

## MÉTODOS ANALÍTICOS

### Calidad

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

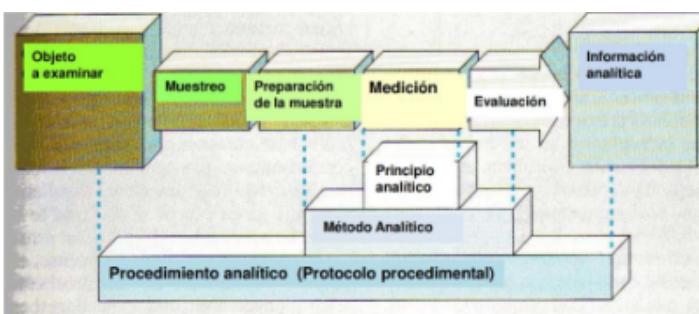
b) Defina calidad y trazabilidad.

c) Dada la siguiente curva de calibrado lineal de Fluorescencia

$$F = 0,004 + 1,5 \cdot 10^{-4} C$$

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 del rango dinámico (útil) lineal.

a)



Definir el problema: definir la información que se necesita

- 2) Toma y preparación de la muestra: escoger el método analítico a realizar, recoger la muestra representativa y determinar su cantidad, preparar la muestra para eliminar interferencias.
- 3) Proceso de medida: patrones de calibración de la muestra.
- 4) Tratamiento de los datos: respuesta numérica.
- 5) Tratamiento estadístico de los datos: análisis estadístico y límites de error.
- 6) Solución: interpretar los datos.

b) Calidad: conjunto de propiedades inherentes de una cosa que permite caracterizarla y valorarla con respecto a otras de su especie

Trazabilidad: cadena ininterrumpida de comparaciones, con incertidumbres conocidas, del resultado de una medición o del valor de un patrón con un patrón generalmente nacional o internacional.

c) LOD:  $(3 \cdot s_b)/m = 2 \times 10^{-7}$

LOQ:  $(10 \cdot s_b)/m = 6,67 \times 10^{-7}$

Sabiendo que la curva de calibración para la determinación espectrofluorimétrica de una proteína es  $F = 2,731 \times 10^{-3} + 0,008$  en donde  $x$  es la concentración en  $\text{mg L}^{-1}$  y sabiendo que el rango lineal (o rango útil) determinado para el método fue entre 0,17 y 3,5  $\text{mg L}^{-1}$ .

a) Indique o calcule (de ser necesario): i- la sensibilidad de calibración, ii- el límite de detección, iii- el límite de cuantificación y iv- la desviación estándar del blanco.

b) Defina validación de un método analítico.

- a) i) sensibilidad de calibración =  $m = 2,731$   
ii) LOD =  $k \cdot S_b/m = 3 \cdot 0,046 / 2,731 = 0,051$   
iii) LOQ = 0,17  
iv)  $S_b = LOQ \cdot m/k = 0,17 \cdot 2,731/10 = 0,046$

b) Validación es un conjunto de pruebas utilizadas para establecer que un método es apropiado para un determinado propósito

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

s: desviación estándar.

Lab.	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

a) ¿Qué laboratorio obtuvo la mejor sensibilidad de calibración?

b) ¿Qué laboratorio obtuvo el mejor límite de detección (LOD)?

- a) sensibilidad de calibración=m (pendiente)

Mayor pendiente, mayor sensibilidad

el laboratorio que tuvo mejor sensibilidad de calibración es el laboratorio 3

- b) LOD=k. Sb/m k=3

LOD1=0,013

LOD2=0,0166

LOD3=0,0133

LOD4=0,0115

el laboratorio 4 fue que obtuvo el mejor límite de detección (el más chico)

- c) Defina patrón de referencia.

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

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

- c) Un patron de referencia es el patron de mayores cualidades metrológicas en una organización y a partir del cual se hacen las mediciones en dicho lugar.

- d) Lo primero a realizar es **graficar** para observar la linealidad de los datos, y poder determinar hasta donde se toma esa linealidad etc

- e) El LOD se determina a partir de la fórmula (LOD = 3 . Sb/m ), es la mínima concentración detectable por el método.

El rango lineal útil va desde LOQ (límite de cuantificación) hasta LOL (límite de respuesta lineal). LOQ = 10. Sb / m, es la concentración mínima cuantificable por el método, mientras que el LOL es el último valor de la relación lineal.

## b- Defina calibrador y características de un calibrador

Un calibrador posee un valor asignado que tiene una trazabilidad con un patrón. El fabricante debe entregar una carta en donde se detalle la trazabilidad. Sirve para estandarizar el método y permite calcular los valores de las muestras.

Características: Conc del analito en rangos similares a los medidos, matriz similar a la utilizada por el analito, estabilidad (temperatura, fecha de caducidad), condiciones para almacenarlo, presentación (liofilizado, líquido)

1. Defina:
- patrón primario,
  - patrón de referencia
  - patrón de trabajo
  - trazabilidad
  - Dada una curva de calibración lineal explique cómo determina:
    - el límite de detección si midió blancos
    - el límite de detección si no midió blancos
    - el intervalo lineal de calibración (rango útil).

a- Patrón primario: patrón asignado a las mayores cualidades metrológicas. No es necesario referirlo a otros patrones.

c- Patrón de trabajo: patrón calibrado con el patrón de referencia, se utiliza en la rutina.

e- i) LOD= 3. Sb /m      ii) Con la desviación de los residuales Sr ?

*RECOMENDACION: lea cuidadosamente la pregunta*

Pregunta Nro. 1:

Para un método de calibración lineal Señal vs Concentración:

- défina rango útil.
- como calcularía el límite de detección a partir del rango útil.

b) despejando Sb del LOQ supongo

## Luminiscencia

Considerando los conceptos de luminiscencia responda:

- ¿Por qué algunos compuestos capaces de absorber radiación fluorescente mientras que otros no lo hacen?
- 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 espectrofluorimetría, responda:
  - ¿Cuál sería la longitud de onda de excitación?
  - ¿En qué concentraciones debe trabajarse y por qué?
  - ¿A partir de qué longitud de onda se deben tomar las emisiones?
- Responda cuál de estas moléculas emitirá mayor fosforescencia y por qué: pireno o bromopireno.
- ¿Cómo podría detectar ácido úrico por luminiscencia?

- a) No todas las moléculas pueden emitir fluorescencia ya que para fluorescer tienen que ser moléculas rígidas, con suficiente densidad electrónica dada por grupos donadores de electrones. Además, no debe tener temperaturas altas ya que aumenta la E cinética entre las moléculas y pueden perder la energía en forma de calor o por conversión externa, transfiriendo la energía al solvente, por ejemplo. También el pH puede generar cambios en la fluorescencia según las estructuras resonantes de la molécula y su protonación. Para que haya fluorescencia los compuestos deben absorber radiación y luego debe haber una emisión, en los compuestos no fluorescentes la emisión no ocurre. Cuando un compuesto absorbe radiación, se excita y se generan transiciones electrónicas sin cambio de spin. Luego, se dan las relajaciones vibracionales donde

se pierde energía y se emite un fotón, que es lo que finalmente provoca la fluorescencia.

B)

- I. La longitud de onda de excitación sería 420 nm que es igual a la long máxima de absorción ya que vamos a observar allí una mejor fluorescencia debido a que **la intensidad del pico de fluorescencia es igual a la del pico de absorción.**
- II. Se debe cumplir que la  $\text{Abs.} 2,303 < 0,05$ , la concentración correcta para trabajar debe cumplir con ésto, sino no se cumple con la linealidad y va a haber desviaciones negativas.

$$\text{A. } 2,303 < 0,05 \quad 0,5 \text{ Abs} \dots 5\text{mM}$$

$$\text{A} < 0,05 / 2,303 \quad 0,0217 \text{ Abs} \dots x = 0,217 \text{ mM}$$

$$\text{A} < 0,0217$$

A esta concentración se cumple con el rango de linealidad, por lo que nos va a permitir cuantificar el compuesto correctamente.

- III. Las emisiones se deben tomar a una long de onda mayor a la de la excitación debido al desplazamiento de stokes, es decir, mayor que 420 nm.

C) El bromopireno tendrá mayor fosforescencia que el pireno ya que al tener bromo, el cual es un átomo pesado, favorecerá el triplete excitado y por lo tanto la fosforescencia.

D) El ácido úrico podría detectarse mediante **quimioluminiscencia** haciéndolo reaccionar con alguna sustancia y formando un producto que tenga comportamiento fluorescente por ejemplo. Esto debido a que el ácido úrico no es fluorescente por sí solo por presentar heterociclos en su estructura.

Como primera etapa, se produce una reacción enzimática donde  
ácido úrico + oxígeno + uricasa (oxidasa) → alantoína +  $\text{H}_2\text{O}_2$

Posteriormente, se puede detectar el peróxido de hidrógeno por distintas técnicas quimioluminiscentes.

**El ácido úrico se oxida en presencia de  $\text{O}_2$  y la enzima uricasa, dando alantoína y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ese  $\text{H}_2\text{O}_2$  se usa para oxidar el luminol, a partir de una reacción quimioluminiscente, dando un ion capaz de emitir radiación y así se puede averiguar la cantidad de ac. úrico.**

El metilparabeno (para-hidroxibenzoato de metilo) es un agente fungicida empleado en una variedad de alimentos y de productos de cosmética efectivo contra hongos que presenta una absorbancia de 0,300 a 260,0 nm en una concentración de  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ . Como puede analizarse por espectrofluorimetría responda:

- a) ¿En qué orden de concentraciones debe trabajarse y por qué?
- b) ¿Cuál sería la longitud de onda de excitación?
- c) ¿A partir de qué longitud de onda se deben tomar las emisiones?
- d) ¿Que grupo funcional reemplazaría en el metilparabeno para disminuir la fluorescencia y aumentar la fosforescencia e indique que grupo funcional sería adecuado para producir el efecto deseado. J.S.R.

- a) Se debe cumplir que la  $\text{Abs} \times 2,303 < 0,05$  para que se cumpla con la linealidad.

Abs x2,303 < 0,05  
Abs < 0,05 / 2,303  
Abs < 0,022

3 mg/ml \_\_\_\_\_ 0,300 Abs  
0,217 mg/ml \_\_\_\_\_ 0,022 Abs

Se debe trabajar con concentraciones menores o iguales a 0,217 para que se cumpla el rango de la linealidad

- b) La longitud de excitación debe ser 260 nm, igual a la longitud máxima de absorbancia debido a que la intensidad del pico de fluorescencia depende de la intensidad de la onda de excitación.
- c) Se deben tomar las mediciones a longitudes de onda de emisión mayores a la longitud de excitación debido al desplazamiento de stoke, el cual se da porque los electrones pasan de un estado excitado a un estado basal y se da una **pérdida de energía vibracional**. Por lo tanto la long de onda de emisión se debe medir a longitudes mayores que 260 nm.
- d) Para desfavorecer la fluorescencia y favorecer la fosforescencia en el metilparabeno cambiaría el OH (que es un grupo dador de electrones, favorece la fluorescencia) por un halógeno, como por ejemplo, un Bromo. El agregado del bromo genera lo que se llama Efecto del Átomo Pesado, favoreciendo el entrecruzamiento de sistemas y la formación de triplete excitado, favoreciendo así la FOSFORESCENCIA.

Una solución 50,0  $\mu\text{M}$  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?
- b) ¿Cuál sería la longitud de onda de excitación?
- c) ¿A partir de qué longitud de onda se deben tomar las emisiones?
- d) ¿Qué sustituyente debería tener un compuesto derivado de A para presentar fosforescencia?
- e) ¿Cómo podría detectar  $\text{NO}_2$  por luminiscencia?

a)  $A \times 2,3 < 0,05$       0,450—————50 $\mu\text{M}$   
 $A=0,05/2,3=0,02$       0,02—————X=2,22 $\mu\text{M}$

Se debe trabajar a concentraciones menores de 2,22 $\mu\text{M}$ , debido a que es la que corresponde a una absorbancia que al ser multiplicada por 2,3 es menor a 0,05. Esto es así porque a absorbancias mayores, hay desvíos negativos en la linealidad.

- b) La longitud de onda de excitación corresponde a la longitud de onda máxima en el espectro de absorción, es decir, 340nm.
- c) Las emisiones se deben tomar a longitudes de onda mayores a 340nm, debido al desplazamiento de stokes, donde la longitud de onda de emisión es mayor a la longitud de onda de excitación porque la molécula pierde energía cuando se dan las relajaciones vibracionales.
- d) Debería tener como sustituyente un átomo pesado, como por ejemplo, el bromo, ya que estos sustituyentes aumentan el cruce entre sistemas y el estado triplete excitado, lo que favorece a la fosforescencia.

- e) Podría detectarlo con quimioluminiscencia, haciéndolo reaccionar con algún compuesto tal que genere como producto un compuesto que produzca luminiscencia. No podría presentar otro tipo de luminiscencia ya que no emite por si solo.

Por ejemplo, el NO en presencia de ozono ( $O_3$ ) produce  $NO_2^*$  (excitado) el cual emite luz entre 600 a 2800 nm.

A través de quimioluminiscencia. Se haría reacción NO con ozono produciendo la oxidación del gas tóxico obteniendo una especie excitada de  $NO_2$  la cual decae emitiendo radiación.

**Pregunta Nro. 2:**

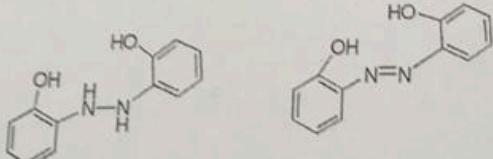
De acuerdo con los conceptos de luminiscencia:  
 a) Explique por qué algunos compuestos capaces de absorber radiación fluorescen mientras que otros no lo hacen.  
 b) Describa las características de los compuestos orgánicos capaces de fluorescer.  
 c) Explique por qué la fluorescencia molecular ocurre comúnmente a una longitud de onda más grande que la radiación de excitación.  
 d) Indique cuál de las siguientes moléculas emitirá mayor fosforescencia y porqué: píreno o bromopíreno.

- b) Los compuestos orgánicos capaces de fluorescer tienen una estructura rígida, por lo general son aromáticos y al aumentar el número de anillos aumenta su capacidad de fluorescer, esto debido a que la densidad electrónica favorece este fenómeno. También la presencia de grupos donores de electrones, como -OH, aumentan la capacidad de fluorescencia en estos compuestos y los sustituyentes más pequeños sean mejor.
- c) La fluorescencia ocurre a una longitud de onda mayor a la de excitación debido al desplazamiento de Stokes, el cual se da porque los electrones pasan de un estado excitado a un basal generando por consecuencia una disminución de energía vibracional, y a menor energía mayor longitud de onda emitida.

**Pregunta Nro. 2:**

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

- a) El desplazamiento de Stokes es un fenómeno que se da en sistemas complejos como moléculas, complejos y quelatos. Este fenómeno se da por la diferencia de la longitud de onda de excitación y la de emisión. Esto se debe a que al excitar una molécula, ésta tiende a perder energía por relajaciones vibracionales en el estado

excitado antes de emitir radiación, generando que la energía de emisión sea menor y por ende tenga una mayor longitud de onda a la de excitación.

- b) Grupo I: el segundo compuesto tendrá mayor rendimiento cuántico de fluorescencia ya que posee un doble enlace N=N con una mayor cantidad de electrones deslocalizados y una mayor rigidez. y además, puede tener estructuras resonantes  
??? no tengo idea

Grupo II: Fenol> fluorobenceno> Clorobenceno> bromobenceno>iodobenceno el fenol tendrá mayor rendimiento cuántico porque tiene un grupo donador de electrones (OH). Los demás poseen halógenos, los cuales disminuyen la fluorescencia. El iodobenceno posee iodo, (halógeno de mayor tamaño) por lo que tendrá un menor rendimiento cuantico que los demás, debido al gran efecto del átomo pesado, que favorece el cruce entre sistemas y por ende la emisión por fosforescencia.

- b) Comente las condiciones estructurales y de medio que desfavorecen la emisión fluorescente.

- c) Dado el siguiente grupo de compuestos, ordénelos de mayor a menor fosforescencia. J.S.R.

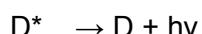
**Iodobenceno, Fenol, Fluorobenceno, Bromobenceno y Clorobenceno**

- d) Escriba un proceso quimioluminiscente genérico y de un ejemplo de un reactivo quimioluminiscente.

b) desfavorecen emision: flexibilidad estructural, grupos funcionales atractores de electrones, elementos pesados, medios polares, baja viscosidad, solventes con elementos pesados, aumento de temperaturas, sustituyentes flexibles, etc

c) iodobenceno>bromobenceno>clorobenceno>fluorobenceno>fenol  
iodobenceno tiene mayor fosforescencia por el efecto del atomo pesado, etc. Fenol tiene grupo donador de e-, es muy fluorescente.

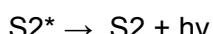
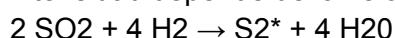
d) Proceso quimioluminiscente generico: A + B → D\* + C



Un ejemplo de un reactivo quimioluminiscente es el luminol, el cual al reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da una especie excitada, que cuando vuelve a su estado basal emitirá.

- e) ¿Como podría detectar SO<sub>2</sub> 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:



SO<sub>2</sub> podria reaccionar con H<sub>2</sub> para dar S<sub>2</sub> excitado el cual luego emitirá radiación para volver a su estado basal.

2. Explique:

- a) porqué para una molécula orgánica la longitud de onda de emisión fluorescente es mayor que la longitud de onda de excitación  
b) porqué la longitud de onda de emisión fosforescente es mayor que la fluorescente.

Comente:

- c) las condiciones estructurales y de medio que favorecen la emisión fluorescente.  
d) que otra condición favorece la fosforescencia.

b) la longitud de onda de emisión fosforescente es mayor que la fluorescente debido a que para emitir radiación fosforescente, el compuesto excitado debe estar en un estado triplete de energía excitada. Para llegar a este estado, primero debe perder energía por cruzamiento de sistemas desde el estado de singulete excitado que es el estado a partir del cual se emite fluorescencia. Por ende, el estado de triplete excitado tiene menor energía que el de singulete excitado y se necesita una mayor longitud de onda para emitir desde él fosforescencia.

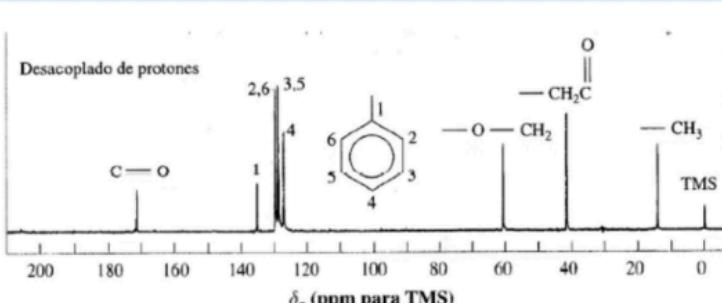
- c) favorecen emisión fluorescente: compuestos aromáticos, condensados, insaturaciones, estructuras resonantes, rigidez estructural, sustituyentes rígidos, grupos donores de e-, medio con alta viscosidad y baja polaridad, temperaturas bajas.  
d) favorecen emisión fosforescente: átomos pesados en la estructura, solventes con átomos pesados, oxígeno disuelto, quenchers, etc.

La quinina en una tableta contra la malaria de 2,196g se disolvió en HCl 0,10 M para obtener 1L. Al diluir una alícuota de 20 ml a 100 ml se produjo una disolución que generó una lectura de 540 en una escala arbitraria de 347,5 nm. Una segunda alícuota de 20 ml se mezcló con 10 ml de una disolución de 50 ppm de quinina antes de diluirse a 100 ml. La intensidad de fluorescencia de esta solución fue de 600, cuando se midió en condiciones idénticas a las de la muestra diluida. Calcule la concentración en ppm de quinina en la tableta.

no lo hice pero se que en un examen hace poco pedian uno igual !!! tambien calcular la concentracion en ppm

## RMN

a) Dado el siguiente espectro de RMN-<sup>13</sup>C desacoplado de <sup>1</sup>H, dibuje el espectro de RMN-<sup>1</sup>H justificando su respuesta para cada una de las señales (desplazamiento aproximado, multiplicidad, integración).



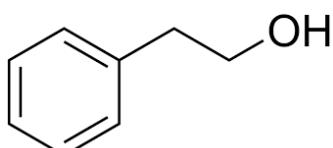
b) ¿Qué información brinda un RMN 2D COSY y cuál un NOESY?

a)

b) COSY: nos indica acoplamiento escalar. nos dice que protones están acoplados entre sí  
NOESY: nos indica acoplamiento u proximidad espacial, nos indica la correlación a larga distancia

El espectro de RMN protónico 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.
- b) Indique la multiplicidad e integración de cada señal.
- c) Diga que señales cambiarían y cual sería la multiplicidad a -40 °C.
- d) ¿Cuántas señales tendría el espectro de RMN de carbono desacoplado de protones?



