna, aparecen bandas de vapor de agua en el espectro de absorbancia. Para restar las bandas de vapor de agua se obtiene un espectro de absorbancia del vapor de agua. Éste se adquiere al final de la jornada, antes de retirar la muestra del cristal. Se obtiene un espectro de intensidad del fondo y abriendo el compartimiento del interferómetro se introduce aire exterior (con una concentración de vapor de agua muy alta). Se obtiene un espectro de intensidad de la muestra. El espectro de absorbancia corresponde al del aire introducido, presentando bandas de absorción del vapor de agua y  $\text{CO}_2$ .

La temperatura del sistema se controla mediante un bloque termostatzado mediante un flujo de líquido de un baño Haaker, el cual se deposita sobre el accesorio de RTA. De forma habitual los experimentos han sido realizados a  $20,0^\circ\text{C}$ .

Las muestras utilizadas han sido siempre películas secas de proteoliposomas o liposomas. Estas películas se preparan depositando sobre el cristal de RTA un volumen líquido de  $\approx 20 \mu\text{l}$ , el cual se extiende para que cubra toda la superficie del cristal, mediante una punta de micropipeta con la abertura sellada. Tras unos minutos en contacto con la atmósfera del laboratorio, se evapora suficiente líquido como para que se forme una película sobre el cristal. Posteriormente, sobre esta película se hace pasar un flujo de  $\text{N}_2$  seco, bajo el cual la hidratación de la película disminuye. La duración de este paso se determina por el nivel de hidratación de la película deseado, el cual puede seguirse por el espectro de absorbancia mediante la banda del agua a  $3400 \text{ cm}^{-1}$ .

## 5. Experimentos de orientación

### 5.1. Determinación de la orientación molecular mediante espectroscopia infrarroja

Se realiza utilizando los espectros de absorbancia obtenidos por RTA por varios motivos. Dada la geometría del experimento no es necesario inclinar la muestra, como se requiere para determinar orientaciones en transmitancia (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1990). Además, en el espectro de absorbancia por RTA pesan más las moléculas más cercanas a la superficie. Como consecuencia, la orientación de la muestra sobre el cristal/ventana será mayor en RTA que en transmitancia, lo que conduce a una determinación de la orientación más fiable (Ludlam et al., 1996).

#### 5.1.1 La razón dicroica

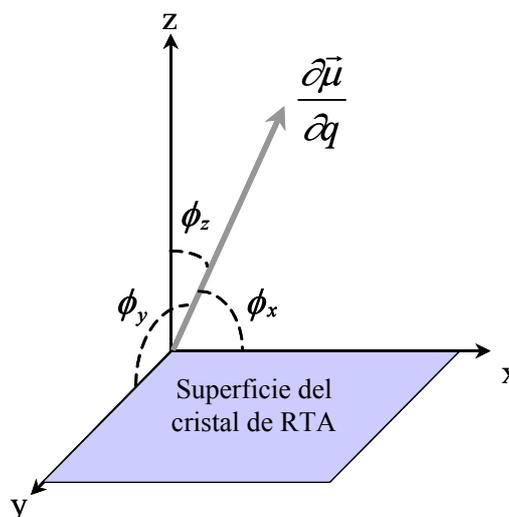
La razón dicroica de una banda se define como la relación entre la absorción integrada (área  $A$ ) con radiación polarizada a  $90^\circ$  respecto a la polarizada a  $0^\circ$ .<sup>\*</sup> El valor de esta razón puede obtenerse experimentalmente y su valor está relacionado con el ángulo que forma el momento dipolar de transición de la vibración a la que corresponde la banda respecto a los ejes del cristal,  $\phi_x$ ,  $\phi_y$  y  $\phi_z$  (ver figura 5.1), como (Tamm y Tatulian, 1997)

$$R = \frac{A_{90}}{A_0} = \frac{\int Abs_{90}}{\int Abs_0} = \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x \cos^2 \phi_x + \langle E(0)^2 \rangle_z \cos^2 \phi_z}{\langle E(0)^2 \rangle_y \cos^2 \phi_y} \quad (5.1)$$

y teniendo en cuenta la relación trigonométrica

$$\cos^2 \phi_x + \cos^2 \phi_z + \cos^2 \phi_y = 1 \quad (5.2)$$

La razón dicroica se convierte en:



