

PREGUNTAS DE EXAMEN

MÉTODOS ANALÍTICOS

TEÓRICO 1: CALIDAD	2
TEÓRICO 2: TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	7
• LUMINISCENCIA	7
• RMN: RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.....	11
• ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	22
• ESPECTROSCOPIA RAMAN	27
TEÓRICO 3: TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	33
TEÓRICO 4: TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.....	43
• TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS	43
• BIOSENSORES	47
TEÓRICO 5: TÉCNICAS AVANZADAS DE ANÁLISIS	62
• ANÁLISIS POR INYECCIÓN DE FLUJO (FIA)	62
• ELECTROFORESIS CAPILAR	68
• AUTOMATIZACIÓN Y MINIATURIZACIÓN	76
TEÓRICO 6: INMUNOENSAYOS.....	77
TEÓRICO 7: TÉCNICAS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN	83

LAS RESPUESTAS FUERON REALIZADAS POR ESTUDIANTES, PUEDEN CONTENER ERRORES, SER INEXACTAS, IMPRECISAS O ESTAR INCOMPLETAS. COMPROBAR SIEMPRE LA INFORMACIÓN QUE LEA.

Respuestas en **Rojo**: Respuestas de Exámenes parciales, finales, recuperatorios o EUIs.

Respuestas en **Azul**: Respuestas de ejercicios que fueron extraídos de otros sitios.

TEÓRICO 1: CALIDAD

PREGUNTA 1:

a) Comente las etapas del proceso analítico, diferenciando el método analítico y el principio analítico.

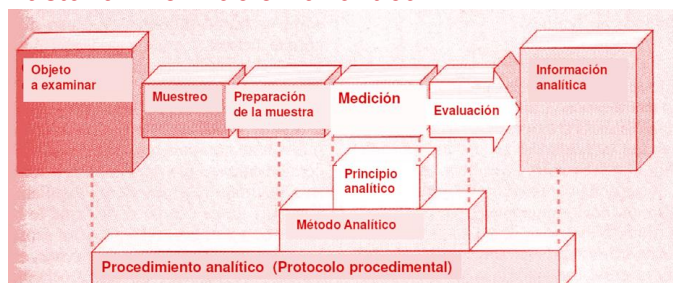
Las etapas del proceso analítico son:

- Definir el problema: Se parte de una problemática inicial, por ejemplo, la cuantificación de un analito en una muestra problema.
- Muestreo: Se toma una porción de la muestra a ser tratada que debe ser representativa. En este paso también se elige el tipo de método analítico adecuado a emplear.
- Preparación de la muestra: En este paso se prepara la muestra para que esté en forma correcta para su análisis según la metodología elegida. Por ejemplo, determinar el estado de agregación que debe tener el mismo, condiciones del medio, etc.
- Medición: Se realiza la medición analítica en sí de la muestra preparada.
- Evaluación: Se evalúa la medición teniendo en cuenta patrones de referencia, y pasar los datos obtenidos a un valor numérico para una mejor interpretación.
- Información analítica: Se obtiene una respuesta que puede dar con la solución al problema, para ello se usan programas estadísticos para manejar los datos obtenidos.

El método analítico conforma los pasos de "Preparación de muestra", "Medición" y "Evaluación". Por ejemplo, si se usa un método de espectroscopía de masas, la preparación de la muestra tiene que ser de tal forma, la medición se hace de una forma determinada (bombardeo de electrones, etc), y los datos obtenidos son específicos de esa metodología (espectro de masas per se)

El principio analítico conforma el paso de "Medición", ya que es en este paso en donde se aplica el fundamento de la técnica para un fin, que puede ser cuantificación o identificación, dependiendo de lo que se quiera lograr.

Esto no lo pide, pero el procedimiento analítico es todo el protocolo procedimental, desde el objeto a examinar, hasta la información analítica.



b) Defina Calidad y trazabilidad.

- **Calidad**: Se refiere a un conjunto de propiedades de una cosa que permite valorarla respecto a otras de la misma especie.
- **Trazabilidad**: La trazabilidad es la capacidad de rastrear todos los procesos, desde la adquisición de materias primas hasta la producción, consumo y eliminación, para poder aclarar "cuándo y dónde fue producido, qué y por quién".

c) Dada la siguiente curva de calibrado lineal de Fluorescencia:

$$F=0,004 + 1,5^4 C$$

donde C es la concentración de analito analizado y sabiendo que la desviación estándar (S_B) de 25 mediciones del blanco es 0,001; **Calcule el LOD** (límite de detección) **y el límite inferior de rango dinámico (útil) lineal**.

El límite de detección LOD o concentración límite (CL) se calcula siguiendo la siguiente fórmula: $LOD=CL= k \times S_{bl} / m$

siendo k el número de veces que hay que multiplicar la desviación estándar para que el resultado sea considerado aceptable, en caso del LOD $k=3$. Y S_{bl} la desviación estándar del blanco, y "m" es la pendiente de la función lineal, en este caso es 1,54

Entonces reemplazando obtenemos:

$$LOD=3 \times 0,001 / 1,54 = 5,926 \times 10^{-4} \text{ [unidad de concentración]}$$

El límite de inferior de rango dinámico (útil) lineal hace referencia al límite de cuantificación LOQ, se calcula usando la siguiente fórmula:

$$LOQ=CQ=k \times S_{bl} / m$$

siendo k un el número de veces que hay que multiplicar la desviación estándar para que el resultado sea considerado aceptable, en caso del LOQ $k=10$. Y S_{bl} la desviación estándar del blanco, y "m" es la pendiente de la función lineal, en este caso es 1,54

$$LOQ=10 \times 0,001 / 1,54 = 1,975 \times 10^{-3} \text{ [unidad de concentración]}$$

¡Acordarse que los LOD y LOQ tienen unidades de concentración!

PREGUNTA 2:

Defina:

a) Patrón primario: *Es una sustancia que es usada como referencia durante procesos de valoración o estandarización que NO es necesario referirlo a otros patrones, ya que está asociado a las mayores cualidades metrológicas. Obtener estos patrones suele ser bastante costoso y laborioso.*

b) Patrón de referencia: *Son sustancias de altas cualidades metrológicas en una organización, y es usada por la misma en sus mediciones de laboratorio (laboratorio de referencia). Para conseguirlos se usa un patrón primario.*

c) Patrón de trabajo: *Es la sustancia calibrada a partir de un patrón de referencia que es usado rutinariamente, son los patrones usados en, por ejemplo, laboratorios clínicos.*

d) Trazabilidad: *Hace referencia a la capacidad de rastrear todos los procesos, desde la adquisición de materias primas hasta la producción, consumo y eliminación, para poder aclarar "cuándo y dónde fue producido qué y por quién".*

e) Dada una curva de calibración lineal, explique cómo determina:

i. El **límite de detección** (LOD) si midió blancos.

Si se midió un blanco, el LOD es aquella concentración cuya señal se diferencie de la señal del blanco en 3 veces su desviación estándar. Para esto se usaría la ecuación:

$$C_L = k \times S_{bl} / m = LOD$$

Siendo C_L la concentración en el límite de detección, $k=3$ (número de veces que se tiene que multiplicar la desviación estándar), s_{bl} la desviación estándar del blanco, y m es la pendiente de la calibración lineal.

ii. El **límite de detección** (LOD) si no midió blancos.

Cuando no se calcularon las desviaciones estándar de los blancos, se usa la desviación de los residuales de los cuadrados mínimos. Esto se puede usar para calcular tanto el LOD como el LOQ.

iii. El intervalo lineal de calibración (rango útil).

Es aquel que está comprendido entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de respuesta lineal (LOL).

PREGUNTA 3:

Para un método de calibración lineal Señal vs Concentración:

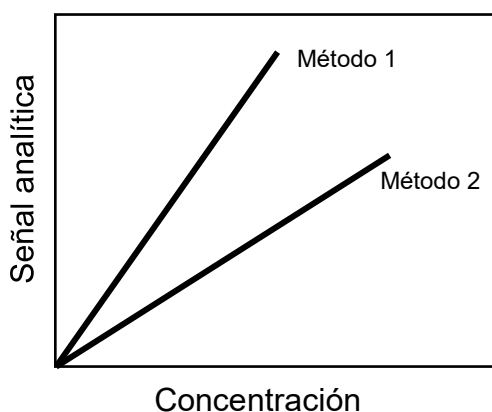
a) Defina rango útil.

Rango útil: *El rango útil es un rango de concentraciones que son las que van a ser utilizadas para realizar una curva de calibración. Está definido entre el límite de cuantificación LOQ y el límite de respuesta lineal LOL.*

b) Cómo calcularía el límite de detección a partir del rango útil.

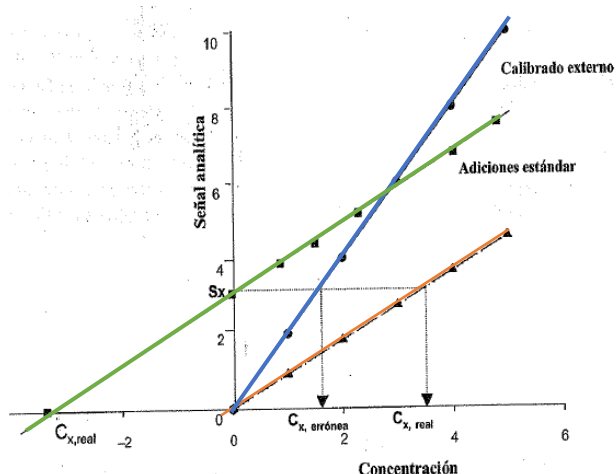
Vería cual es el valor de menor concentración del LOQ, y a ese valor lo multiplicaría por 0,3. (por la relación entre las k de LOD y LOQ)

f) Dado el siguiente gráfico que compara de forma cualitativa dos métodos de cuantificación, explique cuál método es más sensible.



El método más sensible será aquel que tenga mayor pendiente, en este caso el método 1. Porque para un mismo de concentración, la diferencia de señal será más grande. Es decir que, para detectar una determinada concentración de analito en una muestra, el método con mayor pendiente tendrá una señal mayor.

Adiciones estándar:



En **naranja** se muestra la curva que se obtiene para una muestra que se quiere medir que está en una determinada matriz. Si hago un calibrado externo, uso una muestra patrón y la pongo en un buffer, se obtiene la curva **azul**. Esta diferencia de pendientes indica que en la matriz de la muestra problema hay sustancias o componentes que están haciendo que la señal que se tiene no sea muy alta y están interfiriendo, pero tampoco se pueden eliminar. Entonces se aplica el método de **adiciones estándar**.

Para una muestra X que se quiere analizar, se toma la misma porción de esa muestra, a la cual se le realizan distintos agregados del analito estándar. Con esto se obtiene la curva **verde** (la cual tiene la misma pendiente de que la curva naranja), donde sabemos que cada punto tiene la concentración que quiero determinar sumado a lo que le agregué del

estándar. Entonces mediante extrapolación se puede obtener el valor de concentración real de la muestra X, siendo el valor absoluto de la raíz en la extrapolación de esta curva.

Otros conceptos:

Validación: Se define como el conjunto de pruebas utilizadas para establecer que un método es apropiado para un determinado propósito.

Validar: consiste en establecer una evidencia documentada que permita asegurar la consistencia de un procedimiento, a partir del cual se pueda obtener un producto que satisfaga de manera consistente las especificaciones de calidad predeterminadas por el productor.

Evaluación externa de la calidad: Programa en el cual una institución externa provee muestras desconocidas para su análisis. Los resultados son remitidos a los laboratorios participantes con una evaluación de rendimiento: “aceptable o no aceptable”.

Evaluación externa: Complemento del control interno No preventivo, detecta errores después de emitidos los resultados. Detecta **imprecisión** interlaboratorios. Detecta **inexactitud** interlaboratorios. Sus beneficios son: Ayuda a detectar errores en los métodos empleados. Detecta errores en la calibración. Estabilidad de los materiales empleados. Defectos en el control interno. Sugerencias para tomar medidas correctivas. Compararse con otros laboratorios.

EUI: PREGUNTA 1:

a) Defina Calidad:

Propiedad inherente que permite la caracterización y valoración de algo con respecto al resto. Conjunto de propiedades inherentes a una cosa que permite caracterizarla y valorarla con respecto a las restantes de su especie.

b) Defina calibrador y características de un calibrador:

El calibrador posee un valor asignado que tiene una trazabilidad con un patrón. El fabricante debe darnos una carta en donde diga la trazabilidad. Este se utiliza para estandarizar el método y nos permite calcular los valores de las muestras.

Características:

- *Concentración del analito en rangos similares a los medidos*
- *Estabilidad (temperatura, fecha de caducidad)*
- *Matriz similar a la utilizada por el analito (suero, acuosa)*
- *Presentación (líoofilizado, líquido)*
- *Condiciones para almacenarlo*

c) A partir de curvas de calibración lineales para la determinación por fluorescencia del compuesto A cuatro laboratorios obtuvieron los siguientes parámetros:

Laboratorio	s del blanco	Pendiente de la recta (mL/ng)
1	0,0079	1,80
2	0,0094	1,70
3	0,0084	1,90
4	0,0065	1,70

i) ¿Qué laboratorio obtuvo la mejor sensibilidad de calibración? **J.S.R.**

El que obtuvo la mejor sensibilidad en la calibración es el laboratorio 3. Esto es porque la sensibilidad de una curva de calibración está dada por la pendiente de la recta, es por esto que el laboratorio 3, al tener mayor pendiente, va a tener más sensibilidad (y, por ende, el laboratorio 2 y 4 los que tienen menos sensibilidad en la calibración)

ii) ¿Qué laboratorio obtuvo el mejor LOD? **J.S.R.**

El laboratorio que tenga mejor LOD es aquel que tenga el valor más bajo del mismo, ya que es capaz de detectar el compuesto "A" a menores concentraciones. Para esto habría que calcular LOD para cada laboratorio:

Laboratorio 1: $LOD = 3 \times 0,0079 / 1,80 = 0,01316 \text{ mL/ng}$

Laboratorio 2: $LOD = 3 \times 0,0094 / 1,70 = 0,01658 \text{ mL/ng}$

Laboratorio 3: $LOD = 3 \times 0,0084 / 1,90 = 0,01326 \text{ mL/ng}$

Laboratorio 4: $LOD = 3 \times 0,0065 / 1,70 = 0,01146 \text{ mL/ng}$

El laboratorio que tiene mejor LOD es el "Laboratorio 4", porque es capaz de detectar el compuesto A en una mejor concentración.

EUI: PREGUNTA 2:

a) Defina validación de un método analítico.

Validación se define como el conjunto de pruebas utilizadas para establecer que un método es apropiado para un determinado propósito. Validar las técnicas analíticas permiten conocer si las mismas son apropiadas para el análisis del sustrato a identificar y/o cuantificar, además de brindar información acerca de la precisión y exactitud inherente al método en estudio.

b) Dado un conjunto de datos señal vs concentración: ¿Qué es lo primero que debe realizar antes de calcular algún parámetro?

Primero se deben graficar los datos para poder determinar el rango lineal de la calibración. Una vez determinado el rango lineal, se toman en cuenta aquellos datos que entran en ese rango lineal para realizar posteriores cálculos.

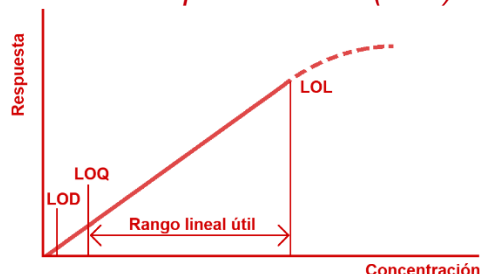
c) Dada una curva de calibración lineal explique cómo determina el límite de detección y cómo el rango lineal útil.

El límite de detección (LOD) de una curva de calibración lineal hace referencia a la mínima señal que se puede detectar sin considerarla parte del blanco. Se da por señal límite a cuya señal se diferencie de la señal del blanco en 3 veces su desviación estándar.

$$LOD = s_{bl} \times 3 \div m$$

Siendo s_{bl} La desviación estándar del blanco y m la pendiente de la curva de calibración lineal.

El rango lineal útil se determina como el rango entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de respuesta lineal (LOL)



EUI: PREGUNTA 3:

Sabiendo que la curva de calibración para la determinación espectrofluorimétrica de una proteína es $F = 2,731 x + 0,008$ en donde x es la concentración en mg L^{-1} y sabiendo que el rango lineal (o rango útil) determinado para el método fue entre 0,17 y 3,5 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$

a) Indique o calcule (de ser necesario):

i) La sensibilidad de calibración. *Corresponde a la pendiente: 2,731*

ii) El límite de detección. $LOD = 3 \times s_{bl} / m = 0,051 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$

iii) El límite de cuantificación. $LOQ = \text{Límite menor del rango útil} = 0,17 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$

iv) La desviación estándar del blanco. *0,0464*

TEÓRICO 2: TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

• LUMINISCENCIA

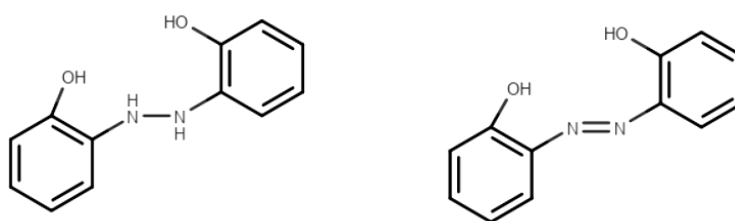
PREGUNTA 1:

a) A que se denomina desplazamiento de Stokes en los métodos fotoluminiscentes y en qué tipos de sistemas se observa.

El corrimiento de Stokes hace referencia al incremento en la longitud de onda (λ) en las bandas de excitación con respecto a las de emisión. Este desplazamiento se observa en aquellos sistemas no tengan fluorescencia de resonancia, ya que en estos casos la λ de emisión y de excitación es la misma.

b) Cuál de los siguientes compuestos de cada grupo es de esperar que tenga mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y porqué, J.S.R. Además, en el caso del **Grupo II** ordénelos de mayor a menor fluorescencia.

Grupo I:



Grupo II: Iodobenceno, Fenol, Fluorobenceno, Bromobenceno y Clorobenceno.

Grupo I: *El compuesto de la derecha es esperable que tenga mayor rendimiento cuántico de fluorescencia que el compuesto de la izquierda, esto es por que presenta un doble enlace N=N que le confiere una mayor rigidez estructural, al ser más rígida, la molécula puede acomodarse menos espacialmente al chocar con otras moléculas (del solvente, por ejemplo) y tendrá menor pérdida de energía por conversiones externas, teniendo más posibilidades de liberar energía mediante la liberación de un fotón.*

Grupo II: *En este caso todos los compuestos son benceno con algún sustituyente, entonces el fenol es esperable que tenga mayor rendimiento cuántico que los otros, ya que el grupo -OH es un grupo donador de electrones que favorece la fluorescencia, mientras que los otros sustituyentes son halógenos que son aceptores de electrones. Además, por efecto de átomo pesado tendrán menos fluorescencia.*

Orden: Fenol > Fluorobenceno > Clorobenceno > Bromobenceno > iodobenceno

PREGUNTA 2:

De acuerdo con los conceptos de luminiscencia:

a) Explique por qué algunos compuestos capaces de absorber radiación fluorescen mientras que otros no lo hacen.

Porque solamente podrán fluorescer aquellos compuestos capaces de absorber energía y llegar a un nivel electrónico excitado, en el cuál la ruta de liberación de energía más rápida sea la de la liberación de energía por emisión de un fotón.

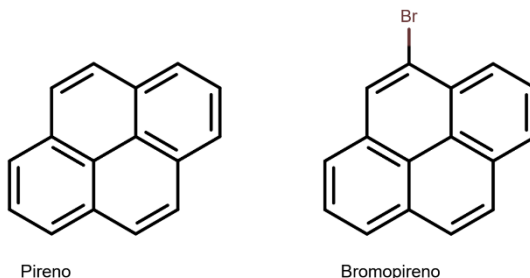
b) Describa las características de los compuestos orgánicos capaces de fluorescer.

Los compuestos orgánicos capaces de fluorescer son aquellos que presentan que presentan anillos aromáticos con electrones deslocalizados, mientras más deslocalizado más fluorescencia. También en aquellos compuestos capaces de generar transiciones $\pi^ \rightarrow \pi$.*

c) Explique por qué la fluorescencia molecular ocurre comúnmente a una longitud de onda más grande que la radiación de excitación.

Esto es porque cuando la molécula se encuentra en estado excitado tiende a perder energía por varias vías además de la fluorescencia, como pueden ser conversiones externas o internas, relajaciones vibracionales o choques con otras moléculas, esta pérdida de energía se ve reflejado como una menor frecuencia, es decir una mayor longitud de onda de emisión.

d) Indique cuál de las siguientes moléculas emitirá mayor fosforescencia y porqué: pireno o bromopireno.



En este caso el bromopireno emitirá mayor fosforescencia. Si bien el bromo es un átomo pesado que produce una disminución de la fluorescencia, es un grupo que ayuda a que suceda el cruce entre sistemas, y por ende que tenga más fosforescencia.

PREGUNTA 3:

Explique:

a) ¿Por qué para una molécula orgánica la longitud de onda de emisión fluorescente es mayor que la longitud de onda de excitación?

Porque luego de la excitación de la molécula orgánica, esta para perder energía realiza procesos de conversiones internas y externas, relajaciones vibracionales, etc, estos procesos de pérdida de energía llevan consigo un aumento en la longitud de onda. Esto sucede en todos los casos de fluorescencia excepto la fluorescencia de resonancia.

b) ¿Por qué la longitud de onda de emisión fosforescente es mayor que la fluorescente?

Porque para que una molécula sea fosforescente tiene que realizar un proceso llamado "Cruce entre sistemas", el cual consiste en el pasaje del estado de menor nivel energético del estado electrónico excitado S1 a un nivel vibracional del estado de triplete excitado (T1) donde se realiza un cambio de spin. En este proceso de cruce entre sistemas la energía baja y por ende la longitud de onda aumenta.

Comente:

c) Las condiciones estructurales y de medio que favorecen la emisión fluorescente.

Condiciones estructurales:

Moléculas que tengan dobles enlaces conjugados o compuestos que puedan tener electrones π deslocalizados.

- Moléculas que no tengan átomos voluminosos (principalmente halógenos) tendrán más fluorescencia por efecto del átomo pesado.
- Moléculas más rígidas tendrán serán más fluorescentes, debido a que pueden “acomodarse” menos con otras moléculas y perderán menor energía por conversiones externas.

Condiciones del medio:

- Efecto del pH: Algunas moléculas orgánicas con grupos protonables o deprotonables podrán aumentar o disminuir su fluorescencia dependiendo de cómo sea el pH del medio, el cual cambiará las características de estos grupos. Ej: NH_3 es un grupo donador de electrones que aumenta la fluorescencia, pero en condiciones ácidas este grupo se protona y pasa a NH_4^+ , el cual es un aceptor de electrones y disminuye la fluorescencia.
- Efecto de la temperatura: A menor temperatura las moléculas tendrán menor energía cinética en la solución, por ende, habrá menor probabilidad de pérdida de energía por conversiones externas y mayor probabilidad de fluorescencia.
- Efecto del solvente: Aquellos solventes polares provocarán una disminución en la fluorescencia, mientras que los apolares aumentarán la fluorescencia.
- Viscosidad: Si la viscosidad del medio es mayor, es menos probable que haya eventos de conversión externa, por ende, mayor probabilidad de que haya fluorescencia.

d) Que otra condición favorece la fosforescencia.

La presencia de grupos halógenos favorece la fosforescencia, pero provocan una disminución de la fluorescencia por efecto del átomo pesado.

Escriba:

e) Un proceso quimioluminiscente genérico.



Siendo C^ una molécula con exceso de energía, y $h\nu$ la energía que libera C en para llegar al estado basal en forma de un fotón de luz (fluorescencia)*

f) Un reactivo quimioluminiscente.

Luciferasa.

EUI PREGUNTA 1:

a) Una solución 5,0 mM de un compuesto aromático (A) presenta una absorbancia de 0,500 a su longitud de onda de máxima absorción (420,0 nm). Para realizar su análisis por espectrofluorimétrica, **responda**:

i) ¿Cuál sería la longitud de onda de excitación?

La longitud de onda de excitación es 420,0 nm, que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del compuesto A.

ii) ¿En qué concentraciones debe trabajarse y por qué?

La absorbancia multiplicada por 2.3 no puede ser mayor a 0.05. Absorbancias mayores no van a cumplir con la linealidad y tendremos desviaciones. En este caso debe trabajarse a concentraciones menores a 0.022 mM.

iii) ¿A partir de qué longitud de onda se deben tomar las mediciones?

Las emisiones deben ser tomadas a longitudes de onda mayores a 420 nm. Esto se debe al desplazamiento de Stokes, donde las longitudes de onda de emisión serán mayores debido a que la molécula pierde energía a través de las relajaciones vibraciones.

b) ¿Cómo podría detectar ácido úrico por fluorescencia?

El ácido úrico puede ser detectado mediante quimioluminiscencia. Para esto se lo hace reaccionar con oxígeno y una enzima oxidasa para obtener alantoína. La alantoína es un

compuesto que es capaz de fluorescer, entonces se podría medir la fluorescencia a longitudes de onda mayores a la longitud de onda de emisión.

EUI PREGUNTA 2:

Una solución 50,0 mM de un compuesto aromático (A) presenta una absorbancia de 0,450 a su longitud de onda de máxima absorción (340,0 nm). Para realizar su análisis por espectrofluorimetría, responda:

a) ¿En qué concentraciones debe trabajarse y por qué?

La Absorbancia multiplicada por 2,303 no debe ser mayor a 0,05. En este caso da:

$$A \times 2,303 = 0,450 \times 2,303 = 1,036 \rightarrow 1,036 > 0,05$$

$$1,036 - 50,0 \text{ mM}$$

$$0,05 - x = \mathbf{2,41 \text{ mM}}$$

Se deben trabajar a concentraciones menor a 2,41 mM, ya que, si se trabajan a concentraciones mayores, las señales de absorbancia obtenidas saldrán de la linealidad y no podrán ser utilizadas para cuantificación.

b) ¿Cuál sería la longitud de onda de excitación?

La longitud de onda de excitación es de 340,0 nm.

c) ¿A partir de qué longitud de onda se deben tomar las emisiones?

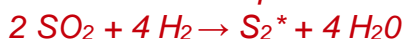
A partir de longitudes de onda mayores a 340,0 nm, ya que las longitudes de onda de emisión pueden tener corrimientos de Stokes hacia mayores longitudes de onda.

d) ¿Que sustituyente debería tener un compuesto derivado de A para presentar fosforescencia?

Los compuestos que tengan sustituyentes pesados como el Iodo o Bromo van a favorecer el cruce entre sistemas, lo que favorece la fosforescencia. Las especies paramagnéticas también mejoran el cruce entre sistemas, lo que en consecuencia disminuye la fluorescencia.

e) ¿Como podría detectar SO por luminiscencia?

A través de quimioluminiscencia, es decir excitación por una reacción química en donde la intensidad depende de la velocidad de reacción química. Se haría la siguiente reacción:



• RMN: RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

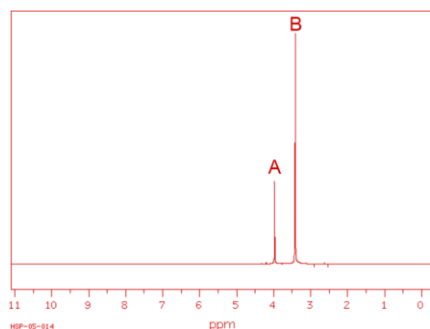
PREGUNTA 1:

De acuerdo con los conceptos de RMN:

a) Indique de qué depende la frecuencia de absorción de un determinado núcleo en RMN.

La frecuencia de absorción de un núcleo de RMN depende grado de apantallamiento que posea, por ejemplo, el apantallamiento de un protón de un grupo hidroxilo será menor que el de un protón de un grupo metilo, al estar menos apantallado absorberá un campo más bajo que los protones de un grupo metilo.

b) Prediga el espectro RMN de ^1H del metanol.

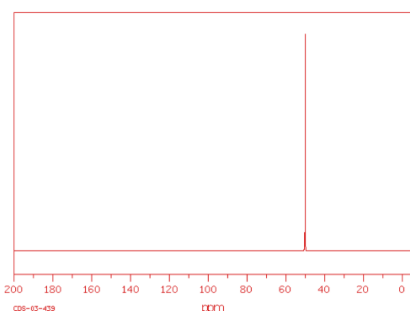


	(B)	(A)
	CH_3	—OH
Assign.	A	B
Shift(ppm)	3.97	3.417

El espectro de RMN- ^1H del metanol presentaría dos bandas, una correspondiente a los protones del metilo en forma de singlete con integración de 3H, y otra correspondiente al protón del grupo hidroxilo en forma de singlete con integración de 1H, siendo esta última señal la que salga a campos más bajos (más a la izquierda) y por lo general las señales de los grupos -OH y NH suelen ser más anchas en el caso de que aparezcan.

Espectro extraído de: <https://sdbs.db.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbno=3302>

c) Prediga el espectro RMN de ^{13}C desacoplado de protón del metanol.



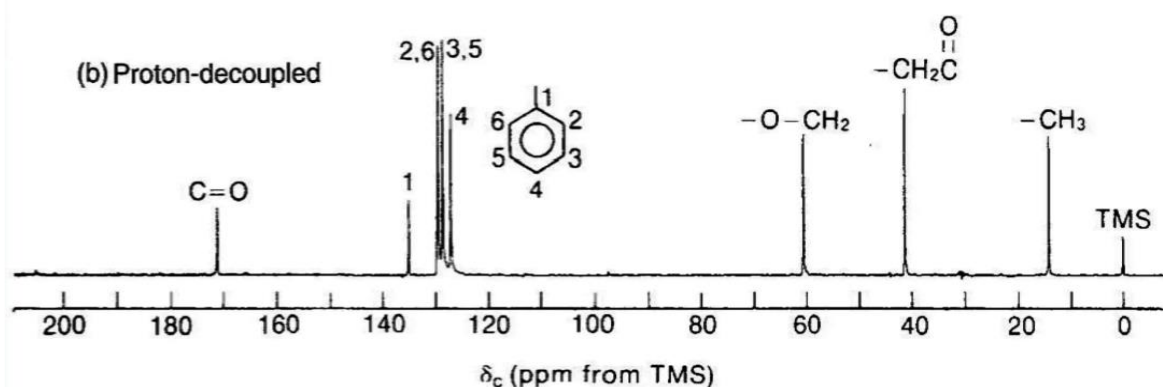
	CH_3	—OH
ppm	50.05	
Int.	1000	
Assign.	1	

En el caso del espectro de RMN- ^{13}C del metanol se esperaría que tuviera una sola banda debido a que tiene un solo carbono, esta banda estaría aproximadamente a los 50ppm, cerca del TMS.

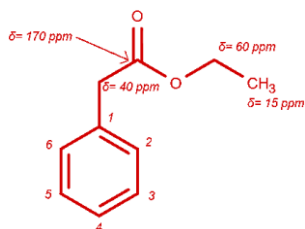
Espectro extraído de: <https://sdbs.db.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbno=3302>

PREGUNTA 2:

a) Dado el siguiente espectro de RMN- ^{13}C desacoplado de ^1H , dibuje el espectro no desacoplado de ^1H justificando su respuesta para cada una de las señales.



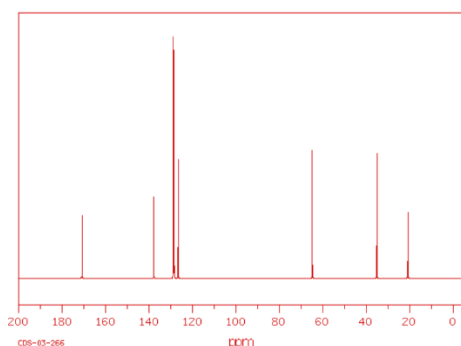
Primero habría que deducir la estructura química de la molécula a partir de las señales del espectro de ^{13}C .



Molécula: Etil fenilacetato

Espectro: <https://sdb.sdb.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbno=2282>

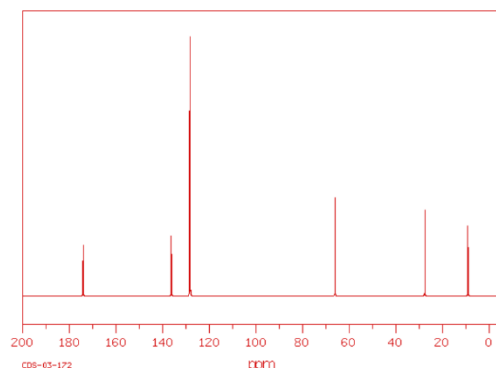
Otra posible molécula



ppm	Int.	Assign.
170.80	259	1
137.86	338	2
128.88	1000	3
128.50	945	4
126.56	493	5
64.88	532	6
35.12	517	7
20.83	274	8

El fenil etilacetato tiene una estructura que puede coincidir con el gráfico del enunciado, es más, tiene hasta un espectro muy parecido.

Otra posible molécula es el bencil propionato



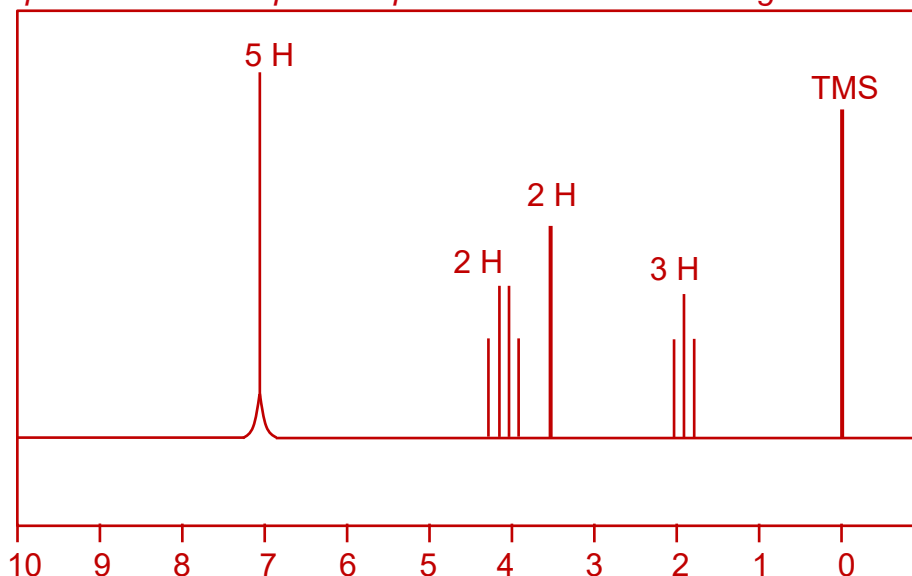
ppm	Int.	Assign.
174.12	195	1
136.28	230	2
128.55	710	3
128.17	1000	4
66.08	380	5
27.57	330	6
9.10	270	7

Este compuesto tiene un espectro RMN^{13}C bastante parecido también, ya que cambia nomás el oxígeno del carboxilo.