- a) 7,3 → protones aromáticos, integra para 5 H, singlete  
5,5 → protón del OH, singlete (muy desapantallado), integra para 1 H  
4,5 → protones CH<sub>2</sub> cercanos a OH, integra para 2 H, triplete  
3,1 → protones CH<sub>2</sub> cercanos al anillo, integra para 2 H, triplete
- c) A -40°C, hay un acoplamiento spin spin, veo al H del -OH desdoblado en un triplete y a los protones del metileno contiguo (CH<sub>2</sub>) como cuatriplete.
- d) Tendría 4 señales: 2 de los grupos CH<sub>2</sub> de la cadena alifática, una del C del grupo aromático unido a la cadena alifática, y otra del resto de los C aromáticos equivalentes.???? no estoy segura, capaz son 5 me parece que 6

**Pregunta Nro. 3:**

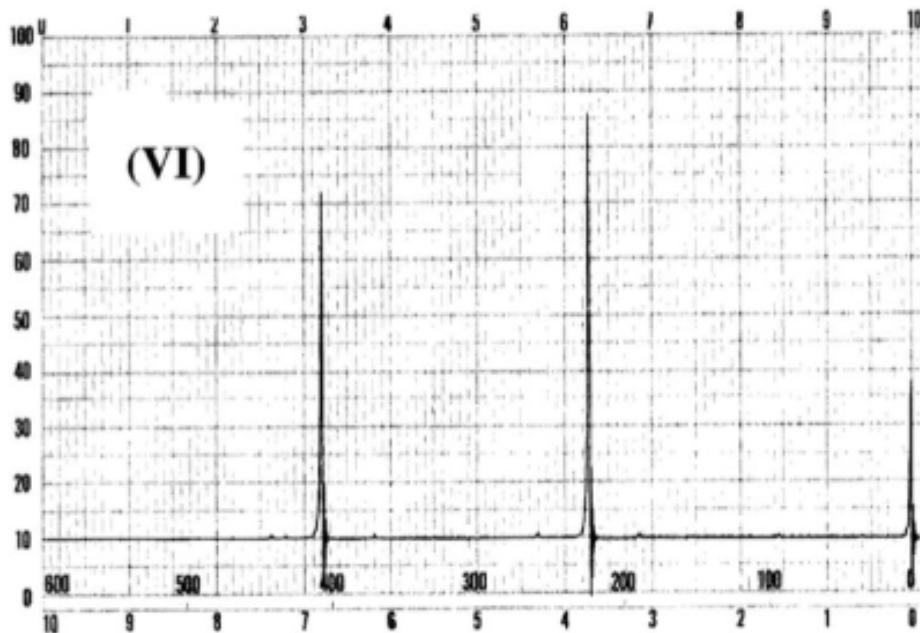
De acuerdo con los conceptos de RMN:

- a) Indique de qué depende la frecuencia de absorción de un determinado núcleo en RMN.
- b) Prediga el espectro RMN de <sup>1</sup>H del metanol.
- c) Prediga el espectro RMN de <sup>13</sup>C desacoplado de protón del metanol.
- d) Que información brinda un RMN 2D COSY y cual un ROESY?. b) 100 81

- a) Depende del campo magnético externo aplicado ya que mediante el mismo se pueden obtener los estados energéticos de los núcleos, y además de la relación giromagnética, que es característica de cada núcleo.  
 $v = (\gamma \cdot B_0)/2\pi$
- b) 2 señales  
OH singlete, aprox 5 ppm, integra para 1 H  
CH<sub>3</sub> singlete, aprox 1 ppm, integra para 3H
- c) 1 señal, aproximadamente  
CH<sub>3</sub> : 50ppm
- d) COSY: nos indica acoplamiento escalar. nos dice que protones están acoplados entre sí  
ROESY: nos indica correlación espacial a través de la relajación spin spin a corta distancia

NOESY: nos indica acoplamiento u proximidad espacial, y nos da la correlación a larga distancia

- b) El compuesto  $C_8H_{10}O_2$  tiene el siguiente espectro de RMN- $^1H$ . Indique de qué 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.



- c) ¿Cuántas señales presentaría el espectro RMN- $^{13}C$  desacoplado de  $^1H$  para el mismo compuesto?

b) molécula:  $CH_3-O\text{-benceno}\text{-O-CH}_3$

La señal a aprox 4 ppm corresponde a los dos grupos  $CH_3$  que tienen H equivalentes, por lo que integra por 6 protones y tiene ese corrimiento ya que está unido al O, un átomo electronegativo tomador de e-. Y es un singlete ya que no tiene grupos con protones vecinos

La señal a aprox 7 ppm, corresponde a un compuesto aromático, un benceno, que integra para 4 protones ya que está unido a dos O, es una molécula simétrica. Es un singlete ya que no tiene grupos con protones vecinos.

c) Presenta 3 señales. Una para los C de los  $CH_3$  ya que son C equivalentes, una para los C del benceno unidos a los O, y otra para los C restantes del benceno.

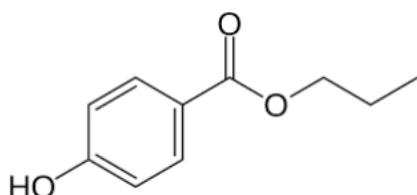
**¿Por qué el RMN de  $^{13}C$  es 6000 veces menos sensible que el  $^1H$ ?**

ya que es un isótopo menos abundante y tiene un núcleo más complejo de desdoblar

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

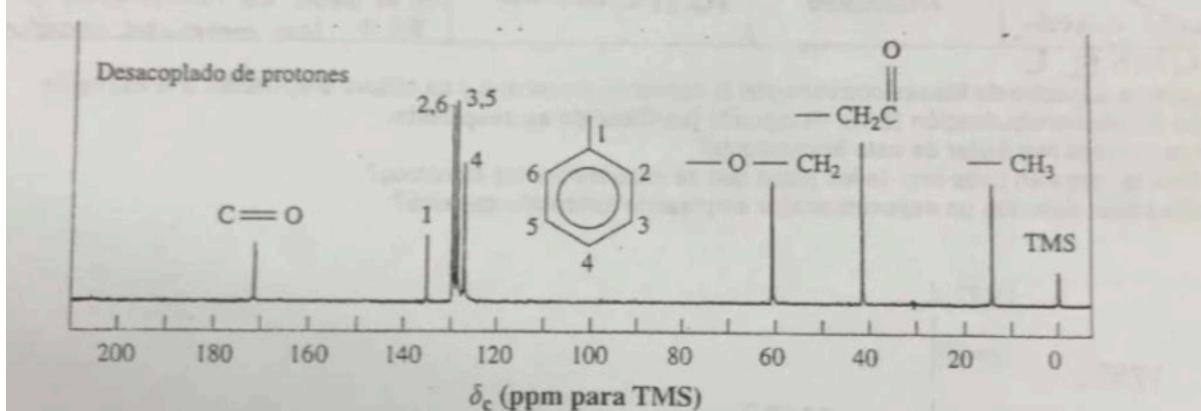
a) Indique cuantas señales se verían en el espectro RMN protónico, el desplazamiento químico aproximado, la multiplicidad e integración de cada señal.

b) Indique cuantas señales se verían en el espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado de protones indicando el desplazamiento relativo.

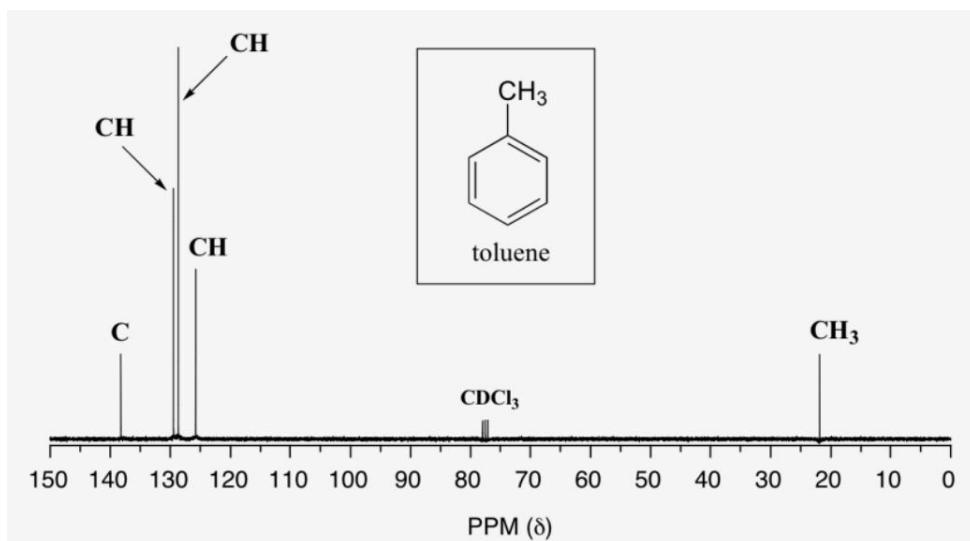


- a) - 1 señal de los H del benceno, a aprox 7 ppm, integra para 4 H, singlete  
 - 1 señal para el H del OH a aprox 5 ppm, integra para 1 H, singlete  
 - 1 señal para los H del  $\text{CH}_2$  contiguos al O, a aprox 4 ppm, integra para 2 H, triplete (porque tiene un  $\text{CH}_2$  vecino)  
 - 1 señal para el otro  $\text{CH}_2$ , a aprox 2 ppm, integra para 2 H, sextuplete (5 H vecinos)  
 - 1 señal para el  $\text{CH}_3$  del extremo, a aprox 1 ppm, integra para 3 H, triplete (3 H vecinos)
- b) - 1 señal C 1 del benceno a aprox 130 ppm  
 - 1 señal C 2 y 6 del benceno a aprox 120 ppm  
 - 1 señal C 3 y 5 del benceno a aprox 125 ppm  
 - 1 señal C 4 del benceno a aprox 135 ppm  
 - 1 señal del C=O a aprox 170 ppm  
 - 1 señal del C del  $\text{CH}_2$  contiguo al O a aprox 60 ppm  
 - 1 señal del C del otro  $\text{CH}_2$  a aprox 20 ppm  
 - 1 señal del C del  $\text{CH}_3$  a aprox 15 ppm

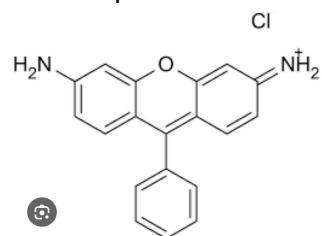
a) Dado el siguiente espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  desacoplado de  $^1\text{H}$ , dibuje el espectro no desacoplado de  $^1\text{H}$  justificando su respuesta para cada una de las señales.



- Cómo se vería un espectro de carbono 13 del tolueno?



- Qué señales serán activas en RMN y cómo podrían diferenciarse
- Cómo podrías identificar rhodamina por RMN



La identificación de la rodamina mediante resonancia magnética nuclear (RMN) se puede realizar analizando tanto el espectro de RMN de protón (<sup>1</sup>H) como el espectro de RMN de carbono (<sup>13</sup>C). A continuación, te explico cómo se pueden identificar algunas de las características principales de la rodamina:

#### Espectro de RMN de Protón (<sup>1</sup>H)

1. Aromaticidad: La rodamina contiene anillos aromáticos que producirán señales características en la región de 6-8 ppm.
2. Grupos metilénicos y metílicos: La rodamina tiene grupos metilo (CH<sub>3</sub>) y metileno (CH<sub>2</sub>), que aparecerán típicamente en las regiones de 0.5-2.5 ppm para metilos y 2-4 ppm para metilenos.
3. Protones sobre heteroátomos: Los protones en átomos de nitrógeno (como en la parte de la xantena de la rodamina) pueden aparecer en la región de 2-4 ppm.

#### Espectro de RMN de Carbono (<sup>13</sup>C)

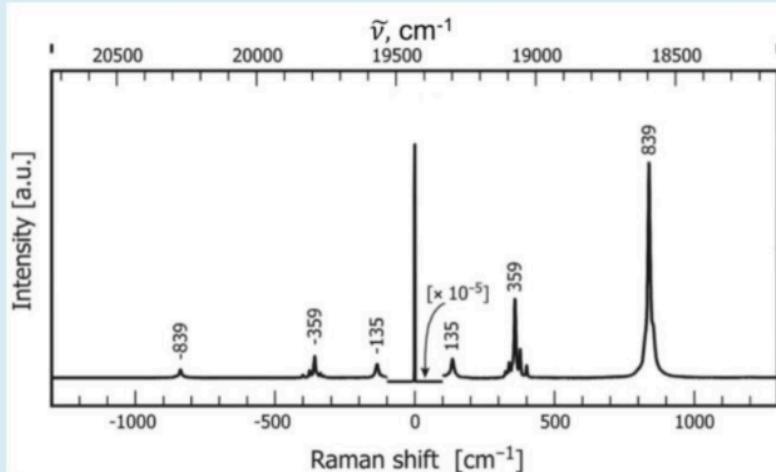
1. Carbonos aromáticos: Los carbonos en los anillos aromáticos de la rodamina aparecerán en la región de 110-160 ppm.
2. Carbonos de ésteres y cetonas: Los carbonos carbonílicos (C=O) en los grupos éster de la rodamina se observarán alrededor de 160-180 ppm.
3. Carbonos de metilos y metilenos: Los carbonos de los grupos metilo (CH<sub>3</sub>) se observarán entre 10-30 ppm y los carbonos metileno (CH<sub>2</sub>) entre 20-50 ppm.  
(según chat gpt)

- Dada la estructura de la molécula, cómo determinarías que es un espectro de RMN y no uno de IR

## **RAMAN**

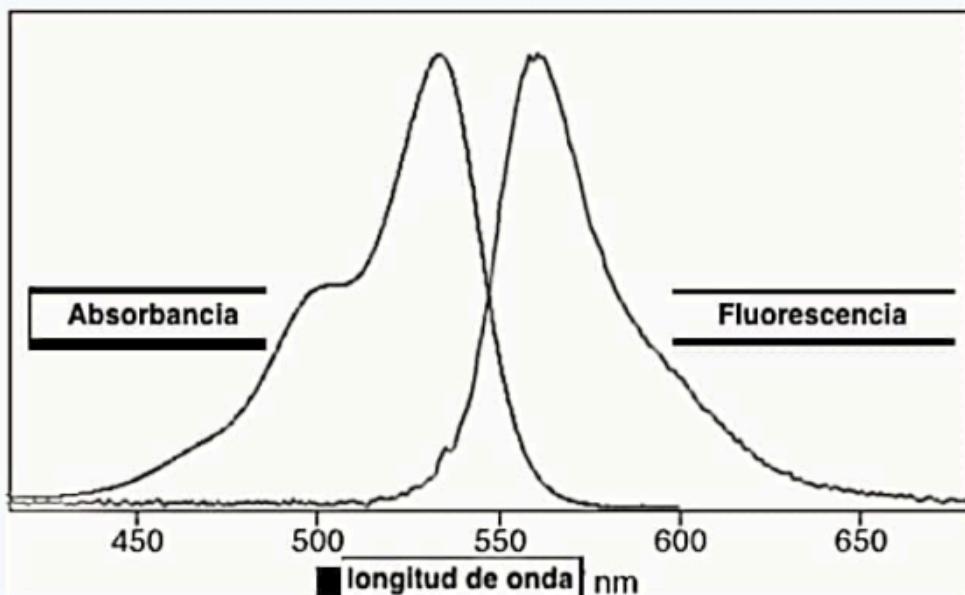
Respecto a la espectroscopía Raman, responda justificando su respuesta:

- ¿Qué tipo de espectroscopía es y qué información sobre una molécula brinda?
- De qué 2 parámetros depende principalmente la intensidad de una señal Raman?
- 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).



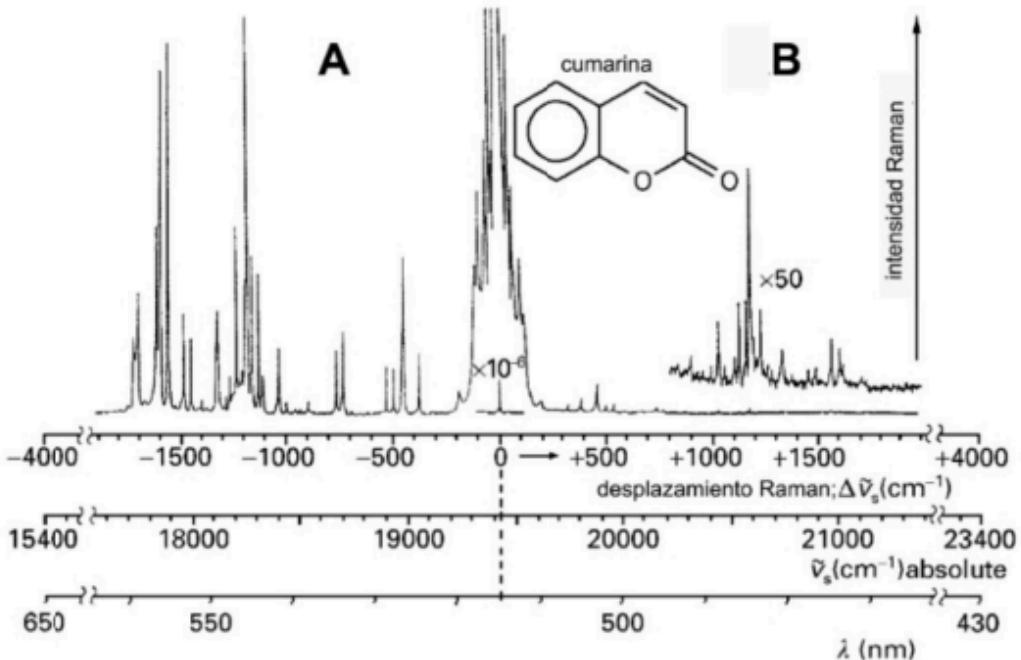
- Es espectroscopía vibracional o de dispersión inelástica.  
La espectroscopía Raman o inelástica utiliza longitudes de onda del IR para que una molécula llegue al estado virtual, que se encuentra entre el estado electrónico fundamental y el estado electrónico excitado. Brinda información sobre la **estructura molecular** de un compuesto y sobre el modo vibracional de las moléculas. La luz incidente induce un **cambio en la polarizabilidad** de la molécula
- RAMAN depende de:
  - Frecuencia del láser: debe ser una long de onda baja (mayor E, mayor frecuencia) pero no tanto porque puede interferir con las long de onda de fluorescencia, excitando la molécula en lugar de llevarla al estado virtual.
  - Cambio de polarizabilidad: debe ser diferente de 0 y a mayor cambio de polarizabilidad mayor intensidad. Es decir, si tengo una molécula apolar, la misma pasa a polar.
- Las señales menos intensas (a la izquierda del 0) son anti stokes y a la derecha, son las Stokes ya que las señales tienen mayor intensidad. La señal en cero, es la Rayleigh o elástica, cuya frecuencia de emisión es la misma que la frecuencia de incidencia.
- $\lambda = 1/\nu = 1/19500 \text{ cm} = 5,13 \times 10^{-5} \text{ cm}$   
 $1 \text{ nm} \text{ ---- } 1 \times 10^{-7} \text{ cm}$   
 $513 \text{ nm} \text{ ---- } 5,13 \times 10^{-5} \text{ cm}$

- a) Para que la vibración de un enlace sea activa en Raman, ¿Qué se debe producir?
- b) ¿De qué parámetros experimentales depende la intensidad de una señal Raman?
- c) El equipo Raman de un laboratorio posee tres fuentes láser de excitación (514 nm, 633 nm y 1064 nm). 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.



- a) Para que la vibración de un enlace sea activo en Raman, debe haber cambio en la polarizabilidad del enlace de moléculas con enlaces simétricos (apolares)
- b) Raman depende de dos parámetros:  
La intensidad de la frecuencia del láser  
El cambio de polarizabilidad del enlace de una molécula simétrica
- c) Utilizaría el láser de 1064nm para asegurarme de no tener ninguna interferencia por fluorescencia. Desventaja: menor intensidad en el espectro raman  
El láser podría estar entre 600/650 nm ya que a estas longitudes de onda se tendría una muy baja interferencia de fluorescencia y se mantienen mayores intensidades en la señal en comparación a 1064 nm.
- b) ¿Podría realizar el experimento anterior en solución acuosa? J.S.R
- c) 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
- b) Si, ya que la espectroscopía Raman es compatible con el agua.  
c) En raman normalmente vería las señales de stokes, la de rayleigh (en el cero de corrimiento) y las de anti stokes. También vería sobre todo señales referidas a la vibración de los enlaces C=C (vibraciones con polarizabilidad diferente de cero), mientras que en IR principalmente vería los de C=O (se verían las vibraciones con momento dipolar diferentes de cero ).