**Figura 5.1.** Ángulos que forma la variación del momento dipolar de una vibración con los ejes del cristal de RTA.

<sup>\*</sup> Esta definición corresponde a la figura 4.1. Otros autores utilizan otro criterio, y la razón dicroica se define como la absorbancia a  $0^\circ$  dividido por la absorbancia a  $90^\circ$ . Lo que sí que es general es que  $R$  para una bandas es igual a la absorbancia con radiación polarizada paralelamente ( $\parallel$ ) dividido por la polarizada perpendicularmente ( $\perp$ ).

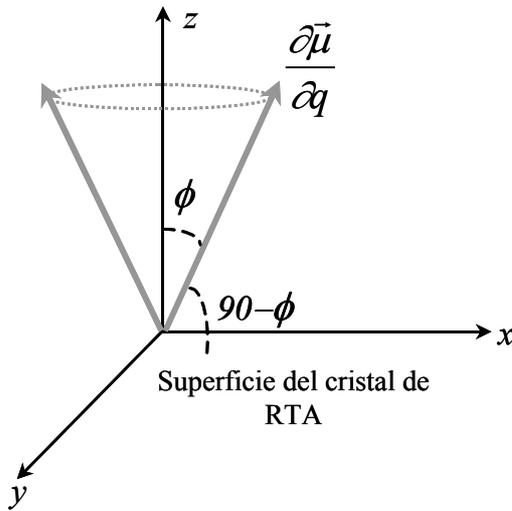
$$R = \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x + \cos^2 \phi_z (\langle E(0)^2 \rangle_z - \langle E(0)^2 \rangle_x)}{\langle E(0)^2 \rangle_y \cos^2 \phi_y} - \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x}{\langle E(0)^2 \rangle_y} \quad (5.3)$$

A partir del valor experimental de  $R$  no es posible obtener experimentalmente los valores de  $\phi_z$  y  $\phi_y$  (dos incógnitas y una ecuación). Para obtenerlos se requieren los valores de  $R$  para dos vibraciones cuya orientación relativa se conozca teóricamente.

Para el caso en el que el sistema muestra simetría axial (la probabilidad de encontrar el oscilador sólo depende del ángulo al eje perpendicular  $z$ ) es posible llegar a una expresión mucho más simplificada. En este caso  $\phi_x = \phi_y = \phi_{90}$  y sólo hay que considerar el ángulo que forma el momento dipolar de transición respecto a la norma del cristal,  $\phi_z = \phi_0$  (ver figura 5.2). Renombraremos a este ángulo como  $\phi$ , con lo que  $R$  será

$$R = \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x}{\langle E(0)^2 \rangle_y} + \frac{\langle E(0)^2 \rangle_z}{\langle E(0)^2 \rangle_y} \frac{2 \cos^2 \phi}{1 - \cos^2 \phi} \quad (5.4)$$

y será posible calcular  $\phi$  a partir del valor experimental de  $R$ .



**Figura 5.2.** Esquema de sistema con simetría axial. Las relaciones trigonométricas hacen que sólo sea necesario conocer un ángulo para describir la orientación del sistema.

### 5.1.2. El parámetro de orden

En general, el momento dipolar de transición no forma un único ángulo con la normal del cristal, sino que existe una distribución de ángulos. La función  $f(\phi)$  nos da la densidad de osciladores con ángulo  $\phi$ , mientras que la distribución de osciladores en función de  $\phi$  será  $f(\phi)\sin\phi$  (Boncheva y Vogel, 1997; Axelsen y Citra, 1996). Definimos el parámetro de orden  $p_\phi$  como (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1990; Ludlam et al., 1996)

$$p_\phi = \frac{3\langle \cos^2 \phi \rangle - 1}{2} \quad (5.5)$$

donde (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1990; Mitchell y Litman, 1998)

$$\langle \cos^2 \phi \rangle = \int_0^\pi \cos^2 \phi \times f(\phi) \sin \phi \cdot d\phi \quad (5.6)$$

