

Libros de **Cátedra**

Métodos instrumentales básicos para muestras agroforestales

Fundamentos y procedimientos para el análisis
de muestras en el laboratorio

Lorenza Costa, Paula I. Villabrille y Vanesa Y. Ixtaina
(coordinadoras)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES


EduLP
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

MÉTODOS INSTRUMENTALES BÁSICOS PARA MUESTRAS AGROFORESTALES

FUNDAMENTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS
DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Lorenza Costa
Paula I. Villabrille
Vanessa Y. Ixtaina
(coordinadoras)

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata por darnos la posibilidad de generar nuestro Libro de Cátedra a través de su Editorial.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, nuestro lugar de trabajo como docentes, que nos enfrenta al continuo desafío de relacionar las ciencias básicas con el contexto agroforestal y gracias a ello enriquecernos.

A los estudiantes, quienes dan sentido a nuestro trabajo diario, nos incentivan y motivan a la búsqueda permanente de estrategias para un aprendizaje significativo.

A la Prof. Elisa Miceli quien, desde su aprecio por nuestra tarea, escribió el Prólogo de este libro.

A los docentes que formaron parte del grupo de trabajo de Análisis Químico en etapas anteriores, quienes de diferentes maneras han dejado su huella.

A Hilda Castagnasso, quien con su calidez humana y con su ejemplo motivó a muchos de nosotros para seguir este camino.

A cada una de nuestras familias por inculcarnos el valor de la educación como condición necesaria para transformarnos y poder elegir nuestro camino profesional.

Índice

Agradecimientos	3
Introducción	5
Prólogo	8
Capítulo 1	
Métodos analíticos instrumentales para laboratorios agroforestales	9
<i>Paula I. Villabrille y Lorenza Costa</i>	
Capítulo 2	
Métodos basados en la interacción del analito con la luz	19
<i>Agustina Buet, Nadia S. Rolny y Paula I. Villabrille</i>	
Capítulo 3	
Métodos cromatográficos	54
<i>Lorenza Costa, Luciana M. Julio y Vanesa Y. Ixtaina</i>	
Capítulo 4	
Electroforesis	79
<i>Lorenza Costa</i>	
Capítulo 5	
Métodos para analizar ácidos nucleicos	98
<i>Mariela P. Bayardo y Alejandra Bárcena</i>	
Las autoras	116

Introducción

En la actividad agronómica y forestal es importante conocer las características fisicoquímicas de los distintos componentes del agroecosistema a fin de realizar una utilización eficiente de los recursos de manera sustentable. Tanto en la actividad primaria como en la transformación de las materias primas es necesario conocer los componentes presentes en los productos naturales y/o sintéticos, ya sea para su aprovechamiento y comercialización, para cumplir la legislación vigente o para dar respuestas en muchos campos de la investigación.

La mayoría de los autores de este libro contamos con varios años de experiencia como docentes de Análisis Químico en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP. Se trata de una materia de segundo año, para un universo de estudiantes que, en general, a esa altura de la carrera, no imaginan que un Ingeniero Agrónomo o Forestal es un profesional habilitado para realizar análisis químicos. En este sentido, los docentes apreciamos un mayor entusiasmo e interés por parte de los estudiantes al contextualizar y encontrar la aplicación de lo estudiado tanto en lo referido a la profesión como en diferentes temas de actualidad.

El *Análisis Químico* comprende el conjunto de técnicas que se emplean para determinar la composición de una muestra. Este análisis puede ser cualitativo, cuando el objetivo es indicar la presencia o ausencia de un componente en la muestra sin determinar la cantidad, o cuantitativo, cuando determinamos la cantidad del componente presente en la muestra. La sociedad recurre a los análisis químicos para resolver problemáticas de diversos sectores, muchos de ellos vinculados a actividades agropecuarias y forestales. Mencionamos algunos ejemplos:

- Procesos agroindustriales (industrias lácteas y de la fermentación, producción de aceites, industrias de la madera, producción de agroquímicos, etc.): los análisis químicos son necesarios durante la producción, para el control de calidad desde la materia prima hasta el producto final, para realizar el control del proceso y para el control de vertidos y emisiones generados.

- Agricultura, silvicultura y ganadería: los análisis químicos se requieren para el control y dosificación de fertilizantes y fitosanitarios, la detección de tóxicos en suelos, la realización de diagnósticos de carencias nutricionales y la detección de enfermedades, la caracterización de diferentes cultivos y el análisis de su comportamiento frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, el análisis de la calidad nutricional de los granos y forrajes, el análisis de la calidad de la semilla, etc.

- Protección del medio ambiente: los análisis químicos permiten determinar la calidad de aguas, suelos y aire. Permiten controlar los contaminantes vertidos en diversas producciones,

entre las que podemos mencionar criaderos de cerdos y aves, producción intensiva de ganado bovino (*feedlots*), etc.

El libro que hemos escrito tiene como finalidad destacar el trabajo de laboratorio como una herramienta necesaria en el campo agronómico y forestal. En cada capítulo planteamos conceptos básicos de los métodos instrumentales de la disciplina Química Analítica y aplicaciones concretas para el estudio de muestras de origen vegetal, fertilizantes, productos agroindustriales, entre otros. Nuestra intención es que el libro proporcione un adecuado balance entre los contenidos teóricos que subyacen en cada método instrumental y la propuesta de actividades experimentales concretas para llevar a cabo en un laboratorio básico de análisis químico.

El conocimiento de las bases teóricas permitirá diseñar actividades similares en cada laboratorio en función de su demanda o bien permitirá encontrar estrategias adecuadas para solucionar problemas que puedan surgir en una determinación analítica. Las experiencias detalladas en cada capítulo podrán aplicarse directamente o adaptarse a las posibilidades y necesidades de cada usuario. Así, se pretende brindar conceptos que permitan comprender el fundamento de los métodos instrumentales de uso corriente y presentar casos de estudio que sean de utilidad como puntapié inicial para transferir los procedimientos a nuevos contextos. En cada uno de los ejemplos de aplicación, se incluye la preparación de las muestras, las cuestiones específicas del método, la interpretación de resultados y las medidas de seguridad relacionadas con los reactivos y/o equipamiento utilizados.

Los contenidos están organizados en cinco capítulos. En el Capítulo 1 se exponen conceptos generales del trabajo en el laboratorio y de los métodos instrumentales de análisis químico. Los Capítulos 2 a 5, abordan sucesivamente los fundamentos y procedimientos de cada método instrumental en particular. El Capítulo 2 desarrolla los métodos basados en la interacción de la luz con el componente que queremos cuantificar, incluyendo la espectrofotometría de absorción molecular y atómica, la espectrofotometría de emisión atómica y métodos no espectrofotométricos de dispersión. El Capítulo 3 aborda los métodos de cromatografía plana y en columna, incluyendo una breve descripción del equipamiento específico necesario en cada caso. El Capítulo 4 se centra en la electroforesis, la cual constituye una herramienta indispensable de trabajo en estudios bioquímicos sobre fisiología de plantas, así como en métodos de biología molecular, los cuales se desarrollan en el Capítulo 5.

El contenido del libro pretende acercar conceptos teóricos de Química Analítica y Bioquímica a los docentes y estudiantes de disciplinas afines pero que no forman parte del universo de las Ciencias Exactas. Imaginamos que nuestros lectores serán docentes, estudiantes y formadores de recursos humanos de diferentes niveles educativos, desde los últimos años de escuelas secundarias, pasando por materias de carreras de grado como Ciencias Veterinarias, Ciencias Agrarias y Forestales, Ciencias Naturales, hasta la primera etapa de formación de los estudiantes de las carreras de maestría y doctorado.

En síntesis, el libro está pensado como una herramienta que será utilizada en los tres niveles educativos, *i.e.* pregrado, grado y posgrado, con el objetivo de acompañar el proceso de

enseñanza-aprendizaje durante las primeras etapas de formación para el trabajo en un laboratorio de análisis básico de muestras agronómicas y forestales.

Este libro es principalmente el resultado del trabajo conjunto realizado por un equipo docente de diversa formación básica que considera la contextualización de la química en el campo profesional como una herramienta indispensable en el proceso de enseñanza-aprendizaje. Esperamos que les sea de utilidad.

Lorenza Costa, Paula I. Villabrille y Vanesa Y. Ixtaina

Prólogo

Cuando ingresas como estudiante a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales los primeros cursos con los que te encontrás son los de matemática, física y química y quizás te preguntes ¿para qué?

Pero será necesario el paso del tiempo para comprenderlo. Para encontrar las respuestas e ir descubriendo en ese recorrido la importancia de los primeros aprendizajes.

Quizás sea imprescindible afirmar que toda disciplina tiene sus pilares fundamentalmente en el conocimiento, pero también en lo humano, en las personas que forman parte de las instituciones.

El análisis químico no siempre fue parte del diseño curricular de la carrera de ingeniería agronómica y forestal. Fue necesario el aporte desinteresado y visionario iniciado por los docentes Raúl Pérez Duprat e Hilda Castagnasso allá por la década del 90, quienes pudieron ver cómo la química, a través de los análisis, fortalecía la formación general de los egresados y el trabajo interdisciplinario.

Lorenza Costa —y los jóvenes docentes investigadores que la acompañan— hicieron su camino comprometidos en el crecimiento y difusión de la ciencia y, siguiendo los pasos de los profesores que les precedieron, apuestan a dar cuenta de forma sencilla pero profunda que los métodos químicos, instrumentales, biológicos permiten mejorar la comprensión y resolución de las problemáticas de los sistemas biológicos e ingenieriles, ayudan a predecir las respuestas de los mismos y te enriquecen como egresado en todas tus prácticas profesionales.

“Métodos instrumentales básicos para muestras agroforestales” es un libro de Cátedra que vuelve a poner sobre la mesa la importancia del análisis químico y la práctica de laboratorio. Por ello, es irremplazable que lo leas y sea tu libro de consulta.

Elisa Miceli

La Plata, abril 2023

CAPÍTULO 1

Métodos analíticos instrumentales para laboratorios agroforestales

Paula I. Villabrille y Lorenza Costa

En este libro se presentan los fundamentos y procedimientos de los métodos analíticos instrumentales utilizados frecuentemente en laboratorios que trabajan con muestras de origen vegetal. No es un libro de Química Analítica ya que no está destinado a profesionales que se dediquen a desarrollar métodos analíticos, sólo pretende ayudar y acompañar durante el trabajo inicial de laboratorio a estudiantes y profesionales de otras formaciones académicas.

En este primer capítulo se desarrollan aspectos generales que se deben tener en cuenta independientemente de cuál será el método instrumental utilizado. Tales temas se abordarán organizados en tres aspectos importantes:

- Normas generales para el trabajo en el laboratorio
- Concepto general del Análisis Químico instrumental
- Planificación de un procedimiento adecuado para el análisis instrumental

Normas generales para el trabajo en el laboratorio

El trabajo en el ámbito de un laboratorio conlleva riesgos y por ello es necesario conocer las **normas generales** antes de desarrollar las actividades. Incorporar las normas a la rutina de trabajo conducirá a **minimizar los riesgos asociados**, generando un espacio de trabajo eficiente y seguro para nosotros, las personas que nos rodean y el ambiente. La prevención de accidentes es **responsabilidad** de todos los que trabajamos en un laboratorio y, por lo tanto, es necesaria la cooperación activa de cada uno.

Las normas generales y recomendaciones relacionadas con el conocimiento, el sentido común y el bien común en el ámbito de trabajo se pueden agrupar en tres momentos: antes, durante y al final de la actividad de laboratorio.

Antes de la actividad:

- Se debe tomar conocimiento de las normas generales del lugar, se recomienda leer atentamente el material disponible.

- Se debe conocer la ubicación de los elementos de seguridad disponibles, extintores, duchas, lavaojos, botiquín, entre otros.
- El ingreso a un laboratorio debe estar bajo la responsabilidad de algún docente/investigador (tutor). Es importante que siempre se trabaje cuando él esté presente o bien se tenga la autorización correspondiente.
- Todo trabajo en el laboratorio debe ser cuidadosamente planificado. Se debe tener en cuenta que el experimento comienza con el armado del plan de trabajo con el tutor.
- Se debe conocer el protocolo de uso de cada equipo que se utilice, lo cual es importante tanto para el buen funcionamiento del equipo, como para la seguridad individual y colectiva. Se recomienda trabajar siempre con el tutor hasta adquirir experiencia en el manejo del equipo.
- Se debe conocer el grado de peligrosidad de los productos químicos que se utilicen. Esta información está disponible tanto en la etiqueta del envase comercial como en las fichas de datos de seguridad correspondientes. Se recomienda leer la sección sobre manipulación de productos químicos para mayor detalle.

Durante la actividad:

- Se recomienda dejar las pertenencias personales (mochila, equipo de mate, libros, etc.) en alguna zona de escritorios, mesas o armarios, alejada o fuera del laboratorio.
- Se debe utilizar la vestimenta adecuada (guardapolvo, preferentemente de algodón y mangas largas y calzado cerrado), el pelo largo recogido y los elementos de protección necesarios (guantes, gafas, máscara).
- No se debe comer, ni fumar en el laboratorio.
- Se debe mantener limpia y ordenada el área de trabajo, esto incluye rotular el material que se utilice para evitar contaminaciones indeseadas.
- Se debe trabajar concentrado y sin apuro: se recomienda no estar atentos al celular, no correr de un lado para el otro, cerrar cajones y/o puertas de los armarios luego de su uso.
- Se recomienda ser extremadamente prudente con las siguientes pautas: no tocar con las manos directamente los reactivos, ni olerlos y mucho menos ¡probarlos!; sujetar siempre los frascos de productos químicos con las dos manos y nunca desde la tapa, taparlos inmediatamente después de su uso y, cuando se termine el contenido del envase, se debe lavar apropiadamente (no se deja para lavar en otro momento, es importante pensar en la seguridad de los que comparten el espacio de trabajo). No se deben reutilizar envases para otros productos sin quitar la etiqueta original.
- No se deben eliminar por el desagüe de las piletas, aunque sea en pequeñas cantidades, productos inflamables, pestilentes, lacrimógenos, no biodegradables, cancerígenos, aquéllos que reaccionan violentamente con el agua o muy tóxicos.
- En caso de accidente, se debe actuar inmediatamente aplicando el tratamiento específico adecuado e informar al tutor (o pedir a un compañero que lo haga) para seguir con el plan de contingencia.

Al final de la actividad:

- Se deben dejar los equipos apagados siguiendo los respectivos protocolos de uso.
- Se deben descartar los residuos generados según los procedimientos establecidos en el lugar de trabajo. Se recomienda leer la sección sobre gestión de residuos para más información.
- Se debe dejar el espacio limpio y ordenado.
- Lavarse las manos antes de abandonar el laboratorio.

Si se trabaja en el ámbito de la UNLP se recomienda revisar los documentos elaborados por la Dirección de Higiene y Seguridad (DHS), tal como el relacionado a la prevención de riesgos en laboratorios (DHS UNLP, 2018).

Manipulación de productos químicos

El grado de peligrosidad de los productos químicos varía según su composición y estructura química. El riesgo de que este peligro genere efectivamente un impacto adverso (accidentes, problemas de salud, daños al ambiente) depende de factores tales como las cantidades de uso, los tipos de aplicaciones y las posibles vías de exposición a los mismos (dérmica, ocular, inhalatoria, digestiva, parental).

El **Sistema Globalmente Armonizado** de clasificación y etiquetado de productos químicos (**SGA**) (ONU, 2021) unifica criterios a nivel internacional para la comunicación confiable sobre los peligros intrínsecos de todos los productos químicos, los riesgos químicos para la salud humana y el ambiente. En la Figura 1.1 se presentan los **pictogramas** o símbolos de advertencia definidos por el SGA según la clase de peligro.

PELIGROS FÍSICOS				
				
Explosivo	Inflamable	Comburente	Gas a presión	Corrosivo para metales
PELIGROS PARA LA SALUD HUMANA				
				
Toxicidad aguda	Corrosión cutánea	Irritación cutánea/ocular	Cancerígeno/mutágeno/	
PELIGROS PARA EL AMBIENTE				
				
Toxicidad acuática	Peligro para la capa de ozono			

Figura 1.1. Pictogramas del SGA para identificar la peligrosidad de los productos químicos

El uso del SGA es obligatorio en el ámbito laboral (Resolución SRT N° 801/15 y modificatorias) y se implementa a través de dos elementos de **comunicación de peligros**:

- **etiquetado de envases y**
- **Fichas de Datos de Seguridad (FDS)** estandarizadas y en idioma español.

Esto permite establecer las medidas preventivas adecuadas y los procedimientos efectivos ante cualquier situación que pueda presentarse durante la manipulación de productos químicos.

La **etiqueta** es la fuente de información básica y obligatoria que identifica al producto y los riesgos asociados a su manipulación. En la Figura 1.2 se muestra un modelo de etiqueta del sistema armonizado. En la misma se incluyen los siguientes datos: la identificación del producto químico, una palabra de advertencia (Alerta o Peligro, que indica la gravedad o el grado relativo de peligro), el(los) pictograma(s) de precaución (composición gráfica que transmite de manera visual el tipo de peligro), las indicaciones de peligro (frase asignada a una clasificación y categoría de peligro que describe la naturaleza de los riesgos, por ejemplo ver H314- en la Figura 1.2), los consejos de prudencia (describe las medidas recomendadas para minimizar o prevenir los efectos adversos resultantes de la exposición, por ejemplo, P271- en la Figura 1.2) y la identificación del fabricante/proveedor/distribuidor.



Figura 1.2. Modelo de etiqueta SGA para el ácido clorhídrico (37 % m/m)

Por su parte, las **FDS** complementan la función realizada por las etiquetas, brindando una información mucho más completa y ampliada a otros aspectos relevantes, tales como la gestión de residuos y primeros auxilios. Una FDS consiste en un documento de varias hojas cuyo contenido se organiza siguiendo el orden de 16 secciones: identificación del producto y su(s) peligro(s), composición del producto, procedimientos en casos de accidentes derivados de la manipulación, primeros auxilios, medidas de lucha contra incendios o vertidos accidentales, precauciones para la

manipulación y el almacenamiento seguro, controles de exposición y protección personal, propiedades físicas y químicas, estabilidad y reactividad, información toxicológica y ecológica, información relativa al transporte y eliminación del producto, reglamentación y otra información relevante. Las FDS deben ser suministradas por el proveedor de cada producto químico y se deben ubicar en un lugar conocido por todos los usuarios y de fácil acceso en el laboratorio.

Gestión de residuos peligrosos

La Ley Nacional 24.051 considera peligroso a todo residuo capaz de causar un potencial daño, directa o indirectamente, a seres vivos o contaminar el ambiente. La misma establece que todo **generador de residuos peligrosos** es responsable de su **adecuada gestión**.

Una gestión adecuada implica la minimización y eliminación de las emisiones y liberaciones de sustancias peligrosas al ambiente siguiendo procedimientos previamente establecidos que se deben conocer. Se deben considerar las disposiciones legales vigentes a nivel local para residuos. Estas se pueden consultar con el referente de Seguridad e Higiene del lugar de trabajo.

Es importante destacar que:

- Las soluciones de ácidos y/o bases con concentraciones menores a 0,1 M se pueden desechar por las piletas con suficiente agua corriente para producir una dilución conveniente (1:10 v/v).
- Se prohíbe el descarte de líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deben seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.
- Los residuos se deben separar y envasar en recipientes adecuados de vidrio, plástico o bolsas plásticas, perfectamente identificados y rotulados según la normativa vigente (categorías indicadas en los Anexos I y II, Ley 24.051).

Concepto general del Análisis Químico Instrumental

Se define como Química Analítica a la rama de la Química que describe la composición cualitativa y cuantitativa de una muestra. Para lograrlo se utilizan métodos analíticos que permiten determinar qué componentes y en qué cantidad se encuentran presentes en la muestra. En los métodos analíticos se denomina **analito** al componente que se quiere identificar y/o cuantificar.

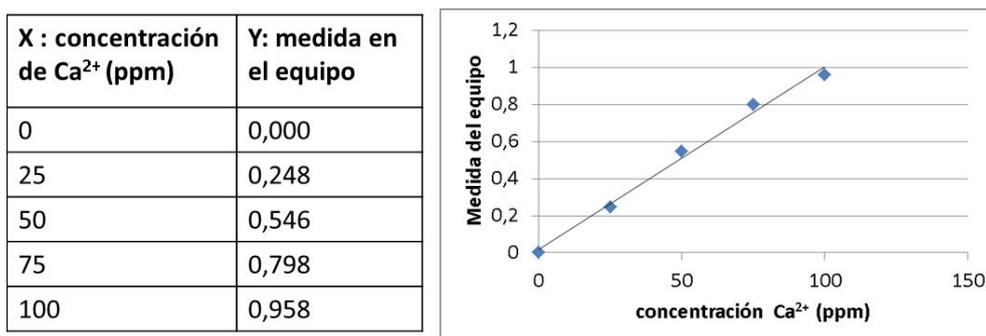
En particular, dentro de los métodos analíticos se denominan métodos instrumentales a aquellos que se basan en el uso de un equipo o instrumento para medir alguna propiedad fisicoquímica que se relaciona con el analito. Dentro de los métodos instrumentales se encuentran aquellos basados en medidas de conductividad o de potencial de electrodo que se relacionan con la concentración del analito, mediciones de intensidad de luz luego de su interacción con el analito, o medidas de desplazamiento del analito bajo determinadas condiciones que permitirán separar a los componentes y posteriormente cuantificarlos. En todos los casos, se utiliza un equipo y un

procedimiento específico para realizar las mediciones, algunos de los cuales, se desarrollan en detalle en cada uno de los capítulos posteriores de este libro.

Ahora bien, en todos los **métodos instrumentales**, para transformar la **medida del equipo** que se utiliza en **concentración de analito**, se necesita construir una **curva de calibración**. La idea general de una curva de calibración consiste en preparar en el laboratorio soluciones de concentración conocida del analito que se quiere cuantificar y realizar las mediciones en el equipo utilizado. De este modo se puede construir un gráfico de coordenadas cartesianas en el que se representa en el eje de las X las concentraciones conocidas del analito y en el eje de las Y la medida en el equipo que corresponde. Con esta representación gráfica de pares ordenados $(x, y) = (\text{concentración}, \text{medida en el equipo})$ se obtiene una relación entre ambos que generalmente será lineal. A partir del gráfico construido o de la ecuación matemática que lo representa se puede convertir una medida en el equipo de una muestra desconocida en un valor de concentración de analito. Por lo tanto, la curva de calibración es la herramienta que permitirá transformar las medidas del equipo en concentración de analito.

Para reforzar el concepto de una curva de calibración se considera el siguiente ejemplo concreto. Se necesita construir una curva de calibración para medir el contenido de calcio en muestras de leche mediante un método instrumental.

El analito que queremos cuantificar será el ion calcio, por lo tanto, se preparan en el laboratorio soluciones de diferentes concentraciones conocidas de ion calcio utilizando cloruro de calcio (CaCl_2) y agua destilada. Se preparan por lo menos cinco concentraciones diferentes de ion calcio: 0, 25, 50, 75 y 100 ppm ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Estas soluciones, de concentración conocida, se utilizan para realizar el procedimiento correspondiente al método instrumental que estamos usando y se realizan las medidas en el equipo indicado. Como resultado, se obtiene para cada concentración de ion calcio la medida correspondiente en el equipo (Figura 1.3).



Ecuación de la recta obtenida: $Y = 0,0099 x + 0,0168$

Coefficiente de correlación: $r^2 = 0,9909$

Figura 1.3. Curva de calibración.

Se muestra la tabla de pares ordenados (x, y) ; el gráfico correspondiente en el que se trazó la recta que mejor ajusta los puntos obtenidos y la ecuación de la recta obtenida.

Respecto al uso de una curva de calibración se debe tener presente tres puntos importantes:

- 1- Cada equipo tendrá un rango de validez para las medidas de concentración

2- Las muestras desconocidas deben estar comprendidas dentro del rango de validez para el equipo utilizado (dentro del rango de concentraciones que abarca la calibración)

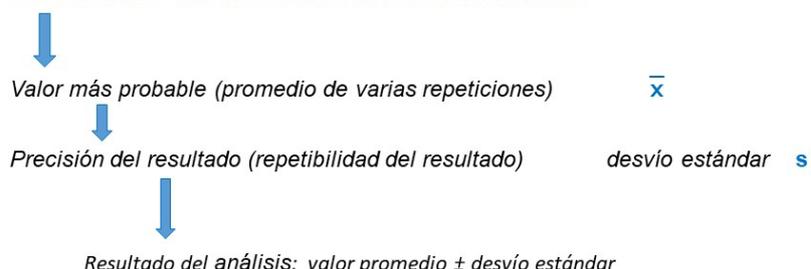
3- La dependencia entre las medidas del equipo y la concentración conocida de analitos que se usa para construir la curva de calibración debe tener valor estadístico. Si se trata de una dependencia lineal, esto significa que el coeficiente de correlación entre la medida y la concentración conocida debe ser cercano a 1. Para profundizar este concepto se recomienda la lectura de un texto de Cálculo Estadístico, Hines y col. (2006).

En todo método instrumental se obtiene un resultado, una medida del contenido del analito en la muestra. Un concepto inherente a todo análisis cuantitativo es la existencia de **errores en la medición**. Es un hecho real que el resultado obtenido siempre difiere del valor real del analito en la muestra, se asume que el valor obtenido está afectado por un cierto error. Dicho error tiene dos componentes: errores sistemáticos y aleatorios.

Los **errores sistemáticos o determinados** tienen una causa definida, provocan un error por exceso o por defecto en el resultado, en otras palabras, todas las mediciones darán por exceso o por defecto. Este tipo de errores pueden detectarse y corregirse. Las causas de estos errores pueden ser inherentes al método utilizado, errores del instrumento o de algún reactivo y errores del operador.

Los **errores aleatorios o indeterminados** son los que ocurren ocasionalmente y pueden darse como errores positivos o negativos aleatoriamente, no tienen siempre la misma tendencia. Los errores aleatorios ocurren en toda medición. A diferencia de los errores determinados, los indeterminados no se pueden corregir. Para disminuir estos errores inevitables, se realizan repeticiones del análisis. Ninguna de las mediciones arroja el valor verdadero del analito en la muestra y, por lo tanto, el resultado del análisis será el **valor más probable** calculado como el promedio de las mediciones realizadas a la misma muestra y se determinará además la **precisión** del resultado que será una medida de cuan dispersos son los resultados obtenidos para una misma muestra. De manera sencilla, se puede definir la precisión como la capacidad de un método de análisis para obtener resultados similares en varios análisis realizados a una misma muestra, es decir, sería una medida de la repetibilidad de los resultados. La forma más utilizada para medir la repetibilidad de los resultados es calcular su desvío estándar.

Cantidad de analito en la muestra



$$\bar{x} \pm s$$

Para ampliar estos conceptos se recomienda la lectura de los Capítulos 3 (Error experimental) y 4 (Estadística) del libro de Análisis Químico Cuantitativo, Harris (2016).

Etapas iniciales para la aplicación del método analítico instrumental

La planificación adecuada para realizar el análisis en el laboratorio mediante un método instrumental incluye varias etapas que serán comunes para todos los métodos. Según Zumbado Fernández (2004) dentro de la planificación debemos incluir las siguientes etapas: definición de los objetivos, selección del método analítico, muestreo, preparación de la muestra, determinación (protocolo del método analítico seleccionado) y finalmente cálculos, reporte e interpretación de los resultados.

Definición de los objetivos

¿Qué analito voy a cuantificar? ¿A partir de qué muestra voy a trabajar, es decir, cuál es la matriz en la que se encuentra el analito? ¿El analito es un componente mayoritario de la muestra o es un contaminante?

Selección del método analítico

Este es un punto muy importante de la planificación. Para seleccionar el método más adecuado se deben tener en cuenta tres aspectos relevantes: el tipo de analito que vamos a cuantificar, las características de la matriz en la que se encuentra y que sea un método validado. Los métodos elegidos dependerán del estado de agregación de la muestra y de la complejidad de su composición, ya que de ello dependen las interferencias que pueden aparecer. Por último, un concepto muy importante a tener en cuenta es que el método elegido permita obtener resultados reproducibles y confiables, es decir, que sea validado. Los criterios de validación los establecen organizaciones internacionales como AOAC, (2000); Codex Alimentarius, (2001) y IUPAC (2002). Si bien el objetivo de este libro no es contribuir con la formación de profesionales que van a desarrollar métodos analíticos, sino que se asume que los métodos que se van a utilizar corresponden a métodos validados, es importante que el profesional tenga una idea general sobre el significado de un método validado. Para definir si un método está validado, los organismos analizan características tales como la exactitud (precisión y veracidad), selectividad, linealidad, sensibilidad, robustez y límite de detección y cuantificación de cada método. Para profundizar en este tema se recomienda la lectura del Capítulo 1, páginas 28-38, del libro *Análisis Químico de los alimentos. Métodos clásicos*, cuyo autor es Héctor Zumbado Fernández (2004).

