

**Asignatura:** Técnicas Analíticas Instrumentales II

**Carrera:** Bioquímica

**Ciclo lectivo:** 2018

**Docente/s:** Dra. Patricia Bolla, Coordinadora. Docente: Dr. Esteban Colman Lerner

**Carga horaria semanal:** 6 hs semanales

### **Fundamentación**

La asignatura de Analítica Instrumental constituye parte de la formación básica y general en Bioquímica. El propósito general es el de presentar a los futuros profesionales un panorama de algunos aspectos básicos de métodos espectroscópicos y cromatográficos acoplados a espectrometría de masa, 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 de la materia ~~curso~~ está puesto en la presentación de los principios generales de un conjunto de técnicas instrumentales seleccionadas, 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**

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

- Comprender los principios generales de los métodos instrumentales presentados
- 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 del analito, con el método instrumental a utilizar.
- Interpretar la información estructural y cuantitativa obtenida con los métodos instrumentales presentados
- 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**

Introducción a los métodos cromatográficos. Métodos separativos: Cromatografía gaseosa, cromatografía líquida, Cromatografía líquida de intercambio iónico y de permeación en geles. Electroforesis. Inmunolectroforesis. Electroenfoque analítico y preparativo. Electroforesis bidimensional. Electroforesis de ácidos nucleicos. Electroforesis capilar. Espectroscopía infrarroja. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Espectrometría de Masa (EM). Métodos separativos acoplados a espectrometría de masa. GC-MS, LC-MS. Acoplamiento ICP-MS.

## Unidades temáticas

### Unidad 1: Espectroscopía infrarroja (IR)

Regiones del espectro infrarrojo. Fundamentos teóricos: tipos de vibraciones moleculares. Modelo mecánico de la vibración. Tratamiento cuántico de las vibraciones. Instrumentación: sistemas clásicos y de transformada de Fourier (FTIR). Fuentes, detectores. Preparación de muestras. Análisis cualitativo: bandas características de los principales grupos funcionales; interpretación de espectros de IR. Espectrometría de reflexión en el infrarrojo medio. Espectrometría de reflectancia total atenuada (ATR).

*Lectura introductoria: (1, 2, C3)*

*Lectura recomendada: (3,4)*

### Unidad 2: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Principios de la resonancia magnética nuclear: momento angular, espín nuclear y momento magnético. Frecuencia de Larmor. Descripción clásica del fenómeno. Obtención de espectros por transformada de Fourier. Desplazamientos químicos: apantallamiento nuclear. Acoplamiento espín-espín: modelos de multipletes, núcleos equivalentes. Relajación de los espines. Instrumentación.

RMN  $^1\text{H}$ : 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.

RMN  $^{13}\text{C}$ : el problema de la sensibilidad nuclear. Modos de adquisición de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ : acoplados a H, desacoplados de H, DEPT. Interpretación de espectros desacoplados de H y DEPT. Relación entre el desplazamiento químico y la estructura molecular.

*Lectura introductoria: (1, 2, C3)*

*Lectura recomendada: (3, 4, 5)*

### Unidad 3: Espectrometría de Masa

Fundamentos del fenómeno de ionización y ruptura molecular. Componentes de un espectrómetro: fuente de iones, analizador, detector. Métodos de ionización: Ionización electrónica (EI), ionización química (CI), ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI). Su aplicación para distintos tipos de moléculas. Los analizadores: sectores magnéticos y eléctricos, cuadrupolos, tiempo de vuelo (TOF), trampas de iones, trampa de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (ICR-FT), Orbitrap.

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.

*Lectura introductoria: (1, 2, C3)*

*Lectura recomendada: (3, 6, 7, 12)*

### Unidad 4: Métodos separativos acoplados: GC-MS y LC-MS

GC-MS: Instrumentación: interfases, sistemas de vacío, analizadores de simple cuadrupolo. Modos de funcionamiento: barridos completos, monitoreo de iones seleccionados. Cromatogramas de masa.

LC-MS: Tipos de interfases: Haz de partículas, Ionización a presión atmosférica: Electrospray, APCI, APPI. Analizadores de masa en tándem: triple cuadrupolos, Q-TOF, Q-Trampa Lineal, Q-Orbitrap. Aplicaciones: determinación de secuencia de biomoléculas; determinación de analitos trazas en fluidos biológicos y otras matrices complejas.