Cuando el parámetro de orden toma un valor de 1, implica que  $f(\phi)$  es diferente de cero sólo para  $\phi = 0^\circ$  o  $180^\circ$  (no es distinguible). Cuando  $p_\phi = -0,5$  implica que  $f(\phi)$  es diferente de cero sólo para  $\phi = 90^\circ$ . En las demás situaciones, diferentes formas de  $f(\phi)$  dan el mismo valor para  $p_\phi$ , y por lo tanto a partir de éste no podemos conocer  $f(\phi)$ . El caso más extremo de incertidumbre se da cuando  $p_\phi = 0$ , pues

las diferentes formas de  $f(\phi)$  compatibles con esta situación van, desde  $f(\phi)$  igual a una constante (no hay orientación preferencial), a  $f(\phi)$  diferente de cero sólo para  $\phi = 54,7^{\circ}$ \* (Axelsen y Citra, 1996).

Podemos re-exresar la razón dicroica de un sistema axial con una distribución de ángulos, modificando la ecuación 5.4, como:

$$R = \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x}{\langle E(0)^2 \rangle_y} + \frac{\langle E(0)^2 \rangle_z}{\langle E(0)^2 \rangle_y} \frac{2\langle \cos^2 \phi \rangle}{1 - \langle \cos^2 \phi \rangle} = \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x}{\langle E(0)^2 \rangle_y} + \frac{\langle E(0)^2 \rangle_z}{\langle E(0)^2 \rangle_y} \frac{2p_\phi + 1}{1 - p_\phi} \quad (5.7)$$

El parámetro de orden posee la siguiente propiedad interesante: Si un sistema muestra simetría axial, y es posible descomponerlo en sucesivos subsistemas con simetría axial, el parámetro de orden del sistema es igual al producto de los parámetros de orden de los diferentes subsistemas (Axelsen y Citra, 1996; Boncheva y Vogel, 1997). Esta propiedad nos será útil más adelante.

### 5.1.3. Efecto de un polarizador imperfecto

Los polarizadores son imperfectos, por lo tanto no podemos obtener el espectro de absorbancia a  $90^\circ$  y el espectro de absorbancia a  $0^\circ$  puros. El espectro obtenido con luz polarizada a  $90^\circ$  tendrá cierta contribución del espectro polarizado a  $0^\circ$  y viceversa. Ello hace que la ecuación 5.1 y 5.7 se tengan que redefinir, y que la razón dicroica sea:

$$R = \frac{\int Abs_{90}}{\int Abs_0} \approx \frac{(1-f) \int Abs_0^{pura} + f \int Abs_{90}^{pura}}{(1-f) \int Abs_0^{pura} + f \int Abs_{90}^{pura}} = \frac{[\langle E(0)^2 \rangle_x (1-p_\phi) + \langle E(0)^2 \rangle_z (2p_\phi + 1)](1-f) + \langle E(0)^2 \rangle_y (1-p_\phi)f}{\langle E(0)^2 \rangle_y (1-p_\phi)(1-f) + [\langle E(0)^2 \rangle_x (1-p_\phi) + \langle E(0)^2 \rangle_z (2p_\phi + 1)]f} \quad (5.8)$$

donde  $f$  es el factor de imperfección del polarizador, que nos dice que fracción de la intensidad que atraviesa el polarizador lo hace con la polarización incorrecta. En esta ecuación hemos supuesto que  $f$  es igual para la polarización a  $90^\circ$  y a  $0^\circ$ .

