Programa de TÉCNICAS ANALITICAS INSTRUMENTALES

Carrera:*Licenciatura en Biotecnología*

Asignatura:*Técnicas Analíticas Instrumentales*

Núcleo al que pertenece:*Obligatorio(Ciclo Inicial)*

Profesores:*Alejandro Eugenio Ferrari; Caballero, Gerardo Manuel*

Correlatividades previas:*Química Orgánica I*

Objetivos: Comprender los principios de la Química Analítica Instrumental, con sus fundamentos teóricos, sus aplicaciones y la interpretación de los resultados de un análisis químico.La primera parte del curso se enfocará especialmente las técnicas espectrofotométricas aplicadas al análisis cuantitativo (ultravioleta-visible, absorción atómica) como en aquellas con aplicación cualitativa para caracterización o identificación de moléculas orgánicas (espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa). En la segunda parte se estudiarán los métodos cromatográficos de alto rendimiento (CG, HPLC).
Se espera que la/os estudiantes sean capaces de interpretar correctamente los resultados de un análisis químico, no aprender solo a “tocar botones de un equipo” sino aprender que significa, desde el punto de vista práctico y aplicado, un cierto dato analítico. Esta será la principal diferencia entre un técnico y un profesional de la química analítica.

Contenidos mínimos:
Métodos de análisis cualitativos y cuantitativos. Métodos espectroscópicos: UV-Visible, Fluorescencia, Infrarrojo, RMN, espectrometría de masa. Determinación de estructuras con métodos instrumentales. Métodos separativos: cromatografía de gases y de líquidos, métodos acoplados cromatografía-masa, electroforesis capilar. Métodos electroquímicos. Potenciometría. Absorción atómica. ICP-Masa. Introducción a la quimiometría. Validación e interpretación estadística de los resultados. Aseguramiento de la calidad analítica.

Carga horaria semanal:6 horas

Programa analítico:

<u>Primera parte:</u> El problema de la determinación estructural de las moléculas aisladas

Capítulo 1: Introducción a la espectroscopía

Interacción de la radiación electromagnética con la materia. Interpretación clásica y cuántica. Espectros de absorción y de emisión. Transiciones espectroscópicas. Métodos cualitativos y cuantitativos.

Lectura recomendada: (3)

Capítulo 2: Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)

Fundamentos teóricos del proceso de absorción. Características de los espectros de las sustancias orgánicas. Instrumentación: fuentes de radiación, selectores de longitud de onda, detectores: fototubos y arreglo de diodos. Colorímetros, fotómetros y espectrofotómetros. Aplicaciones cualitativas, interpretación de espectros. Aplicaciones cuantitativas, ley de Lambert-Beer.

Trabajo Práctico N° 1: Espectroscopía UV-VIS (obtención de espectros UV de compuestos orgánicos; obtención de espectros de absorción visible de especies inorgánicas; cuantificación mediante la ley de Lambert-Beer; análisis de un protector solar)

Lectura introductoria: (C2)

Lectura recomendada: (3)

Capítulo 3: Espectroscopía de fluorescencia.

Fluorescencia molecular: fundamentos, estados electrónicos singulete y triplete. Diagramas de Jablonski de sistemas fotoluminiscentes. Rendimiento cuántico. Variables que afectan la fluorescencia. Aplicaciones cuantitativas. Instrumentación: fluorómetros y espectrofluorómetros. Supresión ("quenching") de la fluorescencia. Fluorescencia de proteínas.

Trabajo Práctico N° 2: Espectroscopía de Fluorescencia (familiarización con espectrofluorómetros, construcción de curvas de calibración).

Lectura recomendada: (3)

Capítulo 4: Espectroscopía infrarroja (IR)

Fundamentos teóricos: vibraciones y rotaciones moleculares. Modelo del oscilador armónico simple. Tratamiento cuántico de las vibraciones. Modos de vibración: tensiones y flexiones. Bandas características de los principales grupos funcionales. Regiones del espectro infrarrojo. Interpretación de espectros. Instrumentación: sistemas clásicos y FTIR, modalidades de preparación de muestras. Aplicaciones cuali-cuantitativas.

Lectura introductoria: (1,2,C3,C7)

Lectura recomendada: (3,4)

Capítulo 5: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Principios de la resonancia magnética nuclear: momento angular y espín nuclear. Descripción clásica del fenómeno. Transformación de Fourier. Desplazamientos químicos: apantallamiento nuclear. Acoplamiento espín-espín: modelos de multipletes, núcleos equivalentes: equivalencia química y magnética. Tiempos de relajación. Instrumentación.

^{1}H-RMN: Relación entre el desplazamiento químico y la estructura molecular. Acoplamientos espín-espín de primer orden. Constantes de acoplamiento. Integración de las señales. Interpretación de espectros.