Experimentos de MS/MS: barrido de iones producto, monitoreo de pérdidas neutras, monitoreo de reacciones múltiples.

El acoplamiento ICP-MS. Fuente ICP. Equipamiento. Reacciones que ocurren en el interior de un plasma. Interferencias. Límites de detección. Comparación con ICP-OES. Análisis de proteínas por marcado con metales usando ICP-MS.

*Lectura introductoria: (apunte de la cátedra, 11).*

*Lectura recomendada: (8, 9, 10)*

**Unidad 5: 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.

**Unidad 6: 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.

**Unidad 7: 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.

**Unidad 8: 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.)

**Unidad 9: 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.

**Unidad 10: 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. Electroenfoque analítico y preparativo. Electroforesis bidimensional. Electroforesis de ácidos nucleicos. Electroforesis capilar.

## Bibliografía

### Bibliografía principal :

- (1) Química Orgánica. Francis Carey. Mc Graw Hill Ed. Tercera Edición. **1999**.
- (2) Química Orgánica. Morrison y Boyd. Pearson Education. **1998**.
- (3) Principios de Análisis Instrumental . D.A. Skoog , F.J. Holler y S.R. Crouch . 6ta. Edición, **2008**
- (4) Spectrometric Identification of Organic Compounds. R.M. Silverstein, F.X. Webster. John Wiley and Sons Inc. Sixth Edition. **1998**.
- (5) Resonancia Magnética Nuclear. P.J. Hore. Editorial Eudeba. Primera Edición. **2000**
- (6) Introducción a la Espectrometría de Masa de sustancias orgánicas. O.R. Gottlieb, R.B. Filho, F. Aragao 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**.
- (7) Interpretación de Espectros de Masas. F. W. McLafferty. Editorial Reverté.
- (8) A Global View of LC/MS. R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich. Global View Publishing. **1998**.
- (9) Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Robert Ardrey. Wiley. **2003**
- (10) Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. F. Kitson, B. Larsen, C. McEwen, Academic Press, **1996**
- (11) Quantitative Chemical Analysis. Daniel C. Harris, W.H. Freeman & Company, **2010**.
- (12) Mass Spectrometry Basics. Herbert y Johnstone, CRC Press, **2003**
- (13) Practical HPLC Methodology and Applications. B.A. Bidlingmeyer. John Wiley and Sons Inc. 1992.
- (14) • Modern Practice of Gas Chromatography. R.L. Grob (Ed.) John Wiley and Sons Inc. Third Edition. 1995.
- (15) • A Global View of LC/MS. R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich. Global View Publishing. 1998.
- (16) • Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Robert Ardrey. Wiley. 2003
- (17) • Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. F. Kitson, B. Larsen, C. McEwen, Academic Press, 1996
- (18) • Técnicas Instrumentales del análisis bioquímico. García-Segura et al 2008.
- (19) • Análisis química cuantitativo. Fisher & Peters. Tercera edición. 1970
- (20) • Métodos instrumentales de análisis. Willard, Merritt, Dean, Settle. Edición original. 1991
- (21) 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>)
- (22) • Experimental Organic Chemistry. Daniel Palleros. John Wiley & Sons. 2000.
- (23) • The Basics of NMR, J. P. Hornak <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/bnmr.htm>
- (24) • Fundamento de química analítica. Skoog, West, Holler, Crouch. Octava edición. 2005.
- (25) • Química analítica cuantitativa. Day & Underwood. Quinta edición. 1989.
- (26) • Análisis química cuantitativo. Harris. Segunda edición. 2001
- (27) • Principios de análisis Instrumental. Skoog, Holler & Nieman. Quinta edición. 2001.
- (28) "Fundamentos de Química Analítica", D.A. Skoog, D.M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, 8° Ed. Paraninfo, 2005.