Con la estructura de la molécula va a ser más fácil realizar un espectro aproximado de ^1H :

- **Señal a los $\delta=7$ ppm:** Singlete correspondiente a la señal de los protones aromáticos, que suelen tener este desplazamiento a campo bajo. Integra para 5H. Corresponde a la señal de $\delta=130$ ppm en el espectro de RMN^{13}C .
- **Señal a los $\delta=4,1$ ppm:** Cuartete correspondiente a los hidrógenos del carbono que está unido al oxígeno del acetato. Integra para 2H. Tiene más desplazamiento debido a estar cerca de un átomo de oxígeno. Corresponde a la señal de $\delta=60$ ppm en el espectro de RMN^{13}C .
- **Señal a los $\delta=3,6$ ppm:** Singlete correspondiente a los hidrógenos del carbono que está unido al grupo carbonilo y a su vez al anillo aromático. Integra para 2H. Corresponde a la señal de $\delta=40$ ppm en el espectro de RMN^{13}C .
- **Señal a los $\delta=2$ ppm:** Triplete correspondiente a los hidrógenos del CH_3 , al estar más alejado del átomo de oxígeno tendrá un campo más alto. Corresponde a la señal de $\delta=15$ ppm en el espectro de RMN^{13}C .

Con todo esto podríamos decir que el espectro de RMN¹H sería algo así:



b) ¿Por qué el RMN de ¹³C es 6000 veces menos sensible que el ¹H?

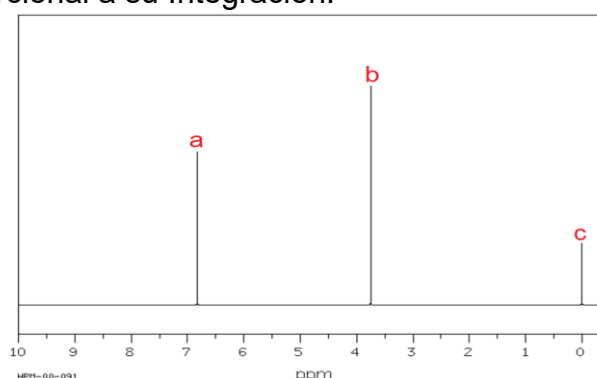
Debido a que hay menor abundancia de ¹³C (aprox 1,1%) con respecto a ¹H (>99%) y por la relación giromagnética 0,702 frente a 2,8 (aproximadamente un cuarto menos).

c) Que información brinda un RMN 2D COSY y cual un ROESY?

- **RMN 2D COSY:** El COSY indica el acoplamiento escalar, es decir que H están acoplados con cual otro.
- **ROESY:** Es útil para determinar qué señales surgen de protones que están cerca uno del otro en el espacio, incluso si no están enlazados. Un espectro ROESY proporciona correlaciones espaciales mediante relajación de espín-espín. ROESY también detecta intercambio químico y conformacional

PREGUNTA 3:

a) El compuesto C₈H₁₀O₂ tiene el siguiente espectro de RMN-¹H. Indique que compuesto se trata justificando su respuesta en base a los corrimientos químicos, la multiplicidad e integración de cada una de las señales. Tome la intensidad de la señal como aproximadamente proporcional a su Integración.



En el espectro RMN se observan 3 picos bien diferenciados entre sí, los cuales se les dio el nombre de "a", "b" y "c" para facilitar la explicación:

- **Señal "c":** La señal "c" tiene un corrimiento igual a 0, entonces este pico es el correspondiente al del compuesto TMS.
- **Señal "a":** La señal "a" tiene un corrimiento de aproximadamente 7, este es el corrimiento característico de los protones de anillos aromáticos. Como su multiplicidad es un singlete, esto quiere decir que los sustituyentes que tenga el anillo

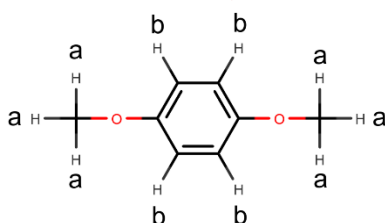
serán algo así como "simétricos", es decir que todos los protones del anillo son equivalentes, por eso se ve como un singlete.

- **Señal "b":** La señal tiene un corrimiento de aproximadamente 4, lo que corresponde al corrimiento de los protones vinílicos que tienen cerca un oxígeno o un halógeno, en este caso la fórmula nos indica que tiene 2 oxígenos.

En cuanto a la integración, la intensidad de la señal del anillo aromático es menor que la de los protones vinílicos, entonces podríamos decir que la señal "a" integra para 4 H y la señal "b" integra para 6H.

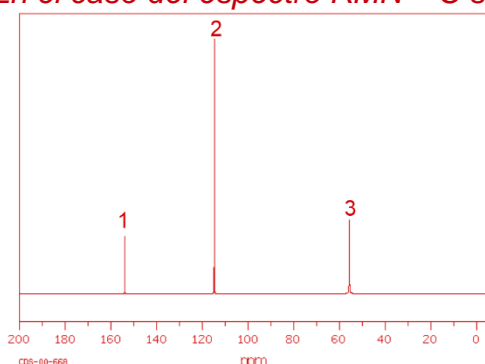
Con esta información podríamos suponer el compuesto del espectro es el

"p-dimetoxibenceno", el cual presenta la siguiente estructura:



b) Cuántas señales presentaría el espectro RMN-¹³C no desacoplado de ¹H para el mismo compuesto.

En el caso del espectro RMN-¹³C se esperaría ver tres señales para este compuesto:



ppm	Int.	Assign.
153.94	224	1
114.76	1000	2
55.68	289	3

Señal 1: Carbono aromático con sustituyente electronegativo (oxígeno)

Señal 2: Carbono aromático.

Señal 3: Carbono vinílico.

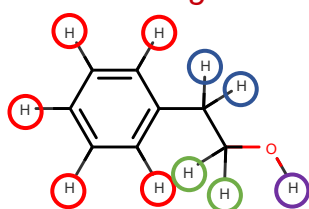
Espectro extraído de: <https://sdbs.db.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbno=1160>

EUI PREGUNTA 1:

El espectro de RMN protónico (RMN¹H) del **hidroxietilbenceno** a temperatura ambiente presenta las siguientes señales en ppm: 3,7; 4,5; 5,5 y 7,3.

a) Asigne cada una de las señales a los protones correspondientes.

Para que sea más fácil asignar las señales, primero se puede graficar la molécula para facilitar la asignación de señales:



- Protones aromáticos (rojos): Señal de 7,3 ppm
- Protones del CH₂ del anillo aromático (azules): Señal de 4,5 ppm
- Protones del CH₂ Al lado del grupo OH (verdes): Señal de 5,5 ppm
- Protón del grupo OH (púrpura): Señal de 3,7 ppm

b) Indique la multiplicidad e integración de cada señal, JSR.

- **Protones aromáticos:** Singlete que integra para un protón. Los protones de bencenos monosustituídos se muestran como singlete.

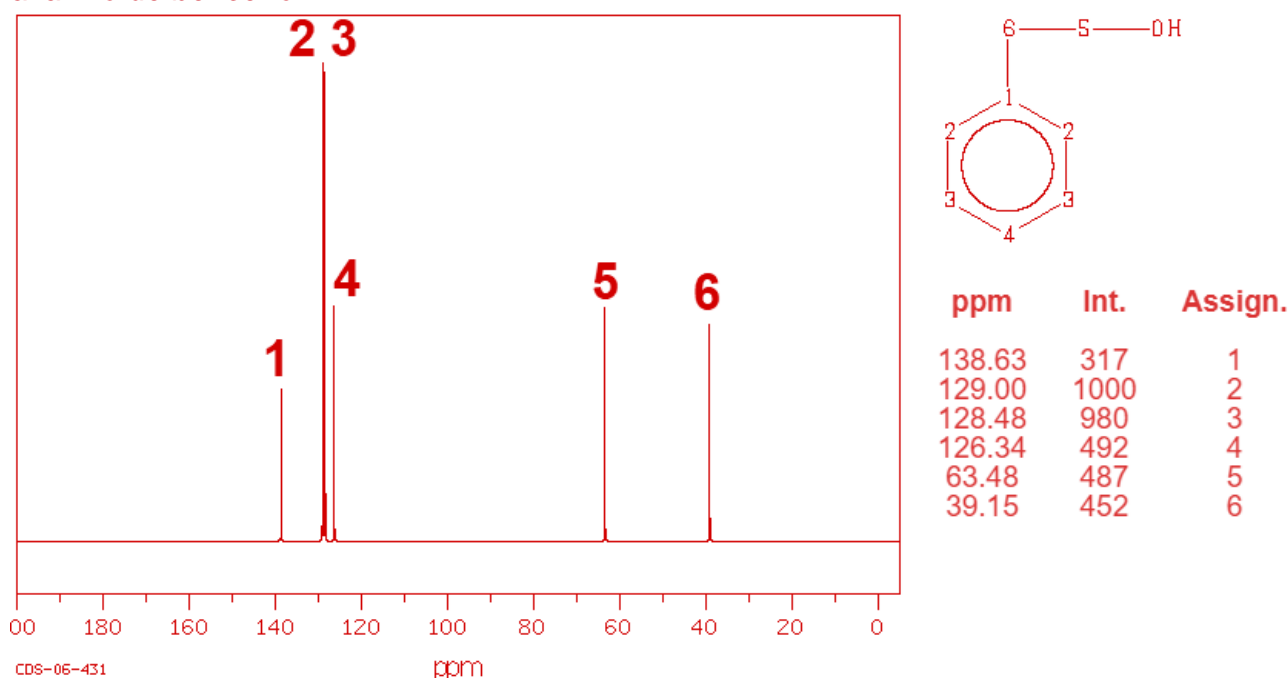
- Protones del CH₂ unido al anillo aromático: Triplete que integra para 2H. Es un triplete porque tiene dos protones vecinos del otro grupo CH₂, la multiplicidad es N° Carbonos vecinos +1, por lo que al ser dos protones vecinos +1 va a ser un triplete (multiplicidad=3)
- Protones del CH₂ unido al grupo OH: Triplete que integra para 2H. Se interpreta de la misma forma que el otro grupo CH₂, pero en este caso el protón del grupo OH no se tiene en cuenta para la multiplicidad, solo los unidos a átomos de carbono.
- Protón del grupo OH: Singlete que integra para 1H. El corrimiento característico de los protones unidos a átomos de oxígeno es de 2-3 ppm, y la señal es un singlete que suele ser ancho (no siempre es así, depende un poco del equipo).

c) Diga que señales cambiarían y cuál sería la multiplicidad a -40°C, JSR.

¿?

d) Cuántas señales tendría el espectro de RMN de carbono desacoplado de protones, JSR. El espectro RMN de carbono desacoplado de protones tendría 6 señales. Cuatro señales correspondientes a los carbonos aromáticos, con un desplazamiento de unos 120 ppm aproximadamente, el carbono aromático donde se encuentra el grupo etanol tendrá un desplazamiento a campos menores, mientras que el carbono que se encuentra en posición para tendrá un desplazamiento a campos más altos.

Las otras dos señales corresponden a los carbonos del grupo sustituyente CH₂CH₂OH. Los cuales tendrán un desplazamiento de unos 60-80 ppm aproximadamente para el CH₂ que esté cerca del grupo OH, y unos 40-50 ppm aproximadamente para el CH₂ que esté unido al anillo de benceno.



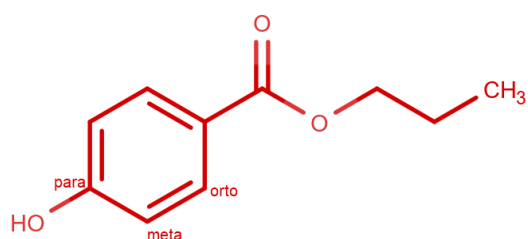
Espectro extraído de: <https://sdbs.db.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbno=2670>

EUI PREGUNTA 2:

El propilparabenceno (para-hidroxibenzoato de propilo) es un fungicida más efectivo contra levaduras que contra hongos.

a) Indique cuantas señales se verían en el espectro RMN protónico, el desplazamiento químico aproximado, la multiplicidad e integración de cada señal.

Primero se podría graficar la estructura química del fungicida para facilitar la asignación de señales.



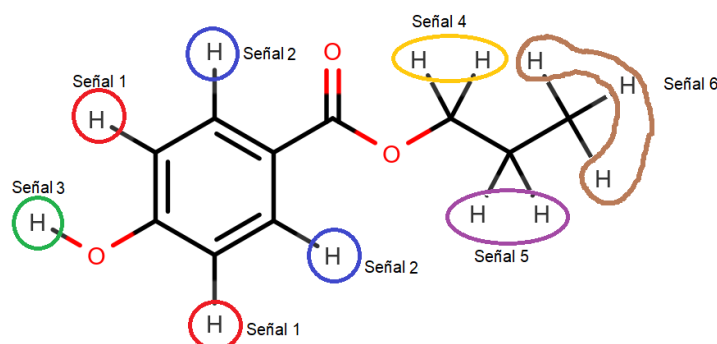
La nomenclatura dice para-hidroxi... , esto nos dice que el anillo de benceno tiene al menos dos sustituyentes:

Un grupo hidroxilo en posición para, como lo dice el nombre, y un grupo carboxilo (benzoato) en la posición opuesta al grupo hidroxilo (porque está en para). Este grupo carboxilo tiene a su vez un

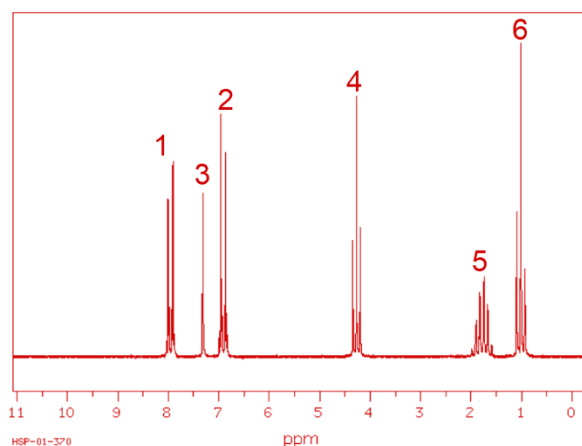
grupo propilo (una cadena de tres átomos de carbono).

Una vez dibujada la estructura química, nos facilitará el asignar las señales:

En el espectro se verían 6 señales:



- **Señal 1:** Corresponde a los dos protones aromáticos (integra para 2 protones) que se encuentran cerca del grupo OH. Tendría una multiplicidad de 2 (doblete) y un desplazamiento de unos 7ppm aprox.
- **Señal 2:** Corresponde a los otros dos protones aromáticos (integra para 2 protones), que se encuentran cerca del grupo sustituyente carboxilo. Tendría una multiplicidad de 2 (doblete) y un desplazamiento de unos 8ppm aproximadamente.
- **Señal 3:** Corresponde al protón del grupo hidroxilo (integra para 1 protón), tendría una multiplicidad de 1 (singlete) y un desplazamiento de unos 7,5 ppm aproximadamente (entre la señal 1 y 2).
- **Señal 4:** Corresponde a los protones del CH₂ (integra para 2 protones) que se encuentran unidos al grupo carboxilo. Tendría una multiplicidad de 3 (triplete) y un desplazamiento de unos 4 ppm aproximadamente.
- **Señal 5:** Corresponde a los protones del CH₂ (integra para 2 protones) que se encuentra al medio del grupo propilo. Tendría una multiplicidad de 6 (multiplete) y un desplazamiento de 2ppm aproximadamente.
- **Señal 6:** Corresponde a los protones del CH₃ (integra para 3 protones) que está más alejado del grupo carbonilo. Tendría una multiplicidad de 3 (triplete) y un desplazamiento de unos 1-1,5 ppm aprox.

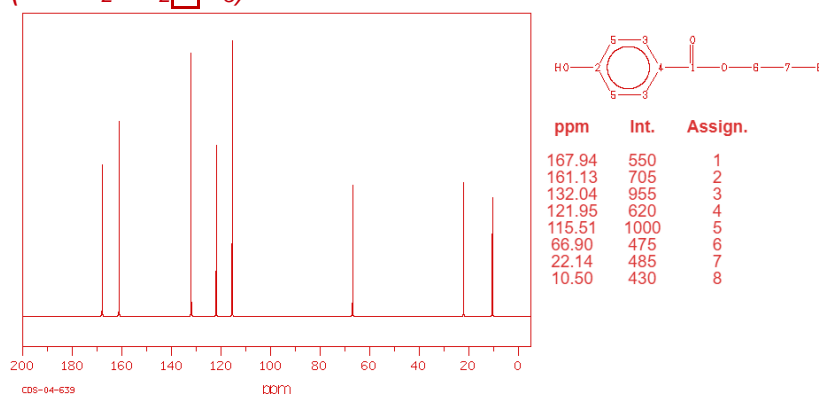


Espectro RMN¹H de para-hidroxibenzoato de propilo. Espectro extraído de SBDS: <https://sdbb.db.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbbno=6704>

b) Indique cuantas señales se verían en el espectro RMN de ¹³C desacoplado de protones indicando el desplazamiento relativo.

Se verían 8 señales:

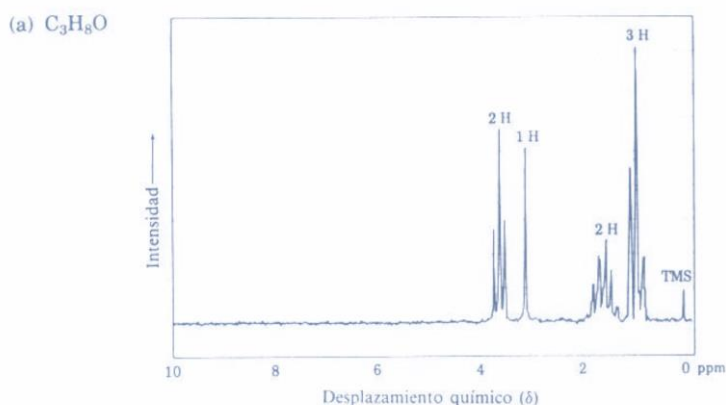
- 4 de esas señales corresponden a los carbonos aromáticos, tendrían un rango de desplazamiento de unos 120 a 160 ppm aproximadamente, siendo el que tiene más desplazamiento el carbono el que tiene el grupo -OH de sustituyente.
- Una señal a unos 180-200 ppm que corresponde al carbono del grupo carbonilo.
- Una señal correspondiente al carbono unido al oxígeno del carbonilo (O-CH₂CH₂CH₃). Tendría un corrimiento de unos 60 ppm aproximadamente.
- Una señal correspondiente al carbono del medio del propilo (O-CH₂-CH₂CH₃). Tendría un corrimiento de unos 40 ppm aproximadamente.
- Una señal correspondiente al carbono más alejado del grupo carbonilo en el propilo (O-CH₂CH₂-CH₃)



Espectro extraído de: <https://sdbb.db.aist.go.jp/CompoundLanding.aspx?sdbbno=6704>

Otros Ejercicios de RMN:

Ejercicio 5: Proponer una estructura para el alcohol de fórmula molecular C₃H₈O y cuyo espectro de RMN de ¹H es el que se indica:



Primero habría que ver el número de insaturaciones para ver si hay dobles enlace:

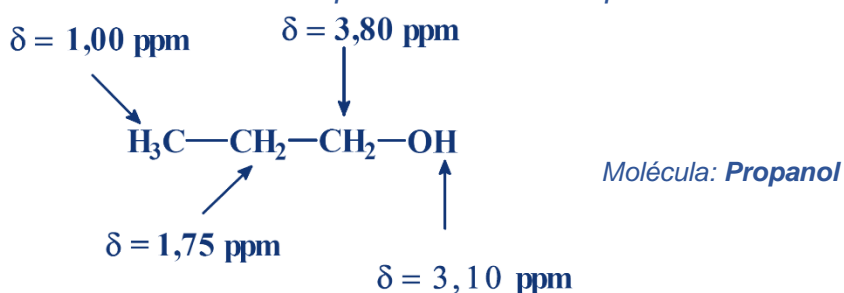
$$n^{\circ} \text{ de insaturaciones} = \frac{2 \times C + 2 - H}{2} = \frac{2 \times 3 + 2 - 8}{2} = 0$$

Al ser 0 el número de insaturaciones, no hay dobles enlace en la estructura

En el espectro se pueden ver cuatro señales distintas:

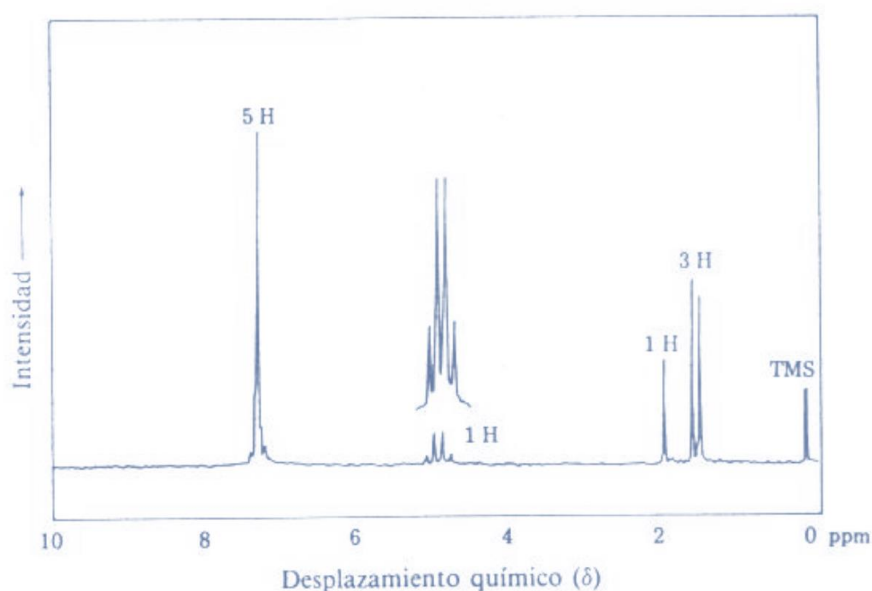
- Un triplete a los $\delta=3,8$ ppm aproximadamente que integra para 2H, esta señal al tener más desplazamiento va a estar cerca del átomo de oxígeno.
- Un singlete a los $\delta= 3,1$ ppm aproximadamente que integra para 1H, esta señal es un poco más ancha asique es muy probable que corresponda al hidrógeno del alcohol.
- Un multiplete a los $\delta=1,8$ ppm aproximadamente que integra para 2H, al ser un multiplete que integra para dos, es muy probable que se trate de un carbono que esté en medio de una cadena.
- Un triplete a los $\delta=1$ ppm aproximadamente que integra para 3H, al tener poco desplazamiento e integrar para 3H, es probable que se trate de un carbono que esté en un extremo de una cadena y es el que esté más alejado del átomo de oxígeno.

Con estos datos podemos concluir que la estructura de la molécula es la siguiente:



Ejercicio 6: Proponer una estructura para el alcohol de fórmula molecular, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ cuyo espectro de ^1H -RMN es el que se indica.

(c) $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$



Primero habría que ver el número de insaturaciones:

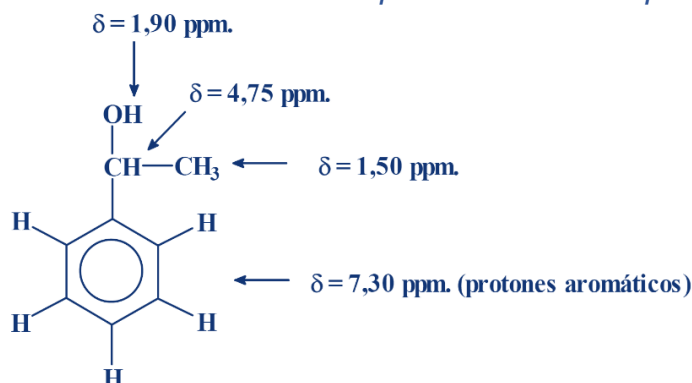
$$n^\circ \text{ de insaturaciones} = \frac{2 \times C + 2 - H}{2} = \frac{2 \times 8 + 2 - 10}{2} = 4$$

En este caso el número de insaturaciones es **4**, este número suele asociarse a la presencia de un anillo de benceno en su estructura.

En cuanto a las señales del espectro se puede observar:

- Un singlete a los $\delta = 7,3$ ppm aproximadamente, correspondiente al desplazamiento de los protones aromáticos.
- Un cuartete a los $\delta = 4,75$ ppm aproximadamente, al tener un desplazamiento alto, integrar para un solo hidrógeno y tener una multiplicidad de 4 (tres hidrógenos vecinos), es muy probable que se trate de un carbono que esté en medio de una cadena de carbonos.
- Un singlete a los $\delta = 1,9$ ppm aproximadamente, el cual seguramente corresponde a la señal del protón de un grupo -OH.
- Un doblete a los $\delta = 1,5$ ppm aproximadamente, que integra para 3H, esta señal es probable que corresponda a un extremo de una cadena de carbono.

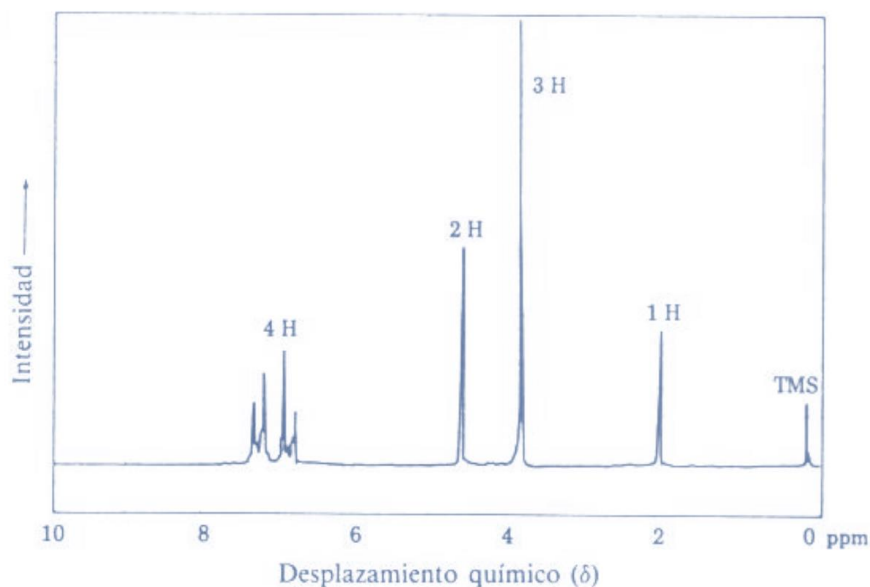
Con esta información podemos deducir que la estructura de la molécula es:



Molécula: 1-feniletanol

Ejercicio 7: Indicar cual sería la estructura de un alcohol de fórmula molecular $C_8H_{10}O_2$, a partir del espectro de 1H -RMN que se indica.

(b) $C_8H_{10}O_2$



Primero habría que ver el número de insaturaciones:

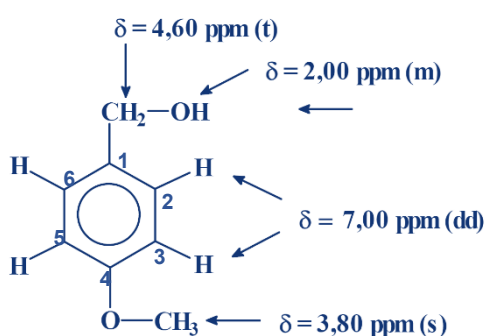
$$n^{\circ} \text{ de insaturaciones} = \frac{2 \times C + 2 - H}{2} = \frac{2 \times 8 + 2 - 10}{2} = 4$$

En este caso el número de insaturaciones es 4, este número suele asociarse a la presencia de un anillo de benceno en su estructura.

En cuanto a las señales del espectro se puede observar:

- Un cuartete a los $\delta = 7$ ppm aproximadamente, el cual corresponde al corrimiento de los protones aromáticos. Al integrar para 4H, nos indica que el anillo de benceno está disustituido, si integrara para 5H estaría mono sustituido (como en el ejercicio 4).
- Un singlete a los $\delta = 4,6$ ppm aproximadamente que integra para 2H. Al tener un desplazamiento alto indica que está cerca de uno de los átomos de oxígeno.
- Un singlete a los $\delta = 3,8$ ppm aproximadamente que integra para 3H. Al tener un desplazamiento alto, es probable que esté cerca de un átomo de oxígeno, y al tener 3H, es probable que se trate de un carbono que esté en un extremo.
- Un singlete a los $\delta = 2$ ppm que integra para 1H, esta señal es característica de los hidrógenos del grupo -OH.

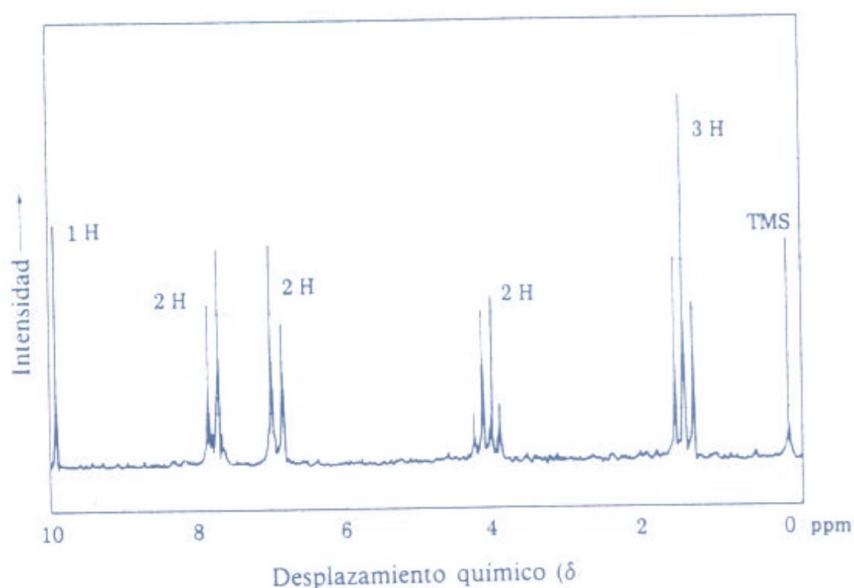
Con estos datos podemos deducir que la estructura de la molécula es la siguiente:



Molécula: 4-metoxifenil metanol

Ejercicio 8: A partir de los datos del espectro de ^1H -RMN que se adjunta y sabiendo que se espectro IR presentan una banda intensa y característica a 1695 cm^{-1} , y que su

(c) $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$;
IR: 1695 cm^{-1}



fórmula molecular es $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$, proponer una estructura para el compuesto.

Primero habría que ver el número de insaturaciones:

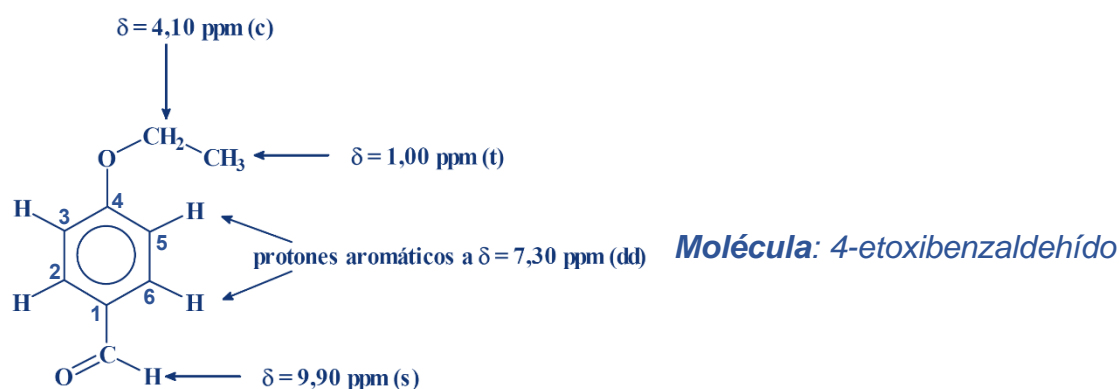
$$n^\circ \text{ de insaturaciones} = \frac{2 \times C + 2 - H}{2} = \frac{2 \times 9 + 2 - 10}{2} = 5$$

En este caso el número de insaturaciones es **5**, de los cuales cuatro corresponden al anillo aromático, y otro corresponde al doble enlace C=O.

En cuanto a las señales del espectro:

- Una señal a los $\delta = 10$ ppm aproximadamente, este desplazamiento es característico de los grupos aldehído. (banda intensa y característica a 1695 cm^{-1} en el espectro IR)
- Una señal a los $\delta = 7,9$ ppm aproximadamente que integra a 2H, esto corresponde a los dos protones aromáticos que se encuentran más cercanos al grupo aldehído.
- Una señal a los $\delta = 7,3$ ppm aproximadamente que integra a 2H, esto corresponde a los dos protones aromáticos que se encuentran más alejados del grupo aldehído.
- Un cuartete a los $\delta = 4,1$ ppm aproximadamente que integra para 2H, esto puede corresponder a los hidrógenos de un carbono que esté en medio de una cadena y a su vez que está cerca de un átomo de oxígeno.
- Un triplete a los $\delta = 1$ ppm aproximadamente que integra para 3H. Esto puede corresponder a los protones de un carbono que esté en un extremo de una cadena.