^{13}C-RMN: el problema de la sensibilidad nuclear. Rango de desplazamientos químicos. Espectros desacoplados. Interpretación de espectros. Secuencias especiales: DEPT.

Lectura introductoria: (1,2,C4,C7,C8)

Lectura recomendada: (3,5,6)

Capítulo 6: Espectrometría de Masa (EM)

Fundamentos del fenómeno de ionización y de las fragmentaciones iónicas. El espectrómetro: sus componentes. Sistemas de vacío: bombas mecánicas, difusoras y turbomoleculares. Métodos de ionización: Ionización electrónica (EI), ionización química (CI), ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI). Su aplicación para distinto tipo de moléculas.

Analizadores: cuadrupolos, trampa de iones, sector magnético y eléctrico, tiempo de vuelo (TOF). Detectores: multiplicadores de electrones de dínodos discretos y continuos, placa multicanal (MCP).

Fragmentaciones características de los grupos funcionales más importantes: alcanos, compuestos halogenados, alcoholes, éteres, aminas, aldehídos y cetonas, ácidos y derivados. Conceptos de ion molecular, pico base y abundancia iónica relativa. Interpretación de espectros.

Lectura introductoria: (1,2,3,C7)

Lectura recomendada: (7,8,14)

<u>Segunda parte:</u> El problema de la determinación cualitativa y cuantitativa de analitos en matrices complejas

Capítulo 7: Estadística, Aseguramiento de la Calidad y Métodos de Calibración

Distribuciones gaussianas. Intervalos de confianza. Comparación de promedios con el test*t* de Student. Comparación de desviaciones estándar con el test*F*. Método de los cuadrados mínimos. Curvas de calibración. Conceptos básicos de aseguramiento de la calidad. Validación de métodos. Cuantificación por adición de estándar. Cuantificación con estándar interno. Eficiencia en el diseño experimental.

Lectura recomendada: (14, 3)

Capítulo 8: Potenciometría.

Celda electroquímica. Ecuación de Nernst. Electrodos de referencia. Electrodos indicadores: electrodos metálicos, electrodos de membrana. Funcionamiento del pH-metro. Electrodos de vidrio selectivos para otros cationes. Métodos cuantitativos.

Lectura recomendada: (3)

Capítulo 9: Espectroscopía de absorción atómica

Fundamentos de la absorción atómica. Niveles energéticos. Componentes de los instrumentos: fuente de cátodo hueco, atomizador de llama de flujo turbulento, atomizador de horno electrotérmico. Interferencias químicas y

espectrales. Supresión de la ionización. Fuente de ICP. Acoplamiento ICP-Masa. Aplicación a la detección de metales en matrices complejas.
Lectura recomendada: (3, 14)

Capítulo 10: Introducción a la Cromatografía

Principios básicos: fase móvil y estacionaria. Cociente de distribución. Factor de retención, factor de selectividad. Cromatograma: tiempo de retención y tiempo muerto. Teoría del ensanchamiento de bandas: ecuación de Van Deemter. Selectividad. Resolución. El problema general de la elución. Forma de los picos cromatográficos. Factor de asimetría.
Lectura recomendada: (3, 14)

Capítulo 11: Métodos separativos: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Principios. Parámetros cromatográficos: solvente de elución, tiempo de retención, resolución, flujo óptimo. Modos de operación: cromatografía de adsorción (fase normal), cromatografía de fase reversa (RPC), cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC). Tipos de columnas y solventes de elución para cada caso. Columnas monolíticas. Columnas de núcleo sólido. Aplicación a distintos tipos de moléculas. Instrumentación: inyectores, bombas, desgasificadores, detectores UV-VIS, de fluorescencia, de dispersión de la luz evaporativo (ELSD). Introducción a la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC). Métodos cuali-cuantitativos.

Trabajo Práctico N° 3: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (familiarización con un equipo de HPLC, separación de mezclas, cambio de variables cromatográficas, análisis de datos)

Lectura introductoria: (3)
Lectura recomendada: (9, 14)

Capítulo 12: Métodos separativos: Cromatografía gaseosa (CG)

Principios. Gas de transporte, tipos de columnas (capilares y orificio ancho). Instrumentación: inyectores (inyección “Split”, “Splitless”, “Head Space”), horno, detectores: detector de ionización de llama (FID), detector de

captura electrónica (ECD), detector selectivo para nitrógeno y fósforo (NPD), detector de conductividad térmica (TCD), detector UV-Vis. Cromatografía bidimensional (GCxGC). Métodos cuali-cuantitativos.

