

Tutorial para el Aprendizaje de la Técnica de Espectroscopia de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR) para Estudiantes de Biofísica: Estudio de Membranas

TUTORIAL FOR LEARNING INFRARED SPECTROSCOPY TECHNIQUES OF
FOURIER TRANSFORM (FTIR) FOR BIOFYSICIAN STUDENTS: MEMBRANE
STUDY

Natalia del Pilar Orjuela León*

Gelver Guillermo Ramos Pita**

Resumen

En este artículo se habla sobre el desarrollo de un tutorial que permite a los estudiantes del curso de Biofísica aprender cómo se realiza la técnica de FTIR. Se observó que a los estudiantes de último semestre de Licenciatura en Física les parece novedoso e interesante el trabajo de tutoriales y simulaciones con el ánimo de seguir trabajando y aportar material necesario enfocado a cursos teórico-prácticos como Biofísica cuyos laboratorios no están a fácil alcance.

Palabras Clave: Espectroscopia; enseñanza de la física.

Abstract

This article discusses the development of a tutorial that allows students on Biophysics course to learn how the FTIR technique is performed. It was observed that students of the last semester undergraduate in physics teaching find novel and interesting the work of tutorials and simulations with the intention of continuing to work and providing necessary material focused on theoretical and practical courses such as Biophysics, whose laboratories are not easily accessible.

Keywords: Spectroscopy; physics education.

1. Introducción

El trabajo en ramas interdisciplinarias como la biofísica permite abarcar más campos del conocimiento haciendo que el estudiante enfoque de una manera más amplia y completa un

* natorjuela@yahoo.com ** gelverramos@yahoo.es

fenómeno en especial.

La membrana celular es un sistema que presenta fenómenos tanto biológicos como físicos permitiendo explorar diversas técnicas para el estudio de ellas. Teniendo en cuenta esto, la biofísica es una rama teórico practica por lo tanto el estudiante de biofísica debe estar familiarizado con ambas.

En un curso de biofísica se ha visto encaminado hacia la parte teórica fundamental- mente, esto debido en gran parte a la falta de materiales (laboratorios y demás elementos), que permitan conformar prácticas experimentales serias y con las que se llegue a enriquecer la parte teórica recibida por el estudiante.

Debido a esto, se quiere que el estudiante tenga un acercamiento a una técnica experimental muy utiliza- da en la biofísica para el estudio de membranas llamada espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (Espectroscopia FTIR).

Para el acercamiento se propone hacer un tutorial que contenga todo el proceso desde la preparación de muestras hasta la utilización del FTIR para el estudio de membranas celulares y mezclas de ellas permitiendo al estudiante prepararse para una futura experimentación real.

El tutorial se trabajará bajo una visión constructivista llevando a que el estudiante, como parte de la interacción con el tutorial, forme sus propias estrategias para explicar fenómenos relacionados con la técnica experimental.

2. ¿Que ofrece el tutorial?

Para nadie es un secreto que el desarrollo tecnológico implica la actualización del maestro para el desarrollo de nuevas propuestas de enseñanza. Han surgido actualmente nuevas formas y herramientas para la enseñanza, que permiten no solo al estudiante, sino que también al maestro ver de un modo diferente su entorno de clase. Las TICs, (tecnologías de la información y comunicación), permiten llegar de una manera más directa al estudiante generando un mayor impacto, además de permitirle ampliar la información que en el momento se le está brindando, en este caso con la ayuda de la internet.

Así el maestro actualmente debe tener interés por llegar a aplicar las diferentes herramientas que se le presentan, por esto la elaboración de software, páginas, y demás elementos propios de las TICs le representan una ventaja a la hora de implementar lo que conoce como nueva estrategia de enseñanza.

2.1. Trabajo del Docente

La labor del docente se encuentra dividida en dos partes, el acompañamiento al estudiante y el diseño y elaboración del tutorial.

En la parte de acompañamiento, el docente debe hacer un seguimiento del estudiante del proyecto que este vaya a realizar después del uso del tutorial y con los datos suministrados en el mismo. Debe además resolver las dudas que este tenga durante y post tutorial, para el avance en su construcción de conocimiento.

El diseño y elaboración del tutorial implica el conocimiento de una serie de conceptos propios de la técnica experimental a seguir y que en la siguiente sección se explicaran. La elaboración del tutorial implica el conocimiento de elaboración de páginas Web y el manejo de un software que permita la implementación de la evaluación correspondiente a el protocolo experimental. Para la implementación del tutorial es necesario la revisión de ciertos elementos tales como videos, presentaciones como, ([http://www.tau.ac.il/lifesci/zabam/images/FTIR Process.gif](http://www.tau.ac.il/lifesci/zabam/images/FTIR_Process.gif)), y vocabulario que permitan al estudiante de biofísica ampliar su espectro de información acerca del tema a tratar.