Si disponemos un líquido sobre el cristal,  $p_\phi = 0$ , ya que las moléculas de un líquido no muestran orientación preferencial. La razón dicroica obtenida será la de una muestra isotrópica,  $R^{iso}$  (Axelsen y Citra, 1996; Goormaghtigh et al., 1999). Si además consideramos que el líquido es un absorbente débil, podremos aplicar la hipótesis de la película gruesa. En nuestras condiciones experimentales la ecuación 5.8 se simplifica a:

$$R^{iso} = \frac{2-f}{1+f} \quad (5.9)$$

Por lo tanto, determinando el valor de  $R^{iso}$  para la banda de un líquido podemos obtener el valor de  $f$ . Hemos de tener en cuenta que la ecuación 5.9 no será correcta sin la asunción de un absorbente débil. Si  $f=0$  y  $k_2=0$ , el valor de  $R^{iso}$  es igual a 2, pero como se puede derivar de los datos de Picard et al. (1999),

\* Este ángulo es conocido por este motivo como ángulo mágico.

si  $f = 0$  pero  $k_2 = 0,22$ , el valor de  $R^{\text{iso}}$  es igual a 1,9. Por ello, determinamos el valor de  $R^{\text{iso}}$  para tres bandas del agua que aparecen sobre  $3400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2125 \text{ cm}^{-1}$  y  $1645 \text{ cm}^{-1}$ . La banda a  $2125 \text{ cm}^{-1}$  ( $k^{\text{max}} = 0,017$ ) muestra un  $R^{\text{iso}} \approx 1,93$ , igual que la banda a  $1645 \text{ cm}^{-1}$  ( $k^{\text{max}} = 0,14$ ). La banda a  $3400 \text{ cm}^{-1}$  ( $k^{\text{max}} = 0,31$ ) muestra un  $R^{\text{iso}} \approx 1.85$ . Utilizando  $R^{\text{iso}} \approx 1,93$  obtenemos un valor de  $f \approx 0.024$ , próximo, aunque algo superior, a valores descritos (Goormaghtigh et al., 1999; Axelsen et al., 1995). Este será considerado en adelante el factor de imperfección de nuestro polarizador.

Si consideramos que la muestra es un absorbente débil y que tiene un grosor suficiente para que se aplique la hipótesis de la película gruesa, y sustituyendo los valores de nuestras condiciones experimentales en la ecuación 5.8 y despejando, el valor de  $p_\phi$  puede obtenerse como:

$$p_\phi = \frac{(n_2^2 - 16)(128R - 247)}{n_2^2(128R - 247) - 1904(R + 1)} \quad (5.10)$$

Cuando la anchura de la muestra no puede considerarse suficiente para que se aplique la hipótesis de la película gruesa, podemos utilizar la interpolación entre la hipótesis delgada y gruesa (ecuación 4.19). Sustituyendo los valores de nuestras condiciones experimentales, y para  $n_2 = 1,5$ :

$$p_\phi \approx \frac{(205R - 396)\exp(49lv) + (267 - 23R)\exp(24,5lv) + 2R - 80}{(188R + 287)\exp(49lv) - (543 + 3R)\exp(24,5lv) - 4R + 160} \quad (5.11)$$

Esta ecuación resultará difícil de aplicar, pues no es frecuente conocer el grosor de la muestra. Posteriormente describiremos una manera de determinar el valor de  $l$ .

#### 5.1.4. Obtención de la orientación molecular a partir de la razón dicroica experimental

Una vez obtenemos el valor de  $p_\phi$ , a partir de  $R$ , tenemos cierto conocimiento del ángulo  $\phi$ . Sin embargo nosotros no estamos interesados en el ángulo que forma el momento dipolar de transición con la normal del cristal de RTA. A nosotros nos interesa el ángulo que forma cierta estructura molecular, por ejemplo una hélice alfa, con la normal de una bicapa lipídica.