Lectura introductoria: (3)

Lectura recomendada: (10, 14)

Capítulo 13: Métodos separativos: Electroforesis capilar

Fundamentos de las separaciones electroforéticas. Movilidad electroforética. Flujo electroosmótico. Modos de inyección. Instrumentación. Electroforesis capilar de zona (CZE), isoelectroenfoque capilar (CIEF), electroforesis capilar en gel, cromatografía micelar electrocinética. Ejemplos de aplicación.

Lectura recomendada: (3, 14)

Capítulo 14: Métodos separativos acoplados: LC-MS y GC-MS

GC-MS: Instrumentación: interfases. Analizadores cuadrupolares, barridos completos (“scan”) y monitoreo selectivo de iones (SIM). Trampa de iones y TOF. Aplicaciones. Determinación de relación isotópica (IRMS).

LC-MS: Interfases de ionización a presión atmosférica: Electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI). Analizadores de masa: triple cuadrupolos. Modos de operación de triple cuadrupolos: iones producto, iones precursores, pérdidas neutras, monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Trampas de iones lineales, Orbitrap. Equipos híbridos: Q-TOF, LIT-TOF, Q-LIT-Orbitrap. Aplicaciones: determinación del peso molecular de biomoléculas, secuencia de biomoléculas; determinación de trazas de contaminantes en alimentos.

Trabajo Práctico N° 4: Exposición de “Papers” (presentación oral grupal, mediante Powerpoint, de unos 20 minutos por grupo de un trabajo científico reciente de temática relacionada al contenido de esta unidad).

Lectura recomendada: (11, 12, 13, 14)

Bibliografía *(obligatoria y de consulta):*

Bibliografía principal:

(1) QuímicaOrgánica. John McMurry. Editorial Cengage Learning. 7ma. edición **2008.**

(2) Química Orgánica. Francis Carey. Mc Graw Hill Ed. Sexta Edición. **2006.**

(3) Principios de Análisis Instrumental. D.A. Skoog, F.J. Holler y S.R. Crouch. 6ta. Edición, **2008**

(4) Espectroscopía infrarroja. Jesús Rubio. Serie de Química Orgánica, monografía n° 12. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Segunda Edición. **1981.**

(5) Spectrometric Identification of Organic Compounds. R.M. Silverstein, F.X. Webster. John Wiley and Sons Inc. SixthEdition. **1998.**

(6) Resonancia Magnética Nuclear. P.J.Hore. Editorial Eudeba. Primera Edición. **2000**

(7) Introducción a la Espectrometría de Masa de sustancias orgánicas. O.R. Gottlieb, R.B. Filho, F. AragaoCraveiro, J. W. Alencar. Serie de Química, monografía n° 17. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Segunda Edición. **1983.**

(8) Interpretación de Espectros de Masas. F. W. McLafferty. Editorial Reverté.

(9) Practical HPLC Methodology and Applications. B.A. Bidlingmeyer. John Wiley and Sons Inc. **1992.**

(10) Modern Practice of Gas Chromatography. R.L. Grob (Ed.) John Wiley and Sons Inc. ThirdEdition. **1995.**

(11) A Global View of LC/MS. R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich. Global View Publishing. **1998.**

(12) Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Robert Ardrey. Wiley. **2003**

(13) Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. F. Kitson, B. Larsen, C. McEwen, Academic Press, **1996**

(14) Quantitative Chemical Analysis; Daniel Harris; Ed. W.H. Freeman; Seventh Edition, **2010**

Bibliografía de consulta:

(1) Química Orgánica. Morrison y Boyd. Pearson Education. **1998.**

(2) http://www.chemistry.ccsu.edu/glagovich/teaching/316/uvvis/uvvis.html

(3) http://www.organicworldwide.net/infrared.html

(4) http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.html

(5) Pesticide Analytical Manual. Volume 1. Chapter 5, 6. Federal DrugAdministration (accesible en forma gratutita en http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html)

(6) HPLC for Food Analysis. A primer. A. Gratzfeld-Hüsgen, R. Schister. Hewlett-Packard Company 1996 (accesible en forma gratuita en http://www.chem.agilent.com)

(7) Experimental Organic Chemistry. Daniel Palleros. John Wiley &Sons. **2000**

(8) The Basics of NMR, J. P. Hornak
http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/bnmr.htm

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

Organización de las clases: El curso consta de clases teóricas y clases prácticas, estas últimas incluyen seminarios de discusión de problemas y también trabajos prácticos de laboratorio.

Modalidad de evaluación:

1. La materia consta de 6 horas semanales las cuales incluyen clases teóricas y prácticas, estas últimas constan de seminarios de discusión de problemas y trabajos prácticos de laboratorio.
2. Los trabajos prácticos de laboratorio deben ser aprobados en su totalidad al finalizar el cuatrimestre, lo cual incluye el correcto desarrollo del trabajo práctico (alcanzando los resultados esperados) y la presentación y aprobación del informe correspondiente.
3. Las clases de seminarios de problemas consistirán en una breve explicación introductoria por parte del docente y la posterior discusión de los temas propuestos en la guía de estudio entre alumnos y docentes.