- (29) "Análisis Química Cuantitativo" D. Harris. 3° Ed. reverté, 2006.
- (30) "Principios de Análisis Instrumental" D. Skoog, J. Holler, T. Nieman. Ed. Mc Graw-Hill, 5° Ed., 2000.
- (31) "Métodos Instrumentales de análisis" H. H. Willard, L. L. Merritt, J. A. Dean y F. A. Settle 1992, Grupo Ed. Iberoamericana
- (32) "Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica" J. M. García-Segura, J. G. Gavilanes, A. Martínez del Pozo, F. Montero, M. Oñaderra, F. Vivanco 4° ed. Síntesis 2008.
- (33) "Equilibrio y Análisis Químico" R. W. Ramette Ed Fondo educativo Interamericano 1983.
- (34) "Instrumental Methods of Chemical Analysis" G. W. Ewing. Ed Mc Graw-Hill. 1960.
- (35) "Análisis Instrumental" K. A. Rubinson y J. F. Rubinson Ed Prentice Hall.
- (36) "Métodos Instrumentales de Análisis en Qca Clínica" G. J. Bender Ed Acirbia 1992
- (37) Chromatographic Methods. BRAITHWAITE, A. y SMITH, F.J., "", 5h ed., Chapman & Hall, London, 1996.
- (38) Capillary electrochromatography. Ed. Keith D. Bartle, Peter Myers. Cambridge, U.K. : Royal Society of Chemistry, 2001
- (39) Cromatografía y electroforesis en columna. DABRIO M.V. "" Springer, Barcelona 2000
- (40) Técnicas de Separación en Química Analítica. R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais. Editorial Síntesis. 2002

#### **Bibliografía de consulta:**

- (1) <http://www.organicworldwide.net/infrared.html>
- (2) <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.html>
- (3) Experimental Organic Chemistry. Daniel Palleros. John Wiley & Sons. **2000**
- (4) Pesticide Analytical Manual. Volume 1. Chapter 5, 6. Federal Drug Administration (accesible en forma gratuita en <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>)
- (5) • 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>)
- (6) • Experimental Organic Chemistry. Daniel Palleros. John Wiley & Sons. 2000.
- (7) • The Basics of NMR, J. P. Hornak <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/bnmr.htm>
- (8) • Fundamento de química analítica. Skoog, West, Holler, Crouch. Octava edición. 2005.
- (9) • Química analítica cuantitativa. Day & Underwood. Quinta edición. 1989.
- (10) • Análisis química cuantitativo. Harris. Segunda edición. 2001
- (11) • Principios de análisis Instrumental. Skoog, Holler & Nieman. Quinta edición. 2001.

#### **Modalidad de dictado**

- Presentación de conceptos generales y ejemplos seleccionados por parte de los docentes en clases teórico-prácticas.
- Análisis de situaciones – problemas por los docentes en clases.
- Análisis y resolución de guías de problemas por los alumnos, en forma individual y/o en grupos, dentro y fuera del horario de clases.
- Discusión con los docentes en forma individual (consultas) o colectivas de los problemas resueltos, en horario de clase y en horarios adicionales de consultas.
- Ejecución de trabajos prácticos de laboratorio (en horario de clase de problemas) individualmente o en grupos, sobre la base de guías de TP e indicaciones de los docentes.

- Presentación de informes de los trabajos prácticos de laboratorio.
- Preparación de un seminario por parte de los alumnos sobre temas seleccionados del Programa Analítico. Los temas se elegirán a mediados del cuatrimestre y los alumnos realizarán un trabajo de búsqueda bibliográfica fuera del horario de clases, bajo la guía y supervisión de los docentes.
- Lectura de bibliografía por parte de los alumnos en horarios extra-clases, sobre la base de las recomendaciones docentes

#### **4. Material disponible, régimen de cursada y evaluación.**

Se encontrarán disponibles para los alumnos el siguiente material:

- Filminas de las teóricas
- Guía de problemas
- Tablas de datos
- Guía de laboratorio

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.

Todo este material se encontrará disponible en la página:

<https://sites.google.com/site/taiunaj/>

#### **Régimen de aprobación**

La evaluación se efectuará a través de dos 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 14 puntos entre los dos parciales, y no menos de seis puntos en cada uno de ellos. Si hubiera sacado menos de seis puntos en cualquiera de los dos 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%.