

**Asignatura:** Técnicas Analíticas Instrumentales I

**Carrera/s a la/s cual/es pertenece:** Bioquímica

**Ciclo lectivo:** 2018

**Docente/s:** Profesora Asociado coordinador: Dra. Bolla, Patricia A; Profesor Adjunto: Dr. Esteban Colman Lerner; Jefe de Trabajos Prácticos: Lic. María Laura Vera

**Carga horaria semanal:** 7 horas

### **Fundamentación**

El curso de Analítica Instrumental constituye parte de la formación básica y general de la carrera de Bioquímica. El propósito general de este curso es el de presentar a los futuros profesionales un panorama de algunos aspectos básicos y aplicados de la química instrumental, de forma tal que los futuros profesionales sean capaces de establecer estrategias de resolución de problemas relacionados con la identificación y cuantificación de sustancias orgánicas e inorgánicas en matrices biológicas.

El énfasis del curso está puesto en la presentación de los principios generales de un conjunto de técnicas instrumentales, habitualmente utilizadas en la resolución cuali-cuantitativa de problemas analíticos. El nivel del curso propone la incorporación de estos principios generales y el desarrollo de los conocimientos necesarios para poder comunicarse con especialistas en este ámbito.

### **Objetivos:**

#### **Objetivos generales:**

Que los alumnos adquieran herramientas, integren y apliquen los conocimientos del análisis químico cuantitativo a muestras bioquímicas.

Que los alumnos sean capaces de desarrollar los hábitos y actitudes de analista.

#### **Objetivos Específicos:**

Se espera que al finalizar la materia los alumnos estén en condiciones de:

- Comprender los principios generales de los métodos instrumentales más importantes
- Comprender la naturaleza del problema analítico y establecer una estrategia de resolución .
- Correlacionar las propiedades físicas y químicas del analito, y el tipo de matriz, con el método instrumental a utilizar.

- Analizar e interpretar la información cualitativa y cuantitativa obtenida con los métodos instrumentales más importantes.
- Interpretar normas, literatura científica, etc. relacionadas con la resolución de problemas cuali-cuantitativos en matrices biológicas y su evaluación.
- Poder comunicarse con facilidad con especialistas en química instrumental.

### **Contenidos mínimos:**

Fundamentos de Electroquímica. Conductimetría. Espectroscopía UV-Visible. Espectroscopía de luminiscencia molecular. Espectroscopía atómica. Cromatografía gaseosa. Cromatografía líquida. Cromatografía de Intercambio iónico. Cromatografía de Exclusión molecular. Cromatografía HPLC. Electroforesis. Espectroscopía IR. Espectroscopía RMN. Espectroscopía de masas. Métodos separativos acoplados: LC-MS y GC-MS

### **Contenidos temáticos o unidades:**

#### **1.-Fundamentos de electroquímica.**

Celdas galvánicas. Potenciales normales y formales. Ecuación de Nernst. Potenciometría. Electrodo de primera, segunda y tercera especie. Electrodo de membrana. Electrodo de vidrio. Medida de pH. Potenciometría directa. Titulaciones potenciométricas. Trabajo práctico de laboratorio: Curvas de titulación: ácido-base (valoración de ácido fosfórico en bebida cola). Determinación del pH de muestras biológicas. Determinación de calcio de muestra biológicas mediante el uso de electrodos ion selectivos.

#### **2.-Conductimetría.**

Titulaciones conductimétricas. Introducción a la cinética electroquímica. Curvas de polarización. Sobrepotenciales. Trabajo práctico de laboratorio: Curvas de titulación conductimétrica. Valoración de HCl con NaOH.

#### **3.- Introducción a la espectroscopía**

Interacción de la radiación electromagnética con la materia. Interpretación clásica y cuántica. Espectros de absorción y de emisión. Ley de Beer. Limitaciones de la ley de Beer. Desviaciones químicas. Desviaciones instrumentales Transiciones espectroscópicas. Métodos cualitativos y cuantitativos.