2.2. Biofísica de membranas

La membrana celular es una estructura fluida. Esta fluidez implica que sus componentes están unidos por uniones no covalentes, es decir, no forman uniones fuertes y por lo tanto su estructura está fuertemente influenciada por los cambios de temperatura.

Para el estudio de las propiedades termodinámicas de la membrana se utilizan técnicas tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (espectroscopia FTIR). En estas técnicas se suele usar membranas artificiales, debido a que en estas por lo general solo hay lípidos, por tanto el estudio se hace de manera específica sobre el componente fundamental de la membrana celular, el fosfolípido.

La técnica de espectroscopia FTIR trabaja en el intervalo de números de onda 4000 a 670cm^{-1} y tiene un rendimiento muy superior ya que presentan un aumento en la relación señal/ruido y de los límites de detección. Esta técnica considera tres mecanismos, absorción, emisión y reflexión de la radiación IR (infrarrojo). En este tutorial se trabajará el espectro de absorción de membranas artificiales formados de los lípidos DMPG DSCP.

2.3. Espectroscopia de Infrarrojo

La espectroscopia molecular se basa en la interacción entre la radiación y la muestra de estudio, en este caso lípidos. De acuerdo con la radiación incidente (región del espectro electromagnético) se tienen diferentes características, es decir, longitud de onda, numero de onda incidente, y tipo de interacción vibracional, rotacional o por excitación. En el caso de la espectroscopia del infrarrojo existen cambios de energía vibracionales y rotacionales en la muestra.

La espectroscopia por infrarrojo, usa instrumentos dispersivos, no dispersivos y de tipo de transformada de Fourier. Este último dota a la técnica de una alta resolución, una gran

sensibilidad, una precisión y una exactitud incomparable en la determinación de las longitudes de onda de resonancia de las moléculas, lo que permite un análisis cualitativo y cuantitativo de muestras complejas como las de especies orgánicas.

El estudio en el infrarrojo se puede considerar desde tres regiones: Infrarrojo lejano donde se producen las vibraciones rotacionales. Comprende longitudes de onda entre

$5 \times 10^4 - 10^6$ nm y números de onda $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Infrarrojo medio, donde se producen las vibraciones fundamentales. Comprende longitudes de onda

entre $2500 - 5 \times 10^4$ nm y números de onda entre $400 - 200 \text{ cm}^{-1}$ Infrarrojo cercano, donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones se encuentra

entre longitudes de onda $700 - 2500$ nm y números de onda $14300 - 4000 \text{ cm}^{-1}$

Cuando la luz incide en la muestra, la muestra puede experimentar diferentes fenómenos absorción, transmisión y reflexión. La luz incidente tiene una intensidad mayor a la que la muestra transmite, así está, va a absorber una parte de esta radiación incidente y la otra va a ser reflejada.

En este caso se hace énfasis en la absorción, siendo la parte del infrarrojo medio la más utilizada para el estudio, utilizando para tal efecto el espectrómetro de transformada de Fourier. La espectrometría de absorción en el infrarrojo medio es la principal herramienta estructural de especies orgánicas y bioquímicas.

2.3.1. Espectrómetro de transformada de Fourier

El espectrómetro de transformada de Fourier trabajan bajo el principio del interferómetro de Michelson- Morley, la codificación se da dividiendo la fuente en dos haces con trayectorias que pueden variar su longitud periódicamente para dar modelos de interferencia. La transformad de fourier tiene como uso exclusivo el tratamiento de los datos obtenidos.

El FTIR genera un espectro de la muestra que señala el porcentaje de absorción en función del número de onda. El uso de estos espectros a diferentes temperaturas permite identificar el comportamiento de ciertos enlaces de la muestra, mediante la relación de la temperatura y número de onda y, así encontrar las temperaturas de transición. El espectrómetro posee una interface al computador, que permite el tratamiento de los datos de una manera más eficaz.

2.4. Protocolo experimental

El protocolo experimental se encuentra dividido en dos partes: la preparación de muestras y el IR Materiales: DMPG, DSPC, cloroformo, buffer de fosfato de sodio al 0.01M.