Muestreo y preparación de la muestra

En la mayoría de los casos, quienes realizan el trabajo en el laboratorio reciben la muestra, por lo tanto, no participan del muestreo original, el que se realiza en el lugar de producción y que se denominará a campo. Sin embargo, es importante tener conocimientos de la forma correcta en que se debe tomar la muestra fuera del laboratorio, ya que el resultado obtenido también depende fuertemente de la calidad del muestreo realizado a campo. La muestra que se recibe en el laboratorio debe ser **representativa** del material que se quiere analizar (lote, partida,

cultivo, parcela, fuente de agua, cosecha, etc.). Por regla general, para las determinaciones en el laboratorio se trabajará con un número de 3 a 5 muestras iniciales. No menos de 3 para asegurarnos un análisis estadístico que nos permita evaluar la calidad de los resultados obtenidos. La elección de un número máximo de 5 muestras tiene que ver con el tiempo que demandará el análisis y el costo de reactivos, pero obviamente cuanto mayor sea el número de muestras analizadas más representativo será el resultado obtenido. Las muestras que se procesan en el laboratorio podrán ser individuales o bien compuestas, es decir, muestras que se arman por combinación de muestras individuales. Por último, se debe procesar la muestra para que sea lo más **homogénea** posible. En general, si se trata de muestras líquidas se homogenizan por agitación y, si se trata de muestras sólidas, generalmente se secan y trituran o se congelan y trituran. A partir de este punto, cada método analítico que se estudie tiene su procedimiento particular de preparación de la muestra, por lo tanto, se analizará en cada capítulo en particular.

A modo de ejemplo, se plantea la recepción en el laboratorio de un muestreo realizado para un análisis foliar de un lote de *Eucalyptus globulus*. Se reciben en el laboratorio muestras de hojas provenientes de 25 árboles identificados individualmente (A1, A2, A3, ..., A23, A24 y A25) y seleccionados al azar dentro del lote. Cada muestra está formada por 100 hojas del árbol.

Al planificar el análisis en el laboratorio, se debe decidir el número de muestras con las que se va a trabajar. Obviamente no se realiza el análisis individual de cada árbol por una cuestión de tiempo y costos, ya que serían 25 muestras. Una decisión adecuada para obtener un buen resultado sería trabajar con 5 muestras compuestas (M), cada una de las cuales será la combinación de 5 árboles, por ejemplo:

M1: compuesta por A1, A2, A3, A4 y A5

M2: compuesta por A6, A7, A8, A9 y A10

Lo mismo para M3, M4 y M5. Por lo tanto, dado que de cada árbol entregaron 100 hojas, cada muestra tendrá un total de 500 hojas. Las hojas de cada muestra serán trituradas para transformarlas en muestras homogéneas antes de realizar el método analítico. Por lo tanto, a partir de las hojas trituradas se tomará la **porción de muestra homogénea** que se utilizará para hacer el método analítico, es decir, se tomará la **alícuota**.

Se describieron hasta aquí los puntos importantes de las tres primeras etapas de la planificación de un análisis químico. Los pasos siguientes, desde la preparación de la muestra en adelante, serán desarrollados para cada método en particular en los capítulos siguientes.

Referencias

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International; agricultural chemicals, contaminants, drugs*. AOAC International

Codex Alimentarius (2005). Normas generales del Codex. Recuperado de <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/es/>

- Dirección de Higiene y Seguridad, UNLP (2018). Prevención de Riesgos en Laboratorios. Recuperado de https://unlp.edu.ar/gestion/obras/seguridad_higiene/recomendaciones-de-trabajo-en-laboratorio-9240-14240/
- Harris, D.C. (2016). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté
- Hines, W.C., Borror, C. M., Goldsman, D. M. y Montgomery, D. C. (2006). *Probabilidad y estadística para ingeniería*. Compañía Editorial Continental.
- IUPAC (2002) Harmonized Guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical report). Budapest.
- Ley Nacional N° 24.051. Residuos Peligrosos. Publicación: B.O. 17/1/92. Recuperado de <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/0-4999/450/texact.htm>
- ONU (2021) Sistema Globalmente armonizado de Clasificación y etiquetado de Productos Químicos. Nueva York y Ginebra: Naciones Unidas. Recuperado de <https://unece.org/transport/standards/transport/dangerous-goods/ghs-rev9-2021>
- Resolución SRT N° 801/15 (2015) y modificatorias. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resolución-801-2015-245850>
- Zumbado Fernández, H. (2004). *Análisis Químico de los alimentos. Métodos clásicos*. Editorial Universitaria.

CAPÍTULO 2

Métodos basados en la interacción del analito con la luz

Agustina Buet, Nadia S. Rolny y Paula I. Villabrille

En este capítulo, se consideran tres tipos de interacción entre el analito y la luz: absorción, emisión y dispersión. Se describen los fundamentos de los métodos basados en dichas interacciones para determinar la concentración del analito presente en una muestra (análisis químico cuantitativo) y se presentan ejemplos de aplicación en cada caso.

Conceptos generales sobre la interacción del analito con la luz

¿Qué es la luz?

La **luz** es definida por la Física Clásica como una **radiación electromagnética** y se describe como una onda transversal a la dirección de propagación. Cada onda se caracteriza por un conjunto de parámetros que la definen: longitud de onda, número de onda, amplitud de onda y frecuencia de onda. La longitud de onda (λ) corresponde a la distancia que existe entre dos máximos o dos mínimos de la onda y se mide en unidades de longitud (cm, μm , nm, etc.) (Figura 2.1). El número de onda ($\bar{\nu}$) corresponde a la inversa de la longitud de onda y se mide en (unidades de longitud)⁻¹, por ejemplo, cm^{-1} ; nm^{-1} . La amplitud de onda (A) se refiere a la distancia entre la línea de avance y el máximo de la onda y también se mide en unidades de longitud (Figura 2.1). En tanto que la frecuencia de onda (ν) representa el número de veces que pasa la onda completa por un punto fijo por unidad de tiempo, se mide en hercios ($1 \text{ Hz} = 1/\text{s} = \text{s}^{-1}$).

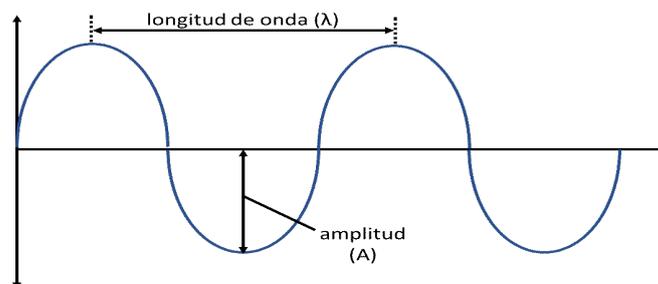


Figura 2.1. Representación bidimensional de una onda electromagnética. El eje vertical (eje y) puede ser el campo eléctrico o magnético y el eje horizontal (eje x) puede ser el tiempo o la distancia.

Los parámetros que caracterizan a una radiación electromagnética están relacionados entre sí de la siguiente manera:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

donde ν se refiere a la frecuencia, c es la velocidad de la luz en el vacío, una constante cuyo valor es $3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ o $3 \times 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. La unidad de medida para la longitud de onda (λ) comúnmente utilizada en los métodos aquí presentados es nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

A partir de la Física Cuántica, se agregó el concepto de **dualidad onda-partícula** y se comenzó a interpretar a la luz como una **onda de fotones** que se propagan. Dichos fotones representan paquetes discretos de energía denominados cuantos. Con este nuevo concepto, se interpreta a la luz como una onda que propaga energía. La energía de la onda (radiación electromagnética) queda definida como:

$$E = h \cdot \nu$$

donde h corresponde a la constante de Planck, siendo su valor de $6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$. Considerando que $\nu = \frac{c}{\lambda}$, se puede reemplazar en la expresión de energía:

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

A partir de ambas expresiones, se puede relacionar claramente que cuanto mayor es la frecuencia de la radiación electromagnética mayor será su energía. En cambio, cuanto mayor es la longitud de onda de la radiación electromagnética menor será su energía.

¿Qué es el espectro electromagnético?

El **conjunto de radiaciones electromagnéticas** de diferentes longitudes de onda conforma el **espectro electromagnético** abarcando desde los rayos γ hasta las ondas de radio (Figura 2.2).

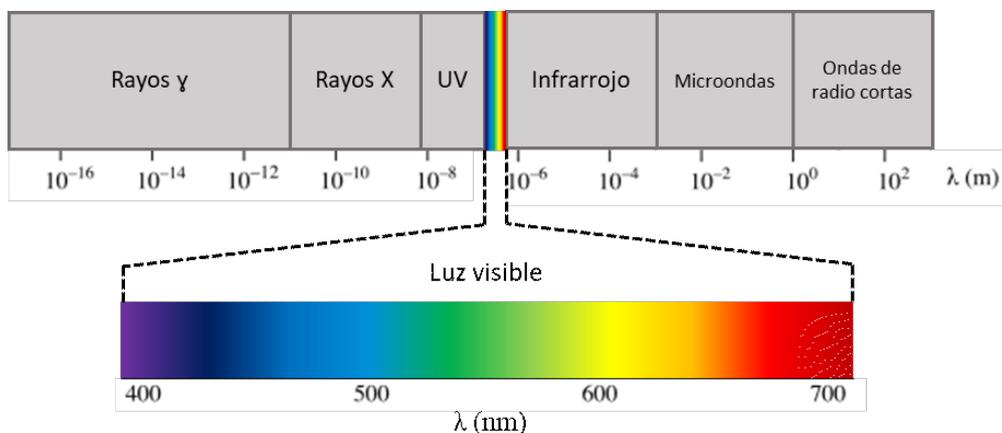


Figura 2.2. Representación esquemática del espectro electromagnético

Aquellas longitudes de onda que corresponden al rango entre 380-780 nm pertenecen a lo que se denomina **región visible del espectro** ya que las radiaciones electromagnéticas de estas longitudes de onda afectan la retina del ojo humano y provocan que observemos colores. La luz blanca contiene todos los colores del espectro visible y, por lo tanto, es un ejemplo de fuente de **luz policromática** (luz formada por varias longitudes de onda). En cambio, si la luz tiene un solo color, una única longitud de onda, se denomina **luz monocromática**.

A cada extremo de la región visible, se ubican la **región infrarroja** (con λ mayores a 780 nm) y la **región ultravioleta** (UV) (con λ menores a 380 nm). Como se ha mencionado, la energía de una radiación electromagnética es inversamente proporcional a su longitud de onda ($E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$), por lo tanto, los rayos visibles tienen menor energía que los rayos UV, pero mayor energía que los rayos infrarrojos.

¿Qué sucede cuando un átomo absorbe luz?

Dentro de un átomo, los electrones ocupan niveles discretos de energía (concepto que deriva de la Teoría Cuántica). Estos niveles se denominan con números enteros (1, 2, 3, etc.) y a medida que aumenta el nivel de energía, mayor es el número de orbitales presentes en cada nivel. Los electrones ocupan orbitales denominados con letras (s, p, d, etc.) y en cada orbital se ubican como máximo dos electrones apareados. Como ejemplo, el primer nivel sólo tiene 1 orbital (1s), en tanto que el segundo nivel posee 4 orbitales (2s, 2p_x, 2p_y, 2p_z). De acuerdo con la posición de un átomo en la tabla periódica, se puede deducir la estructura electrónica del mismo. Por ejemplo, el átomo de sodio (Na), que tiene el número atómico 11, pertenece al período 3 y grupo 1. Esto quiere decir que tiene 11 electrones en total, los que ocupan hasta el tercer nivel de energía electrónica, que tiene 1 solo electrón en el último nivel: 1s², 2s² y 2p⁶, 3s¹. Teniendo en cuenta la estructura interna del átomo, cuando los electrones absorben una cantidad de energía adecuada pueden pasar de un nivel energético a otro de mayor energía (Figura 2.3). Este proceso se denomina **transición electrónica**, en el cual los electrones que están en su condición de menor energía posible (**estado fundamental**) pasan a un estado de mayor energía (**estado excitado**). La diferencia de energía entre los niveles son cantidades discretas de energía (determinados valores de $h \cdot \nu$) que resulta característica para cada átomo.

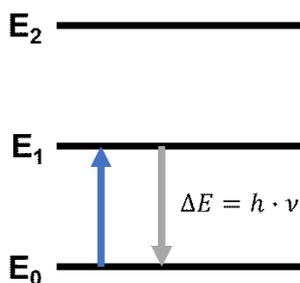


Figura 2.3. Representación esquemática de los niveles de energía en un átomo.

E_0 , E_1 y E_2 representan los niveles electrónicos dentro del átomo. Para simplificar el esquema no se dibujaron los orbitales (s , p , etc.) dentro de cada nivel energético. La flecha azul representa un salto electrónico entre el nivel fundamental y el primer nivel excitado. La flecha gris indica el regreso al estado fundamental (proceso de relajación).

¿Qué sucede cuando una molécula absorbe luz?

Una molécula está formada por la unión entre átomos; estas uniones no son estáticas ya que permanentemente vibran y rotan. Por lo tanto, la **energía interna (E) de una molécula** comprende tres componentes: **E rotacional**, **E vibracional** y **E electrónica**. Esto se debe a que los electrones que establecen la unión entre átomos dentro de la molécula tendrán determinado nivel energético de vibración y de rotación, además de su nivel electrónico. En consecuencia, las moléculas pueden absorber radiación electromagnética y sufrir **transiciones rotacionales, vibracionales y electrónicas** según la energía absorbida, siendo menor la energía requerida para las transiciones rotacionales y mayor para las transiciones electrónicas (Figura 2.4). Por consiguiente, la energía de la radiación de microondas alcanza sólo para transiciones rotacionales, en tanto que la energía de la radiación infrarroja alcanza para las transiciones vibracionales y rotacionales, mientras que la energía de las radiaciones visibles y UV alcanza para producir transiciones electrónicas, vibracionales y rotacionales.

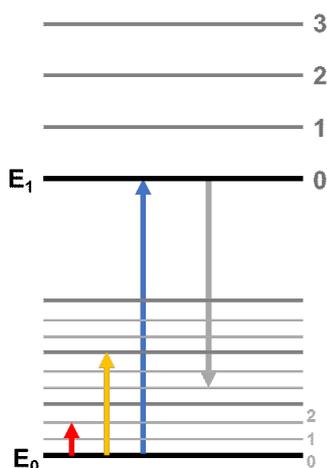


Figura 2.4. Representación esquemática de los niveles de energía en una molécula: electrónicos (E_0 , E_1); vibracionales (0, 1, 2, 3) y rotacionales (0, 1, 2).

La excitación en la molécula puede ser rotacional (flecha roja), vibracional (flecha amarilla) o electrónica (flecha azul). Para simplificar el esquema, los niveles rotacionales (en color gris) se dibujaron sólo en el nivel electrónico E_0 , pero este esquema se repite en todos los niveles energéticos.

¿Qué sucede con un átomo y una molécula excitados?

Tanto los átomos como las moléculas excitados son inestables y, rápidamente, buscarán la manera de regresar al nivel de menor energía, eliminando el exceso de energía a través de un **proceso de relajación**. Esto puede ocurrir por diversos fenómenos: liberación de calor y/o emisión de luz (Figura 2.3, flecha gris y Figura 2.4, flecha gris, para el caso del átomo y la molécula, respectivamente).

Clasificación de los métodos basados en la interacción de los analitos con la luz

Según el tipo de interacción entre los analitos y la luz, los métodos de análisis químico cuantitativo que se tratarán en este capítulo se dividen en:

- Espectrofotometría de absorción molecular y atómica
- Espectrofotometría de emisión atómica
- Métodos no espectrofotométricos de dispersión

La espectrofotometría de absorción se basa en la medida de la luz absorbida para excitar el analito, en tanto que la espectrofotometría de emisión mide la luz emitida por el analito previamente excitado. En ambos métodos, el analito debe estar formando parte de una solución antes de ser introducido en el equipo de medición. Por otra parte, los métodos no espectrofotométricos se basan en la medición de la dispersión de la luz por parte del analito para lo cual será necesario que el analito se encuentre conformando partículas en suspensión.

Espectrofotometría de absorción

Si se imagina un haz de **luz monocromática** atravesando una solución que contiene una **especie absorbente**, la potencia del haz de luz emergente (P) disminuye respecto del haz incidente (P_0) como consecuencia de la **absorción de energía** por parte de las especies absorbentes presentes en la solución (Figura 2.5).

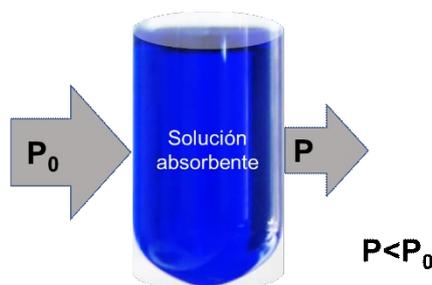


Figura 2.5. Dibujo que representa un haz de luz monocromática que incide sobre una solución absorbente. P_0 : potencia del haz incidente y P : potencia del haz emergente. La potencia del haz emergente será menor que la potencia del haz incidente debido al fenómeno de absorción que ocurre en la solución.

A partir de la absorción de luz por parte de la especie absorbente, hay dos conceptos relacionados entre sí: **transmitancia (T)** y **absorbancia (A)**. Se define como transmitancia a la fracción de luz que deja pasar dicha solución, por lo tanto, puede valer entre 0 y 1:

$$\text{Transmitancia} \quad T = \frac{P}{P_0}$$

La transmitancia porcentual (T%) corresponde a $100 \cdot T$ y puede tomar valores entre 0 y 100 %. La absorbancia se define a partir de la transmitancia como:

$$\text{Absorbancia} \quad A = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = -\log T$$

De las expresiones matemáticas presentadas, se puede deducir que **cuanto mayor es la A, menor será la T**, es decir que, si una solución absorbe mucho, transmitirá poco. Se puede observar además que, de acuerdo con la definición de T y A, ambas propiedades son adimensionales, ya que se definen a partir de un cociente de la misma magnitud (P/P_0). En la espectrofotometría de absorción, se mide la absorbancia (A), ya que es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe luz en la muestra.

Espectrofotometría de absorción molecular UV-visible

La espectrofotometría de absorción molecular en la región UV y visible tiene una amplia aplicación para el análisis cuantitativo de moléculas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas.

Fundamento del método

Para medir la concentración de un analito por este método es necesario que el analito (o un producto de reacción del analito) tenga la propiedad de **absorber luz en la región del UV-visible** del espectro electromagnético. Tal como se describió previamente, cuando dicho haz de luz incide sobre la **solución del analito**, éste absorbe energía, la que utiliza para pasar de su estado fundamental de energía a un **estado excitado**, produciéndose transiciones rotacionales, vibracionales y electrónicas en la molécula de interés.

¿Cómo se relaciona la medida de absorbancia con la concentración?

Ley de Lambert-Beer

Cuando un haz de luz monocromática atraviesa una solución, la absorbancia es directamente proporcional a la distancia recorrida por la luz atravesando la solución absorbente y a la

concentración de la especie absorbente en la solución. La distancia recorrida por la luz atravesando la solución se denomina camino óptico y se mide generalmente en cm (Figura 2.6).

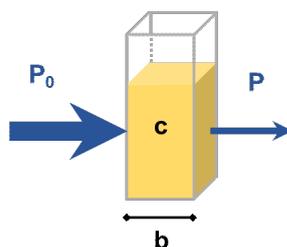


Figura 2.6. Esquema que representa el fenómeno que describe la ley de Lambert-Beer. P_0 es la potencia del haz de luz monocromática incidente; P es la potencia del haz emergente; c es la concentración, y b es el camino óptico.

La representación matemática de la **Ley de Lambert-Beer** es:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

donde:

A : absorbancia, magnitud adimensional

ε : absorptividad molar, constante que se define como la unidad de absorbancia por unidad de concentración y por unidad de longitud de la trayectoria de luz; depende de la naturaleza de la solución y de la longitud de onda de la luz incidente. En general, su unidad es la inversa de la molaridad por la inversa de cm, es decir $(M \cdot cm)^{-1}$ ó $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

b : camino óptico, en general se mide en cm

c : concentración de la especie absorbente expresada en molaridad (M)

Dado que la absorbancia y la absorptividad molar dependen de la longitud de onda de la luz incidente, muchas veces se expresa la ecuación de Lambert-Beer como una función de la longitud de onda:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c$$

Con cierta frecuencia, se utiliza como constante de proporcionalidad la absorptividad (a) en lugar de la absorptividad molar en la Ley de Lambert-Beer:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Las unidades de a son $(L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1})$ y, por lo tanto, en este caso, la concentración del analito se debe expresar en $g \cdot L^{-1}$.

La Ley de Lambert-Beer es una **ley límite**, sólo se cumple **en condiciones de luz monocromática y soluciones diluidas**.

Representación gráfica de la Ley de Lambert-Beer

La Figura 2.7 representa la absorbancia medida a una determinada longitud de onda en función de la concentración de un analito. Se puede observar que la representación gráfica de la Ley de Lambert-Beer es una recta. En el eje de las ordenadas (eje Y) se representan los valores de A y en el eje de las abscisas (eje X) se representan las concentraciones del analito. La pendiente de la recta corresponde al producto $\varepsilon \cdot b$.

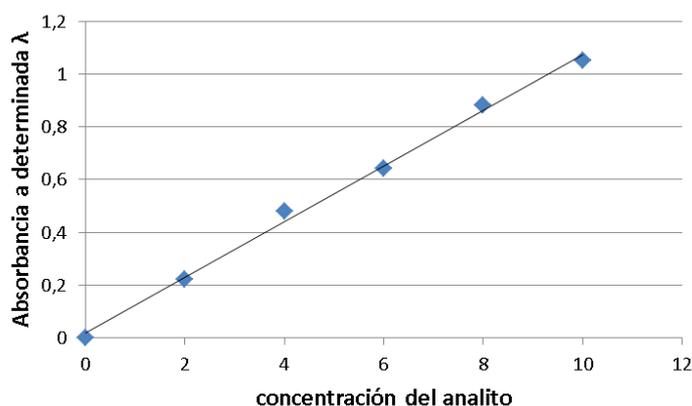


Figura 2.7. Ejemplo de representación gráfica de la relación entre absorbancia y concentración (Ley de Lambert-Beer)

¿Por qué se pierde la linealidad entre A y c? Desviaciones de la Ley de Lambert-Beer

- Si la solución del analito es concentrada (en general, mayor a 1×10^{-2} M) se pierde la relación lineal entre la A y la c; las moléculas muy próximas entre sí comienzan a interferir entre ellas en el proceso de absorción de energía. Se suele decir que la recta se “plancha” a altas concentraciones.

- Desviaciones químicas: se pierde la relación lineal entre A y c cuando existen interferencias en la solución, tales como asociación o disociación del analito en solución, reacciones del analito con el solvente y presencia de otros componentes en la muestra que también absorben luz incidente.

- Desviaciones instrumentales: la Ley de Lambert-Beer se aplica usando luz monocromática. Sin embargo, en la práctica, el espectrofotómetro utiliza una fuente policromática de luz y, mediante un sistema óptico adecuado (una red de difracción o un filtro), se selecciona un segmento de longitudes de onda centrado en aquella que se desea utilizar; a este segmento se lo denomina banda. Por este motivo, es muy importante elegir adecuadamente la longitud de onda de trabajo.

¿Cómo se elige la longitud de onda de trabajo?

Para ello se utiliza el **espectro de absorción**, que es un gráfico característico para cada especie absorbente en el que se representan las absorbancias en función de la longitud de onda de la luz incidente (Figura 2.8).

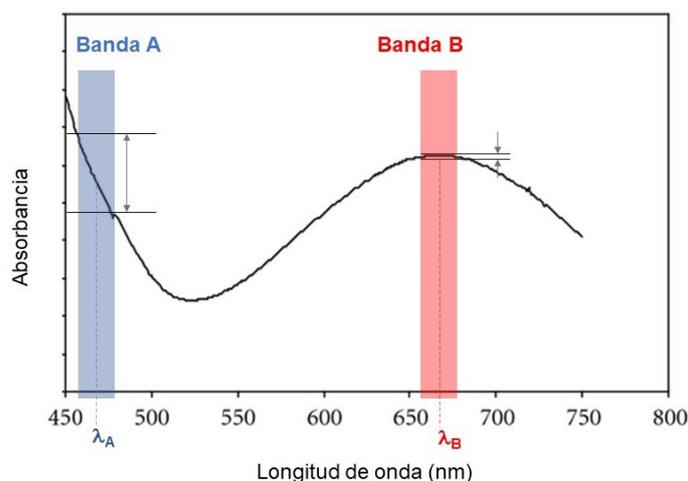


Figura 2.8. Representación de un espectro de absorción de un analito.

A es la banda de longitudes de onda centrada en λ_A y B es la banda de longitudes de onda centrada en λ_B .

Si se analiza la banda centrada en la longitud de onda λ_B , se concluye que no hay gran variación en la lectura de absorbancia a lo largo de esa banda. Por el contrario, la banda centrada en la longitud de onda λ_A , muestra una variación importante en la lectura de absorbancia a lo largo de la banda. Concretamente, se debe elegir una longitud de onda ubicada en una región plana del espectro de absorción correspondiente (como λ_B en el espectro de la Figura 2.8) a fin de minimizar el error instrumental.

¿Qué ocurre si en la solución de estudio hay otras especies absorbentes además del analito? Si dichas especies absorben a la misma longitud de onda que el analito, pero sin interactuar con éste, las absorbancias se suman. Entonces se aplica la Ley de Lambert-Beer mediante la siguiente expresión:

$$A_{total\lambda} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n$$

Es decir, la absorbancia total en una longitud de onda única (λ) para una muestra de componentes múltiples (1, 2, ..., n) es la suma de las absorbancias individuales (A_1, A_2, \dots, A_n) y se deben realizar medidas de absorbancia total a tantas longitudes de onda comunes como componentes tenga la mezcla. Un ejemplo de este caso es la determinación de pigmentos (clorofilas y carotenoides) en extractos vegetales. En relación con ésta, se recomienda la lectura de Lichtenthaler (1987, pp. 359-366) donde se presentan las expresiones de cálculo correspondientes a cada longitud de onda, teniendo en cuenta la presencia simultánea de dichos pigmentos en el extracto de interés.

Descripción del equipo básico

En la espectrofotometría de absorción molecular, el equipo que se utiliza se denomina espectrofotómetro UV-visible. Este equipo permite medir la absorbancia en las regiones visible y UV

del espectro electromagnético. En la Figura 2.9, se muestra un espectrofotómetro Shimadzu-UV mini-1240 de simple haz. Se puede observar la cavidad donde se ubica la cubeta, recipiente que se utiliza para contener la muestra líquida a medir.



Figura 2.9. Fotografías de un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu-UV mini-1240

La Figura 2.10 muestra los componentes de un espectrofotómetro UV-visible, que se detallan a continuación:

- Fuente de luz policromática. Para la región visible se selecciona la lámpara de tungsteno y para la región UV la lámpara de deuterio.
- Sistema óptico (colimador, monocromador). Este componente es fundamental, ya que permite generar una luz que se asemeja a una monocromática. Cuanto mejor es el monocromador más estrecho será el intervalo de longitudes de onda del haz producido.
- Cubeta (debe ser de un material transparente a la región espectral de interés, de vidrio o de plástico para el visible y de cuarzo para UV). El ancho de la cubeta se asocia al camino óptico (b).
- Detector (Fototubo). Dispositivo que transforma la radiación en energía eléctrica capaz de ser medida.
- Procesador y lector de la señal.

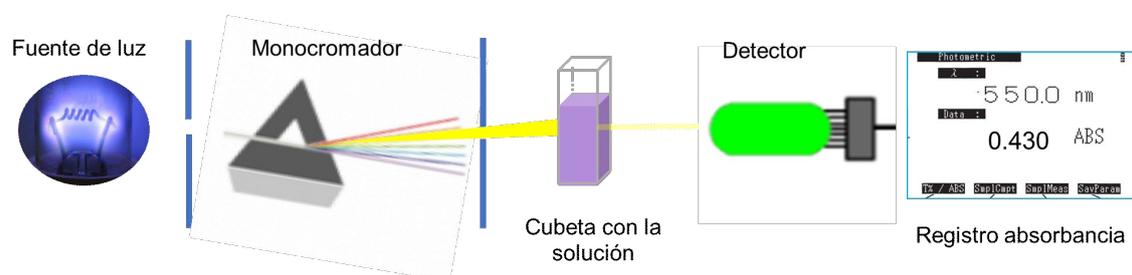


Figura 2.10. Representación esquemática de los componentes de un espectrofotómetro UV-visible de simple haz

¿Cómo se puede determinar la concentración de un analito utilizando el método espectrofotometría de absorción molecular UV-visible?

- **Utilizando la ecuación de la Ley de Lambert-Beer.** Se aplica cuando se conoce el valor de la absorptividad molar (ϵ) para el analito que se quiere cuantificar a la longitud de onda de trabajo y en la solución utilizada (datos de bibliografía). En estos casos, se mide la absorbancia de la muestra a analizar y utilizando la ecuación de la Ley de Lambert-Beer se puede despejar el valor de la concentración. Esta modalidad de trabajo es la que se utiliza para medir pigmentos en extractos vegetales o productos agroindustriales.