El espectro Raman de cumarina que se muestra en la figura se obtuvo empleando un laser de Ar<sup>+</sup> ( $\lambda=514,53$  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:

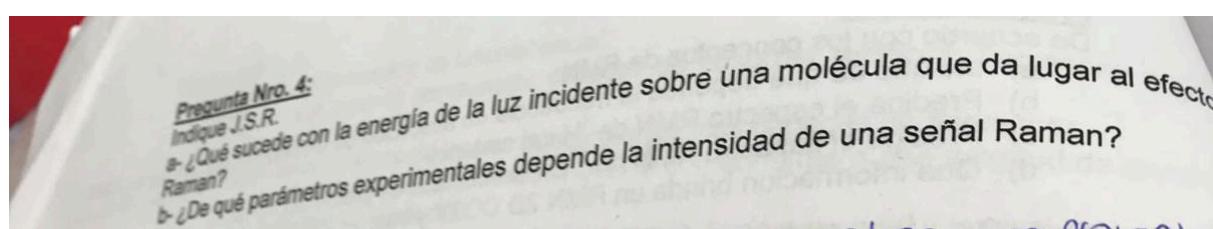
- a) ¿A qué tipo de corrimiento Raman corresponden las señales que aparecen en la región A y en la región B del espectro?
- b) ¿Se modificaría el espectro si el láser de Ar<sup>+</sup> se utilizara a 488 nm? Explique brevemente
- c) ¿Cuál de las dos regiones (A o B) presentaría mayores cambios por un aumento de la temperatura?
- d) ¿Qué vibración debería presentar mayor intensidad en el espectro de cumarina, la correspondiente al enlace C=O o al enlace C=C?

- a) A. Stokes, mayor intensidad, menor energía  
B. Anti Stokes, menor intensidad y mayor energía
- b) Al disminuir la long de onda, aumenta la frecuencia del haz de excitación por lo que el espectro si se modifica: las señales (los picos) serán más intensas
- c) El aumento de la temperatura sólo afectará a la intensidad de las señales anti stoke ya que se excitan más moléculas pasando del estado  $v=0$  al estado  $v=1$  y los electrones excitados podrán dispersarse en raman.
- d) La vibración que debería presentar mayor intensidad en raman de cumarina, corresponde al enlace C=C ya que es un enlace apolar, simétrico y van a tener un cambio de polaridad. En cambio, los enlaces C=O son polares, asimétricos, tendrían mayor intensidad en IR y tendrá un momento dipolar

Pregunta Nro. 4:

- a) Para que se produzca dispersión Raman de la luz incidente sobre una molécula, ¿Qué debe provocar la vibración de un enlace?
- b) ¿Cuál sería la diferencia observable para la línea con un corrimiento Raman de Stokes a  $1200\text{ cm}^{-1}$  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?

b) Si el experimento se realizara con un laser de 532 nm, al disminuir la longitud de onda, la frecuencia incidente sería mucho mayor y por ende, aumentaría en gran medida la intensidad de las señales raman.



a) Cuando incido a una molécula con un haz de luz de long de onda del IR en Raman, se lleva a la molécula a un nivel de energía más elevado denominada Estado Virtual, el cual se encuentra entre el estado electrónico fundamental y el estado electrónico excitado. Cuando la molécula se relaja, dispersa energía. Si la energía (o la frecuencia) dispersada es menor que la absorbida, entonces estamos hablando de Raman **Stokes**. En cambio, si la energía de dispersión es mayor que la de absorción estamos ante Raman **anti stokes**. Además, cuando se incide a la molécula con el haz de luz, ocurre un **cambio en la polarizabilidad** de los enlaces de la molécula, es decir pasa de apolar a polar.

**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.
- ii- Para que se produzca el fenómeno Raman es necesario que la molécula presente cromóforos.
- iii- Las muestras a utilizar en espectroscopia Raman deben estar 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.
- v- La intensidad de la señal Raman obtenida para un dado compuesto es independiente de la longitud de onda del láser utilizado.
- i- Falsa. Se fundamenta en la dispersión inelástica debido a la diferencia de energía entre la frecuencia incidente y la frecuencia dispersada. Hay ganancia o pérdida de energía.
- ii- Falsa. Para que se produzca el fenómeno Raman es necesario que haya un cambio en la polarizabilidad de la molécula al hacer incidir luz sobre ella.
- iii- Falsa. No necesariamente las muestras tienen que estar anhidras ya que Raman es compatible con agua.

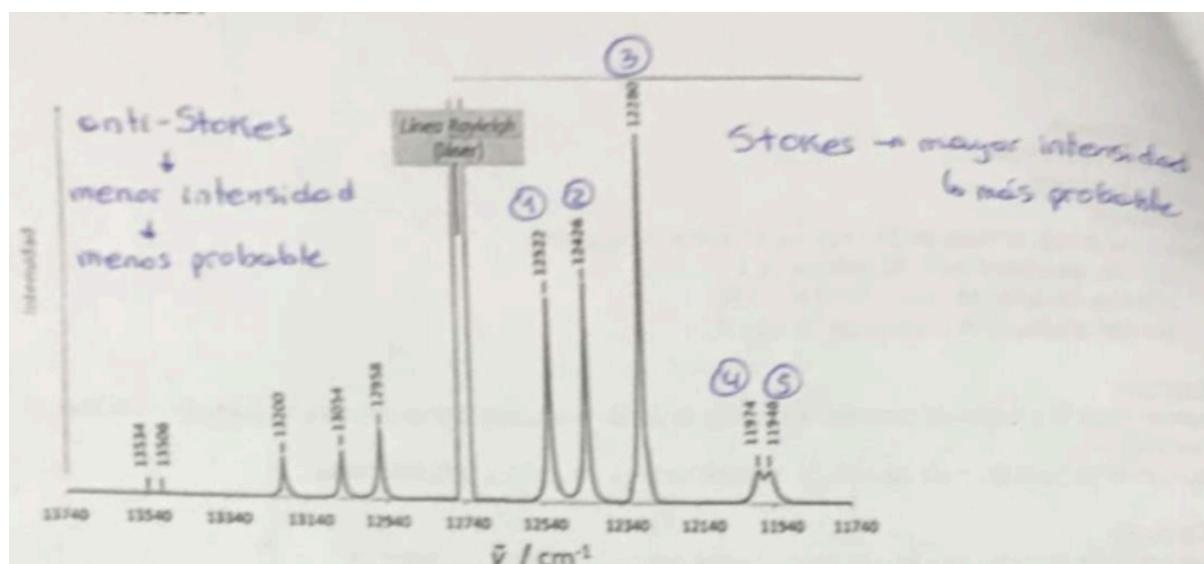
iv- Verdadera.  $\lambda = 1/\nu = 1/9397,59 \text{ cm} = 1,06 \times 10^{-4} \text{ cm}$

$$1 \text{ nm} \text{ ---- } 1 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

$$1064 \text{ nm} \text{ ---- } 1,06 \times 10^{-4} \text{ cm}$$

v- Falsa. La intensidad de Raman está fuertemente relacionada a la intensidad del láser. Mientras mayor sea la longitud de onda del láser, menor será la frecuencia incidente, y por ende, menor será la intensidad de la señal del espectro de raman.

4. En base al 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)  $\lambda = 1/\nu = 1/9397,59 \text{ cm} = 1,06 \times 10^{-4} \text{ cm}$

$$1 \text{ nm} \text{ ---- } 1 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

$$1064 \text{ nm} \text{ ---- } 1,06 \times 10^{-4} \text{ cm}$$

(se calcula así pero no puedo ver los números en la foto, es un ejemplo!!!! )

c)

i- A la izquierda de la línea de Rayleigh: anti stokes. La intensidad se podría incrementar aumentando la temperatura.

ii- A la derecha de la línea de Rayleigh: Stokes. La intensidad se podría disminuir utilizando un láser de mayor longitud de onda (menor energía, y por ende menor frecuencia incidente)

b) Segun chat gpt el corrimiento raman se calcula asi:

### Ejemplo de Cálculo

Supongamos que la longitud de onda del láser es 532 nm y la longitud de onda dispersada es 550 nm.

1.  $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$
2.  $\lambda_s = 550 \text{ nm}$

El número de onda del corrimiento Raman se calcula así:

$$\Delta\nu = \left( \frac{1}{532} - \frac{1}{550} \right) \times 10^7$$

Calculando:

$$\Delta\nu = (1.880 \times 10^{-3} - 1.818 \times 10^{-3}) \times 10^7$$

$$\Delta\nu = (0.062 \times 10^{-3}) \times 10^7$$

$$\Delta\nu = 620 \text{ cm}^{-1}$$

Por lo tanto, el corrimiento Raman es de  $620 \text{ cm}^{-1}$ .

$$\Delta V = V_L - V_m$$

$V_L$  = frecuencia del láser

$V_m$  = frecuencia de la vibración

$$V = 1 / \lambda$$

$$1 \text{ nm} \longrightarrow 1 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

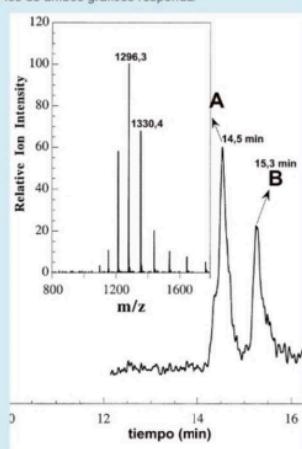
## ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Una muestra biológica contenida en un frasco de plástico se analizó empleando un método de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (ESI-MS), para poder cuantificar los diferentes tipos de Ab. Ab puede variar en la cantidad de residuos galactosa (GAL) de la cadena terminal.

La fase móvil consistió en un gradiente entre el solvente 1 (2% ácido acético) y el solvente 2 (acetona:2-propano, 70% 30%).

En la figura se muestra el chromatograma 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:



- a) ¿Qué tipo de cromatografía líquida se realizó?
- b) Si el ancho a la base para los picos A y B es 0,70 min, ¿cuál es la resolución del chromatograma? ¿Considera que la resolución entre los picos es adecuada para utilizar el área bajo la curva con fines cuantitativos?
- c) ¿Cuál es la carga del ion molecular en los picos marcados en el espectro de masas? ¿Qué masa tiene el anticuerpo?
- d) ¿Podría utilizar impacto electrónico (EI) como fuente de ionización para obtener el EM?
- e) ¿Qué otro tipo de cromatografía líquida podría utilizar para separar este tipo de compuestos?

c) ión molecular →  $p_1 = 1296,3$

$$p_1 = m + z_1 / z_1$$

$$p_2 = m + (z_1 - 1) / (z_1 - 1) = 1330,4$$

despejo  $m$  de la primera ecuación y reemplazo en la segunda, despejo  $z_1$

$z_1 = 39 \rightarrow$  carga del ion molecular

reemplazo 39 en la primer ecuación

$$1296,3 = m + 39 / 39 = 50516,7 \text{ Da} = 50 \text{ kDa}$$

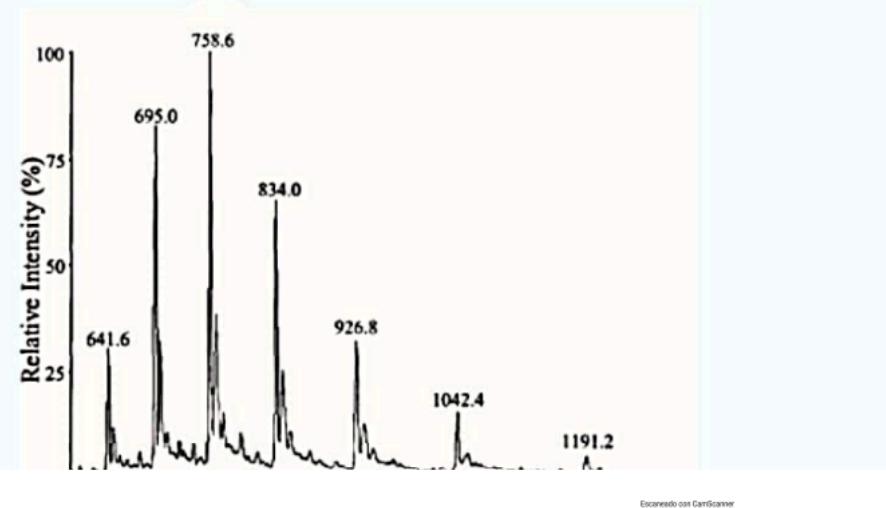
d) No se podría utilizar impacto electrónico porque permite obtener PM de hasta 500 Da, mientras que ESI permite hasta 70 kDa, es por esto que si se usara IE nuestra muestra, que pesa 50 kDa, no sería detectada. Además tendría mucha fragmentación.

a) ¿Qué tipo de mecanismo de ionización ocurre en MALDI y para qué tipo de compuestos se utiliza?

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

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

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



Escaneado con CamScanner

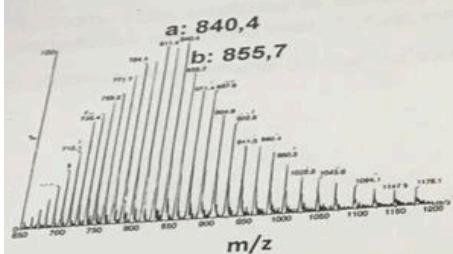
s

- Ocurre una ionización tipo protonación o cationización. se usa para bajas concentraciones de biomoléculas de alto peso molecular como nucleótidos y proteínas con una masa de hasta 500 kDa.
- la diferencia de carga entre dos picos adyacentes es de +1 (el de la izquierda +1 y el de la derecha -1)
- $p_1 = m + z_1 / z_1$   
 $m = (758,6 \cdot 11) - 11$   
 $m = 8333,6$

**RECOMENDACION:** lea cuidadosamente

**Pregunta Nro. 5:**

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?

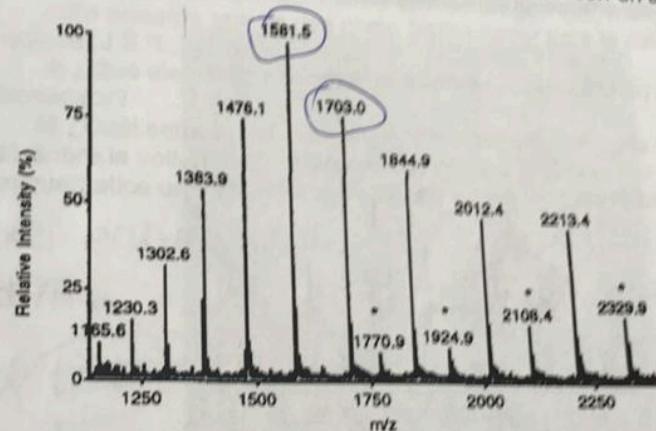


$$z_1 = 55,86$$

$$m = 46,9 \text{ kDa}$$

**Pregunta Nro. 5:**

a- La siguiente figura muestra el espectro de masas de una hormona de crecimiento obtenido empleando como fuente de ionización ESI. Determine el PM de esta proteína.  
Nota: NO tenga en cuenta aquellos picos marcados con un asterisco.



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

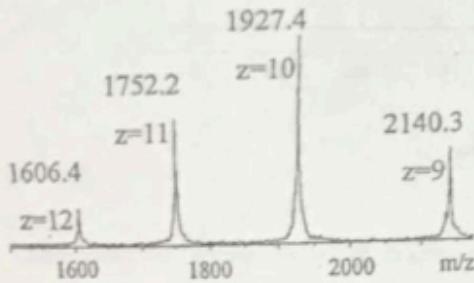
$$z_1 = 15$$

$$m = 22,1 \text{ kDa}$$

5. a) Complete 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	Hasta 500 kDa	Múltiples series de iones moleculares multi protonados, diferentes Z.
Radical anión Radical cation	Impacto electrónico	Hasta 500 Da	- Relación m/z indica directamente el peso del compuesto, ya que Z = 1.

- b) El siguiente espectro de masas corresponde al interferón-a-humano y se obtuvo empleando una fuente de ionización de electronebulización (ESI). Responda justificando su respuesta:
- ¿Cuál es la masa molecular de esta biomolécula?
  - ¿Cuál es la carga en cada uno de los picos que se encuentra a los extremos?
  - ¿Podría haber obtenido un espectro similar empleando ionización química?



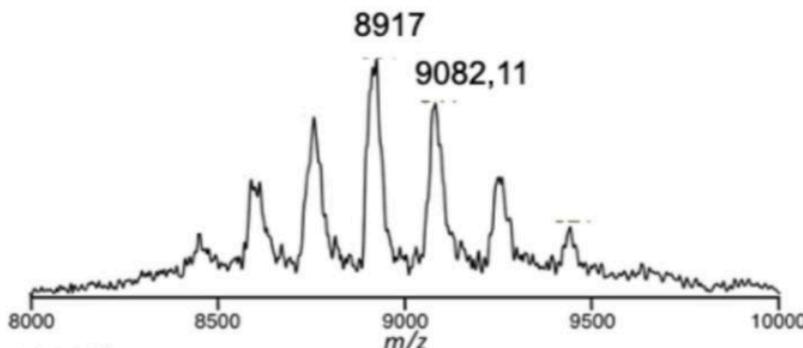
- a) IE: eyección de e-, hasta 500 Da, sensibilidad sub-pM a pM, Disponibilidad de biblioteca de espectros, alta fragmentación, para moléculas de polaridad baja o media, brinda info estructural

MALDI: protonación, cationización, hasta 500 kDa, sensibilidad en el orden de fmol a pmol, Átomo es posible, ionización blanda con poca fragmentación, tolerancia a sales hasta mM, permite análisis de mezclas complejas.

ESI: protonación o cationización, hasta 70 kDa, sensibilidad en el orden de fmol a pmol, ionización blanda múltiples cargas.

- b)
- $m = 19,3 \text{ kDa}$
  - Extremo izquierdo = +12  
Extremo derecho = +9
  - No, ya que la ionización química no se puede utilizar para moléculas mayores a 500 Da, por lo que no hubiese sido capaz de detectar a nuestra molécula de interés de 19,3 kDa.

- c) 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.



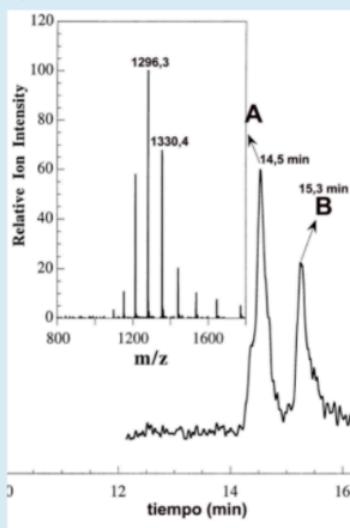
$z_1$  (pico de 8917) = 55  
 $z_2$  (pico de 9082,11) = 54  
 $m = 490,4$  kDa

## TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Una muestra biológica conteniendo rituximab (Ab, un anticuerpo monoclonal recombinante químico) 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 chromatograma 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?
- b- ¿Qué condiciones experimentales puede variar para mejorar la resolución del chromatograma?
- 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?
- d- ¿Qué otro tipo de chromatografía líquida podría utilizar para separar este tipo de compuestos?

- A) Por ser chromatografía líquida en fase reversa, la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar.
- B) La resolución depende específicamente del factor de retención, el número de platos teóricos y el factor de selectividad. Para mejorarla, en el caso del factor de retención debe ser medio para que el componente no eluya ni tan rápido ni tan lento. Por otro lado el número de platos teóricos debe ser grande para mayor eficiencia de separación, el cual se puede variar con la longitud de la columna por ejemplo. Y el factor de selectividad debe ser diferente de 1, lo que nos indica que los componentes se separan correctamente.  
Entonces, para cambiar estos factores, se requiere cambiar ciertas condiciones experimentales. El factor de selectividad y de retención dependen de la fase móvil, la fase estacionaria y la temperatura. Los platos teóricos dependen de la long de la columna, el tamaño de la partícula y el flujo.  
Por ejemplo, aumentando la polaridad de la fase móvil, aumentaríamos el factor de retención.
- D) Se podría usar chromatografía de exclusión por tamaño ya que este es utilizado para biomoléculas. Y el Ab puede variar en la cantidad de residuos galactosa de la cadena terminal.

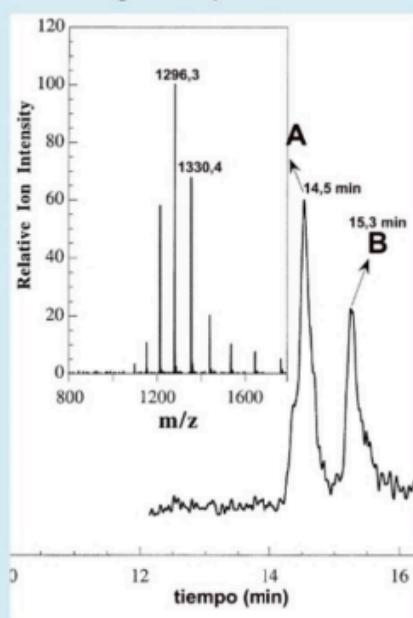
(NO podría usar cromatografía líquida por afinidad ya q si inmovilizó un antígeno, los anticuerpos se unirán todos al azar sin importar su tamaño)

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

La fase móvil consistió en un **gradiante** entre el **solvante 1** (2% ácido acético) y el **solvante 2** (acetonitrilo:2-propanol, 70%:30%).

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:



- a) ¿Qué tipo de cromatografía líquida se realizó?
- b) Si el ancho a la base para los picos A y B es 0,70 min, ¿cuál es la resolución del chromatograma? ¿Considera que la resolución entre los picos es adecuada para utilizar el área bajo la curva con fines cuantitativos?
- c) ¿Cuál es la carga del ion molecular en los picos marcados en el espectro de masas? ¿Qué masa tiene el anticuerpo?
- d) ¿Podría utilizar impacto electrónico (EI) como fuente de ionización para obtener el EM?
- e) ¿Qué otro tipo de cromatografía líquida podría utilizar para separar este tipo de compuestos?