2.4.1. Preparación de muestras

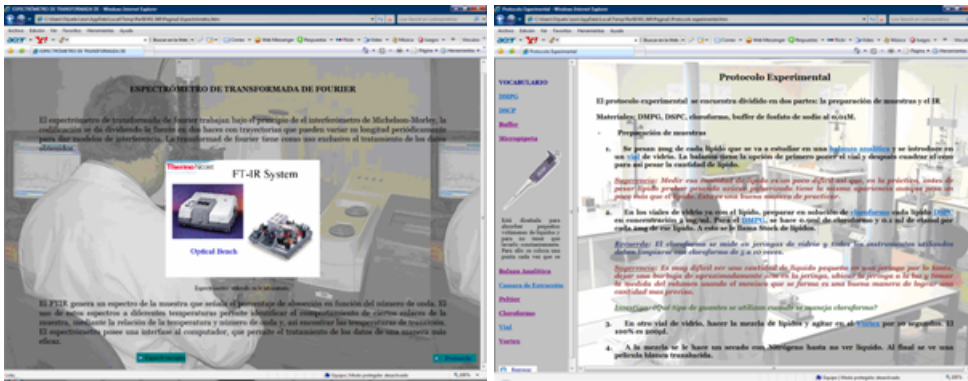
1. Se pesan 2mg de cada lípido que se va a estudiar en una balanza analítica y se introduce en un vial de vidrio. La balanza tiene la opción de primero poner el vial y después cuadrar el cero para así pesar la cantidad de lípido.
2. En los viales de vidrio ya con el lípido, preparar en solución de cloroformo cada lípido DSPC en concentración 2 mg/ml. Para el DMPG, se hace 0.9ml de cloroformo y 0.1 ml de etanol por cada 2mg de ese lípido. A esto se le llama Stock de lípidos.
3. En otro vial de vidrio, hacer la mezcla de lípidos y agitar en el Vortex por 10 segundos. El 100
4. A la mezcla se le hace un secado con Nitrógeno hasta no ver líquido. Al final se ve una película blanca translúcida.
5. Desecar la mezcla de lípidos a 40°C en vacío por 12 horas.
6. Preparación de 40 ml de muestra en proporción 10:30 buffer-lípidos. Se cierra con la tapa.
7. Agitar 5 veces la muestra con una Micropipeta a una temperatura de 60°-65°.

2.4.2. Protocolo sobre el IR

1. La muestra se pasa del vial a las ventanas que son de Fluoruro de Calcio (CaF₂).
2. Las ventanas con la muestra se introducen en un peltier.
3. El peltier se pone en el espectrógrafo FTIR.
4. El espectrógrafo FTIR esta conectado a un computador desde donde se configura el experimento. Aquí es donde uno escoge la cantidad de escaneos, la resolución y el material de las ventanas entre otros. También, el programa permite procesar datos.

3. El tutorial

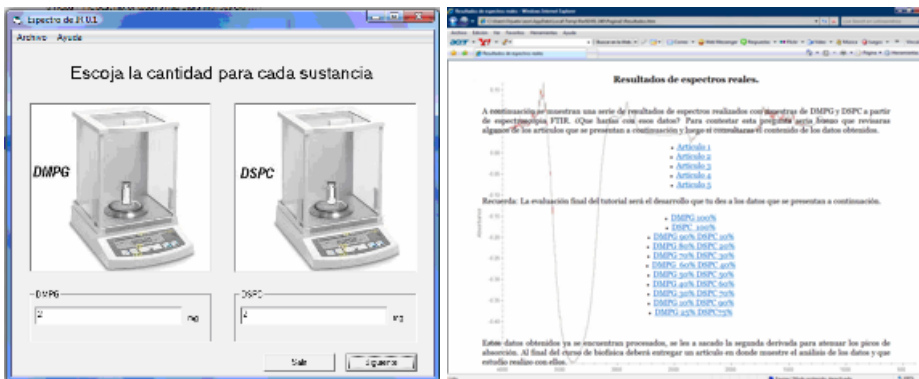
El tutorial tiene las secciones de Espectroscopia FTIR, Protocolo experimental, Evaluación. Las primeras dos partes son teóricas, el protocolo experimental además de ser informativa tiene preguntas que permite al estudiante investigar mas a fondo algunos procesos.



(a) (b)

Figura 1: (a) Sección Espectroscopia FTIR. (b) Sección Protocolo Experimental. Esta parte tiene el vocabulario pertinente al lado izquierdo de la pantalla.

La evaluación se encuentra dividida en dos partes, la primera es a corto plazo consiste en verificar que el estudiante a través de un programa interactivo, muestre el manejo de los pasos necesarios para la experimentación con la técnica de espectroscopia (FTIR). La otra parte consiste en datos reales de espectros obtenidos a partir de esta técnica y una serie de artículos, que ayuden al estudiante hacer un análisis de dichos resultados. Estos datos obtenidos ya se encuentran procesados, se les sacó la segunda derivada para atenuar los picos de absorción.