- **Utilizando el procedimiento de la curva de calibración.** Se aplica cuando los valores de absorptividad molar no se conocen y en los casos en los que se necesita realizar una reacción previa para lograr que el analito se transforme en una especie absorbente de luz UV o visible. En este procedimiento se prepara una serie de soluciones de concentración conocida del analito que se quiere cuantificar, se lleva a cabo la reacción previa para generar el compuesto absorbente y luego se mide la absorbancia de estas soluciones absorbentes en el espectrofotómetro UV-visible. La recta de calibración (curva de calibración) obtenida será la referencia para transformar la medida de absorbancia de una muestra desconocida en un valor de concentración para el analito. El concepto general de la curva de calibración fue presentado en el Capítulo 1.

Ejemplos de aplicación de espectrofotometría de absorción molecular

Determinación rápida del contenido de β -caroteno en zanahorias por espectrofotometría de absorción molecular en el visible

Los pigmentos que dan sus colores atractivos a frutas y verduras, ¿son funcionales únicamente a los vegetales? Varios estudios han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes y antitumorales de pigmentos carotenoides. Por ello, desde el punto de vista nutricional, el interés por estos pigmentos se ha intensificado notablemente. El contenido de carotenoides en vegetales se puede determinar por espectrofotometría de absorción molecular en el visible.

Procedimiento analítico basado en el trabajo de Olives Barba y col. (2006)

Preparación de la muestra: las verduras frescas se cortan, trituran y homogeneizan en un molinillo para obtener una muestra representativa para el análisis de carotenoides. Se pesan 3 g de muestra y se mezclan con 100 mL del solvente de extracción (*n*-hexano:acetona:etanol, 50:25:25) en un recipiente protegido de la luz. Se agita magnéticamente durante 30 min y se obtienen los extractos por centrifugación.

Curva de calibración: se prepara una serie de soluciones de concentración conocida (entre 0,47 y 9,32 μM) del patrón de referencia certificado de β -caroteno en *n*-hexano y una solución blanco que no contenga el pigmento. Se registra el espectro de absorción de una de las soluciones de β -caroteno en *n*-hexano y se selecciona la longitud de onda óptima de trabajo ($\lambda=446$ nm). Para ello, se utiliza un espectrofotómetro UV-visible con una lámpara de tungsteno como fuente luz policromática y una cubeta de plástico para contener la solución a

medir. Se mide el valor de absorbancia para cada una de las soluciones preparadas a $\lambda=446$ nm. Se construye la curva de calibración con la serie de datos de pares ordenados (c, A), donde c, concentración de β -caroteno (μM) y A, absorbancia medida a λ .

Medición y obtención del resultado: la cuantificación en la capa de *n*-hexano de los extractos se realiza a partir de la medida de la absorbancia a $\lambda=446$ nm en las condiciones mencionadas previamente. Fórmula de cálculo:

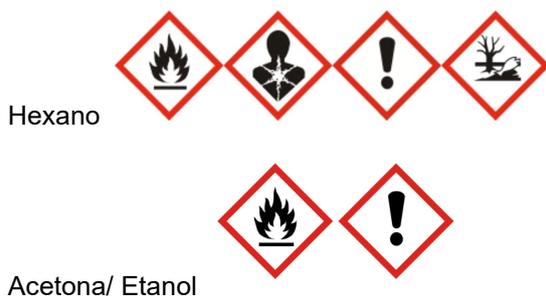
$$\text{Concentración de } \beta\text{-caroteno} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A(\lambda)-b}{m} \cdot M \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right) \cdot \frac{V(\text{mL})}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1\text{g}}{a(\text{g})}$$

donde A(λ): absorbancia medida del extracto, b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, V: volumen de solvente de extracción (100 mL, en este caso), a: alícuota de la muestra (3 g, en este caso), M: masa molar de β -caroteno ($536,87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Interferencias: la cuantificación de β -caroteno por este método espectrofotométrico da lugar a la sobreestimación del contenido de carotenoides en alimentos ricos en licopeno, como el tomate o la sandía, debido a la superposición de las bandas de absorción de los espectros de ambos pigmentos.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica, a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado.

En particular, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación de los solventes orgánicos para preparar la mezcla de extracción, de acuerdo con los pictogramas correspondientes:



Determinación de la concentración de fosfato en hojas por espectrofotometría de absorción molecular en el espectro visible

El fosfato es uno de los macronutrientes con mayor demanda por parte de los cultivos. Si bien la fertilización fosforada es una práctica generalizada, dada la baja biodisponibilidad del fosfato en los suelos de diversas regiones de nuestro país y la alta demanda por parte de las plantas, el fosfato resulta muchas veces un nutriente limitante en los cultivos. Por esta razón, con frecuencia se incluye la determinación de fósforo en los tejidos vegetales como uno de los parámetros importantes para evaluar el estado nutricional de un cultivo (análisis foliar de nitrógeno, fósforo y potasio -NPK-).

Fundamento del método: el método espectrofotométrico del ácido vanadomolibdofosfórico consiste en la reacción del ortofosfato con molibdato de amonio bajo condiciones ácidas, para formar un heteropoliácido, el ácido molibdofosfórico que en presencia del ion vanadato da lugar

al ácido vanadomolibdofosfórico de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de fosfatos presentes en la muestra.

Procedimiento analítico basado en los trabajos de Sadzawka y col. (p. 91, 2007) y Kitson y Mellon (1944)

Preparación de la muestra: las hojas (3-5 g) se secan en estufa a 60 °C hasta peso constante y se registra el peso seco (PS) de las mismas. A continuación, se llevan a cenizas en mufla a 500 °C (6 h). Las cenizas obtenidas se disuelven con 3,5 mL de ácido nítrico de calidad analítica y finalmente se diluyen en matraz aforado de 25,0 mL con agua ultrapura (un agua con un alto grado de purificación tal que reduce al mínimo posible la cantidad de los iones presentes). El valor del volumen total de la solución de las cenizas, Vd, corresponde a 25 mL en este caso.

Curva de calibración: se prepara una solución patrón de fosfato 250 mg·L⁻¹ (P-PO₄³⁻): se secan 1,25 g de fosfato diácido de potasio KH₂PO₄ grado analítico a 105 °C durante 1 h. Se disuelven 1,0975 g de KH₂PO₄ anhidro y se llevan a 1000 mL finales en un matraz aforado, usando una solución de ácido nítrico 10 %m/m preparada en agua ultrapura. La solución se almacena a 4 °C en frasco de vidrio. Esta solución es estable durante seis (6) meses. Por otro lado, se prepara el reactivo vanadato-molibdato. Para ello se preparan dos soluciones, A y B. Solución A: se pesan 12,5 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado, y se disuelve en aproximadamente 150 mL de agua destilada. Solución B: se calientan hasta ebullición 160 mL de agua destilada aproximadamente en un vaso de precipitado de 500 mL y se disuelven 0,625 g de vanadato de amonio, se deja enfriar y se añaden 165 mL de HCl(c). Una vez preparadas las soluciones, se añade A sobre B, se trasvasa a un matraz de 500 mL y se enrasa.

A una serie de matraces aforados de 25,0 mL se transfieren volúmenes de 0; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 y 6,0 mL de la solución patrón de fosfato (250,00 mg·L⁻¹). Se agregan 5,0 mL de reactivo vanadato-molibdato y se enrasa con agua destilada para preparar soluciones de concentración conocida en el rango de 0 a 60,00 mg·L⁻¹. Se deja desarrollar el color durante 10 min.

Se realiza un barrido del espectro de absorción del complejo formado entre el patrón de fósforo (solución de concentración intermedia entre las preparadas) y el reactivo vanadato-molibdato en el rango 400–490 nm de la región visible y se selecciona la longitud de onda de trabajo.

Posteriormente, se miden las absorbancias de todas las soluciones patrones preparadas para la curva de calibración a la longitud de onda seleccionada para verificar el comportamiento lineal (Ley de Lambert-Beer). Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivos y se mide la absorbancia a la longitud de onda de trabajo seleccionada. Se realiza la curva de calibración representando en un gráfico la absorbancia de las soluciones de concentración conocida de fosfato (eje Y) contra la concentración de fósforo en los mismos (eje X). Se obtiene la ecuación de la recta resultante del ajuste lineal.

Medición y obtención del resultado: para la reacción de desarrollo de color de la muestra se toma una alícuota de 10,0 mL de muestra pretratada (solución ácida de cenizas) en un matraz de 25,0 mL, se adicionan 5,0 mL de reactivo vanadato-molibdato y se enrasa con agua destilada. Se deja desarrollar el color durante 10 min. Asimismo, se prepara un blanco de reactivos en el cual el volumen de muestra se sustituye por agua destilada sometida al mismo tratamiento preliminar y se procede de igual forma que con la muestra. Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivos y se mide la absorbancia de la muestra a la longitud de onda seleccionada. Fórmula de cálculo para determinar la concentración de P-PO₄³⁻ en hojas:

$$\text{Concentración de fosfato } \left(\frac{\text{mg}}{\text{gPS}} \right) = \frac{Ac-b}{m} \cdot \frac{Vd(\text{mL})}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{1g}{PS(g)}$$

donde Ac: absorbancia corregida ($A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$), b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, Vd: volumen de solución de las cenizas, D: factor de dilución en las muestras que sea necesario preparar una dilución, PS: peso seco de hojas que se llevó a cenizas.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica, a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado. En particular, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido inorgánico concentrado de acuerdo con los pictogramas correspondientes.



Ácido nítrico..

Espectrofotometría de absorción atómica

La espectrofotometría de absorción atómica se aplica a una amplia variedad de muestras y permite la detección y cuantificación de múltiples elementos a través de su **atomización**; es decir, de su conversión en átomos gaseosos; y la posterior medición de la energía absorbida por parte de éstos.

Fundamentos del método

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la medición de la **energía absorbida por los átomos** en estado vapor cuando **pasan de su estado fundamental a un estado excitado**. A temperatura ambiente, los átomos se encuentran en estado fundamental, el estado de menor energía. Los átomos de los distintos elementos absorben energía de longitudes de onda

características para pasar del estado fundamental al estado excitado (ver Figura 2.3), las que conforman el espectro de absorción atómica característico de cada elemento. En la espectrofotometría de absorción atómica, se hace incidir un haz de luz de una longitud de onda particular para cada átomo, según su espectro de absorción, para detectarlo y cuantificarlo en una muestra determinada, reduciendo las posibles interferencias por otros elementos. Este método es muy específico dado que la energía necesaria para que ocurran las **transiciones electrónicas** es característica para cada elemento.

Para poder detectar los elementos que se encuentran en una muestra mediante este método, se debe lograr la excitación de los átomos en estado de vapor como mencionamos antes, para lo cual la muestra se nebulizará sobre una llama. Al nebulizar una muestra líquida en una llama, ocurrirá una serie de procesos que llevarán a la **excitación de los átomos** (Figura 2.11). Primero, se producirá la desolvatación de las sales, luego, las sales se fusionarán y se evaporarán, posteriormente, éstas se disociarán, generando el vapor atómico. Los átomos presentes en el vapor atómico absorberán energía de una longitud de onda característica y pasarán al estado excitado.

La **absorción de energía** por parte de los átomos para pasar del estado fundamental al estado excitado será **proporcional a la cantidad de átomos presentes en la muestra**, por lo cual, la cuantificación de los elementos presentes en una muestra determinada se realiza a partir de la medición de la absorbancia de la muestra.

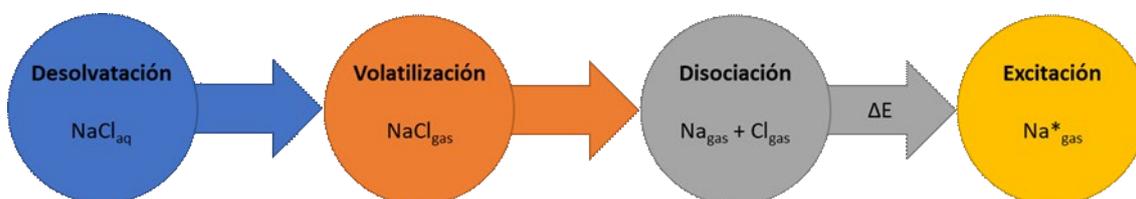


Figura 2.11. Procesos que ocurren en la llama tomando como ejemplo el átomo de sodio, formando parte de una solución de cloruro de sodio (NaCl)

Descripción del equipo básico

El espectrofotómetro de absorción atómica básico está compuesto por una fuente de radiación, un sistema de nebulización, un sistema de atomización, un monocromador, un detector y un sistema informático para procesar y leer la señal (Figura 2.12). La precisión y la exactitud de la espectrofotometría de absorción atómica dependen en gran medida de los métodos de introducción de la muestra y de su atomización.

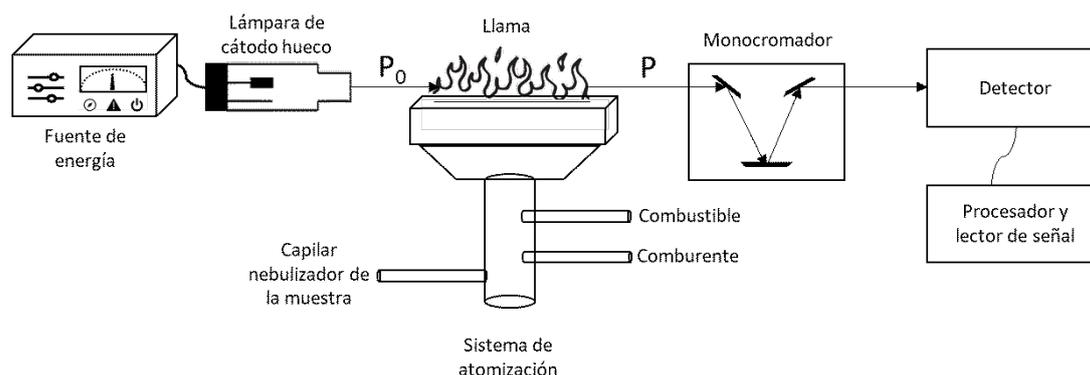


Figura 2.12. Esquema de los componentes básicos de un espectrofotómetro de absorción atómica

La nebulización directa es el método de introducción de la muestra más utilizado. Consiste en un nebulizador que introduce la muestra en forma de aerosol de manera continua en el sistema de atomización. La muestra debe estar en estado líquido para poder utilizar estos métodos. Una vez introducida la muestra, los elementos presentes en ella deben convertirse en átomos para que puedan ser detectados y cuantificados por este método. Este proceso se denomina **atomización**. Para esto, se suelen utilizar distintas fuentes de energía: el calor de una llama de combustión ordinaria o un plasma de radiofrecuencia, siendo este último el atomizador más potente. El método más utilizado de atomización es el método de la llama, donde se produce la atomización a partir de la energía calórica brindada por la misma. La mezcla de combustible y comburente será la que determinará la temperatura de la llama y, en consecuencia, su capacidad de excitar los átomos de los distintos elementos. En la Tabla 2.1., se muestran las temperaturas que alcanzan las distintas combinaciones de combustible y comburente utilizadas en este método.

Tabla 2.1. Temperaturas obtenidas según las combinaciones de combustible-comburente

Combustible	Comburente	Temperatura obtenida (°C)
gas natural	aire	1.700-1.900
gas natural	oxígeno	2.700-2.800
acetileno	aire	2.100-2.400
acetileno	óxido nitroso	2.600-2.800
acetileno	oxígeno	3.050-3.150
hidrógeno	aire	2.000-2.100
hidrógeno	oxígeno	2.550-2.700

Información extraída de Skoog y col. (2015, p. 783).

Una vez que los analitos se encuentran como átomos, son capaces de absorber energía electromagnética adecuada y pasar al estado excitado. En este método, la fuente de radiación electromagnética más utilizada son las **lámparas de cátodo hueco**. Estas lámparas son específicas para el elemento que se quiera cuantificar permitiendo obtener curvas de calibración lineales y evitando interferencias con otros elementos. En su interior contienen un ánodo de tungsteno y un cátodo del elemento que se quiere cuantificar o con una fina capa del mismo. El funcionamiento consiste en la excitación del elemento del cátodo por una corriente eléctrica, generando una emisión de radiación electromagnética específica que incidirá sobre la muestra atomizada, donde se producirá la absorción por parte del analito. En la espectrofotometría de absorción atómica, se requiere que el ancho de banda del haz incidente sea muy estrecho para evitar interferencias con otros elementos, ya que las bandas de absorción son muy finas.

Luego de atravesar la zona de atomización en la que los analitos absorben energía del haz incidente, el haz emergente llega al monocromador que permitirá seleccionar la radiación electromagnética de la longitud de onda específica para cada elemento que impactará en el detector. El detector registra la potencia del haz luego de atravesar la zona de la llama donde se encuentran los analitos (P). Previamente a realizar las medidas, se debe ajustar el 100 % de transmitancia, utilizando agua ultrapura para nebulizar en lugar de la muestra, esta acción permite registrar la potencia del haz incidente (P_0). Seguidamente, el procesador de la señal brindará un valor de absorbancia a partir de la lectura de transmitancia.

Ejemplos de aplicación de espectrofotometría de absorción atómica

Determinación de zinc en plantas de trigo por espectrofotometría de absorción atómica

Debido a los sucesivos ciclos de cultivos, los suelos se empobrecen en nutrientes y generan deficiencias que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que repercute en el rendimiento y la calidad nutricional de los granos. El zinc (Zn) es un micronutriente esencial para las plantas, esto quiere decir que, aun cuando se necesita en cantidades muy pequeñas, es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de los cultivos. Un análisis de micronutrientes en plantas necesita de un método que sea selectivo a partir de una mezcla compleja y con gran capacidad de detección cuando el analito está en muy bajas concentraciones. En este sentido, la espectrofotometría de absorción atómica es una herramienta adecuada.

Procedimiento analítico basado en el trabajo de Buet y col. (p. 339, 2014)

Preparación de la muestra: 1-3 g de muestra de distintos órganos de las plantas (raíces, hojas y vástagos) se secan en estufa a 60 °C hasta peso constante; seguidamente se registra el peso seco (PS) de los mismos. A continuación, las muestras se colocan en viales de vidrio y se llevan a cenizas en mufla a 500 °C durante 6 h. Las cenizas se disuelven en 0,5 mL de ácido nítrico de calidad analítica y se diluyen con 3 mL de agua ultrapura, correspondiendo al volumen de disolución de las cenizas (Vd), (Figura 2.13).



Figura 2.13. Esquema de la preparación de la muestra.

Es conveniente, además, preparar un vial de control blanco, que se ponga en la mufla vacío y al que luego se le agregue ácido nítrico y agua ultrapura como se realiza con las muestras. Este control de blanco permitirá corregir el resultado por el aporte de las trazas de Zn presentes en el ácido nítrico y de los materiales utilizados en el procedimiento.

Curva de calibración: para realizarla, se utiliza sulfato de zinc (ZnSO_4 , PM: $287,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) certificado como patrón de referencia y agua ultrapura como solvente. Se prepara una solución madre (concentrada) de 50 ppm de Zn ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn) en un matraz aforado. Se debe tener en cuenta que, en cada mol de sulfato de zinc, hay un mol de Zn; por lo tanto, para preparar 1 litro de la solución madre, se deberán pesar 219,9 mg de ZnSO_4 y disolver en agua ultrapura. Una vez preparada la solución madre, se procede a preparar diluciones de la misma que serán las soluciones patrón que formarán la curva de calibración. Las concentraciones de dichas soluciones son 0,25; 0,50; 1,00 y 1,50 ppm de Zn. Además, se utiliza un patrón de 0 ppm que consiste en agua ultrapura.

Medición y obtención del resultado: para realizar la medida en el equipo, se selecciona e instala la lámpara de cátodo hueco del elemento que se pretende medir, en este caso, Zn. Se prende el equipo según las instrucciones de uso, que, por lo general, involucra la apertura y regulación de las llaves de los gases (acetileno y aire) para alimentar la llama; luego se enciende la llama e inmediatamente después se sumerge el capilar del sistema de nebulización de la muestra en agua ultrapura. El equipo se calibra estableciendo la longitud de onda de medición (213,9 nm para el Zn) y el cero de absorbancia con agua ultrapura. Luego se nebulizan los patrones de la curva de calibración de menor a mayor concentración. Se lava el sistema utilizando agua ultrapura y se nebulizan las muestras. Entre cada muestra, se debe realizar el lavado con agua ultrapura. Se registran los valores de absorbancia de cada patrón de la curva de calibración y de cada muestra. Se registra, además, el valor de absorbancia del vial de control blanco para luego corregir la absorbancia de las muestras. Hay equipos con software más sofisticado que realizan el cálculo de la ecuación de la curva de calibración y brindan el valor de concentración directamente.

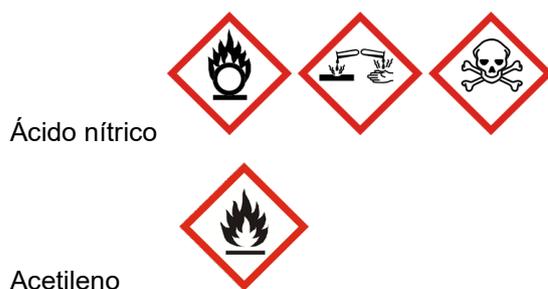
Cuando se mide una gran cantidad de muestras, es conveniente nebulizar un patrón de la curva de calibración para verificar que no haya desvíos durante el uso continuado del equipo. Idealmente se realiza esta acción cada 10 muestras. En caso de que se haya producido un desvío, se deberá calibrar nuevamente el equipo. En equipos más sofisticados, existe esta función, mediante la cual este proceso se realiza automáticamente.

Se revisa que cada muestra ingrese en el rango de medidas comprendido en la curva de calibración. En caso de que alguna muestra supere el rango de concentración, se debe preparar una dilución de la misma. Una vez realizadas las medidas, se obtendrán los resultados de concentración de Zn a partir de la curva de calibración utilizando los valores de absorbancia registrados. En equipos sofisticados, se cuenta con la función de generar la ecuación de la curva de calibración y por lo tanto la lectura de absorbancia se utiliza automáticamente para calcular la concentración del analito en la solución de las cenizas. En estos casos, es importante verificar el ajuste de la curva de calibración a una ecuación lineal. Fórmula de cálculo de la concentración de Zn en órganos vegetales:

$$\text{Concentración de Zn } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g PS}} \right) = \frac{Ac - b}{m} \cdot \frac{Vd \text{ (mL)}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{1 \text{ g}}{\text{PS (g)}}$$

donde Ac: absorbancia corregida ($A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$), b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, Vd: volumen de disolución de las cenizas (3,5 mL, en este caso), D: factor de dilución en las muestras que sea necesario preparar una dilución, PS: peso seco del órgano que se llevó a cenizas.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: durante el desarrollo del protocolo para realizar estas mediciones, hay varias cuestiones de seguridad a tener en cuenta. Respecto a los reactivos utilizados, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido nítrico, ya que corresponde a un ácido fuerte, corrosivo, comburente y tóxico por inhalación. Cuando se realiza la disolución de las cenizas hasta que se agrega agua se debe trabajar bajo campana, con el equipo de protección personal (guardapolvo, guantes y gafas). Luego, se puede trabajar en mesada, con el equipo de protección personal. Respecto a la utilización del equipo, es importante prestar atención a la composición de la mezcla de combustible (acetileno) y comburente (aire), ya que el acetileno es un gas inflamable que puede provocar incendios y explosiones. Se debe revisar regularmente el estado de los tubos y del sistema de compresión de aire.



Determinación de cobre en vinos por espectrofotometría de absorción atómica

La presencia de metales puede provocar alteraciones en el vino, entre las más comunes podemos mencionar la quiebra férrica y la quiebra cúprica. El vino pierde limpidez y se vuelve turbio; suelen generarse sedimentos blanquecinos, azulados, pardos o negruzcos, según el caso. Metales tales como el Cu y el Fe juegan un papel muy importante en la estabilidad, color, claridad e incluso afectan las características organolépticas de los vinos. Por tal motivo, es necesaria la determinación de cobre en vino a fin de controlar su calidad; para ello, se puede utilizar la espectrofotometría de absorción atómica.

Procedimiento analítico basado en el trabajo de Durguti y col. (p. 412, 2020)

Preparación de la muestra: se toma una alícuota de 10 mL, exactamente medidos, de la muestra de vino y se transfieren a un matraz aforado de 40 mL. Se agregan 0,80 mL de ácido nítrico de calidad analítica y se lleva a volumen final con agua ultrapura (Figura 2.14).

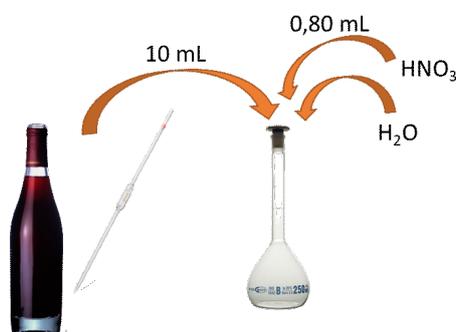


Figura 2.14. Esquema de la preparación de la muestra

Para realizar la curva de calibración se utiliza una solución madre de 1000 ppm de Cu (1000 mg·L⁻¹ de Cu) en ácido nítrico calidad analítica 2 %m/v. A partir de esta solución madre, se procede a preparar las soluciones patrón que formarán la curva de calibración. Se preparan soluciones de concentración 1,00; 5,00 y 10,00 ppm de Cu. Además, se realiza un patrón de 0 ppm que consiste en una solución de ácido nítrico calidad analítica 2 %m/v en agua ultrapura.

Medición y obtención del resultado: es muy similar al ejemplo anterior. Se debe seleccionar e instalar la lámpara de cátodo hueco del elemento que se pretende medir, en este caso, Cu. Se prende el equipo según las instrucciones de uso, que, por lo general, involucran la apertura y regulación de las llaves de los gases (acetileno y aire) para alimentar la llama. Luego se enciende la llama e inmediatamente después se sumerge el capilar del sistema de nebulización de la muestra en agua ultrapura. Posteriormente se establece la longitud de onda de medición (324,8 nm para el Cu) y el cero de absorbancia con agua ultrapura. Luego se procede de la misma manera que en el ejemplo anterior.

Los resultados se obtienen como se describió en el ejemplo anterior. Una vez realizado el gráfico, se debe obtener la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejará el valor de concentración para cada muestra, utilizando el correspondiente valor de absorbancia leído en el espectrofotómetro. Fórmula de cálculo de la concentración de Cu en vino:

$$\text{Concentración de Cu } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{Ac - b}{m} \cdot \frac{Vm \text{ (mL)}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1000}{a \text{ (mL)}}$$

donde Ac: absorbancia corregida ($A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$), b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, Vm: volumen del matraz (40 mL, en este caso), a: volumen de la alícuota utilizada para preparar una dilución.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: se deben tener en cuenta las mismas medidas de seguridad descriptas en el ejemplo anterior.



Ácido nítrico..



Acetileno

Espectrofotometría de emisión atómica

La espectrofotometría de emisión atómica se basa en la medida de la **luz emitida** por un **analito previamente excitado**, es decir, la radiación electromagnética característica que emiten **átomos** de un elemento en **estado vapor** cuando pasan de un estado excitado a su estado fundamental.

La muestra líquida debe ser atomizada, proceso similar al descrito para el caso de la espectrofotometría de absorción atómica. Si la fuente de energía que se utiliza es el calor de la llama, la técnica se denomina fotometría de llama (se presenta a continuación) y, si se utiliza un plasma de radiofrecuencias, la técnica se conoce como espectrofotometría de emisión con fuente de plasma.

Fotometría de llama

Fundamento del método

La excitación del analito se logra mediante el calor de una llama (energía térmica). El tiempo de vida del **átomo excitado** es breve y rápidamente vuelve al estado fundamental emitiendo luz de una longitud de onda característica (fotón: $E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$). La **señal de emisión** que se mide en el fotómetro de llama es directamente proporcional a la concentración del átomo que emite:

$$\text{Señal emisión} = k \cdot c$$

donde k : constante de proporcionalidad y c : concentración del analito cuya emisión se mide en el fotómetro de llama.

La temperatura máxima alcanzada por la llama de combustión ordinaria define para qué tipo de analitos se puede utilizar la técnica. En el fotómetro de llama se utiliza gas natural-aire como la mezcla combustible-comburente; en este caso, la temperatura máxima de la llama puede alcanzar 1.700-1.900 °C (ver Tabla 2.1.). Esta temperatura es relativamente baja y, por lo tanto,

sólo permite analizar analitos cuyos átomos sean fácilmente excitables, es decir, elementos del grupo 1 (metales alcalinos) y grupo 2 (metales alcalinotérreos) de la tabla periódica.

La llama debe cumplir los requisitos de tener una temperatura uniforme y lograr la combustión completa. La manera práctica de controlar que se cumplen estas condiciones es la observación de conos azules en la llama. Estos se logran mediante la regulación del caudal de combustible (gas natural) y comburente (aire).