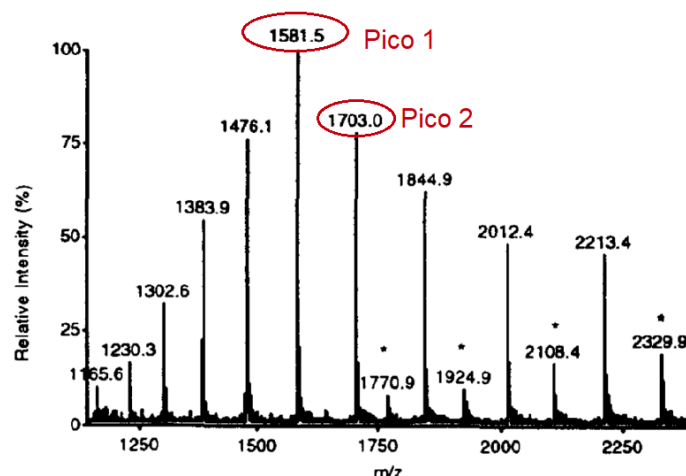
Con esta información podemos deducir que la estructura de la molécula es la siguiente:



• ESPECTROMETRÍA DE MASAS

PREGUNTA 1:

a- La siguiente figura muestra el espectro de masas de una hormona de crecimiento obtenida empleando como fuente de ionización ESI, Determine el PM de esta proteína.



Nota: **NO** tenga en cuenta aquellos picos marcados con un asterisco

Primero debemos calcular el valor de z_1 para conocer la masa de la proteína, para ello realizamos un sistema de ecuaciones:

$$\text{Pico 1} = 1581,5 = (M+z_1)/z_1 \quad \rightarrow \quad \text{Despejar } M \rightarrow M = 1581,5 \times z_1 - z_1$$

$$\text{Pico 2} = 1703,0 = (M+(z_1-1))/(z_1-1) \quad \rightarrow \quad \text{Despejar } M \rightarrow M = 1703,0 \times (z_1-1) - (z_1-1)$$

Igualar M y despejar z_1 :

$$1581,5 \times z_1 - z_1 = 1703 \times (z_1 - 1) - (z_1 - 1)$$

$$1580,5 \times z_1 = 1702 \times z_1 - 1702$$

$$1580,5 \times z_1 - 1702 \times z_1 = -1702$$

$$-121,5 \times z_1 = -1702$$

$$z_1 = -1702 / -121,5$$

$$z_1 = 14$$

Ahora con el valor de z_1 , podemos despejar M, lo podemos hacer tanto del pico 1 como del 2:

Pico 1

$$M = 1581,5 \times z_1 - z_1$$

$$M = 1581,5 \times 14 - 14$$

$$M = 22.127 \text{ Da}$$

Pico 2

$$M = 1703 \times (z_1 - 1) - (z_1 - 1)$$

$$M = 1703 \times 14 - 14$$

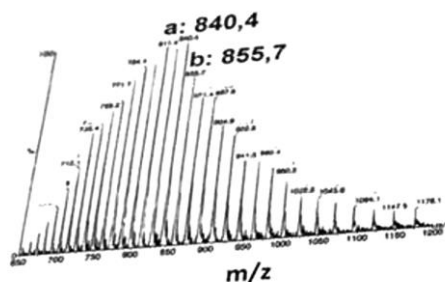
$$M \approx 22.127 \text{ Da}$$

b- ¿Qué tipo de mecanismo de ionización ocurre en MALDI y para qué tipos de compuestos se utiliza?

- El mecanismo de ionización es una protonación, también podría llegar a ser una cationización en el caso de que la matriz tuviera iones. En la ionización MALDI se realiza una **ionización con un láser** sobre una matriz la cuál puede absorber 1, energía UV, en esta matriz se encuentra nuestro analito co-cristalizado, entonces cuando se irradia con un láser, se vaporiza la matriz junto con nuestro analito
- Se utiliza para analitos de alto peso molecular (hasta 500 kDa), y compuestos que no se degraden con la matriz ácida.

PREGUNTA 2:

El siguiente espectro de masas para una proteína Rho se obtuvo empleando como fuente de ionización ESI. Determine el PM de esta proteína a partir de los picos marcados como **a** y **b**



Primero debemos calcular el valor de z_a para conocer la masa de la proteína, para ello realizamos un sistema de ecuaciones:

$$\text{Pico a} = 840,4 = (M + z_a) / z_a \quad \rightarrow \quad \text{Despejar } M \rightarrow M = 840,4 \times z_a - z_a$$

$$\text{Pico b} = 855,7 = (M + (z_a - 1)) / (z_a - 1) \quad \rightarrow \quad \text{Despejar } M \rightarrow M = 855,7 \times (z_a - 1) - (z_a - 1)$$

Igualar M y despejar z_a :

$$840,4 \times z_a - z_a = 855,7 \times (z_a - 1) - (z_a - 1)$$

$$839,4 \times z_a = 854,7 \times z_a - 854,7$$

$$839,4 \times z_1 - 854,7 \times z_a = -854,7$$

$$-15,3 \times z_a = -854,7$$

$$z_a = -854,7 / -15,3$$

$$z_a \approx 56$$

Ahora con el valor de z_a , podemos despejar M, lo podemos hacer tanto del pico a como del b:

Pico a

$$M = 840,4 \times z_a - z_a$$

$$M = 840,4 \times 56 - 56$$

$$M = 47.006 \text{ Da}$$

Pico b

$$M = 855,7 \times (z_a - 1) - (z_a - 1)$$

$$M = 855,7 \times (56 - 1) - (56 - 1)$$

$$M = 47.008 \text{ Da}$$

PREGUNTA 4:

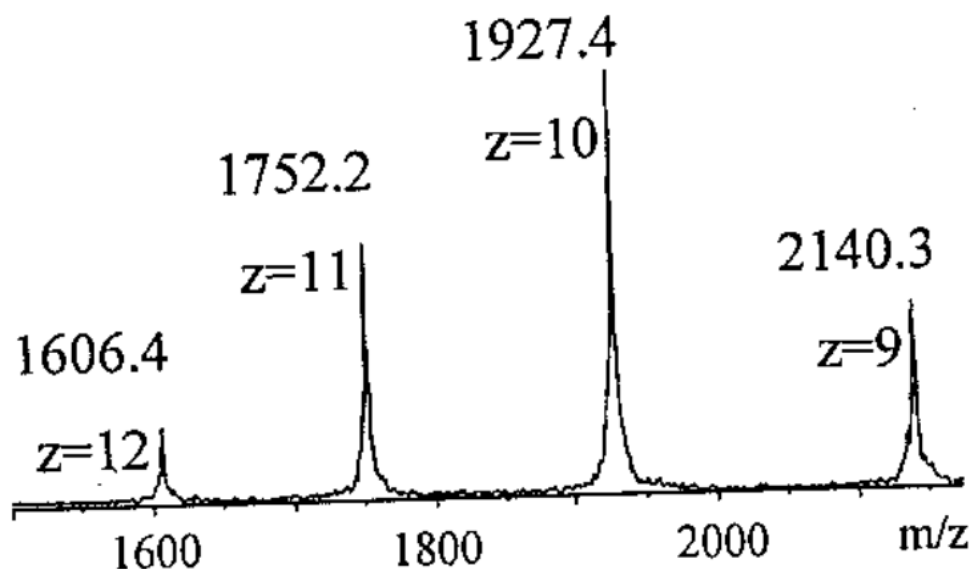
a) Completa la siguiente tabla:

Método de ionización predominante	Fuente de ionización	Se utiliza para moléculas... (indique el PM límite)	Característica principal de los espectros
Protonación	MALDI, ESI	Compuestos de alto PM, aprox. 500 kDa	Se observarán múltiples señales del ión molecular multiprotonado, se ven diferentes Z.
Eyección de un electrón	Impacto electrónico	Compuestos de bajo PM, aprox. 500 Da.	Picos con relación m/z que indican directamente el peso del compuesto, ya que en este caso la carga Z=1.

Fuente de ionización	Tipo de muestra	Sistema de introducción	Rango de masas	Características Principales
----------------------	-----------------	-------------------------	----------------	-----------------------------

Ionización electrónica (EI)	Masas pequeñas y volátiles	CG o sonda líquida / sólida	Hasta 500 Da	Método duro. Versátil. Información estructural
Ionización química (CI)	Masas pequeñas y volátiles	CG o sonda líquida / sólida	Hasta 1000 Da	Método blando. Pico del ión molecular.
Electronebulización (ESI)	Péptidos / proteínas	Cromatografía líquida / inyección	Hasta 70 kDa	Método blando. Iones con carga múltiple.
Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Carbohidratos / péptidos / organometálicos	Muestra mezclada en matriz viscosa	Hasta 7 kDa	Método blando, pero más duro que ESI y MALDI.
Desorción por láser asistida por matriz (MALDI)	Péptidos / Proteínas / Nucleótidos	Muestra mezclada en matriz sólida	Hasta 150 kDa	Método blando / Masas muy altas.

b) El siguiente espectro de Masas corresponde al interferón- α -humano y se obtuvo empleando una fuente de ionización de electronebulización (ESI). Responda JSR:



I. ¿Cuál es la masa molecular de esta biomolécula?

La masa de la molécula se la puede obtener a partir de los picos y su carga:

Pico $z=10 \rightarrow 1927,4 = (m+Z10) / Z10$

$$1927,4 = (m+10) / 10$$

$$m = 1927,4 \times 10 - 10$$

$$m = \mathbf{19264 \text{ Da}}$$

*La masa de la biomolécula es de **19264 Da**.*

II. ¿Cuál es la carga en cada uno de los picos que se encuentra a los extremos?

La carga del pico de 1604,4 m/z es de 12

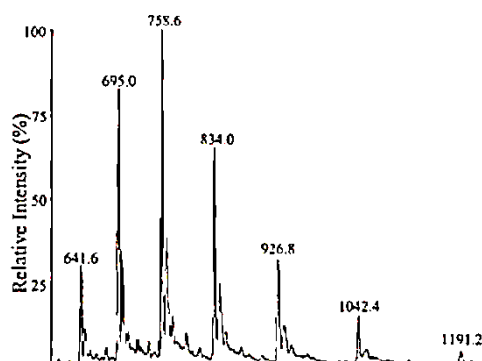
La carga del pico de 2140,3 m/z es de 9

III. ¿Podría haber obtenido un espectro similar empleando ionización química?

Es probable que un espectro obtenido empleando ionización química tengan menor cantidad de fragmentos. Esto se debe al ser un método de ionización más suave que ESI.

EUI PREGUNTA 1:

a) El siguiente espectro de masas de la proteína transducina bovina se obtuvo empleando como fuente de ionización ESI.



i) ¿Cuál es la diferencia en carga entre dos picos adyacentes?

La diferencia en carga entre dos picos adyacentes es de 1. Será de +1 si el pico está a la izquierda del que tomamos como referencia o -1 si el pico está a la derecha del que tomamos como referencia.

ii) Si la carga del pico a $m/z = 758,6$ es +11 ¿Cuál es la masa de la proteína?

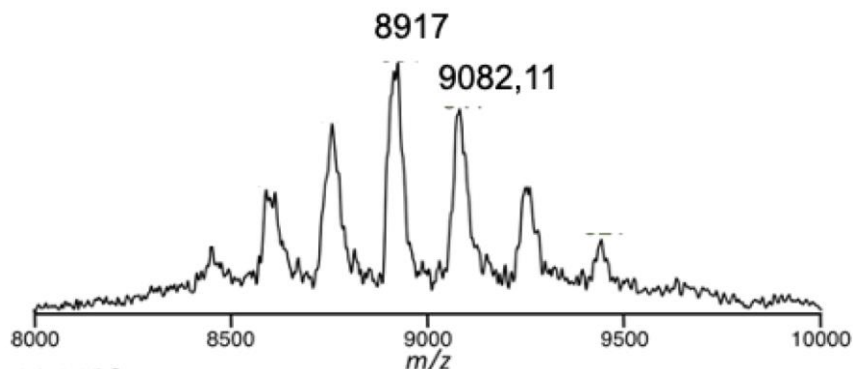
Sabiendo que $758,6 = (m+11)/11$, despejamos masa (m) y obtenemos:

$$m = (758,6 \times 11) - 11 = \mathbf{8333,6 \text{ Da}}$$

La masa de la proteína es de 8333,6 Da.

EUI PREGUNTA 2:

A partir del siguiente espectro de masas obtenido para una proteína, determine la carga de cada uno de los picos cuya relación m/z se indica y el peso molecular de la proteína.



Planteamos un sistema de ecuaciones:

$$\text{Pico 1: } 8917 = m + z_1/z_1 \rightarrow m = 8917 \times z_1 - z_1 = 8916z_1$$

$$\text{Pico 2: } 9082,11 = (m + (z_1 - 1)) / (z_1 - 1) \rightarrow m = 9081,11z_1 - 9081,11$$

Siendo z_1 la carga del pico 1 (relación masa/carga de 8917)

Iguamos masa y despejamos carga.

$$8916z_1 = 9081,11z_1 - 9081,11$$

$$-165,11z_1 = -9081,11$$

$$z_1 = -9081,11 / -165,11$$

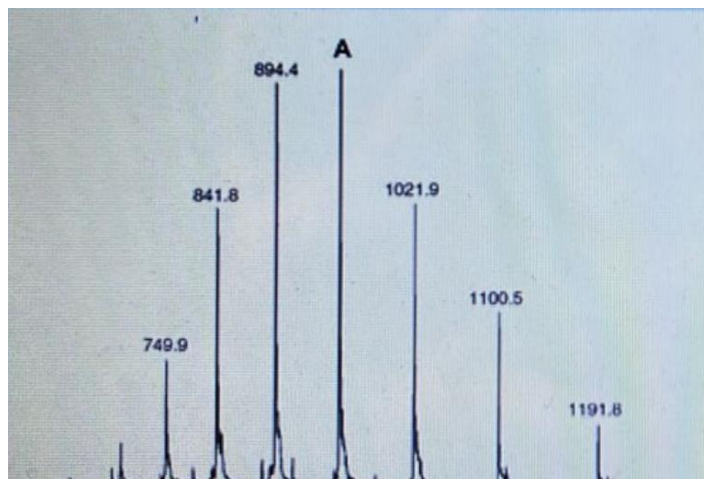
$$\mathbf{z_1 = 55,00}$$

Una vez obtenido el valor de la carga, podemos calcular el peso molecular de la proteína.

$$m = 8917 \times z_1 - z_1 = 8917 \times 55 - 55 = \mathbf{490380 \text{ Da}}$$

EUI PREGUNTA 3:

La siguiente figura muestra el espectro de masas obtenido, empleando como fuente de ionización ESI, para la proteína denominada "cytochrome c" cuya masa molecular promedio es de 14293 Da. En base a este dato y la información que puede extraer del espectro, responda.



a) ¿Cuál es la relación m/z y la carga del pico indicado como A?

Para obtener la relación masa carga primero deberíamos obtener la carga del pico 894,4 sabiendo que el peso de la proteína es 14293 Da:

$$894,4 = m + z/z$$

$$894,4 = \frac{14293+z}{z}$$

$$894,4z = 14293 + z$$

$$893,4z = 14293$$

$$z = 14293 \div 893,4$$

$$z = 16$$

Con el valor de la carga de este pico, sabemos que el pico A tendrá 15 de carga. Entonces ahora podemos despejar la masa carga:

$$m/z = (14293+15) \div 15$$

$$m/z = 953,8$$

b) ¿Podría utilizar impacto electrónico en lugar de ESI como fuente de ionización para realizar esta determinación? Justifique su respuesta

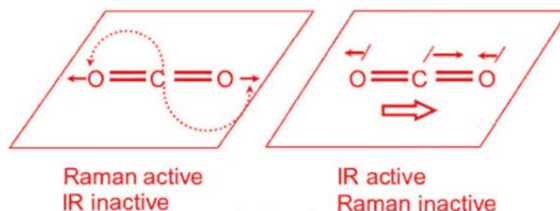
Si, podría realizar ESI como fuente de ionización, ya que esta técnica permite la determinación de compuestos de alto peso molecular.

• ESPECTROSCOPIA RAMAN

PREGUNTA 1:

- a) Para que se produzca dispersión Raman de la luz incidente sobre una molécula, ¿Qué debe provocar la vibración de un enlace?

Para que se produzca dispersión Raman, las vibraciones de un enlace deben ser totalmente simétricas en moléculas que presenten un centro de simetría, en este caso serán activos en Raman, pero inactivos en IR.



En la imagen se muestra como ejemplo los tipos de vibraciones del dióxido de carbono, aquellas vibraciones de enlace que sean simétricas en un centro de simetría (imagen de la izquierda) serán activas en Raman, pero inactivas en IR. Aquellas vibraciones de enlace que no sean simétricas con respecto al centro de simetría serán activas en IR, pero inactivas en Raman.

- ¿Cuál sería la diferencia observable para la línea con un corrimiento Raman de Stokes a 1200 cm^{-1} de un determinado compuesto si el experimento se realizara con un láser de 532 nm respecto a un experimento realizado con un láser de 1064 nm ?

A medida que disminuyo la longitud de onda del láser y por ende se aumenta la energía, entonces con el láser de 532 nm se observará una señal más intensa que con el láser de 1064 nm para la señal de Stokes a 1200 cm^{-1} .

PREGUNTA 2:

Indique JSR:

- a. ¿Qué sucede con la energía de luz incidente sobre una molécula que da lugar al efecto Raman?

La energía de luz que incide sobre una molécula puede ser diferente a la energía de la luz que, de emisión, podría pasar que pierda energía o que gane energía, entonces la dispersión de la energía será del tipo inelástica, esto es lo que se llama RAMAN, significa que esta luz incidente tendrá una energía o frecuencia diferente a la luz que llega al detector.

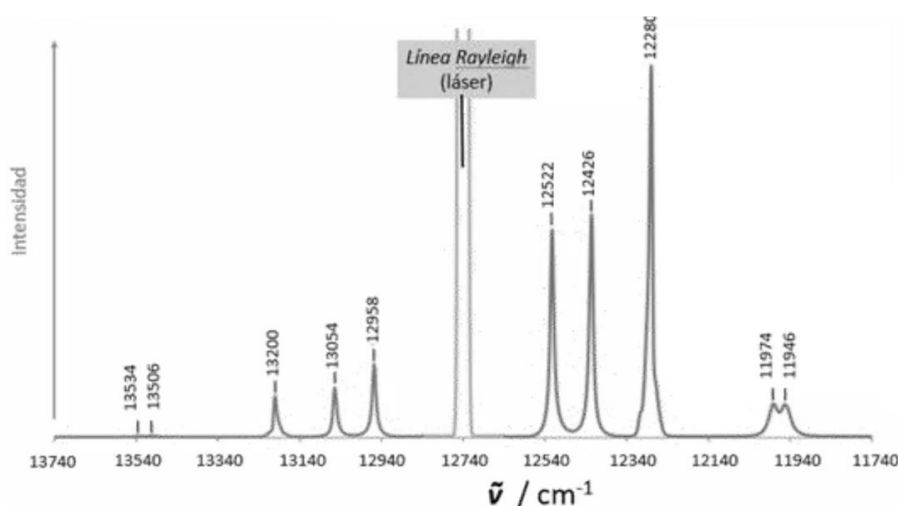
- *Si la frecuencia (energía) de la luz incidente es MAYOR a la frecuencia que llega al detector se denomina Stokes. ($\nu_0 > \nu$)*
 - *Si la frecuencia (energía) de la luz incidente es MENOR a la frecuencia que llega al detector se denomina anti-Stokes. ($\nu_0 < \nu$). Esto pasa por que se incide luz sobre moléculas que se encuentran en estados vibracionales mayores al $\nu=0$.*
- b. ¿De qué parámetros experimentales depende la intensidad de una señal Raman?
- *Es proporcional a la frecuencia de la luz, es decir la diferencia entre frecuencia del láser (ν_L) y la frecuencia del enlace que se está observando (ν_m)*
 - *Es proporcional a la intensidad del láser. (Láseres de menor longitud de onda (aumento de energía) permiten que se aumente la intensidad)*

- También es proporcional al CAMBIO EN LA POLARIZABILIDAD DEL ENLACE (α). No todos los enlaces tienen la misma probabilidad de que hagan una dispersión Raman, entonces esto también afecta a las señales del espectro. Para que ocurra el fenómeno de Raman tiene que haber un cambio de POLARIZABILIDAD, entonces siempre $\Delta\alpha \neq 0$

PREGUNTA 3:

En base al siguiente espectro Raman de un compuesto orgánico que se muestra en la figura responda, **justificando su respuesta** en cada caso:

- ¿Cuál es la longitud de onda del láser que se utilizó para irradiar la muestra?
- ¿Cuál es el corrimiento Raman de cada línea Stokes?
- ¿Qué modificación experimental propondría para:
 - Incrementar la intensidad de las señales a la izquierda de la línea Rayleigh
 - Disminuir la intensidad de las señales a la derecha de la línea Rayleigh.



a) La longitud de onda del láser utilizado es 785nm, usando: $\lambda_{nm} = \frac{10^7}{12740_{cm}} = 785nm$

b) Corrimiento Raman [cm^{-1}] = $\frac{10^7}{\lambda_{ex}[nm]} - \frac{10^7}{\lambda[nm]} = \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}$

- Línea 12522 cm^{-1} = Corrimiento Raman de 218 cm^{-1}
- Línea 12426 cm^{-1} = Corrimiento Raman de 314 cm^{-1}
- Línea 12280 cm^{-1} = Corrimiento Raman de 460 cm^{-1}
- Línea 11974 cm^{-1} = Corrimiento Raman de 766 cm^{-1}
- Línea 11946 cm^{-1} = Corrimiento Raman de 794 cm^{-1}

c) i. Para que ocurra el fenómeno de anti-Stokes, se tiene que incidir luz sobre una población de moléculas que están en un estado de mayor energía que el ν_0 , esta población es mucha menor que la población de moléculas en estado ν_0 , entonces para incrementar la intensidad de las líneas que están a la izquierda de la línea de Rayleigh, es decir, las líneas de Anti-Stokes, lo que se puede hacer es aumentar la temperatura, de esta forma habrá mayor cantidad de moléculas con energía mayor a ν_0 y entonces la intensidad de las líneas anti-Stokes será mayor.

ii. Algo que se podría usar son láseres con mayor longitud de onda, de forma que la energía de excitación será menor y las líneas tendrán menor intensidad.

EUI PREGUNTA 1:

Respecto a la espectroscopia Raman, responda **justificando su respuesta**:

a) ¿Qué tipo de espectroscopia es y qué información sobre una molécula brinda?

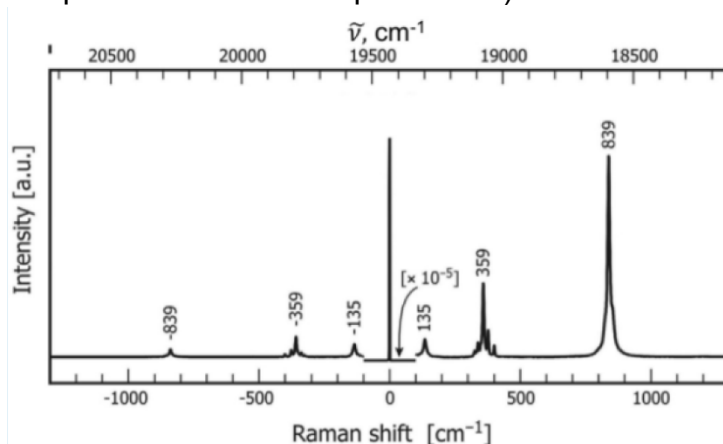
Es una espectroscopía de tipo vibracional o de dispersión inelástica. Nos brinda información sobre los grupos funcionales presentes en una molécula.

b) ¿De qué 2 parámetros depende principalmente la intensidad de una señal Raman?

Depende de la intensidad del láser, un láser con menor longitud de onda tendrá una mayor intensidad, es importante considerar la intensidad del láser porque el fenómeno Raman tiene una baja probabilidad de que ocurra, y aumentando la intensidad del láser puede ayudar a tener señales más intensas.

Otro parámetro importante es el cambio en la polarizabilidad del enlace que se esté analizando. Para que un enlace sea visible en Raman, debe tener un cambio de polarizabilidad distinto de 0 ($\alpha \neq 0$), ya que no todos los enlaces tienen la misma probabilidad de que hagan una dispersión Raman, entonces esto también afecta a las intensidades de las señales del espectro.

c) Observe el siguiente espectro Raman e indique cuáles son las líneas Raman de Stokes, anti Stokes, la línea Rayleigh y exprese la longitud de onda del láser utilizado para la excitación en nm (Nota puede ser un valor aproximado).



• Líneas Raman de Stokes: Son las que se encuentran a la derecha de la línea 0. Estas líneas se obtienen cuando la frecuencia (energía) de la luz incidente es MAYOR a la frecuencia que llega al detector. ($\nu_0 > \nu$)

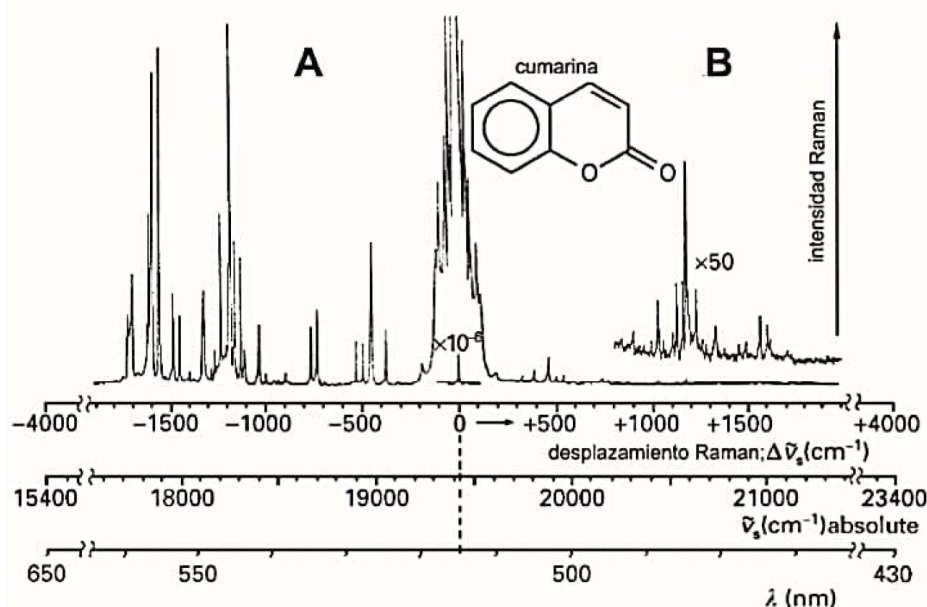
• Líneas Raman de anti-Stokes: Son las que se encuentran a la izquierda de la línea 0. Estas líneas se obtienen cuando la frecuencia (energía) de la luz incidente es MENOR a la frecuencia que llega al detector se denomina anti-Stokes. ($\nu_0 < \nu$). Esto pasa por que se incide luz sobre moléculas que ya se encuentran en estados vibracionales mayores al $\nu=0$.

• La longitud de onda del láser usado para la excitación corresponde a la línea 0. Esta línea 0 tiene una frecuencia de unos aproximadamente 19570 cm^{-1} . Para pasarlos a nanómetros habría que hacer: $\lambda_{(nm)} = \frac{10^7}{\bar{\nu}_{(cm^{-1})}} = \frac{10^7}{19570 \text{ cm}^{-1}} = 511 \text{ nm}$

La longitud de onda del láser incidente es de **511nm** aproximadamente.

EUI PREGUNTA 2:

El espectro Raman de cumarina que se muestra en la figura se obtuvo empleando un láser de Ar ($\lambda=514,53 \text{ nm}$) como fuente de excitación. La cumarina es un compuesto orgánico que también presenta picos de absorción en la región UV del espectro a 270 nm y 310 nm .



A partir del análisis del espectro Raman de cumarina y teniendo en cuenta las características de la técnica como la dependencia de la intensidad de Raman con los parámetros experimentales responda:

a) ¿A qué tipo de corrimiento Raman corresponden las señales que aparecen en la región A y en la región B del espectro?

Las señales que aparecen en la región “A” del espectro corresponden a señales Raman Stokes, y las señales que aparecen en la región B corresponden a las señales Raman de Anti-Stokes, ya que estas últimas tienen picos mucho menos intensos, además de salir a valores de frecuencia más altos.

b) ¿Se modificaría el espectro si el láser de Ar se utilizara a 488 nm? Explique brevemente
Si el láser que se utilizara fuera de 488 nm, la intensidad de las señales Raman se vería aumentada. La intensidad de las señales Raman es inversamente proporcional a la longitud de onda, es decir que, si disminuyo la longitud de onda del láser, la intensidad de la señal será mayor. Sin embargo, al usar láseres con longitud de onda bajos puede provocar que haya ruido por fluorescencia, por lo tanto, se debe elegir un láser que, de una buena señal, pero no produzca ruido por la generación de fluorescencia. La región entre 400 y 500 nm suele ser la región donde más se observa este ruido por fluorescencia.

c) ¿Cuál de las dos regiones (A o B) presentaría mayores cambios por un aumento de la temperatura?

La región “A” correspondiente a las señales Raman anti-Stokes. Ya que para que se produzca el fenómeno de Raman anti-Stokes, debe haber moléculas que ya posean energía mayor al nivel 0 ($v > v_0$), lo cual es poco probable. Al aumentar la temperatura, habrá mayor población de moléculas que tengan una energía mayor a la v_0 , por lo que estas señales se verían intensificadas.

d) ¿Qué vibración debería presentar mayor intensidad en el espectro de cumarina, la correspondiente al enlace C=O o al enlace C=C?

La vibración que debería presentar mayor intensidad en el espectro de cumarina corresponde al enlace C=C.

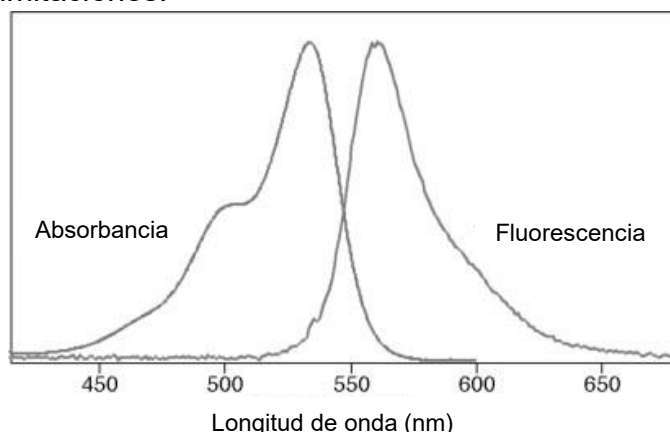
EUI PREGUNTA 3:

a) ¿De qué parámetros experimentales depende la intensidad de una señal Raman?

La intensidad de una señal Raman depende de la temperatura, esto sobre todo en las señales anti-Stokes; depende de la intensidad del láser, mientras menor longitud de onda

tenga el láser más intensidad tendrá; La concentración de la muestra también es importante, ya que el fenómeno Raman tiene baja probabilidad de ocurrir, por lo que se necesita de una alta concentración de muestra (del orden de los mM); El soporte del analito también puede afectar a la intensidad Raman, si se encuentran sobre nanopartículas metálicas estas pueden ayudar a mejorar la dispersión Raman.

b) El equipo Raman de un laboratorio posee tres fuentes de láser de excitación (514nm, 644nm y 1064nm). El compuesto que se quiere analizar por esta técnica es rodamina 6G, cuyos espectros de absorción y de fluorescencia se muestran en la figura. ¿Cuál o cuáles de las fuentes disponibles seleccionaría para realizar el experimento? ¿Por qué? Al justificar indique ventajas y/o limitaciones.



La fuente láser que elegiría es la de 644nm, ya que de esta forma me aseguro de no tener mucha interferencia por fluorescencia y una intensidad moderada. Si eligiera el láser de 514nm obtendría un espectro con mucho ruido por fluorescencia van a interferir con las señales Raman que puedan aparecer, pero la intensidad de este láser sería mayor. Si eligiera el láser de 1064nm me aseguraría por completo de no tener interferencia por fluorescencia, pero la intensidad del láser sería demasiado baja, por lo que es posible que las señales de Raman que puedan aparecer en el espectro sean poco apreciables.

c) ¿Podría realizar el experimento anterior en solución acuosa? J.S.R

Si, por que a diferencia de una espectroscopía IR, donde no se puede usar agua, en Raman se puede analizar sustancias que se encuentren en soluciones acuosas.

d) Si le presentaran un espectro de rodamina 6G, ¿Cómo reconocería si se trata de un espectro Raman o de un espectro IR? J.S.R

Reconocería si es un espectro Raman por la señal característica a corrimiento 0, correspondiente a la señal de Rayleigh, además en un espectro IR se tiene la zona de la huella digital con señales estrechas, en Raman los picos que se obtienen pueden variar en intensidad dependiendo de las condiciones experimentales y pueden llegar a presentar señales de Stokes y Anti-Stokes.

EUI PREGUNTA 4:

Indique si las siguientes afirmaciones son Verdaderas o Falsas. **JSR** en todos los casos

I) El fenómeno Raman se fundamenta en la dispersión elástica de la luz incidente sobre una molécula.

FALSO. El fenómeno Raman se basa en la dispersión inelástica que tenga la luz incidente sobre una molécula. Si dispersión elástica hace referencia a la señal de Rayleigh mientras que la dispersión inelástica hace referencia a las señales de Stokes y Anti-Stokes que son las consideradas como dispersión Raman.

II) Para que se produzca el fenómeno Raman es necesario que la molécula presente cromóforos.

FALSO. No es necesario que la molécula presente cromóforos. Para que una molécula pueda hacer el fenómeno Raman la vibración de los enlaces deben ser capaz de generar un cambio en la frecuencia de la luz incidente para generar una dispersión inelástica.

III) Las muestras a utilizar en espectroscopia Raman deben estar anhidras.

FALSO. Las muestras en espectroscopía Raman pueden estar en soluciones acuosas, a diferencia de espectroscopía IR que si o si deben ser anhidras.

IV) Si para un compuesto la línea Rayleigh se detecta a $9397,59 \text{ cm}^{-1}$ significa que la longitud de onda del láser utilizado es 1064 nm.

VERDADERO. Para comprobarlo se pasa la señal de la línea de Rayleigh de cm^{-1} a nm:

$$\lambda_{(\text{nm})} = \frac{10^7}{\tilde{\nu}_{(\text{cm}^{-1})}} = \frac{10^7}{9397,59 \text{ cm}^{-1}} = \mathbf{1064 \text{ nm}}$$

V) La intensidad de la señal Raman obtenida para un dado compuesto es independiente de la longitud de onda del láser utilizado.