- a) ES FASE LÍQUIDA REVERSA (FM polar) (acetonitrilo es bastante polar)
- b)  $Rs = [2.(t_{Rb} - t_{Ra})] / (w_a + w_b) = 1,14$

La resolución ideal es de alrededor de 1,5. Entonces los picos están completamente separados y a la hora de cuantificar es de mayor utilidad. Con resoluciones de 1,0 podemos identificarlos, pero a la hora de cuantificarlos se introducirán algunos errores. **No es una buena resolución para fines cuantitativos. 1,2 es el límite.**

- e) Podría utilizar la cromatografía líquida por exclusión por tamaño, ya que es útil para biomoleculas.

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  $t_{\text{M}}$  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?

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	tiempo de retención ajustado /min	Área	Área
A	5,2	35227	33970
B	6,5	104530	167945
Estándar interno	3,2	40500	

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?

- a) i) Para aumentar la resolución, debería aumentar el factor de retención, ya que hace que los picos salgan más separados, aunque a mayor tiempo de arranque. Para hacer esto puedo variar la fase móvil, la fase estacionaria o la temperatura, ya que todos estos factores hacen que varíen los tiempos de retención en la columna y la selectividad. Por ejemplo, varió la proporción del solvente polar en la fase móvil.
- Aumentando la polaridad del solvente aumentamos el factor de retención K.**

$$D'_{RF} = \frac{\text{área } X * [EI]}{\text{área } EI * [X]}$$

ii)  
Ya que Área x/ Área ei= Drf.[x]/[ei]

El compuesto b tiene el mayor Drf, ya que en la división Área x/área ei, el numerador es mayor que el denominador y me da un resultado mayor a uno, lo contrario ocurre con el compuesto a.

x → A o B

[X]=área x/área ei . [ei]/Drf

A= área A/ área ei menor a 1 → [A] MENOR A 1

B=área B/ área ei mayor a 1 → [B] MAYOR A 1

La solución testigo contiene 1 mg/ml de cada compuesto (A y B).

El área bajo la curva es proporcional a la concentración.

Entonces, en el caso de A, en la solución X el área es MENOR que el área en la solución testigo, por lo que, la concentración de A en la solución X es MENOR a 1 mg/ml.

En el caso de B en la solución X el área es MAYOR que en la solución T. entonces, la concentración de B es MAYOR que 1 mg/ml en la solución X

- b) salen primero los de mayor tamaño  
el orden es:  
1) agregados de tiroglobulina ( $m > 660$  kDa)

- 2) Tiroglobulina (660 kDa)
- 3) Dimero de IgG (2x150 kDa)
- 4) IgG (150 kDa)
- 5) Aniones fosfato

**Pregunta Nro. 6:**

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

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 250 mg de un estándar interno, se filtra y se completa 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 250 mg de estándar interno. Ambas soluciones se analizan por HPLC arrojando los siguientes resultados:

Compuesto	$t_R$ /min	Solución T		Solución X	
		Área	Área	Área	Área
A	5,2	35227		33970	
B	6,5		104530		167945
Estándar interno	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.

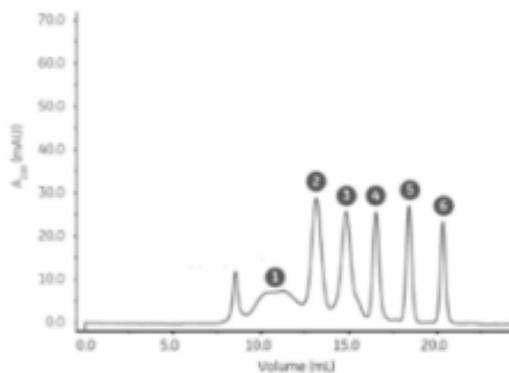
- a) En la cromatografía de afinidad, se utiliza un agente “biológico” como fase estacionaria, es decir, habrá un compuesto que se unirá de forma no covalente y reversible al analito para retenerlo. Una de las soluciones buffer que se utilizan es el buffer de aplicación, el cual contiene la mezcla con el analito que queremos separar y que se unirá a la FE. La otra solución buffer es un buffer de elución que sirve para eluir nuestro analito retenido y recuperarlo, y esto se logra por una elución no específica o por una bio específica.
- b) En la muestra problema hay 0,4 g de B y 0,24 g de A. Es decir, un 40% de B y un 24% de A

- 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:

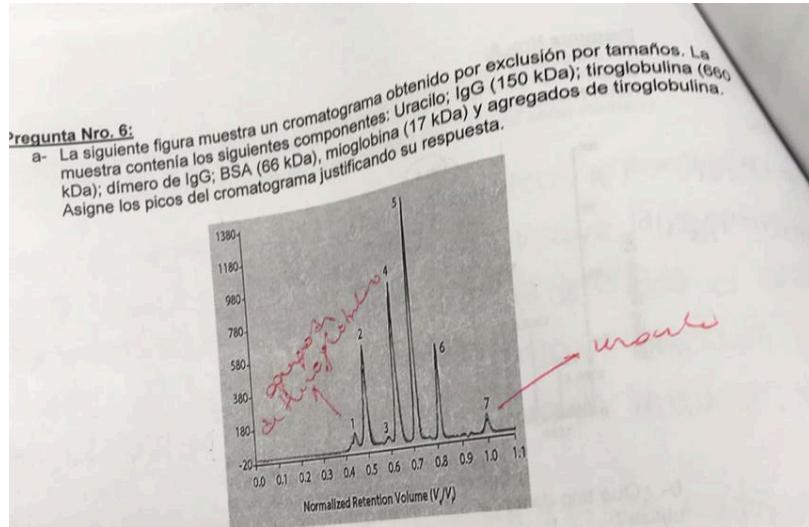
Compuesto	$t_R$ /min	Solución T		Solución X	
		Área		Área	
A	15,2	35000		34000	
B	16,5	104000		168000	
Estándar interno	13,2	17000		40000	

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.

- 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 Tirotoglobulina (440 kDa). Indique la identidad de los picos marcados como 3 y 5 justificando su respuesta.



- a) Se debería calcular igual que el b del anterior, me da paja hacerlo
- b) pico 1: IgM
- pico 2: ferritina (490 kDa)
- pico 3: tirotoglobulina (440 kDa)**
- pico 4: BSA (66 kDa)
- pico 5: mioglobina (17 kDa)**
- pico 6: vitamina B12 (1355 Da=1,3 kDa)



b- Una mezcla que contenía cuatro compuestos orgánicos (A, B, C y D) en 15 mL de metano se analizó por HPLC empleando una columna de sílica de 25 cm. Una segunda muestra (incógnita) de los mismos compuestos pero en diferente proporción se analizó por HPLC bajo las mismas condiciones de corrida que la mezcla anterior. Las áreas de cada pico y la concentración de cada compuesto en la muestra estándar y las áreas de los picos obtenidos para la muestra incógnita se informan en la tabla que se presenta a continuación

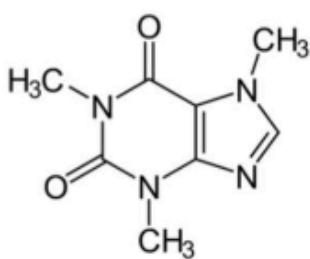
b.1. Determine el factor de respuesta del detector ( $R_F$ ) para cada componente con respecto al compuesto A ( $D_{RF}$ ).

b.2. Dado que el factor de respuesta del detector para A es 1,00 y empleando los resultados que obtuvo en b.1, calcule el % de cada componente en la muestra incógnita.

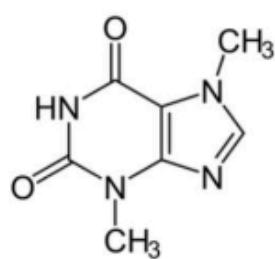
en 15mL, en 100mL : ppm (gr/L)

Compuesto	Muestra estándar		Muestra incógnita	
	Cantidad (mg)	Área de pico	Área de pico	$R_F$
A	50 = 9,3 ppm			
B	30 = 2 ppm	88400		$R_F(1,00)$
C	30 = 2 ppm	60112	88404	$R_F(1,00)$
D			26787 ppm	

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.



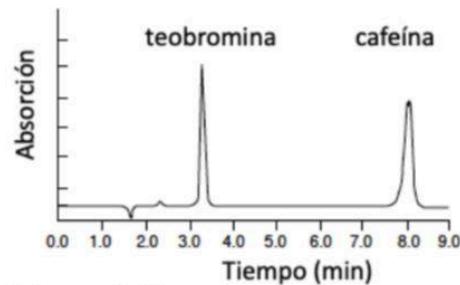
cafeína



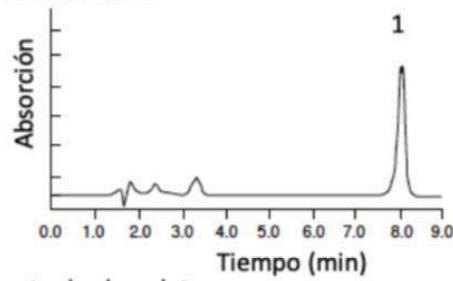
teobromina

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%  $NH_4NO_3$ )<sub>(ac)</sub> en una proporción 12:88. Se realizaron tres experimentos cuyos chromatogramas se presentan a continuación.

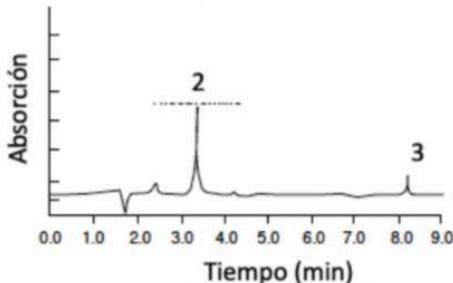
Solución estándar  
Teobromina (20 µg/mL) y cafeína (40 µg/mL)



Extracto de té



Extracto de chocolate



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

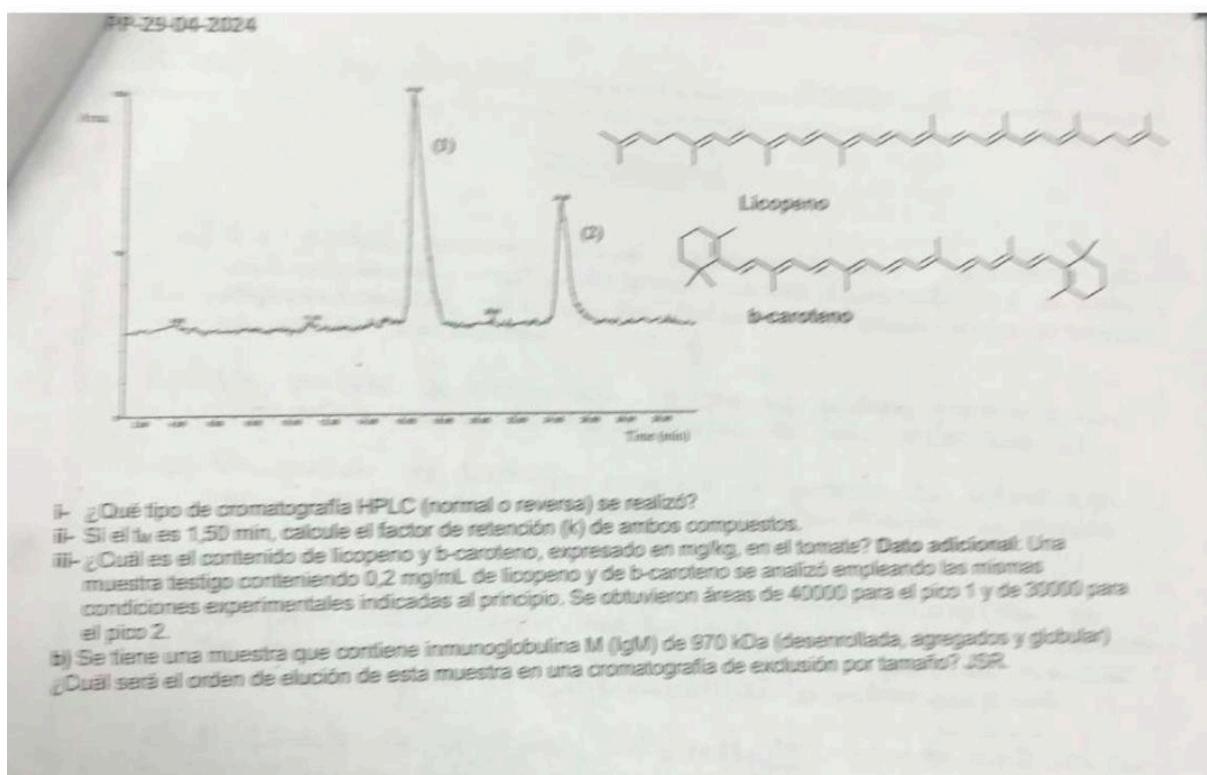
- ¿Qué tipo de cromatografía líquida se realizó? ¿Cuál fue el tipo de detector utilizado?
- Si el área bajo la curva en la solución estándar es 68000 u.a para teobromina y 65000 u.a para cafeína; en el extracto de té es 68000 u.a para el pico 1 y en el extracto de chocolate es 30000 u.a para pico 2 y 10000 u.a para el pico 3
  - ¿El factor de respuesta del detector para cafeína y teobromina es igual? Nota: puede usar a cafeína como referencia.
  - ¿El extracto de té es más rico en teobromina o cafeína? ¿Y el de chocolate?
- Podría utilizar un detector de masas acoplado al cromatógrafo líquido? ¿Cuál sería la fuente de ionización adecuada en ese caso?
- En relación a su respuesta anterior en el inciso c, ¿Cuál sería el mecanismo de ionización que tendría lugar?

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

- Debido a la composición de la FM es una cromatografía líquida de fase reversa. El detector utilizado es de ultravioleta, se basa en la absorción de luz ultravioleta de los compuestos analizados.
- i- El factor de respuesta no es igual, ya que si tuvieran el mismo factor de respuesta, el área bajo la curva en la solución estándar para la cafeína tendría el doble que la de la teobromina, debido a que es proporcional a la concentración el área. Y la concentración de cafeína es el doble.

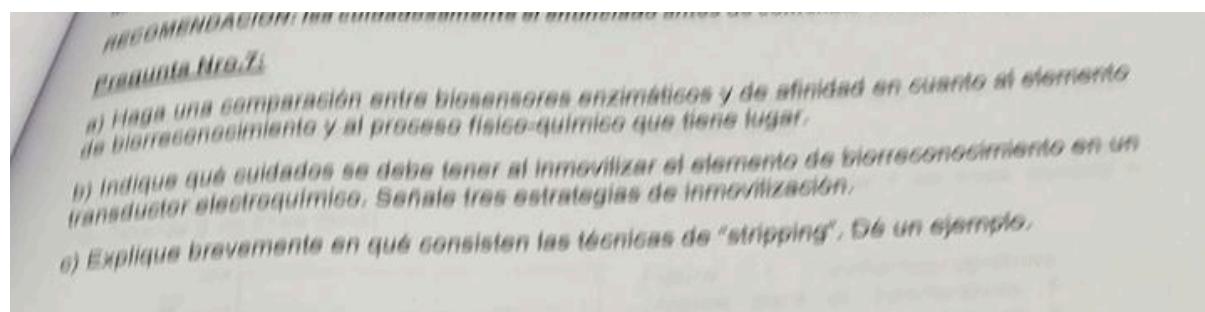
- ii- El extracto de té es más rico en cafeína, mientras que el de chocolate es más rico en teobromina, por los picos supongo
- c) Si se puede utilizar un detector de masas acoplado al cromatógrafo líquido, la fuente de ionización a utilizar es ESI.
- d) El mecanismo de ionización sería la protonación y cationización

6. a) El chromatograma de la figura muestra los picos de licopeno (1,  $t_R$ : 16,62 min; área: 60000) y  $\beta$ -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 C<sub>18</sub> 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 mL min<sup>-1</sup>. En base a estos datos, responda justificando su respuesta en cada caso:



- a) i- fase reversa → fase móvil polar (THF, ACN y metanol son polares!!)
- b) orden de elución: 1- agregados, 2- desenrollada, 3- globular

## TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y BIOSENSORES

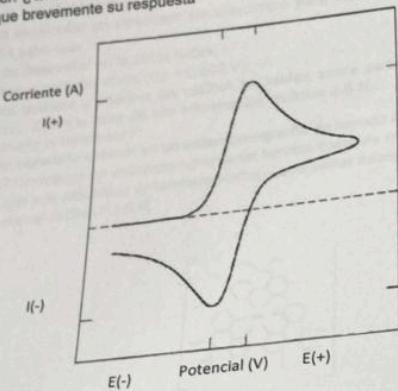


- a) Los **biosensores enzimáticos** tienen como molécula de biorreconocimiento a las enzimas, en este ocurre reacciones catalíticas. La enzima cataliza la formación de productos a través del consumo de sustratos. Lo que se mide es: el consumo del sustrato, la formación de producto o el consumo/transformación de intermediarios. Los **biosensores de afinidad** tienen distintas moléculas de biorreconocimiento: anticuerpos (inmunosensor), aptámeros (aptasensor), ADN ds o ss (genosensor), lectinas (glicobiosensor), etc. En estos, no ocurre ninguna reacción, sino que el reconocimiento se debe a una relación de afinidad (se forma un complejo entre el elemento de biorreconocimiento y el analito por afinidad). La señal que se mide es: el cambio intrínseco del complejo molecular de biorreconocimiento-target (obtención directa) o usando algún indicador redox, por ejemplo (obtención indirecta).
- b) Los cuidados que hay que tener al inmovilizar a la molécula de biorreconocimiento en el electrodo son que el grado de desnaturalización sea mínimo y que la molécula conserve en la mayor medida posible su capacidad de biorreconocimiento. Algunas estrategias de inmovilización son adsorción, entrecruzamiento, atrapamiento, enlace covalente, autoensamblado de multicapas, etc
- c) Las técnicas de stripping son técnicas electroquímicas para la cuantificación de cationes metálicos. Se basan en una preconcentración del analito en un electrodo para luego hacer la redisolución con alguna técnica voltamperométrica. Un ejemplo es el stripping voltamperométrico anódico el cual se usa para cationes metálicos pesados. Consta de 2 etapas:
  - Preconcentración: se aplica a los cationes un potencial de reducción para preconcentrarlos en el electrodo como metales. El potencial aplicado debe ser menor que la cupla redox para asegurarnos de que se reduzcan y se depositen en el electrodo mis cationes de interés.
  - Medición por redisolución: aplicación de un barrido anódico (de oxidación). El pico de oxidación del catión es proporcional a la concentración del mismo.

**RECOMENDACION:** lea cuidadosamente el enunciado antes de responder

**Pregunta N° 1: 20 puntos**

- 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



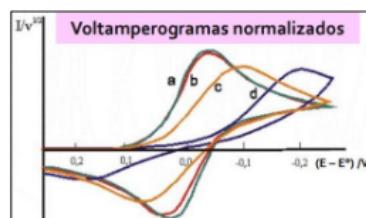
- c. ¿Cómo diferenciaría un proceso reversible de uno irreversible? Justifique su respuesta y esquematice en un gráfico de  $i$  vs.  $E$ .  
 d. Esquematice la perturbación aplicada y la respuesta corriente vs. potencial en la técnica de pulso diferencial.  
 e. Indique las ventajas de las técnicas de pulso diferencial con respecto a la polarografía clásica.

- a)
- 
- b) Corriente de pico anódico ( $I_{pa}$ ), corriente de pico catódico ( $I_{pc}$ ), potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), separación de potenciales de pico ( $\Delta E$ ).
- c) A medida que aumenta la velocidad en los procesos reversibles, no cambia la forma del voltágrafo:
- 

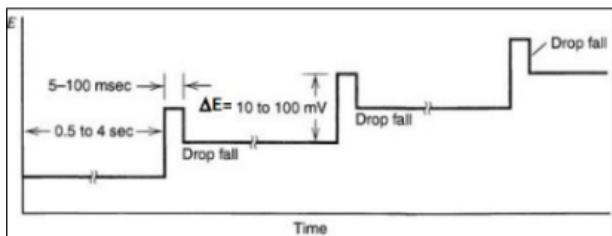
En un proceso irreversible, con el aumento de la velocidad de barrido, se deforma el voltamperograma:

Para que sea reversible se debe cumplir que:

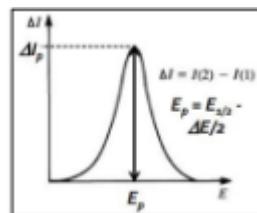
- $I_{pc}/I_{pa} = 1$
- $dE = E_{pc} - E_{pa} = 58 \text{ mV}$
- $|E_{pc} - E_{pa}| = 59/n \text{ mV}$
- $E_p$  no debe cambiar con la velocidad
- \* Relación lineal entre  $I_p$  vs  $v$  de barrido a la  $1/2$



d) Perturbación aplicada:



Respuesta corriente vs potencial:



e) Las ventajas de la técnica de pulso diferencial son:

- ❖ La corriente de pico es proporcional a la concentración, de manera tal que es mucho más fácil realizar curvas de calibración y determinaciones; La reacción redox ocurre siempre en el mismo sentido.
- ❖ Mejor resolución (0,05 V vs 0,2 V de la polarografía clásica).
- ❖ La corriente de cargado ( $i_c$ ) siempre tiene la misma magnitud porque se hace una diferencia, lo cual contribuye al aumento de la sensibilidad.
- ❖ El límite de detección es de entre 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> M.