¿Cuáles son los procesos que ocurren en la llama? Los procesos son comunes a los descritos en absorción atómica y fueron esquematizados en la Figura 2.11 para el caso del átomo de sodio como analito formando parte de una solución de salmuera (agua con sal común, NaCl). Sin embargo, en la espectrofotometría de emisión atómica, hay un proceso adicional que tiene lugar luego de la excitación de los átomos en estado vapor: la emisión de luz cuando los átomos excitados vuelven al estado fundamental (proceso de relajación). Siguiendo el ejemplo del sodio como analito, este último proceso involucra la relajación de los átomos de sodio excitados emitiendo luz de una longitud de onda de 589 nm (línea amarilla característica del sodio). La energía del fotón emitido se corresponde con la diferencia de energía entre ambos estados.

¿Qué pasa con los átomos de cloro de NaCl? Dado que es un elemento del grupo 7 de la tabla periódica (muchos electrones en la última capa) el calor de la llama aire-gas natural no es suficiente para excitarlo.

¿Qué pasa si en la muestra hay átomos de potasio y de calcio? Dado que son del grupo 1 y 2 respectivamente en la tabla periódica, estos átomos también se excitan con la energía de la llama aire-gas natural y emiten luz con una frecuencia característica para regresar al estado fundamental. Utilizando el filtro adecuado, el detector del fotómetro sólo recibirá la señal del sodio, aunque se pueden producir interferencias si dichos elementos se encuentran en una relación potasio:sodio > 5:1 y calcio:sodio > 10:1.

Descripción del equipo

El fotómetro de llama está compuesto por un sistema nebulizador, un sistema atomizador, un sistema óptico, un detector y un sistema para procesar y leer la señal (Figura 2.15).

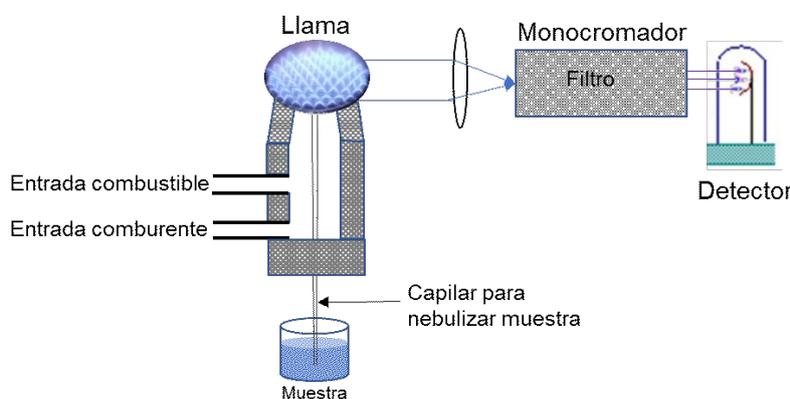


Figura 2.15. Esquema de los componentes básicos de un fotómetro de llama

¿Cuál es la diferencia con los componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica? Ambos equipos presentan varios componentes comunes (sistema de nebulización, sistema de atomización, monocromador, detector y procesador y lector de la señal); la diferencia radica en que en absorción atómica se requiere un componente adicional: una fuente de luz (comparar las Figuras 2.12 y 2.15).

Descripción de los componentes del fotómetro de llama:

- Sistema nebulizador: sistema que toma la muestra a analizar y la coloca directamente como pequeñas gotas sobre la llama a través de un capilar.
- Sistema atomizador: entrada de aire (comburente) y entrada de gas natural (combustible), ambas con regulador de presión que generarán la llama.
- Llama: lugar donde la muestra pasa por una serie de procesos que terminarán con la emisión de luz por parte de los componentes de la muestra que logran excitarse.
- Sistema óptico: un filtro que permite seleccionar la longitud de onda que llega al detector; es decir, seleccionará de todas las emisiones que se producen en la llama, aquella que corresponde al analito que queremos cuantificar.
- Detector: fototubo
- Procesador y lector de la señal.

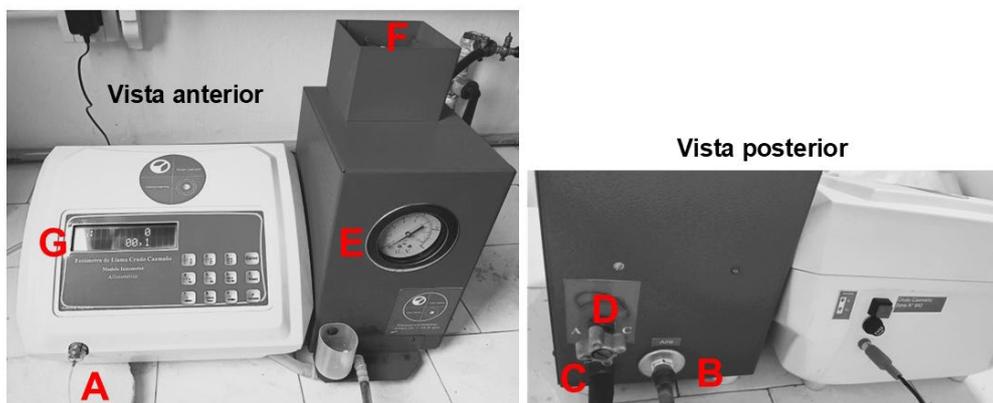


Figura 2.16. Fotografías del fotómetro de llama Crudo Ionometer - Crudo Camaaño.

A Aguja de nebulizador, **B** Oliva entrada de aire, **C** Oliva entrada de gas natural, **D** Válvula reguladora de gas natural, **E** Manómetro de presión de aire, **F** Visor de llama en el mechero y **G** Visualizador de cristal líquido para lectura.

En la Figura 2.16, se muestran fotografías de un fotómetro de llama comercial donde se indican los componentes que pueden identificarse externamente.

¿Cómo se puede determinar la concentración de un analito utilizando el fotómetro de llama?

Se utiliza el método de la curva de calibración. Se preparan soluciones de concentración conocida del analito que queremos cuantificar y se miden en el fotómetro de llama, registrando la señal de emisión correspondiente. La recta de calibración obtenida será la referencia para transformar la señal de emisión de cualquier muestra desconocida en un valor de concentración para el analito estudiado.

Las posibles fuentes de error en la fotometría de llama pueden ser de dos tipos:

- Factores instrumentales: son los que dependen de las características del equipo y de los parámetros controlables, tales como tipo de mechero, características de la llama, presión de combustible y comburente, etc. En la práctica, se ajustan las variables operacionales de modo de obtener la máxima señal de la solución del analito y se mantienen constantes durante toda la medida. Por lo tanto, cada vez que se procesen muestras se debe realizar la curva de calibración correspondiente.
- Factores asociados a la composición de la muestra (matriz) que generen posibles interferencias: los aniones que forman la sal determinan la facilidad de la disociación en vapor atómico (cloruros y nitratos se disocian fácilmente, sulfatos y fosfatos son más difíciles), componentes de la muestra que emiten fotones de λ cercanas y componentes que se ionizan más fácilmente que el analito.

Ejemplos de aplicación de fotometría de llama

Análisis del contenido de potasio en tejidos vegetales por fotometría de llama

Es una práctica de rutina controlar el estado nutricional de un cultivo mediante un análisis foliar donde se determina el contenido en hojas de nitrógeno, fósforo y potasio, conocido como NPK. El potasio es uno de los macronutrientes que necesitan las plantas. Es un ion intracelular que cumple funciones muy importantes como mantenimiento de la turgencia, activador de muchas enzimas (ATPasas) y es indispensable para el adecuado funcionamiento de los estomas a través de los cuales las plantas realizan su intercambio de gases. El análisis de potasio se realiza habitualmente por fotometría de emisión a la llama.

Procedimiento analítico basado en los trabajos de Rolny y col. (2011) y Samar Raza y col. (2013)

Preparación de la muestra: se pesan de 1 a 3 g de hojas frescas, se secan en estufa a 70 °C por 48 h. Luego se llevan a cenizas, utilizando una mufla a 500 °C por 2 h. Las cenizas obtenidas se digieren con una solución de ácido clorhídrico 0,005 M en un matraz aforado de 50 mL.

Curva de calibración: se utiliza una solución patrón de 500 mg·L⁻¹ (ppm) de potasio preparada a partir de KCl (PM: 74,55 g·mol⁻¹) grado analítico, previamente secado en estufa a 105 °C por 1 h. Las diluciones de trabajo (rango 0-50 ppm) se preparan diariamente con agua destilada.

Medición y obtención del resultado: se conecta el fotómetro de llama siguiendo las instrucciones de uso. Se abren las entradas de los gases (aire y gas natural) y se enciende la llama. Se selecciona el filtro adecuado, según el elemento a medir, potasio en este caso. Se sumerge el capilar del sistema de nebulización en agua destilada y se ajusta el cero de señal de emisión. Posteriormente, se nebuliza la solución de mayor contenido del analito y se ajusta el máximo de la escala. Finalmente, se nebulizan las soluciones de concentración conocida de patrón en orden creciente. Se lava el sistema utilizando agua destilada y se nebulizan las muestras. Entre cada

muestra, se lava el sistema con agua destilada. Se registran los valores de señal de emisión de cada solución de concentración conocida de la curva de calibración y de cada muestra.

Se construye la curva de calibración con la serie de datos de pares ordenados (c , S), donde c : concentración de potasio (ppm) y S : señal de emisión de potasio. Fórmula de cálculo:

$$\text{Concentración de potasio } \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{S - b}{m} \cdot \frac{V (mL)}{1000 mL} \cdot \frac{1 g}{a (g)}$$

donde S : señal emisión, b : ordenada al origen de la ecuación de la recta, m : pendiente de la ecuación de la recta, V : volumen solución cenizas (50 mL en este caso), a alícuota de muestra (1 g en este caso).

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado.

Determinación de Cd en muestras de tejido vegetal por la técnica de espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo

Las plantas pueden presentar elevados niveles tanto de elementos esenciales como no esenciales, de procedencia natural o antropogénica. Algunas plantas que crecen en suelos contaminados han desarrollado la capacidad de acumular grandes cantidades de metales y metaloides en sus tejidos, sin presentar síntomas de toxicidad. Esta característica es la base de la fitorremediación de suelos y aguas. Los elementos tóxicos que suelen ser acumulados más fácilmente por las plantas son As, Cd y Pb. El contenido de estos metales en plantas se puede determinar por espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo.

Procedimiento analítico basado en el trabajo de García Salgado y col. (2009)

Preparación de la muestra: se selecciona la parte aérea del vegetal, se tritura y seca antes de su digestión. La digestión de la muestra vegetal se realiza mediante el calentamiento en horno de microondas. Para ello, se pesan con exactitud aproximadamente 250 mg de muestra y se colocan en un vaso de teflón. La muestra se digiere con 10 mL de ácido nítrico al 70 %v/v. Se aplica un programa de digestión que comprende una rampa de temperatura de 200 °C durante 15 min y un tiempo de permanencia de 10 min a esta temperatura. Las muestras digeridas se diluyen a 25 mL con agua destilada.

Curva de calibración: se utiliza una solución patrón de grado analítico de 1.000 mg·L⁻¹ del elemento a analizar. Las diluciones de trabajo se preparan diariamente con agua destilada.

Medición y obtención del resultado: características analíticas para Cd, longitud de onda seleccionada 226,5 nm, límite de detección 0,08 µg·g⁻¹, límite de cuantificación 0,3 µg·g⁻¹; la precisión del método, evaluada como desviación estándar relativa, es de 0,6 µg·g⁻¹. Las muestras vegetales digeridas se analizan mediante un espectrómetro de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (reconocido como ICP de acuerdo con las siglas en inglés de *Inductively Coupled Plasma*). Se ha demostrado que el contenido elemental para las muestras vegetales recogidas en

suelos contaminados por metales presenta una gran variabilidad en función del tipo de especie de planta. El nivel de concentración de cadmio puede oscilar entre valores inferiores al límite de cuantificación ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y $19,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Fórmula de cálculo de la concentración de cadmio:

$$\text{Concentración de cadmio } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = \frac{Sd - b}{m} \cdot \frac{V (\text{mL})}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{PS (\text{g})}$$

donde Sd : señal emisión de muestra diluida, b : ordenada al origen de la ecuación de la recta, m : pendiente de la ecuación de la recta, V : volumen de solución (25 mL en este caso), PS : peso seco de hojas (0,25 g en este caso).

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica, a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado. En particular, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido inorgánico concentrado y de la solución patrón del elemento metálico, de acuerdo con los pictogramas correspondientes:



Ácido nítrico ..



Cadmio solución 1000 ppm

Turbidimetría

La **turbidimetría**, como su nombre lo indica, nos permite medir la turbidez de una suspensión. Pero ¿qué es la turbidez? Se entiende por turbidez la falta de transparencia de un líquido debida a la presencia de partículas en suspensión. Cuanto mayor sea la cantidad de sólidos suspendidos en el líquido, mayor será el grado de turbidez.

Para medir la concentración de un analito por este método es necesario que el analito (o un producto de reacción del analito) presente en la muestra a analizar, esté suspendido en el líquido de análisis y es indispensable que esa suspensión (mezcla heterogénea compuesta por un sólido que se dispersa en un medio líquido) sea uniforme.

Fundamento del método

El método se basa en el grado de **atenuación**, es decir, la disminución de la potencia, que experimenta un **haz de luz que se propaga a través de una suspensión**. La atenuación se

produce debido a tres fenómenos: 1- reflexión (la luz regresa con un ángulo igual al de incidencia), 2- absorción (la partícula absorbe parte de la energía lumínica) y 3- dispersión (desviación de la dirección de la luz incidente) que experimenta la luz cuando la muestra suspendida en el medio interfiere con ésta. El fenómeno de **dispersión** de la luz por parte del analito es el más importante en este método. Cuando la luz atraviesa la muestra se dispersa en todas direcciones (Figura 2.17). La luz dispersada se ve afectada por la longitud de onda de la luz incidente, ya que la luz azul (430-450 nm) se dispersa en mayor medida que la amarilla (570 nm) o roja (650 nm), proporcionando una sensibilidad más alta. También se ve afectada por propiedades de la materia, como el tamaño de las partículas y el índice de refracción (para profundizar se recomienda la lectura de Rubinson y Rubinson, 2001, p. 296-297).

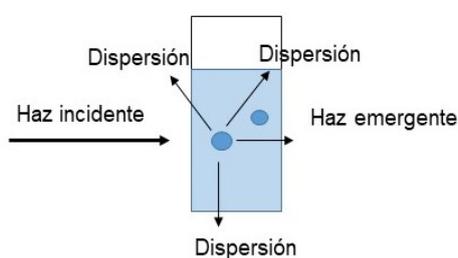


Figura 2.17. Esquema que representa el fenómeno de dispersión de un haz de luz que se propaga a través de una suspensión

Los métodos instrumentales que se basan en medir la luz dispersada por las partículas presentes en la muestra son la **turbidimetría** y la **nefelometría**.

¿En qué se diferencian la turbidimetría y la nefelometría?

En la turbidimetría se mide la disminución de la intensidad de la luz luego de atravesar la muestra turbia. Para ello, es necesario que el haz de luz incidente y el detector del equipo estén en la misma dirección (Figura 2.18). En este método se cuantifica la **luz transmitida**, por lo tanto, se mide indirectamente la luz dispersada. La sensibilidad de la turbidimetría está limitada por la exactitud y sensibilidad del instrumento utilizado ya que depende de la capacidad del detector del equipo para registrar pequeños cambios en la intensidad de la luz. El equipo específico utilizado para este método se denomina turbidímetro; en el mercado se encuentran dos versiones: portátil y de mesada. Sin embargo, generalmente se utiliza el espectrofotómetro UV-visible para medir la dispersión de luz de manera indirecta, ya que en su configuración tiene el detector en la misma dirección que el haz de luz incidente (ver Figura 2.10).

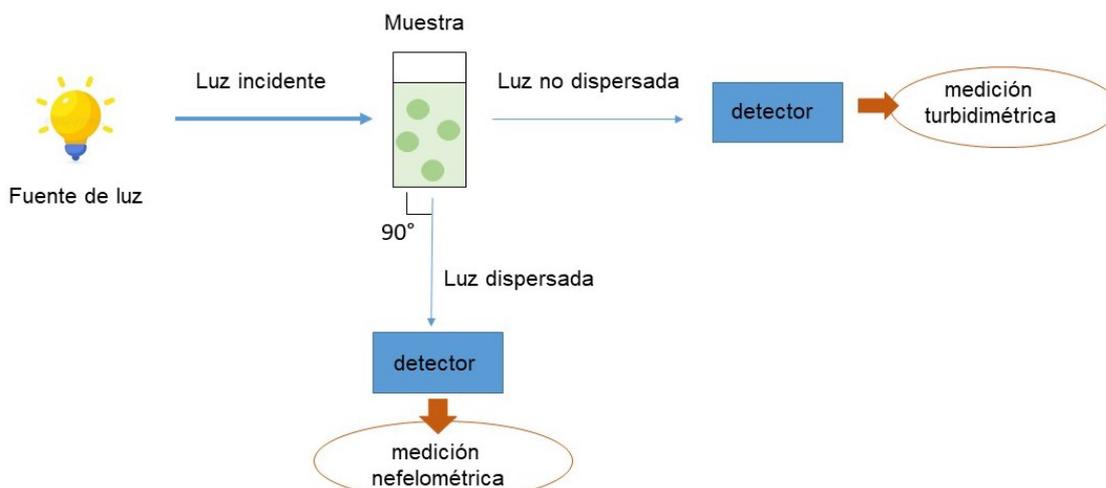


Figura 2.18. Esquema comparativo entre la medición turbidimétrica y nefelométrica. En turbidimetría el detector se encuentra en la misma dirección que la luz incidente, mientras que en nefelometría el detector se encuentra en un ángulo diferente al plano, en este esquema se ubica a 90°.

En la nefelometría se mide la **luz dispersada** en una dirección determinada (en general se define a 90°) por las partículas presentes en la suspensión (Figura 2.18). Por lo tanto, se mide directamente la luz dispersada y resulta un método más sensible que la turbidimetría, por lo que es recomendado para mezclas con muy baja turbidez. Para la nefelometría es necesario emplear un equipo con características específicas, que recibe el nombre de nefelómetro. En este equipo la unidad de medición se llama Unidad de Turbidez Nefelométrica (UTN). En la Figura 2.19 se presenta un nefelómetro portátil.



Figura 2.19. Imagen de Nefelómetro portátil C-102 HANNA Instruments y sus cubetas. La flecha indica la cavidad donde se debe ubicar la cubeta con la solución a medir.

Descripción del equipo

Un nefelómetro portátil está compuesto por una fuente de luz (pueden ser lámparas de tungsteno, láser, LEDs), la cubeta (recipiente generalmente prismático o cilíndrico, que puede tener diferentes tamaños), el detector (fototubo) y el procesador y lector de la señal.

Fuentes de error del nefelómetro portátil:

- Cubetas: cualquier agente externo a la solución en estudio, que se encuentre dentro o fuera de la cubeta, altera el trayecto de la luz hacia el detector (cubetas defectuosas, rayadas, polvo o grasa adheridos a las paredes de las mismas).
- Interferencias: la presencia de algún contaminante microbiano o burbujas pueden elevar la intensidad de la dispersión. Los compuestos fluorescentes que al ser excitados por la luz incidente provocan lecturas erróneas y elevadas de la densidad de dispersión.
- Conservación de los reactivos: la temperatura inadecuada del sistema podría causar condiciones adversas al estudio y podría generar la presencia de reactivos turbios o con precipitados.
- Fluctuaciones en la potencia eléctrica: para evitar que la luz incidente sea una fuente de error se recomienda chequear la carga de la batería para tener un haz de luz uniforme.

¿Cómo se puede determinar la concentración de un analito utilizando la turbidimetría?

Para determinar la concentración de un analito (C) por esta técnica, independientemente de si se trabaja con un espectrofotómetro UV-visible o un nefelómetro, se debe utilizar el método de la curva de calibración explicado en el Capítulo 1 (Figura 2.20).

C analito (ppm) (X)	UTN (Y)
0	0,0
2	1,5
4	3,0
6	5,0
8	6,0
10	8,0

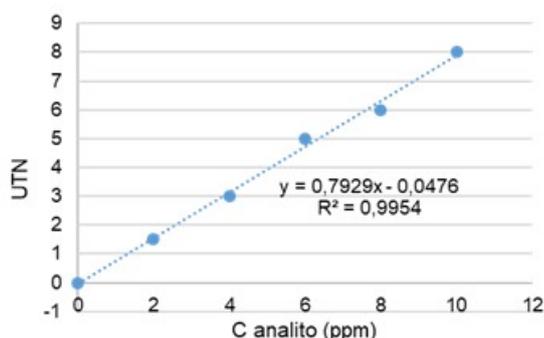


Figura 2.20. Ejemplo de tabla de datos de pares ordenados (x,y) y curva de calibración. UTN (Unidad de Turbidez Nefelométrica).

Ejemplos de aplicación de turbidimetría

Determinación turbidimétrica de sulfato en fertilizantes inorgánicos

El azufre, junto al calcio y el magnesio, es uno de los tres nutrientes secundarios que requieren las plantas para un crecimiento normal y saludable. Las plantas adquieren azufre del sustrato como sulfato. Cuando un cultivo presenta deficiencias en el crecimiento compatibles con un déficit de nutrientes, aun cuando se aplica un plan de fertilización adecuado, se hace necesario analizar la composición de los fertilizantes utilizados. En este contexto surge la necesidad de controlar el aporte de azufre (S) de los fertilizantes utilizados.

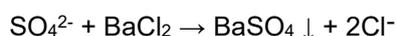
Procedimiento analítico basado en el trabajo de Carrillo de Cori y col. (2010)

Preparación de la muestra: se pesa 1 g de muestra (si el producto a analizar contiene más de 10 % de S ó 2 g si contiene menos de 10 %). Se transfiere a un vaso de precipitado, se añaden

15 mL de HCl concentrado y se hierve por 5 a 10 min en plancha eléctrica bajo campana extractora de gases. A continuación, se añaden 100 mL de agua destilada caliente (40-50 °C), se mezcla, se trasvasa a un matraz aforado de 250 mL, se deja enfriar a temperatura ambiente, se enrasa y se filtra. Se diluye una alícuota de 5 mL de este extracto a un volumen total de 100 mL con agua destilada. Asimismo, se prepara un blanco de reactivos en el cual el volumen de muestra se sustituye por agua destilada sometida al mismo tratamiento preliminar y se procede de igual forma que con la muestra.

Reacción turbidimétrica: se transfieren 25 mL de esta última solución a un erlenmeyer y se agregan 5 mL de HCl 2 M, 1 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina 5 % (m/v) y 0,5 g de BaCl₂ previamente pulverizado. Se agregan 2 mL de solución de goma arábiga 0,25 % (m/v). Se agita. Se deja en reposo 30 min.

La reacción se basa en la precipitación del S presente en el fertilizante en forma de sulfato (SO₄²⁻), mediante la adición de cloruro de bario (BaCl₂) para formar sulfato de bario (BaSO₄), que al precipitar dará la turbidez. Con el agregado de goma arábiga ese precipitado se mantendrá en suspensión.



Curva de calibración: como patrón, se utiliza una solución madre de 100 mg·L⁻¹ (ppm) de sulfato como K₂SO₄ (PM:174,259 g·mol⁻¹) grado analítico, previamente secado en estufa a 105 °C por 1 h. A partir de esta solución madre, se procede a preparar las soluciones patrones que formarán la curva de calibración. Se preparan las soluciones en matraces de 25 mL de concentraciones 0; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 y 5,00 ppm de SO₄²⁻. Se homogeneizan y se pasan a erlenmeyers. Se continúa con la reacción turbidimétrica.

Medición y obtención de resultados: se utiliza un espectrofotómetro UV-visible por lo que se debe seleccionar la longitud de onda de trabajo, en este caso 420 nm. Se comienza midiendo los puntos de la curva de calibración. Se registran los valores de absorbancia. Antes de medir el blanco y la muestra, se debe enjuagar la cubeta con agua destilada y con una porción de las mismas, según corresponda. Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivos y se mide la absorbancia de la muestra a la longitud de onda seleccionada. Registrar los valores de absorbancia. Se debe revisar que el valor de absorbancia para la muestra ingrese en el rango de medidas comprendido en la curva de calibración. En caso de que supere el rango se debe preparar una solución más diluida.

Para el cálculo de resultados, primero se debe verificar el ajuste de la curva de calibración a una ecuación lineal. Se deberá graficar la curva de calibración a partir de los datos registrados de absorbancia y la concentración de los patrones. Una vez realizado el gráfico, se debe obtener la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejará el valor de concentración para la muestra, utilizando el correspondiente valor de absorbancia. Una vez obtenido ese valor en ppm, se procede a realizar los cálculos para expresar el resultado en % m/m, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y la alícuota de muestra utilizada. Fórmula de cálculo de la concentración de SO₄²⁻ en el fertilizante:

$$\text{Concentración } S - SO_4^{2-} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{Ac - b}{m} \cdot \frac{Vd (mL)}{1000 mL} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{100}{PS (g)}$$

donde Ac : absorbancia corregida ($A_{muestra} - A_{blanco}$), b : ordenada al origen de la ecuación de la recta, m : pendiente de la ecuación de la recta, Vd : volumen de disolución de muestra (250 mL, en este caso), D : factor de dilución en las muestras que sea necesario para preparar una dilución, PS : peso de la muestra de fertilizante.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos utilizados: durante el desarrollo del protocolo para realizar estas mediciones, hay varias cuestiones de seguridad a tener en cuenta. Respecto a los reactivos utilizados, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido clorhídrico concentrado, ya que corresponde a un ácido fuerte, corrosivo, comburente y tóxico por inhalación, riesgo de quemadura por contacto. Se debe trabajar bajo campana extractora de gases y con el equipo de protección personal (guardapolvo, guantes y gafas).



Ácido clorhídrico

Determinación turbidimétrica de ceras en aceites vegetales

Los aceites vegetales, por ejemplo, aceite de girasol, contienen ceras, las que se eliminan durante el proceso de refinación (descerado o winterización). Si el contenido de ceras es elevado afectará a la calidad del aceite. En general una elevada turbidez se asocia tanto a una baja eficiencia en el proceso de refinación como a condiciones inadecuadas de almacenamiento de las semillas de girasol. Por lo tanto, una práctica frecuente en las refinerías de aceites es la medida del contenido de ceras por turbidimetría.

Procedimiento analítico basado en los trabajos de Martini (2003) y Martini S. y Añón M.C. (2000)

Preparación de la muestra: las muestras de aceite de girasol comercial (refinado) se calientan por 90 min a 110 °C para asegurar la fusión completa de las ceras, si es que las hay. Luego se enfrían en un baño de agua-hielo hasta 21 °C.

Curva de calibración: como patrones se utilizan soluciones conocidas de diferentes concentraciones de ceras en aceite. Para ello, primero se centrifuga aceite crudo de girasol a 3000 xg por 60 min a 0 °C para obtener un aceite libre de ceras. De esta manera, se eliminan por precipitación las ceras que cristalizan a 0 °C. Segundo, el remanente de las ceras se purifica por filtración del aceite a través de un embudo Buchner. El residuo sólido obtenido se lava varias veces con éter de petróleo a 0 °C. Las ceras obtenidas se purifican con sucesivas extracciones con hexano en caliente, luego se centrifugan a 3000 xg por 30 min a 0 °C. Por último, esas ceras se pesan y se disuelven en el aceite libre de ceras para obtener soluciones de concentraciones

conocidas de ceras en el orden de 0 a 1.000 mg·L⁻¹. Cada mezcla (patrones) se calienta por 90 min a 110 °C y finalmente, se enfrían en baños de agua-hielo hasta los 21 °C.

Medición y obtención del resultado: se realiza en Unidades de Turbidez Nefelométrica (UTN) usando un nefelómetro con fuente de luz de tungsteno. El equipo se calibra con una solución estándar de formazina estabilizada, como lo indica el fabricante. Luego se procede a obtener los valores de UTN que se corresponden con un valor de concentración en ppm de las soluciones patrones de ceras, dando origen así a la curva de calibración.

Para el cálculo de resultados primero se debe verificar el ajuste de la curva de calibración a una ecuación lineal. Se deberá graficar la curva de calibración a partir de los datos registrados de UTN y la concentración de los patrones. Una vez realizado el gráfico, se debe obtener la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejará el valor de concentración para la muestra, utilizando el correspondiente valor de UTN obtenido. Obtendremos el resultado en ppm, es decir, mg de ceras por litro de aceite refinado.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y la muestra: durante el desarrollo del protocolo para realizar estas mediciones, hay varias cuestiones de seguridad a tener en cuenta. Respecto a los reactivos utilizados, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación. El éter de petróleo es muy inflamable e irritante y tóxico por inhalación. El hexano es inflamable, corrosivo e irritante, se usa caliente y por lo tanto desprende gases y vapores. En ambos casos, se debe trabajar bajo campana extractora de gases y con el equipo de protección personal (guardapolvo, guantes y gafas). Máxima precaución al desechar los residuos ya que son tóxicos para el medioambiente. Respecto a la muestra, debemos tener cuidado con su manipulación en caliente.