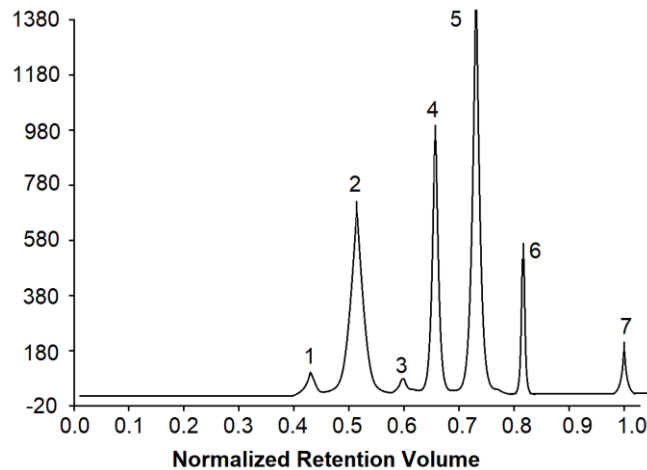
FALSO. La longitud de onda del láser utilizado influye de forma importante en la intensidad de las señales Raman. Son inversamente proporcionales, es decir, mientras mayor sea la longitud de onda del láser, menor será la intensidad y viceversa.

TEÓRICO 3: TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

PREGUNTA 1:

a) La siguiente figura muestra un cromatograma obtenido por exclusión por tamaños. La muestra contenía los siguientes componentes Uracilo; IgG (150kDa); tiroglobulina (660kDa); dímero de IgG; BSA (66kDa); mioglobina (17kDa) y agregados de tiroglobulina.

Asigne los picos del cromatograma justificando su respuesta.



Algo conveniente que se puede hacer es ordenarlos según su tamaño, para que luego sea más fácil ubicarlos en los picos:

Orden de mayor a menor de los componentes:

Agregados de tiroglobulina (>660kDa) > tiroglobulina (660kDa) > dímero de IgG (300kDa) > IgG (150kDa) > BSA (66kDa) > mioglobina (17kDa) > Uracilo (112 Da)

- **Pico 1:** Corresponde a los "**agregados de tiroglobulina**", esto es porque la tiroglobulina es el componente con mayor peso molecular, y si además forma agregados (es decir varias proteínas juntas) el volumen hidrodinámico será mucho mayor, por ende, será el primero en eluir.
- **Pico 2:** Corresponde a la "**tiroglobulina**", ya que es el segundo componente con mayor volumen hidrodinámico.
- **Pico 3:** Corresponde al "**dímero de IgG**", el cuál es un tendrá el peso molecular igual al de dos proteínas de IgG ($150\text{kDa} + 150\text{kDa} = 300\text{kDa}$)
- **Pico 4:** Corresponde al "**IgG**", ya que tendrá la mitad del PM que su dímero, entonces tendrá un volumen de elusión mayor.
- **Pico 5:** Corresponde al "**BSA**", ya que tiene menor PM que el IgG, por ende, el volumen de elusión será mayor.
- **Pico 6:** Corresponde a la "**mioglobina**", ya que es la proteína con menor peso molecular de todas, entonces el volumen de elusión será mayor.
- **Pico 7:** Corresponde al "**uracilo**", que, si bien en el enunciado no indica su peso molecular, sabemos que el uracilo es una base nitrogenada, es decir una molécula relativamente mucho más pequeña que el resto de componentes de la mezcla, que son proteínas, es por esto que es la que más tardará en salir.

PREGUNTA 2:

a) En la cromatografía de afinidad: ¿Qué función cumple la fase estacionaria y los dos tipos de soluciones buffers que generalmente se utilizan?

• Fase estacionaria: Su función es la de mantener unido de forma covalente un agente biológico que interaccionará de forma muy específica con nuestro analito de interés mediante interacciones no covalentes.

• Buffer de aplicación: Se trata de una solución de solventes con pH, polaridad y fuerza iónica similar al ambiente donde se encuentra nuestro analito de interés. Es el buffer que contendrá la muestra problema y estas condiciones le permiten al analito de interés unirse a la fase estacionaria.

• Buffer de elución: Una vez que nuestro analito se unió de forma específica a la fase estacionaria, se usa un buffer de elución que tiene la función de romper el enlace no covalente entre el analito y que este pueda eluir de la columna y ser purificado. Esto se puede conseguir disminuyendo la constante de equilibrio entre el analito y la FE, usar un competidor que compita con el analito por la FE (cromatografía de afinidad normal), o usar un compuesto que compite con el ligando de la FE por el analito (cromatografía de afinidad reversa).

b) Se necesita cuantificar el contenido de los compuestos A y B en una muestra problema. Para este análisis se toma 1g de la muestra y se realiza una extracción con una mezcla de solventes (MeOH 60%: agua 40%). Luego, se agregan 250mg de un estándar interno, se filtra y se completa a un volumen final de 100mL (**Solución X**). Por otro lado, se prepararon 50 mL de una solución testigo (**Solución T**) conteniendo 250mg de A, 250 mg de B y 250 mg de estándar interno. Ambas soluciones se analizan por HPLC arrojando los siguientes resultados:

		Solución T	Solución X
Compuesto	t_R/min	Área	Área
A	5,2	35227	33970
B	6,5	104530	167945
<i>Estándar interno</i>	3,2	40500	

Calcule el contenido de A y B en la muestra problema. Nota: la muestra puede contener otros compuestos diferentes de A y B, no solubles.

Para calcular el contenido de A y B en la muestra problema usaremos el método de estándar interno (Ei):

Para calcular el contenido de los compuestos incógnita A y B en la solución problema (solución X) necesitamos del factor de respuesta relativo al Ei (D'_{RF}) de estos compuestos. Sabemos que el factor de respuesta está relacionado con el detector, entonces para obtener estos valores de D'_{RF} usaremos una solución con concentraciones conocidas de A y B (solución T).

La concentración de A, B y el Ei en la solución T es:

50 mL — 250 mg

1 mL — 5 mg → Solución T: $[A]=[B]=[Ei]= 5\text{mg/mL}$

Solución T**Compuesto A**

$$D'_{RFA} = \frac{\text{área A} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [A]} = \frac{35227 \times 5 \text{ mg/mL}}{40500 \times 5 \text{ mg/mL}} = \frac{35227}{40500} = 0,8698$$

Compuesto B

$$D'_{RFB} = \frac{\text{área B} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [B]} = \frac{104530 \times 5 \text{ mg/mL}}{40500 \times 5 \text{ mg/mL}} = \frac{104530}{40500} = 2,5809$$

Ahora con los valores de factor de respuesta de los compuestos A y B obtenidos a partir de la solución T, podemos usarlos para saber la concentración en la solución X:

Solución X

En esta solución el estándar interno está en otra concentración, por lo que hay que calcular la nueva concentración:

100 mL — 250 mg

1 mL — 2,5 mg → En solución X: [Ei] = 2,5 mg/mL

Compuesto A

$$D'_{RFA} = \frac{\text{área A} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [A]} \rightarrow [A] = \frac{\text{área A} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times D'_{RFA}} = \frac{33970 \times 2,5 \text{ mg/mL}}{40500 \times 0,8698} = 2,41 \text{ mg/mL}$$

Compuesto B

$$D'_{RFB} = \frac{\text{área B} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [B]} \rightarrow [B] = \frac{\text{área B} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times D'_{RFA}} = \frac{167945 \times 2,5 \text{ mg/mL}}{40500 \times 2,5809} = 4,016 \text{ mg/mL}$$

Estos valores de concentración corresponden a las concentraciones de A y B en la solución X, entonces el valor en la muestra es de:

Compuesto A

1 mL — 2,41 mg

100 mL — **241 mg**

Compuesto B

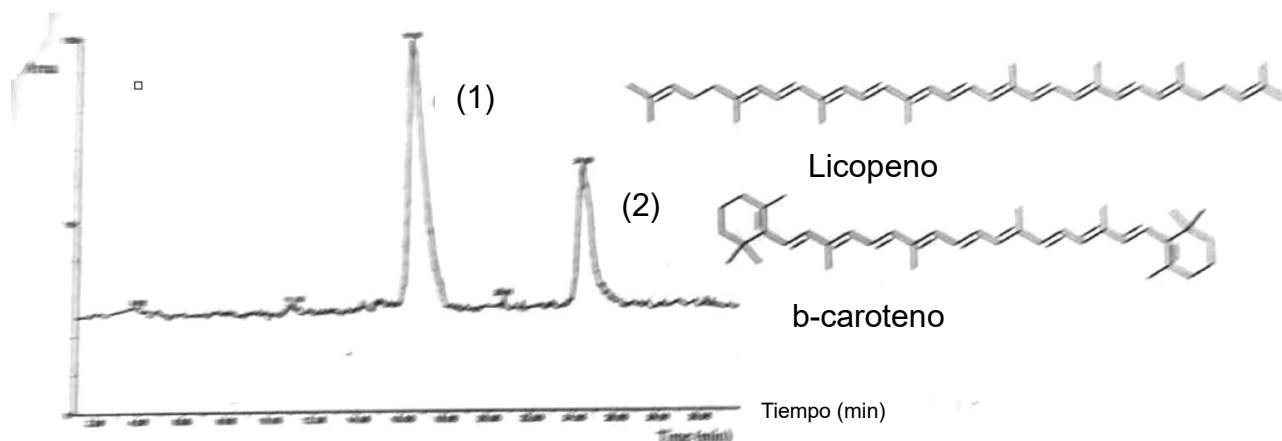
1 mL — 4,016 mg

100 mL — **401,6 mg**

En 1g de la muestra problema hay 241 mg del compuesto A y 401,6 mg del compuesto B. Los otros 357,4 mg de la muestra pueden corresponder a otros compuestos no solubles que no fueron detectados por la cromatografía.

PREGUNTA 3:

El cromatograma de la figura muestra los picos de licopeno (1, t_R: 16,62 min; área: 60000) y β-caroteno (2, t_R: 24,69 min; área 30000). Se obtuvo a partir de extraer 500 g de tomates cherries y llevar el extracto a un volumen final de 10 mL. La corrida HPLC se realizó en las siguientes condiciones experimentales: columna C18 a 30°C; la fase móvil fue una mezcla de metanol (P': 5,1), tetrahidrofurano (THF, P': 4), y acetonitrilo (P': 5,8) (60:30:10 v/v/v) en



modo isocrático y un flujo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. En base a estos datos, responda **justificando su respuesta** en cada caso:

I. ¿Qué tipo de cromatografía HPLC (normal o reversa) se realizó?

Se realizó una cromatografía HPLC reversa, ya que en este caso se usó una mezcla de solventes polares, lo que va a resultar en una FM polar. Además, se usa una columna de C18, es decir una FE apolar. Estas características son las de una cromatografía en fase reversa.

II. Si el t_m es 1,50 min, **calcule** el factor de retención (k') de ambos compuestos.

Factor de retención de Licopeno (k'_L)

$$k'_L = (16,62 \text{ min} - 1,5 \text{ min}) / 1,5 \text{ min}$$

$$k'_L = 10,08$$

Factor de retención de β -caroteno (k'_β)

$$k'_\beta = (24,69 \text{ min} - 1,5 \text{ min}) / 1,5 \text{ min}$$

$$k'_\beta = 15,46$$

III. ¿Cuál es el contenido de licopeno y β -caroteno, expresado en mg/kg, en el tomate?

Dato adicional: Una muestra testigo conteniendo $0,2 \text{ mg/mL}$ de licopeno y de β -caroteno se analizó empleando las mismas condiciones experimentales indicadas al principio. Se obtuvieron áreas de 40000 para el pico 1 y de 30000 para el pico 2.

Para calcular el contenido de licopeno y β -caroteno en el tomate usaremos el método de estándar externo:

SOLUCIÓN TESTIGO

Licopeno

$$\text{Área} = a \times C$$

$$a = \text{área} / C$$

$$a = 40000 / 0,2 \text{ mg/mL}$$

$$a = 200000 \text{ mg/mL}$$

β -Caroteno

$$\text{Área} = a \times C$$

$$a = \text{área} / C$$

$$a = 30000 / 0,2 \text{ mg/mL}$$

$$a = 150000 \text{ mg/mL}$$

Una vez obtenido el valor de la constante, como las condiciones experimentales son las mismas la podemos emplear en la otra cromatografía:

SOLUCIÓN PROBLEMA

Licopeno

$$\text{Área} = a \times C$$

$$C = \text{área} / a$$

$$C = 60000 / 200000 \text{ mg/mL}$$

$$C = 0,3 \text{ mg/mL}$$

β -Caroteno

$$\text{Área} = a \times C$$

$$C = \text{área} / a$$

$$C = 30000 / 150000 \text{ mg/mL}$$

$$C = 0,2 \text{ mg/mL}$$

Ahora estos valores de concentración del licopeno y el β -Caroteno hay que pasarlos a mg/kg como pide en la consigna:

Licopeno

$$1 \text{ mL} \rightarrow 0,3 \text{ mg}$$

$$10 \text{ mL} \rightarrow 3 \text{ mg} \rightarrow 500 \text{ g}$$

$$\boxed{6 \text{ mg}} \rightarrow 1000 \text{ g}$$

β -Caroteno

$$1 \text{ mL} \rightarrow 0,2 \text{ mg}$$

$$10 \text{ mL} \rightarrow 2 \text{ mg} \rightarrow 500 \text{ g}$$

$$\boxed{4 \text{ mg}} \rightarrow 1000 \text{ g}$$

El contenido de licopeno y de β -caroteno es de 6 mg/kg y de 4 mg/kg respectivamente en la muestra de tomate.

b) Se tiene una muestra que contiene inmunoglobulina M (IgM) de 970 kDa (desenrollada, agregados y globular) ¿Cuál será el orden de elución de esta muestra en una cromatografía de exclusión por tamaño? **JSR**.

El orden de elución será el siguiente:

① Agregados de IgM \rightarrow ② IgM desenrollada \rightarrow ③ IgM globular

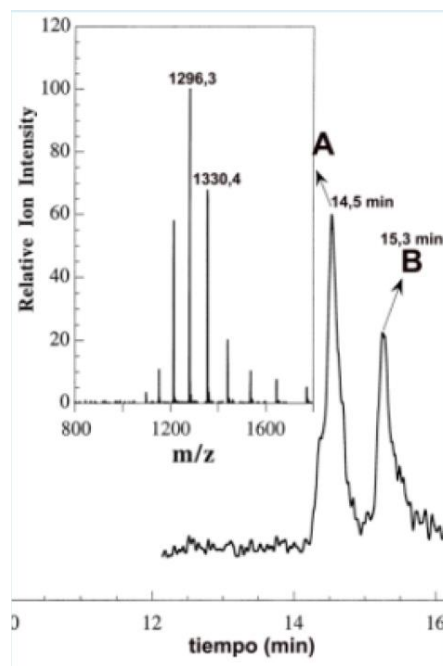
Esto es porque los agregados de IgM, es decir, muchas IgM “pegadas” entre sí, van a tener un radio hidrodinámico mucho mayor que una IgM en estado nativo. Luego la IgM desenrollada va a tener un radio hidrodinámico mucho mayor que la IgM globular.

EUI PREGUNTA 1:

Una muestra biológica conteniendo Rituximab (Ab, un anticuerpo monoclonal recombinante quimérico) se analizó empleando un método de cromatografía líquida de fase reversa con detección por espectrometría de masas (ESI-MS), para poder cuantificar los diferentes tipos de Ab. El Ab puede variar en la cantidad de residuos galactosa (GAL) de la cadena terminal.

En la figura se muestra el cromatograma resultante mostrando los picos A y B, correspondientes a Rituximab con diferencias en la cantidad de GAL. Para el pico A se muestra el espectro de masas respectivo.

Sobre la base de estos datos y los de ambos gráficos responda justificando su respuesta:



a) ¿Qué polaridad tienen la fase estacionaria y la fase móvil?

La cromatografía fue realizada en fase reversa, entonces la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar.

b) ¿Qué condiciones experimentales puede variar para mejorar la resolución del cromatograma?

- Variar el factor de retención: Se puede variar el factor de retención de alguna de los Ab para lograr una mejor separación de los picos. Esto se puede conseguir modificando las propiedades de la fase móvil o estacionaria, así como variar la temperatura.

- Aumentar el factor de selectividad. No varía mucho el tiempo de retención de los analitos, pero si mejora mucho la resolución ya que los picos no están tan solapados.

- Aumentar el número de platos teóricos: Al aumentar el número de platos teóricos va a haber mayor cantidad de equilibrios analito – Fase estacionaria. Esto no va a aumentar los tiempos de retención, pero si mejorará mucho la resolución de los picos.

c) ¿Cuál es la carga del ion molecular para cada uno de los picos cuya relación m/z se indica en el espectro de masas? ¿Qué masa promedio tiene el anticuerpo?

Para calcular la carga de los iones moleculares de los picos indicados en el espectro de masas se tiene que realizar un sistema de ecuaciones:

$$\begin{cases} 1296,3 = (m + z_1)/z_1 \\ 1330,4 = ((m + (z_1 - 1))/(z_1 - 1)) \end{cases} \quad \text{Siendo } z_1 \text{ la carga del pico de } 1296,3 \text{ m/z}$$

Ahora la resolvemos por el método de igualación. Para esto despejaremos la masa (m) en ambas ecuaciones para igualarlas:

$$\begin{aligned} 1296,3 &= (m + z_1)/z_1 & 1330,4 &= ((m + (z_1 - 1))/(z_1 - 1)) \\ m &= 1296,3 \times z_1 - z_1 & m &= 1330,4z_1 - 1330,4 - z_1 + 1 \\ m &= 1295,3z_1 & m &= 1329,4z_1 - 1329,4 \end{aligned}$$

Ahora que despejamos m en ambas ecuaciones, las podemos igualar para despejar la carga z_1 :

$$\begin{aligned} 1295,4z_1 &= 1329,4z_1 - 1329,4 \\ 1295,4z_1 - 1329,4z_1 &= -1329,4 \\ -34,1z_1 &= -1329,4 \\ z_1 &= -1329,4 / -34,1 \\ z_1 &= 39 \end{aligned}$$

Con esto obtenemos que el pico de $m/z = 1296,3$ tiene una carga de 39, mientras que el pico de $m/z = 1330,4$ tiene una carga de 38.

Con este dato de la carga ahora podemos calcular la masa del anticuerpo:

$$\begin{aligned} 1296,3 &= (m + z_1)/z_1 & 1330,4 &= ((m + (z_1 - 1))/(z_1 - 1)) \\ 1296,3 &= (m + 39)/39 & 1330,4 &= (m + 38)/38 \\ m &= 1296,3 \times 39 - 39 & m &= 1330,4 \times 38 - 38 \\ m &= 50516,7 \text{ Da} & m &= 50517,2 \text{ Da} \end{aligned}$$

La masa promedio del anticuerpo es de **50516,95 Da**

d) ¿Qué otro tipo de cromatografía líquida podría utilizar para separar este tipo de compuestos?

Otra cromatografía que se podría utilizar sería una cromatografía de afinidad, que usen moléculas orgánicas que pueden unirse específicamente a las partes donde están los residuos de galactosa. Otra cosa que se podría hacer es que si los residuos de galactosa cambian considerablemente el tamaño hidrodinámico de los anticuerpos podría realizarse una cromatografía de exclusión por tamaño, pero no lo veo muy factible.

EUI PREGUNTA 2:

a) ¿Cuál es el contenido de A y B expresado en gramos en la siguiente muestra problema? Datos: Para el análisis se tomó 1,0 g de la muestra y se realizó una extracción con una mezcla de solventes. Luego, se agregaron 250 mg de un estándar interno, se filtró y se completó a un volumen final de 100 mL (**Solución X**). Por otro lado, se prepararon 50 mL de una solución testigo (**Solución T**) conteniendo 250 mg de A, 250 mg de B y 100 mg de estándar interno. Ambas soluciones se analizan por HPLC (Fase móvil: MeOH 50%: agua 50%) obteniendo los siguientes resultados:

		Solución T	Solución X
Compuesto	t_R /min	Área	Área
A	15,2	35000	34000
B	16,5	104000	168000
Estándar interno	13,2	17000	40000

Nota: la muestra puede contener otros compuestos diferentes de A y B, no solubles en el solvente de extracción. El t_M es 2 min.

Para calcular el contenido de A y B en la muestra problema usaremos el método de estándar interno (Ei):

La concentración de A, B y el Ei en la solución T es:

Estándar Interno	Compuestos A y B
50 mL — 100 mg	50 mL — 250 mg
1 mL — 2 mg → Solución T: [Ei] = 2 mg/mL	1 mL — 5 mg → Solución T: [A]=[B] = 5 mg/mL

Solución T

Compuesto A

$$D'_{RFA} = \frac{\text{área A} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [A]} = \frac{35000 \times 2 \text{ mg/mL}}{17000 \times 5 \text{ mg/mL}} = \frac{70000}{85000} = 0,8235$$

Compuesto B

$$D'_{RFB} = \frac{\text{área B} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [B]} = \frac{104000 \times 2 \text{ mg/mL}}{17000 \times 5 \text{ mg/mL}} = \frac{208000}{85000} = 2,4471$$

Ahora con los valores de factor de respuesta de los compuestos A y B obtenidos a partir de la solución T, podemos usarlos para saber la concentración en la solución X:

Solución X

En esta solución el estándar interno está en otra concentración, por lo que hay que calcular la nueva concentración:

100 mL — 250 mg

1 mL — 2,5 mg → En solución X: [Ei] = 2,5 mg/mL

Compuesto A

$$D'_{RFA} = \frac{\text{área A} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [A]} \rightarrow [A] = \frac{\text{área A} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times D'_{RFA}} = \frac{34000 \times 2,5 \text{ mg/mL}}{40000 \times 0,8235} = 2,580 \text{ mg/mL}$$

Compuesto B

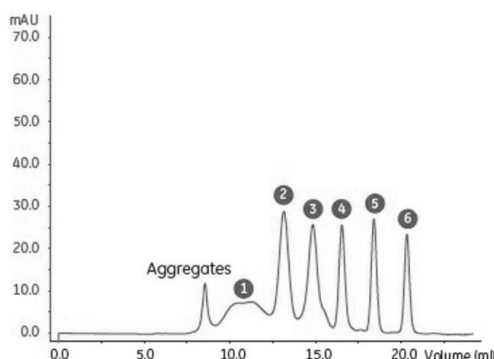
$$D'_{RFB} = \frac{\text{área B} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times [B]} \rightarrow [B] = \frac{\text{área B} \times [Ei]}{\text{área Ei} \times D'_{RFB}} = \frac{168000 \times 2,5 \text{ mg/mL}}{40500 \times 2,4471} = 4,238 \text{ mg/mL}$$

Estos valores de concentración corresponden a las concentraciones de A y B en la solución X, entonces el valor en la muestra es de:

Compuesto A	Compuesto B
1 mL — 2,580 mg	1 mL — 4,238 mg
100 mL — 258 mg	100 mL — 423,8 mg

En 1g de la muestra problema hay 258 mg del compuesto A y 423,8 mg del compuesto B. Los otros 318,2 mg de la muestra pueden corresponder a otros compuestos no solubles que no fueron detectados por la cromatografía.

b) El siguiente cromatograma de exclusión por tamaños corresponde a una muestra de biomoléculas que contiene: Ferritina (490 kDa); Vitamina B12 (1355 Da); BSA (66 kDa); IgM (970 kDa) y sus agregados; Mioglobina (17 kDa) y Tiroglobulina (440 kDa). **Indique la identidad de los picos marcados como 3 y 5 justificando su respuesta.**



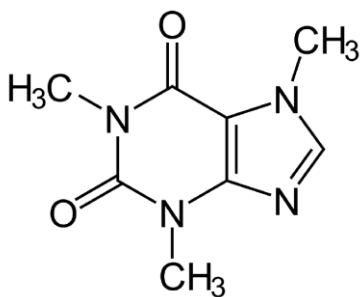
Lo que se puede hacer para facilitar la asignación de los compuestos a los picos es la de ordenarlos según su peso molecular, sabemos que los compuestos de mayor tamaño van a tener tiempos o volúmenes de elusión menores que los de menor tamaño.

Compuesto	IgM	Ferritina	Tiroglobulina	BSA	Mioglobina	Vitamina B12
PM	970kDa	490 kDa	440k Da	66 kDa	17 kDa	1355 Da
Señal	①	②	③	④	⑤	⑥

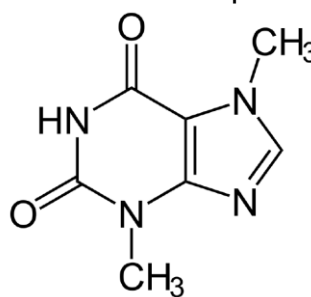
La identidad del pico 3 corresponde a la tiroglobulina y el pico 5 a la mioglobina.

EUI PREGUNTA 3:

La cafeína es un compuesto orgánico que se encuentra tanto en las hojas de té como en el café. En las hojas de té, representa un 2% a 3,5% en peso. La teobromina es un metabolito de la cafeína, así como también un compuesto que está presente naturalmente en el cacao que se utiliza para preparar chocolate, representando un 1% de la masa del cacao. A continuación, se presentan las estructuras químicas de ambos compuestos.



cafeína

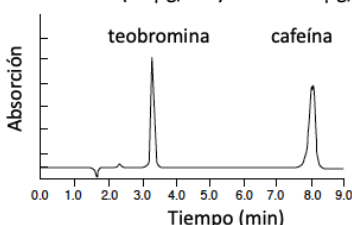


teobromina

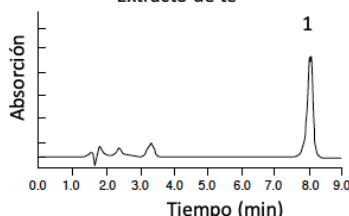
Para satisfacer los requisitos legales y de etiquetado es necesario poder cuantificar el contenido de estos compuestos en los productos comerciales. Para ello, en un laboratorio, se realizó una extracción desde las hojas de té o desde chocolate a partir de una masa equivalente y volúmenes finales de extracto equivalentes, para su posterior análisis por cromatografía líquida, empleando una columna C-18 de 15 cm de longitud y como fase móvil se utilizó ACN: (0.5% NH_4NO_3)_(ac) en una proporción 12:88. Se realizaron tres experimentos cuyos cromatogramas se presentan a continuación.

Nota: ACN= acetonitrilo; u.a = unidades arbitrarias

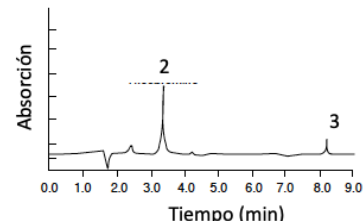
Solución estándar
Teobromina (20 $\mu\text{g/mL}$ y cafeína 40 $\mu\text{g/mL}$)



Extracto de té



Extracto de chocolate



En base a la información brindada, responda **justificando su respuesta** para cada caso

a) ¿Qué tipo de cromatografía líquida se realizó? ¿Cuál fue el tipo de detector utilizado?

Se realizó una cromatografía de adsorción en fase reversa, ya que la fase estacionaria es apolar (columna de C18) y la fase móvil es polar (se usó acetonitrilo que es polar).

El detector que se utilizó fue uno de fluorescencia, ya que en los gráficos se observa que la respuesta de detector es la absorción (no confundir con absorbancia de los detectores UV-visible).

b) Si el área bajo la curva en la solución estándar es 68000 u.a para teobromina y 65000 u.a para cafeína; en el extracto de té es 68000 u.a para el pico 1 y en el extracto de chocolate es 30000 u.a para pico 2 y 10000 u.a para el pico 3

I. ¿El factor de respuesta del detector para cafeína y teobromina es igual? Nota: puede usar a cafeína como referencia.

No, los factores de respuesta no son iguales, ya que si fueran iguales se debería ver que el área bajo la curva para la cafeína sea el doble que el de la teobromina (porque hay el doble de cafeína que de teobromina en esa cromatografía), sin embargo, vemos que las áreas son bastante similares, por lo que los factores de respuesta son diferentes.

II. ¿El extracto de té es más rico en teobromina o cafeína? ¿Y el de chocolate?

El extracto de té tiene mayor cantidad de cafeína que de teobromina, ya que se observa un pico de gran área que corresponde a la cafeína, comparándolo con el cromatograma de la solución estándar, pero tiene un pico muy poco pronunciado para la teobromina, lo que indica que hay muy poca cantidad de este.

En el caso del chocolate hay mayor cantidad de teobromina que de chocolate, ya que, si consideramos las áreas de los picos 2 y 3 como proporcionales a la concentración de los mismos, entonces habrá aproximadamente tres veces más teobromina que cafeína en el chocolate.

c) ¿Podría utilizar un detector de masas acoplado al cromatógrafo líquido? ¿Cuál sería la fuente de ionización adecuada en ese caso?

Si podría utilizar un detector de masas acoplado al cromatógrafo líquido, La fuente de ionización adecuada sería MALDI que es desorción/ionización laser asistida por matriz: es una técnica analítica de ionización muy utilizada para biomoléculas, el analito se ya que, con un exceso del compuesto de la matriz que generalmente son derivados de ácidos cinámicos que absorben la energía en el UV y se vaporiza, trabajando con péptidos, proteínas y otros que se protejan, el cual absorbe energía en el UV.

d) En relación a su respuesta anterior en el inciso c, ¿Cuál sería el mecanismo de ionización que tendría lugar?

La muestra se irradia con un láser. La matriz se vaporiza llevando al analito. Lo que ocurre es PROTONACIÓN o CATIONIZACIÓN y se puede utilizar con compuestos de alto PM. La concentración de la muestra puede ser de 20-50 microM (5microL). En general se observan iones con multicarga, la mayor carga se observa a menores relaciones masa carga, en un menor intervalo puedo detectar.

EUI PREGUNTA 4:

a) Se realiza una cuantificación en una muestra problema (solución X) de dos compuestos (A y B) por HPLC (fase reversa) con detección UV-visible empleando el método de estándar interno. Una solución testigo conteniendo 1 mg/mL de cada compuesto también se analizó bajo los mismos parámetros experimentales. El valor de t_M fue 2 min. En la tabla se presentan los resultados obtenidos. A partir del análisis de estos datos, responda:

I) Para aumentar la resolución entre los picos, ¿En qué sentido modificaría el factor de retención (k)? ¿Cómo lo podría lograr?

Se podría aumentar el factor de retención para uno de los compuestos, de esta forma los picos en los cromatogramas estarían más separados. Esto se podría lograr modificando la polaridad del solvente, aumentándola ya que la cromatografía es en fase reversa.

II) Sin realizar cálculos, ¿Cuál de los dos compuestos (A o B) tienen el factor de respuesta en relación al estándar interno mayor a 1? La solución X, ¿Presenta una concentración para A y para B mayor o menor a 1 mg/mL?

		Solución T	Solución X
Compuesto	t_R/min	Área	Área
A	5,2	35227	33970
B	6,5	104530	167945
<i>Estándar interno</i>	3,2	40500	

Solución Estándar: En la solución estándar el compuesto B tiene un factor de respuesta mayor a 1 con respecto al estándar interno, esto es porque el área del pico del compuesto B es mayor que el área del estándar interno y la concentración de todos los compuestos es la misma (1mg/mL). El compuesto A en cambio tendrá un factor de respuesta en relación al estándar interno menor a 1.

Solución X: El compuesto A tendrá una concentración menor a 1mg/ml, sabiendo que el área es proporcional a la concentración, y que el estándar interno tiene 1mg/mL de concentración, como A tiene menor área que el Ei, tendrá menor concentración que este, es decir que $[A] < 1\text{mg/mL}$.

En cambio, el compuesto B, al tener un área mucho mayor al del estándar interno, como esta área es proporcional a la concentración, va a tener una concentración mucho mayor al del estándar interno, es decir que $[B] > 1\text{mg/mL}$.

b) Se analiza por cromatografía de exclusión por tamaños una muestra que contiene (1) Inmunoglobulina G (IgG: 150 kDa); (2) tiroglobulina (660 kDa); (3) dímero de IgG, (4) agregados de tiroglobulina y (5) aniones fosfatos. ¿Cuál será el orden de elución esperado?

El orden de elución esperado sería el siguiente:

1^{ro} Agregados de tiroglobulina

2^{do} Tiroglobulina

3^{ro} dímero de IgG

4^{to} IgG

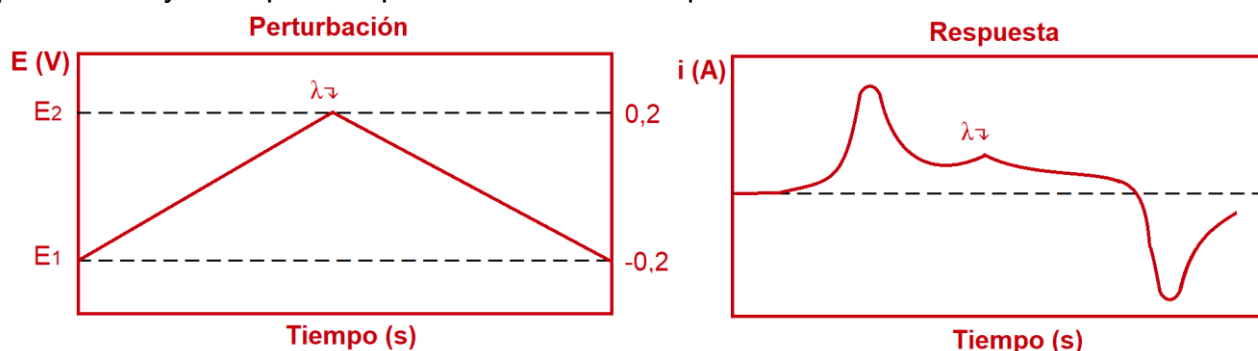
5^{to} aniones fosfato

TEÓRICO 4: TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

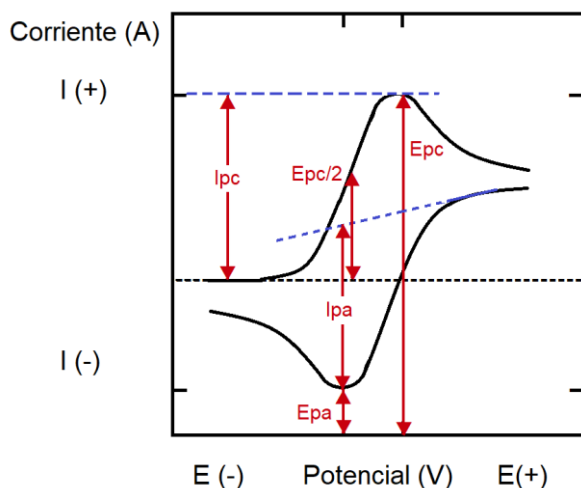
• TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS

PREGUNTA 1:

a. Para voltamperometría cíclica esquematice la perturbación que se debe aplicar en un perfil E vs t y la respuesta que se observa en un perfil I vs t.



b. Señale en el siguiente voltamperograma cíclico de un sistema reversible los parámetros que se pueden extraer. ¿Qué otros parámetros de importancia se pueden obtener indirectamente a partir de ellos? Justifique brevemente su respuesta.