Pregunta Nro. 7:

a) Realice un análisis comparativo entre los biosensores enzimáticos y los biosensores de afinidad.

b) Se necesita cuantificar los siguientes analitos empleando biosensores electroquímicos:  
 -Secuencia de ADN de una porción de un gen que codifica para cáncer de mama.  
 -Una proteína que se usa como biomarcador para la detección de obesidad.

Indique, J.S.R.,

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

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

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

~~Los biosensores enzimáticos tienen como elemento de bioreconocimiento~~

a)

Biosensor de afinidad	Biosensor enzimático
<ul style="list-style-type: none"> <li>• no ocurre reacción catalítica, es por una relación de afinidad</li> <li>• elemento de bioreconocimiento: ácidos nucleicos, aptámeros, anticuerpos, lectinas, etc.</li> <li>• señal obtenida a partir de cambios de bioreconocimiento-target, indicadores redox y esquemas de amplificación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ocurre reacción catalítica</li> <li>• elemento de bioreconocimiento: enzimas redox.</li> <li>• señal obtenida a partir de: consumo de productos, consumo/transformación de intermediarios y formación de productos.</li> </ul>

- b) i- Para el caso I donde se debe reconocer una secuencia de ADN del cáncer de mama, utilizaría un Genosensor y como elemento de biorreconocimiento una secuencia simple de ADN para que pueda hibridarse con la secuencia de interés y así detectarla.
- Para el caso II utilizaría un Aptasensor, donde el elemento de biorreconocimiento es un aptámero el cual puede detectar cualquier tipo de molécula, como las proteínas. La construcción de estos biosensores consta de:
- 1- Seleccionar el elemento de biorreconocimiento (los anteriores)
  - 2- Seleccionar un electrodo de trabajo, como el electrodo de carbono vitreo, el cual será el responsable de la sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. El electrodo deberá modificarse o tratarse previamente, de modo que la molécula de biorreconocimiento se ancle a su superficie de manera más eficiente.
  - 3- Inmovilización del elemento de biorreconocimiento sobre el electrodo con algún método adecuado para minimizar el grado de desnaturación y la pérdida de las propiedades del mismo.
  - 4- Y por último aplicamos un potencial mediante alguna técnica voltamperométrica, como de pulso diferencial, para obtener así un voltamperograma ( $i$  vs  $E$ ) donde la corriente obtenida será proporcional a la cantidad del analito (elemento a reconocer) en la muestra
- ii- Para el caso del ADN la señal analítica que se obtendría sería la de las nucleobases como la de la oxidación de guanina o la señal de algún indicador redox capaz de intercalarse en la doble hebra. Para el caso de la proteína, también se podría obtener una señal de la oxidación de guanina, ya que ésta se vería afectada durante la interacción del aptámero y la proteína. Esto se debe a que el aptámero tiene una conformación a través de la cual reconoce a la molécula blanco, pero tras la interacción con ella, ocurre un cambio de conformación que produce una alteración en la accesibilidad de los residuos G o A para su oxidación, lo que disminuye las corrientes de la misma.
- c) La voltamperometría cíclica informa sobre termodinámica de procesos redox, cinética de transferencia de carga, existencia de reacciones químicas acopladas y de procesos de adsorción.

I-Molécula de biorreconocimiento.  
II-Evento de biorreconocimiento.  
III-Obtención de la señal analítica.

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

i) A es capaz de *intercalar* en la doble hebra;

ii) A se oxida sobre carbono vitreo ( $E_p = 0,600 \text{ V}$ );

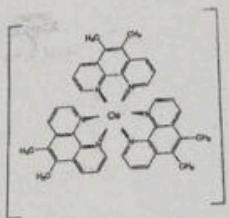
iii) Los residuos guanina y adenina del dsDNA se oxidan sobre carbono vitreo a  $0,900 \text{ V}$  y  $1,100 \text{ V}$ , respectivamente. Sobre la base de esa información, indique J.S.R.:

I-¿Cómo construiría el biosensor?

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.

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

Compuesto A:



RECOMENDACIONES RECOMIENDAMOS LEER EL ENUNCIADO ANTES DE COMENZAR A RESOLVER EL PROBLEMA

Pregunta Nro. 8:

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).

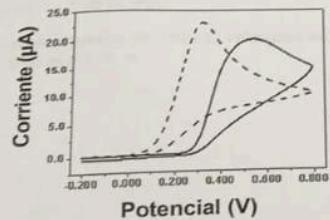
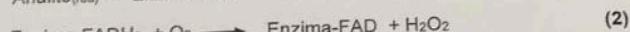
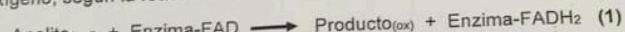


Figura 1. Voltamperogramas cíclicos para el interferente 1 (línea cortada) e interferente 2 (línea llena) ambos en concentración  $1,0 \times 10^{-3}$  M en solución de "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40.

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 compósito de grafito y aceite mineral (cuadrados vacíos, electrodo a) y un compósito de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0 % P/P de iridio (triángulos llenos, electrodo b).

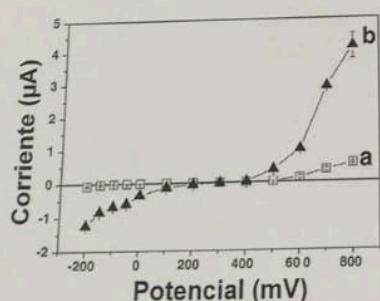


Figura 2. Voltamperogramas hidrodinámicos para peróxido de hidrógeno 0,010 M en solución de "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40 obtenidos sobre un compósito de grafito (70,0 % P/P) y aceite mineral (30,0 % P/P) (cuadrados vacíos, electrodo a, CPE) y un compósito de grafito y aceite mineral conteniendo 3,0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

Resuelto en la guía

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 bioreconocimiento:

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

Indique, J. S. R.:

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

b-En caso que pudiera construir más de uno,

b-i. ¿Cuál le permitiría obtener la respuesta más eficiente?

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

a) Los biosensores que se podrían construir son:

Biosensores de afinidad:

- Glico biosensor. Molécula de bioreconocimiento: concanavalina A, que identifica a carbohidratos complejos o polisacáridos, glicoproteínas, azúcares, etc. La galectina 3 es una glicoproteína.
  - Aptasensor. La molécula de bioreconocimiento es un aptámero anti galectina 3 (anti cuerpo químico, ácido nucleico sintético). Este reconoce cualquier molécula ya que se sintetizan in vitro y no necesitan de organismos vivos.
  - Inmunosensor. Molécula de bioreconocimiento es un anticuerpo anti galectina
  - Enzima: biosensor enzimático
- b) i) El biosensor que elegiría sería el APTASENSOR ya que se puede construir in vitro y su producción es ilimitada (a diferencia de los anticuerpos que hay que extraerlos de un organismo vivo). Además los aptámeros son muchos más estables lo cual nos puede permitir una mayor eficiencia.

ii) Pasos para obtener una señal analítica con el aptasensor:

- 1- Selección de la molécula de bioreconocimiento: aptámero anti galectina 3
- 2- Selección de electrodo de trabajo por ej el de pasta de C, el cual nos dará la sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad.
- 3- Modificación del electrodo con el aptámero anti galectina 3.
- 4- Aplicación de potencial mediante una voltamperometría de pulso diferencial lo que nos da como respuesta un voltamperograma de delta de corriente en función del potencial que aplicamos, a partir de él obtenemos un pico cuya área es proporcional a la cantidad de Glicoproteína Galectina 3 en la muestra.

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  $X^{2+}$  ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $Z^{3+}$  ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) 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:

- La técnica de "stripping" (voltamperometría de redisolución) que emplearía para efectuar la cuantificación de los cationes.
- Las etapas (TODAS) que debería seguir para llegar a obtener la concentración de una muestra problema que contenga ambos cationes?
- Los valores numéricos de los parámetros experimentales para llevar a cabo cada una de esas etapas.
  - Stripping voltamperométrico anódico, ya que debo cuantificar cationes
  1. Preconcentración de los iones metálicos mediante una reducción a un potencial constante tal que se depositen ambos metales sobre la superficie del electrodo.  
2. Oxidación del metal que se pre concentró/electrodepositó, aplicando un barrido anódico.
  - En la primera etapa el potencial de reducción que debe aplicarse tiene que ser más negativo que el de la pareja redox, es decir menor que -0,750V, como por ejemplo -0,950 V, esto es para que se lleguen a depositar todos los metales. Pero además, no hay que elegir un potencial tan negativo ya que puede interferir el oxígeno.  
En la segunda etapa, donde se la da oxidación, los potenciales serían -0,350 V y -0,750 ya que estos corresponden a los picos anódicos de cada catión.

Para eliminar interferencias → stripping de cambio de medio. Una vez que se realizó la preconcentración se transfiere el electrodo a otro electrolito donde se realiza la redisolución. Mejora la selectividad y puede usarse en medio con agente complejante capaz de modificar sustancialmente los potenciales de redisolución y así favorecer la discriminación (elimina interferencia de compuestos fácilmente oxidables).

Los potenciales de oxidación de los metales deben ser suficientemente diferentes para permitir su resolución y cuantificación individual en la etapa de redisolución.

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 vitreo 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:

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

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

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

Emplearía stripping voltamperométrico anódico ya que lo que busco es cuantificar cationes. Las etapas que seguiría son:

- 1) Preconcentración de los iones metálicos mediante reducción a un potencial constante. Se depositan como metal sobre la superficie del electrodo, a un potencial adecuado. El potencial de posición debe ser menor al potencial de la cupla de interés (menor a -0,800V). Una selección criteriosa del potencial mejora la sensibilidad y selectividad de la determinación.
- 2) Oxidación del metal preconcentrado y electrodepositado, con un barrido anódico.

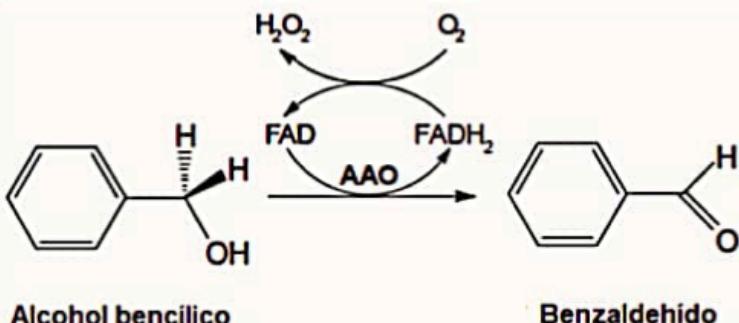
Los parámetros que debo tener en cuenta para que se deposite la mayor cantidad de metal posible en la superficie del electrodo son:

- velocidad de agitación
- tiempo de deposición
- potencial de deposición
- tamaño de la gota, si utilizo Hg

Es importante variar el potencial hasta asegurarse que por más que sea más negativo se observa la misma cantidad de picos de corriente de oxidación. De esta manera estoy segura de que todos los metales se depositaron en la superficie del electrodo.

Los potenciales de oxidación serían 0,400 y 0,800 V

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<sub>2</sub> que, al regenerar la enzima produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 compósito de carbono (CPE), microparticulas de cobre, micropartículas de iridio y AAO.

**Sabiendo que:**

- i-La oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre CPE comienza a 0,550 V y la reducción a -0,500 V.
- ii-La oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre CPE modificado con Cu (CPE-Cu) comienza a 0,250 V y la reducción a 0,050 V.
- iii-La oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.:**

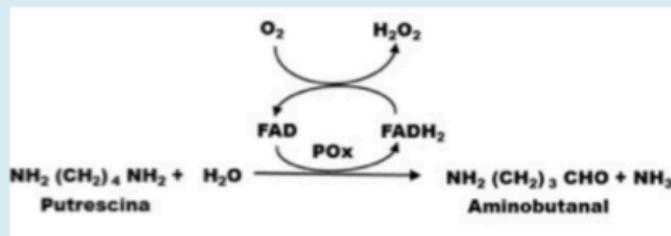
- a) Cuál de los siguientes electrodos usaría para la construcción del biosensor: CPE-AAO; CPE-Cu-AAO; CPE-Ir-AAO. Explique claramente las razones por las que no usaría los dos restantes.
- b) El potencial al que realizaría la determinación amperométrica.

- a) Utilizaría el electrodo de CPE-Ir-AAO ya que si observamos el rango que se comprende entre los potenciales de interés, es decir entre el de reducción del O<sub>2</sub> (0,100V) y el de la oxidación del alcohol bencílico (0,05V), vemos que el potencial del interferente, 0,300V, no está incluido en el mismo y por lo tanto no generaría perturbaciones en la medición.

El electrodo CPE no es ideal usarlo ya que no contiene el catalizador y por lo tanto la reacción no será eficiente ni tan rápida como con el electrodo de CPE-Ir-AAO, donde el catalizador es el Iridio. Además si observamos el rango que resulta de este electrodo: -0,500V a 0,600V, siendo 0,300V el potencial del interferente, este si genera perturbaciones al momento del análisis. El electrodo CPE-Cu-AAO, un interferente comienza su oxidación a

- los -0,1 V provocando entonces que si este se utiliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no podría ser posible.
- b) La selección del potencial de trabajo debe ser tal que la corriente sea máxima, es decir que ocurra la oxidación del alcohol y no ocurra la oxidación de los interferentes. Por ende se seleccionaría un potencial cercano a 0 o a los 0,05 V (menor a 0,1 V).

La putrescina es una de las aminas 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<sub>2</sub> que, al regenerar la enzima produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre CPE comienza a 0,550 V y la reducción a -0,500 V.
- ii-La oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre CPE modificado con Ir (CPE-Ir) comienza a 0,250 V y la reducción a 0,050 V.
- iii-La oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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-Cu-POx; CPE-Rh-POx? Explique claramente las razones por las que no usaría los dos restantes.
- b) El procedimiento experimental que seguiría para seleccionar el potencial de trabajo en la determinación amperométrica de putrescina con el biosensor seleccionado.
- c) El potencial al que realizaría la determinación amperométrica.

El biosensor CPE-Rh-POx es la mejor opción para determinar la frescura de los alimentos por las siguientes razones:

- Selectividad: El CPE-Rh-POx presenta el potencial de oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más bajo (0.150 V) en comparación con los otros electrodos. Esto es crucial porque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el producto de la reacción enzimática de la putrescina-oxidasa (POx) y su detección es fundamental para cuantificar la putrescina presente en la muestra. Un potencial de oxidación más bajo minimiza las interferencias de otras especies presentes en la muestra que podrían oxidarse a potenciales más altos.
- Sensibilidad: El CPE-Rh-POx muestra una mayor diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.050 V) en comparación con los otros electrodos. Esto se traduce en una mayor sensibilidad para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y, por lo tanto, una mejor cuantificación de la putrescina.
- Minimización de interferencias: El CPE-Rh-POx permite la oxidación de la putrescina a un potencial (0.650 V) donde el ácido ascórbico, un interferente común en muestras de alimentos, no se oxida. Esto asegura que la señal medida sea específica para la putrescina y no esté influenciada por la presencia de ácido ascórbico.

¿Por qué no usar los otros biosensores?

- CPE-POx: El CPE-POx no es adecuado porque el potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es demasiado alto (0.550 V), lo que podría llevar a la oxidación de otras especies presentes en la muestra y generar interferencias en la señal.
- CPE-Cu-POx: Aunque no se proporcionan datos específicos sobre el CPE-Cu-POx en el enunciado, es probable que el cobre (Cu) introduzca interferencias adicionales debido a sus propias reacciones redox, lo que complicaría la detección y cuantificación de la putrescina.

- a) Indique J.S.R. cuál es el objetivo fundamental de las técnicas de *stripping* o de *redisolución*.
- 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.:
- I) El tipo de *stripping voltamperométrico* (o *redisolución voltamperométrica*) que emplearía y su fundamento.
  - II) La condición que se debe cumplir para que los cationes puedan ser cuantificados mediante esa técnica de *stripping* o de *redisolución*.
- c) Realice un análisis comparativo entre *voltamperometría cíclica* y *voltamperometría hidrodinámica*.

- a) Las técnicas de *stripping* sirven fundamentalmente para cuantificar cationes metálicos, preconcentrando el analito de interés de la manera más selectiva posible para luego redisolverlo y medirlo utilizando técnicas electroquímicas. Las mismas tienen una gran variedad de aplicaciones y mejores niveles de detección para numerosos analitos.
- b) I- Emplearía un *stripping voltamperométrico* anódico ya que el mismo sirve para determinar cationes de metales pesados. Este método se basa en la preconcentración mediante una reducción a potencial constante donde los iones se depositaran en el electrodo en un tiempo determinado, y luego una *redisolución* por un barrido anódico de los iones metálicos previamente reducidos.
- II- Condiciones que se deben cumplir:
- Que el potencial de reducción en la preconcentración sea más negativo que el potencial de equilibrio para poder depositar todos los metales de la solución.
  - El tiempo de agitación tal que se acumule la mayor cantidad posible del analito en el electrodo.
  - Velocidad de agitación necesaria para la mayor *redisolución*.
  - Evaluar el tamaño de gota de mercurio en caso de que se utilice este método.

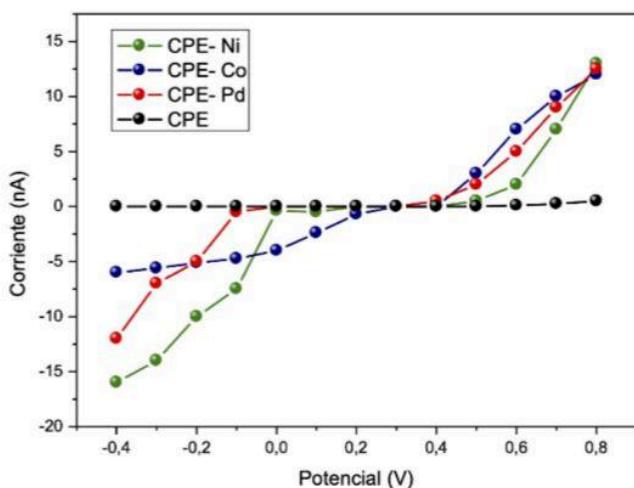
c)

Voltamperometría Hidrodinámica	Voltamperometría Cíclica
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución agitada</li> <li>• Hay convección forzada</li> <li>• Capa difusional constante</li> <li>• Corriente máxima y constante porque hay un aporte por convección.</li> <li>• Alta sensibilidad, nos brinda mejor información.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución en reposo</li> <li>• Por difusión natural</li> <li>• Capa difusional aumenta con el tiempo</li> <li>• La corriente cae porque la velocidad de transferencia de carga es mayor a la velocidad difusional.</li> <li>• Baja sensibilidad</li> </ul>

I- En un laboratorio de análisis se necesita desarrollar un microbiosensor para lactato inmovilizando la enzima lactato oxidasa (LOx) en un compósito 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 compósito adecuado y útil para construir un biosensor, se evaluó el comportamiento de un compósito sin modificar y tres compósitos 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 o CPE-Pd-Lox? **Explique y justifique** claramente las razones por las que no usaría los restantes.

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

a) Utilizaría el sensor CPE-Co-Lox, debido a que los demás sensores tendrán interferencias, además de las zonas de donde la señal es apreciable. El CPE-Ni-Lox por ejemplo no podría trabajar en zonas ni de oxidación debido a la oxidación de mis contaminantes, y para trabajar en zona de reducción tendría que ir a potenciales bastante negativos. Para el CPE-Pd-Lox pasaría lo mismo. Pero en el caso del CPE-Lox queda descartado debido al gráfico no presenta una respuesta apreciable en ninguna zona.

b) Debido a la presencia de contaminantes en la zona de oxidación, utilizaría un potencial de entre 0,100V y 0,200V con el cual el sensor CPE-Co-Lox me daría una buena respuesta.

(la respuesta anterior no tenia comentario de la profe)

- a) Para determinar el lactato en las muestras utilizaria el biosensor CPE-Co-LOx.

No utilizaria el CPE-LOx ya que necesitaría trabajar a potenciales muy altos lo que resultaría en interferencias y tendría interferencias. Tampoco usaría el CPE-Pd-LOx ya que tiene interferencia por la oxidación del ácido úrico y no usaría el CPE-Ni-LOx ya que posee interferencias tanto del ácido úrico como del acetaminofen.

- b) Para realizar la determinación amperométrica de lactato con el biosensor de CPE-Co-LOx utilizaría un potencial de 0,250 V para evitar interferencias por oxidación de ácido urico y acetaminofen. Es importante que sea menor a 0,550 y a su vez que sea menor a 300 para evitar interferencias.

Comentario:

b-Incorrecto. a 250 mV la corriente es prácticamente cero.

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.