4. Se rendirán dos exámenes parciales teórico-prácticos que serán calificados sobre 10 puntos cada uno. Cada parcial se aprueba con 4 puntos y tendrá un solo recuperatorio por parcial.
5. Si un alumno desaprueba el recuperatorio de cualquiera de los 2 parciales, haya estado ausente o desaprobado en la primera fecha, pierde el curso con calificación final *Desaprobado*. Si un/a estudiante desaprueba la primera fecha de cualquiera de los 2 parciales y resulta ausente en el correspondiente recuperatorio, figurará como AUSENTE en el curso. Si algún informe resultó desaprobado, el estudiante pierde el curso con nota final *Desaprobado*.

Condiciones para <u>aprobar</u> el curso:

1) Acreditar un presentismo mínimo del 75% de todas las clases (teóricas y prácticas)
2) Concurrir al 100% de los trabajos prácticos de laboratorio y aprobar todos los informes de los mismos.
3) Aprobar con nota mínima de 4 (cuatro) puntos los 2 exámenes parciales, en cualquiera de las 2 fechas de cada uno. Además de obtener 4 puntos como nota final, los alumnos deberán haber respondido correctamente un mínimo de 40% de cada uno de los temas en que se divide la materia. Si uno de los temas no está aprobado, aunque la nota final sea superior a 4, deberá recuperarse ese módulo.
4) Aprobar con nota mínima de 4 (cuatro) puntos un examen integrador en cualquiera de las 2 fechas disponibles: una al final del cuatrimestre en curso y otra al comienzo del cuatrimestre siguiente.
5) La nota final del curso será la obtenida en el examen integrador.

Condiciones para <u>promocionar</u> el curso:

1) Acreditar un presentismo mínimo del 75% de todas las clases (teóricas y prácticas).
2) Concurrir al 100% de los trabajos prácticos de laboratorio y aprobar todos los informes de los mismos.
3) Obtener una nota promedio mínima de 7 (siete) puntos entre los 2 exámenes parciales.
4) Si un alumno está ausente o desaprobado en la primera fecha de parcial y aprueba en el recuperatorio, la nota que se computará para la promoción será la nota del recuperatorio.
5) Los alumnos que hayan aprobado un parcial en primera fecha no podrán presentarse a rendir el recuperatorio para intentar mejorar la nota.
6) Si se cumplen todas las condiciones anteriores, el alumno promociona el curso y no debe rendir examen integrador.
7) La nota final se computará como el promedio obtenido entre los 2 parciales.

8) Si algún informe resultó desaprobado, el alumno pierde el curso con nota final *desaprobado*

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad, requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

(a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.

(b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los alumnos que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el docente administrará en un lapso que no superará el cierre de actas del siguiente cuatrimestre. El Departamento respectivo designará a un profesor del área, quien integrará con el profesor a cargo del curso, la mesa evaluadora de este nuevo examen integrador.

Modalidad de evaluación exámenes libres:

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas y problemas de aplicación.

Trabajo Práctico Nº1: Espectroscopia UV-Visible

OBJETIVOS

- Conocer el manejo del Espectrófotómetro UV-Vis.
- Obtener y analizar el espectro UV-Vis de distintos compuestos.

PARTE 1: Obtención del espectro de absorción UV de compuestos orgánicos (benceno, antraceno, anilina, fenol, tolueno, naftaleno).

Las bandas de absorción en las regiones Ultravioleta y Visible que presentan los compuestos orgánicos se asocian con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Los electrones involucrados en dichas transiciones corresponden a aquellos más débilmente atraídos por el conjunto de núcleos atómicos que componen la molécula, y cuyos estados pueden ser descriptos a través de orbitales moleculares que se expresan como combinaciones lineales de orbitales atómicos de la capa de valencia. Por otra parte, las transiciones electrónicas que involucran a los electrones de las capas internas son muy energéticas y se presentan en la región de los rayos X del espectro electromagnético. Nuestro análisis se reducirá a las transiciones electrónicas en la capa de valencia. La clasificación convencional de los orbitales moleculares en la capa de valencia de los compuestos orgánicos son:

Orbitales σ y σ*. Orbitales moleculares localizados a lo largo del eje de unión de los átomos. Los orbitales σ generan una densidad electrónica elevada en la región internuclear, teniendo un carácter fuertemente enlazante. Los orbitales σ*, como todos los orbitales antienlazantes, presentan un plano nodal perpendicular al eje del enlace en la región internuclear y tienen un acentuado carácter antienlazante.