Epc: Potencial de pico catódico o de reducción.

Epa: Potencial de pico anódico o de oxidación.

Ipa: Intensidad de corriente de pico anódico.

Ipc: Intensidad de corriente de pico catódico

Parámetros de importancia que se pueden obtener indirectamente:

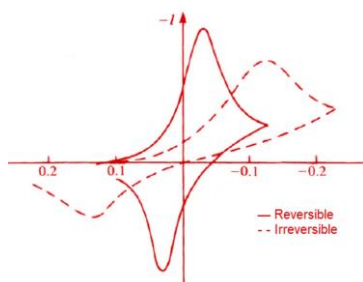
- **Diferencia de potenciales de pico (ΔE)**: Es la diferencia entre los potenciales de los picos catódicos y anódicos: $\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = 58 \text{ mV}$ (valor teórico) ó $57 - 60 \text{ mV}$ (valor experimental)
- **Ancho de pico y su dependencia con la velocidad**: $|E_p - E_p/2| = 59/n \text{ mV}$

Con respecto a la velocidad, el potencial de pico **NO** debe cambiar con la velocidad, si se observa un cambio entre el potencial de pico con respecto al tiempo, es probable que estemos en un caso de un proceso irreversible. Eso sumado a otros parámetros.

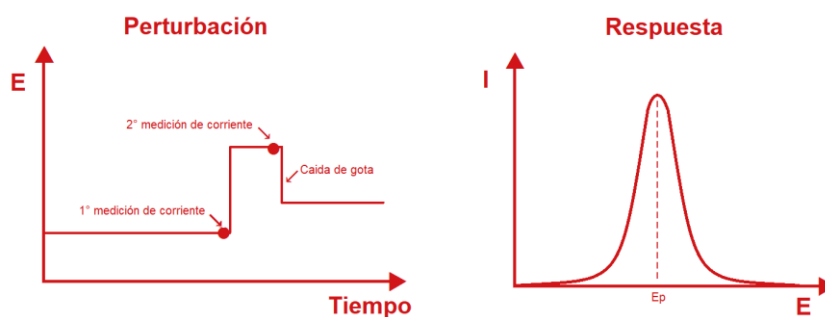
- **Cociente entre las corrientes de pico**: $I_{pc} / I_{pa} = 1$
- **El intervalo de potencial en el que ocurre el proceso de óxido – reducción**

c. ¿Cómo diferenciaría un proceso reversible de uno irreversible? Justifique su respuesta y esquematice en un gráfico de I vs. E.

Se podría diferenciar un proceso reversible de otro observando si el potencial de los picos cambia a medida que se aumenta la velocidad de barrido, si hay cambio es por que probablemente estemos frente a un proceso irreversible, esto se puede ver en que los picos catódicos y anódicos se separan y los picos son cada vez menos pronunciados y tienden a desaparecer:



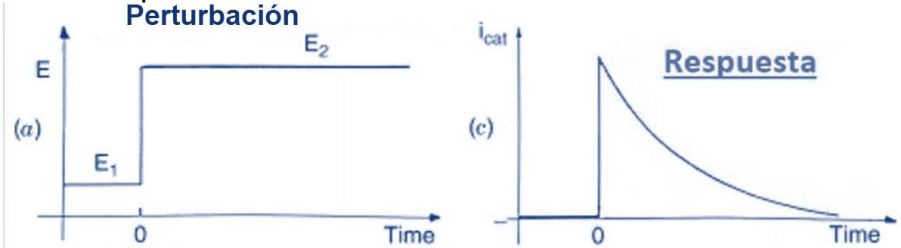
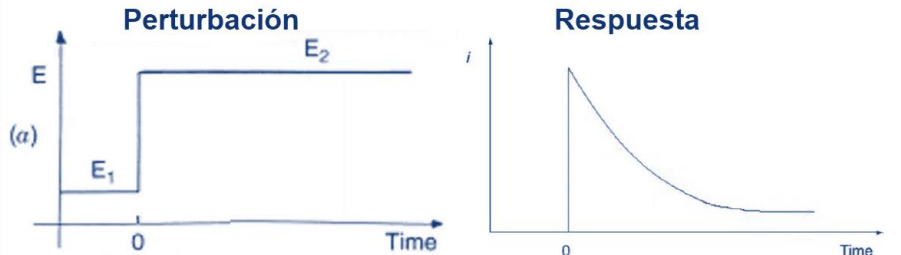
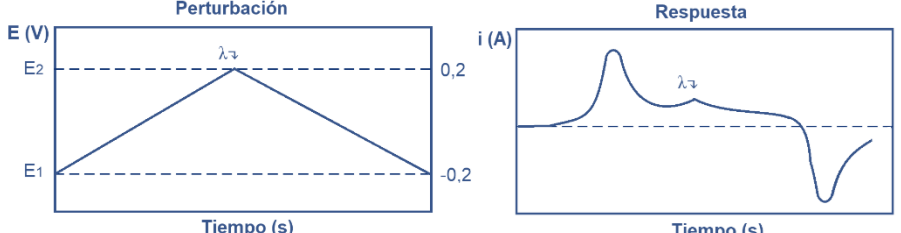
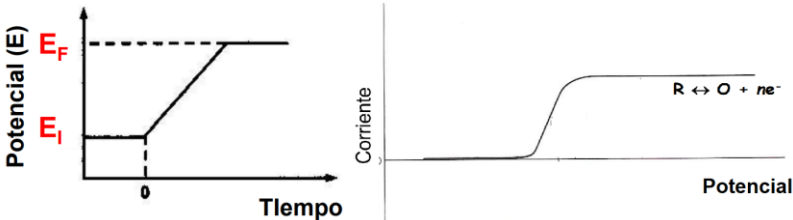
d. Esquematice la perturbación aplicada y la respuesta corriente vs. potencial en la técnica de **pulso diferencial**.



e. Indique las ventajas de las técnicas de pulso diferencial con respecto a la polarografía clásica.

Ventajas:

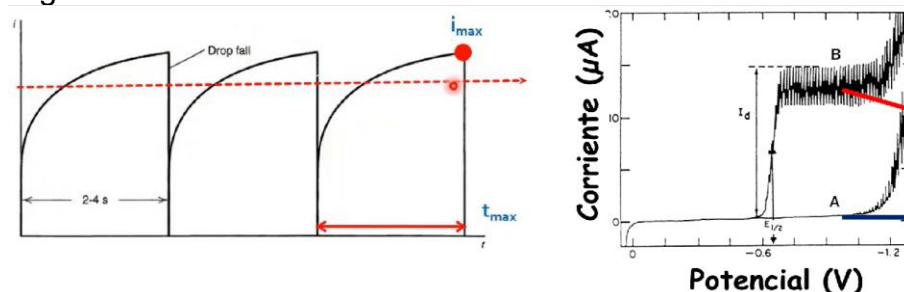
- Tiene mayor límite de detección que las otras técnicas (10^{-7} a 10^{-8} M)
- Tiene una mayor resolución (0,05 V vs 0,2 V de la polarografía clásica)
- La intensidad de corriente I_c tiene siempre la misma magnitud (diferencia) por lo que tiene mayor sensibilidad.
- La diferencia de la intensidad del pico es proporcional a la concentración del analito.

TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS
TÉCNICAS DE POTENCIAL CONTROLADO	
Cronoamperometría	<p>Técnica de potencial controlado en condiciones de solución estática (sin agitar). Se aplica un potencial que provoca la reacción completa del analito, como respuesta se ve un salto de corriente que cae hasta el valor 0.</p> 
Amperometría	<p>Técnica de potencial controlado en condiciones de convección forzada (agitación). Se aplica un potencial que provoca la reacción completa del analito, como respuesta se ve un salto de corriente que cae hasta un valor de corriente constante mayor a 0. Se usa para realizar curvas de calibración.</p> 
TÉCNICAS DE BARRIDO DE POTENCIAL	
Voltamperometría cíclica	<p>Condiciones de solución estática (sin agitación). Se aplica un barrido de potencial desde un valor E1 a un valor E2, como respuesta la corriente irá aumentando hasta llegar a un valor máximo, donde luego caerá por efecto difusional. Cuando se llega a E2 (λ) se realiza la inversión del barrido y se vuelve a E1 u otro valor de potencial. Se usa para la determinación diagnóstico de potenciales.</p> 
Voltamperometría hidrodinámica	<p>Condiciones de convección forzada (con agitación). Se aplica un barrido de potencial y como respuesta se obtiene un valor de corriente que llegará a un máximo, pero no decaerá como en la voltamperometría cíclica, sino que permanece constante. Se usa para la determinación diagnóstico de potenciales.</p> 

Polarografías

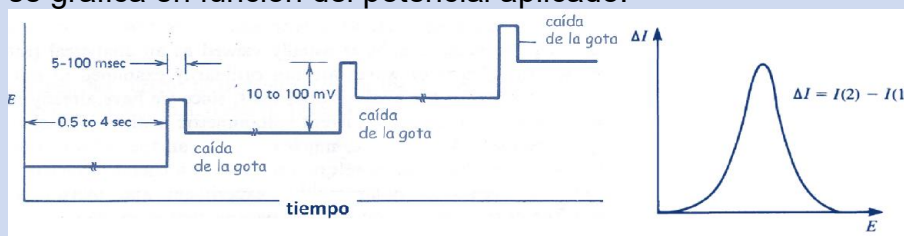
Polarografía clásica

Condiciones de convección inducida por el crecimiento de la gota de mercurio. A diferencia de la voltamperometría cíclica que el incremento del potencial es lineal, en la polarografía se hacen pequeños escalados de potencial, denominado rampa lenta, donde cada oscilación es el crecimiento y caída de la gota, y a medida que se van haciendo estos escalados de potencial las oscilaciones de la corriente van a ir aumentando en valor hasta llegar a una corriente límite.



Polarografía de pulso diferencial

Se aplican pulsos de magnitud fija superpuestos sobre una rampa de barrido lineal. La corriente se mide dos veces, justo antes de la aplicación del pulso (1) y aproximadamente 40 ms después de aplicado (2). La primera corriente se sustrae instrumentalmente de la segunda y esa diferencia de corriente se grafica en función del potencial aplicado.



Diferencias entre la voltamperometría de pulso diferencial:

- El potencial de base aplicado durante la mayor parte de tiempo de vida de la gota no es constante de una gota a otra.
- La amplitud del pulso es 10-100 mV y se mantiene constante respecto del potencial de base.
- La corriente se muestrea dos veces durante el tiempo de vida de la gota, una inmediatamente antes del pulso y la otra justo antes de la caída de la gota.
- El voltamperograma consiste en el gráfico de la diferencia de corrientes versus el potencial de base.

Polarografía de onda cuadrada

Se aplica una onda cuadrada superpuesta a una rampa de potencial en forma de escalera. La corriente es medida 2 veces durante cada ciclo de onda cuadrada, al final del pulso directo y al final del pulso inverso, y en cada pulso inverso se produce la reacción inversa. La gran ventaja de SWV es la velocidad de obtención del voltamperograma: un barrido puede obtenerse en pocos segundos.

• BIOSENSORES

PREGUNTA 1:

a. En un cuadro realice un análisis comparativo entre los biosensores enzimáticos y los biosensores de afinidad en cuanto a:

- i. Molécula de biorreconocimiento.
- ii. Evento de biorreconocimiento.
- iii. Obtención de la señal analítica.

	<i>Molécula de biorreconocimiento</i>	<i>Evento de biorreconocimiento</i>	<i>Obtención de la señal analítica</i>
Biosensores de afinidad	<i>ácidos nucleicos, antígenos, anticuerpos, receptores, lectinas, aptámeros o péptidos.</i>	<i>NO HAY UNA REACCIÓN CATALÍTICA, el biorreconocimiento está dado simplemente por una asociación de afinidad.</i>	<i>Directa: Cambios en la interacción molécula – target. Indirecta (indicador redox) Usando un esquema de amplificación.</i>
Biosensores enzimáticos	<i>Enzimas</i>	<i>Evento redox por acción deshidrogenasa u oxidasa</i>	<i>Midiendo una corriente o un cambio de potencial.</i>

b. Se requiere desarrollar un biosensor electroquímico para estudiar la interacción del compuesto A con dsDNA. Se sabe que:

- A es capaz de **intercalar** en la doble hebra
- A se oxida sobre carbono vítreo ($E_p = 0,600 \text{ V}$)
- Los residuos guanina y adenina del dsDNA se oxidan sobre carbono vítreo a $0,900 \text{ V}$ y $1,100 \text{ V}$

Respectivamente. Sobre la base de esa información, indique J.S.R.:

I- ¿Cómo construiría el biosensor?

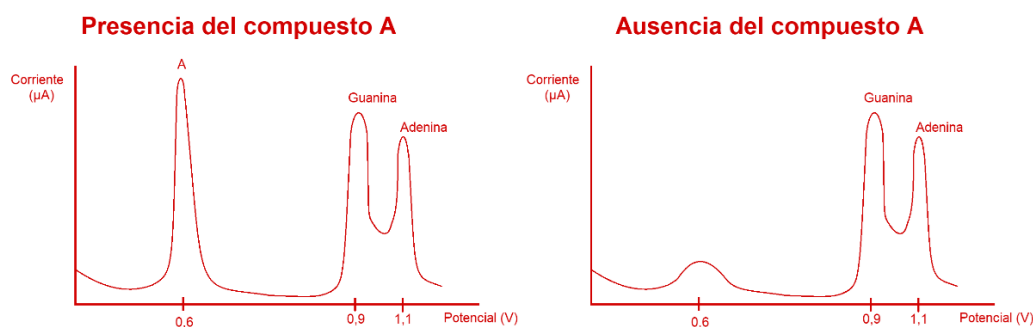
Inmovilizaría un ssDNA de unas 40-50 pares de bases mediante enlaces covalentes sobre un electrodo de carbono vítreo de forma tal que las bases queden hacia afuera para interaccionar con la cadena complementaria.

II- ¿Qué señales esperaría obtener en un voltamperograma de barrido lineal en presencia y en ausencia del compuesto? Construya un voltamperograma de barrido lineal de manera esquemática.

En un voltamperograma de barrido lineal, en ausencia del compuesto A solo esperaría ver dos señales, correspondientes a las señales de oxidación de los residuos de guanina y adenina a los $0,9 \text{ V}$ y $1,1 \text{ V}$ respectivamente.

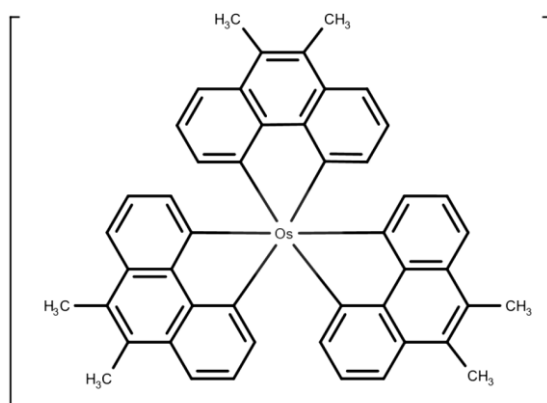
En presencia del compuesto A, como este se intercalará entre los residuos de la doble hebra de ADN formada, y en los surcos del ADN, es como si se estuviera pre concentrando

sobre la superficie del electrodo de carbono vítreo, por lo que es esperable que la señal de corriente a los 0,6V sea mucho mayor. Además, vería las señales de oxidación de las bases de guanina y adenina a los 0,9V y 1,1V respectivamente.



III-De acuerdo con ese hipotético voltamperograma, ¿qué señal escogería para evaluar la interacción del compuesto con el dsDNA? J.S.R.

Compuesto A:



La señal que elegiría para evaluar la interacción del compuesto A es la señal de corriente a los 0,600V, ya que esta es la correspondiente a la señal de oxidación de este compuesto, y se puede ver claramente que en ausencia del compuesto A no se aprecia una señal de corriente, mientras que en presencia de este compuesto la señal de oxidación es muy intensa.

c. Explique en qué consisten los métodos de "stripping" o de redisolución. Dé un ejemplo.

Los stripping métodos de stripping son técnicas que consisten en dos pasos principales:

- 1) Una preconcentración de nuestro analito de interés sobre la superficie del electrodo, ya sea por la aplicación de un potencial de reducción, o por la adsorción del analito a la superficie, asegurándonos de que la mayoría del analito se encuentra sobre la superficie.
- 2) Luego se realiza el stripping como tal, que consiste en la oxidación o reducción del analito preconcentrado en la superficie del analito, de modo que cuando se alcance el potencial de la cupla redox del analito se ve un pico que sería nuestra señal.

Un ejemplo de una técnica de stripping es el "Stripping voltamperométrico anódico (ASV)", el cual consiste en preconcentrar el analito sobre la superficie del electrodo mediante la aplicación de un potencial de reducción, de forma tal que el analito reducido se acumule en la superficie del electrodo. Luego de esta preconcentración, se aplica un potencial de oxidación. Entonces cuando uno haga un barrido anódico de potencial, se tiene una corriente de base (corriente capacitiva), y **cuando el potencial alcanza el potencial de la cupla redox de ese metal, vamos a ver el pico de corriente de oxidación.**

PREGUNTA 2:

a) Indique que cuidados se debe tener al inmovilizar el elemento de biorreconocimiento en un transductor electroquímico. Señale tres estrategias de inmovilización.

Uno al inmovilizar el elemento de biorreconocimiento, tiene que tener el cuidado de que quede orientado hacia el lado que va a interactuar con el analito, y que el proceso de inmovilización no cambie las propiedades químicas de reconocimiento. Además, si se usa una proteína o enzima como elemento de biorreconocimiento, se tiene que evitar que esta se desnaturalice durante la inmovilización.

Ejemplos de estrategias de inmovilización son: Adsorción, Entrecruzamiento, Unión por enlace covalente, Interacción biotina-avidina, etc.

PREGUNTA 3:

a) Se necesita cuantificar los siguientes analitos empleando biosensores electroquímicos:

i) Secuencia de ADN de una porción de un gen que codifica para cáncer de mama.

ii) Una proteína que se usa como biomarcador para la detección de obesidad. Indique, J.S.R.

I) ¿Qué elemento de biorreconocimiento emplearía en cada caso y cómo prepararía el biosensor?

i) Como elemento de biorreconocimiento elegiría una molécula de ADN complementario a la porción del gen que codifica para cáncer de mama. El biosensor lo prepararía inmovilizando una molécula de ADN simple cadena en la superficie de un electrodo que exponga grupos amino o carboxilo, de forma que se puedan formar enlaces covalentes con el fragmento de ssDNA. La secuencia del fragmento sería complementaria a la porción de gen del cáncer de mama, y la unión del electrodo-ssDNA se realizaría de modo que las bases queden expuestas y sean capaces de hibridizar con su secuencia complementaria.

ii) En este caso podría usar un aptasensor obtenido por la metodología SELEX que sea reconozca específicamente la proteína que se usa como biomarcador de la obesidad. El biosensor lo prepararía inmovilizando este aptasensor en la superficie de un electrodo modificado que exponga grupos amina o carboxilos, de esta forma se podría unir al biosensor a partir de un enlace covalente con el aptámero.

II) ¿Cuál sería la señal analítica que obtendría en cada caso?

i) Usaría un indicador redox que intercalara entre las bases de un fragmento de ADNds, de forma que si se realiza la hibridización ADN-ADN el indicador redox se intercalaría entre las bases, esto de cierto modo es como si se preconcentrara en la superficie del electrodo, entonces al aplicar un potencial de reducción u oxidación adecuado, este indicador realizaría se oxidaría o reduciría. Mientras más fragmentos de ADN se unen al biosensor, más ADN doble cadena habría, por lo que hay mayor intercalamiento del indicador y mayor reacción redox del mismo, lo que se traduce en mayor señal analítica de reducción u oxidación.

ii) En este caso la señal analítica estaría dada por la oxidación de las bases de guanina y adenina del aptasensor. Entonces si no hay unión entre la proteína y el aptasensor, la conformación del aptasensor no cambia y se produce la oxidación de las bases de guanina y adenina, que sería la señal analítica, si se produce la unión entre la proteína y el aptasensor, este último cambia de conformación de forma tal que ahora no se puede realizar la oxidación de las bases de guanina y adenina, por lo que la señal aumenta.

Entonces para cuantificar la proteína, la señal analítica será inversamente proporcional a la concentración de la misma. Es decir, a menor señal de oxidación de guanina, mayor interacción proteína-aptasensor, y por ende mayor concentración de proteína.

c) Sobre la voltamperometría cíclica, indique JSR qué tipo de información proporciona y esquematice un voltamperograma señalando los parámetros de interés.

La voltamperometría cíclica puede proporcionar información de diagnóstico de los potenciales de oxidación y reducción de un compuesto desconocido en una muestra

Un voltamperograma cíclico proporciona información de:

Epc: Potencial de pico catódico o de reducción.

Epa: Potencial de pico anódico o de oxidación.

Ipa: Intensidad de corriente de pico anódico.

Ipc: Intensidad de corriente de pico catódico.

PREGUNTA 4:

Se necesita efectuar la determinación de un bioanalito presente en una muestra compleja mediante el empleo de un biosensor enzimático. **Sabiendo que:**

I) La muestra contiene, además del bioanalito de interés, dos posibles interferentes, cuyos Voltamperogramas cíclicos se muestran en la Figura 1 (Interferente 1 en línea cortada e Interferente 2 en línea llena).

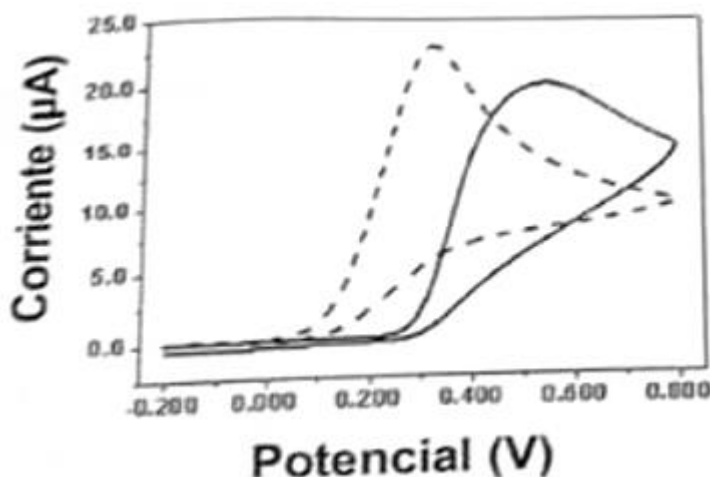
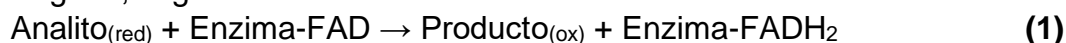


Figura 1. Voltamperogramas cíclicos para el interferente 1 (línea cortada) e interferente 2 (línea llena) ambos en concentración $1,0 \times 10^{-3}$ M en solución "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40

II) Se cuenta con una enzima (Enzima-FAD) que es capaz de catalizar la oxidación del bioanalito según la reacción 1, cuya regeneración tiene lugar en presencia del mediador natural, oxígeno, según la reacción 2:



III) La señal analítica se obtiene a partir del peróxido de hidrógeno formado.

IV) Los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos para peróxido de hidrógeno 0,010 M son los presentados en la Figura 2, empleando un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral (cuadrados vacíos, electrodo a) y un compuesto de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0% P/P de iridio (triángulos llenos, electrodo b).

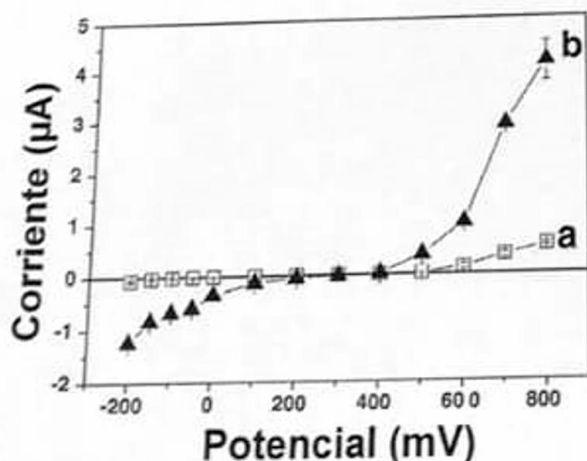


Figura 2. Voltamperogramas hidrodinámicos para peróxido de hidrógeno 0,010 M en solución de "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40 obtenidos sobre un compuesto de grafito (70,0 % P/P) y aceite mineral (30,0 % P/P) (cuadrados vacíos, electrodo a, CPE) y un compuesto de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0% P/P de iridio (triángulos llenos, electrodo b, CPE-Ir).

a) Indique J.S.R. qué potencial de trabajo seleccionaría para efectuar la determinación amperométrica del bioanalito en la muestra de interés si empleara el electrodo a conteniendo 10,0% P/P de Enzima-FAD (CPE-Enzima-FAD).

b) Indique, J.S.R., cómo procedería, una vez seleccionado el potencial de trabajo, para obtener la curva de trabajo o calibrado correspondiente empleando el electrodo seleccionado.

c) Haga una comparación de la respuesta que obtendría empleando CPE-Enzima-FAD y CPE- Ir-Enzima-FAD en cuanto a sensibilidad y selectividad.

EUI PREGUNTA 1:

a) Indique J.S.R. cuál es el objetivo fundamental de las técnicas de stripping o de redisolución.

El objetivo principal es el de la cuantificación de un analito en una muestra problema mediante la preconcentración del analito sobre un electrodo para luego medir la corriente de oxidación o reducción del analito.

b) Se necesita diseñar un experimento que permita efectuar la determinación de dos cationes de metales pesados mediante stripping voltamperométrico (o redisolución voltamperométrica), Indique, J. S. R.

1) El tipo de stripping voltamperométrico (o redisolución voltamperométrica) que emplearía y su fundamento.

*El tipo de stripping que emplearía es un **stripping voltamperométrico anódico (ASV)**. Esta técnica consiste en la reducción de iones metálicos sobre la superficie de un electrodo, en este caso serían los cationes de metales pesados, a los cuales se les aplicará un potencial de reducción para que pasen de iones metálicos a metales. Luego de que estos cationes metálicos se preconcentren en la superficie del electrodo, se les aplicará un potencial de oxidación para que se oxiden de metal a catión metal, el potencial de oxidación debe ser lo suficientemente alto para que oxide a los dos cationes metálicos. Este último paso de oxidación es el stripping en sí, y puede ser realizado mediante un proceso de voltamperometría cíclica o una voltamperometría de pulso diferencial, siendo esta última la que da mejores resoluciones en las señales.*

II) La condición que se debe cumplir para que los cationes puedan ser cuantificados mediante esa técnica de stripping o de redisolución.

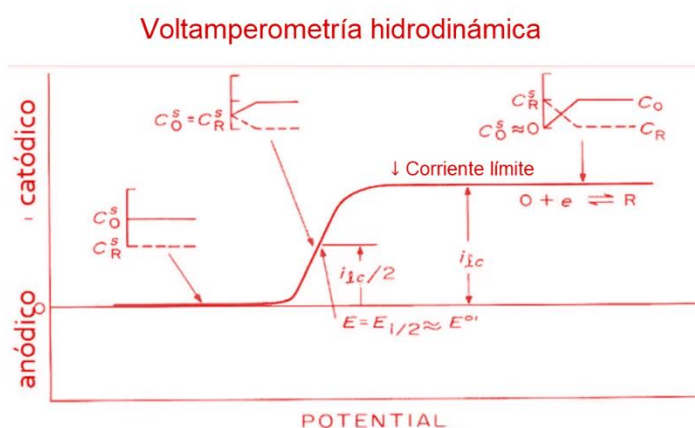
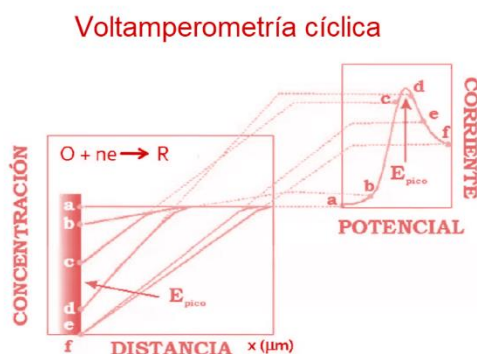
Es importante que el tiempo y potencial de deposición del catión metálico a metal sobre la superficie del electrodo sea suficiente para que la mayor cantidad de muestra posible quede preconcentrada sobre la superficie del electrodo.

Además, se debe cumplir que el potencial de reducción que se aplique durante la etapa de stripping sea lo suficientemente alto para que ambos cationes puedan oxidarse, si el potencial aplicado es muy bajo, es probable que solo una especie se oxide o ninguna.

c) Realice un análisis comparativo entre voltamperometría cíclica y voltamperometría hidrodinámica.

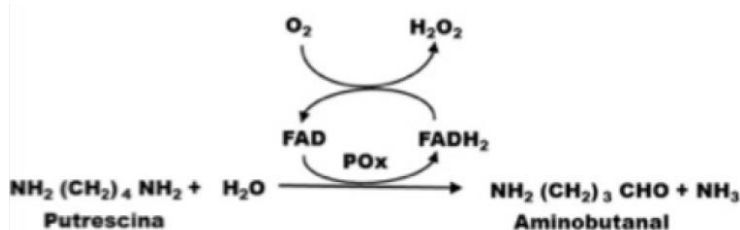
• **Voltamperometría Cíclica**: Se aplica un régimen de convección pura, sin convección. Se suele emplear como técnica preliminar de muestras desconocidas para determinar los potenciales de oxidación y reducción de un analito. Debido a las condiciones de convección pura, en un voltamperograma cíclico se verá que se alcanza un máximo de corriente a un determinado potencial, y luego este empezará a caer, esto debido a que las reacciones faradaicas son más rápidas que la incorporación del analito desde el seno de la solución, esto se lo conoce como “Efecto difusional” y se ve reflejado como un pico en el voltamperograma.

• **Voltamperometría Hidrodinámica**: En la voltamperometría hidrodinámica hay régimen de convección forzada (agitación), de esta forma cuando se va aumentando el potencial y se empieza consumir la especie en la superficie del electrodo, en este caso no hay un efecto difusional como si pasaba con la voltamperometría cíclica, porque en este caso el analito está siendo proporcionado constantemente desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo. Entonces llegado valor de potencial, la corriente se mantiene constante (corriente límite), que no decae, formando una meseta en el voltamperograma.



EUI PREGUNTA 2:

La putrescina es una de las aminos biogénicas que aparecen en alimentos (pescado, jugos de frutas, carne de cerdo) cuando comienzan a perder su frescura, debido a la proliferación de microorganismos. Además, son algunos de los compuestos responsables del mal olor en el proceso de degradación y durante la cocción de los alimentos, la putrescina puede dar lugar a nitrosaminas, que son sustancias cancerígenas. Para evitar estos inconvenientes la putrescina debe ser controlada exhaustivamente en los alimentos. La putrescina-oxidasa (POx) es una enzima que contiene como cofactor una molécula de FAD. POx produce la oxidación del putrescina a aminobutanal en presencia del mediador natural O_2 que, al regenerar la enzima produce H_2O_2 . El mecanismo de oxidación enzimática de putrescina se observa en la siguiente figura:



Para desarrollar un biosensor enzimático que permita determinar la frescura de alimentos en función del contenido de putrescina, se dispone de los siguientes materiales: Compósito de carbono (CPE), micropartículas de iridio, micropartículas de rodio y POx

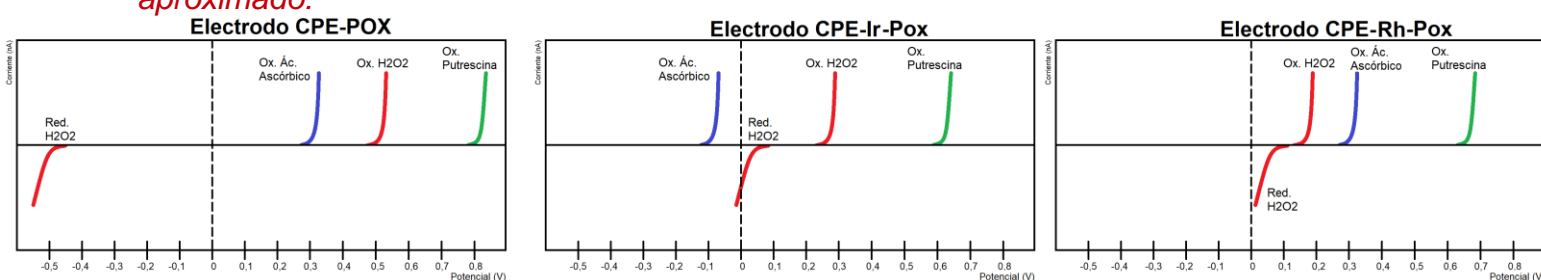
Sabiendo que:

- i) La oxidación de H₂O₂ sobre CPE comienza a 0,550 V y la reducción a -0,500 V.
- ii) La oxidación de H₂O₂, sobre CPE modificado con Ir (CPE-Ir) comienza a 0,250 V y la reducción a 0,050 V.
- iii) La oxidación de H₂O₂ sobre CPE modificado con Rh (CPE-Rh) comienza a 0,150 V y la reducción a 0,100 V.
- iv) La oxidación de putrescina comienza a 0,800 V sobre CPE; a 0,600 V sobre CPE-Ir y a 0,650 V sobre CPE-Rh.
- v) Las muestras de partida contienen ácido ascórbico, cuya oxidación comienza a 0,300 V sobre CPE; a -0,100 V sobre CPE-Ir y a 0,300 V sobre CPE-Rh.

Indique J.S.R.:

a) ¿Cuál de los siguientes biosensores usaría para determinar la frescura de los alimentos: CPE-POX ; CPE-Ir-POX ; CPE-Rh-POX? Explique claramente las razones por las que no usaría los dos restantes.