**Indique J.S.R:**

- a) La técnica de "stripping" (voltamperometría de redisolución) que emplearía para efectuar la cuantificación de los cationes.
- b) Las etapas que seguiría y las condiciones de trabajo necesarias para efectuar la determinación (con valores numéricos).
- c) La estrategia que elegiría para eliminar los efectos de posibles interferentes fácilmente oxidables presentes en la muestra.

-

**Datos:**

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

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

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

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

- a) Ya que se trata de cationes utilizaría la Stripping voltamperometrico anódico o voltamperometría de redisolución anoticia (ASV)
- b) El primer paso es la preconcentración que se efectúa mediante la aplicación de un potencial tal que el ion metálico se reduzca en la superficie del electrodo y pase a ser un metal, la segunda etapa consiste en la oxidación del metal que se preconcentra y electrodeposito aplicando un barrido anódico. Se deben tener en cuenta el potencial de deposición, el tiempo de deposición, la velocidad de agitación y en el caso de utilizar Hg el tamaño de la gota, para que se deposite la mayor cantidad posible de catión metálico en la superficie del electrodo. El potencial debe ser más negativo que el potencial de equilibrio de la夫妇 de interés (menor a -0,900), una elección criteriosa mejora la sensibilidad y selectividad de la determinación. Se debe variar el potencial hasta asegurarse que por más de que sea más negativo observo la misma cantidad de picos de corriente de oxidación y así me aseguro que pude depositar en la superficie del electrodo todos los metales.
- c) Se puede utilizar una redisolución con cambio de medio que consiste en que se transfiere el electrodo a otro electrolito donde se realiza la redisolución para evitar realizar la redisolución con interferencia de oxidación de otros compuestos presentes en la solución. Mejora la selectividad y puede usarse en medio con un agente complejante capaz de modificar sustancialmente los potenciales de redisolución y así favorecer la discriminación. Se elimina la interferencia de compuestos de la muestra que se puedan oxidar durante la redisolución.

Comentario:  
Correcto

Sobre las técnicas de *stripping* o de redisolución:

- a) Indique J.S.R. cuál es el objetivo que persiguen desde el punto de vista analítico.
- b) 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:I) etapa de acumulación, II) etapa de "stripping" o redisolución y III) analitos con los que se pueden usar.
- c) 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).

a) El objetivo fundamental de las técnicas de *stripping* o de redisolución es mejorar los niveles de detección de numerosos analitos, se utilizan para la cuantificación de los mismos (lograr una mayor sensibilidad por el efecto de preconcentración). Este objetivo se lleva a cabo consiguiendo que el analito de interés quede acumulado, pre concentrado en la superficie del electrodo y posteriormente se lo oxida o reduce en la solución.

b) **Voltamperometría de redisolución anódica:** Es un método de análisis cuantitativo para el análisis de trazas de cationes metálicos. El analito se deposita (electrolíticamente) sobre el electrodo de trabajo durante una etapa de deposición, y luego se oxida durante la etapa de extracción. La corriente se mide durante la etapa de extracción.

Tiene dos etapas:

1. Preconcentración: se efectúa mediante la aplicación de un potencial que el ion metálico se reduzca en la superficie del electrodo y pase a metal, se lo preconcentra como un metal.
2. Consiste en la oxidación del catión metálico que se acaba de preconcentrar que se encuentra como metal. Cuando uno hace el barrido se ve que hay una corriente de base y que cuando el potencial alcanza el potencial de la cupla redox del analito vamos a ver el pico de oxidación.

**Voltamperometría de redisolución adsorptiva:** Es un método de análisis cuantitativo para el análisis de trazas. El analito se deposita simplemente por adsorción en la superficie del electrodo (es decir, sin electrólisis), y luego se electroliza para dar la señal analítica. Se utilizan a menudo electrodos modificados químicamente.

En la primera etapa el analito se acumula mediante la adsorción en la superficie del electrodo y el *stripping* propiamente dicho se efectúa mediante la aplicación de un programa de potencial adecuado, una voltamperometría de barrido lineal, o de pulso diferencial. En este caso, la preconcentración se realiza mediante un proceso que es no electrolítico, simplemente una adsorción, esta etapa de preconcentración puede efectuarse a potencial de circuito abierto o aplicando un dado potencial. La cantidad de analito acumulado va a depender del medio, del pH, de la fuerza iónica, de la naturaleza del electrodo (no cualquier analito se va a absorber sobre cual superficie del electrodo), de la convención, del potencial y de la temperatura.

Ejemplo: adsorción de dopamina sobre el carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono.

c) En voltamperometría cíclica se obtiene un pico de corriente ya que en esta técnica no hay convención, solo hay difusión, es decir que no se produce la agitación del analito. Si se agitara la solución, no se alcanaría un pico de corriente, sino una corriente máxima.

En voltamperometría hidrodinámica se obtiene una corriente límite (máxima) ya que hay convección, hay agitación de la solución.

Comentario:

Correcto

c-extracción no es el término correcto

## ELECTROFORESIS

### Pregunta N° 4: 15 puntos

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

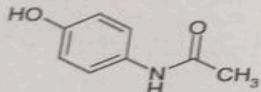
b. I) ¿Cómo se define el flujo electroendosmótico (EOF)?

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

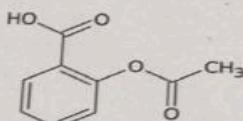
III) Esquematice una curva de variación de EOF en función del pH.

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.

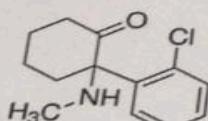
Datos:



Paracetamol ( $pK_a = 9,9$ )



Aspirina ( $pK_a = 3,5$ )



Ketamina ( $pK_a = 7,5$ )

a) Fundamento de electroforesis capilar: consiste en una técnica para separar analitos según su movimiento en un medio conductor en respuesta a la aplicación de un campo magnético. Características: El capilar de sílice fundido tiene dimensiones que van de los 25 a los 75  $\mu\text{m}$  (diámetro interno d.i.), de acuerdo a la aplicación que tengan estos capilares. Es una técnica que opera en medio acuoso. Se emplean pequeños volúmenes (1-50 nL). Las muestras son introducidas en un extremo de la columna, migrando hacia el otro extremo. El buffer de separación rellena una columna capilar.

Ventajas de la electroforesis frente a HPLC:

- Mayor eficiencia en la separación de macromoléculas en disolución.
- No hay correlación entre tiempos de retención y tiempos de migración.
- Menores volúmenes de fase móvil empleada (orden de nL).
- Correlación del área en función del tiempo de migración es necesaria para llevar a cabo el análisis cuantitativo en electroforesis capilar.

b) i) Flujo electroosmótico: Es el movimiento general de todo lo existente en el interior del capilar como consecuencia del campo eléctrico aplicado. Bajo condiciones normales, el movimiento global es hacia el cátodo. Su componente de velocidad es mayor, en general, que las componentes electroforéticas de los solutos a separar.

ii) Por agregado de aminas cuaternarias al buffer de separación. Las aminas tienen una cabeza cargada positivamente ( $\text{NH}_4^+$ ) y colas hidrocarbonadas. En una primera instancia detenemos el flujo, ya que se están ocluyendo las cargas negativas con las positivas de las aminas cuaternarias, y las colas hidrocarbonadas no tienen carga. Pero, si se aumenta la concentración del amonio cuaternario, las colas hidrofóbicas interaccionan entre sí, exponiendo las cargas positivas de las cabezas de los amonios. Esto provoca que cambie el sentido del flujo electroosmótico, ya que le cambiamos la carga a la pared del capilar.

c) orden de elución: paracetamol, ketamina, aspirina.

esto es así debido a que en electroforesis zonal, el orden de migración es primero los compuestos con carga positiva, primero los de menor tamaño y luego los de mayor tamaño,

y luego los neutros, y por ultimo los negativos, primero los de mayor tamaño y luego los de menor tamaño.

*RECOMIENDAMOS leer el enunciado antes de comenzar a resolver el problema.*

**Pregunta Nro. 10**

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.

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:

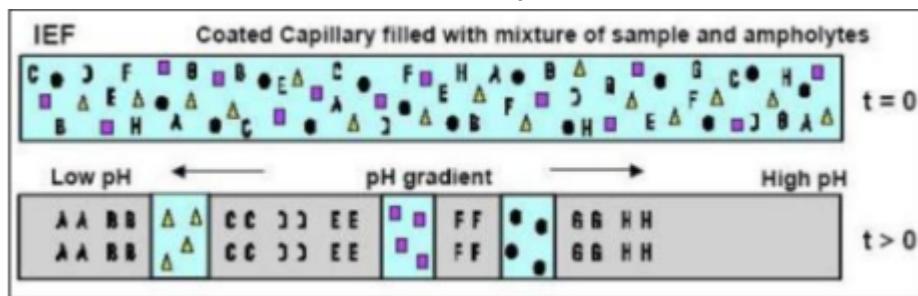
- ✓ Tampón Tris-Borato 0,10 M pH 8,3
- ✓  $E = 250 \text{ V/cm}$
- ✓  $L = 40 \text{ cm}$
- ✓  $I = 30 \text{ cm}$
- ✓ i.d. = 75  $\mu\text{m}$
- ✓  $\lambda = 206$

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 esquematicice cualitativamente un registro de la señales en función del tiempo que esperaría ver en el análisis de esta muestra.

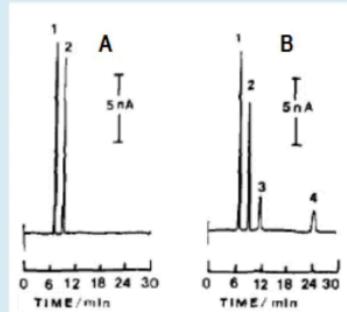
c) Mencione las principales características de los sistemas micro-analíticos y esquematicice una celda de detección electroquímica integrada en un equipo de electroforesis capilar

- a) La separación se basa en la diferencia entre puntos isoeléctricos.
- Capilar neutro, no hay flujo electroendosmótico. Normalmente se recubre con algún material que impida la adsorción de las proteínas al mismo.
  - Su principal aplicación es la separación de proteínas.
  - La columna se rellena con una disolución de anfolitos y la muestra. Tras la aplicación del campo eléctrico se genera un gradiente de pH en el interior de la columna capilar.
  - Una vez alcanzado el punto de enfoque, las proteínas se sitúan en zonas de pH igual a su punto isoeléctrico, se produce el movimiento de toda la disolución hacia el detector. Se mantiene constante el voltaje de separación.



- b) En CGE la separación se basa en la diferencia de tamaños y cargas. Para la misma relación carga/tamaño, la separación está basada únicamente en el tamaño. Primero eluyen las más pequeñas y luego las más grandes. Orden de elución: 75 bp, 298 bp, 506 bp, 1018 bp, 2036 bp.

Glucosa oxidasa (GOx) cataliza la reacción de oxidación enzimática de  **$\beta$ -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  **$\beta$ -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 añadir 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  $\mu$ m
- Detector: celda electroquímica wall-jet de 3 electrodos, **electrodo de trabajo: Cobre de 100  $\mu$ 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:

- ¿Qué tipo de electroforesis capilar se emplea para separar estos compuestos? Justifique su respuesta indicando el fundamento de la técnica.
- ¿Qué función cumple el glucitol? Justifique su respuesta.
- Por qué disminuye el pico 2 en el electroferograma B? Justifique su respuesta.
- 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	$\beta$ -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

- Se emplea electroforesis zonal o de zona. Este tipo de electroforesis, separa en base a la relación tamaño/carga, no separa moléculas neutras, solo iones. Se usa un capilar de sílice cargado negativamente, al que se le aplica un campo eléctrico. Cuando esto ocurre, las moléculas cargadas positivamente van a migrar hacia el cátodo (carga negativa), luego las moléculas neutras migran llevando el frente del EOF, y por último salen las moléculas cargadas negativamente ya que el ánodo (carga positiva) las retiene más por interacciones electrostáticas hacia el lado opuesto.
- El glucitol cumple la función de estándar interno. Además, es un compuesto neutro, por lo que nos indica el flujo electroosmótico. Representa el pico 1, que no varía en la reacción. Al comparar el área o altura del pico del analito con el área o altura del pico estándar interno, se puede calcular la concentración del analito de manera más precisa, ya que se compensan los errores introducidos por las variaciones en el volumen de inyección y otros factores instrumentales.
- El pico 2 disminuye porque es el que corresponde a la glucosa. En el electroferograma A, la glucosa no tiene con quién reaccionar, por eso se ve un pico

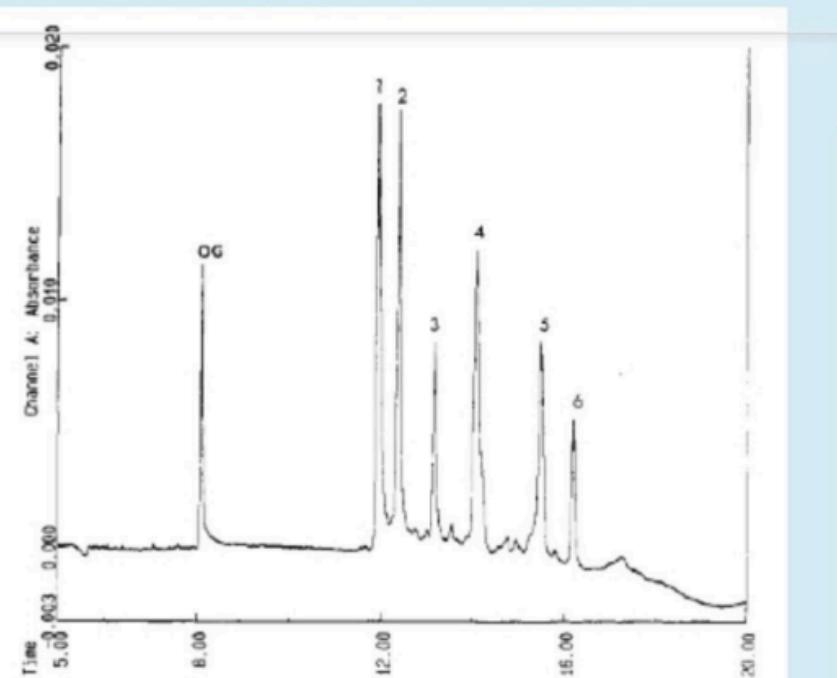
más alto. En el B, ocurre la reacción y la glucosa comienza a consumirse como sustrato, por lo que vemos una señal más baja.

- d) Principio de separación: se basa en separar compuestos según su relación q/m. La muestra se sitúa en el ánodo y los solutos migran hacia el cátodo, saliendo primero moléculas positivas (menor, mayor tamaño), neutras, negativas (mayor, menor tamaño).
1. glucitol. compuesto neutro, flujo electroosmótico
  2. glucosa. compuesto negativo menor carga
  3. ácido glucónico, compuesto negativo, mayor carga, más pesado que 4
  4. h2o2, compuesto negativo, mayor carga, menos pesado que 3

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 = 300 V/cm
- L= 50 cm
- I= 40 cm
- i.d.= 100  $\mu$ 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 a 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). 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.



Electroforesis capilar en gel se basa en la separación de moléculas por sus distintos tamaños, con igual carga, donde el orden de separación es: 1ro las más chicas y luego las más grandes.

El agregado de SDS permite que esta separación sea posible ya que enmascara la carga intrínseca de cada proteína y las deja cargadas de igual manera.

1. f
2. c
3. b
4. e
5. a
6. d

#### 9. Electroforesis capilar en zona:

- Pregunta sobre el fundamento de la técnica.
- Pedían explicar cómo sería el flujo endosmótico en tres situaciones:
  - Con un recubrimiento de silanatos.
  - Con silanatos y un grupo positivo que hacía que la membrana de la pared del capilar esté neutra.
  - Con la pared del capilar positiva.
- Preguntaban cómo fluirían cationes, aniones y moléculas neutras en cada uno de esos casos.

Segun chat gpt:

#### 1. Con un recubrimiento de silanatos

Flujo endosmótico (EOF): El recubrimiento de silanatos mantiene los grupos silanol ionizados (cargados negativamente). Esto genera un EOF significativo hacia el cátodo.

Movimiento de las especies:

- Cationes: Se moverán hacia el cátodo, tanto por el EOF como por su propia movilidad electroforética.
- Aniones: Se moverán hacia el ánodo debido a su carga, pero el EOF hacia el cátodo puede ralentizarlos o incluso hacer que algunos más pequeños se muevan hacia el cátodo.
- Moléculas neutras: Serán arrastradas en la dirección del EOF, es decir, hacia el cátodo.

#### 2. Con silanatos y un grupo positivo que neutraliza la carga de la pared del capilar

Flujo endosmótico (EOF): Con la pared del capilar neutralizada, el EOF será prácticamente inexistente.

Movimiento de las especies:

- Cationes: Se moverán hacia el cátodo por su movilidad electroforética.
- Aniones: Se moverán hacia el ánodo por su propia movilidad electroforética.
- Moléculas neutras: No se moverán significativamente, ya que no hay EOF para arrastrarlas.

#### 3. Con la pared del capilar positiva

Flujo endosmótico (EOF): Si la pared del capilar es positiva, el EOF se invertirá y se dirigirá hacia el ánodo.

Movimiento de las especies:

- Cationes: Se moverán hacia el cátodo por su movilidad electroforética, pero el EOF hacia el ánodo puede ralentizarlos o incluso hacer que algunos cationes más pequeños se muevan hacia el ánodo.
- Aniones: Se moverán hacia el ánodo tanto por el EOF como por su propia movilidad electroforética.
- Moléculas neutras: Serán arrastradas en la dirección del EOF, es decir, hacia el ánodo.

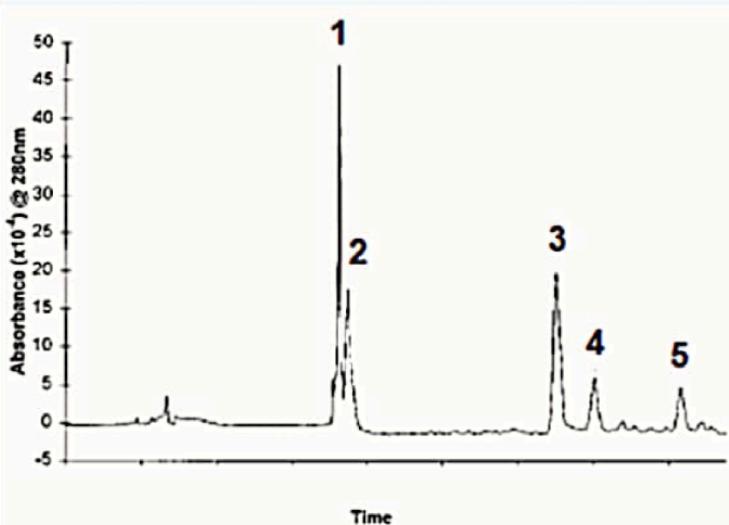
El isoelectroenfoque capilar (IEEF) es un método de alta resolución, potente y práctico para la separación de componentes en mezclas biológicas complejas. Este método puede ser aplicado al estudio de los niveles de proteínas contenidas en fluido cerebroespinal humano, en las siguientes condiciones de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

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

Las proteinas 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:

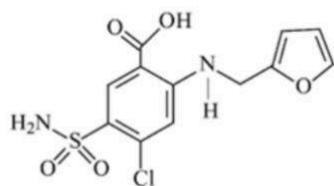
a- ¿Qué función cumple el alcohol polivinílico PVA? Justifique su respuesta.

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.



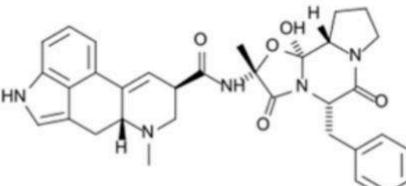
- El recubrimiento de PVA genera el capilar neutro eliminando el flujo electroendosmótico y minimizando la adsorción de la muestra en las paredes. Otra que se usa para esto es la poliacrilamida.
  - La técnica de separación de isoelectroenfoque se usa generalmente en la separación de proteínas según su punto isoeléctrico. Al aplicar un campo eléctrico se genera un gradiente de pH dentro del capilar. Las proteínas se van a ubicar en zonas de pH igual que su pl.
- En esta técnica el capilar es neutro (gracias al PVA) por lo que no tiene EOF. Con respecto al orden de salida, si vemos los datos de los tiempos de migración, sale primero la mioglobina que tiene pl 7 y el inhibidor de tripsina que tiene pl 4,6 demora mas en salir, esto nos indica que primero saldrán los básicos y por último los ácidos.
- Entonces el orden es: 1) Lisozima 2) Citocromo C 3) Mioglobina 4) Anhidrasa 5) Inhibidor tripsina.

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:



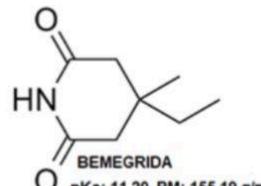
**FUROSEMIDA**

pKa: 3,90 PM: 330,75



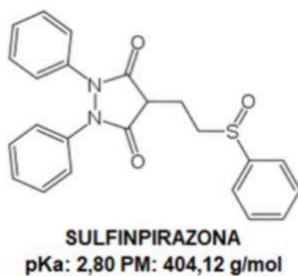
**ERGOTAMINA**

pKa: 6,30 PM: 581,66



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
- \* I= 50 cm
- \* i.d.= 50 µm
- \* Detector UV - I = 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.