#### **4.- Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)**

Fundamentos teóricos del proceso de absorción. Características de los espectros de las sustancias orgánicas. Diseño general de los instrumentos ópticos para la región uv-visible. Aplicaciones cualitativas. Aplicaciones cuantitativas (ley de Lambert-Beer). Resolución de mezclas. Estudio de equilibrio ácido base y de formación de complejos. Espectrofotometría de proteínas. Aplicación de la espectrofotometría al estudio de los ácidos nucleicos. Interpretación de espectros. Otras aplicaciones de la espectrofotometría: Colorimetría. Enzaimunoensayo (ELISA) Turbidimetría. Ensayos enzimáticos. Trabajo práctico de laboratorio: determinación del pKa de un indicador ácido base.

Determinación del pKa de tirosina. Estudio de cinética química mediante la determinación espectrofotométrica de desaparición de NAD<sup>+</sup> en muestra de suero humano.

### **5.- Espectrometría de luminiscencia molecular**

Teoría de la fluorescencia y de la fosforescencia. Diagrama de energía para un sistema fotoluminiscente. Procesos de desactivación. Rendimiento cuántico. Factores que favorecen la fluorescencia y fosforescencia frente a desactivaciones no radiativas. Espectros de excitación (y su relación con los espectros de absorción) y emisión. Instrumentación. Medidas de concentración. Fenómeno de desactivación de la fluorescencia (Quenching) Fluorescencia de proteínas. Características de la influencia de tirosina y triptófano sobre la fluorescencia. Aplicaciones analíticas. Determinación de Vitaminas. Determinación de analitos bioquímicos de importancia en clínica (corticosteroides, estrógenos, catecolaminas, porfirinas). Determinación de la secuencia de nucleótidos en el ADN con marcas fluorescentes. Fluoroimmuno análisis. Aplicaciones en bioquímica forense. Conceptos básicos de la quimioluminiscencia.

### **6.-Espectrometría atómica**

Absorción, emisión y fluorescencia. Llamas, hornos y plasmas. Instrumentación: lámparas de cátodo hueco. Métodos analíticos: método del sobreagregado, método del patrón interno. Trabajo práctico de laboratorio: Fotometría de llama. Determinación de sodio y potasio en agua corriente. Efecto del contenido de etanol en la intensidad de la señal. Determinación indirecta de fosfatos a partir de la medida de calcio por fotometría de emisión. Absorción atómica: Determinación de calcio y magnesio en muestras biológicas.

### **7.-Introducción a los métodos cromatográficos**

Clasificación de los métodos cromatográficos. Cromatografía de elución en columna. Constantes de distribución. Parámetros de retención. Fase móvil y estacionaria. Cociente de distribución. Cromatograma: tiempo de retención y tiempo muerto. Ensanchamiento de las bandas cromatográficas. Teoría cinética de la cromatografía. Ecuación de van Deemter. Selectividad y Resolución. Factores de los cuales dependen. Problema general de la elución. Trabajo práctico de laboratorio: Obtención de parámetros de retención y de eficiencia a partir de un cromatograma. Curva H vs u.

### **8.- Métodos separativos: Cromatografía gaseosa (CG)**

Principios. Gas de transporte, tipos de columnas (capilares y orificio ancho). Instrumentación: inyector, horno, detectores: detector de ionización de llama (FID), detector de captura electrónica (ECD), detector de conductividad térmica. Métodos cuali-cuantitativos. Resolución de mezclas complejas. Trabajo práctico: Análisis cuantitativo de una mezcla de hidrocarburos por CGL.

### **9.- Métodos separativos: Introducción a la cromatografía líquida**

Principios. Parámetros cromatográficos: solvente de elución, tiempo de retención, resolución, flujo óptimo. Tipos de cromatografía líquida: cromatografía líquido-sólido (LSC), cromatografía líquido-líquido (LLC), cromatografía de fase ligada (BPC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Cromatografía hidrofóbica y de afinidad.

### **10.- Cromatografía líquida de absorción y partición**

Tipos de fases estacionarias y fase móvil. Mecanismos de retención. Modos de operación: fase normal y fase reversa. Aplicación a distintos tipos de moléculas. Instrumentación: inyector, bombas, desgasificadores, detectores UV-VIS, de fluorescencia, electroquímico, de índice de refracción, de dispersión de la luz evaporativo (ELSD). Métodos cuali-cuantitativos. Aplicación en la

determinación de analitos en bioquímica clínica (hemoglobina glicosilada, adrenalina, ácidos orgánicos, serotonina, etc.) Trabajo práctico: Determinación de analitos bioquímicas por HPLC.