De acuerdo con la figura 5.3, supongamos que la normal de la bicapa lipídica muestra simetría axial respecto a la normal del cristal de RTA, con un parámetro de orden  $p_\gamma$ ; la estructura molecular muestra simetría axial respecto a la normal de la bicapa lipídica, con un parámetro de orden  $p_\beta$ ; y el momento dipolar de transición muestra simetría axial respecto a la estructura molecular, con un parámetro de orden  $p_\alpha$ . Entonces podemos descomponer  $p_\phi$  en (Goormaghtigh et al., 1999; Axelsen et al., 1995)

$$p_\phi = p_\gamma \times p_\beta \times p_\alpha \quad (5.12)$$

de acuerdo con las propiedades de parámetro de orden. Estamos interesados en conocer  $p_\beta$  para así tener cierto conocimiento del ángulo  $\beta$ , por ello es mejor expresar la ecuación 5.12 como:

$$p_\beta = \frac{p_\phi}{p_\gamma \times p_\alpha} \quad (5.13)$$

El valor de  $p_\phi$  se obtiene experimentalmente a partir de  $R$ . El valor de  $p_\alpha$  puede obtenerse a partir de estudios teóricos o de datos experimentales. De acuerdo con Marsh et al. (2000) para una hélice alfa transmembrana  $p_\alpha$  es igual a 0,65 para la amida A, 0,43 para la amida I y  $-0,37$  para la amida II. El valor de  $p_\gamma$  se asume habitualmente próximo a 1 (Goormaghtigh et al., 1999; Tamm y Tatulian, 1997), aunque para películas de fosfolípidos el valor de  $p_\gamma$  parece próximo a 0,8 (Axelsen et al., 1995). Por ello, para una determinación de  $p_\beta$  fiable es importante estimar el valor de  $p_\gamma$  en nuestros experimentos.

Una vez hemos obtenido el valor de  $p_\beta$ , podemos determinar el ángulo medio  $\langle\beta\rangle$  que forma la estructura molecular con la bicapa, como

$$\langle\beta\rangle = \arccos \left[ \sqrt{\frac{2p_\beta + 1}{3}} \right] \quad (5.14)$$

Esta expresión sólo es válida si existe una única orientación para la estructura molecular, ya que asume erróneamente que  $\langle\cos^2\beta\rangle = \cos^2\langle\beta\rangle$  (Axelsen y Citra, 1996). Si existe una distribución de orientaciones, lo cual será lo más habitual, el valor de  $\beta$  obtenido utilizando la ecuación 5.14 no corresponde al ángulo medio  $\langle\beta\rangle$ .

### 5.1.5. Determinación del grosor de la muestra

Cuando no se puede considerar que la muestra siga la hipótesis de la película gruesa, es necesario determinar el grosor de la muestra, como paso previo para determinar el parámetro de orden  $p_\phi$  a partir de  $R$ .

El método que nosotros proponemos para determinar  $l$  y  $p_\phi$  se basa en que el parámetro de orden de una estructura molecular ha de ser la misma independientemente de la vibración utilizada para obtenerla. Es decir, si utilizamos la amida I y la amida II para obtener  $p_\beta$ , el valor obtenido ha de ser el mismo:

$$p_\beta^{al} = \frac{P_\phi^{al}}{P_\alpha^{al}} = \frac{P_\phi^{all}}{P_\alpha^{all}} = p_\beta^{all} \quad (5.15)$$

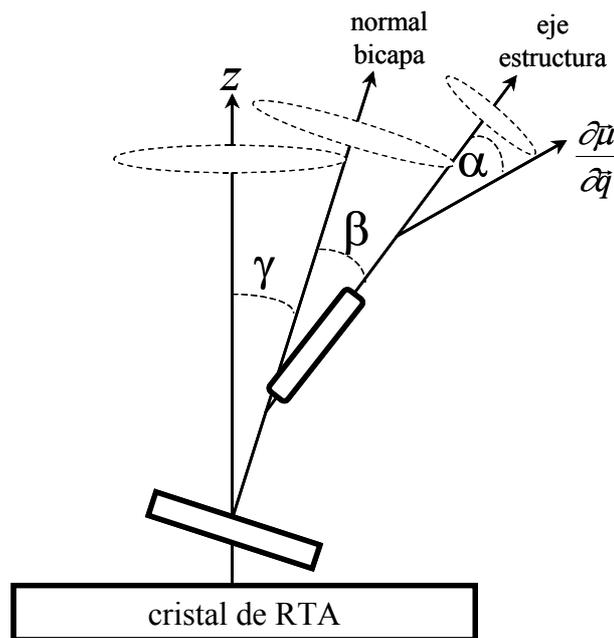


Figura 5.3. Misma situación que en la figura 5.2, pero descomponiendo el sistema axial en tres subsistemas con simetría axial.