Éter de petróleo /hexano

Publicaciones científicas donde se aplicaron los métodos estudiados en el capítulo

An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. (2014) A. Buet, J.I. Morinconi, G.E. Santa-María, M. Simontacchi. *Plant Physiology and Biochemistry* 83:337-345.

El efecto de la adición del dador de óxido nítrico, S-nitrosoglutatión (GSNO) sobre el estado nutricional de zinc fue evaluado en plantas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) cultivadas hidropónicamente. La adición de GSNO en plantas deprivadas en Zn no modificó la acumulación de biomasa, pero aceleró la senescencia foliar en un modo concomitante con la disminución acelerada de la distribución de Zn a vástago. En plantas con nutrición adecuada, la concentración de Zn tanto en raíces como vástago disminuyó debido a la exposición prolongada a

GSNO. La evaluación adicional de la tasa neta de absorción de Zn durante la recuperación de la privación prolongada de Zn reveló que el aumento de la acumulación de Zn fue parcialmente bloqueado cuando el GSNO estaba presente en el medio de absorción. Este efecto sobre la absorción fue asociado mayormente al cambio en la translocación de Zn a vástago. Nuestros resultados sugieren un rol para el GSNO en la modulación de la absorción y translocación a vástago de Zn durante la transición de suministro de Zn de niveles deficientes a adecuados.

En este trabajo, la aplicación del método de absorción atómica permitió determinar la concentración de Zn en los diferentes órganos y su distribución en plantas de trigo cultivadas en hidroponía con niveles suficientes y deficientes de Zn. La cuantificación de este elemento en los diferentes órganos permitió calcular la tasa neta de absorción y translocación en experimentos de recuperación, donde plantas privadas de Zn fueron traspasadas a un medio con niveles óptimos de este micronutriente.

Nitrogen fertilization increases ammonium accumulation during senescence of barley leaves. (2016). N. Rolny, M. Bayardo, J. Guiamet, L. Costa. *Acta Physiologia Plantarum* 38:89-100.

La senescencia de hojas es una etapa del desarrollo caracterizado por dos eventos: 1- la completa degradación de los cloroplastos, y 2- la removilización del nitrógeno hacia otras partes de la planta. Durante la senescencia las proteínas de los cloroplastos son degradadas en aminoácidos y amonio. La mayor parte del amonio es re-asimilado en aminoácidos para exportarse desde las hojas senescentes hacia otras partes de la planta, mientras que una menor porción se pierde como amoníaco emitido desde las hojas. El contenido de amonio emitido depende del amonio acumulado en la cavidad subestomática de las células del mesófilo, el cual es continuamente suministrado con amonio desde el citoplasma. La acumulación de amonio en los tejidos podría incrementar la posibilidad de perder nitrógeno como amoníaco emitido. Los resultados sugirieron que durante la senescencia de hojas de cebada la degradación de proteínas estuvo acompañada por la acumulación transitoria de amonio en ambos estadios de desarrollo. El pico de acumulación de amonio ocurrió inmediatamente después de la mayor degradación de proteínas en todas las muestras analizadas, después de eso los niveles de amonio cayeron sustancialmente. Un incremento significativo del pico de concentración de amonio fue observado cuando las dosis de fertilizante nitrogenado se incrementaron, principalmente en el estado reproductivo.

En este trabajo, la aplicación de la espectrofotometría de absorción molecular permitió cuantificar el contenido de proteínas y amonio en hojas, aportando resultados que permitieron el estudio del efecto de la fertilización nitrogenada en el metabolismo del nitrógeno durante la senescencia de hojas de cebada en dos estadios de desarrollo, el vegetativo y el reproductivo.

Referencias

- Buet A., Moriconi J. I., Santa-María G. E. y Simontacchi M. (2014). An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 337-345.
- Carrillo de Cori C., Ruiz M., Aular M., Mora R., Castillo L., Arrieché I., Díaz T., Fernández S., Noguera R., Martínez A. y Tovaret M. (2010). Un método turbidimétrico para determinar azufre en fertilizantes inorgánicos. *Venesuelos*, 18, 6-15. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/303920880_Un_metodo_turbidimetrico_para_determinar_azufre_en_fertilizantes_inorganicos
- Durguti, V., Aliu, S., Laha, F., y Feka, F. (2020). Determination of Iron, Copper and Zinc in the Wine by FAAS. *Emerging Science Journal*, 4(5), 411-417.
- García Salgado, S., Quijano Nieto, A. y Bonilla Simón, M. (2009). Análisis multielemental mediante ICP-AES de plantas autóctonas procedentes de la zona minera de Bustarviejo (Madrid). *V IBEROLAB, Requisitos Técnicos 0074*, 361-364.
- Kitson, R. E., y Mellon, M. G. (1944). Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), 379-383.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Martini S. (2003). *Cristalización de ceras en aceite de girasol* (Tesis de doctorado). Recuperada de Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata SEDICI.
- Martini S. y Añón M.C. (2000). Determination of wax concentration in sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 1087-1092.
- Olives Barba, A. I., Cámara Hurtado, M., Sánchez Mata, M. C., Fernández Ruiz, V. y López Sáenz de Tejada, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and b-carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95, 328-336.
- Ramos-Artuso F., Galatro A., Buet A., Santa-María G. y Simontacchi M. (2018). Key acclimation responses to phosphorus deficiency in maize plants are influenced by exogenous nitric oxide. *Journal of Plant Physiology*, 222, 51-58.
- Rolny, N., Bayardo, M., Guiamet, J. J., y Costa, L. (2016). Nitrogen fertilization increases ammonium accumulation during senescence of barley leaves. *Acta physiologiae plantarum*, 38, 89-100.
- Rolny, N., Costa, L., Carrión, C. y Guiamet, J. J. (2011). Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1220-1227.
- Rubinson K. y Rubinson J. (2001). *Química Analítica Contemporánea*. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A.
- Sadzawka, R.A., Carrasco, M.A.R., Demanet, R.F., Flores, H.P., Grez, R.Z., Mora, M.L.G., Neaman, A. (2007). *Métodos de análisis de tejidos vegetales*. INIA.

- Samar Raza, M. A., Farrukh Saleem, M., Mustafa Shah, G., Jamil, M. y Haider Khan I. (2013). Potassium applied under drought improves physiological and nutrient uptake performances of wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 175-185.
- Skoog, D. A., West, D.M., Holler, F.J. y Crouch, S.R (2015). *Fundamentos de química analítica*. Cengage Learning.

CAPÍTULO 3

Métodos cromatográficos

Lorenza Costa, Luciana M. Julio y Vanesa Y. Ixtaina

Introducción

Cromatografía es el término con el que se denomina a un conjunto de métodos analíticos utilizados para separar, identificar y cuantificar los componentes de una muestra. Mediante una cromatografía es posible separar analitos muy parecidos entre sí en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, nos permite separar mezclas de aminoácidos, de proteínas, de ácidos grasos, de pigmentos, de pesticidas, entre otros.

Para realizar una cromatografía se necesitan dos fases (fase estacionaria y fase móvil) y un soporte:

Fase estacionaria (FE): es un componente que está contenido en un soporte adecuado y, como su nombre lo indica, permanece fijo en un espacio determinado. Puede ser **sólida** o **líquida**.

Fase móvil (FM): es un compuesto químico, o una mezcla sencilla de compuestos químicos y, como su nombre lo indica, debe fluir (moverse) a través de la fase estacionaria. La fase móvil es la que arrastra a la muestra obligándola a atravesar la fase estacionaria. Puede ser **líquida** o **gaseosa**.

Por lo tanto, en toda cromatografía hay una **fase estacionaria** inmovilizada en un **soporte** y una **fase móvil** que arrastra a la muestra a través de la **fase estacionaria**. Durante este proceso, cada componente de la muestra se va a desplazar según sus propias características fisicoquímicas, las cuales van a determinar que interaccione más con la fase estacionaria o que prefiera a la fase móvil. El concepto general es que aquellos analitos que interaccionen más con la fase estacionaria serán más retenidos, es decir, irán quedando más atrasados, mientras que aquellos que interaccionen más con la fase móvil se desplazarán más rápido. Así, los **analitos** se desplazan a diferentes velocidades dependiendo de su **afinidad** por cada fase, logrando separarse.

Este método fue utilizado por primera vez en el año 1903 por el botánico ruso M. Tswett con el fin de separar pigmentos vegetales presentes en extractos de hojas. Este investigador utilizó carbonato de calcio (adsorbente) como fase estacionaria contenida en una columna de vidrio y mezclas de éter de petróleo/etanol como fase móvil para separar dichos pigmentos. El resultado obtenido fue una serie de bandas coloreadas (verdes, naranjas y amarillas correspondientes a clorofilas, carotenos y xantófilas). En base a estos resultados, fue en 1906 cuando este investigador utilizó el término cromatografía para denominar a este método de separación, término que deriva del griego *chroma* que significa color y *graphein* que significa escribir.

Clasificación

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse según diferentes criterios. Entre estas clasificaciones podemos mencionar las siguientes:

- Según el **estado de agregación** de las fases
- Según el **mecanismo fisicoquímico** por el que se produce la separación de los analitos
- Según el **soporte** que contiene a la fase estacionaria

a. Según el estado de agregación de las fases

Debido a que la fase móvil puede ser líquida o gaseosa y la fase estacionaria sólida o líquida, los tipos de cromatografía, según este criterio de clasificación, pueden ser: gas-líquido, gas-sólido, líquido-líquido y líquido-sólido (Tabla 3.1).

Fase móvil	Fase estacionaria	Cromatografía
Gas	Líquido (no volátil)	CGL
	Sólido	CGS
Líquido	Líquido (no volátil)	CLL
	Sólido	CLS

Tabla 3.1. Tipos de cromatografía según el estado de agregación de las fases

La cromatografía en la cual la fase móvil es un **gas** se conoce como **cromatografía de gases** o **cromatografía gaseosa**, mientras que cuando la fase móvil es un líquido se denomina **cromatografía líquida**.

b. Según el proceso fisicoquímico que se pone en juego para la separación de los analitos

Los analitos se separan según su afinidad diferencial (interacción) por la fase estacionaria o la fase móvil, la que puede darse por diversos mecanismos fisicoquímicos. Los principales tipos de cromatografía según este criterio de clasificación se presentan en la Tabla 3.2.

Para las cromatografías de reparto y de adsorción donde el mecanismo de interacción se basa en la polaridad de las fases y de los analitos, se denomina **cromatografía en fase normal** cuando la fase estacionaria es la más polar y **cromatografía en fase reversa** cuando la fase móvil es la más polar.

c. Según el soporte que contiene a la fase estacionaria:

La fase estacionaria puede estar contenida sobre un soporte plano (puede ser una placa plana o una hoja de papel especial), dando lugar a la **cromatografía plana**, o dentro de un tubo o

capilar, dando lugar a la cromatografía en columna. La Tabla 3.3 muestra las cromatografías según el tipo de soporte específico que contiene a la fase estacionaria.

Nombre	Algunas características
Cromatografía de reparto	<p>FE: líquido</p> <p>FM: líquido o gas</p> <p>Los analitos se reparten entre las dos fases según su polaridad</p>
Cromatografía de adsorción	<p>FE: sólido</p> <p>FM: líquido o gas</p> <p>Los analitos son adsorbidos por el sólido según su polaridad</p>
Cromatografía de intercambio iónico	<p>FE: resina (sólido) con grupos unidos covalentemente de carga opuesta al ion que intercambian. Hay resinas de intercambio catiónico (con grupos sulfónicos negativos unidos covalentemente) y resinas de intercambio aniónico (con grupos aminas cuaternarias positivas unidos covalentemente).</p> <p>FM: líquido</p> <p>Se basa en la atracción entre cargas opuestas</p>
Cromatografía de exclusión molecular	<p>FE: gel poroso</p> <p>FM: líquido / gas</p> <p>Separa los analitos por tamaño. Los poros del gel serán atravesados por las moléculas pequeñas, pero no por las moléculas grandes. Las moléculas pequeñas tardarán más en atravesar la fase estacionaria.</p>
Cromatografía de afinidad	<p>FE: especialmente diseñada para retener un analito en particular presente en una mezcla. Se trata de una fase estacionaria muy selectiva</p>

Tabla 3.2. Tipos de cromatografía según el mecanismo fisicoquímico involucrado en la separación de los analitos

Nombre	Tipos de soporte
Cromatografía plana	<p>Papel: tira de papel Whatman N° 1</p> <p>Capa fina: placa de vidrio cubierta con una capa fina de fase estacionaria distribuida de manera uniforme</p>
Cromatografía en columna	<p>Columna empaquetada: tubo de vidrio, acero inoxidable, cobre o aluminio, habitualmente de 2 a 6 m de largo, con diámetros internos de 2 a 4 mm, relleno con un sólido finamente molido y homogéneamente empaquetado</p> <p>Columna capilar: se construye a partir de sílice fundida y se recubre con un polímero protector. El largo varía de 15-100 m, con un diámetro interno de aproximadamente 150-300 μm</p>

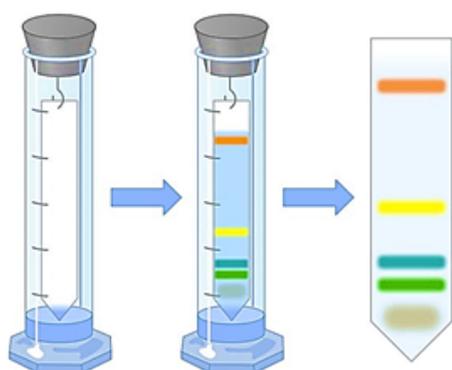
Tabla 3.3. Tipos de cromatografía según el soporte que contiene a la fase estacionaria.

¿Cómo se lleva a cabo un proceso cromatográfico?

A continuación, se pueden observar los esquemas que representan un proceso cromatográfico, es decir, la separación de los componentes de una muestra a través de su interacción con cada una de las dos fases involucradas:

Cromatografía plana

Ej: En este caso la FM asciende



Cromatografía en columna

Ej: En este caso la FM desciende

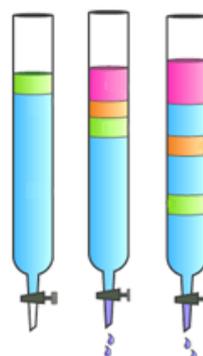


Figura 3.1. Esquemas de procesos de cromatografía plana y en columna.

En la cromatografía plana, la muestra se colocó en el extremo inferior de una tira de papel y la fase móvil asciende por capilaridad empujando a los componentes sobre la fase estacionaria. En la cromatografía en columna la muestra se colocó en el extremo superior y la fase móvil desciende a través de la fase estacionaria por gravedad.

Cromatografía plana

Generalidades

Tal como se indicó previamente en la Tabla 3.3, podemos mencionar dos tipos de cromatografías planas: cromatografía **en papel** y cromatografía **en capa fina** (TLC, *thin layer chromatography*).

Las cromatografías planas pueden realizarse en forma ascendente o descendente. En la forma ascendente, la fase móvil arrastra a la muestra recorriendo la fase estacionaria desde abajo hacia arriba, mientras que en la forma descendente, el camino será desde arriba hacia abajo. En la cromatografía plana ascendente la fase móvil sube por capilaridad mientras que, en la descendente, la fase móvil se mueve principalmente por gravedad.

En algunos casos, el soporte puede actuar también como fase estacionaria. Para ello, debe activarse el papel o la “capa fina”, lo que quiere decir que se colocarán en una estufa para eliminar la humedad ambiente. Si no se realiza la activación del soporte, la fase estacionaria será una fina película de líquido adsorbido en la superficie del papel o de la capa fina, en general agua (humedad ambiente).

¿Cuál es el parámetro que se mide en una cromatografía plana?

El parámetro que se mide en una cromatografía plana se denomina relación de frentes (Rf) y representa la distancia que recorre un analito sobre la fase estacionaria respecto a la distancia que recorre la fase móvil en la cromatografía:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el analito}}{\text{distancia recorrida por la FM}}$$

Este parámetro puede tomar valores entre 0 y 1. Cuanto más cercano a 0 es el valor de Rf significa que el analito tiene más afinidad por la fase estacionaria (es muy retenido), mientras que cuanto más cercano a 1 sea el valor de Rf significa que el analito tiene más afinidad por la fase móvil, por lo tanto, es poco retenido por la fase estacionaria.

¿Cuáles son las etapas de una cromatografía plana?

La Figura 3.2 muestra las etapas necesarias para llevar a cabo una cromatografía plana.

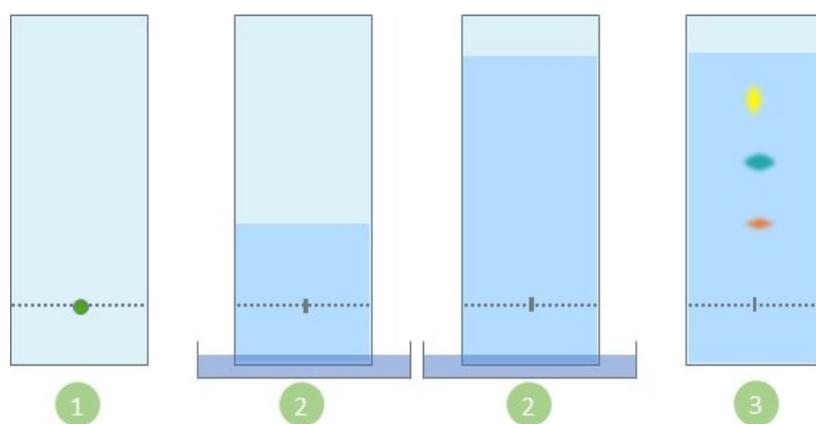


Figura 3.2. Etapas de la cromatografía plana.

(1) FE retenida en un soporte plano rectangular en el cual se siembra la muestra (círculo verde) sobre la línea de siembra (2) Ascenso de la FM por capilaridad a través de la FE durante el desarrollo hasta llegar cerca del extremo superior, a esto se le denomina “frente de la fase móvil” (3) Finalmente se realiza un revelado para observar los analitos separados y se miden las distancias recorridas para obtener el Rf de cada analito.

- **Siembra de la muestra:** se marca con un lápiz en uno de los extremos del soporte plano la línea de siembra y se coloca una pequeña cantidad de la muestra a analizar.
- **Desarrollo del cromatograma:** la fase móvil recorre la fase estacionaria “empujando” a la muestra. Cada analito se desplaza a una velocidad diferente. Esta etapa finaliza cuando la fase móvil llegue cerca del otro extremo del soporte.
- **Revelado:** si los analitos tienen color (por ejemplo, los pigmentos vegetales) se puede observar a simple vista la separación de los mismos sobre la fase estacionaria y esta etapa no es necesaria. Si los analitos no tienen color al finalizar el desarrollo, no es posible ver la separación y, por lo tanto, es necesario realizar una etapa de revelado para poner en evidencia el recorrido de cada analito separado.
- **Cálculo de Rf:** consiste en realizar las medidas correspondientes para calcular los valores de Rf de cada analito, como se muestra en el ejemplo de la Figura 3.3.

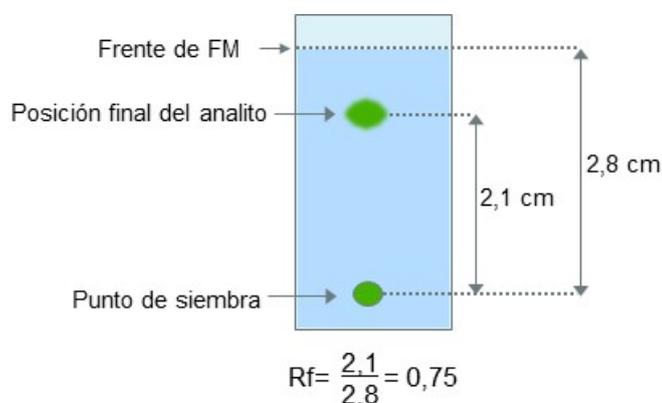


Figura 3.3. Ejemplo de cálculo del parámetro Rf

¿Qué utilidad práctica puede tener una cromatografía plana y su parámetro Rf?

Análisis mediante el criterio de *no identidad*

El valor de Rf es un parámetro que nos permite **asegurar la ausencia de un analito en una muestra**, pero por sí sólo, no puede garantizar la presencia del analito. Esto se denomina criterio de *no identidad* y es una herramienta útil en los análisis para el control del uso de compuestos no permitidos. Entre los ejemplos de aplicación de este concepto, se puede mencionar la detección de pesticidas en frutas y verduras, de la presencia de algún metal pesado en pinturas para maderas o de algún compuesto que revele adulteración de un producto.

Un ejemplo de aplicación del uso del criterio de *no identidad* sería el control del uso de un pesticida no habilitado en un cultivo de lechuga:

1. Aplicar el criterio de no identidad implica conocer el valor de Rf del analito de interés, en este caso, el pesticida no habilitado para lechuga.
2. Se realizan las cromatografías planas de un gran número de muestras: extractos de hojas de lechuga provenientes de la producción que se está controlando.
3. Se analizan los Rf obtenidos en cada muestra de lechuga.
4. Interpretación de resultados:
 - Si la muestra de lechuga no tiene un analito que presente un valor de Rf que sea igual al del pesticida prohibido podemos asegurar que no tiene el pesticida prohibido, por lo tanto, se acepta la lechuga.
 - Si alguna muestra de lechuga dio positivo para el pesticida, ya que algún componente dio un valor de Rf igual al del pesticida, la lechuga se descarta momentáneamente hasta que el resultado se confirme por otro método.

Análisis de composición de muestras

El parámetro Rf puede utilizarse como un resultado orientativo de identificación cuando se buscan analitos dentro de un grupo acotado de compuestos. En base a valores conocidos de Rf, es posible orientarse sobre cuáles se encuentran presentes específicamente en una muestra. Se deben conocer previamente los Rf de cada analito en particular y luego se analiza si estuviesen presentes o no en las muestras analizadas. Por ejemplo, se pueden analizar los azúcares simples presentes en un jugo de fruta, o determinar si un hidrolizado proteico tiene aminoácidos azufrados.

Cromatografía en capa fina de alta resolución (*high-performance thin layer chromatography*, HPTLC)

La cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés) es un tipo de cromatografía plana con características especiales en cuanto a las placas y el

equipamiento que se utiliza. Es una de las técnicas instrumentales más utilizadas en la actualidad para el análisis de compuestos de baja masa molecular a partir de muestras complejas tanto en las industrias de alimentos como para realizar análisis de control del medio ambiente. Actualmente se considera una metodología cuantitativa ya que se utiliza la densitometría para cuantificar una zona directamente sobre la placa. Para ello se emplea un densitómetro, el que puede medir en base a la absorción de luz visible, UV, fluorescencia o radioactividad, o bien cuantificar píxeles a partir de una imagen. Una HPTLC se lleva a cabo en placas especiales recubiertas por partículas homogéneas, más pequeñas que las de la placa convencional (5 μm comparada con los 10 μm). Además, las capas son más delgadas y la distancia necesaria para el desarrollo de la cromatografía es menor. Estas características de la placa hacen que la HPTLC resulte una técnica más eficiente, rápida y con mayor límite de detección que la cromatografía en capa fina (TLC) convencional. Otra característica destacable es que la cantidad de muestra necesaria para HPTLC, del orden de los nanogramos, debe ser significativamente menor que para TLC, donde se usan microgramos de muestra. Con respecto al equipamiento necesario para realizar una HPTLC se utiliza, para sembrar las muestras, aplicadores mecánicos o microjeringas con el objetivo de evitar daños en la superficie de las placas. Con estos aplicadores automáticos se puede programar para sembrar varias muestras en una misma placa; los aplicadores cuentan con una jeringa que se desliza y se puede enjuagar cada vez que va a tomar una nueva muestra. Las muestras se colocan en viales especiales ubicados en el sector correspondiente del equipo. La siembra de cada muestra en la placa se puede realizar como un punto o bien, lo más frecuente, como una banda de muestra (una línea de muestra). Para el desarrollo de la cromatografía se utiliza una cámara cromatográfica especial (Rubinson y Rubinson, 2001). La Figura 3.4 muestra los dos equipos mencionados. Finalizado el desarrollo, se realiza el revelado de la placa lo que dará lugar a la aparición de las manchas o bandas correspondientes a cada muestra analizada y se cuantifica por densitometría o bien mediante un *software* incorporado al equipo.

En general, la técnica HPTLC no es un análisis de rutina en laboratorios básicos dado que es un equipamiento costoso. Sin embargo, actualmente, las ventajas que ofrece permiten suponer un crecimiento importante de las aplicaciones de esta técnica y, por lo tanto, un uso más general.



Figura 3.4. Equipo básico para la realización de una cromatografía HPTLC

Ejemplos de aplicación de cromatografía plana

Determinación de la presencia de plaguicidas por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en vegetales

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, repeler, o mitigar cualquier plaga. Todos los plaguicidas cuentan con un período denominado “de carencia” que indica el tiempo mínimo entre su aplicación sobre los cultivos y el momento de la cosecha, de manera que no existan residuos que puedan afectar la salud.

¿Contiene un determinado lote de frutas o vegetales residuos de pesticidas? Para responder esta pregunta, puedo utilizar una cromatografía plana del tipo HPTLC.

Procedimiento analítico

Preparación de la muestra: las muestras vegetales (tomate, cebolla, pepino, manzana, etc.) se lavan con agua y jabón y se cortan en trozos de 2-3 mm, con ayuda de un procesador de alimentos. Las mismas se mantienen en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su análisis, el cual debe ser lo más pronto posible. De lo contrario, se debe almacenar a -18 °C.

Extracción sólido-líquido de los pesticidas a partir de muestras vegetales: se colocan en un erlenmeyer aproximadamente 60 g de muestra, 20 g de Na₂SO₄ anhidro, 2,5 g de NaCl y 70 mL de acetato de etilo. Se someten a vibración mecánica durante 60 min a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se filtra, primero, a través de un embudo de vidrio con algodón y fibra de vidrio, para eliminar restos de material vegetal y otros sólidos (no solubles en acetato de etilo); y luego, a través de un segundo embudo de vidrio con papel de filtro Whatman N° 42 y carbón activado. Los extractos obtenidos se transfieren a tubos cónicos y el solvente

se evapora hasta peso constante a 30-35 °C bajo corriente suave de nitrógeno. Las muestras secas se resuspenden en acetona (2 mL) y se guardan pequeños tubos denominados viales de 2-4 mL a -20 °C.

Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC): se utilizan placas comerciales para HPTLC de silicagel (20 cm x 10 cm) las que se lavan previamente con metanol, se secan y se activan a 105 °C durante 30 min. En estas placas se pueden analizar varias muestras en paralelo

- **Siembra:** tanto las muestras como los estándares se aplican en forma de bandas de 5 mm, usando una microjeringa de 10 µL, utilizando como volumen de siembra 3 µL. Se usa una separación de 10 mm para las distancias de la línea de siembra desde el borde inferior, desde el lado izquierdo y entre las bandas correspondientes a cada muestra. Se utilizan como estándares los plaguicidas que se busca detectar, clorpirifós [O,O-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil) fosforotioato], grado analítico, con 99,9 % de pureza, y malatión [O,O-dimetil fosforoamidotioato de dietil mercapto succinato], grado técnico 83,7 % (1000 g L⁻¹).

- **Desarrollo:** las placas se desarrollan en una cuba cromatográfica, en equilibrio vapor/disolvente, empleando una mezcla de hexano:acetona (8:2) como fase móvil. Se deja que la fase móvil recorra una distancia de 70 mm desde el borde inferior (60 mm desde la línea de siembra). La actividad de la placa se ajusta a una humedad relativa del 33 %, mediante el uso de una disolución acuosa saturada de cloruro de magnesio (MgCl₂ .6H₂O).

- **Revelado:** la placa desarrollada se sumerge en la disolución de PbCl₂ al 0,5 % durante 3 s. La placa se seca durante aproximadamente un minuto al aire y después se continúa con el secado en un calentador de placas durante 20 min a 105 °C.

Análisis e interpretación de resultados: se calcula el R_f correspondientes a clorpirifós y a malatión, de acuerdo con la bibliografía se esperan valores de 0,73 y 0,63, respectivamente y se comparan con los R_f de los analitos detectados en cada una de las muestras vegetales.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos: en este caso, el riesgo está asociado al empleo de solventes orgánicos como el acetato de etilo, acetona, y hexano. Al ser solventes inflamables, deben mantenerse alejados de fuentes de calor, chispas, llamas, etc. Además, estos solventes pueden provocar irritación ocular grave y producir somnolencia o vértigo. Por tal motivo debe trabajarse bajo campana y utilizando el equipo de seguridad, consistente en guantes y anteojos de protección. El PbCl₂ es un compuesto probablemente cancerígeno para el ser humano, con lo cual es importante reducir al mínimo todo contacto con el mismo. Además, la exposición puede provocar dolor de cabeza, irritabilidad, trastornos del sueño, pérdida de memoria. Por lo tanto, es necesario utilizar guantes de material apropiado (neopreno o vitón) y anteojos de seguridad.

Dado que el método genera residuos que contienen solventes orgánicos y plomo, debe realizarse un adecuado manejo de residuos. Para ello se dispondrán en recipientes adecuados para tal fin, etiquetados de manera tal que sean desechados como residuos peligrosos.