### **11.- Cromatografía líquida de intercambio iónico y de permeación en geles**

Fundamentos. Dependencia de la retención con la composición de la fase móvil. Mecanismos de retención. Resinas de intercambio iónico. Determinación de su capacidad. Tipos de geles para permeación. Mecanismos de retención. Principios básicos.

### **12.-Electroforesis**

Fundamentos. Electroforesis en zona. Equipo electroforético. Factores que afectan a la electroforesis (Campo eléctrico, muestra, buffers, soporte). Inmunolectroforesis. Electroforesis en gel de poliacrilamina. Aplicaciones. Estimación de la masa molecular. Electroenfoco analítico y preparativo. Electroforesis bidimensional. Electroforesis de ácidos nucleicos. Electroforesis capilar.

### **13.- Espectroscopía infrarroja (IR)**

Fundamentos teóricos: vibraciones y rotaciones moleculares. Bandas características de los principales grupos funcionales. Instrumentación: sistemas clásicos y FTIR. Aplicaciones cuali y cuantitativas.

### **14.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Principios de la resonancia magnética nuclear: momento angular y espín nuclear. Desplazamientos químicos: apantallamiento nuclear. Acoplamiento espín-espín: modelos de multipletes, núcleos equivalentes. Relajación de los espines. Instrumentación. Interpretación de espectros:

<sup>1</sup>H-RMN: apantallamiento nuclear y desplazamiento químico. Relación entre el desplazamiento químico y la estructura molecular. Acoplamientos espín-espín de primer orden. Constantes de acoplamiento. Integración de las señales. Interpretación de espectros.

<sup>13</sup>C-RMN: el problema de la sensibilidad nuclear. Interpretación de espectros.

### **15.- Espectrometría de Masas (EM)**

Fundamentos del fenómeno de ionización y ruptura molecular. El espectrómetro: sus componentes: Métodos de ionización: Ionización electrónica (EI), ionización química (CI), electrospray (ESI), ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI). Su aplicación para distintos tipos de moléculas. Los analizadores: cuadrupolos, tiempo de vuelo (TOF), trampas de iones, trampa de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (ICR-FT).

Interpretación de espectros de ionización electrónica. Rupturas características de los grupos funcionales más importantes: alcanos, compuestos halogenados, alcoholes, éteres, aminas, aldehídos y cetonas, ácidos y derivados.

### **16.- Métodos separativos acoplados: LC-MS y GC-MS**

GC-MS: Instrumentación: interfases, sistemas de vacío, analizadores de simple cuadrupolo y de triple cuadrupolo, modos de funcionamiento; trampa de iones y TOF. Experimentos de MS/MS.

LC-MS: Tipos de interfases: Haz de partículas, ionización a presión atmosférica: Electrospray, APCI, APPI. Analizadores de masa: cuadrupolos, trampas iónicas tiempo de vuelo. Aplicaciones: determinación de secuencia de biomoléculas; determinación de analitos trazas en fluidos biológicos y otras matrices complejas.

### **Bibliografía:**

- A Global View of LC/MS. R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich. Global View Publishing. 1998.
- Análisis química cuantitativo. Fisher & Peters. Tercera edición. 1970
- Espectroscopía infrarroja. Jesús Rubio. Serie de Química Orgánica, monografía n° 12. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Segunda Edición. 1981.
- Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. F. Kitson, B. Larsen, C. McEwen, Academic Press, 1996
- Interpretación de Espectros de Masas. F. W. McLafferty. Editorial Reverté.
- Introducción a la Espectrometría de Masa de sustancias orgánicas. O.R. Gottlieb, R.B. Filho, F. Arago Craveiro, J. W. Alencar. Serie de Química, monografía n° 17. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Segunda Edición. 1983.
- Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Robert Ardrey. Wiley. 2003
- Métodos instrumentales de análisis. Willard, Merritt, Dean, Settle. Edición original. 1991
- Modern Practice of Gas Chromatography. R.L. Grob (Ed.) John Wiley and Sons Inc. Third Edition. 1995.
- Practical HPLC Methodology and Applications. B.A. Bidlingmeyer. John Wiley and Sons Inc. 1992.
- Principios de Análisis Instrumental . D.A. Skoog , F.J. Holler y S.R. Crouch . 6ta. Edición, 2008
- Química Orgánica. Morrison y Boyd. Pearson Education. 1998.
- Química Orgánica. Seyhan Ege. Editorial Reverté. 1997.
- Resonancia Magnética Nuclear. P.J.Hore. Editorial Eudeba. Primera Edición. 2000
- Spectrometric Identification of Organic Compounds. R.M. Silverstein, F.X. Webster. John Wiley and Sons Inc. Sixth Edition. 1998.
- Técnicas Instrumentales del análisis bioquímico. García-Segura et al 2008.