Tenemos tres incógnitas,  $l$ ,  $p_{\phi}^{al}$ , y  $p_{\phi}^{al}$  y tres ecuaciones (la ecuación 5.15 y dos ecuaciones como la 5.11) lo que nos permite resolver el sistema.

### 5.1.6. Corrección por la presencia de estructuras no orientadas

Supongamos que podemos agrupar los diferentes segmentos de una proteína en dos grupos. El primer grupo representa una fracción  $1 - m$  de la proteína y muestra un valor medio de  $p_{\beta}$  igual a cero (los segmentos en su conjunto no muestran una orientación preferencial). El segundo grupo representa una fracción  $m$  de la proteína y muestra un valor medio de  $p_{\beta}$  diferente de cero. Por lo tanto, el valor de  $p_{\beta}$  obtenido aplicando la ecuación 5.13 será el valor medio. Si queremos obtener el valor de  $p_{\beta}$  para la parte de la proteína que muestra orientación preferencial hemos de hacer la siguiente corrección (Axelsen y Citra, 1996; Marsch y Páli, 2001):

$$p_{\beta}^{cor} = \frac{p_{\beta}}{m} \quad (5.16)$$

Por ejemplo, en la orientación obtenida a partir de la amida I, II y A contribuye toda la proteína. Si consideramos que sólo las hélices transmembrana mostrarán una orientación neta, podemos obtener su parámetro de orden aplicando esta corrección.

### 5.1.7. Determinación experimental de la razón dicroica

Los espectros de absorción en ambas polarizaciones se obtienen como los espectros de absorbancia sin polarización, excepto que se sitúa un polarizador de KRS-6 en el camino del haz. Al principio del día se obtienen los espectros de emitancia para ambas polarizaciones, y a lo largo del día se obtienen los espectros emitancia con muestra para ambas polarizaciones. Ambos se combinan para obtener los espectros de reflectancia y de absorbancia.

Para la obtención de la razón dicroica tenemos que determinar la absorbancia integral de la banda de una vibración para ambas polarizaciones, lo cual representa una gran dificultad, pues las vibraciones en espectroscopia IR dan bandas que aparecen habitualmente solapadas. Si se incluye un área que no corresponde al área de la banda, el valor de  $R$  se verá afectado. Por ello, la integración de la absorbancia ha de limitarse a un intervalo de números de onda en el que la banda aparezca bien resulta, con una corrección de línea base entre los extremos de integración (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1990). Aplicar, previo a la integración, un método de estrechamiento de bandas que conserve el área, puede mejorar los resultados, pues la resolución de la banda será mayor.

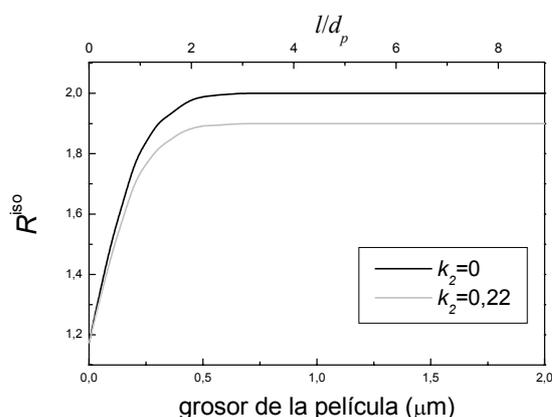
Cuando el solapamiento con otras bandas es total, su contribución tendrá que restarse si queremos determinar el valor de  $R$  propio de la banda. Por ello, la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos se restó a la amida I y II antes de la determinación de  $R$ . Como las películas de proteína retienen siempre agua, no es posible obtener valores fiables de  $R$  para la amida A, ni para la amida A' en agua deuterada. La amida II' solapa con bandas de lípido y no es posible obtener un valor fiable de  $R$ .