Se sugiere la lectura de Ramírez-Jiménez y Oregel-Zamudio (2018).

Identificación de compuestos de la resina de *Liquidambar styraciflua*

La resina de *L. styraciflua* tiene algunas propiedades medicinales, dentro de las cuales se destaca su uso para tratar enfermedades respiratorias. Aunque la resina de liquidámbar posee múltiples propiedades terapéuticas, su uso principal ha sido como componente de cosméticos y sustancias aromáticas. El alto valor comercial de la resina de esta especie en el mercado internacional la perfila como una opción importante como producto forestal no maderable. ¿Cómo se pueden detectar diferencias estacionales en la composición de la resina (metabolitos) de esta especie forestal? Mediante una cromatografía en capa fina.

Procedimiento analítico

Preparación de la muestra: se colectan muestras de resinas de los mismos árboles en dos épocas diferentes, de sequía y de lluvia. Para la purificación de las resinas, las muestras se extraen de manera secuencial con 50 mL de diclorometano. La primera extracción de cada muestra se deja reposar por 72 h, mientras que las siguientes dos extracciones se dejan reposar 24 h cada una. Posteriormente, se reúne el volumen total de las extracciones correspondientes a cada muestra y se filtran con papel filtro previamente saturado con diclorometano. Después de la filtración se agrega Na_2SO_4 como agente desecante y nuevamente las muestras se filtran con ayuda de una bomba de vacío. Se evapora el solvente mediante un equipo de rota evaporación. El residuo semisólido obtenido se coloca en viales de vidrio y las muestras se almacenan a 4 °C.

Cromatografía en capa fina: se utilizan placas de aluminio de 20 cm × 20 cm cubiertas con gel de sílice, formando una capa de 0,20 mm de espesor, la cual constituye la fase estacionaria. Se toman 5 mg de resina de cada muestra y se disuelven en 500 μL de diclorometano previo a la realización de la cromatografía en capa fina.

- **Siembra:** se marca en la placa la línea de siembra y con un capilar de vidrio se toma una porción de muestra que se aplica sobre la placa cromatográfica. La distancia entre muestras es de 1 cm.

- **Desarrollo:** la fase móvil consiste en una mezcla de tolueno y acetato de etilo, en una proporción de 93:7 v/v, respectivamente. Los cromatogramas se desarrollan en posición ascendente, dentro de una cámara de vidrio para cromatografía en capa fina, saturada con la mezcla de solventes de la fase móvil. La distancia recorrida por el solvente es de 18 cm.

- **Revelado:** como reactivo revelador se usa vainillina-ácido sulfúrico (mezcla de una solución en etanol de vainillina al 1 % y una solución en etanol de ácido sulfúrico al 10 %). Después de aplicar dicho revelador, las placas se colocan en un horno previamente calentado a 110 °C durante 5-10 min, hasta observar un cambio de color en las bandas (compuestos). Los compuestos son detectados con luz UV (254 nm) proveniente de una cámara de luz UV especial para cromatografía en capa fina

Análisis e interpretación de resultados: se calcula la relación de frentes de las bandas (R_f); el R_f se informa de acuerdo con su presencia en la muestra para cada época de colecta. Estos valores se comparan con los R_f de los compuestos de referencia: ácido cinámico-ácido benzoico, cinamato de cinamilo-cinamato de propilo, benzoato de bencilo-benzoato de cinamilo. En el

análisis se informan las bandas más sobresalientes de todas las comunidades, de acuerdo con cada temporada de colecta. Los cromatogramas muestran mayor número de bandas (analitos) en época de sequía que en época de lluvia.

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos: el riesgo está asociado al uso de solventes como el diclorometano y el acetato de etilo. Pueden provocar irritación cutánea, irritación ocular grave, somnolencia o vértigo y en el caso del diclorometano, se sospecha que provoca cáncer. Por tal motivo, deben usarse guantes/gafas de protección y trabajar bajo campana. Con respecto al tolueno, se puede esperar efectos retardados o inmediatos como consecuencia de una exposición a corto o largo plazo. El producto es combustible y puede encenderse por fuentes de ignición potenciales. Tanto el derrame como el agua de extinción pueden contaminar los cursos de agua.

Se sugiere la lectura de Rasgado-Bonilla y col. (2016).

Cromatografía en columna

Generalidades

Las cromatografías en columna se suelen denominar según la naturaleza de la fase móvil: **Cromatografía líquida** y **Cromatografía gaseosa**. En las cromatografías en columna la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por acción de la gravedad y/o por aplicación de una presión para que sea posible la circulación del fluido por el interior de la columna de diámetro pequeño. Las cromatografías en columna se realizan generalmente utilizando un equipo denominado **cromatógrafo**, el que permite obtener un registro de la cromatografía realizada que se denomina **cromatograma**.

¿Cuáles son las etapas de una cromatografía en columna?

Las etapas necesarias para realizar una cromatografía en columna son (Figura 3.5):

- **Inyección de la muestra:** es el equivalente a sembrar la muestra en la cromatografía plana. El lugar de inyección será en un extremo de la columna.
- **Desarrollo de la cromatografía:** la fase móvil arrastra a los analitos obligándolos a atravesar la fase estacionaria contenida en la columna. Durante este proceso los analitos se separan dentro de la columna según su afinidad por cada fase.
- **Elución:** en las cromatografías en columna es necesario que los analitos separados dentro de la columna lleguen a salir de la columna para poder detectarlos. Muchas veces alcanza con hacer circular la fase móvil hasta que todos los analitos se recuperen a la salida de la columna. En estos casos, se nombra a la fase móvil como “eluyente”. En otros casos es necesario cambiar la fase móvil para lograr la elución de los analitos, por lo tanto, la fase móvil y el eluyente serán diferentes.

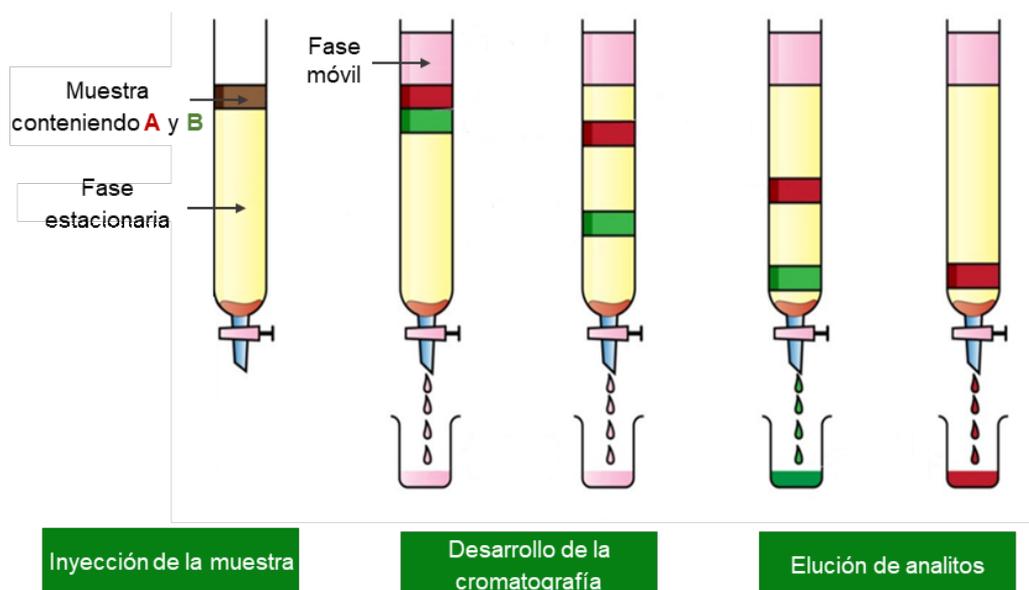


Figura 3.5. Representación esquemática de las etapas de una cromatografía en columna

¿Cuál es el parámetro que se mide en una cromatografía en columna?

En una cromatografía en columna el parámetro que se mide depende de las unidades que se utilicen como referencia. Puede ser el tiempo de retención (t_r) o el volumen de retención (V_r).

Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que transcurre desde que se inyectó la muestra hasta que el analito sale de la columna.

Volumen de retención (V_r): es el volumen de FM que circuló por la columna desde que se inyectó la muestra hasta que el analito sale de la columna.

Tiempo muerto de la columna: algunas veces en el cromatograma aparece el tiempo muerto (t_m) o volumen muerto (V_m) de la columna que corresponde al primer pico del gráfico y aparece rápidamente (es un tiempo muy corto). Corresponde a un analito que no interacciona con la fase estacionaria y por lo tanto es una medida del tiempo (o volumen de FM) que se necesita para recorrer la columna desde que se inyectó la muestra. Si el cromatograma tiene un dato de t_m , todos los tiempos de retención se corrigen respecto a él y se denominan **tiempo de retención neto**.

Un analito con un **bajo tiempo de retención** (o volumen de retención) tendrá **alta afinidad por la FM**, ya que interacciona poco con la fase estacionaria y, por lo tanto, sale pronto de la columna. Por el contrario, un analito que tiene **alta afinidad por la FE** será retenido mucho tiempo dentro de la columna y tardará en salir de la misma.

Cromatógrafos

Cromatógrafo de gases: fundamento y funcionamiento

La Figura 3.6 muestra el esquema de un **cromatógrafo gaseoso**. En este caso, la FM es gaseosa, por lo tanto, el recipiente que contiene a la FM es un tubo con el gas comprimido, con

su correspondiente regulador de presión. Los gases portadores (FM) deben ser de gran pureza, ser químicamente inertes respecto a los componentes de la muestra, a los materiales de la columna y del cromatógrafo y no dar respuesta en el detector. Los más usados son nitrógeno, helio e hidrógeno.

Antes de llegar a la columna habrá un **regulador de flujo** que permite controlar a qué velocidad se hará circular la FM a través de la columna. La columna que contiene a la FE se encuentra dentro del **horno** que nos permite regular la temperatura de trabajo. En el extremo de la columna próximo al ingreso de la FM se encuentra el **inyector**, donde se va a colocar la muestra que se analizará. En el extremo opuesto de la columna, que corresponde a la salida de la columna, estará ubicado el **detector**. Finalmente, fuera del horno encontramos el **procesador** que brindará el registro del **cromatograma** (Figura 3.6).

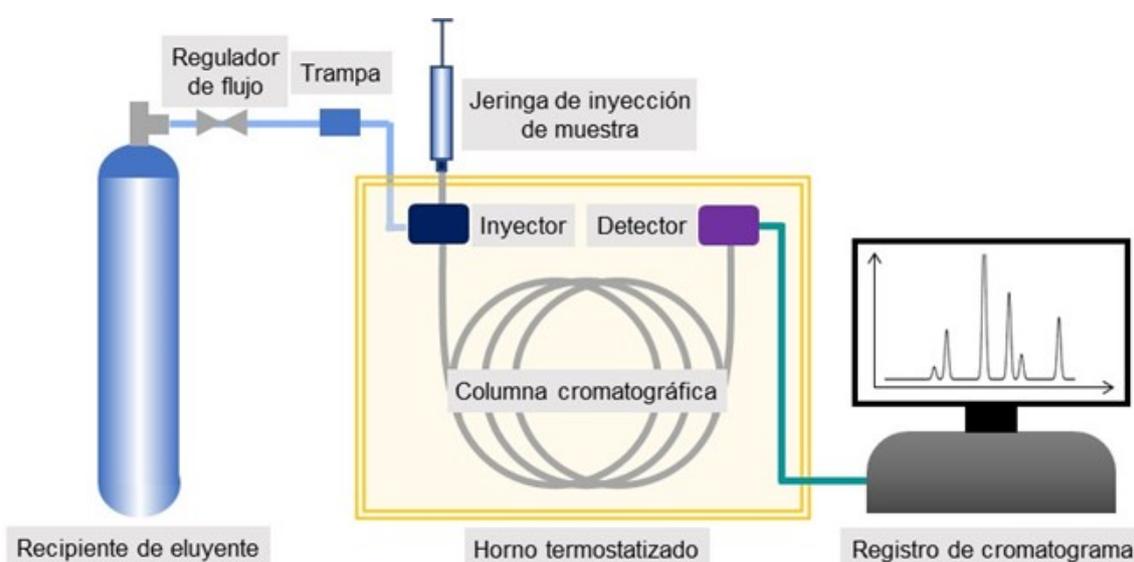


Figura 3.6. Componentes del cromatógrafo gaseoso

Cromatógrafo líquido: fundamento y funcionamiento

La Figura 3.7 muestra un esquema del **cromatógrafo líquido**: en el **reservorio de FM**, que en este caso es un líquido, está conectada una **bomba de alta presión** que permite seleccionar con qué presión se hará circular la FM líquida a través de la **columna** que contiene la fase estacionaria. Antes de la columna se encuentra el **inyector** donde se colocará la muestra, luego la **columna** que contiene a la FE y, luego de la columna, el **detector** que permite obtener los datos necesarios para obtener finalmente el cromatograma.

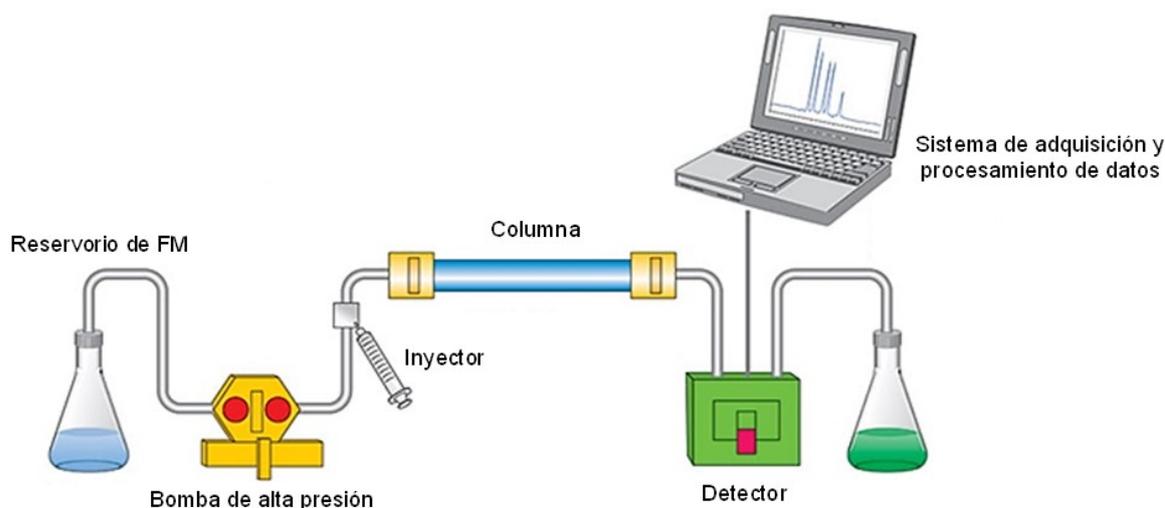


Figura 3.7. Componentes del Cromatógrafo Líquido

A modo de resumen, se puede ver, tal como se muestra en la Figura 3.8, que tanto el cromatógrafo de gases como el líquido presentan componentes básicos en común. Sin embargo, cada uno de ellos presenta sus particularidades.

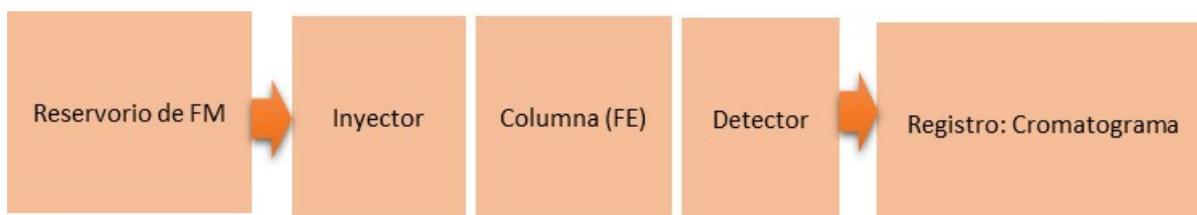


Figura 3.8. Esquema de caja de los principales componentes de un cromatógrafo

Análisis e interpretación de un Cromatograma

El cromatograma es el gráfico donde se registran los analitos separados durante el proceso cromatográfico. Este registro se logra mediante un detector ubicado a la salida de la columna del cromatógrafo. El detector dará una señal base (línea de base) cuando por la salida de la columna circule sólo la fase móvil. Cuando la fase móvil contenga un analito, la señal del detector se levantará dando lugar a un pico correspondiente al analito que está saliendo con la fase móvil (Figura 3.9).

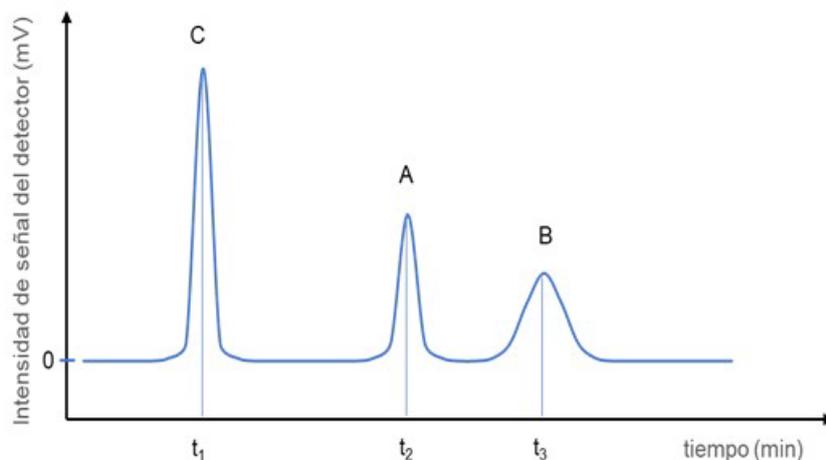


Figura 3.9. Representación esquemática de un cromatograma.

Se obtuvieron tres analitos separados: A, B y C. En el eje Y se grafica la señal del detector y en el eje X se grafica el tiempo en min desde que se inyectó la muestra hasta que sale el analito. En este esquema t_1 , t_2 y t_3 representan los tiempos (min) a los que salió cada analito (C, A y B, respectivamente). En algunos cromatógrafos, el cromatograma que se obtiene representa la señal del detector (en el eje Y) en función del **volumen de fase móvil** que circula desde la inyección de la muestra (en el eje X) en lugar del tiempo que transcurrió desde la inyección de la muestra

¿Qué parámetros podemos obtener en un cromatograma?

Los principales parámetros que podemos obtener a partir del cromatograma son:

a. Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que tarda en salir un analito de la columna. Este valor se mide en min a partir de la inyección de la muestra. Un analito con un t_r bajo es un analito que tiene baja afinidad por la fase estacionaria, es decir, que es poco retenido en la fase estacionaria. Por el contrario, un analito con t_r alto será un analito que tiene gran afinidad por la fase estacionaria y, por lo tanto, es fuertemente retenido y tardará más tiempo en salir de la columna. Si el cromatograma representa la señal del detector en función del volumen de fase móvil que circula, el parámetro se denomina **Volumen de retención** (V_r) y se interpreta del mismo modo que el tiempo de retención.

Tiempo muerto (t_M): tiempo que tarda la fase móvil en recorrer la columna desde que se inyectó la muestra. Para determinar el tiempo muerto es necesario agregarle a la muestra un analito que *a priori* sabemos que no interactúa en absoluto con la fase estacionaria. No todos los cromatogramas tendrán este dato. En aquellos cromatogramas que tienen el valor de t_M , se calculan los **tiempos de retención netos** (t'_R) para cada analito restandole el tiempo muerto al valor del tiempo de retención (Figura 3.10).

$$t'_R = t_R - t_M$$

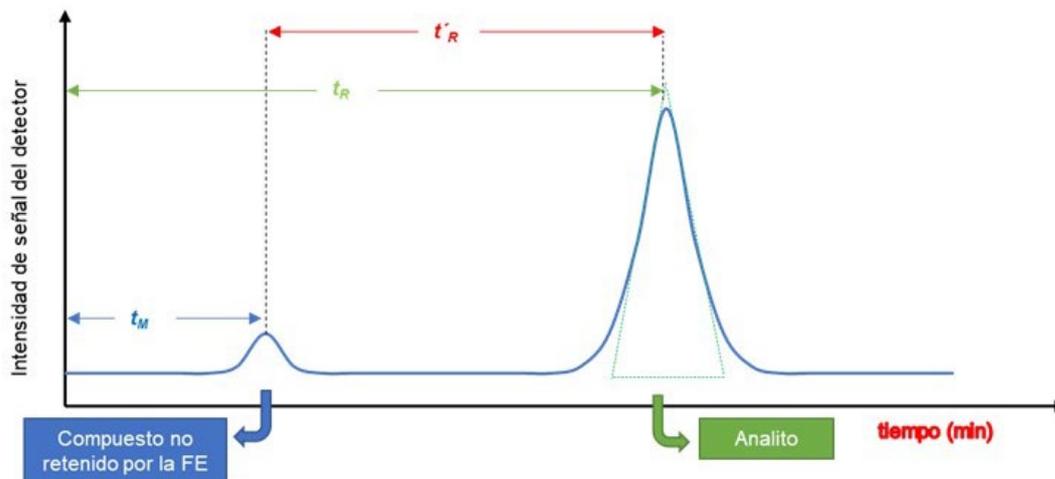


Figura 3.10. Cromatograma que muestra el tiempo muerto (t_M), de retención (t_R) y de retención neto (t'_R)

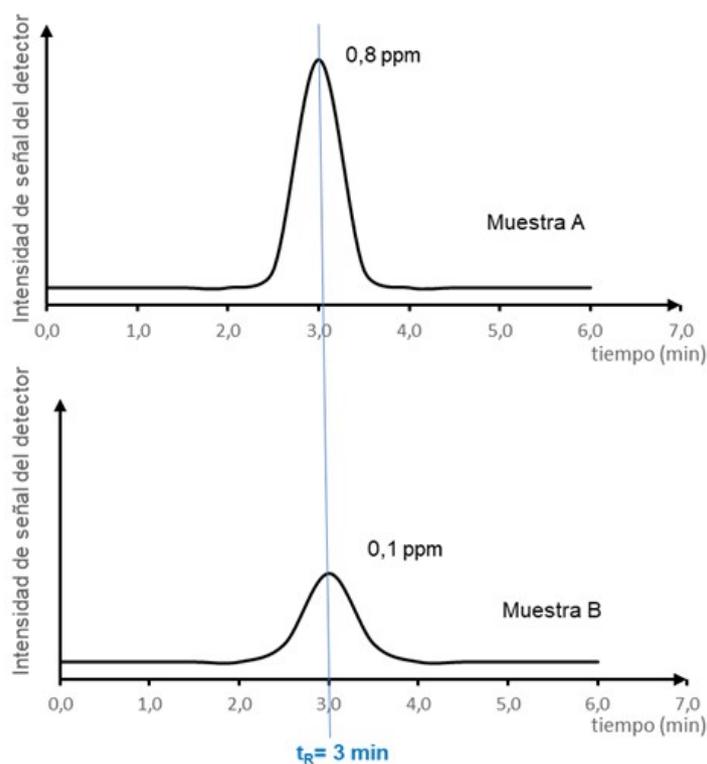


Figura 3.11. Cromatograma del mismo analito, pero en cantidades diferentes.

Igual t_R indica que se trata del mismo analito. Así, este parámetro nos permite identificar el analito y, por lo tanto, es un **parámetro cualitativo**. Distinta **área bajo la curva**, indica que en las dos muestras hay distinta concentración de dicho compuesto. Así, decimos que el área bajo la curva es un **parámetro cuantitativo**. A mayor concentración en la solución, mayor el área del triángulo. Para calcular el área, se aproxima el dibujo a un triángulo y se calcula el área del triángulo ($\text{base} \times \text{altura} / 2$).

b. Área bajo el pico: es proporcional a la cantidad del analito al que corresponde ese pico. Podemos decir que cuanto mayor es el área bajo el pico, mayor la cantidad del analito que representa ese pico. Para poder cuantificar es necesario previamente realizar una calibración de la cromatografía (como ocurre con todos los métodos instrumentales) (Figura 3.11).

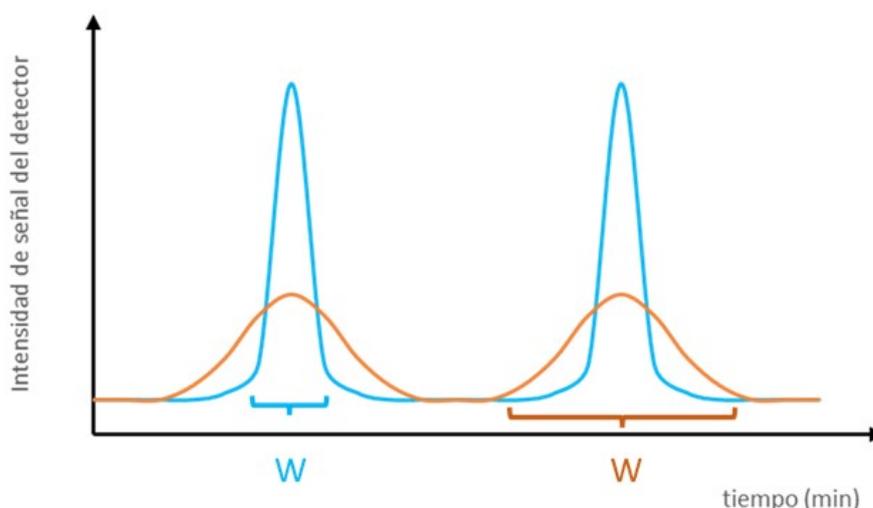


Figura 3.12. Eficiencia de un pico en un cromatograma.
Cuanto más agudo (finito) es el pico obtenido para un analito, más eficiente es la cromatografía para ese analito.

c. La **eficiencia** de la cromatografía realizada se puede calcular para cada analito obtenido a partir de los datos del pico correspondiente: tiempo de retención y ancho de la base del pico. Asumiendo que los picos son simétricos alrededor del máximo, la eficiencia se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 16 \times \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

d. **Resolución de la cromatografía (Rs):** es un parámetro que permite evaluar si los analitos fueron separados correctamente (están resueltos) o si hay desprolijidades en la separación, lo que significa que hay zonas a la salida de la columna donde dos analitos consecutivos salen mezclados. La resolución se calcula a partir de los datos del cromatograma para dos picos consecutivos. Corresponde a la diferencia entre los tiempos de retención dividido el promedio del ancho de bases:

$$RS = \frac{(t_{rB} - t_{rA})}{\frac{(W_A + W_B)}{2}}$$

La Rs debe ser $\geq 1,5$ para poder afirmar que dos picos adyacentes estén bien resueltos.

En la Figura 3.13 puede observarse que los analitos se separaron bien en el gráfico inferior donde la resolución (Rs) dio por lo menos 1,5. En los otros dos casos las resoluciones dieron valores menores a 1,5 y, como se observa en la figura, los dos picos no están bien separados.

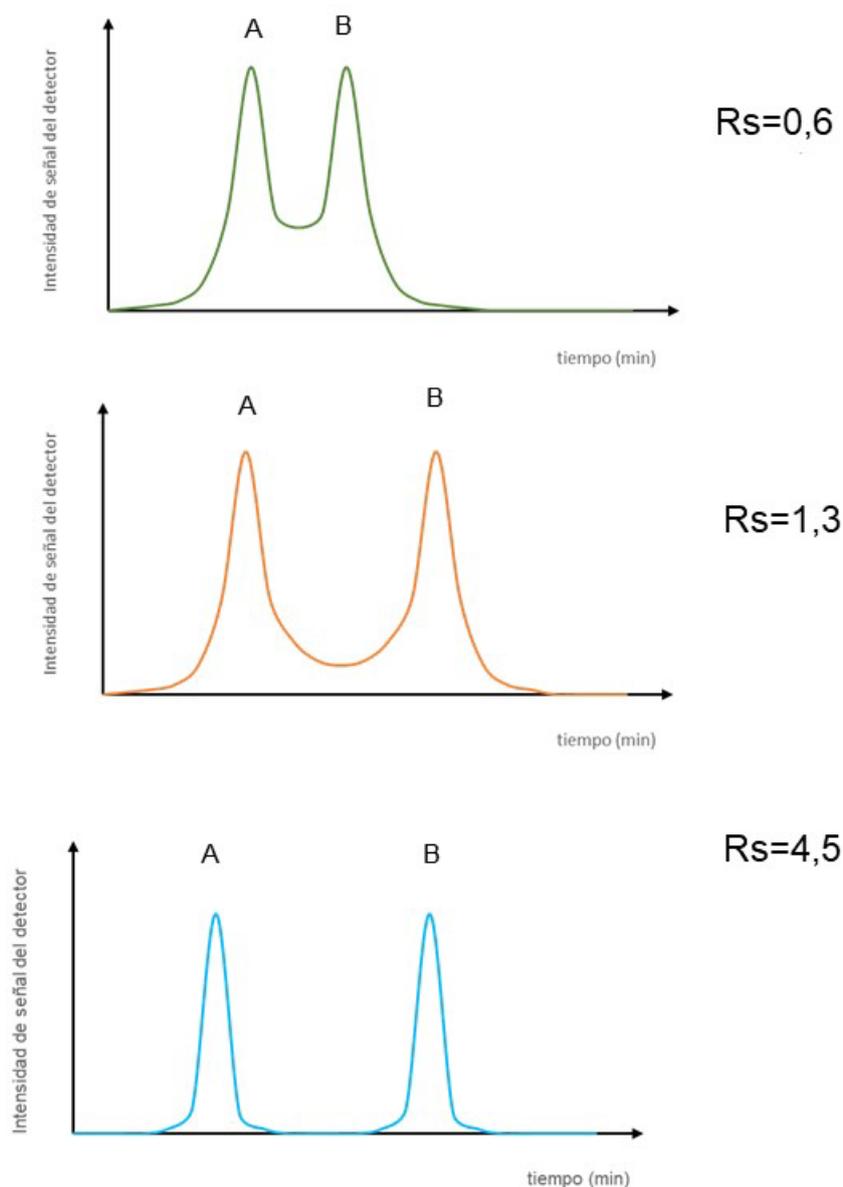


Figura 3.13. Representación de tres cromatogramas con diferente resolución para los analitos A y B

Factores que afectan la eficiencia de una cromatografía

Básicamente, los cuatro factores que determinan la eficiencia de una cromatografía en columna son los siguientes:

1. Naturaleza de la fase estacionaria (calidad del empaquetamiento en caso de columnas rellenas y resistencia a la transferencia de materia que ofrece la FE)
2. Naturaleza de la fase móvil (resistencia a la transferencia de materia que ofrece la FM)
3. Velocidad a la que circula la fase móvil (para cada cromatografía diseñada existirá una velocidad óptima para la circulación de la FM)
4. Temperatura de trabajo (modifica la resistencia a la transferencia de materia de las fases involucradas y modifica el coeficiente de difusión de los analitos).

