

## PROGRAMA DE TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES

**Carrera:** Diplomatura en ciencia y tecnología

**Asignatura:** Técnicas Analíticas Instrumentales

**Docentes:** Ferrari, Alejandro Eugenio; Caballero, Gerardo Manuel; Abdusetir, Juan; Martínez, Carolina.

### Objetivos:

Se espera que quienes cursen la asignatura:

- aprendan el funcionamiento, con fundamentos teóricos, de instrumentos de mediciones químicas analíticas, identificando la función de cada uno de sus componentes,
  - comprendan la importancia de la obtención e interpretación de los datos generados por un espectrofotómetro o un cromatógrafo,
  - desarrollen habilidades para interpretar la información analítica obtenida con un cierto instrumento analítico, según los objetivos del análisis químico,
  - reconozcan las aplicaciones y limitaciones de cada método analítico para poder tomar decisiones sobre la mejor técnica a elegir,
  - aprendan a manejar las herramientas estadísticas necesarias para determinar parámetros quimiométricos que reflejen la calidad de los datos obtenidos.
-

## **Contenidos mínimos**

Métodos espectroscópicos, cromatográficos, electroquímicos, radioquímicos y electroforéticos. Introducción a la quimiometría. Determinación de estructuras con métodos instrumentales.

**Carga horaria:** 6 horas semanales

## **Programa analítico**

### **Unidad 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.

### **Unidad 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.

### **Unidad 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.

### **Unidad 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.

### **Unidad 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.

$^1\text{H}$ -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.

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

### **Unidad 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.

### **Unidad 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.

### **Unidad 8: Potenciometría.**

Celda electroquímica. Ecuación de Nernst. Electrodo de referencia. Electrodo indicadores: electrodo metálico, electrodo de membrana. Funcionamiento del pH-metro. Electrodo de vidrio selectivos para otros cationes. Métodos cuantitativos.

### **Unidad 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.

### **Unidad 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.

### **Unidad 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: inyector, 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.

## **Unidad 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.

## **Unidad 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.

## **Unidad 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.

### Trabajos prácticos experimentales

#### **Trabajo Práctico N°1: Espectroscopía UV-Visible**

Objetivos: Conocer el manejo del Espectrófotómetro UV-Vis. Obtener y analizar el espectro UV-Vis de compuestos orgánicos e inorgánicos.

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

Actividades: Obtener el espectro de absorbancia del etanol absoluto en la región 210-400 nm. Obtener el espectro de los compuestos orgánicos (en etanol absoluto) y marcar los picos de máxima absorción. 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.

Actividades: Obtener el espectro de soluciones acuosas de iones inorgánicos en el rango 380 – 900 nm. Observar el aspecto de las bandas de absorción y marcar los picos de máxima absorción. 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.

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

Actividades: Realizar mezclas en distintas proporciones de las soluciones de iones utilizadas en 2.a. Obtener los espectros en el rango 380 – 900 nm. A partir de los espectros de las mezclas y de las soluciones puras, elegir dos longitudes de onda para determinar matemáticamente la concentración de cada componente de la mezcla.

### *Parte 3: Análisis de un protector solar. Determinación del factor de protección solar (FPS).*

Actividades: Obtener el espectro de absorción UV (290-390 nm) de una solución de un bronceador en isopropanol. Analizar la efectividad del protector solar.

## **Trabajo práctico N°2: 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.

Actividades: Preparar diluciones seriadas de solución de fluoresceína 0,1M en PBS para realizar una curva de calibración. Llevar a cabo un barrido de emisión de la fluoresceína en el rango de 400-750 nm, corroborar la longitud de onda a la cual se produce la mayor intensidad de fluorescencia. Determinar el RFU (Relative Fluorescence Units) de los distintos patrones en la longitud de onda

seleccionada. Obtener el espectro de absorbancia de la fluoresceína en el rango de 220-750 nm, y determinar la longitud de onda máxima. Medir las absorbancias para cada solución. Medir una muestra de fluoresceína de concentración desconocida.

Construir dos curvas de calibración con los datos obtenidos. Un gráfico de RFU ( $\lambda$ ) vs concentración de fluoresceína, y otro de Absorbancia ( $\lambda$ ) vs concentración de fluoresceína. Obtener la ecuación de cada una de las líneas de tendencia y el valor de R<sup>2</sup>. Calcular la concentración de una muestra incógnita.

### **Trabajo Práctico N°3: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Objetivo: familiarización con un equipo de HPLC. Separar una mezcla de Uridina (nucleósido) y Uracilo (base); evaluar cómo optimizar los resultados del cromatograma modificando variables como la velocidad de flujo y los porcentajes de distintos solventes.

Actividades: Realizar la elución de una muestra de Uridina/ Uracilo en condiciones isocráticas utilizando un equipo HPLC Gilson 321/322 de inyección automática acoplado a detector Gilson, columna LichroCART® Purospher STAR RP-18 endcapped (5  $\mu$ m), pH: 1,5 – 10,5; solventes grado HPLC: Metanol y Agua desionizada y filtrada. Determinar las condiciones óptimas de corrida para cada sistema. Describir la influencia de cada variable ensayada. Indicar cómo podría optimizar aún más la resolución de los sistemas descriptos.