Para seleccionar el biosensor adecuado, tenemos que tener en cuenta los potenciales de la putrescina, del H₂O₂, y del ácido ascórbico que en este caso es un interferente. Algo que nos puede ayudar es diagramar los potenciales para cada compuesto en un gráfico aproximado:



El electrodo que usaría es el CPE-Rh-POX, ya que el potencial de oxidación del H₂O₂ es menor en comparación de los dos electrodos, además de que con este electrodo no se tendrían señales de interferencia de la oxidación del ácido ascórbico o de la oxidación de la putrescina.

El CPE-POX no lo usaría porque la ventana de potencial es muy amplia, además de que tendríamos interferencias de la oxidación del Ácido ascórbico, además, la oxidación del H₂O₂ Está a valores altos de sobrepotencial, lo que involucra un mayor gasto de energía.

El CPE-Ir-POX no lo usaría porque podríamos tener interferencias del ácido ascórbico, además, el potencial de oxidación del H₂O₂ que se requiere es mayor comparado con el electrodo CPE-Rh-POX, por lo tanto, el CPE-Ir-POX requerirá mayor gasto de energía.

b) El procedimiento experimental que seguiría para seleccionar el potencial de trabajo en la determinación amperométrica de putrescina con el biosensor seleccionado.

Realizaría una voltamperometría de barrido lineal para cada compuesto (H_2O_2 , putrescina y ácido ascórbico), usando una ventana de potencial de -0,5V a 0,8V usando el electrodo CPE-Rh-POX. Luego compararía los potenciales de oxidación de cada compuesto y buscaría una ventana de potencial en la que no haya interferencias de los compuestos putrescina y ácido ascórbico o haya la menor interferencia posible.

c) El potencial al que realizaría la determinación amperométrica.

El potencial al que realizaría la determinación amperométrica es entre 0,200V y 0,250V, para la oxidación del H_2O_2 , ya que a potenciales mayores podría haber oxidación del ácido ascórbico que interfiera con la determinación.

EUI PREGUNTA 3:

Se requiere determinar simultáneamente dos cationes de metales pesados presentes en muestras de aguas residuales, el catión A^{2+} y el catión D^{3+} , utilizando un electrodo de carbono vítreo modificado con una película de mercurio.

Indique J.S.R:

La técnica de "stripping" (voltamperometría de redisolución) que emplearía para efectuar la cuantificación de los cationes, indicando claramente las etapas que seguiría y las condiciones de trabajo necesarias para llevar adelante la determinación (con valores numéricos). **Es importante remarcar que se deben consignar los valores numéricos de las condiciones experimentales.**

Datos:

$$E^0(A^{2+}/A(Hg)) = -0,400 \text{ V}$$

$$E^0(D^{3+}/D(Hg)) = -0,800 \text{ V}$$

$$E^0(Hg^{2+}/Hg) = 0,400 \text{ V}$$

La técnica de stripping que utilizaría es un "Stripping voltamperométrico anódico", ya que se trata de cationes metálicos que se tienen que reducir, y esta técnica nos permite eso.

Para cuantificar los cationes metálicos, el procedimiento sería el siguiente:

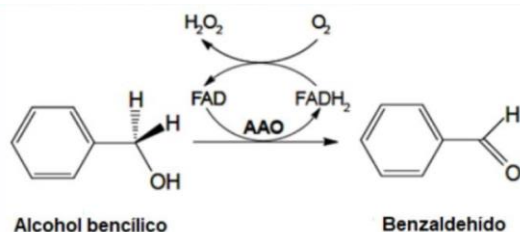
- **Etapas de preconcentración:** Consiste en la preconcentración de los cationes metálicos en forma de metal en la superficie del electrodo de carbono vítreo modificado con mercurio. Para esto se aplica un potencial de reducción de unos -1,0V, este potencial debe ser más negativo que el potencial de reducción de la cupla ($D^{3+}/D(Hg)$), que en este caso es -0,8V, no usaría exactamente este valor porque la reducción de este compuesto sería muy lenta. Además del potencial, se tendría que elegir un tiempo y velocidad de agitación adecuados para asegurarnos la preconcentración de la mayor cantidad posible de analito sobre la superficie del electrodo.

- **Etapas de redisolución (stripping):** Luego de la preconcentración del analito sobre la superficie del electrodo, se procede a aplicar un potencial de oxidación para que el metal en la superficie del electrodo se oxide a un catión metálico y se redissuelva en la solución. En este caso se tendría que aplicar un potencial de oxidación menor a 0,4V, ya que a potenciales mayores a este se empezaría a oxidar la película de mercurio del electrodo. Luego se miden los potenciales de oxidación correspondientes a los de cada catión metálico, sabiendo que la intensidad de la corriente proporcional a la concentración, podemos realizar la cuantificación de cada catión metálico en la muestra.

En caso de tratarse de una muestra con muchos interferentes (compuestos fácilmente oxidables), se podría realizar un cambio de medio, con el fin de eliminar estos interferentes y obtener una señal de oxidación más limpia.

EUI PREGUNTA 4:

En la producción biotecnológica de los aromatizantes naturales vainillina y benzaldehído se emplean hongos. El *Pleurotus eryngii* es capaz de producir benzaldehído, a través de la biodegradación de la lignina de la pared celular vegetal mediante la acción de la enzima extracelular aril-alcohol oxidasa (AAO), flavoenzima que contiene como cofactor una molécula de FAD. AAO produce la oxidación del alcohol bencílico a benzaldehído en presencia del mediador natural O_2 que, al regenerar la enzima produce H_2O_2 . El mecanismo de oxidación enzimática del alcohol bencílico se muestra en la siguiente figura:



Se necesita desarrollar un biosensor enzimático para cuantificar el nivel de alcohol bencílico en muestras obtenidas de una planta industrial biotecnológica de producción de benzaldehído y **se dispone** de un compuesto de carbono (CPE), micropartículas de cobre, micropartículas de iridio y AAO.

Sabiendo que:

- i) La oxidación de H_2O_2 sobre CPE comienza a 0,550 V y la reducción a -0,500 V.
- ii) La oxidación de H_2O_2 sobre CPE modificado con Cu (CPE-Cu) comienza a 0,250 V y la reducción a 0,050 V.
- iii) La oxidación de H_2O_2 sobre CPE modificado con Ir (CPE-Ir) comienza a 0,150 V y la reducción a 0,100 V.
- iv) La oxidación de alcohol bencílico comienza a 0,600 V sobre CPE; a 0,000 V sobre CPE-Cu y a 0,050 V sobre CPE-Ir.
- v) La muestra de partida contiene un interferente cuya oxidación comienza a 0,300 V sobre CPE; a -0,100 V sobre CPE-Cu y a 0,300 V sobre CPE-Ir.

Indique J.S.R.:

a)Cuál de los siguientes electrodos usaría para la construcción del biosensor: CPE-AAO ; CPE-Cu-AAO ; CPE-Ir-AAO. Explique claramente las razones por las que no usaría los dos restantes.

Elegiría el electrodo CPE-Ir-AAO. No usaría el electrodo CPE-AAO porque se necesitan valores de sobrepotencial positivo muy altos para llegar al potencial de oxidación del H_2O_2 , además de que habría interferencia por el proceso de oxidación del interferente.

El electrodo de CPE-Cu-AAO no lo elegiría porque si bien se necesitan menores sobrepotenciales que con el electrodo CPE-AAO, se tendrían interferencias del proceso de oxidación del interferente.

b) El potencial al que realizaría la determinación amperométrica.

Usando el electrodo CPE-Ir-AAO, usaría un potencial de oxidación de unos 0,150 o 0,200V, y debemos asegurarnos de no llegar a potenciales de 0,300V, ya que si no tendríamos el proceso de oxidación del interferente que nos afectará la resolución de los voltamperogramas.

EUI PREGUNTA 5:

La glicoproteína galectina 3 es un biomarcador de enfermedades cardiovasculares que ha recibido una gran atención en los últimos años por las ventajas en cuanto a la información que brinda. Por esta razón, es muy importante desarrollar nuevos biosensores electroquímicos que permitan su eficiente cuantificación. Sabiendo que dispone de los siguientes elementos de biorreconocimiento:

- Aptámero anti-galectina 3
- Anticuerpo anti-galectina 3
- Concanavalina A (lectina)
- Enzima glucosa oxidasa

Indique, J. S. R.:

a) Ellos biosensore/s que podría construir para cuantificar galectina 3 (todos los que sean posible).

• Se podría utilizar un aptámero anti-galectina 3, que sea obtenido por metodología SELEX, y que se obtenga una señal analítica correspondiente a la oxidación de los residuos guanina y adenina que será inversamente proporcional a la concentración de la glicoproteína galectina 3.

• Se podría utilizar un anticuerpo específico anti-galectina 3 que se una específicamente, luego con otro anticuerpo secundario que tenga conjugada en su estructura una enzima que realice un proceso redox con un sustrato que agregamos (generalmente se usa una enzima oxidasa), de modo tal que este producto pueda ser oxidado o reducido por el electrodo dando una señal analítica que es proporcional a la concentración galectina 3.

• Se podría utilizar un glicobiosensor de Concanavalina A (lectina) que detecte los residuos de azúcar en la estructura de la proteína.

b) En caso que pudiera construir más de uno,

i) ¿Cuál le permitiría obtener la respuesta más eficiente?

El anticuerpo anti-galectina 3 daría una respuesta más eficiente, debido a la especificidad con la que se une el anticuerpo y la sensibilidad de la reacción redox.

ii) ¿Cómo procedería para obtener la señal analítica en el caso de ese biosensor más eficiente?

Usando el anticuerpo anti-galectina 3 una vez que se realice la interacción anticuerpo primario anti-galectina \leftrightarrow galectina 3, se agregaría un anticuerpo secundario que contenga una enzima oxidasa conjugada en su estructura y que sea específico contra otro epítipo del biosensor. Luego agregaría el sustrato de la enzima de forma tal que se forme como producto peróxido de hidrógeno, este sufrirá una reacción redox en el electrodo al aplicar un potencial adecuado que fue elegido previamente para ese electrodo. Como resultado obtendremos un amperograma con una señal de corriente correspondiente al proceso redox del peróxido, este valor de corriente será proporcional a la cantidad de galectina 3.

EUI PREGUNTA 6:

Se requiere determinar simultáneamente dos cationes de metales pesados presentes en muestras de aguas residuales, el catión X^{2+} y el catión Z^{3+} , utilizando un electrodo de carbono vitreo modificado con una película de mercurio (GCE-Hg). Se sabe que un voltamperograma cíclico de una solución que contiene X^{2+} (10,0 mg L) y Z^{3+} (10,0 mg L) en ácido nítrico al 10% P/V obtenido sobre GCE-Hg y realizado entre 0,00 V y -1,00 V a 0,020 V/s presenta dos picos de corriente, uno a -0,350 V y otro a -0,750 V.

Indique J.S.R:

a) La técnica de "stripping" (voltamperometría de redisolución) que emplearía para efectuar la cuantificación de los cationes.

La técnica de stripping que utilizaría es la de stripping voltamperométrico anódico (ASV)

b) Las etapas (**TODAS**) que debería seguir para llegar a obtener la concentración de una muestra problema que contenga ambos cationes.

c) Los **valores numéricos** de los parámetros experimentales para llevar a cabo cada una de esas etapas.

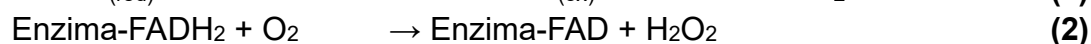
EUI PREGUNTA 7:

Se necesita efectuar la determinación de un bioanalito presente en una muestra compleja mediante el empleo de un biosensor enzimático.

Sabiendo que:

I) La muestra contiene, además del bioanalito de interés, dos posibles interferentes (A y B), cuyos voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos con un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral muestran que la oxidación de A comienza a 0,00 V y la de B a 0,300 V, y que en la ventana de potencial examinada (-0,300 V a 0,800 V) no hay corrientes de reducción.

II) Se cuenta con una enzima (Enzima-FAD) que es capaz de catalizar la oxidación del bioanalito según la reacción (1), cuya regeneración tiene lugar en presencia del mediador natural, oxígeno, según la reacción (2):



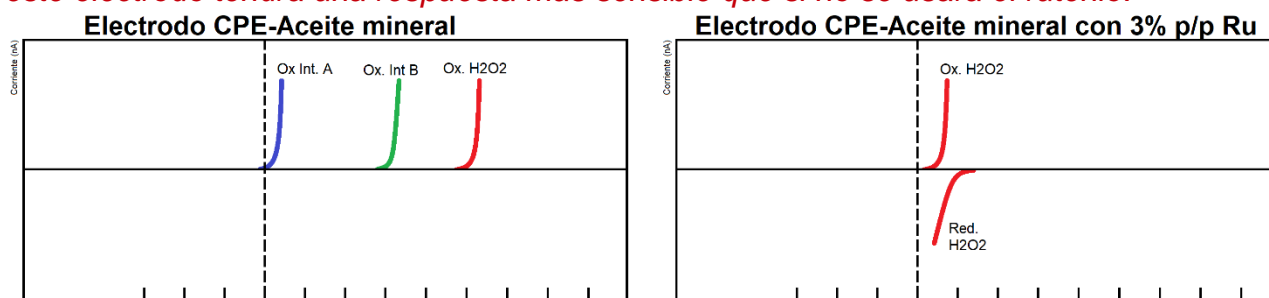
III) La señal analítica se obtiene a partir del peróxido de hidrógeno formado.

IV) El voltamperograma hidrodinámico obtenido para peróxido de hidrógeno 0,010 M empleando un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral, muestra que la oxidación comienza a 0,500 V y que no hay corrientes de reducción en la ventana de potencial estudiada (-0,300 V a 0,800 V).

V) El voltamperograma hidrodinámico obtenido para peróxido de hidrógeno 0,010 M empleando un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0 % P/P de rutenio muestra que la oxidación comienza a 0,050 V y que las corrientes de reducción aparecen a partir de 0,100 V.

a) Explique las diferencias en los voltamperogramas hidrodinámicos para peróxido de hidrógeno 0,010 M obtenidos con un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral y con un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0 % P/P de rutenio.

En el voltamperograma hidrodinámico para H_2O_2 en el compuesto de grafito y aceite mineral se necesitan sobrepotenciales muy altos para llegar a valores de oxidación del H_2O_2 (0,500V), en cambio, el electrodo de compuesto de grafito con aceite mineral y 3% P/P de rutenio necesita menores sobrepotenciales de oxidación para el H_2O_2 (0,050V), por lo que este electrodo tendrá una respuesta más sensible que si no se usara el rutenio.



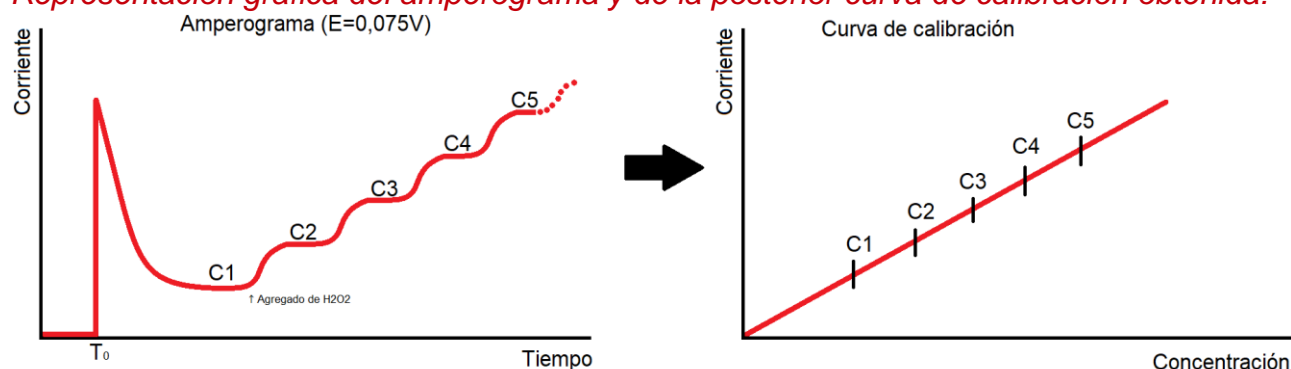
b) Indique J.S.R. qué potencial de trabajo seleccionaría para efectuar las determinaciones más en la muestra de interés si empleara un electrodo compuesto de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0 % P/P de rutenio y 10,0 % P/P de Enzima-FAD (CPE-Ru-Enzima-FAD).

El potencial de trabajo que usaría de 0,075V, ya que, si se usan potenciales mayores a 0,100V el H₂O₂ se reduciría, y la oxidación es a partir de los 0,050V, entonces tampoco se podrían usar valores menores a 0,050V, ya que no habría proceso de oxidación.

c) Indique, J.S.R., cómo procedería, una vez seleccionado el potencial de trabajo para obtener la curva de trabajo o calibrado correspondiente empleando CPE-Ru-Enzima-FAD.

*Para obtener una curva de trabajo realizaría una **amperometría hidrodinámica**, usando como potencial constante 0,075V. En primer lugar a una solución de H₂O₂ de concentración conocida le aplico este potencial de oxidación a un tiempo 0 (T₀) y se observaría en el amperograma un aumento de la corriente, que disminuirá al pasar el tiempo hasta llegar a un valor constante (corriente estacionaria), una vez alcanzada esta corriente estacionaria realizo un agregado de solución de H₂O₂ de concentración mayor a la inicial, esto se observará como un aumento de la corriente hasta llegar a un nuevo valor de corriente estacionaria, repito este paso usando concentraciones crecientes de H₂O₂ hasta realizar unos 8-10 agregados. Luego, cada uno de valores de corriente estacionaria se los puede graficar en una curva de calibración del tipo Corriente vs Concentración para realizar la curva de calibración.*

Representación gráfica del amperograma y de la posterior curva de calibración obtenida:



Una vez obtenida la curva de calibración de H₂O₂, luego medimos la intensidad de corriente de la muestra problema usando las mismas condiciones (mismo electrodo y mismo potencial aplicado) y podremos determinar la concentración empleando la curva de calibración realizada.

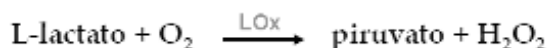
EUI PREGUNTA 8:

Sobre las técnicas de *stripping* o de redisolución:

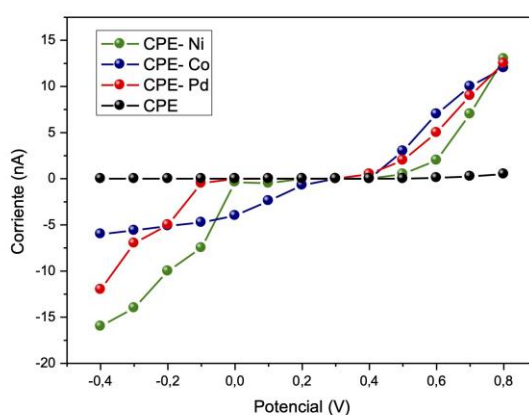
- Indique J.S.R. cuál es el objetivo que persiguen desde el punto de vista analítico.
- Haga un análisis comparativo entre el *stripping* voltamperométrico anódico o voltamperometría de redisolución anódica y el *stripping* voltamperométrico de adsorción o voltamperometría de redisolución adsorptiva en cuanto a:
 - etapa de acumulación.
 - etapa de "stripping" o redisolución.
 - analitos con los que se pueden usar.
- Explique la razón por la cual en la voltamperometría cíclica se obtiene un pico de corriente y en la voltamperometría hidrodinámica se obtiene una corriente límite (máxima).

EUI PREGUNTA 9:

a) En un laboratorio de análisis se necesita desarrollar un microbiosensor para lactato inmovilizando la enzima lactato oxidasa (LOx) en un compuesto de partículas de grafito. LOx cataliza la oxidación de lactato según la siguiente reacción:



Los metales de transición catalizan, en mayor o menor medida, la oxidación y reducción del peróxido de hidrógeno. Para seleccionar un compuesto adecuado y útil para construir un biosensor, se evaluó el comportamiento de un compuesto sin modificar y tres compuestos conteniendo níquel, cobalto y paladio, respectivamente, a través de experimentos de voltamperometría hidrodinámica en presencia de peróxido de hidrógeno. Los siguientes gráficos muestran los resultados de tales experimentos:



Se determinó además que:

A- La oxidación de **lactato** comienza a 0,750 V sobre CPE; a 0,480 V sobre CPE-Ni, a 0,550 V sobre CPE-Co y a 0,610 V sobre CPE-Pd.

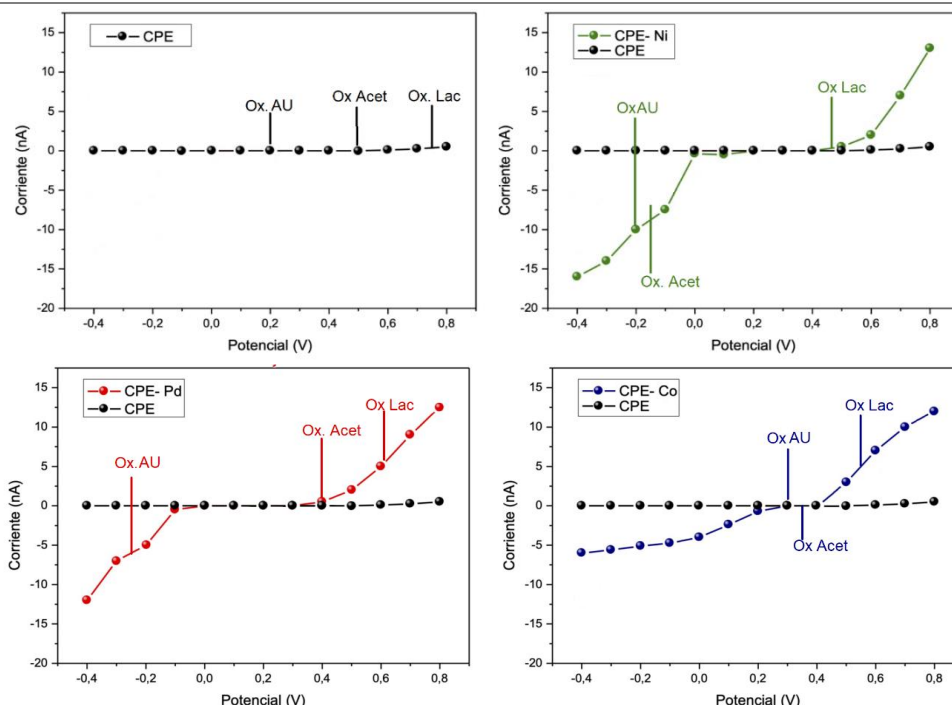
B- Las muestras para evaluar lactato contienen además ácido úrico (AU) y acetaminofeno (Acet):

i-El **ácido úrico**, comienza su oxidación a 0,200 V sobre CPE; a -0,250 V sobre CPE-Pd, a 0,300 V sobre CPE-Co y a -0,200V sobre CPE-Ni.

ii-El **acetaminofen** comienza su oxidación a 0,500 V sobre CPE; a 0,400 V sobre CPE-Pd, a 0,350 V sobre CPE-Co y a -0,150V sobre CPE-Ni.

Analizando estos resultados, indique:

a) ¿Cuál de los siguientes biosensores usaría para determinar lactato en las muestras: CPE-LOx ; CPE-Ni-LOx ; CPE-Co-LOx ; CPE-Pd-LOx? **Explique y justifique** claramente las razones por las que no usaría los restantes.



El electrodo de CPE-LOx no lo usaría porque se necesitaría aplicar un sobrepotencial muy alto (0,8V o más) para poder ver la oxidación del H_2O_2 , además tendríamos las interferencias de la oxidación del ácido úrico y del acetaminofen.

El electrodo CPE-Ni-LOx no lo usaría porque si bien necesitaríamos menos sobrepotencial para llegar al valor de oxidación del H_2O_2 , tendríamos las señales de ambos interferentes, tanto del ácido úrico como del acetaminofen. Y si quisiera trabajar con los valores de reducción tendría que ir a valores de sobrepotencial muy negativos para evitar interferentes.

El electrodo CPE-Pd-LOx no lo usaría por las mismas razones que el CPE-Ni-LOx, es decir que si quiero usar los potenciales de oxidación del H_2O_2 voy a tener interferentes, y si quiero usar los potenciales de reducción tengo que ir a sobrepotenciales muy negativos para evitar los interferentes.

*Por todo esto, **el electrodo que usaría es CPE-Co-LOx**, ya que, si bien no podría usar los valores de oxidación del H_2O_2 debido a la presencia de interferentes, podría usar los valores de oxidación sin necesitar ir a valores de potencial muy altos con respecto a los electrodos de níquel o paladio.*

b) El potencial al que realizaría la determinación amperométrica de lactato con el biosensor seleccionado. Justifique su respuesta

El potencial al que realizaría la determinación amperométrica es de 0,100V, ya que a este valor no se requiere tanta energía, tendríamos una buena señal de corriente de reducción del H_2O_2 y además no tendríamos señal de oxidación proveniente de los interferentes (ácido úrico y acetaminofen) debido a que tienen potenciales de oxidación más elevados.

EUI PREGUNTA 10:

Se requiere determinar simultáneamente tres cationes de metales pesados presentes en muestras de aguas de deshecho de una fábrica, A^{2+} , P^{3+} y Z^{3+} utilizando un electrodo de carbono vítreo modificado con una película de mercurio.

Datos:

$$E^0(A^{2+}/A(Hg)) = -0,200 \text{ V}$$

$$E^0(P^{3+}/D(Hg)) = -0,600 \text{ V}$$

$$E^0(Z^{3+}/D(Hg)) = -0,900 \text{ V}$$

$$E^0(Hg^{2+}/Hg) = 0,400 \text{ V}$$

Indique J.S.R:

a) La técnica de “stripping” (voltamperometría de redisolución) que emplearía para efectuar la cuantificación de los cationes.

La técnica que emplearía es un “stripping voltamperométrico anódico (ASV)”, ya que los cationes metales se tienen que reducir a metales, y esta técnica nos permite eso al aplicar un potencial de reducción que reduce los cationes metálicos a metales en la superficie del electrodo.

b) Las etapas que seguiría y las condiciones de trabajo necesarias para efectuar la determinación (con valores numéricos).

• **Preconcentración**: Consiste en la concentración del catión metálico en forma de metal en la superficie del electrodo. Para esto se tiene aplicaría un potencial de reducción que sea más negativo que el potencial de reducción del catión más negativo, en este caso tendría que ser un potencial menor a $-0,9V$, podría usarse un potencial de reducción de $-1,0V$ o más negativo para asegurar la reducción de todos los cationes metálicos en la superficie del electrodo. Para esto se puede ir variando los potenciales de reducción hasta que vemos una cantidad constante de picos de oxidación, correspondientes a los tres cationes metálicos, si vemos menos significa que uno de los metales no se está reduciendo. Además, es importante tener en cuenta el tiempo de deposición, así como la velocidad de agitación.

• **Redisolución (Stripping)**: Una vez preconcentrado el catión metálico en forma de metal en la superficie del electrodo, se procede a aplicar un potencial de oxidación que asegure la oxidación de los metales. En este caso es importante no aplicar un potencial mayor al de $0,4V$, ya que si no se podría oxidar el electrodo. El potencial de oxidación que se podría usar es unos $0,1V$ o $0,2V$ por ejemplo.

c) La estrategia que elegiría para eliminarlos efectos de posibles interferentes fácilmente oxidables presentes en la muestra.

Una estrategia posible para eliminar interferentes es realizar un cambio de medio. Esta estrategia consiste en que, una vez realizada la preconcentración, el electrodo con los analitos en su superficie (en este caso los metales reducidos de los cationes metálicos) se transportan a otro medio con solución buffer sin interferentes, de modo tal que la etapa de stripping se realiza en este nuevo medio, por lo que las señales de oxidación provienen de los analitos en la superficie del electrodo y no de otros compuestos de la muestra.

TEÓRICO 5: TÉCNICAS AVANZADAS DE ANÁLISIS

• ANÁLISIS POR INYECCIÓN DE FLUJO (FIA)

PREGUNTA 1:

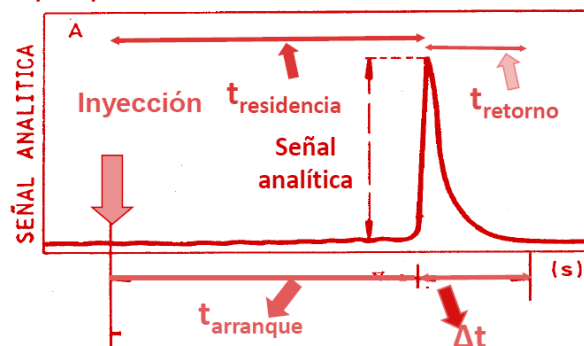
a) Haga un análisis comparativo entre el análisis por inyección en flujo segmentado (SFA) y el análisis por inyección en flujo continuo (FIA).

FIA	SFA
<ul style="list-style-type: none"> • La muestra se inserta en el portador sin separarlo. (muestra-portador-muestra...) • La señal analítica son picos poco anchos y bien definidos y no es necesario llegar al máximo, ya que es método cinético. • La muestra se introduce mediante inserción. • La detección se realiza en régimen de equilibrio. • Los tiempos de respuesta son mayores. • Tiene menor capacidad de muestras por tiempo. 	<ul style="list-style-type: none"> • La muestra se inserta de forma intercalada con solución de lavado entre gotas de aire (muestra-aire-lavado-aire...) • La señal analítica es una señal ancha y se necesita llegar al máximo, es decir, llegar al equilibrio de la reacción. • La muestra se introduce mediante aspiración. • La detección se realiza por dispersión controlada. • Los tiempos de respuesta son menores. • Tiene mayor capacidad de muestras por tiempo.

b) Indique cuáles son los parámetros de importancia que se pueden obtener de un diagrama. Mencínelos y señálelos en un hipotético diagrama.

Los parámetros son:

- **Tiempo de arranque (t_{arranque}):** Es el intervalo de tiempo desde la inyección de la muestra hasta el comienzo de la señal.
- **Tiempo de residencia ($t_{\text{residencia}}$):** Es el intervalo de tiempo desde la inyección de la muestra hasta el máximo de la señal.
- **Tiempo de retorno (t_{retorno}):** Es el intervalo de tiempo desde el máximo del pico hasta el retorno a la línea de base.
- **Δt :** Es el intervalo de tiempo que dura la señal.

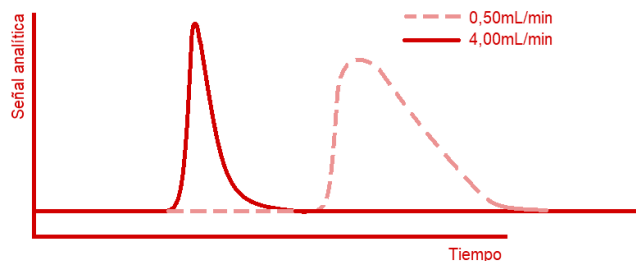


c) Esquematice de manera comparativa la señal FIA que esperaría obtener en las siguientes condiciones:

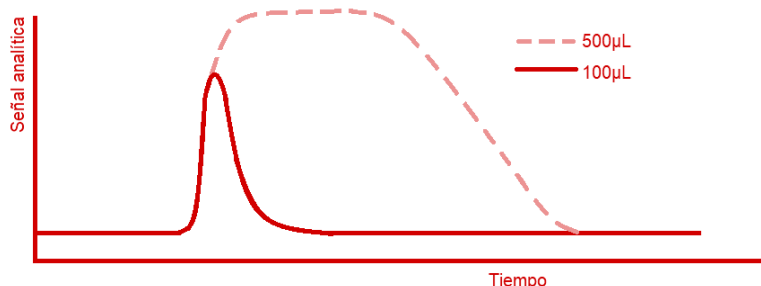
I- Volumen de muestra: 75 μL ; Longitud de reactor: 1,80 m para dos flujos: 0,50 mLmin^{-1} y 4,00 mLmin^{-1} . Indique **J.S.R.** en cuál de los casos habrá mayor dispersión de la muestra.

El flujo de 0,50 mLmin^{-1} tendrá una mayor dispersión, porque el flujo será más lento, lo que favorecerá el proceso de difusión axial, haciendo que la señal disminuya y el pico sea más

ancho (peor señal). Además, la señal aparecerá a mayor tiempo debido a que el flujo es más lento.



II- Longitud de reactor: 1,80 m; flujo: 4,00 mLmin⁻¹ para dos volúmenes de muestra: 100 μL y 500 μL. ¿Qué perfiles esperarías obtener para ambos volúmenes de muestra si el flujo hubiera sido 0,70 mL min⁻¹?



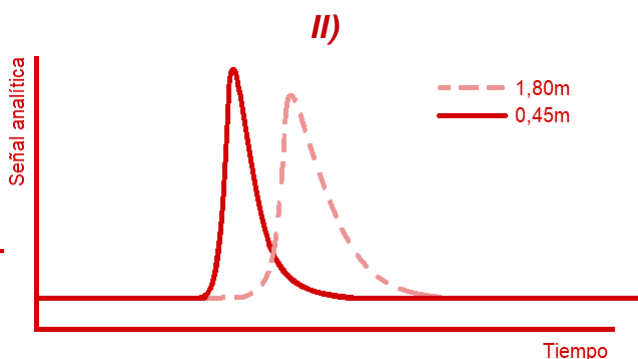
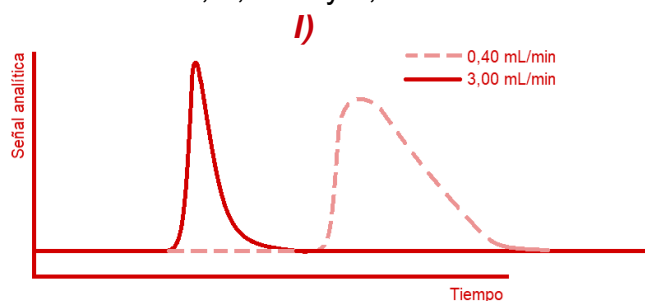
En caso de que el flujo se redujera de 4,00 mLmin⁻¹ a 0,70 mLmin⁻¹ esperarías que los picos se hagan más anchos y tengan un Δt mayor, ya que el efecto de difusión axial sería mucho mayor.

PREGUNTA 2:

a) Esquematice la señal FIA que esperarías obtener de manera comparativa en los siguientes experimentos. **Justifique su respuesta:**

I- Volumen de muestra de 75 μL, longitud de reactor de 1,50 m para dos flujos: 0,40 mLmin⁻¹ y 3,00 mLmin⁻¹

II- Volumen de muestra de 75 μL, flujo de 3,00 mLmin⁻¹ para dos longitudes de reactor, 0,45 m y 1,80 m.