(a) (b)

Figura 2: (a) Programa de evaluación técnica experimental. (b) Pantalla con links hacia los artículos y datos experimentales.

Esta última parte duraría aproximadamente un mes, dependiendo del tiempo que este tema tenga en la programación del curso de biofísica.

4. Resultados y discusión

El tutorial fue aplicado a estudiantes de Licenciatura de Física de último semestre con conocimientos pre- vios sobre Membranas Celulares. Por cada computador hubo 2 personas y en total hubo 9 parejas de las cuales 2 no se tendrán en cuenta para los resultados ya que

no completaron la guía.

La parte del protocolo experimental, tanto la sección teórica como el programa de evaluación, fue exitoso ya que los estudiantes aprobaron la evaluación y en el momento de la socialización sus comentarios fueron positivos con respecto a esta parte. La parte del Espectroscopia no fue tan exitosa posiblemente a que no fue tan llamativa ni interactiva.

Debido a la falta de tiempo no fue posible hacer la segunda parte de la evaluación aunque si se hizo una pregunta: ¿qué podrías analizar u obtener de los datos arrojados del espectrógrafo de FTIR? A la que solo uno de 7 grupos contesto como se esperaba, los demás grupos analizaron el espectro como tal y no los datos. La razón de esto posiblemente fue a que la pregunta no se entendió.

Con respecto al trabajo del docente, el que crea el tutorial construye para que otros lo entiendan y, por tanto, debe tener el conocimiento del tema muy claro así que él mismo aprende. Cada estudiante puede hacer sus propias preguntas y entre todos se puede discutir la respuesta. Así los temas del curso se aprovechan al máximo en discusiones, análisis y posteriormente en resultados productivos que mostrarán el entendimiento del mismo. Este tipo de ventajas no solo facilita el entendimiento de ideas y conceptos tanto del docente como de los estudiantes, sino que además el hecho de que los estudiantes vean más de cerca estos temas brinda más interés en los estudiantes por la Biofísica ya que esta es una ciencia interdisciplinar y sobre todo práctica donde se debe ver la aplicación en la realidad.

5. Conclusiones

La elaboración de este tipo de herramientas es un primer acercamiento por parte del docente hacia el manejo de nuevas formas de mostrar ciertos contenidos, más aun en estos casos en los que la experimentación real se encuentra muy relegada debido a diferentes factores, sin embargo este tipo de material no sería la parte esencial de un curso de biofísica, si no que daría un complemento didáctico a ciertas temáticas en las que se debería combinar la parte teórica y la experimental.

Como primera experiencia de aplicación se tienen muchos aspectos tanto positivos como a mejorar, importantes a la hora de evaluar el trabajo realizado. La implementación de programas interactivos incentiva el trabajo del estudiante, aunque al programa presentado se le deben hacer algunas reformas en cuanto a su contenido el comportamiento fue bueno, mostrando el complemento con la implementación del protocolo experimental.

La parte del tutorial implica mucho conocimiento de los temas a tratar, además que se exige una mayor explicación en cuanto a los contenidos en el implícitos, es decir, los estudiantes deben tener una total claridad de los conceptos que en él se expresan para de esta manera poder tener una mayor claridad de lo que podrían hacer con este tipo de técnicas experimentales. Como se ha dicho la finalidad de este tipo de tutoriales, además del acercamiento al laboratorio, es el que el estudiante pueda llegar a la interpretación de los

datos obtenidos, haciendo un análisis en las diferentes opciones que se les ofrece. Esta última parte implica un trabajo más extenso que no debería ser limitado a una sola clase, sino que se debe complementar con el transcurrir de el curso de biofísica.

Un tutorial no solo es aplicable para una técnica experimental, por el contrario este sería un buen comienzo para la elaboración de nueva formas de mostrar otras técnicas y sus aplicaciones no solo en la parte de la biofísica sino que también en otras áreas de investigación.

Referencias

- . [1] Skoog D, Holler J, Nieman T, Principios de análisis instrumental, McGrawHill, Quinta edición, 2001, pp. 409, 411-412
- . [2] Arrondo JLR, Goñi FM, Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes, Chemistry and Physics of lipids, 1998 Mar 4; pp. 53-69
- . [3] Mergel B, Diseño instruccional y teoría del aprendizaje, Comunicaciones y Tecnología Educativa de la Universidad de Saskatchewan, Canadá, 1998, pp 2-12,15
- . [4] Aparicio S, Metodologías Analíticas Basadas en Espectroscopia de Infrarrojo y Calibración Multivibrante. Aplicación a la Industria Petroquímica. Universidad Rovira I Virgil, Tarragona, 2002, pp 21-25