**SULFINPIRAZONA**

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

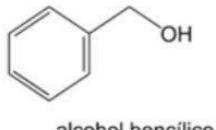
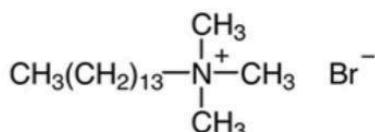
Indique:

- ¿Qué tipo de electroforesis capilar emplearía Ud. en estas condiciones para separar estos fármacos? Justifique su respuesta indicando el fundamento de la técnica.
- ¿Qué función cumple el alcohol bencílico? Justifique su respuesta.
- ¿Qué función cumple el DTAB? Justifique su respuesta.

d- Asigne el orden, adjudicando del número 1 al 4 a cada uno de los fármacos, desde el menor tiempo de elución (Nº1) al mayor (Nº4), y justifique su elección empleando para ello el principio de separación de esta metodología.

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

**DATOS:**



**DTAB**

- a) Utilizaría la electroforesis capilar de zona ya que se está utilizando un capilar de silice fundido recubierto con DTAB.
- b) El alcohol bencílico al ser un compuesto que no reacciona con el compuesto, funciona como patrón interno.
- c) DTAB se utiliza para estabilizar el pH de la solución.
- d) El que va a eluir primero es el catión con mayor carga positiva, es decir 1º sulfonpirazona ( $\text{pK}_a = 2,8$ ), luego el catión con menor carga positiva 2º furosemida ( $\text{pK}_a = 3,9$ ), luego el compuesto que este medianamente neutro ya que pH (5,57) es cercano al  $\text{pK}_a$  es decir 3º ergotamina ( $\text{pK}_a = 6,3$ ), y por último el anión 4º bemegrida ( $\text{pK}_a = 11,2$ )

**Comentario:**

a-No responde ni justifica correctamente.

b-Incorrecto

c- Incorrecto

d- Incorrecto. No interpreta las condiciones experimentales del problema y confunde el análisis del  $\text{pK}_a$ , orden incorrecto.

- a) electroforesis capilar de zona
- b) Segun chat gpt el alcohol bencílico se utiliza como un estándar interno o un marcador de tiempo de migración para asegurar la precisión en la medición de tiempos de migración.
- c) DTAB genera un recubrimiento especial del capilar ya que se ioniza positivamente. Cambia el sentido del flujo electroosmótico.? Segun chat gpt el DTAB es un surfactante cationico utilizado para modificar la superficie del capilar de sílice fundido. La capa catiónica proporcionada por el DTAB neutraliza o incluso invierte las cargas negativas de los grupos silanol, lo que puede cambiar la dirección y la magnitud del EOF. En este caso, el flujo podría dirigirse hacia el ánodo, facilitando la separación de las especies aniónicas. También puede servir para evitar la absorción de las moléculas en la pared del capilar.

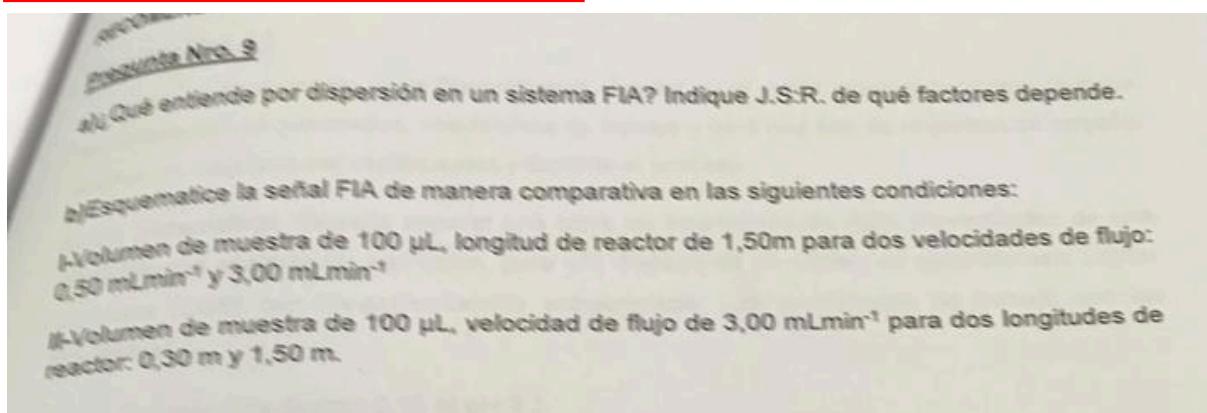
d)

pH>pKa → desprotonado

pH<pKa → protonado

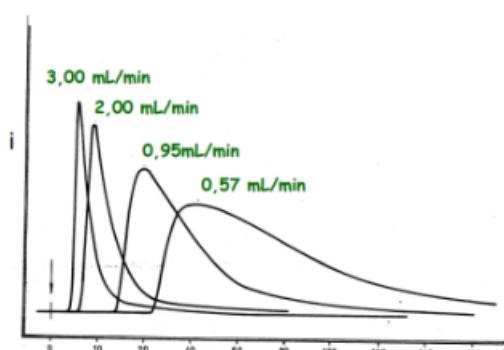
primero sale bemegrida, despues ergotamina, despues sulfinpirazona y despues furosemida

## ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

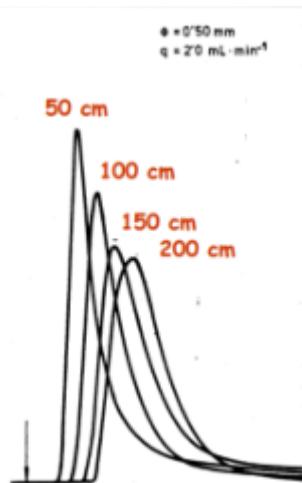


- a) La dispersión es la dilución de la muestra en el portador. Tiene que estar controlada ya que a mayores dispersiones tendremos mayores diluciones, lo que deforma el bolo y por ende la señal de la muestra. La dispersión se refiere a la extensión y mezcla del analito mientras fluye a través del sistema. Depende del volumen de la muestra (a mayor volumen, menor es la dispersión), depende del flujo (mientras mayor es el flujo, la muestra tarda menos tiempo en alcanzar el detector y menor es la dispersión) y de la longitud del reactor (mientras más largo sea, más tiempo tardará la muestra en llegar al detector, habrá más tiempo para que ocurra la difusión y por lo tanto habrá una mayor dispersión).

b) i-



ii-



**Pregunta Nro. 8:**

a) Señale las diferencias fundamentales entre análisis por inyección en flujo segmentado (SFA) y análisis por inyección en flujo continuo (FIA).

b) Esquematicice la señal FIA que esperaría obtener de manera comparativa en las siguientes condiciones. Justifique su respuesta:

I-Volumen de muestra de 75  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor de 1,50m para dos flujos: 0,40  $\text{mLmin}^{-1}$  y 3,00  $\text{mLmin}^{-1}$ .

II-Volumen de muestra de 75  $\mu\text{L}$ , flujo de 3,00  $\text{mLmin}^{-1}$  para dos longitudes de reactor: 0,45 m y 1,80 m.

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

a)

ANALISIS POR INYECCION DE FLUJO SEGMENTADO (SFA)	ANALISIS POR INYECCION EN FLUJO CONTINUO (FIA)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- La muestra y el reactivo circulan constantemente por el reactor, insertando burbujas de aire cada cierto tiempo.</li> <li>- Antes de llegar al detector se requiere eliminar la burbuja y lavar</li> <li>- Requiere de mayor cantidad de volúmenes, mayor cantidad de desechos</li> <li>- 80 muestras/hs</li> <li>- Se requiere esperar a que la reacción llegue al equilibrio para poder medir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Por el reactor circula un líquido transportador. Allí se van insertando las muestras con un volumen pequeño</li> <li>- No requiere de lavados ni eliminación de burbujas (porque no las hay)</li> <li>- Requiere poca cantidad de volumen, menor cantidad de desechos</li> <li>- 300 muestras/hs</li> <li>- No requiere llegar al equilibrio, se puede medir en cualquier parte de la señal</li> </ul>

c) En i. la mayor dispersión se obtiene con el flujo de 0,40 ml/min ya que al ser menor el flujo, la muestra tarda más en llegar al detector, dando mayor lugar a la difusión y por ende a la dispersión. En ii. la mayor dispersión se da para el reactor de 1,80 m, ya que al ser más largo, más tiempo tardará la muestra en llegar al detector, habrá más tiempo para que ocurra la difusión y por lo tanto habrá una mayor dispersión

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  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 0,40  $\text{mLmin}^{-1}$

II-Volumen de muestra: 75  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 3,00  $\text{mLmin}^{-1}$

#### SISTEMA B:

II-Volumen de muestra de 75  $\mu\text{L}$ , flujo de 3,00  $\text{mLmin}^{-1}$ ; longitud de reactor: 0,45 m.

II-Volumen de muestra de 75  $\mu\text{L}$ , flujo de 3,00  $\text{mLmin}^{-1}$ ; longitud de reactor: 1,80 m.

Con respecto a los sistemas A-I y A-II, podemos decir que el sistema II tiene menor tiempo de arranque, menor ancho del pico y mayor altura del pico, por ende una mayor resolución, debido al aumento de flujo, que disminuye la difusión y dispersión.

Con respecto a los sistemas BI y BII, el sistema II tiene mayor tiempo de arranque, menor altura del pico y mayor ancho, lo cual indica una menor resolución. Esto debido al largo del reactor, ya que aumenta la difusión y la dispersión, por lo que lo ideal sería tener un reactor corto.

**RECOMENDACIONES:**

**Pregunta N° 3: 15 puntos**

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

b. Indique cuáles son los parámetros de importancia que se pueden obtener de un flagrama. Mencíñelos y señálelos en un hipotético flagrama.

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

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

II- Longitud de reactor: 1,80 m; flujo: 4,00  $\text{mLmin}^{-1}$  para dos volúmenes de muestra: 100  $\mu\text{L}$  y 500  $\mu\text{L}$ . ¿Qué perfiles esperaría obtener para ambos volúmenes de muestra si el flujo hubiera sido 0,70  $\text{mL min}^{-1}$ ?

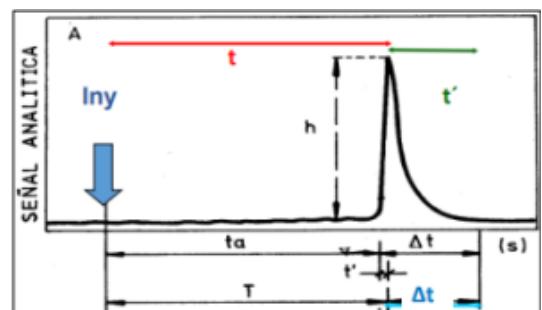
b) **Tiempo de aparición o de arranque ( $ta$ ):** El tiempo que transcurre entre la inserción de la muestra, hasta que la señal se aleja de la línea de base.

**Tiempo de residencia ( $t$ ):** es el tiempo que transcurre desde que se efectúa la inserción de la muestra, hasta que se alcanza el máximo de la señal.

**Tiempo de retorno ( $t'$ ):** es el tiempo que va desde que se alcanza el máximo de la señal, hasta que se alcanza nuevamente la línea de base.

**Intervalo de tiempo que dura la señal ( $\Delta t$ ):** es el tiempo que transcurre desde que aparece la señal, hasta que retorna a la línea de base.

Estos parámetros tienen una relación directa con la velocidad de muestreo y la calidad de señal que se obtenga



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  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 0,40  $\text{mLmin}^{-1}$

**CONDICIÓN II-**Volumen de muestra: 75  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 3,00  $\text{mLmin}^{-1}$

**CONDICIÓN III-**Volumen de muestra: 250  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor: 1,50 m; flujo: 0,40  $\text{mLmin}^{-1}$ .

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.

Condición 2: aumento flujo

Condición 3: aumento volumen de la muestra.

En el caso 2 es donde obtengo la señal con mayor altura, menor tiempo de arranque y menor ancho de pico, debido a que al aumentar el flujo disminuye la difusión y por ende la dispersión. Por otro lado, descartamos la muestra 3 por que al tener mayor volumen de muestra, si bien esto disminuye la dispersión, aumenta el ancho de la señal (Al aumentar el volumen aumenta la señal, pero también lo hace el ancho de pico. A mayor volumen de

muestra tendremos menor dispersión y mayor señal, pero debido al ensanchamiento de picos la señal analítica será peor). Mientras que en la muestra 1 hay menor flujo y la señal no será tan ideal como en la muestra 3.

a) Señale las diferencias fundamentales entre análisis por inyección en flujo segmentado (SFA) y análisis por inyección en flujo continuo (FIA).

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

c) Dada la siguiente información sobre experimentos realizados mediante FIA:

**Experimento I:** Volumen de muestra de 75  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor de 1,50 m para dos flujos: 0,40  $\text{mL min}^{-1}$  y 3,00  $\text{mL min}^{-1}$ .

**Experimento II:** Volumen de muestra de 75  $\mu\text{L}$ , flujo de 3,00  $\text{mL min}^{-1}$  para dos longitudes de reactor: 0,45 m y 1,80 m.

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

i) La mejor señal FIA; ii) El menor tiempo de arranque.

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

i) La menor dispersión; ii) El menor tiempo de retorno; iii) La mayor velocidad de muestreo. (Número de muestras medidas por unidad de tiempo).

	FIA flujo no segmentado	SFA flujo segmentado
Introducción de muestra	inserción	aspiración
volumen de muestra	menores	mayores
tiempo	menores	mayores
diámetro de tubo	menor	mayor
detección	dispersión controlada	en equilibrio
capacidad	mayor	menor
precisión	igual	igual
gasto de reactivo	poco	mucho
ciclo de lavado	no importante	importante
datos suministrados	altura, ancho y área de pico	altura

También es importante lo de equilibrio vs método cinético!! En el análisis por flujo segmentado debemos alcanzar siempre una señal máxima, que se mide en condiciones de equilibrio. En cambio, FIA es un método cinético de análisis, no se debe esperar que se alcance el equilibrio, sino que se puede medir en cualquier punto de la señal que hipotéticamente obtendríamos de la señal máxima.

- a) La dispersión es la medida en la que se diluye la muestra en el portador, la misma depende del volumen de la muestra, la longitud del reactor y del flujo.
- b) Con respecto al experimento I para obtener la mejor señal FIA y el menor tiempo de arranque utilizará un flujo a 3 mL/min ya que la muestra llegara al detector más rápido, no tendrá tiempo para dispersarse, el pico será menos ancho y la señal será más legible.

Con respecto al experimento II utiliza una longitud del reactor de 0,45 m para así obtener una menor dispersión, un menor tiempo de retorno y una mayor velocidad de muestreo debido a que el bolo de la muestra recorrerá una menor distancia haciendo que la misma no se diluya tanto en el reactor, por otro lado, el pico correspondiente a la muestra le llevará menos tiempo volver a la línea de base gracias a que alta velocidad.

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

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 columna

Inserción de muestra

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

d) Dados los siguientes datos:

I-Volumen de muestra de 100  $\mu\text{L}$ , longitud de reactor de 1,50m 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 y ii) la 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 m y 1,50 m. Indique J.S.R. con cuál de los dos reactores se obtendrán i) la señal con mayor tiempo de retorno y ii) la menor dispersión.

a) Los requisitos que debe reunir el elemento de propulsión en un sistema FIA son:

- No debe presentar pulsaciones (Para que haya menos ruido en la señal)
- Debe presentar reproducibilidad (Que se pueda volver a lograr esa propulsión)

El más frecuentemente usado en la bomba peristáltica, que presenta facilidad en la puesta en marcha, bajos costos, versatilidad, aunque tiene flujo pulsante. Pero los demás métodos como el de gravedad o presión gaseosa han caído en desuso.

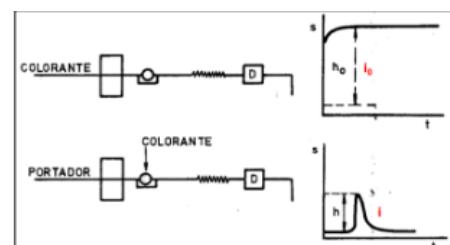
b) Ambos métodos presentan similitudes tanto en el uso de pequeños volúmenes de muestra, del flujo no segmentado y variable además de que ambas muestras se introducen mediante inserción. La mayor diferencia es que en el HPLC la columna es siempre necesaria, mientras que en FIA puede ser optativa.

Cuadro comparativo:

	FIA	HPLC
Volumen de muestra	Pequeños	Pequeños
Flujo	No segmentado, variable	No segmentado, variable
Uso de columna	No esencial	Esencial
Inserción de la muestra	Inserción	Inserción

c) i) Cuando se inserta en un sistema FIA empleando la metodología de inserción de muestra habitual: se observa un claro pico fácil de analizar, una respuesta eficiente.

ii) Cuando el colorante se introduce en el sistema FIA de manera continua: se observa una altura inicial muy alta, no se observan picos, solo un salto que se mantiene constante (no baja), no es eficiente para analizar la respuesta.



d)

I-

- i) El mayor tiempo de arranque lo tendrá el menor flujo (0,50 mL/min), ya que el tiempo de arranque es inversamente proporcional al flujo, cuando menor sea el flujo mayor será el tiempo

de arranque debido la muestra tardará más en llegar al detector.

ii) La menor dispersión la tendrá el mayor flujo (3,00 ml/min) debido a que la muestra llegará más rápido al detector por lo que no tendrá tiempo de dispersarse. La dispersión también es inversamente proporcional al flujo, mientras más grande sea el flujo menor será la dispersión.

II-

i) El reactor con mayor tiempo de retorno será el de 1,50m debido a que el tiempo que pasa la muestra es proporcional a la longitud del reactor, por lo que mientras más largo sea, más tiempo pasará hasta que la muestra llegue al detector y mayor será su dispersión y por ende el tiempo de retorno.

ii) El reactor con la menor dispersión será el más corto, 0,30m, debido a que si la muestra pasa menos tiempo en el reactor se dispersará menos, y la longitud del reactor es proporcional al tiempo, por lo que mientras más corto sea el reactor, menor será el tiempo y menor la dispersión.

## AUTOMATIZACIÓN

*RECOMENDACION: lea cuidadosamente el enunciado antes de responder.*

**Pregunta N° 5: 10 puntos**

- 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.

a) SISTEMAS AUTOMÁTICOS: se combinan las máquinas y aparatos (mecanización) con la instrumentación (censado) y una computadora. Solo constan de trabajo y sensado. Etapas: trabajo (maquinaria y aparatos) + sensado (instrumentación)

SISTEMAS AUTOMATIZADOS: requieren de un sistema de mecanización formado por máquinas y aparatos (bombas, válvulas, etc.), además de instrumentos, una computadora que participa con un sistema de feedback (toma de decisiones, inteligencia). Se emulan las condiciones que posee un operador humano en un determinado análisis. Etapas: trabajo + sensado + inteligencia (feedback)

Si se introduce una muestra cuya concentración cae fuera del rango lineal, en un sistema automático, el operador tiene que decidir diluir la solución. En cambio, en un sistema automatizado, el sistema de feedback decide efectuar la dilución y volver a introducir la muestra en el aparato, esto emula la inteligencia del operador.

Similitudes: ambas involucran el reemplazo total o parcial de la participación humana en una o más operaciones medidas.



Diferencias: sistema automático solo utiliza una combinación de mecanización e instrumentación para lograr el objetivo, no permite controlar el proceso sin la presencia de una persona. El sistema automatizado adquiere inteligencia a partir de toma de decisiones de la computadora (feedback) que sí le permite controlar el proceso sin necesitar personal. Difieren en las etapas que involucran cada una ya que automatizado tiene una etapa más.