Orbitales π y π*. Estos orbitales se emplean en la descripción de los enlaces múltiples. Las regiones de mayor densidad electrónica correspondiente a los mismos son aquellas colaterales al eje del enlace. El carácter enlazante o antienlazante de estos orbitales es menos acentuado que el de los orbitales σ

Orbitales n. Tienen un acentuado carácter local y describen pares electrónicos libres asociados con heteroátomos (O, S, N, Hal). Energéticamente tienen carácter no-enlazante.

Las transiciones electrónicas posibles dentro de la capa de valencia son:

Transiciones s-s*. Se presentan en todos los compuestos orgánicos. Son en general de gran energía (UV de vacío) e intensidad.

Transiciones s-π* y π-s*. Son posibles solo en compuestos insaturados. Son transiciones de baja intensidad (regiones de definición de los orbitales involucrados diferentes) en el UV lejano. Carecen de interés práctico.

Transiciones n-s*. Se presentan en compuestos con heteroátomos (O, N, S, Hal), generalmente en la región cercana a los 200 nm. La intensidad es variable dependiendo de la naturaleza del orbital n.

Transiciones π-π*. Presentes solo en compuestos insaturados. En ausencia de conjugación estas transiciones se presentan en UV de vacío. Dan lugar a bandas intensas que pueden aparecer en UV cercano si está presente insaturación conjugada.

Transiciones n-π*. Presentes en compuestos insaturados con heteroátomos (grupos carbonilo, nitro, azo, tiocarbonilo). Dan lugar a bandas débiles usualmente en la región UV cercana (baja energía de transición).

Resulta conveniente definir algunos términos usuales en espectroscopia UV-Vis que tienen en parte origen en antiguas teorías sobre el origen del color de las sustancias.

Grupo cromóforo: grupo covalente insaturado que origina bandas de absorción electrónicas (π-π*). Ejemplos: grupos vinilo, carbonilo, fenilo y nitro.

Grupo auxócromo: grupo saturado (generalmente con pares electrónicos libres) que unido a un cromóforo altera tanto la posición como la intensidad de la banda de absorción de éste. Ejemplos: grupos –OH, -NHB 2B, -Cl, -Br y -CHB3
Efectos batocrómico e hipsocrómico: desplazamientos del máximo de absorción de una banda a mayores o menores longitudes de onda respectivamente, debido a la introducción de un sustituyente, cambio de solvente o pH o cualquier otra causa.
Efectos hipercrómico e hipocrómico: incremento o decremento de la intensidad de una banda de absorción debido a la introducción de un sustituyente, cambio de solvente o pH o cualquier otra causa.

Procedimiento

1. Obtener el espectro de absorbancia del etanol absoluto en la región 210-400 nm. En este solvente se encuentran los compuestos a estudiar, por lo tanto es el blanco y lo obtenido se restará a los espectros siguientes. Utilizar cubetas de cuarzo.
2. Obtener el espectro de los compuestos orgánicos y marcar los picos de máxima absorción. **Análisis de datos**

-Comparar los espectros y analizar el efecto de los distintos grupos funcionales presentes en cada molécula sobre los picos observados ·
-Analizar la potencialidad de esta técnica en la elucidación de estructuras y naturaleza de compuestos.

PARTE 2: Caracterización de espectros de absorción

2.a. Obtención del espectro de absorción Visible de iones inorgánicos

Los metales de transición presentes como iones inorgánicos en solución acuosa suelen estar en forma de iones complejos del tipo M(H2O)x+n, los cuales son coloreados y absorben en la región Visible.

Procedimiento

Obtener el espectro de las soluciones de iones inorgánicos en el rango 380 – 900 nm. Las soluciones fueron preparadas en agua destilada. Las cubetas a utilizar deben ser de vidrio o plástico.

Análisis de datos

· Observar el aspecto de las bandas de absorción (forma y ancho) y marcar los picos de máxima absorción.
·Conociendo la concentración de las soluciones y utilizando la ley de Lambert-Beer, determinar el coeficiente de extinción molar de cada compuesto para las longitudes de onda de los máximos de absorción.
· Correlacionar la posición de los picos de máxima absorción con el color que presenta cada solución.

9.1 Correlation between Wavelength of Absorbed Radiation and Observed Color

Absorbed light		Observed (transmitted) color
Wavelength [nm]	Corresponding color	
400	violet	yellow-green
425	indigo blue	yellow
450	blue	orange
490	blue-green	red
510	green	purple
530	yellow-green	violet
550	yellow	indigo blue
590	orange	blue
640	red	blue-green
730	purple	green

2.b. Determinación de la concentración mediante la aditividad de la absorbancia

La absorbancia total de una solución con varios compuestos, a una determinada longitud de onda, se puede expresar como la suma de las absorbancias de los distintos componentes a esa misma longitud de onda (suponiendo que no exista interacción entre las distintas especies).

$$A_{total} = A_1 + A_2 + ... + A_n = e_1 bc_1 + e_2 bc_2 + ... + e_n bc_n$$

Procedimiento

Realizar mezclas en distintas proporciones de las soluciones utilizadas en "2.a." y obtener los espectros en el rango 380 – 900 nm.