• En el **experimento I** esperarías que la muestra con menor flujo tenga una señal menor y un tiempo de arranque mayor, ya que al tener un flujo más lento va a demorar más en llegar al detector. Además, tendrá un Δt mayor, debido a que al tener un flujo más lento el efecto de difusión axial será mayor también. En cambio, la muestra que tenga un mayor flujo tendrá una señal mejor, ya que tendrá un Δt menor (señal menos ancha y bien definida) con un coeficiente de dispersión menor.

• En el **experimento II** esperaría que la muestra que tenga largo de reactor menor (0,45m) tendría un tiempo de arranque menor, ya que la muestra tiene que recorrer menos distancia hasta llegar al detector. Además, esperaría que tenga un coeficiente de dispersión menor, porque el efecto difusional será menor al tener menos tiempo para que esto ocurra. En cuanto a la muestra de largo de reactor mayor (1,80m), esperaría que tenga un tiempo de arranque mayor, al tener que recorrer mayor distancia hasta el detector, esto va a provocar además un mayor efecto de difusión axial, lo que se evidencia como una señal un poco más ancha y un coeficiente de difusión mayor

b) Sobre el **experimento I** indique J.S.R. con cuál de los flujos empleados obtendría:

i) La mejor señal FIA.

El flujo con el que obtendría la mejor señal FIA es el flujo de $3,00\text{mL cm}^{-1}$, ya que tendría menor efecto de difusión axial, es decir que tiene un menor coeficiente de difusión (D), lo que se traduce en una señal menos ancha y más definida con respecto a un flujo más lento, donde la difusión es mayor y por ende se obtendría una señal más ancha.

ii) El menor tiempo de arranque.

El flujo con el que obtendría el menor tiempo de arranque es el flujo de $3,00\text{mL cm}^{-1}$, ya que demoraría menos tiempo en llegar al detector desde el momento de la inyección, al ser un flujo más rápido.

Sobre el **experimento II** indique J.S.R. con cuál de las longitudes de reactor empleados obtendría:

i) La menor dispersión.

La muestra con la longitud de reactor menor (0,45m) tendría una menor dispersión, ya que la muestra está menos tiempo en el reactor, lo que se traduce en un menor tiempo para que pueda realizar la difusión axial, es decir que aumente la dispersión.

ii) El menor tiempo de retorno.

La muestra con la longitud de reactor menor (0,45m) tendría un menor tiempo de retorno, porque al tener menos dispersión, el pico que se obtiene es menos ancho, por lo que los tiempos de retorno serán menores.

iii) La mayor velocidad de muestreo. (Número de muestras medidas por unidad de tiempo)

La muestra con la longitud de reactor menor (0,45m) permitiría una mayor velocidad de muestreo, ya que al tener que recorrer menos distancia se podrían analizar más cantidad de muestras en menor tiempo.

c) Respecto de **a,II)** indique J.S.R. ¿En qué caso se obtiene la mayor dispersión?

Se obtendría una mayor dispersión para el largo de reactor de 1,80m, ya que al tener un largo mayor e igual flujo, la muestra tendría mayor tiempo para realizar el proceso de difusión, este proceso de difusión hace que el pico obtenido sea más ancho y de menor altura, entonces la relación entre concentración antes del transporte (C_0) y luego del transporte (C) es mayor (ya que cuando se difunde, la muestra disminuye su concentración), esta relación es el coeficiente de dispersión, entonces aumentaría al aumentar la difusión.

PREGUNTA 3:

a) ¿Qué entiende por dispersión en un sistema FIA? Indique J.S.R. de qué factores depende.

La dispersión hace referencia a la difusión de la muestra en el portador mientras es desplazado por el reactor hacia el detector. La dispersión depende del flujo empleado: a menor flujo utilizado, mayor sería el tiempo que tendría la muestra a difundir en el portador. También depende de la longitud del reactor, mientras más largo sea el reactor, más

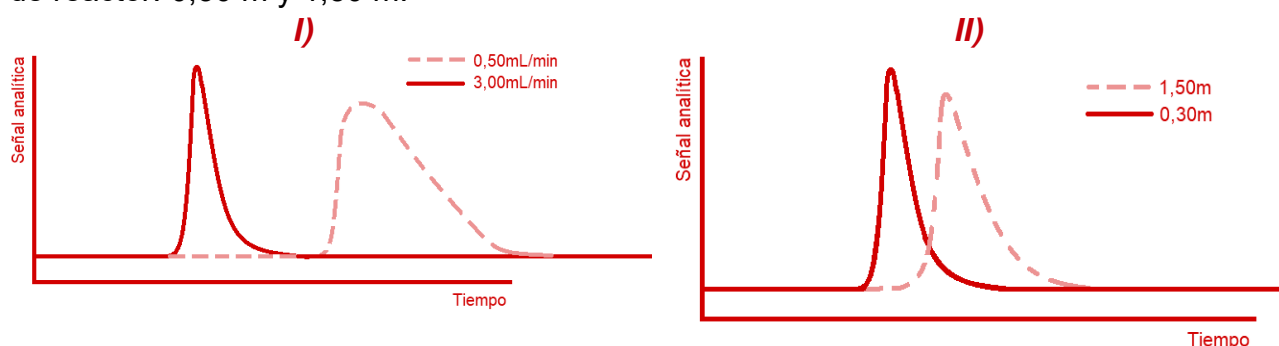
distancia tendrá que recorrer la muestra y el portador, y por ende mayor tiempo tendrá para difundir.

La dispersión también depende del volumen de muestra, mientras mayor sea el volumen de muestra, menor será el coeficiente de difusión, ya que la señal aumentaría.

b) Esquematice la señal FIA de manera comparativa en las siguientes condiciones:

I- Volumen de muestra de 100 μL , longitud de reactor de 1,50m para dos velocidades de flujo: 0,50 mLmin^{-1} y 3,00 mLmin^{-1}

II- Volumen de muestra de 100 μL , velocidad de flujo de 3,00 mLmin^{-1} para dos longitudes de reactor: 0,30 m y 1,50 m.



EUI PREGUNTA 1:

a) Indique **J.S.R.** porqué se produce la dispersión en un sistema FIA.

La dispersión se produce debido a la difusión de la muestra en el portador a medida que es llevada hacia el detector, esta difusión hace que la concentración sea menor al ir diluyéndose, entonces la relación de concentración antes del transporte (C_0) y luego del transporte (C) será mayor ($D = \frac{C_0}{C}$), mientras menor sea la concentración luego del transporte hacia el detector, mayor es la difusión y por ende mayor el coeficiente de dispersión "D".

b) Indique **J.S.R.** en cuál de los siguientes casos esperarías obtener la mejor señal FIA:

I) Volumen de muestra de 100 μL , longitud de reactor de 1,50m; velocidades de flujo: 0,40 mLmin

II) Volumen de muestra de 100 μL , longitud de reactor de 1,50m; velocidad de flujo: 3,20 mLmin

III) Volumen de muestra de 400 μL , longitud de reactor de 1,50m; velocidad de flujo: 3,20 mLmin

El caso II esperarías que tenga una mejor señal FIA, ya que este tiene un mayor flujo que el caso I, lo que se traduce en una menor probabilidad de difusión y por ende menor dispersión, esto da una señal menos ancha y más definida. Además, el caso II tiene un volumen de muestra menor al caso III, mientras mayor es el volumen se tendrá menos dispersión y mayor señal, pero esta será muy ancha será peor. Por esto el caso II tendrá mejor señal FIA que el caso I y III.

c) Respecto de los datos del inciso b), indique **J.S.R.**: En cuál de los casos esperarías obtener el menor tiempo de arranque y el menor tiempo de retorno.

El caso que esperarías que tenga menor tiempo de arranque y menor tiempo de retorno es el caso II, ya que al tener mayor flujo esperarías que tenga un tiempo de arranque menor, y al tener un menor volumen de muestra tendría un pico alto y no tan ancho, esto daría un tiempo de retorno menor.

EUI PREGUNTA 2:

a) ¿Qué requisitos debe reunir el elemento de propulsión en un sistema FIA? ¿Cuál es el más frecuentemente usado?

Un elemento de propulsión debe tener las siguientes características:

- *Debe proporcionar un caudal constante y reproducible*
- *Debe estar libre de impulsos.*
- *En general, los caudales van desde $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$ a $4,0 \text{ mLmin}^{-1}$.*

Los más comunes son: bomba peristáltica, presión gaseosa y gravedad.

b) Haga un análisis comparativo de Análisis por Inyección en Flujo y Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) en cuanto a:

- Volumen de muestra
- Flujo
- Uso de la columna
- Inserción de la muestra
- **Volumen de la muestra:** *En ambos se utilizan volúmenes pequeños de muestra*
- **Flujo:** *ambos tienen flujo no segmentado*
- **Uso de columna:** *En HPLC es imprescindible mientras que en FIA es posible pero no es imprescindible.*
- **Inserción de la muestra:** *En ambas técnicas la inserción de la muestra es similar. En HPLC es por inyección y en FIA por inserción.*

c) Indique J.S.R. las diferencias que encontraría en las señales que se obtendrían para un sistema FIA con detección por espectrofotometría uv-visible al efectuar la determinación de un colorante:

i) Cuando se inserta en un sistema FIA empleando la metodología de inserción de muestra habitual

ii) Cuando el colorante se introduce en el sistema FIA de manera continua.

Cuando la el colorante se inserta de manera habitual la señal que se obtiene es un pico bien definido de poco ancho que es útil para realizar determinaciones. En cambio, cuando se inserta de manera continua se obtiene una señal muy ancha, sin un pico definido que no se puede utilizar para analizar.

d) Dados los siguientes datos:

I-Volumen de muestra de $100 \mu\text{L}$, longitud de reactor de $1,50\text{m}$ para dos flujos: $0,50\text{mLmin}^{-1}$ y $3,00 \text{ mLmin}^{-1}$. **Indique J.S.R.** con cuál de los dos flujos se obtendrá se obtendrán:

i) El mayor tiempo de arranque

ii) la menor dispersión.

i) El que tenga el menor flujo ($0,50\text{mLmin}^{-1}$) tendrá el mayor tiempo de arranque, porque para una misma longitud de reactor, mientras menor es el flujo, más tardará la muestra en llegar al detector, y por ende el tiempo en que aparezca la señal (tiempo de arranque) será mayor.

ii) El que tiene la menor dispersión es aquel que tiene el mayor flujo ($3,00\text{mLmin}^{-1}$), ya que, al tener mayor flujo, tardará menos en llegar al detector, entonces tendrá menos tiempo para realizar la difusión con el portador, entonces la señal que se tiene será mayor (menor dispersión)

II-Volumen de muestra de $100 \mu\text{L}$, flujo de $3,00 \text{ mLmin}^{-1}$ para dos longitudes de reactor: $0,30 \text{ m}$ y $1,50 \text{ m}$. **Indique J.S.R.** con cuál de los dos reactores se obtendrán:

i) La señal con mayor tiempo de retorno

ii) La menor dispersión.

i) El que tiene el mayor tiempo de retorno es el que tiene una longitud de reactor de $1,50\text{m}$, porque al ser más largo el reactor, la muestra tiene más probabilidad de difundir en el portador, lo que se aumenta la dispersión, provocando un ensanchamiento en la señal.

ii) El que tiene una menor dispersión es el que tiene una longitud de reactor de 0,30m, ya que tiene una menor probabilidad de que la muestra difunda en el portador, y por ende que aumente la dispersión.

EUI PREGUNTA 3:

Dadas las condiciones experimentales de los sistemas que se indican a continuación (A y B), compare el tiempo de arranque, la altura de pico y el ancho de pico para cada sistema: A-I vs A-II y B-I vs B-II (indicando si son menores, mayores o iguales en A-I que en A-II o en B-I que en B-II). Justifique su respuesta.

SISTEMA A:

I) Volumen de muestra: 75 μL , longitud de reactor: 1,50 m; **flujo: 0,40 mLmin⁻¹**

II) Volumen de muestra: 75 μL , longitud de reactor: 1,50 m; **flujo: 3,00 mLmin⁻¹**

A-I tiene un mayor tiempo de arranque, debido a que tiene un flujo más lento, también tendrá un ancho de pico mayor y una menor altura. En cambio, A-II al tener un mayor flujo, la altura del pico será mayor y tendrá un ancho menor (mejor señal) y tendrá un tiempo de arranque menor, ya que tardará menos en llegar al detector.

SISTEMA B:

I) Volumen de muestra de 75 μL ; **longitud de reactor: 0,45 m**; flujo de 3,00 mLmin⁻¹

II) Volumen de muestra de 75 μL ; **longitud de reactor: 1,80 m**; flujo de 3,00 mLmin⁻¹

B-I tendrá un tiempo de arranque menor, así como una altura de pico mayor y un ancho menor (mejor señal). B-II al tener una longitud de reactor mayor, tardará más en llegar al detector que B-I, al tener el mismo flujo, esto hará que tenga un mayor tiempo de arranque. Además, B-II tendrá una señal más ancha y un pico de menor altura.

EUI PREGUNTA 4:

A fin de evaluar la eficiencia de un proceso biotecnológico de obtención de un derivado de la penicilina, se emplea Análisis por Inyección en Flujo con detección electroquímica. Durante el proceso de optimización del método analítico, se modifican de manera univariante las distintas condiciones experimentales.

CONDICIÓN I Volumen de muestra: 75 μL , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 0,40 mLmin⁻¹

CONDICIÓN II Volumen de muestra: 75 μL , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 3,00 mLmin⁻¹

CONDICIÓN III Volumen de muestra: 250 μL , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 0,40 mLmin⁻¹

Indique, J.S.R: en cuál de los 3 casos obtendría la señal con la **mayor altura**, el **menor tiempo de arranque** y el **menor ancho de pico**. En su justificación, explique claramente porqué selecciona ese juego de condiciones respecto de los otros.

*Con la **condición II** se tendría una señal de mayor altura debido a que tiene mayor flujo, lo que disminuye la difusión y da una mejor señal. Un mayor flujo también hará que la muestra llegue antes al detector, lo que hará que tenga un menor tiempo de arranque.*

*No elegiría la **condición I** porque el flujo es demasiado lento, esto haría que haya mayor difusión y la señal sea más ancha y tenga menor altura.*

*No elegiría la **condición III** porque tiene mucho volumen de muestra, si bien esto aumentaría la altura del pico y disminuye la dispersión, el ancho del pico se agranda considerablemente, haciendo inviable usar un pico de estas características para una determinación.*

• ELECTROFORESIS CAPILAR

PREGUNTA 1:

a) Indique el fundamento de la electroforesis capilar (EFC). Mencione sus características y las ventajas sobre cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

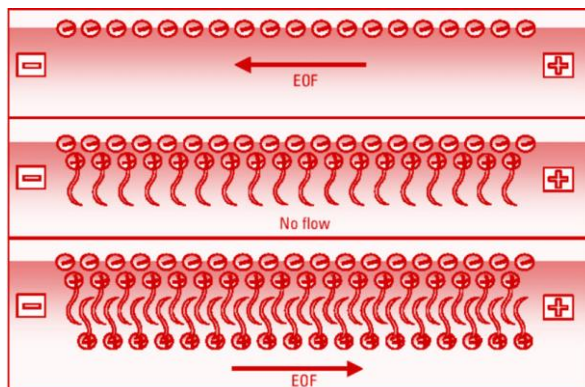
La electroforesis capilar se basa en la diferencia de movilidad que experimentan diferentes compuestos cuando se encuentran en una solución que migra dentro de un tubo capilar debido a la aplicación de una elevada diferencia de voltaje en sus extremos.

b) I) ¿Cómo se define el flujo electroosmótico (EOF)?

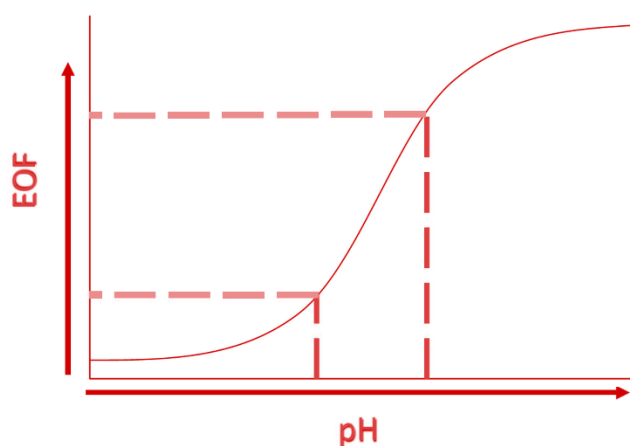
El flujo electroosmótico hace referencia a todo el movimiento general dentro del tubo capilar debido al campo eléctrico generado por la diferencia de potencial entre los extremos del capilar. Por norma general, el sentido del movimiento es del ánodo hacia el cátodo.

II) ¿Cómo podría invertir el orden de elución de los solutos por modificación de la pared del capilar? Explique brevemente.

Se podría invertir el orden al cambiar la carga de la pared del capilar. Normalmente las paredes de los tubos capilares que se usan para electroforesis exponen grupos O-, es decir, carga negativa, para cambiar este valor de carga se puede usar una amina cuaternaria de modo que la carga positiva de la amina se adhiera a la pared del capilar y exponga una cadena carbonada neutra hacia el interior del tubo. Luego si se aumenta la concentración, las cadenas carbonadas de las aminas cuaternarias podrán interaccionar con las que están en solución, de modo que expongan las cabezas con carga positiva hacia el interior del tubo capilar. De esta forma esta nueva capa que está adherida a la pared fuertemente tendrá carga positiva, invirtiendo el orden de elución.



III) Esquematice una curva de variación de EOF en función del pH.



A valores de pH altos, el EOF puede perjudicar la buena separación de los solutos.

A valores de pH bajos va a haber mayor cantidad de especies protonadas (catiónicas) que se pueden adsorber en la pared del capilar, haciendo que tengan tiempos de elución mayores y tengamos un pico más ancho.

c) Los siguientes fármacos se emplean como analgésicos con aplicaciones en distintos tipos de traumas de acuerdo a los requerimientos de analgesia. Indique, **justificando su respuesta**, cuál sería el orden de elución esperado para estos compuestos en una

separación electroforética de zona, empleando un capilar de sílice convencional utilizando una solución de "buffer" fosfato de pH 8,5.

datos:



El orden de elución sería el siguiente: 1° Paracetamol; 2° Ketamina; 3° Aspirina.

Primero eluiría el paracetamol porque al pH de trabajo (8,5) el grupo amino estaría protonado, confiriéndole carga positiva a la molécula, esto va a hacer que tenga menor tiempo de elución al tener carga opuesta al cátodo.

En segundo lugar, eluiría la ketamina, la cual al pH de trabajo la amina se encuentra desprotonada, por lo que no tendrá una carga positiva, sino que estará neutra, esto hará que solo avance por el tubo capilar por acción del EOF, haciendo que tenga un tiempo de elución un poco mayor.

En tercer lugar, eluiría la aspirina, que en el pH de trabajo estaría desprotonada, lo que haría que la molécula tenga carga negativa, esta carga negativa hará de fuerza en contra del EOF, lo que hará que se ralentice y tenga mucho más tiempo de elución.

PREGUNTA 2:

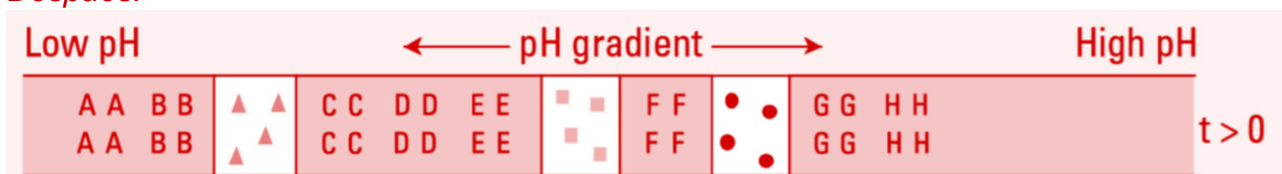
a) Indique el fundamento de la Electroforesis Capilar en el modo Isoelectroenfoque. Indique las características principales, condiciones de trabajo y para qué tipo de muestras se emplea. Realice un diagrama del capilar antes y durante el proceso.

El electroisoeenfoque (CIEF) se basa en la separación de compuestos (principalmente proteínas) según su punto isoelectrico (pI) empleando un gradiente de pH en el tubo capilar utilizando diferentes moléculas zwitteriónicas con valores de pI que cambian en el rango de pH deseado.

Antes:



Después:



b) Un biotecnólogo necesita separar una serie de fragmentos de ADN provenientes de una digestión con enzimas de restricción, para ello dispone de un equipo de electroforesis capilar en geles (CGE) con bis-poliacrilamida entrecruzada. Las condiciones de trabajo son las siguientes:

✓ Tampón Tris-borato 0,10M pH 8,3

✓ E= 250 V/cm

✓ L= 40 cm

✓ $l = 30 \text{ cm}$ ✓ i.d. $75 \mu\text{m}$ ✓ $\lambda = 206$

Los fragmentos (en pares de bases "bp") son: (a) 506 bp; (b) 2036 bp; (c) 75 bp; (d) 1018 bp; (e) 298 bp

Indique **JSR** el orden de elución de los fragmentos de ADN y esquematice cualitativamente un registro de las señales en función del tiempo que esperaría ver en el análisis de esta muestra.

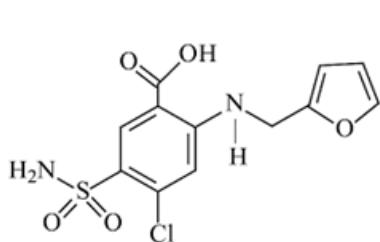
En una electroforesis capilar en geles, primero eluirán los fragmentos de menor peso molecular, es decir los de menor cantidad de pares de bases, y luego los de mayor cantidad de pares de bases. Entonces el orden de elución sería el siguiente:

1° "c" → 2° "e" → 3° "a" → 4° "d" → 5° "b"

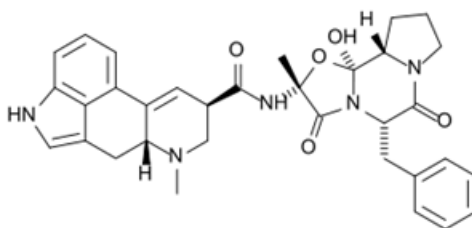
c) Mencione las principales características de los sistemas micro-analíticos y esquematice una celda de detección electroquímica integrada en un equipo de electroforesis capilar

EUI PREGUNTA 1:

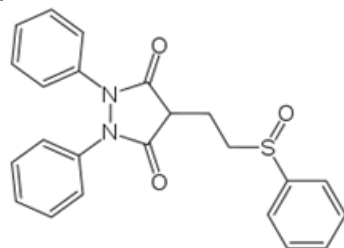
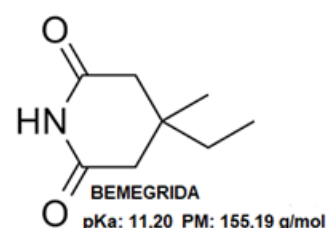
En la terapéutica, el manejo de las dosis es crítico ya que muchos fármacos son drogas con alta eficacia, pero que pueden provocar efectos adversos en dosis no controladas. Por lo tanto, el monitoreo de los niveles séricos de estos fármacos resulta decisivo para mejorar la efectividad y seguridad del tratamiento en pacientes con diferentes cuadros patológicos. En este sentido, la electroforesis capilar, es una metodología ampliamente empleada en la determinación de compuestos de acción farmacológica con potencial efecto tóxico, como los que se detallan a continuación:



Furosemida
pKa: 3,90 PM: 330,75



Ergotamina
pKa: 6,30 PM: 581,66



SULFINPIRAZONA
pKa: 2,80 PM: 404,12 g/mol

A partir de las siguientes condiciones de trabajo:

- * Capilar convencional de sílice fundido recubierto con bromuro de dodecil trimetil-amonio (DTAB).
- * Buffer Succinato de sodio 0,20 M pH = 5,57
- * Temperatura = 20°C * E = 25 kV/cm * L= 57 cm

* $l = 50$ cm

* i.d. = $50\ \mu\text{m}$

* Detector UV - $\lambda = 230$ nm

* Alcohol bencílico (AB): se adiciona a la corrida electroforética y su tiempo de migración a través de un capilar convencional de sílice fundido modificado con DTAB de 50 cm fue de 10,47 min.

Indique:

a) ¿Qué tipo de electroforesis capilar emplearía Ud. en estas condiciones para separar estos fármacos? Justifique su respuesta indicando el fundamento de la técnica.

Usaría una electroforesis capilar en zona, ya que se está usando un capilar de sílice fundido. Esta técnica consiste en la separación de compuestos a partir de su relación carga/masa. No sirve para separar compuestos nuestros, ya que saldrán como una sola banda sin distinción, tampoco los separa únicamente por su peso molecular.

b) ¿Qué función cumple el alcohol bencílico? Justifique su respuesta.

Tiene la función de estándar interno, ya que es un compuesto que no reacciona con los fármacos

c) ¿Qué función cumple el DTAB? Justifique su respuesta.

Sirve para recubrir la pared del capilar y cambiar la carga de la misma, en este caso expondría las cadenas carbonadas hacia el interior del capilar, haciendo que este recubrimiento de las paredes tenga carga positiva, esto provoca una inversión en el sentido de la electroforesis, haciendo que sea de cátodo \rightarrow ánodo.

d) Asigne el orden, adjudicando del número 1 al 4 a cada uno de los fármacos, desde el menor tiempo de elución ($N^{\circ}1$) al mayor ($N^{\circ}4$), y justifique su elección empleando para ello el principio de separación de esta metodología.

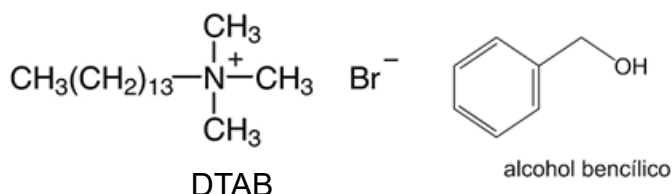
Primero debería salir los que tienen carga negativa, es decir, la furosemida. Luego saldrían los compuestos neutros, es decir la sulfipirazona, y finalmente los compuestos cargados positivamente, es decir la Ergotamina y la bemegrida, siendo esta última la primera en salir de los compuestos cargados positivamente debido a que tiene menor peso molecular.

Entonces el orden de elución es:

$N^{\circ}1$ Furosemida \rightarrow $N^{\circ}2$ Sulfipirazona \rightarrow $N^{\circ}3$ Bemegrida \rightarrow $N^{\circ}4$ Ergotamina.

NOTA: SE RECOMIENDA FUERTEMENTE NO USAR LOS SIGNOS MAYOR Y MENOR EN LAS RESPUESTAS, EMPLEE PALABRAS.

Datos:



EUI PREGUNTA 3:

a) En un laboratorio clínico especializado en biología molecular se ha desarrollado una metodología de separación de proteínas de bajo peso molecular a través de la formación de complejos con dodecil sulfato de sodio (SDS). Para ello dispone de un equipo de electroforesis capilar en geles (CGE) de polietilenglicol (PEG). Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- Tampón Tris-CHES 0,10 M, SDS 0,1%, pH7,21
- $E = 300$ V/cm
- $L = 50$ cm

- $l = 40$ cm
- i.d. = $100\ \mu\text{m}$
- Detector UV - $\lambda = 214$

La presencia de SDS promueve la formación de complejos SDS-proteína. El SDS adsorbido enmascara la carga intrínseca de la proteína produciendo complejos de carga constante por unidad de masa. Las proteínas para separar son:

- (a) albúmina sérica bovina (66,5 kDa, pl: 4,7)
- (b) anhidrasa carbónica (30,0 kDa, pl: 6,2)
- (c) inhibidor de tripsina de soja (20,0 kDa, pl: 4,6)
- (d) fosforilasa B (185 kDa, pl: 5,8)
- (e) ovoalbúmina (45 kDa, pl: 5,19)
- (f) alfa-lactoalbúmina (14,2 kDa, pl: 4,5).

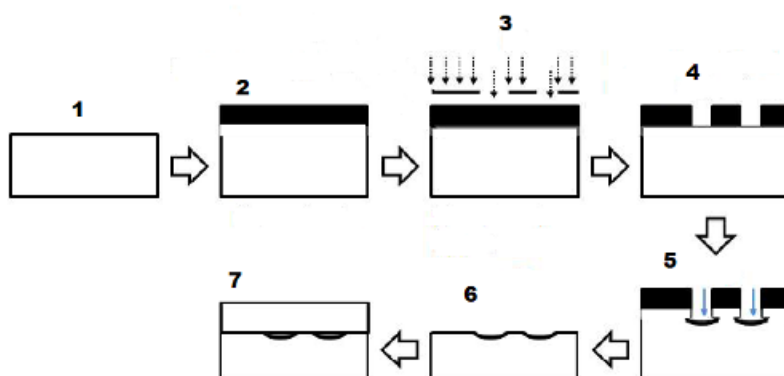
Indique el orden de elución de cada proteína **de menor a mayor tiempo de migración (t)** de acuerdo con el principio de separación empleado. **Justifique su respuesta**

NO UTILICE LOS SIGNOS MAYOR / MENOR O IGUAL, EN LAS RESPUESTAS EMPLEE PALABRAS.

El orden de elución estará determinado por el peso molecular de cada proteína, ya que el SDS enmascara la carga haciendo que sea constante, por lo que el orden de elución sería el siguiente de menor a mayor tiempo de elución sería:

- 1° (f) alfa-lactoalbúmina (14,2 kDa)
- 2° (c) inhibidor de tripsina de soja (20,0 kDa)
- 3° (b) anhidrasa carbónica (30,0 kDa)
- 4° (e) ovoalbúmina (45 kDa)
- 5° (a) albúmina sérica bovina (66,5)
- 6° (d) fosforilasa B (185 kDa)

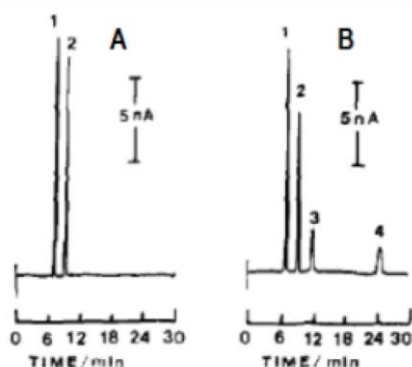
b) A partir de la siguiente imagen describa brevemente las etapas (1 a 7) que requiere un proceso de **microfabricación** empleando vidrio como sustrato.



- 1) Se parte de un sustrato, por lo general se usan materiales de vidrio o de silicio.
- 2) Se agrega una capa de polímero fotosensible en la parte superior
- 3) Se coloca una máscara en la superficie de ese polímero. La cual permite ocultar las zonas que se requieren que no desaparezca. Se aplica radiación UV que afecta a las zonas desprotegidas
- 4) Cuando se incide luz UV se generan canales en las zonas del polímero desprotegidas.
- 5) Los canales de reacción son erosionados del sustrato usando por ejemplo algún ácido fuerte.
- 6) Se remueve la película del polímero que está en la superficie.
- 7) Se agrega una capa que cierra los canales (bonding)

EUI PREGUNTA 4:

Glucosa oxidasa (GOx) cataliza la reacción de oxidación enzimática de β -D-glucosa, produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Para estudiar la cinética de formación de los productos, este proceso puede seguirse a través de electroforesis capilar con detección electroquímica (EC-DE) empleando una celda electroquímica convencional con un microelectrodo de trabajo de cobre, ya que glucosa, ácido glucónico y peróxido de hidrógeno pueden ser monitoreados electroquímicamente en estas condiciones de trabajo. La siguiente figura muestra la reacción de oxidación catalizada por GOx, a diferentes tiempos en presencia de glucitol, que no reacciona con la enzima, y el sustrato β -D-glucosa.



El **electroferograma A** muestra la señal previa a la adición de GOx (tiempo cero). El **electroferograma B** muestra la respuesta de la **reacción enzimática** luego de 5 minutos de adicionar GOx al medio de reacción.

Nota: GOx no puede ser detectada por esta metodología.

Las condiciones de separación electroforética son:

- **Capilar:** convencional de sílice fundido.
- **Solución de separación:** NaOH 100 mM pH = 13
- **Temperatura:** 25°C
- **Potencial de separación:** 30 kV/cm
- **L:** 80 cm
- **I:** 50 cm
- **i.d.:** 25 μ m
- **Detector:** celda electroquímica wall-jet de 3 electrodos, **electrodo de trabajo:** Cobre de 100 μ m de diámetro, **electrodo de referencia:** Ag/AgCl (NaCl 3 M), **contraelectrodo:** Alambre de platino. **Potencial de trabajo:** +0,60 V

En estas condiciones de trabajo indique:

a) ¿Qué tipo de electroforesis capilar se emplea para separar estos compuestos? Justifique su respuesta indicando el fundamento de la técnica.

El tipo de electroforesis capilar que emplearía es una electroforesis capilar en zona, ya que se está usando un capilar de sílice fundido que es activado con NaOH.

b) ¿Qué función cumple el glucitol? Justifique su respuesta.

El glucitol es un compuesto que no reacciona con la enzima GOx, por lo que se usa como estándar interno.

c) ¿Por qué disminuye el **pico 2** en el electroferograma B? Justifique su respuesta.

Porque el pico 2 corresponde al sustrato de la enzima, es decir β -D-Glucosa, que al comienzo como no es consumida va a tener un pico más alto, pero al ir reaccionando se consume y por eso baja la señal.

d) Asigne el orden de los picos **1, 2, 3 o 4** del **electroferograma B** que corresponda **a cada compuesto** y justifique su elección empleando para ello el principio de separación de esta metodología.