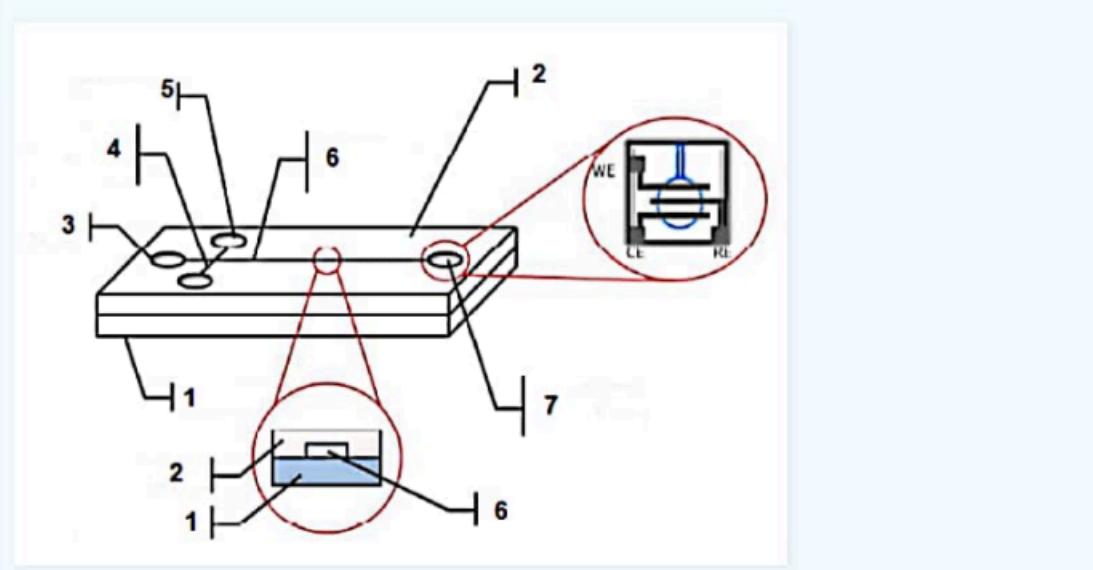
**La diferencia básica entre un proceso automático y uno automatizado radica en el reemplazo o no de la inteligencia humana en la toma de decisiones.**

**SISTEMAS AUTOMÁTICOS = MECANIZACIÓN + INSTRUMENTACIÓN**

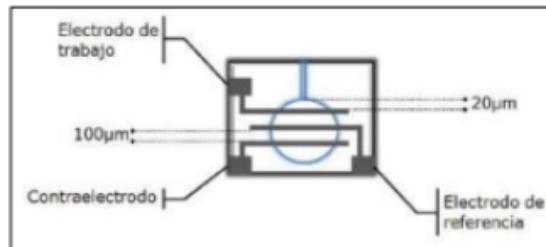
**SISTEMAS AUTOMATIZADOS = MECANIZACIÓN + INSTRUMENTACIÓN + FEEDBACK**

- b) El sistema de electroforesis capilar tiene integrado una celda electroquímica miniaturizada que contiene tres electrodos (referencia, trabajo, contraelectrodo) que conforman la etapa de detección y transducción de señal, un sistema en donde está incluido el buffer y un sistema de capilar y junta por donde pasa la muestra.  
Ventajas: Bajo volumen de muestra ( $\mu\text{L}$ ), Análisis rápido (min), Alta eficiencia, Bajo costo, Portabilidad (se pueden llevar a detección de campo), Baja participación humana

I) 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.



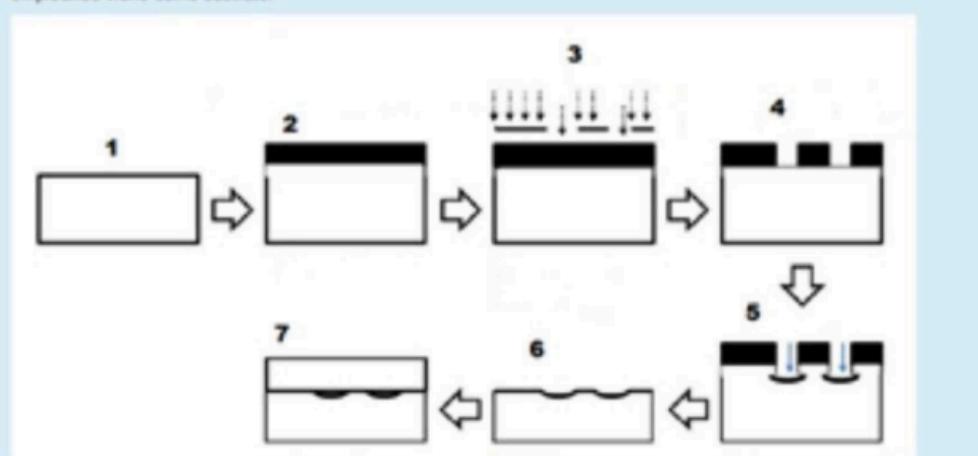
1. Vidrio
2. Resina SU-8
3. Buffer
4. Canal de inyección
5. Muestra
6. Canal de separación
7. Celda de detección



Es un microsistema con un sistema de detección electroquímico: En el capilar se genera una celda electroquímica, con sus electrodos de referencia, de trabajo y el contraelectrodo. Se pueden utilizar sistemas de electrodos microfabricados (muy pequeños), que

poseen los 3 electrodos impresos, por donde va a incidir la muestra para efectuar la determinación.

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



#### Proceso de microfabricaciòn

1. Se utilizan sustratos como silicios o vidrios para la mircofabricaciòn
2. Se aplica una capa fotorresistente, que puede ser un polímero, sobre la superficie del sustrato.
3. Se coloca una máscara en la superficie de ese polímero. Esta máscara permite ocultar las zonas que se requieren que no desaparezcan, se hace incidir luz UV que degrada en las zonas expuestas el polímero, generando canales.
4. Se retira lo que ha sido hidrolizado formando patrones o moldes para fabricar los canales del microchip
5. Estos canales de reacción van a ser erosionados a través de etching o de erosión de ese sustrato empleando por ejemplo HF.
6. Se remueve la película del polímero
7. Se aplica una capa que cierra esos canales (proceso de bonding). Esos canales están generados en el sustrato y están ocluidos por esta capa superior.

#### INDIQUE Y EXPLIQUE BREVEMENTE 4 VENTAJAS FUNDAMENTALES DE LOS SISTEMAS MINIATURIZADOS AUTOMATIZADOS

- Bajo volumen de muestra, reactivos y solventes ( $\mu\text{L}$ ), lo cual también disminuye en gran medida los costos, aumenta la eficiencia del proceso y disminuye los residuos generados.
- Portabilidad, se pueden llevar a detección de campo obteniendo resultados más representativos.
- Baja participación humana, lo cual reduce el error humano y minimiza los riesgos de errores en medición y de incidentes con los operadores.
- Análisis rápido, disminuyen los tiempos de trabajo a minutos aumentando la eficiencia, la productividad y el número de muestras analizadas.

## **INMUNOENSAYOS**

REVISADO

**Pregunta N° 6: 20 puntos**

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.

a) ¿Qué tipo de ELISA cree usted que corresponde al test para la determinación del antígeno viral p24? Justifique su respuesta.

b) Esquematicamente describa cada uno de los pasos del mismo, indicando los reactivos que necesita para realizar el ensayo.

c) ¿Cómo determinaría la concentración del antígeno p24 en la muestra de un paciente?

d) ¿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.

- a) ELISA sandwich corresponde al test ya que debemos determinar el antígeno viral p24, y este método sirve para determinar y cuantificar antígenos específicos para un anticuerpo.
- b) 1. Inmovilizar el Ac específico para el Ag a p24 en la placa, se incuba y se lava.  
2. Agregar proteína inerte para tapar sitios libres y evitar falso +. Incubo y lavo.  
3. Colocar la muestra a estudiar, incubar para dar lugar a la reacción y lavar.  
4. Paralelamente, se agregan en pocillos diferentes la muestra con distintas concentraciones conocidas del Ag. Incubo y lavo.  
5. Agregar un 2do Ac marcado con una enzima, el cual reconocerá al Ag en cuestión en un epítope distinto. Se incuba para permitir la interacción y luego se lava.  
6. Agregar sustrato de enzima (peroxidasa + h<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) junto con un cromógeno, el cual cambiara de color siendo proporcional a la cantidad del Ag en la muestra.
- c) Para determinar la concentración del antígeno, se realiza una curva de calibración de Abs vs C de antígeno p24 con las muestras que realice en el punto b)4-  
A partir de la ecuación de la recta obtenida reemplazo la absorbancia de mi muestra y despejo X. Esta será la concentración de mi muestra (sin aplicar factores de dilución).
- d) En caso de no tener en el laboratorio cromógenos o espectrofotómetro, puedo realizar una medición electroquímica.  
Para esto necesito de un electrodo de trabajo (pasta de C), un electrodo auxiliar (alambre de Pt) y un electrodo de referencia (Ag+/AgCl/Cl- 3M). En el electrodo de trabajo se debe inmovilizar los anticuerpos anti p24, luego colocarlo en la solución problema y aplicar un potencial previamente seleccionado. La respuesta a esta perturbación es un voltamperograma de corriente vs potencial, el cual me dará un pico cuya área será proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra

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 parenteral, 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 antigeno 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 periodo 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 el 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 las hepatitis agudas y crónicas, el control de portadores en bancos de sangre y unidades de diálisis, de transplantados y 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.

- a) Emplearía un ELISA sandwich, debido a que mi objetivo es evidenciar la presencia de un antígeno, el HBsAg. El ELISA indirecto no se puede utilizar porque reconoce anticuerpos, no antígenos.
- b)
  1. Inmovilizar el anticuerpo específico para el antígeno que quiero reconocer.
  2. Tapo los sitios libres para evitar un falso positivo en el test.
  3. Introduzco mi muestra de interés, por ejemplo, una muestra de sangre, para ver si tiene el antígeno. Y en paralelo en pocillos diferentes pongo concentraciones conocidas del Ag.
  4. Incubo para que se produzca la reacción y lavo el antígeno que no se unió a los Ac inmovilizados.
  5. Inserto el tercer componente: Ac que reconoce otra epítope del antígeno marcado con una enzima.
  6. Incubo para que reaccione y lavo el Ac marcado excedente.
  7. Pongo el sustrato de la enzima para evidenciar la reacción (peroxidasa + h202). Si un cromóforo de la enzima cambia de color quiere decir que el antígeno de interés está presente: el Ac marcado se une a una epítope del Ag y el Ac inmovilizado se une a otra epítope diferente, por eso se le dice “sandwich”.

El Chagas es una enfermedad olvidada asociada a condiciones de extrema pobreza, causada por el parásito *Trypanosoma 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.

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

- a) Emplearía un ELISA indirecto, ya que como en la fase crónica no es posible detectar al parásito (antígeno), se busca detectar la enfermedad por medio de la respuesta inmune que genera el sujeto: los anticuerpos. Este tipo de ELISA se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos.
- b)
  1. inmovilizar el antígeno específico de el anticuerpo que quiero detectar en la placa, se incuba y se lava.
  2. agrego proteína inerte para tapar sitios libres y evitar un falso +
  3. coloca la muestra con mi anticuerpo
  4. incubo para que ocurra la reacción y lavo
  5. coloco el tercer componente, que es un anticuerpo marcado con una enzima, y que reconoce al anticuerpo que yo quiero identificar
  6. incubo para que ocurra la reacción y lavo para que se desprenda el anticuerpo marcado que no reaccionó
  7. agrego el sustrato de la enzima y un cromógeno que cambia de color. Si hay un cambio se color, por un cromóforo de la enzima, quiere decir que la reacción ocurrió y que el anticuerpo que yo quiero identificar está presente. El cambio de color es proporcional a la cantidad de Ac específico.

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 las 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.

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

- a) Utilizaría un ELISA indirecto ya que debemos confirmar la especificidad de los anticuerpos presentes en muestras de pacientes con *Brucella spp*.
- b) Pasos de ELISA indirecto:

- 1- Colocar el Antígeno específico para el Anticuerpo en la placa, incubar y lavar.
- 2- Tapar espacios libres con proteína inerte para evitar un falso positivo.
- 3- Agregar muestra. Se incuba para que ocurra la reacción y se lava.

4- Agregar un segundo Ac marcado con una enzima que reconoce al primer Ac. Se incuba y se lava.

5- Se grega sustrato de enzima peroxidasa ( $H_2O_2$ ) + Cromogeno, el cual cambiara de color y sera proporcional a la cantidad del Ac especifico de interes, esto nos permitira cuantificarlo.

Esta técnica no es cuantitativa, como mucho se la puede volver semi cuantitativa realizando diluciones del suero. (por esto creo que capaz utilizará un elisa sandwich que si es cuantitativo)

*Pregunta Nro. 11*

*Recuerde antes de comenzar a resolver el problema.*

a) Marque la opción correcta:

I- Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales:

- A. Pueden proveer especificidad y sensibilidad para medir los analitos
- B. Son inmunoglobulinas
- C. Se unen al antígeno a través de la región de unión Fab
- D. Todas las opciones anteriores

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

Verdadero

Falso

III- ¿Qué técnica de inmunoensayo 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

b-Enumere tres clases de marcadores usados en las técnicas de inmunoensayo:

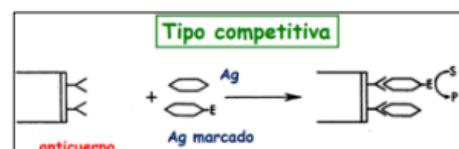
1. \_\_\_\_\_  
2. \_\_\_\_\_  
3. \_\_\_\_\_

- a) i. la correcta es la D, todas son correctas  
ii. Falso, ya que los anticuerpos monoclonales reconocen un epítope particular.



El electrodo está modificado con el anticuerpo primario/sonda de captura, en presencia del antígeno, se forma el complejo antígeno-anticuerpo. Se agrega un segundo anticuerpo (secundario), marcado con una enzima, el cual también se une al antígeno, quedando este entre medio de los anticuerpos primarios y secundarios.

Cuando se agregue sustrato de la enzima, se va a poder determinar electroquímicamente el producto de la reacción enzimática, el cual será proporcional a la concentración del antígeno. Estos son biosensores de respuesta binaria, y también permiten cuantificar.



En el medio va a estar presente el antígeno y el antígeno marcado, de forma que habrá una competencia por los anticuerpos que están en la superficie del electrodo. Por lo tanto la respuesta no será máxima porque estarán inmovilizados ambos sobre el electrodo. Mientras más cantidad de antígeno haya, menor será la respuesta.

(esto igual es de inmunosensores)

Según chat gpt:

Inmunoensayo de un paso: Todos los reactivos necesarios (anticuerpos y analito) se mezclan simultáneamente en un solo paso. La reacción ocurre de manera conjunta, lo que simplifica el proceso y reduce el tiempo total del ensayo.

Ventajas: Más rápido y conveniente debido a la simplicidad del procedimiento. Menor manipulación y menor riesgo de errores técnicos.

Desventajas: Menor sensibilidad y especificidad comparado con los inmunoensayos de dos pasos, debido a la competencia simultánea por la unión al analito. Mayor riesgo de interferencias y reacciones no específicas.

Inmunoensayo de dos pasos: En el primer paso, el analito es capturado por un anticuerpo (anticuerpo de captura) que está inmovilizado en una superficie sólida. Después de lavar para eliminar cualquier material no unido, se añade un segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) en el segundo paso, que se une específicamente al analito ya capturado.

Ventajas: Mayor sensibilidad y especificidad, ya que los anticuerpos tienen más oportunidad de unirse específicamente al analito en cada paso. Reducción significativa de interferencias y uniones no específicas, ya que el lavado entre pasos elimina componentes no deseados.

Desventajas: Procedimiento más largo y más complejo. Mayor manipulación y potencial para errores técnicos.

Segun chat gpt: La técnica de inmunoensayo que proporciona la mayor sensibilidad y especificidad es el inmunoensayo no competitivo (sandwich) de dos pasos.

Sensibilidad: En el inmunoensayo no competitivo de dos pasos, el analito es capturado por un primer anticuerpo (anticuerpo de captura) unido a una superficie sólida en el primer paso. En el segundo paso, un segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) que reconoce un epítopo diferente del analito se añade, lo que mejora la detección del analito. Esta técnica permite la acumulación de más señal por cada molécula de analito, aumentando así la sensibilidad del ensayo.

Especificidad: La utilización de dos anticuerpos diferentes que reconocen epítopenos distintos del mismo analito mejora la especificidad, ya que ambos anticuerpos deben unirse al analito para que se genere una señal. Esto reduce la probabilidad de resultados falsos positivos causados por la unión no específica de anticuerpos.

- b) - Enzimas como la peroxidasa y un cromógeno que cambia de color
- Fluorocromos (moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y luego retornan a su estado basal de energía emitiendo fotones a una longitud de onda mayor). Ejemplos: fluoresceína, rodamina, etc
- Según chat gpt también se pueden usar marcadores metálicos (como partículas de oro coloidal), quimioluminiscentes (como luminol), radiactivos (como isótopos radiactivos).

**1 Pregunta Nro. 10:**

a) Marque la opción incorrecta y JSR:

- A. Los anticuerpos monoclonales pueden proveer especificidad y sensibilidad en el desarrollo de inmunosensores.
- B. La técnica de inmunodifusión bidimensional simple es cuantitativa.
- C. Los anticuerpos se unen al antígeno a través de la región Fc. → a través del epítope
- D. Las interacciones de afinidad antígeno-anticuerpo son reversibles y no modifican al antígeno.

b) Marque con una con una X la opción correcta:

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

JSR.

Verdadero      Falso ✓

- a) C. opción incorrecta. Los anticuerpos se unen al antígeno por medio de la región Fab, que es una zona de alta variabilidad con capacidad de reconocimiento.
- b) Falsa, un anticuerpo monoclonal es producido por clones de un mismo linfocito b por lo que reconoce y se une a un único epítope del antígeno.

**I-** Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de determinados órganos o tejidos del organismo. El enzima-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. ¿Cómo llevaría a cabo un ensayo cuantitativo para Lupus eritematoso sistémico en la muestra de un paciente? Describa cada uno de los pasos de este, indicando 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.

- a) con elisa indirecto
- b) Pasos de elisa indirecto y al final agregar curva de calibración porque nos pide que sea un ensayo cuantitativo.

#### 1- COMPLETE EL SIGUIENTE PÁRRFO INDICANDO LA/S PALABRA/S QUE CORRESPONDE/N EN CADA CASO (1,2 Y 3)

Los ensayos de *inmunoblotting* 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) .....

- 1) Electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo a su PM/ gel por su peso molecular
- 2) la cantidad relativa y el peso molecular
- 3) un anticuerpo primario específico para el antígeno de interés, y un anticuerpo secundario marcado con una enzima que reconozca al anticuerpo primario.

## ULTRACENTRIFUGACIÓN

b) Indique si las siguientes afirmaciones en relación con la Ultra centrifugación Analítica son verdaderas o falsas y justifique cada una de sus respuestas.

**Nota:** Sin la justificación correspondiente las respuestas Verdadero/Falso no serán tenidas en cuenta para su evaluación.

i) 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.

Activar Windows

ii) En la centrifugación isopícnica es posible separar organelas subcelulares según su velocidad de sedimentación.

i) Falsa. En los **rotores de ángulo fijo** los tubos se insertan en orificios en el interior de rotores macizos con un cierto ángulo fijo. El caso extremo es el de los rotores verticales en los que el tubo se sitúa en paralelo al eje de giro.

En los **rotores basculantes** los tubos se colocan en un dispositivo tipo cestilla que, al girar el rotor, se coloca en disposición perpendicular al eje de giro. Así, los tubos giran siempre situados perpendicularmente al eje del giro (horizontalmente).

ii) Falso. En la centrifugación isopícnica las separaciones se hacen por equilibrio de sedimentación. En la centrifugación zonal, las separaciones se hacen según la velocidad de sedimentación.

**II) INDIQUE SI LAS SIGUIENTES AFIRMACIONES SON VERDADERAS O FALSAS Y JUSTIFIQUE CADA UNA DE SUS RESPUESTAS**

**NOTA:** Sin la justificación correspondiente las respuestas Verdadero o Falso no serán consideradas para su evaluación.

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.

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.

a) Falso, en el caso del rotor basculante, las partículas tienen una mayor distancia de viaje, lo que permite una mejor separación. Como el pellet se ubica en el fondo del tubo, resulta muy fácil quitar el sobrenadante. En cambio, en el rotor de ángulo fijo la sedimentación de partículas en este caso tiene una corta distancia de viaje hasta formar el pellet (que se acumula en el fondo y en la pared del tubo).

b) Falso. Un protocolo o método bien redactado deberá indicar que al momento de usar una centrífuga debe hacerlo usando fuerza g (fuerza centrífuga relativa) en lugar de las rpm porque el tamaño de los rotores será diferente dependiendo la marca y por lo tanto la fuerza g será diferente. Si no se manejan adecuadamente estas unidades al momento de centrifugar las células en cultivo

morirán por el exceso de velocidad aplicada o porque no fue eliminada la reacción bioquímica (usada en el cultivo) al momento de los lavados usando la centrífuga.

c) Explique brevemente el fundamento de la centrifugación isopícnica. De un ejemplo de aplicación y justifique.

- c) Centrifugación isopícnica: se basa en la separación de acuerdo a las diferentes posiciones de equilibrio de la muestra, se genera un gradiente de densidad, en donde, luego de la centrifugación, los diferentes componentes de analito se posicionan en donde su densidad es igual a la del gradiente. Se basa en la separación de muestras de PM similares pero densidades diferentes. Esta a menudo se emplea en laboratorios para separar el ADN celular y permitir la manipulación y su posterior estudio.

Según chat gpt: en biología molecular, esta técnica se usa para separar ADN plasmídico de ADN genómico.

Un ejemplo de aplicación típica de la centrifugación zonal es la separación de orgánulos celulares como mitocondrias, lisosomas, etc en una muestra de homogenizado de células. Las partículas en la muestra migran a través del gradiente a diferentes velocidades según su tamaño y masa. Las partículas más grandes y pesadas se moverán más rápido hacia la parte inferior del tubo, mientras que las más pequeñas y ligeras quedarán más cerca de la parte superior.

La centrifugación diferencial es una técnica de separación que se basa en las diferencias en el tamaño y densidad de las partículas en una muestra. A diferencia de las técnicas basadas en gradientes de densidad, la centrifugación diferencial implica la aplicación de diferentes velocidades y tiempos de centrifugación para separar las partículas en diferentes fracciones.