Análisis de datos

A partir de los espectros de las mezclas y de las soluciones puras, elegir dos longitudes de onda para determinar matemáticamente la composición de la mezcla (concentración de cada componente).

PARTE 3: ¿Qué es el factor de protección solar (FPS) en un bronceador?

Los filtros solares y bronceadores son preparados químicos que bloquean parcial o totalmente las radiaciones solares. El factor de protección solar (FPS) es un número que indica cuál es el múltiplo de tiempo al que se puede exponer la piel protegida para llegar al mismo efecto que se obtendría si no se hubiese aplicado el producto (quemadura de la piel).

Los tres tipos de radiaciones ultravioleta provenientes del sol son los rayos:

UV-C: 100-280 nm. Son los de mayor energía y más peligrosos para la salud. Sin embargo, son absorbidos por la capa de ozono y no alcanzan la superficie terrestre.

UV-B: 280-315 nm. Son de energía intermedia y penetran a nivel epidérmico, siendo los principales causantes de cáncer cutáneo. El 90 % es absorbido por la capa de ozono.

UV-A: 315-400 nm. Son los de menor energía, llegan a niveles profundos de la dermis y producen bronceado y envejecimiento prematuro. Son los menos afectados por la capa de ozono.

Procedimiento

1. Pesar una pequeña porción de bronceador, agregar 1 ml de isopropanol y agitar bien hasta disolverlo.
2. Calentar en un baño a 45–50ºC durante 1 min para lograr la completa disolución. Centrifugar.
3. Diluir la solución resultante con isopropanol y obtener el espectro de absorción UV (290-390 nm) utilizando cubetas de cuarzo, e isopropanol en la cubeta de referencia.

Análisis de datos

· Observar el espectro obtenido y concluir la efectividad del protector solar. ¿Cómo funcionan los filtros solares de bronceadores? ¿Qué características deben tener las móleculas que los componen?

Trabajo Práctico Nº2 : Espectroscopia de Fluorescencia

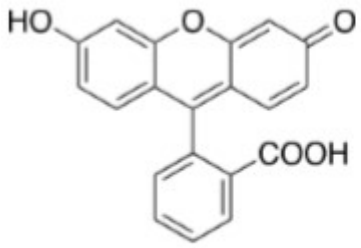
OBJETIVOS

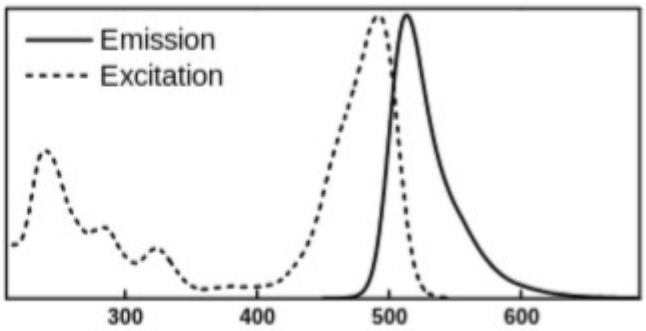
- Conocer el manejo del espectrofotómetro Nanodrop 1000 y del fluorespectómetro Nanodrop 3300 (ThermoScientific).
- Elaborar curvas de calibración de espectrometría UV-Vis y de fluorescencia.

INTRODUCCIÓN

La fluoresceína es una sustancia orgánica hidrosoluble perteneciente al grupo de las

xantinas de peso molecular 332,306 g/mol. En soluciones alcalinas (pH ≥ 7) produce un color fluorescente verde intenso. La fluoresceína absorbe ciertas longitudes de onda y emite luz fluorescente de longitudes de onda más largas. Por ejemplo, la fluoresceína en solución 0,1 M buffer Tris pH 8.0 posee λex = 490 nm y λem = 515 nm. Sin embargo, hay que tener en cuanto que existen factores que afectan la fluorescencia como la concentración de la sustancia, el pH de la solución, longitud de onda de la luz excitante y la presencia de otras sustancias.





La fluoresceína posee diversas aplicaciones. Por ejemplo, es utilizada en oftalmología para evaluar los vasos sanguíneos en el ojo y la integridad de la superficie cornea, en
odontología para detectar placa bacteriana y en geología para seguir la pista de aguas que desaparecen bajo tierra y vuelven a aparecer a una cierta distancia. Además, esta sustancia se utiliza en algunas técnicas de laboratorio clínico que comprenden ensayos de inmunofluorescencia o ELISA (del inglés Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay) en los cuales los anticuerpos se encuentran conjugados con fluoresceína.