## 5.2. Obtención de espectros de dicroísmo lineal

El espectro de dicroísmo lineal se obtiene como  $Abs_{90} - R^{iso}Abs_0$ , donde  $R^{iso}$  es la razón dicroica cuando  $p_\phi = 0$  (Bechinger et al., 1999). El espectro de dicroísmo tiene la propiedad que sólo aparece en él las bandas que muestran una orientación preferencial (Bechinger et al., 1999; Ludlam et al., 1996), siempre que ésta sea diferente del ángulo mágico. Es, por lo tanto, un espectro adecuado para aumentar la resolución de estructuras orientadas de proteínas, como las hélices transmembrana.

Para una muestra que sigue la hipótesis de la película gruesa,  $R^{iso}$  es independiente del número de onda y de  $n_2$ . En nuestras condiciones experimentales  $R^{iso} = 1,93$ . Para una muestra que no es suficientemente gruesa para que se aplique la hipótesis de la película gruesa, el valor de  $R^{iso}$  para  $n_2 = 1,5$ , dependerá de  $l$ ,  $v$  y, como

$$R^{iso} = \frac{2550 \exp(49lv) - 1716 \exp(24,5lv) + 515}{1322 \exp(49lv) - 149 \exp(24,5lv) + 15} \quad (5.17)$$



**Figura 5.4.** Variación de la relación isotrópica,  $R^{iso}$ , con el grosor de la película sobre el cristal de RTA. Las condiciones son las mismas que en la figura 4.3, y los valores de  $R^{iso}$  se determinaron a partir de los valores de la intensidad del campo eléctrico en la interfase de la figura 4.3.

donde se ha sustituido en la ecuación 5.8 la ecuación 4.19 se ha tenido en cuenta nuestras condiciones experimentales.

El valor de  $l$  se puede obtener como se ha explicado con anterioridad. Recordemos que esta ecuación se obtiene utilizando la interpolación de la ecuación 4.19 y por lo tanto sólo es válida para absorbentes débiles. La figura 5.4 muestra el valor de  $R^{iso}$  para unas condiciones experimentales parecidas a las nuestras, pero sin ningún tipo de interpolación ni aproximación, en función del grosor de la película. Los valores se muestran para dos absorbentes, con  $k_2 = 0$  y con  $k_2 = 0,22$ . Para absorbentes fuertes el valor de  $R^{iso}$  será menor que el obtenido con la aproximación del absorbente débil. Se observa que para valores de  $l/d_p$  menores de 1,5, los errores en la

determinación de  $l$  afectan de manera importante al valor de  $R^{iso}$  determinado.

Otra manera de obtener  $R^{iso}$  es obtener el valor de  $R$  de una banda con  $p_\phi = 0$ . Bechinger et al. (1999) han propuesto utilizar el valor de  $R$  de la banda C=O de fosfolípido como una buena estimación de  $R^{iso}$ . Esta elección es totalmente errónea, pues la banda C=O del fosfolípido muestra orientación, con valores de  $p_\phi$  de  $\approx -0,2$  (Ludlam et al., 1996; Hübner y Mantsch, 1991). Como consecuencia, el valor de  $R^{iso}$  se infraestima y las bandas negativas del espectro de dicroísmo disminuyen en intensidad, llegándose en

algunos extremos a bandas amida I y amida II con el mismo signo en el espectro de dicroísmo (Grimard et al., 2001), lo cual es físicamente imposible.

### 5.3. Efecto de la orientación de la muestra en la absorbancia en ausencia de polarización

Cuando se trabaja con películas secas es posible que la muestra adopte una orientación preferencial respecto al cristal de RTA o a la ventana de transmitancia. En estas circunstancias, incluso utilizando radiación no polarizada, la absorbancia dependerá de la orientación de la muestra, produciendo errores si se está realizando un análisis cuantitativo (Sperline, 1991; Marsh, 1999). Para simplificar el análisis, supondremos que la orientación tiene simetría axial respecto a la normal de la superficie donde la muestra se halla depositada.