En la práctica estos cuatro factores representan las características del método cromatográfico que se pueden variar para lograr que los picos anchos de un cromatograma se transformen en picos angostos.

Para profundizar sobre temas de cromatografía se recomienda la lectura de Polo Díez (2018) y Capítulos 17 y 18 de Day y Underwood (1989).

Ejemplos de aplicación de la cromatografía en columna

Análisis del perfil de ácidos grasos en aceites vegetales mediante cromatografía gaseosa

La composición de ácidos grasos de un aceite vegetal es uno de los principales factores que determinan no sólo su calidad nutricional sino también que afecta la susceptibilidad al deterioro oxidativo. ¿El perfil de ácidos grasos de un aceite puede verse afectado por el método y las condiciones de obtención? Se puede responder a esta pregunta analizando los ésteres metílicos de ácidos grasos de los aceites obtenidos a partir de las semillas mediante distintos métodos, a través de una cromatografía gaseosa (Figura 3.14).



Figura 3.14. Etapas para la determinación de la composición de ácidos grasos en semillas oleaginosas

Procedimiento analítico

Preparación de la muestra: el primer paso es la limpieza de las semillas/granos, cuya función es despojar a las mismas de partículas indeseables, entre las cuales se incluyen metales, hojas, pequeñas ramas y otros materiales extraños. Esta operación se realiza mediante la utilización de zarandas, cernidores rotativos, separadores magnéticos y sistemas de aspiración. Luego se procede al triturado de las semillas/granos a través del uso de molinillos o morteros.

Obtención de aceite vegetal: se realiza a partir de la materia por diversos procesos, entre los cuales los más comunes son la extracción sólido/líquido (utilizando generalmente hexano como solvente) o mediante prensado. También se puede extraer mediante CO₂ supercrítico, tecnología más novedosa que presenta como ventaja ser más amigable con el ambiente, ya que no usa solventes tóxicos.

Extracción de los ésteres metílicos de ácidos grasos: hay diversos protocolos para llevar a cabo esta etapa. Aquí se presentan dos métodos: uno con saponificación y otro sin saponificación previa de los ácidos grasos.

Método con saponificación: se basa en la Norma mexicana 490 (1999), la cual concuerda con la norma oficial 963.22 AOAC (1990). Para ello, se pesan ~500 mg de aceite en un balón de 50 mL y se agregan 6 mL de solución metanólica de NaOH 0,5 N, calentando a reflujo a 40 °C durante 5 min para lograr la saponificación de la muestra. Posteriormente, se agregan 7 mL de solución metanólica de trifluoruro de boro, calentando a reflujo. Luego de transcurridos 5 min, se adicionan 4 mL de hexano, se deja enfriar y se añaden aproximadamente 10 mL de solución saturada de NaCl, agitando suavemente. Se continúa agregando solución de NaCl hasta llevar a la fase orgánica al cuello del balón. Mediante una pipeta se recogen 1-1,5 mL de fase orgánica en un tubo con 0,5 g de Na₂SO₄ anhidro. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se transfieren, filtrando con una jeringa, a un vial cerrado bajo atmósfera de nitrógeno, protegido de la luz y almacenado a -20±2 °C hasta su análisis en el cromatógrafo.

Método sin saponificación: se pesan ~0,25 g de aceite, se tratan con 0,5 mL de una solución de HCl:metanol 5 % v/v con una pizca de sulfato de sodio anhidro, calentando durante 10 min a baño de María 100 °C. Luego se agregan 0,25 mL de agua ultrapura y 0,125 mL de hexano y se centrifuga 15 min a 3000 rpm. El sobrenadante se recupera, se filtra (filtro de nylon, 25 mm, 22 µm) y se almacena en viales hasta su análisis en el cromatógrafo.

Análisis mediante cromatografía gaseosa para separar los ésteres metílicos de ácidos grasos: la mezcla de los ésteres metílicos de ácidos grasos se analiza en un cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama. La separación se realiza en una columna capilar. A modo de ejemplo puede ser una columna de sílice fundida (30 m de largo; 0,250 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de la película de polietilenglicol que constituye la fase estacionaria). Se utiliza helio como gas portador (25,1 psi).

Si bien hay distintos programas de calentamiento, aquí se presentan temperaturas orientativas:

- temperatura de inyección: 250-260 °C
- temperatura inicial de la columna es de 170 °C
- calentamiento a 2,5 ó 3 °C min⁻¹ hasta 190 °C, isoterma a 190 °C durante 1 min y subsiguiente incremento a 1 °C min⁻¹ hasta 205-220 °C.
- temperatura del detector: 260-280 °C

Identificación a través de los tiempos de retención utilizando los patrones correspondientes: la identificación de los ácidos grasos se realiza a través de los t_r mediante la utilización de patrones de referencia de ácidos grasos, los cuales se saponifican y metilan, tal como se indicó anteriormente. También pueden utilizarse como patrones los ésteres metílicos de ácidos grasos comerciales. El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresa como valor porcentual en relación con el contenido total de los mismos, es decir como porcentaje relativo.

Se recomienda la lectura de Ixtaina et al (2010) e Ixtaina et al (2011).

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado: en varias de las etapas se utilizan solventes orgánicos, como hexano, éter etílico, metanol. Estos compuestos son muy inflamables y perjudiciales para la salud. Su manipulación debe realizarse bajo campana de extracción, utilizando guantes y anteojos protectores.

Con respecto al **cromatógrafo gaseoso (CG)**, algunas de sus piezas internas tienen voltajes elevados. Todas estas piezas están protegidas con cubiertas y es difícil entrar en contacto accidentalmente con dichos voltajes. A menos que así se indique específicamente, no retirar nunca una cubierta a no ser que el detector, el inyector o el horno estén apagados.

Por otra parte, no se debe utilizar el CG con una fuente de alimentación ininterrumpible (UPS).

Muchas de las piezas del CG funcionan a temperaturas elevadas (inyector, horno, detector, las tuercas que conectan la columna con el inyector o el detector, la caja de válvulas) y pueden provocar quemaduras graves.

Durante los ciclos de refrigeración, el CG emite gases de escape calientes que pueden provocar quemaduras, con lo cual se debe tener cuidado cuando se trabaje detrás del instrumento.

Otra cuestión de seguridad se relaciona con los gases portadores, que deben estar colocados en una habitación separada de donde se encuentra el cromatógrafo. Es necesario proteger las garrafas de daños físicos (no hacerlos rodar, no tirar ni dejar caer). Cuando se usa hidrógeno como gas portador, hay que tener en cuenta que puede filtrarse dentro del horno del CG y generar riesgos de explosión. Por ello, hay que asegurarse de que la fuente está desactivada hasta que se hayan hecho todas las conexiones, y de que los adaptadores de columna del detector y del inyector en todo momento están, o bien conectados a una columna, o bien tapados, mientras se suministra hidrógeno al instrumento. Las fugas, si ocurren en un espacio cerrado, pueden provocar un incendio o una explosión. En cualquier aplicación que utilice hidrógeno, se debe comprobar si hay fugas en las conexiones, líneas y válvulas antes de usar el instrumento. Hay que cerrar siempre el suministro de hidrógeno antes de trabajar con el instrumento.

Como medidas de seguridad se pueden mencionar una ventilación adecuada para disipar el calor producido por los aparatos, utilizar guantes resistentes al calor para manipular zonas calientes, realizar el mantenimiento preventivo adecuado del equipo.

Cuantificación de tocoferoles en aceites por cromatografía líquida de alta presión

Los tocoferoles, son compuestos poco polares que se encuentran en semillas oleaginosas y que, junto con los tocotrienoles, tienen actividad como vitamina E y como antioxidantes. Debido a que son liposolubles, durante el proceso de extracción, pasan a formar parte del aceite crudo, pero, al ser inestables térmicamente, gran parte se pierde en el proceso de refinación del aceite. Existen cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles en las formas α , β , δ y γ para ambos isómeros y se distinguen entre sí por el número de grupos metílicos en el anillo aromático. ¿Cómo puedo cuantificar y conocer los tocoferoles presentes en un aceite determinado? Se puede responder esta pregunta realizando una cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC).

Procedimiento analítico

Preparación de la muestra: las muestras se preparan en el momento de ser utilizadas para su análisis. Se pesan aproximadamente 0,25 g de aceite en un matraz aforado de 5 mL y se lleva a volumen con hexano de calidad HPLC, previa homogeneización de la solución utilizando un baño ultrasónico durante 2 min. Los recipientes se envuelven con papel aluminio a fin de proteger las muestras de la luz.

Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase normal: el análisis se lleva a cabo en un cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con detector de fluorescencia. La separación se realiza en una columna de 250 mm x 4 mm rellena con partículas porosas de sílice con un diámetro de poro de 60 Å y un tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil está compuesta por una mezcla de isopropanol:hexano, 0,5:99,5 v/v, filtrado y desgasificado. El volumen de inyección es de 20 µL y la velocidad de flujo de 1,5 mL min⁻¹. Las longitudes de onda de excitación/emisión del detector se establecen en 290/330 nm.

Identificación y cuantificación de los tocoferoles: se identifican los picos correspondientes a los tocoferoles en función de los tiempos de retención relativos y de los respectivos patrones (α-tocoferol, β-tocoferol, γ-tocoferol y δ-tocoferol).

La concentración de tocoferoles se determina por el método de estándar externo, utilizando el α-tocoferol como referencia y se expresa en µg de tocoferol g⁻¹ aceite.

Curva de calibración:

Para la cuantificación se realiza una curva estándar externa de seis puntos. Se utiliza un estándar de α-tocoferol, preparándose una solución de 10 mg de este compuesto diluidos en 100 mL de *n*-hexano. A partir de la solución estándar de α-tocoferol se preparan las disoluciones de diferentes concentraciones para realizar la curva de calibración.

Cuantificación:

El valor se expresa como µg de tocoferol g⁻¹ de aceite, siendo calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de tocoferol } (\mu\text{g g}^{-1}) = [TOC] \times \frac{V}{m}$$

donde:

[TOC]: concentración de tocoferol calculado a partir de la curva de calibración (µg mL⁻¹)

V: volumen de la muestra (mL)

m: peso del aceite (g)

Se recomienda la lectura de Ixtaina et al (2010) e Ixtaina et al (2011).

Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y equipo utilizados: tal como se mencionó previamente en el ejemplo de aplicación anterior, se utilizan solventes orgánicos, como hexano e isopropanol, los cuales son inflamables y perjudiciales para la salud.

Con respecto al cromatógrafo líquido, los riesgos se asocian al derrame y contactos térmicos en la preparación del eluyente y la contaminación ambiental si los eluyentes son volátiles. Por ello, es necesario manipular adecuadamente los eluyentes utilizando guantes.

Publicaciones científicas donde se aplicaron los métodos estudiados en el capítulo

Estudio preliminar para la determinación de plaguicidas en vegetales comercializados en una zona de Michoacán (México). (2018). Ramírez-Jiménez, R., Oregel-Zamudio, E. *Revista de Ciencias Ambientales*, 52 (2).

Los plaguicidas organofosforados (OF) son ampliamente utilizados en el mundo por su bajo costo, alta eficacia y menor persistencia. Estos compuestos neurotóxicos han sido detectados en matrices biológicas y ambientales en diversos países. El uso de plaguicidas implica el riesgo de acumulación de residuos en productos agrícolas; no obstante, en algunas regiones de México, el monitoreo de residuos de plaguicidas, en alimentos y en otras matrices, es limitado. El objetivo de este trabajo fue determinar residuos de OF en vegetales comercializados en tianguis de Jiquilpan, Michoacán. Se recolectaron muestras de calabaza, pepino, jitomate, cebolla, fresa y manzana (n = 30), además de jitomate y fresa orgánicos (n = 6). Se realizó la extracción de las muestras con acetato de etilo y se analizó la presencia de residuos de malatión y clorpirifos-etílico por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Las muestras orgánicas no presentaron residuos de malatión y clorpirifos-etílico. Bajo las condiciones de este estudio, no se detectaron residuos de malatión en las muestras de vegetales; sin embargo, se observó la presencia de residuos de clorpirifos-etílico en 4 muestras de cebolla y en 1 de manzana (20 % del total de muestras). Se ha reportado que la exposición crónica a bajas concentraciones de plaguicidas puede representar un riesgo a la salud humana, ya que sus efectos pueden ser aditivos y pueden manifestarse a largo plazo. Se requiere el monitoreo periódico de plaguicidas en alimentos y poblaciones expuestas.

Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. (2011). Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W., Nolasco SM, Tomás, M. C. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (2), 166-174.

Se determinó el rendimiento de aceite, la composición de ácidos grasos y las características fisicoquímicas y de calidad de los aceites crudos de semillas de chía obtenidos por prensado y extracción por solventes. Los métodos de extracción ensayados influyeron significativamente en el rendimiento de aceite, obteniéndose alrededor de un 30 % más de aceite mediante la extracción con solvente que por prensado. Los principales ácidos grasos (AG) se clasificaron en el siguiente orden de abundancia: ácido α -linolénico (α Ln) > ácido linoleico (L) > ácido oleico (O) \approx ácido palmítico (P) > ácido esteárico (S) para ambos sistemas de extracción. La relación de AG $n-3/n-6$ de los aceites de chía varió entre 3,18 y 4,18, siendo marcadamente más alta que la

informada para otros aceites vegetales. Los principales triacilglicerolos fueron: $\alpha\text{Ln}\alpha\text{Ln}\alpha\text{Ln} > \alpha\text{Ln}\alpha\text{LnL} > \alpha\text{LnLL} > \alpha\text{Ln}\alpha\text{LnP} > \alpha\text{LnLO} \sim \alpha\text{LnLP}$, que representan alrededor del 87-95 % del contenido total de estos compuestos. El proceso de extracción influyó en la calidad y composición de algunos componentes menores de los aceites de semilla de chía. Los aceites presentaron un contenido moderado de componentes bioactivos, como tocoferoles, polifenoles, carotenoides y fosfolípidos; el alto nivel de insaturación determinó su baja estabilidad oxidativa.

En este trabajo la cromatografía gaseosa (CG) permitió determinar la composición de ácidos grasos de los aceites de chía obtenidos mediante extracción sólido-líquido (hexano) y por prensado en frío, mientras que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se aplicó para determinar el contenido de tocoferoles.

Referencias

- Day R.A., Underwood A.L. (1989). Capítulo 17: Cromatografía Gas-Líquido y Capítulo 18: Cromatografía de Líquidos. En Karen J. Clemments y Joan McCulley (Eds.) *Química analítica cuantitativa* (pp. 586-687). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Ixtaina, V.Y., Vega, A., Nolasco, S.M., Tomás, M.C., Gimeno, M., Bárzana, E. y Tecante, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(1), 192-199.
- Ixtaina, V.Y., Martínez, M.L., Spotorno, V., Mateo, C.M., Maestri, D.M., Diehl, B.W., Nolasco S.M. y Tomás, M.C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166-174.
- Polo Díez, L. M. (2018). *Fundamentos de cromatografía*. Dextra Editorial.
- Ramírez-Jiménez, R. y Oregel-Zamudio, E. (2018). Estudio preliminar para la determinación de plaguicidas en vegetales comercializados en una zona de Michoacán (México). *Revista de Ciencias Ambientales*, 52(2).
- Rasgado-Bonilla, F.A., Soto-Hernández, R.M., Conde-Martínez, V., Vibrans, H. y Cibrián-Tovar, D. (2016). Variación estacional en la composición química de resinas y aceites esenciales de *Liquidambar styraciflua* de Hidalgo, México. *Botanical Sciences*, 94(2), 331-344.
- Rubinson K. y Rubinson J. (2001). Cromatografía líquida. En Kenneth Rubinson y Judith Rubinson (Eds.) *Análisis Instrumental* (pp.636-679). Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A.

CAPÍTULO 4

Electroforesis

Lorenza Costa

Conceptos generales de electroforesis

Se denomina **electroforesis** a la técnica de análisis químico que **permite separar** macromoléculas o fragmentos de macromoléculas **bajo la acción de un campo eléctrico**. La separación de macromoléculas suele ser un paso necesario para lograr el aislamiento de macromoléculas, lo que permite estudiar sus propiedades fisicoquímicas y conocer cuál es su función biológica en un organismo. Las funciones biológicas, están codificadas en el ADN, se traducen al ARN y, en general, se llevan a cabo a través de proteínas que cumplen diferentes funciones en los seres vivos ya sea como enzimas, receptores, transportadores, bombas primarias y secundarias de transporte o proteínas estructurales entre otras (García Trejo y Ortega, 2021). La electroforesis se aplica al estudio de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), por lo tanto, es una herramienta indispensable de trabajo en estudios bioquímicos sobre fisiología de plantas y en métodos de biología molecular.

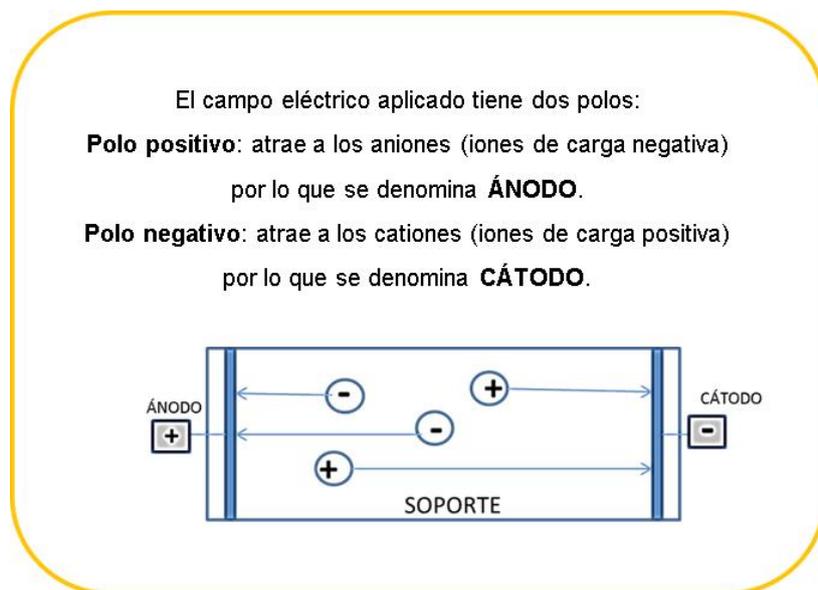


Figura 4.1. Campo eléctrico aplicado.
Esquema que representa el efecto de un campo eléctrico sobre especies cargadas.
Los círculos representan iones de carga positiva (+) o negativa (-)

Electroforesis es una palabra que deriva del griego, *elektro* significa electricidad y *phoros* movimiento. En cuanto al fundamento de la técnica, la electroforesis es un método de análisis en el cual se separan moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La separación electroforética más ampliamente utilizada ocurre en un medio acuoso embebido en un soporte semisólido (gel inmerso en una solución buffer). En los extremos del soporte se ubican los dos polos de carga del campo eléctrico (polo positivo y polo negativo). Al aplicar un campo eléctrico las moléculas que tienen carga (iones moleculares) migrarán hacia el polo de carga opuesta: los cationes se desplazarán en dirección al polo negativo y los aniones hacia el polo positivo (Figura 4.1).

Cuanto mayor sea la intensidad del campo eléctrico aplicado, mayor la velocidad de desplazamiento. Sin embargo, cada ion se desplazará a una velocidad característica que depende de factores propios de cada molécula como la carga, la forma y el peso molecular y, además de la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se desplazan. Los factores mencionados determinan la movilidad iónica de la molécula cuando se desplaza en un medio definido:

$$v_{ion} = \mu_{ion} \times E$$

v: velocidad de migración iónica

μ : movilidad iónica (factores del ion + factores del medio)

E: campo eléctrico aplicado

Existen tres formas básicas de realizar una electroforesis:

- 1- Electroforesis de límite móvil, modalidad que se utiliza para determinar la movilidad electroforética de los iones, no suele ser un método de rutina en laboratorios de análisis químico.
- 2- Electroforesis de zona, la que tiene numerosas aplicaciones en laboratorios de investigación y diagnóstico.
- 3- Electroforesis de estado estacionario, la que se utiliza para caracterizar proteínas, como método de diagnóstico y como etapas intermedias en estudios de muestras complejas.

En este capítulo se describirán las modalidades 2 y 3.

Electroforesis de zona

La **electroforesis de zona** en gel es la más ampliamente utilizada en los laboratorios de diagnóstico e investigación relacionados con el ámbito agronómico y forestal. En una electroforesis de zona **los componentes de una mezcla se separan en bandas estabilizadas sobre un gel**. La muestra ingresa a un gel acumulador o concentrador (*stacking*) que permite concentrar la muestra en un frente de avance antes de ingresar al gel de resolución en el cual se formarán las bandas de avance a velocidad constante para los diferentes analitos (componentes de la muestra). El avance de cada frente de migración continuará a velocidad constante mientras dure la aplicación del campo eléctrico. La Figura 4.2 muestra el equipamiento básico necesario para

realizar una electroforesis de zona y la Figura 4.3 presenta una foto del resultado que se observa al finalizar una electroforesis de proteínas. A medida que se avanza en el capítulo se explica detalladamente cada término utilizado en esta metodología, algunos de los cuales se indican en las figuras mencionadas.

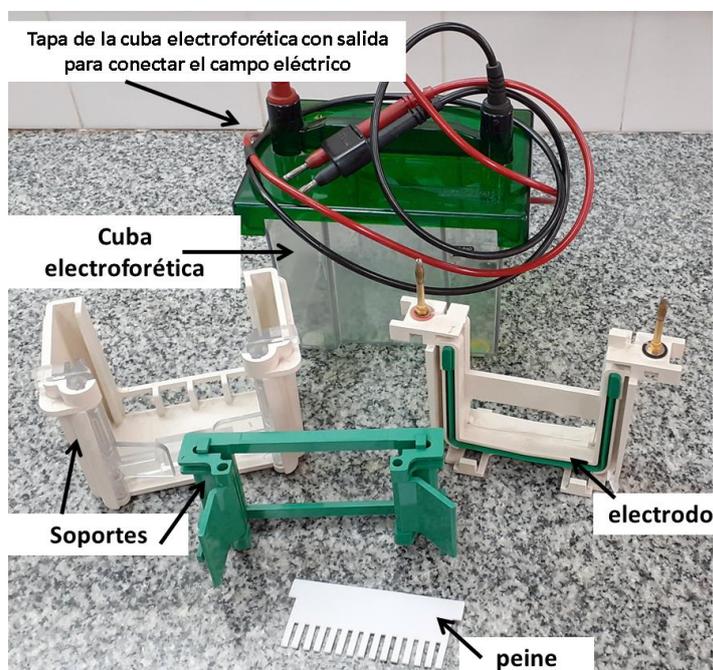


Figura 4.2. Equipo básico para realizar electroforesis

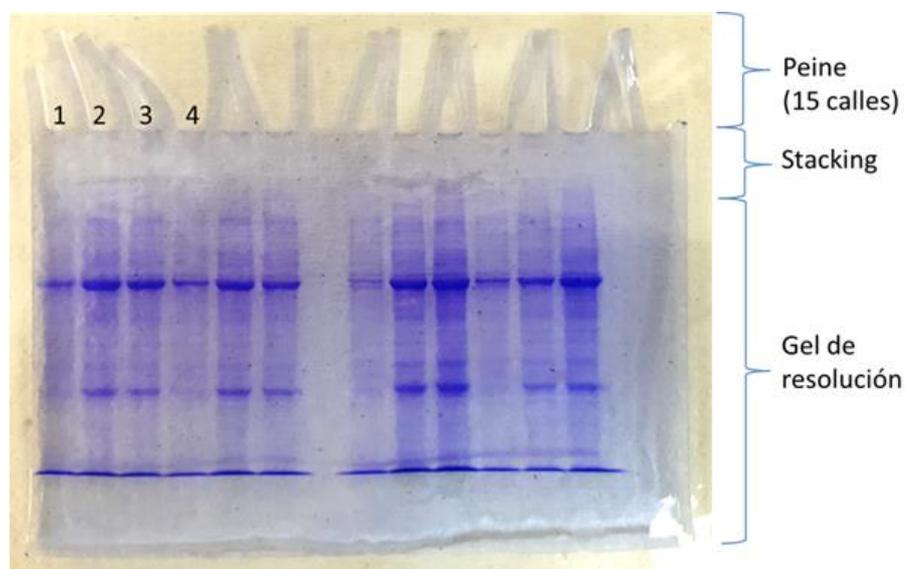


Figura 4.3. Electroforesis de zona.

Resultado de una electroforesis de proteínas en PAGE (gel de poliacrilamida). Se observa en el peine 15 calles donde se indican las 4 primeras (1, 2, 3 y 4). En cada calle se siembra una muestra a analizar. En las calles 7, 14 y 15 no se sembraron muestras. Se señalan las dos partes del gel, gel acumulador o stacking y gel de resolución. Las zonas teñidas de azul fuerte (colorante Azul Brillante de Coomassie) señalan las bandas de migración de proteínas sobre el gel.

En las electroforesis para análisis de proteínas se utilizan geles de poliacrilamida (PAGE, del inglés *PolyacrilAmide Gel Electrophoresis*) mientras que en las electroforesis para análisis de ácidos nucleicos se utilizan geles de agarosa. En ambos casos se arman láminas de geles de 0,75 a 2 mm de espesor, utilizando moldes adecuados para lograrlo. En el caso de proteínas se utilizan geles verticales (Figura 4.4) y en el caso de ácidos nucleicos geles horizontales.



Figura 4.4. Molde para la preparación del gel.

Consta de dos vidrios entre los que se genera un espesor según el separador utilizado, puede ser de 0,75 a 2 mm. Los vidrios se mantienen en forma vertical mediante un soporte adecuado. La parte inferior del molde debe quedar sellado y en el extremo superior se coloca el peine para darle forma a las calles donde se sembrarán las muestras. El molde preparado se carga con líquido que polimerizará con la forma delimitada, obteniendo una lámina fina de gel con las calles en el extremo superior.

Una vez armado el gel, sobre el mismo se colocan las muestras que contienen a los analitos (proteínas o ácidos nucleicos) que se quieren separar. Las muestras se colocan con la ayuda de una jeringa o una micropipeta, lo que permite medir con exactitud el volumen; cada muestra se deposita en una calle en el extremo superior del gel. En general, este procedimiento corresponde a la siembra de las muestras en el gel.

Una vez sembradas las muestras se aplicará el campo eléctrico. Los analitos que poseen carga comenzarán a desplazarse en dirección al polo de carga opuesta. Para el análisis de proteínas el diseño general ubica el cátodo en el extremo superior del gel y el ánodo en el extremo inferior, por lo tanto, es deseable que las proteínas ingresen al gel y lo recorran en dirección al ánodo bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Para lograr este comportamiento, las muestras de proteínas a analizar se preparan en un buffer pH alcalino de modo que la mayoría de las mismas se comporten como aniones, es decir, se desplacen en dirección al ánodo. En el caso de los ácidos nucleicos el diseño es similar, se colocan las muestras en las calles ubicadas en el extremo del gel horizontal cerca del cátodo. Al iniciar la aplicación del campo eléctrico los ácidos nucleicos con sus cargas negativas se desplazarán en dirección al ánodo.

Durante la electroforesis en gel, los analitos se ordenan en bandas que migran a velocidad constante. La idea es interrumpir el campo eléctrico antes de que las bandas alcancen el final del gel. Para lograrlo se agrega a la muestra un analito coloreado, azul de bromofenol, que migrará con mayor velocidad para señalar el frente de la corrida electroforética.