PRODECIMIENTO

Curva de calibración

1. Realizar los cálculos para preparar una solución madre de fluoresceína 0,1M en PBS.
2. Preparar 10 diluciones seriadas 1/5 en PBS. Volumen final 500 µl.
3. Llevar a cabo un barrido de emisión de la fluoresceína en el rango de 400-750 nm de modo de corroborar la longitud de onda a la cual se produce la mayor intensidad de fluorescencia.
4. Luego determinar el RFU (del inglés RelativeFluorescenceUnits) de los distintos patrones en la longitud de onda seleccionada. Llevar a cabo las mediciones en orden creciente de concentración.
5. Medir una muestra de fluoresceína de concentración desconocida.
6. Obtener el espectro de absorbancia de la fluoresceína en el rango de 220-750 nm, y determinar la longitud de onda máxima.
7. Medir las absorbancias para cada solución.
8. Medir una muestra de fluoresceína de concentración desconocida.

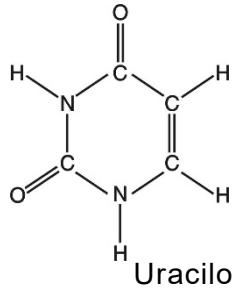
ANÁLISIS DE DATOS

- Construir dos curvas de calibración con los datos obtenidos. Un gráfico de RFU (λ) vs concentración de fluoresceína, y otro de Absorbancia (λ) vs concentración de fluoresceína. - Obtener la ecuación de cada una de las líneas de tendencia y el valor de R2.
- Calcular la concentración de la muestra incógnita.

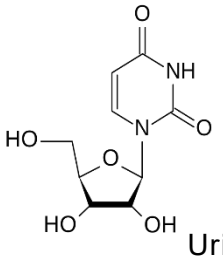
Trabajo Práctico Nº3: Fundamentos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

OBJETIVO

Separar una mezcla de Uridina (nucleosido) y Uracilo (base); evaluar cómo optimizar los resultados del cromatograma modificando variables como la velocidad de flujo y los porcentajes de distintos solventes.



Uracilo

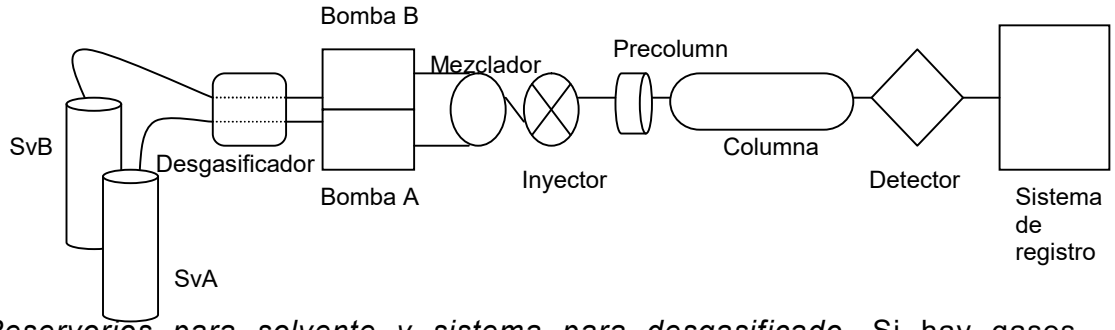


Uridina

INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta presión (*High Performance/PressureLiquidChromatography*: HPLC) se realiza con partículas de tamaño pequeño (5-10 µm), lo que aumenta la superficie de contacto entre la fase móvil y la fase estacionaria; el aumento de equilibrios entre ambas fases incrementa la capacidad de resolver muestras complejas.

Instrumentación



i) Reservorios para solvente y sistema para desgasificado. Si hay gases disueltos en la fase móvil, como oxígeno y nitrógeno, se forman burbujas en la columna y en el sistema de detección causando el ensanchamiento de los picos. Por ello, se desgasifican los solventes haciéndolos pasar por un tubo capilar permeable a los gases que esté conectado a un sistema de vacío. Si el HPLC no contara con esta opción, es posible desgasificar los solventes agitándolos cuidadosamente mientras están conectados a una bomba de vacío.

ii) Bombas. La presión de salida de estas bombas va desde 70 kg/cm2 - 420 kg/cm2. En general la presión máxima de trabajo está dada por la máxima presión que la fase estacionaria de la columna puede soportar sin modificar sus condiciones de empaquetamiento.

iii) Sistemas de inyección. Los inyectores incorporan la muestra de interés al equipo para que la misma sea movilizada por la fase móvil a la precolumna, columna y finalmente al detector. Los inyectores pueden ser manuales o automáticos. Los volúmenes de inyección pueden variar entre 2-100 ul para sistemas analíticos.