La absorbancia cuando se utiliza radiación no polarizada es, para la mayoría de los interferómetros, aproximadamente igual a la semisuma de la absorbancia utilizando radiación polarizada paralela y perpendicularmente (Sperline, 1991).

$$Abs = 0.5 Abs_{90} + 0.5 Abs_0 \quad (5.18)$$

Definiremos el error relativo en la absorbancia de una banda para una muestra orientada respecto a la misma banda en una muestra no orientada como:

$$Er = \frac{Abs_{90}(p_\phi) + Abs_0(p_\phi)}{Abs_{90}(p_\phi = 0) + Abs_0(p_\phi = 0)} - 1 \quad (5.19)$$

donde  $p_\phi$  es el parámetro de orden del momento dipolar de transición respecto a la normal de la superficie.

Cuando trabajemos por transmitancia el error relativo será (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1990):

$$Er = \frac{2 \cos^2 \theta (1 - p_\phi) + \sin^2 \theta (2 p_\phi + 1)}{2 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta} - 1 \quad (5.20)$$

donde  $\theta$  es el ángulo entre el haz y la normal de la ventana. En la disposición estándar de los experimentos de transmitancia  $\theta = 0^\circ$ , y el error resulta ser  $Er = -p_\phi$ , yendo de  $-1$  cuando  $p_\phi = 1$  (no habrá absorbancia) a  $+0,5$  para  $p_\phi = -0,5$  (la absorbancia es 1,5 veces mayor de lo que debiera).

Para RTA, el error resulta ser:

$$Er = \frac{(1-p) \left( \langle E(0)^2 \rangle_x + \langle E(0)^2 \rangle_y \right) + (2p+1) \langle E(0)^2 \rangle_z}{\langle E(0)^2 \rangle_x + \langle E(0)^2 \rangle_y + \langle E(0)^2 \rangle_z} - 1 \quad (5.21)$$

donde se ha utilizado la ecuación 5.7

Para la hipótesis de la película delgada, y utilizando valores para proteoliposomas en un cristal de germanio ( $n_1 = 4,0$ ,  $n_2 = 1,5$ ,  $n_3 = 1,0$  y  $\theta = 45^\circ$ ), el error relativo resulta ser  $Er = -0,7 p_\phi$ , y va de  $-0,7$  para  $p_\phi = 1$  (la absorbancia es 0,3 veces de la que debiera) a  $+0,35$  para  $p_\phi = -0,5$  (la absorbancia es 1,35 veces la que debiera).

Para una película que sigue la hipótesis de la película gruesa, en las mismas condiciones que las anteriores, el error relativo resulta ser  $Er = 0,16p_\phi$ , y va de +0,16 para  $p_\phi = 1$ , a -0,08 para  $p_\phi = -0,5$ .

Se puede concluir que una orientación extrema de la variación del momento dipolar de transición de una banda puede producir errores cuantitativos importantes en transmitancia y en RTA para películas delgadas. Para una película gruesa los errores cuantitativos causados por la orientación de la muestra serán mínimos. Además, hemos de tener que para la mayoría de bandas  $p_\phi$  estará habitualmente más próximo a cero que a 1 o -0,5, y por lo tanto en error cometido será todavía menor.

## 6. Cálculos numéricos y simbólicos

Para los diferentes métodos numéricos de tratamiento de datos (desconvolución de Fourier, desconvolución regularizada lineal y no lineal, predicción lineal y ajuste de bandas) se escribieron programas para Matlab v5.1. Estos programas utilizaron las funciones de transformada de Fourier rápida y la inversión de matrices del propio Matlab. Para la desconvolución regularizada no lineal se creó una función que implementa una minimización por el método de los gradientes conjugados (Press et al., 1992 cap. 10; Penny y Lindfield, 1995 cap. 8). El ajuste de bandas se realizó implementando el método de Levenberg-Marquardt (Press et al., 1992 cap. 15).

El cálculo simbólico (manipulación, simplificación y resolución analítica de ecuaciones, integrales y matrices) se realizó en Derive v5.

La resolución numérica de ecuaciones, integrales o matrices se realizó tanto en Derive como en Matlab.