### **Bibliografía de consulta:**

- Análisis química cuantitativo. Harris. Segunda edición. 2001
- Experimental Organic Chemistry. Daniel Palleros. John Wiley & Sons. 2000.
- Fundamento de química analítica. Skoog, West, Holler, Crouch. Octava edición. 2005.
- HPLC for Food Analysis. A primer. A. Gratzfeld-Hüsgen, R. Schister. Hewlett-Packard Company 1996 (accesible en forma gratuita en <http://www.chem.agilent.com>)
- <http://www.chemistry.ccsu.edu/glagovich/teaching/316/uvvis/uvvis.html>
- <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.html>
- <http://www.organicworldwide.net/infrared.html>
- Pesticide Analytical Manual. Volume 1. Chapter 5, 6. Federal Drug Administration (accesible en forma gratuita en <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>)
- Principios de análisis Instrumental. Skoog, Holler & Nieman. Quinta edición. 2001.
- Química analítica cuantitativa. Day & Underwood. Quinta edición. 1989.
- Química Orgánica. Francis Carey. Mc Graw Hill Ed. Tercera Edición. 1999.
- The Basics of NMR, J. P. Hornak <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/bnmr.htm>.

### **Propuesta Pedagógico-Didáctica:**

Se realizarán clases teóricas expositivas que permitan un intercambio docente alumno óptimo. Se resolverán en clase cuestionarios de preguntas y ejercicios mediante la discusión de los mismos teniendo presente los conceptos teóricos adecuados para cada unidad temática. Las guías de problemas tienen una doble finalidad: por un lado, constituyen la ejercitación que permite fijar los conceptos analizados en clase, sobre la base del trabajo personal; por otro lado, dan una referencia al estudiante acerca del grado de progreso que está realizando, en la medida que logra resolver los

problemas de cada serie. Las consultas acerca de los problemas permitirán a los docentes tener una idea sobre el grado de avance y las dificultades generales registradas por el curso.

Las tablas de datos constituyen el material auxiliar necesario para la resolución de las actividades-problemas planteadas y la guía de laboratorio contiene los protocolos de las actividades experimentales con los cuales se llevarán a cabo los trabajos prácticos.

Se llevarán a cabo trabajos prácticos de laboratorio relacionados con las técnicas analíticas estudiadas y aplicado al campo de la Bioquímica.

#### **Régimen de aprobación:**

La evaluación se efectuará a través de tres exámenes parciales que incluyen los aspectos discutidos en las guías de problemas y en los trabajos prácticos de laboratorio. Cada parcial puede recuperarse sólo una vez en las fechas establecidas en el cronograma. Los parciales se aprueban con 4, pero para promocionar la materia deben aprobarse los parciales en primera instancia con un total de 21 puntos entre los tres parciales, y no menos de seis puntos en cada uno de ellos. Si hubiera sacado menos de seis puntos en cualquiera de los tres parciales, para promocionar la materia deberá recuperarlo (sólo tiene una oportunidad por parcial). En caso de aprobar los parciales, pero no estar en condiciones de promocionar, deberán rendir un examen final en las fechas fijadas en el calendario académico.

Además de las condiciones antes mencionadas, para aprobar la materia se deberá tener los informes de los prácticos de laboratorio aprobados. Los informes deberán ser entregados al comienzo de la clase siguiente a aquella en que se realizó el práctico y podrán ser aprobados, devueltos a los estudiantes para correcciones de algunos aspectos de los mismos, o considerados insuficientes; en este último caso esos alumnos deberán realizar nuevamente el práctico.

La asistencia a las clases de laboratorio es obligatoria. El trabajo no realizado por ausencia o desaprobado (dos como máximo) debe recuperarse en las fechas propuestas en cada curso. La asistencia a clases teórico-prácticas debe cumplirse en un mínimo de 75%.