iv) Precolumna y Columna. La precolumna evita la contaminación de la columna ya que funciona como un filtro de retención de material particulado. Luego en la columna ocurre la separación de la muestra. Las longitudes habituales de las mismas van desde 5 a 45cm y su diámetro varía entre 2-5 mm.
Los tipos de columnas más utilizados son:
-fase normal (fase estacionaria polar) por ej $(SiO_2)_n$, Al_2O_3, etc...
-fase reversa (fase estacionaria no polar) por ej C8, C18.
-intercambio iónico.
-exclusión molecular.
-interacción hidrofílica.
v) Detectores. Los detectores más habituales son: 1) absorción UV-Vis, 2) índice de refracción, 3) fluorescencia, 4) conductimetría, 5) dispersión de la luz evaporativo (ELSD) y 6) espectrometría de masas.

PROCEDIMIENTO

Materiales.
-Equipo HPLC Gilson 321/322 de inyección automática acoplado a detector Gilson
-ColumnaLichroCART ® Purospher STAR RP-18 endcapped (5 µm), pH: 1,5 – 10,5
-Solventes grado HPLC: Metanol y Agua desionizada y filtrada
-Muestra: Uridina/ Uracilo
Condiciones de corrida.
a) 95:5 Agua:Metanol a flujo 0,7 ml/min. Ura 1mM ó Uri 1mM.
b) 90:10 Agua:Metanol a flujo 0,7 ml/min. Ura 1mM ó Uri 1mM.
c) 85:15 Agua:Metanol a flujo 0,7 ml/min. Ura 1mM ó Uri 1mM.
c) 85:15 Agua:Metanol a flujo 0,7 ml/min. Ura 0.5mM + Uri 0.5mM.
d) 85:15 Agua:Metanol a flujo 0,5 ml/min. Ura 0.5mM + Uri 0.5mM.
Metodología.
1. Colocar en la gradilla de inyección un vial con 150 ul de una solución 1mM según corresponda
2. Inyectar las muestras
3. Llevar a cabo la elución en condiciones isocráticas según flujo correspondiente
4. Obtener los cromatogramas de cada inyección

ANÁLISIS DE DATOS

- Determinar las condiciones óptimas de corrida para cada sistema.
- Describir detalladamente la influencia de cada variable ensayada.
- Indicar como podría optimizar aún más la resolución de los sistemas descriptos.
- ¿Cuál es el principio de las columnas de afinidad?

Trabajo Práctico Nº4: Exposición de "*Papers*".

OBJETIVO

-Adquirir experiencia en la interpretación de manuscritos científicos en idioma inglés.
-Adquirir experiencia en la exposición oral ante pares.

Los "*papers*" de temáticas relacionadas a la unidad 14 del programa analítico son seleccionados por el docente entre la literatura científica de los últimos 5

años. Luego la/os alumna/os eligen los mismos según interés propio acorde a la carrera en curso.

CRONOGRAMA TENTATIVO

Semana	Tema/unidad	Actividad				Evaluación
		Teórico	Práctico			
			Res Prob.	Lab.	Otros Especificar	
1	Presentación; Unidad 1: Introducción a la espectroscopía; Unidad 2: espectroscopía UV-Vis	x				
2	Unidad 2: espectroscopía UV-Vis	x	x			
3	Trabajo práctico N°1: espectroscopía UV-Vis; Unidad 3: espectroscopía de fluorescencia	x	x	X		
4	Unidad 4: espectroscopía IR	x	X			
5	Unidad 4: espectroscopía IR; Unidad 5: espectroscopía RMN	x	x			
6	Trabajo práctico N°2: espectroscopía de fluorescencia; Unidad 5: espectroscopía RMN	x	x	X		
7	Unidad 5: espectroscopía RMN; Unidad 6: Espectrometría de masa	x	x			
8	Unidad 6: espectrometría de masa	X				
9	Primer parcial; Unidad 7: Estadística y Validación de métodos.		x		Evaluación	X
10	Unidad 7: Estadística y Validación de métodos; Unidad 8: Potenciometría	x	x			
11	Unidad 9: Absorción atómica; Unidad 10: Introducción a la cromatografía	x	x			
12	Unidad 11: HPLC	x	x			
13	Unidad 12: cromatografía de gases	x	x			
14	Trabajo práctico N°3: HPLC; Unidad 13: electroforesis capilar	x	x	x		
15	Unidad 14: Métodos acoplados, GC-masa, LC-masa	x	x			
16	Segundo parcial; Presentación de “papers”				Evaluación	X
17	Recuperatorios				Evaluación	X
18	Examen integrador				Evaluación	X