Datos:	Glucitol	β -D-Glucosa	Ácido glucónico	Peróxido de hidrógeno
Carga neta	0	-0,65	-1,0	-1,0
pKa	13,00	12,30	3,86	11,70
Peso molecular	182,2	180,2	196,2	34

EUI PREGUNTA 5:

El isoelectroenfoco capilar (IEEF) es un método de alta resolución, potente y práctico para la separación de componentes en mezclas biológicas complejas. Este método puede ser aplicado al estudio de los niveles de proteínas contenidas en fluido cerebrospinal humano, en las siguientes condiciones de trabajo:

- Capilar de sílice fundido recubierto con alcohol polivinílico (PVA)
- El Capilar se rellena con anfolitos combinados (pH 3,0-12,0)
- $E = 400V / cm$
- $L = 50cm$
- $l = 37cm$
- i.d.= $50 \mu m$
- Detector UV - $\lambda = 280nm$

Las proteínas a separar son:

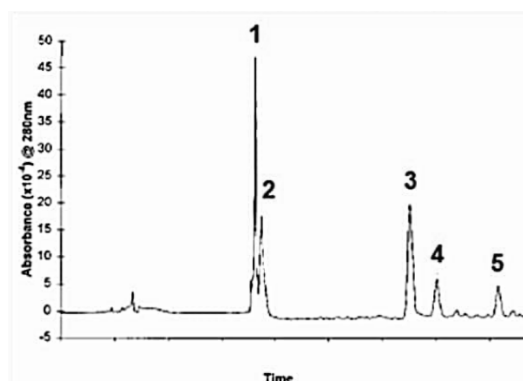
- (A) inhibidor de tripsina (20,0 kDa, pl: 4,6);
 (B) lisozima (14,3 kDa, pl: 11,0);
 (C) anhidrasa carbónica B (30,0 kDa, pl: 5,9);
 (D) citocromo C (0,89 kDa, pl: 9,6);
 (E) mioglobina (16,7 kDa, pl: 7,0).

Sabiendo que el tiempo de migración de mioglobina es $(303,8 \pm 0,8)$ s y el del inhibidor de tripsina $(696,5 \pm 0,6)$ s, responda:

a) ¿Qué función cumple el alcohol polivinílico PVA? Justifique su respuesta.

El PVA tiene la función de recubrir las paredes del capilar para cambiar la carga de una carga negativa a neutro (sin carga). De esta forma se evita además la adsorción de las proteínas a las paredes, algo importante en la técnica de isoelectroenfoco capilar.

b) Asigne a cada proteína los picos (de 1 a 5) del electroferograma que se muestra a continuación, y justifique su elección de acuerdo con el principio de separación de esta metodología.



Si la dirección del isoelectroenfoco es de Cátodo → Ánodo, entonces los picos corresponden a:

Pico 1: Corresponde a Lisozima

Pico 2: Corresponde a Citocromo C

Pico 3: Corresponde a Mioglobina

Pico 4: Corresponde a anhidrasa carbónica B

Pico 5: Corresponde a inhibidor de tripsina

Esto se debe a que las moléculas migrarán según el pI que tengan, siendo el ánodo donde se sitúan los pH más ácidos (pI más bajos serían más retenidos) y en el cátodo pH más básicos (pI más altos no sufrirían tanta retención, siendo los primeros en eluir).

EUI PREGUNTA 6:

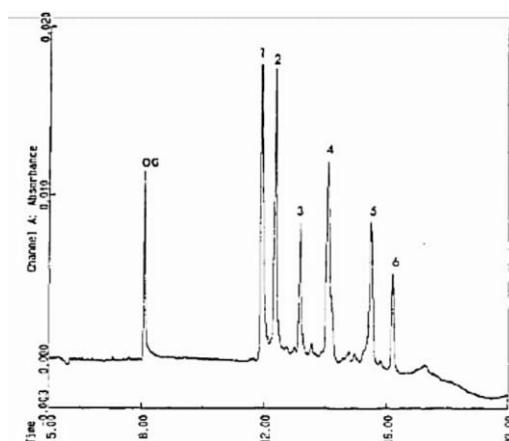
En un laboratorio de biología molecular se ha desarrollado una metodología de separación de proteínas de bajo peso molecular a través de la formación de complejos con dodecil sulfato de sodio (SDS). Para ello dispone de un equipo de electroforesis capilar en geles (CGE) de polietilenglicol (PEG). Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- Tampón Tris 0,10 M, SDS 0,1%, pH 8,8
- $E = 300V/cm$
- $L = 50cm$
- $I = 40cm$
- i.d.= 100 μm
- Detector UV - $\lambda = 214$

La presencia de SDS promueve la formación de complejos SDS-proteína. El SDS adsorbido enmascara la carga intrínseca de la proteína produciendo complejos de carga constante por unidad de masa. Las proteínas a separar son:

- (a) albúmina sérica bovina (66,5 kDa, pI : 4,7);
- (b) anhidrasa carbónica (30,0 kDa, pI : 6,2);
- (c) inhibidor de tripsina de soja (20,0 kDa, pI : 4,6);
- (d) fosforilasa B (185 kDa, pI : 5,8);
- (e) ovoalbúmina (45 kDa, pI : 5,19);
- (f) alfa-lactoalbúmina (14,2 kDa, pI : 4,5).

Justifique el orden de elución del electroferograma que se muestra a continuación de acuerdo con el principio de separación empleado y asigne los picos de 1 a 6 a cada proteína, sabiendo que el pico inicial OG corresponde a la señal del estándar interno Orange G.



• AUTOMATIZACIÓN Y MINIATURIZACIÓN

PREGUNTA 1:

- a. Compare sistemas automáticos y sistemas automatizados. En un diagrama Indique las similitudes y diferencias.
- b. Esquematice un diseño simple de un "microchip" para EFC con detección electroquímica. Mencione las ventajas de este tipo de detección. **Justifique su respuesta.**

EUI PREGUNTA 1:

- a) Complete el siguiente párrafo indicando la/s palabra/s que corresponde/n en cada caso (1,2 y 3).

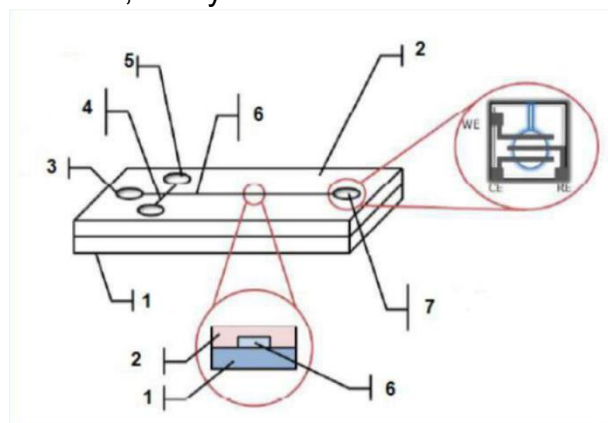
Los ensayos de *immunoblotting* combinan metodologías electroforéticas empleando la separación en (1)para determinar (2)..... de ciertos marcadores proteicos en una muestra de composición heterogénea. El evento de biorreconocimiento se pone de manifiesto a través de (3)

- b) indique y explique brevemente 4 ventajas fundamentales de los sistemas miniaturizados automatizados.

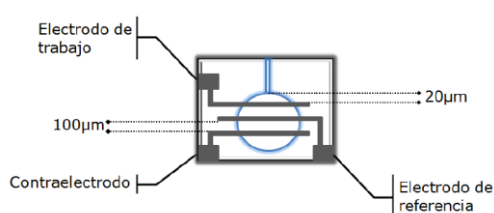
NOTA: Sin la explicación la sola mención de las ventajas no será tenida en cuenta en la corrección.

EUI PREGUNTA 2:

En la siguiente imagen se observa el diseño de un microchip para electroforesis. Indique sus componentes de (1 a 7) y describa brevemente su aplicación para el análisis de una muestra, incluyendo el método de detección empleado.



- 1) Vidrio
- 2) Resina
- 3) Buffer
- 4) Canal de inyección
- 5) Muestra
- 6) Canal de separación
- 7) Celda de detección



←Electrodo

TEÓRICO 6: INMUNOENSAYOS

PREGUNTA 1:

a) Marque la opción correcta y JSR:

I- Los anticuerpos monoclonales y policlonales:

- A. Los anticuerpos monoclonales pueden proveer especificidad y sensibilidad en el desarrollo.
- B. Son inmunoglobulinas.
- C. Se unen al antígeno a través de la región de unión Fab.
- D. Todas las opciones anteriores. ✓

La opción correcta es la D, ya que la opción A es correcta, ya que los Acs monoclonales son un conjunto de anticuerpos que tienen especificidad por un mismo antígeno, entonces van a tener mayor especificidad con respecto a los policlonales. La opción B es correcta, por definición un anticuerpo es una inmunoglobulina (ya sea policlonal o monoclonal). La opción C es correcta, ya que en las regiones Fab de los anticuerpos se encuentran las tres regiones hipervariables (CDR) son las zonas que se unen específicamente con el antígeno.

b) Marque con una X la opción correcta:

II-Un anticuerpo monoclonal individual se une a varios puntos diferentes (epítopes) en un analito. **JSR**.

Verdadero ☐ Falso ☒

Un anticuerpo monoclonal individual (es decir, una sola inmunoglobulina), solamente se une específicamente a un solo epítipo de un antígeno. Ya que la porción Fab del anticuerpo solo podrá reconocer una sola región del antígeno, no varias. Además, que el anticuerpo monoclonal provendrá de un solo hibridoma que producirá Igs específicas contra un solo epítipo.

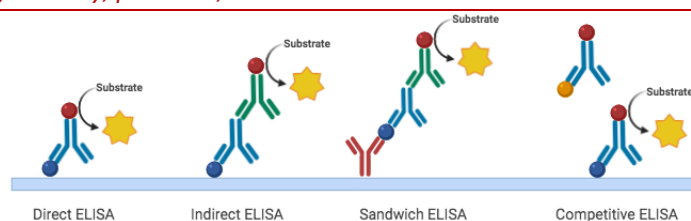
III- ¿Qué técnica de inmunoensayo se prefiere para proporcionar la mayor sensibilidad y la mayor especificidad? **JSR** y esquematice la opción seleccionada.

- A. Competitiva de un paso
- B. No competitiva (sándwich) de dos pasos
- C. Competitiva de dos pasos
- D. No competitiva (sándwich) de un paso

La técnica que tiene mayor sensibilidad y especificidad es la no competitiva de dos pasos, es decir un ELISA sándwich. Esto es porque se usan dos anticuerpos que se unen específicamente a un mismo antígeno, a diferencia de un ELISA indirecto donde se une solo el anticuerpo primario al antígeno (el secundario reconoce la Fc del anticuerpo primario), esto puede dar lugar a reactividad cruzada. El ELISA directo al no emplearse un anticuerpo secundario tendrá menor amplificación de la señal.

Cuadro de tipos de ELISA

ELISA DIRECTO	<p>El ELISA directo es el ensayo ELISA más simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación del mismo. SE USA PARA IDENTIFICAR ANTÍGENOS, ES EL MENOS USADO AL SER MENOS SENSIBLE.</p> <p>El procedimiento simplificado sería el siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1º El antígeno se inmoviliza sobre una placa. 2º Se realiza un bloqueo para evitar la unión inespecífica de otros componentes. 3º Se añade un anticuerpo primario marcado con una enzima que se unirá al antígeno de interés 4º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.
ELISA INDIRECTO	<p>Es un ensayo parecido al ELISA directo, pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima. SE SUELE USAR PARA IDENTIFICAR ANTICUERPOS EN MUESTRAS DE SANGRE.</p> <p>El procedimiento simplificado sería el siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1º El antígeno se inmoviliza sobre una placa 2º Se realiza un bloqueo para evitar la unión inespecífica de otros componentes. 3º Se añade un anticuerpo primario sin marcar que se une al antígeno de interés 4º Se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario. 5º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.
ELISA SANDWICH	<p>En el ELISA tipo sándwich el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección también conocidos como pares de anticuerpos, que se unirán a dos epítopos distintos de un mismo antígeno. SE SUELE USAR PARA IDENTIFICAR ANTÍGENOS EN MUESTRAS DE SANGRE, AUNQUE TAMBIÉN SE PUEDE USAR PARA IDENTIFICAR ANTICUERPOS.</p> <p>El procedimiento simplificado sería el siguiente: (Entre cada paso lavar)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1º El anticuerpo de captura se inmoviliza sobre la placa 2º Se realiza un bloqueo para evitar la unión inespecífica de otros componentes. 3º Se añade la muestra que contiene el antígeno de interés que se unirá al anticuerpo de captura 4º Se añade el anticuerpo de detección que se unirá al antígeno unido a su vez al anticuerpo de captura. 5º En caso de que el anticuerpo de detección vaya conjugado a una enzima, procederemos directamente con el 5º paso. En caso contrario (que es lo más habitual en los ELISA tipo sándwich), será necesario añadir un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo de detección. 6º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.
ELISA COMPETITIVO	<p>El ELISA competitivo es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario.</p> <p>SE SUELE USAR PARA IDENTIFICAR ANTÍGENOS PEQUEÑOS O EN BAJA CONCENTRACIÓN.</p> <p>Se utiliza generalmente para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en muy bajas cantidades.</p> <p>El procedimiento simplificado sería el siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1º El antígeno de referencia se inmoviliza sobre la placa. 2º Por otro lado, un exceso de anticuerpo primario sin marcar se incuba con la muestra que contiene el antígeno de interés, dando lugar a la formación de complejos antígeno-anticuerpo. 2º Se añade la mezcla antígeno-anticuerpo a la placa, donde el antígeno de referencia competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo. 4º Se lava la placa eliminando los complejos antígeno-anticuerpo solubles 5º Se añade a la placa un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario anclado al antígeno de referencia. 6º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de interés presente en la muestra, ya que cuanto más antígeno hay en la muestra, menos anticuerpo termina unido al fondo de los pocillos a través del antígeno de referencia y, por tanto, menos señal.



c) Enumere tres clases de marcadores usados en las técnicas de inmunoensayo:

1. *Enzimas peroxidasa*.....
2. *Fluorocromos*.....
3. *Isotopos radioactivos*.....

EUI PREGUNTA 1:

La brucelosis es una enfermedad causada por varias especies de *Brucella* que infectan principalmente el ganado vacuno, porcino, caprino y ovino. Los humanos contraen la enfermedad por contacto directo con animales infectados o por consumir productos animales contaminados no pasteurizados. Es una de la zoonosis más distribuida a nivel mundial y se considera un peligro ocupacional para los trabajadores del sector ganadero. El enzimo-inmunoensayo (ELISA) es una de las técnicas de elección más utilizadas para estudiar la presencia del microorganismo en cultivos de sangre o médula ósea en el estado agudo o bien identificar o confirmar la especificidad de los anticuerpos presentes en las muestras de los pacientes con *Brucella spp* cuando la patología está en estado crónico.

a) ¿Qué tipo de ELISA emplearía usted para investigar cultivos de tejido de médula ósea sospechosos de *Brucella spp*? Justifique su respuesta.

Usaría un ELISA competitivo, ya que de esta forma se podrían detectar los lipopolisacáridos (LPS) que se encuentran en la superficie de Brucella. Para conseguir esto el procedimiento sería el siguiente (no lo pide la consigna, pero bueno):

Entonces en la placa se inmoviliza el antígeno, que en este caso es el LPS de Brucella, luego se realiza un preparado de anticuerpos monoclonales anti-LPS de Brucella con un homogenato proveniente de muestra del tejido de médula ósea sospechoso de Brucella. Este preparado se añade sobre la placa y se incuba. Luego se realiza un lavado y se añade el anticuerpo monoclonal anti-anticuerpo monoclonal de Brucella, que contiene una enzima en su estructura (por ejemplo, una peroxidasa). Luego se adiciona el sustrato de la enzima y se pueden obtener dos resultados: Un resultado negativo, los anticuerpos anti-LPS de Brucella se unen a los antígenos de la placa, y se observa color. En un resultado positivo, los anticuerpos anti-LPS se unen a los LPS de la muestra problema y no en los antígenos que están en la placa, lo que se observa como una ausencia de color o una disminución considerable del mismo.

b) ¿Cómo llevaría a cabo un ensayo cuantitativo para brucelosis crónica en la muestra de un paciente? Justifique su respuesta.

Para realizar un ensayo cuantitativo para brucelosis crónica en la muestra de un paciente usaría la técnica de ELISA indirecto, ya que de esta forma podremos evidenciar si el paciente ha desarrollado anticuerpos que reconozcan antígenos de Brucella. Los pasos para llevarlo a cabo serían los siguientes:

- 1) Se inmoviliza sobre una placa un antígeno proveniente de Brucella. Se incuba y luego se lava.*
- 2) Se realiza un bloqueo de la placa para evitar uniones inespecíficas de otros componentes. Se incuba y luego se lava.*
- 3) Se agrega una muestra de suero de un paciente con brucelosis crónica, en este paso los anticuerpos presentes en el suero se unirán con el antígeno. Se incuba y luego se lava.*

- 4) *Se adiciona un anticuerpo monoclonal secundario que contiene en su estructura una enzima peroxidasa. Se incuba y luego se lava.*
- 5) *Se agrega el sustrato de la enzima (en este caso peróxido) y un cromógeno que reaccionará con la enzima del anticuerpo monoclonal, generando una coloración.*
- 6) *Se mide la coloración de la placa y se realiza una curva de calibración donde se relacione el color con la concentración. De esta forma se puede cuantificar la cantidad de anticuerpos presentes en el paciente.*

EUI PREGUNTA 2:

El Chagas es una enfermedad olvidada asociada a condiciones de extrema pobreza, causada por el parásito ***Typanosoma cruzi***, que afecta entre 6 y 8 millones de personas y es endémica en 21 países de Latinoamérica. El diagnóstico en la fase inicial aguda de la enfermedad se realiza fundamentalmente por la demostración de la presencia del parásito, en tanto que en la fase crónica se torna muy difícil la detección del parásito. Dado que en estas condiciones el sujeto infectado puede ser aún asintomático y convertirse en un foco potencial de transmisión de *T. cruzi* a través de transfusiones sanguíneas, se hace necesario recurrir a otras alternativas de diagnóstico. En el período crónico, el sujeto genera respuesta inmune específica que persiste toda la vida, de modo que los ensayos serológicos son el elemento central para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica. Una de las metodologías serológicas de diagnóstico de Chagas es el test de ELISA en suero.

a) ¿Qué tipo de ELISA de los que Ud. Conoce emplearía como test diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad de Chagas? Justifique su respuesta

*Emplearía un ELISA indirecto, ya que los pacientes en fase crónica empiezan a formar anticuerpos que sean específicos contra el parásito *T. cruzi*, y la metodología que se puede emplear para la comprobar la presencia de este tipo de anticuerpos es el ELISA indirecto.*

b) Enumere cada uno de los pasos del ensayo, indicando los reactivos que necesita para realizarlo.

Pasos de ELISA indirecto:

- 1) *Se inmoviliza un antígeno obtenido comercialmente sobre una placa. De forma que quede adherida en el fondo. Se deja incubar y luego se lava.*
- 2) *Se realiza un bloqueo de la placa utilizando una proteína inerte que rellenen los espacios donde no se inmovilizó el antígeno, de esta forma evitamos la unión de componentes de la muestra que puedan interferir en la reacción y den resultados falsos positivos. Se deja incubar y luego se lava.*
- 3) *Se agrega en la placa una muestra de un paciente que se sospecha que tiene Chagas crónico. Si el paciente desarrolló anticuerpos específicos contra el parásito (serían los anticuerpos primarios), estos se deberían unir con el antígeno de la placa. Se deja incubar y luego se lava.*
- 4) *Se adiciona un anticuerpo monoclonal conjugado a una enzima peroxidasa (anticuerpo secundario), este anticuerpo monoclonal tiene especificidad contra la Fc del anticuerpo anti-Chagas (en este caso sería específico contra la Fc del isotipo IgG, se usa IgG porque es el isotipo más común en sangre). Se deja incubar y luego se lava.*
- 5) *Se adiciona la placa los sustratos de reacción de la enzima conjugada, al ser una peroxidasa, el sustrato sería el H_2O_2 , y también se adiciona un cromógeno TMB, que en presencia de la peroxidasa y peróxido se oxida, haciendo que se torne de color*

azul. Este proceso de oxidación va a continuar en ciclo haya, por más que tenga o no reconocimiento, entonces este proceso se frena utilizando un ácido fuerte cuando el blanco empieza a colorearse, tornándose de color amarillo.

EUI PREGUNTA 3:

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de determinados órganos o tejidos del organismo. El enzimo-inmunoensayo (ELISA) es una de las técnicas de elección más utilizadas para identificar o confirmar la especificidad de los autoanticuerpos presentes en las muestras de los pacientes con enfermedades autoinmunes. Estos ensayos se fundamentan en el reconocimiento de los anticuerpos específicos de cualquier isotipo presentes en las muestras de los pacientes.

a) ¿Qué tipo de ELISA cree usted que corresponde a la prueba para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes? Justifique su respuesta.

b) Como llevaría a cabo un ensayo cuantitativo para Lupus eritematosos sistémico en la muestra de un paciente? Describa cada uno de los pasos de este, indicado los reactivos que necesita para realizar el ensayo.

Nota: Esta enfermedad autoinmune genera autoanticuerpos contra las células de tejidos sanos como riñón, piel y articulaciones.

EUI PREGUNTA 4:

La hepatitis B es causada por el virus HBV. Puede cursar en forma asintomática, o como un proceso agudo o crónico. En los casos más graves, puede derivar en cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Se transmite principalmente por contacto parental, percutáneo, o sexual. También se ha observado transmisión perinatal y horizontal. El HBV está constituido por una nucleocápside que contiene el ADN asociado a proteínas core y una envoltura cuyo principal componente es una proteína conocida como antígeno de superficie (HBsAg). El HBsAg generalmente aparece 6 semanas después de la exposición al HBV y persiste durante 4-14 semanas. Está presente durante el período de incubación, antes de la aparición de la enfermedad clínica y puede ser detectado en sangre 2 a 8 semanas antes de la aparición de ictericia o de evidencias bioquímicas de disfunción hepática. Así, el HBsAg es un primer indicador de infección por HBV. La hepatitis B crónica se define como la presencia del HBsAg en sangre durante más de 6 meses. La detección del HBsAg es importante para el diagnóstico de hepatitis agudas y crónicas, el control de portadores en bancos de sangre y unidades de diálisis, de trasplantados, gestantes y para el control de preparados de sangre y hemoderivados destinados a transfusiones.

a) ¿Qué tipo de ELISA de los que Ud. conoce emplearía como test diagnóstico de HBV? Justifique su respuesta.

b) Enumere cada uno de los pasos del ensayo, indicando los reactivos que necesita para realizarlo.

PREGUNTA 5:

El antígeno p24 es una proteína que forma parte de la cápside del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Es uno de los primeros antígenos detectados en la sangre de individuos infectados. Este antígeno aparece transitoriamente al inicio de la infección y luego reaparece en estadio tardío de la enfermedad, coincidiendo con los momentos de mayor replicación viral. Permite evaluar en conjunto con otros parámetros la terapia

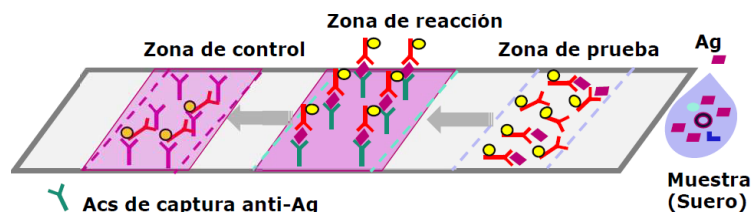
antirretroviral, pues se observa reducción de los niveles de antígeno p24 circulantes luego del tratamiento. El antígeno p24 se determina en suero mediante ELISA.

- ¿Qué tipo de ELISA cree usted que corresponde al test para la determinación del antígeno viral p24? a Justifique su respuesta.
- Esquematice y describa cada uno de los pasos del mismo, indicando los reactivos que necesita para realizar el ensayo.
- ¿Cómo determinaría la concentración del antígeno p24 en la muestra de un paciente?
- ¿Qué metodología alternativa podría usar para efectuar la etapa de detección si no se dispone en el laboratorio de un compuesto cromóforo y un sistema óptico de detección? Justifique brevemente su respuesta y realice un diagrama de la etapa de detección indicando los elementos necesarios.

¿Inmunoprecipitación?

Inmunocromatografía: Es in inmunoensayo **cualitativo** que se emplea para el diagnóstico rápido de algunas enfermedades, como COVID, VIH, etc. Es un método simple, rápido y efectivo que no requiere de reactivos extras ni tiene un procedimiento complicado.

Se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en la zona de prueba, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítopes del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno problema, éste se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no, migrarán el conjugado y la muestra sin unirse. La zona de captura está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítipo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará en este caso como rosa o azul (muestras positivas). En el caso contrario las muestras son negativas.



Básicamente, si tenemos el antígeno en nuestra muestra, por ejemplo, una proteína viral, esta se unirá a los anticuerpos que tienen la partícula de oro (anticuerpo rojo) por uno de sus epítopes, y viajarán por la membrana. Luego, en la zona de reacción se unirá el antígeno viral al anticuerpo que se encuentra en esta región (anticuerpo verde) y dará una banda coloreada. Siempre va a haber un exceso de anticuerpo de la zona de prueba (anticuerpo rojo) que migra hacia la zona de control, en esta zona un anticuerpo que detecta estos anticuerpos rojos se unirá y dará una banda.

Entonces para que tengamos un resultado positivo, tendremos una banda en la zona de reacción y una en la zona de control.

Si el resultado es negativo, no habrá una banda en la zona de reacción, ya que estos anticuerpos no se unirán a ningún antígeno, pero si habrá una banda en la zona de control, ya que los anticuerpos rojos si migrarán, haya o no presencia de antígeno.

Si no aparece una banda en la zona de control el resultado será inválido.

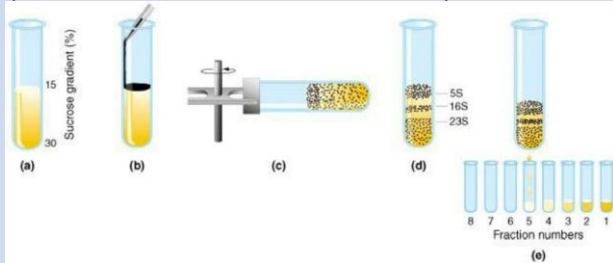
TEÓRICO 7: TÉCNICAS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN

PREGUNTA 1: Explique brevemente el fundamento de la centrifugación isopícnica. De un ejemplo de aplicación y justifique.

La centrifugación isopícnica es aquella en donde las partículas se paran según su densidad, no según el coeficiente de sedimentación (S) como en la centrifugación zonal. Se usa para separar moléculas de PM similar pero que tienen diferente densidad. Ocurre una sedimentación completa de los componentes cuando llegan a un lugar donde la densidad del medio es igual. Se necesitan altas velocidades y tiempos muy largos.

Centrifugación zonal

Se separan los componentes según su coeficiente de sedimentación (S) en un medio de gradiente de densidad. La densidad de las partículas es mayor a la del gradiente, entonces se debe detener la centrifugación antes de que todos los componentes lleguen al fondo del tubo. Se usa para separar proteínas, orgánulos, etc. Con esta técnica se obtienen bandas bien separadas y definidas como si fueran zonas (de ahí el nombre de la técnica).

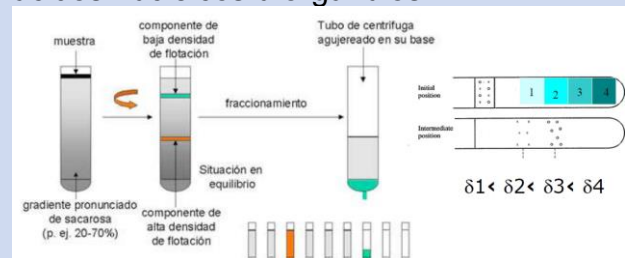


Separación por velocidad de sedimentación.

El gradiente continuo de separación se realiza utilizando un mezclador. **Luego se aplica la muestra** sobre el gradiente. Se usa para separar muestras de peso molecular diferente, pero densidades similares. **El rotor mas adecuado es el basculante.**

Centrifugación isopícnica

Los componentes se separan según su densidad. Estas separaciones se llevan a cabo en un gradiente de densidad en el que las partículas se mueven hasta el punto en el que su densidad es la misma que el medio, allí se detiene su movimiento. **Esta técnica se utiliza, para separar partículas similares en tamaño, pero de diferente densidad.** Es ideal para separar ácidos nucleicos u orgánulos.



La muestra se coloca en la capa superior o dispersa dentro del gradiente de densidad generado por sustancias como sacarosa o cloruro de cesio, entre otras.

PREGUNTA 2:

Indique si las siguientes afirmaciones son verdaderas o falsas y justifique cada una de sus respuestas:

a) Experimentalmente, en comparación con un rotor basculante, un rotor de ángulo fijo permite una mejor separación del sobrenadante y el pellet, ya que este último es retenido en parte de la pared del tubo. *(Falso)*

El de rotor basculante tiene una mejor separación, como el pellet se queda en el fondo del tubo, el sobrenadante es más fácil de retirarlo con este tipo de rotores.

b) Un protocolo de ultracentrifugación adecuado deberá indicar las revoluciones por minuto (rpm) a emplear en cada metodología de separación, debido a que la distancia radial puede variar de un equipo a otro. *(Verdadero)*

En cada metodología de separación, se tiene que informar las rpm y la distancia radial, ya que la fuerza centrífuga depende de estos dos factores, y si se emplea la misma metodología en otro equipo con un radio de rotor diferente, los resultados pueden no ser los mismos.

c) En un rotor basculante los tubos se insertan en orificios en el interior de rotores macizos. En el caso extremo los tubos giran paralelos al eje de giro. *(Falso)*

En un rotor basculante, los tubos se insertan en cestillas que girarán cuando aumenten la fuerza centrífuga, haciendo que los tubos giren de forma perpendicular al eje de giro.

d) En la centrifugación isopícnica es posible separar organelas subcelulares según su velocidad de sedimentación. *(Falso)*

El tipo de centrifugación que se usa para separar organelas subcelulares es la centrifugación zonal.

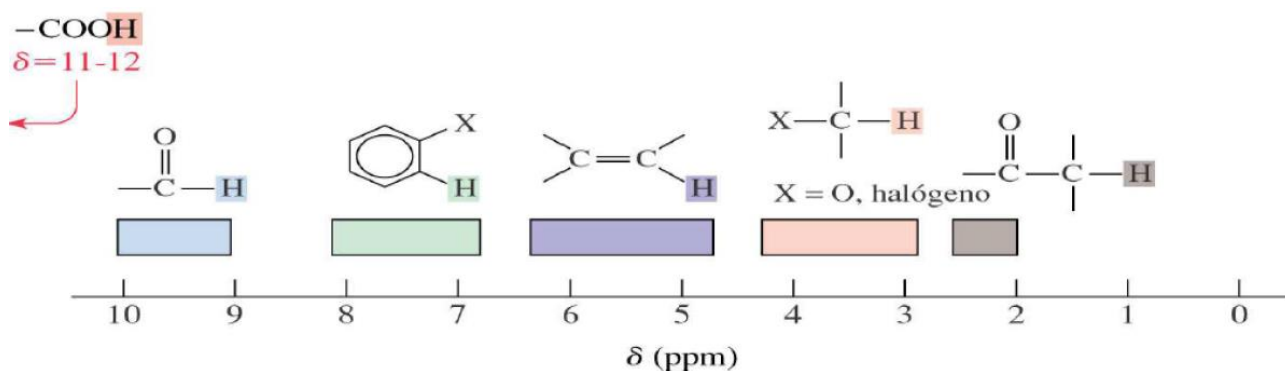
EUI PREGUNTA 1:

Si Ud. es el encargado de optimizar y redactar un protocolo de ultracentrifugación para un determinado tejido, indique cuál es el parámetro de centrifugación fundamental que deberá especificar adecuadamente para que el procedimiento sea exitoso en cuanto a la separación y recuperación del material celular en condiciones óptimas de funcionalidad. Justifique su respuesta.

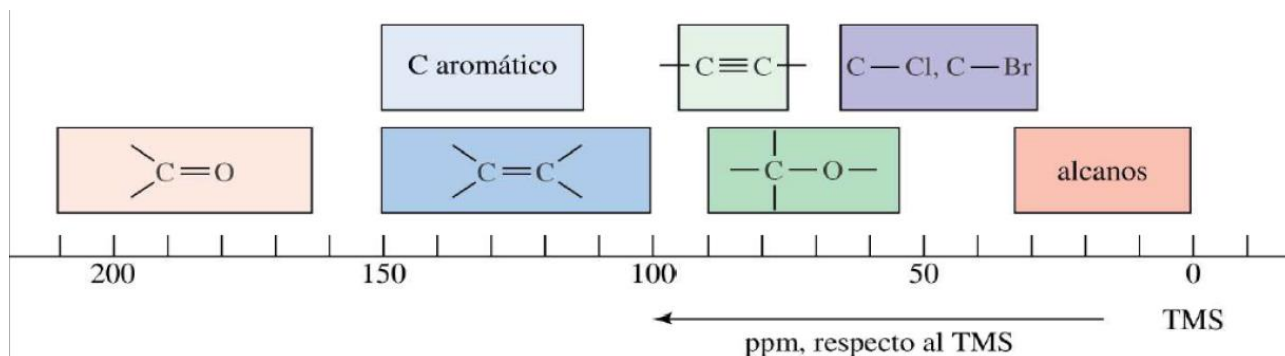
NOTA: Sin la justificación la respuesta no será tomada en cuenta en la corrección.

Anexo

Desplazamientos químicos RMN ^1H



Desplazamientos químicos RMN ^{13}C



Frecuencias RAMAN-IR

	Frequency (cm^{-1})	IR ^a	Raman ^b
Alkanes			
CH ₃ sym stretch	2862–2882	vs	vs
C—C stretch	1040–1100	—	s
Cyclopentane ring breathing	889	—	s
Alcohol O—H stretch	3635–3644	m	w
Acetylene C—H bend	825–640	s	w
Acetylene C≡C	2230–2237	—	s
C≡N stretch in R—CN	2230–2250	s	vs
Cyanate C≡N	2245–2256	s	vs
C—H in R—CHO	2800–2850	m	—
C=O in R—CHO	1730–1740	vs	w
R—NO ₂ asym stretch	1530–1600	vs	m–w
R—NO ₂ sym stretch	1310–1397	s	vs
C—S stretch	580–704	—	vs
S—H stretch	2560–2590	w	s
R ₂ S ₂ S—S stretch	507–512	m–w	s
Benzene ring breathing	992	—	vs
Primary R—Cl	650–660	s	s
Primary R—Br	565–560	s	vs
Primary R—I	500–510	s	vs

^aTaken from Reference 8.

^bvs = very strong, m = medium, w = weak, dash = absent.