### **Trabajo Práctico N°4: Exposición de “Papers”**

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

Actividad: presentación oral grupal, mediante Powerpoint, de unos 20 minutos por grupo de un trabajo científico reciente de temática relacionada al contenido de la unidad 14 del programa analítico.

### **Bibliografía**

#### Bibliografía obligatoria

- Química Orgánica. John McMurry. Editorial Cengage Learning. 7ma. edición. 2008.
- Química Orgánica. Francis Carey. Mc Graw Hill Ed. Sexta Edición, 2006.

- Principios de Análisis Instrumental. D.A. Skoog, F.J. Holler y S.R. Crouch. 6ta. Edición. 2008
- 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.
- Spectrometric Identification of Organic Compounds. R.M. Silverstein, F.X. Webster. John Wiley and Sons Inc. Sixth Edition. 1998.
- Resonancia Magnética Nuclear. P.J.Hore. Editorial Eudeba. Primera Edición. 2000
- Introducción a la Espectrometría de Masa de sustancias orgánicas. O.R. Gottlieb, R.B. Filho, F. Aragao Craveiro, J. W. Alencar. Serie de Química, monografía n° 17. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Segunda Edición. 1983.
- Interpretación de Espectros de Masas. F. W. McLafferty. Editorial Reverté.
- Practical HPLC Methodology and Applications. B.A. Bidlingmeyer. John Wiley and Sons Inc. 1992.
- Modern Practice of Gas Chromatography. R.L. Grob (Ed.) John Wiley and Sons Inc. Third Edition. 1995.
- A Global View of LC/MS. R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich. Global View Publishing. 1998.
- Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Robert Ardrey. Wiley. 2003
- Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. F. Kitson, B. Larsen, C. McEwen, Academic Press, 1996
- Quantitative Chemical Analysis; Daniel Harris; Ed. W.H. Freeman; Seventh Edition, 2010.

#### Bibliografía de consulta

- Química Orgánica. Morrison y Boyd. Pearson Education. 1998.
- <http://www.chemistry.ccsu.edu/glagovich/teaching/316/uvvis/uvvis.html>
- <http://www.organicworldwide.net/infrared.html>
- <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.html>



- Pesticide Analytical Manual. Volume 1. Chapter 5, 6. Federal Drug Administration (accesible en forma gratuita en <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>)
- 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>)
- Experimental Organic Chemistry. Daniel Palleros. John Wiley & Sons. 2000
- 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.

Los trabajos prácticos de laboratorio deben ser aprobados en su totalidad al finalizar el cuatrimestre, lo cual incluye el correcto desarrollo de los mismos y la presentación y aprobación del informe correspondiente.

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 estudiantes y docentes.

### **Modalidad de evaluación**

La modalidad de evaluación y aprobación será según el Régimen de estudios vigente (Res. CS 201/18).

### Modalidad regular

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.

Si se desapueba el recuperatorio de cualquiera de los 2 parciales, se pierde el curso con calificación final Desaprobado. Si se desapueba 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 resultara desaprobado, el estudiante pierde el curso con nota final *Desaprobado*.

#### Condiciones para aprobar el curso

Acreditar un presentismo mínimo del 75% de todas las clases (teóricas y prácticas).

Concurrir al 100% de los trabajos prácticos de laboratorio y aprobar todos los informes de los mismos.

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, se deben responder 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.

Aprobar con nota mínima de 4 (cuatro) puntos un examen integrador en cualquiera de las fechas disponibles según calendario académico y régimen de estudios vigente.

La calificación final del curso será la obtenida en el examen integrador.

#### Condiciones para promocionar el curso

Acreditar un presentismo mínimo del 75% de todas las clases (teóricas y prácticas).

Concurrir al 100% de los trabajos prácticos de laboratorio y aprobar todos los informes de los mismos.

Obtener una nota promedio mínima de 7 (siete) puntos entre los 2 exámenes parciales.

Si se desapueba en la primera fecha de parcial y se aprueba en el recuperatorio, la nota que se computará para la promoción será la nota del recuperatorio.

Si se aprueba un parcial en primera fecha no se podrá presentar a rendir el recuperatorio para intentar mejorar la nota.

Si se cumplen todas las condiciones anteriores, se promociona el curso y no debe rendir examen integrador.

La calificación final se computará como el promedio obtenido entre los 2 parciales.

Si algún informe resultó desaprobado, se pierde el curso con nota final *desaprobado*

#### Modalidad libre

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, laboratorios y problemas de aplicación.

### 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	<b>Primer parcial</b> Unidad 7: Estadística y Validación de métodos.		x			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	<b>Segundo parcial</b> Presentación de "papers"					X
17	<b>Recuperatorios de parcial</b>					X
18	<b>Examen integrador</b>					X