Una vez finalizada la electroforesis, se realiza una etapa de revelado que permitirá observar los analitos separados sobre el gel. Existen diferentes formas de revelado tales como métodos generales de tinción, métodos de tinción por sustrato, y técnicas de inmunodetección luego de transferir los analitos separados en el gel hacia una hoja de nitrocelulosa (esta técnica se explica detalladamente más adelante en este capítulo). El método elegido para revelar dependerá de la pregunta a resolver a través de esta técnica. Se hace referencia aquí al uso de tinciones generales para revelar proteínas y ácidos nucleicos.

En el caso de proteínas la tinción más utilizada para revelar sobre el gel es con el colorante azul brillante de Coomassie. Para el caso de ácidos nucleicos, el revelado más utilizado es la tinción con bromuro de etidio; en este caso se debe trabajar bajo rigurosas normas de seguridad ya que implica la exposición a material radioactivo.

Existen otras tinciones generales para revelar geles, por ejemplo, cuando la cantidad de muestra es muy baja, se recurre a la tinción con nitrato de plata ya que es mucho más sensible que las tinciones mencionadas. Brevemente, en esta tinción, el ion plata (Ag^+) se reduce a plata cero (Ag^0) al reaccionar con grupos funcionales presentes en las proteínas y ácidos nucleicos (tioles, tirosina, aminas). El depósito de plata tiñe de color pardo el lugar donde se encuentran los analitos que han reaccionado. La Figura 4.5 muestra la apariencia de los geles luego de las tinciones mencionadas.

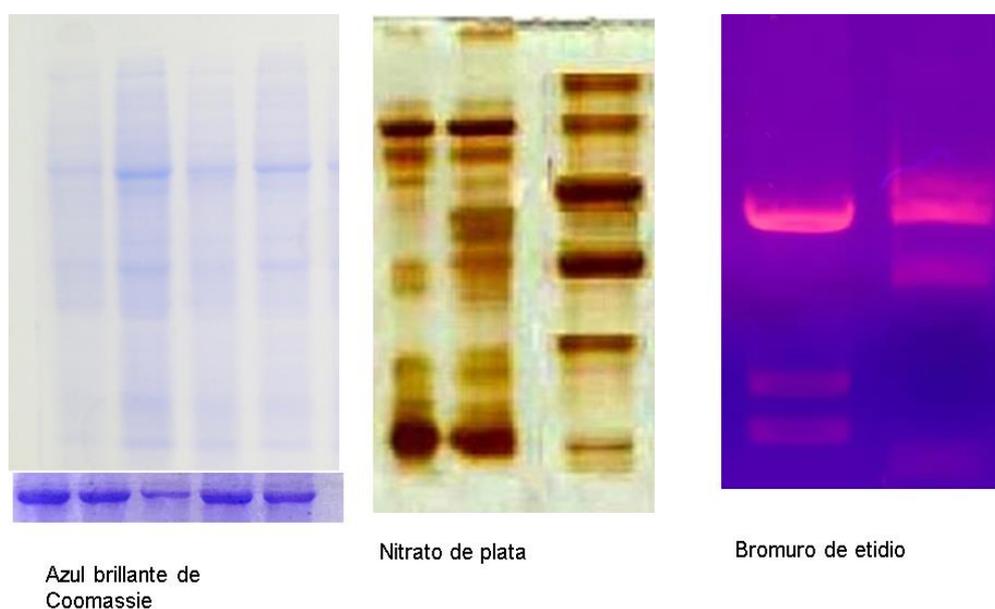


Figura 4.5. Apariencia de los geles una vez finalizada la etapa de revelado

En este capítulo se describen en detalle las electroforesis utilizadas para el estudio de proteínas. Algunos detalles sobre electroforesis para estudios de ácidos nucleicos se desarrollarán en el Capítulo 5 ya que forman parte de las técnicas básicas de biología molecular.

Electroforesis de zona para el análisis de proteínas

Como se ha mencionado, para el estudio de proteínas se utilizan geles de poliacrilamida. Se eligen dichos geles ya que tienen buena resolución, no interactúan con las muestras y son estables frente a cambios de pH, temperatura y fuerza iónica dentro de un amplio rango de valores para estos parámetros. Los geles, en forma de láminas delgadas, se forman fácilmente mediante la polimerización de acrilamida, utilizando como molde el espacio generado entre dos vidrios dejando un espesor que varía entre 0,75 y 2 cm dependiendo del equipo de electroforesis que se va a utilizar.

El gel se forma a partir de acrilamida, monómero que se polimeriza y bisacrilamida, compuesto que genera el entrecruzamiento de los polímeros. Para que ocurra la polimerización se utilizan un iniciador, Persulfato Amónico (APS) y un catalizador, N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED) (Figura 4.6).

La porosidad del gel se puede regular en función del porcentaje de acrilamida y bisacrilamida que se utiliza en la preparación. Cuanto mayor sea el porcentaje de acrilamida más cerrado será el gel, lo que significa que funcionará como un tamiz menos poroso. La porosidad del gel afectará la movilidad de los analitos en función de su tamaño ya que el gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular. Para aumentar el poder de separación del gel se regula el porcentaje de acrilamida utilizado. Si se quiere separar analitos de bajo peso molecular se debe recurrir a geles de mayor porcentaje de acrilamida mientras que si se busca separar analitos de mayor peso molecular se necesitan geles más laxos de menor porcentaje de acrilamida para obtener mayor resolución. Algunas veces, para muestras complejas donde es importante separar tanto analitos de bajo como de alto peso molecular se recurre al armado de un gel con un gradiente de acrilamida.

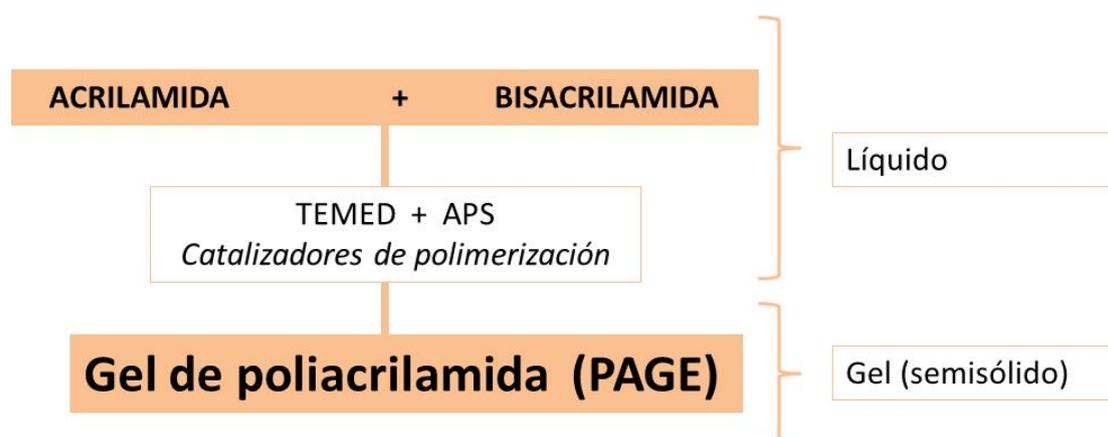


Figura 4.6. Formación de un PAGE.

Esquema de los reactivos necesarios para formar el gel de poliacrilamida (PAGE). Cuando se prepara el gel se debe trabajar con guantes y barbijo ya que la acrilamida sin polimerizar es neurotóxica.

El gel se prepara dentro de un molde formado por dos vidrios con un espesor definido entre ellos tal como se mencionó anteriormente. Se arma en dos fragmentos denominados gel acumulador o *stacking* donde ingresa la muestra para concentrarse en una banda

estrecha y a continuación el gel de resolución, donde se separan las bandas de diferente velocidad electroforética (Figura 4.7).

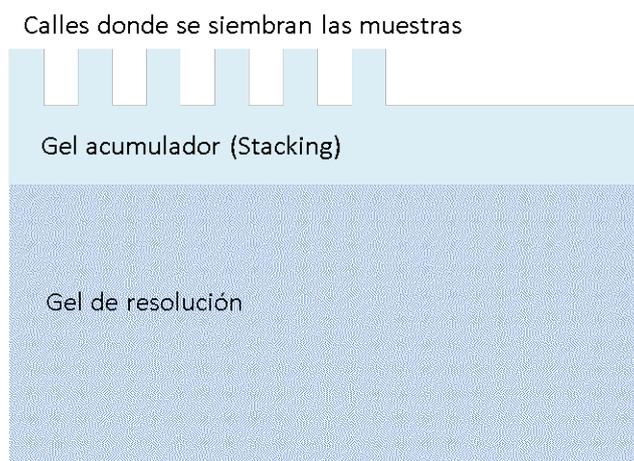


Figura 4.7. Descripción del gel que se usa para realizar una electroforesis de proteínas. Esquema que representa las diferentes partes del gel para la separación de proteínas. En el gel acumulador quedan formadas las calles donde se colocarán las muestras. En general, el gel de stacking tiene un 7 % de acrilamida mientras que el gel de resolución puede ser de 12 a 15 % de acrilamida.

Una vez armado el gel, se acomoda, sin retirar del molde, entre dos compartimentos separados. Cada uno de ellos contiene uno de los electrodos, negativo o positivo, inmersos en buffer de corrida por lo que constituyen el cátodo y el ánodo respectivamente. La conexión eléctrica entre ambos compartimentos se produce a través del gel. Una vez armado este sistema, se colocan las muestras a analizar en el gel y se conecta el campo eléctrico. El campo eléctrico se genera a través de una fuente de poder que se puede programar a voltaje constante o bien a corriente constante. Para las electroforesis se utilizan valores del orden de 100 milivolts. Una vez que la electroforesis ha finalizado, el gel de poliacrilamida se puede revelar para poner en evidencia las bandas de migración separadas. El resultado obtenido se puede digitalizar y guardar. Si es necesario, también es posible purificar las moléculas de interés recuperándolas a partir de la banda de gel donde se ubican.

Recapitulación de los pasos a seguir para realizar una electroforesis de zona para analizar proteínas

Paso 1- Armado del gel

Utilizando un molde sostenido en un soporte adecuado se carga la solución de acrilamida-bisacrilamida correspondiente al gel de resolución y se deja el tiempo suficiente como para que se forme el gel. A continuación, se carga la solución correspondiente al *stacking* e inmediatamente se coloca el peine para que al gelificar queden formadas las calles donde se van a colocar las muestras.

Paso 2- Armado de la cuba de electroforesis con el gel

Una vez que el gel dentro del molde está formado (polimerizado) se lo coloca dentro de la cuba de electroforesis. La cuba tiene dos compartimentos separados, el cátodo y el ánodo, los que se llenan con el mismo buffer de corrida. El contacto entre ambos compartimentos se dará sólo a través del gel.

Paso 3- Siembra de las muestras a analizar y aplicación del campo eléctrico (Figura 4.8).

Las muestras se colocan en las calles del gel con una micropipeta o con una jeringa. Para que las muestras se ubiquen en el fondo de cada calle se les agrega glicerol, de este modo las muestras siempre serán más densas que el buffer de corrida y quedarán depositadas en el fondo de cada calle. Una vez que se sembraron las muestras, se cierra la cuba de electroforesis y se conecta el campo eléctrico a través de una fuente de poder. Se mantiene el campo eléctrico hasta que la molécula coloreada (azul de bromofenol) que se agrega para marcar el frente de corrida llegue cerca del extremo inferior del gel.

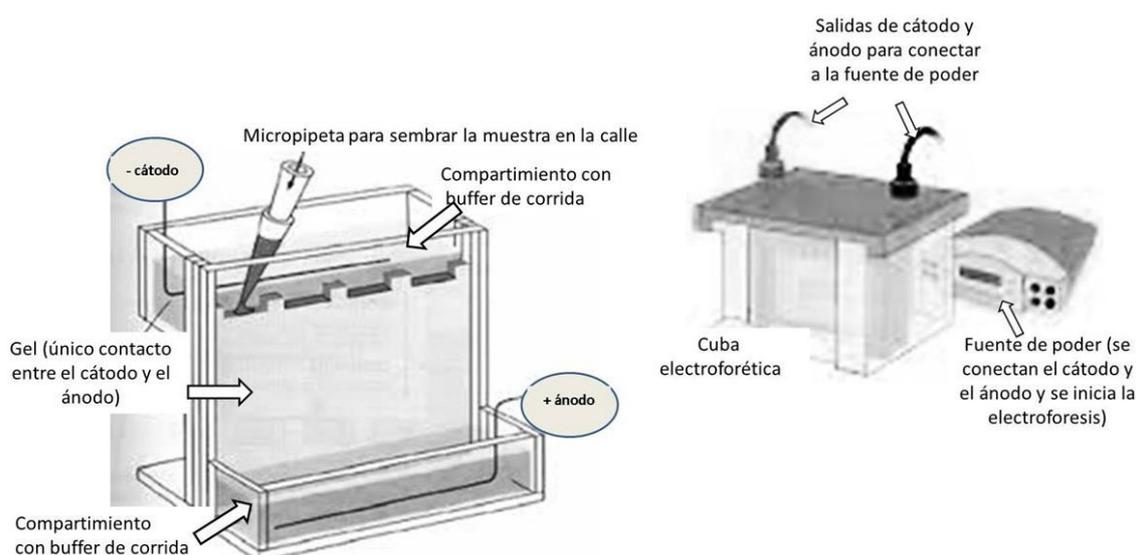


Figura 4.8. Siembra de las muestras a analizar y aplicación del campo eléctrico

Paso 4- Revelado del gel: tinción y decoloración del gel

Finalizada la corrida electroforética, se retira el gel con el molde de la cuba electroforética, se separan cuidadosamente los vidrios que contienen al gel y, con cuidado, se coloca el gel en un recipiente para llevar a cabo el proceso de tinción. Se deja en contacto dentro del recipiente el gel con una solución de colorante azul brillante de Coomassie, en agitación durante varias horas. Se obtendrá una tinción azul completa del gel a partir de la cual comienza la etapa de decoloración, reemplazando la solución de tinción por la solución decolorante, manteniendo la agitación hasta que sólo queden las bandas azules que se tiñeron específicamente.

Electroforesis Nativa y Electroforesis Desnaturalizante

Para el estudio de proteínas se utilizan, con objetivos diferentes, dos modalidades de electroforesis de zona: **electroforesis nativa** y **electroforesis desnaturalizante**. En términos generales no existen grandes diferencias en cuanto al procedimiento y funcionamiento de ambas electroforesis ya que se utilizan los mismos moldes y el mismo equipamiento. La diferencia radica en la preparación previa de las muestras y en las recetas que se utilizan para preparar los geles y el buffer de corrida.

En una **electroforesis nativa**, las proteínas se analizan conservando sus cuatro niveles de estructura, tal como existen en la naturaleza. En este caso cada proteína conserva sus características de tamaño forma y carga y, por lo tanto, su movilidad sobre el gel estará afectada por las características de cada proteína.

Por el contrario, en una **electroforesis desnaturalizante** es necesario hacer un tratamiento previo de las muestras con un agente reductor (2-mercaptoetanol, C_2H_6OS) y un detergente iónico, dodecilsulfato sódico (SDS, $CH_3(CH_2)_{11}OS(=O)_2O-Na^+$) que aportará carga negativa a las cadenas polipeptídicas. El detergente romperá las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas (desnaturaliza a las proteínas) quedando las cadenas polipeptídicas separadas y desplegadas. Algunas proteínas tienen subunidades que se mantienen unidas a través de puentes disulfuro, el agregado de 2-mercaptoetanol permite reducir estos puentes disulfuro y separar las subunidades. Como resultado de este tratamiento, cada proteína dará lugar a las cadenas polipeptídicas que las componen y, a su vez, estas cadenas estarán desplegadas, habrán perdido su forma, y estarán tapizadas por la carga negativa del detergente SDS. Por lo tanto, el efecto final del tratamiento con SDS y 2-mercaptoetanol será que las cadenas polipeptídicas que conforman las proteínas analizadas sólo difieren en su peso molecular ya que han perdido las diferencias en cuanto a forma y carga (Figura 4.9). Se puede concluir que en una electroforesis desnaturalizante las proteínas se analizan como cadenas polipeptídicas que sólo difieren en su tamaño y, por ello, es el estudio indicado para determinar su peso molecular. Comúnmente se nombra este tipo de electroforesis como electroforesis SDS-PAGE. Se recomienda como lectura complementaria Nelson y Cox (2001).

La Figura 4.9 representa una proteína formada por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad tiene una estructura secundaria en la que se pueden reconocer zonas de hoja β plegada y de α hélice y, además, están plegadas sobre sí conformando su estructura terciaria. El tratamiento con SDS y 2-mercaptoetanol conduce a la separación de la proteína en dos subunidades (pérdida de la estructura cuaternaria), las que se observan desplegadas debido a la pérdida de su estructura terciaria y secundaria (se desarmaron las hélices y las hojas plegadas) y, además, cada cadena polipeptídica queda recubierta por pequeñas moléculas del detergente iónico con su carga negativa (-). Este efecto enmascara la carga propia que pueda tener cada cadena polipeptídica.

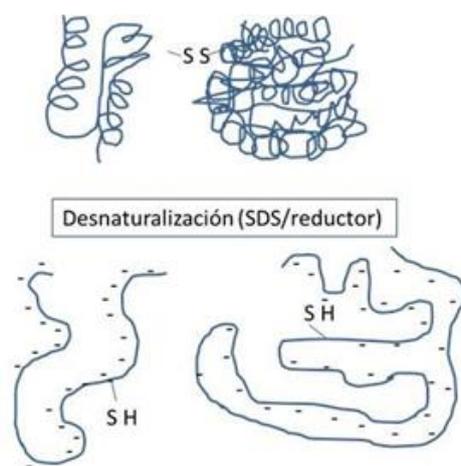


Figura 4.9. Esquema que representa la desnaturalización de una proteína hipotética. Representación del efecto desnaturalizante del SDS y 2-mercaptoetanol sobre una proteína formada por dos subunidades unidas mediante un puente disulfuro (-SS-). El símbolo (-) representa moléculas de SDS recubriendo las cadenas polipeptídicas desplegadas.

Una vez que se ha comprendido el efecto del tratamiento previo sobre la proteína se podrá deducir el comportamiento de esta misma proteína hipotética en una electroforesis nativa y en una electroforesis desnaturalizante (Figura 4.10):

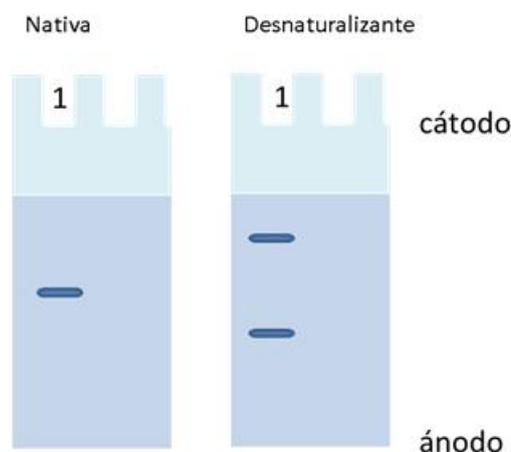


Figura 4.10. Análisis del resultado esperado para la proteína hipotética en una electroforesis nativa y en una desnaturalizante. El esquema representa una electroforesis nativa y una electroforesis desnaturalizante realizada para la proteína hipotética formada por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. El 1 indica el lugar donde se sembró la muestra. El extremo del gel que contiene el peine es el que está en contacto con el cátodo. El extremo inferior del gel es el que está en contacto con el ánodo. La proteína nativa y sus subunidades se comportaron como aniones ya que ingresaron al gel en dirección al ánodo.

En una electroforesis nativa la proteína hipotética dará lugar a una única banda cuya posición dependerá de la forma y la relación carga/masa en la proteína completa. A mayor carga mayor velocidad de migración mientras que a mayor peso molecular menor velocidad de migración. Se define que la velocidad de migración en una electroforesis nativa depende de la relación carga/masa de la proteína.

La misma proteína desnaturalizada da origen a dos cadenas polipeptídicas que presentan formas y cargas similares. La diferencia de velocidad de migración estará dada por el tamaño de cada cadena. La cadena más grande se moverá más lento y la cadena más pequeña migrará más rápido. En la electroforesis desnaturalizante las cadenas se separan según el peso molecular, es decir, en función de $1/\text{masa}$, ya que cuanto mayor sea la masa (el peso molecular) menor será la velocidad de migración. Se puede afirmar entonces que para determinar el peso molecular de una proteína se usará una electroforesis desnaturalizante.

Electroforesis de estado estacionario – Isoelectroenfoque

Un **isoelectroenfoque** es una electroforesis de estado estacionario. En este tipo de electroforesis las bandas migrarán sobre el gel hasta alcanzar una posición definitiva y a partir de ese momento permanecen fijas independientemente del tiempo que se aplique el campo eléctrico. Este comportamiento es diferente respecto a la electroforesis de zona, en la cual las bandas migran a velocidad constante hasta que se interrumpe la aplicación del campo eléctrico.

El isoelectroenfoque es un caso particular en el que la **separación de proteínas** se logra en función de su **punto isoelectroenfoque** bajo la acción de un campo eléctrico. Para comprender cómo funciona este método se necesitan repasar algunas características de las proteínas (Lectura recomendada Nelson y Cox, 2001):

- i- Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos unidos por uniones peptídicas. Los aminoácidos son anfóteros, es decir, poseen carga positiva y negativa en la misma molécula.
- ii- Las proteínas tendrán grupos cargados dependiendo de los aminoácidos que las componen.
- iii- Las cargas de las proteínas dependen del pH en el que se encuentran.
- iv- Cada proteína posee un punto isoelectroenfoque característico que corresponde al pH al cual la proteína tiene carga neta cero.

Como se ha mencionado anteriormente, en esta técnica las proteínas se separan según su punto isoelectroenfoque. Para ello se utiliza un gel de poli(acrilamida) especial, en el que se establece un gradiente de pH. Para generar el gradiente de pH existen diferentes métodos, basados en el uso de anfolitos o bien otros compuestos derivados del monómero acrilamida con grupos amino o carboxílicos capaces de captar o ceder protones. Actualmente los más utilizados son gradientes formados por los derivados de acrilamida, se agregan como sales y mediante la difusión de un ácido y una base desde los extremos opuestos del gel se logra el gradiente de pH inmovilizado. Este método de preparación del gradiente de pH permite mayor reproducibilidad y resolución en comparación al gradiente de pH generado por los anfolitos (Mikkelsen y Cortón, 2011). Actualmente, existen geles comerciales prefabricados con estos gradientes de pH inmovilizados, son altamente reproducibles y sólo se necesita hidratarlos en el momento de utilizarlos.

Para analizar la muestra, se siembra la mezcla de proteínas en un extremo del gel y se aplica el campo eléctrico. Cada proteína comenzará a migrar sobre el gel impulsada por su carga. Al avanzar sobre el gel, la carga de la proteína se va modificando en función del pH de la zona del

gel que va atravesando hasta llegar a la zona de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. En ese punto, la carga neta es cero y la proteína permanecerá inmovilizada. El pH en el cual se inmoviliza cada proteína corresponde a su punto isoeléctrico.

Los principales usos del isoelectroenfoque, son:

- 1- Determinar el punto isoeléctrico de una proteína.
- 2- Separar isoformas de proteínas.
- 3- Realizar el diagnóstico de enfermedades en humanos y en animales, en base a la detección de una isoforma particular de una proteína.
- 4- El isoelectroenfoque es frecuentemente la primera etapa de una Electroforesis Bidimensional (Electroforesis 2D), método que se utiliza para analizar muestras complejas de proteínas en el contexto de estudios proteómicos, tema que excede al objetivo de este libro. Se sugiere la lectura de Huerta-Ocampo y col. (2009) para profundizar estos contenidos.

Electroforesis para proteínas seguida de transferencia e inmunodetección - *Western Blot*

Se conoce como *Western Blot* a la técnica analítica utilizada para el estudio de proteínas que permite la detección de una proteína específica dentro de una muestra biológica. La especificidad del *Western Blot* se logra mediante el uso de anticuerpos que reconocen solamente a la proteína de interés. La unión entre una proteína y el anticuerpo que la reconoce es altamente específica, es la reacción fundamental de todas las respuestas inmunológicas, reacción antígeno-anticuerpo en la cual la proteína de interés es el antígeno.

Para realizar un *Western Blot* se debe comenzar con una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas de la muestra a analizar. En este caso es importante que se reserven calles del gel para sembrar marcadores de peso molecular, un control positivo y un control negativo para el anticuerpo que usaremos luego. Los marcadores de peso molecular serán varias proteínas purificadas y conocidas que permitirán estimar el peso molecular de la proteína de interés; el control positivo debe ser la proteína de interés que permitirá verificar el funcionamiento correcto del anticuerpo y el control negativo será una proteína que no se une al anticuerpo para descartar uniones inespecíficas.

Finalizada la electroforesis, el gel sin revelar se somete a una transferencia (Figura 4.11). El funcionamiento de la transferencia es similar a la electroforesis ya que se transfieren las proteínas cargadas negativamente desde el gel hacia un polo positivo (ánodo) de un campo eléctrico aplicado. Las proteínas separadas en el gel se difunden rápidamente en dirección al ánodo pasando por una hoja de nitrocelulosa donde quedarán adheridas en la misma posición que tenían sobre el gel. El proceso de transferencia se lleva a cabo durante un cierto tiempo que se define según el campo eléctrico aplicado, lo más frecuente suele ser 2 h a 100 mV para geles de 1,5 mm de espesor.

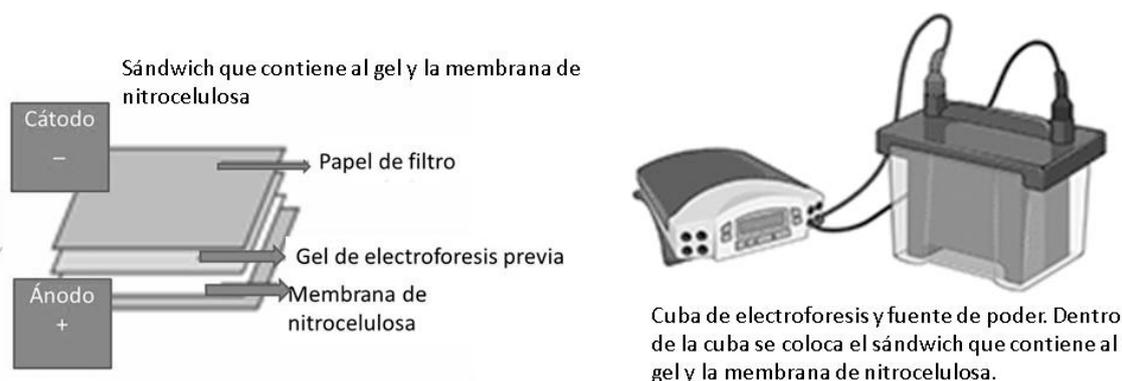


Figura 4.11. Transferencia de proteínas.

Para realizar la transferencia de las proteínas separadas en una electroforesis previa, se arma un sándwich respetando el siguiente orden: papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulosa y papel de filtro. Se acondiciona en el soporte adecuado y se coloca dentro de la cuba electroforética para aplicar el campo eléctrico necesario.

Finalizada la transferencia se realiza el revelado sobre la hoja de nitrocelulosa. El procedimiento de revelado se denomina inmunodetección, en la modalidad más generalizada requiere de dos reacciones inmunológicas consecutivas y consta de los siguientes pasos:

1- Bloqueo de la membrana

Para ello, se pone en contacto la membrana de nitrocelulosa con una solución de leche descremada durante un tiempo y en agitación. Las proteínas de la leche se unen a la membrana cubriendo espacios libres de modo que el anticuerpo no se adhiera en estas zonas.

2- Agregado del anticuerpo específico para reconocer a la proteína de interés.

Se agrega el anticuerpo específico que va a reaccionar con la proteína (reacción inmunológica antígeno-anticuerpo). Esta reacción es la primera reacción inmunológica sobre la membrana y por ello se denomina al anticuerpo específico anticuerpo primario. Se deja aproximadamente 1 h a temperatura ambiente para que se complete la reacción. Luego la membrana se lava para eliminar el anticuerpo que no se une específicamente.

3- Agregado de un segundo anticuerpo conjugado o marcado con una molécula reportera.

Se agrega sobre la membrana un segundo anticuerpo que reconoce específicamente al anticuerpo primario, por ello se denomina anticuerpo secundario. Se deja en contacto durante algunas horas. Nuevamente ocurre una reacción inmunológica por lo que es específica y altamente estable. El anticuerpo secundario queda unido al anticuerpo primario sobre la membrana de nitrocelulosa en los lugares donde se encuentra la proteína de interés. La Figura 4.12 representa un esquema de las reacciones inmunológicas que se necesitan en este tipo de revelado. El anticuerpo secundario debe tener conjugada (unida) una molécula reportera necesaria para el revelado. Finalizada la reacción se lava la membrana.

4- Detección del anticuerpo secundario.

La detección de la proteína de interés se logra gracias a una molécula reportera conjugada. La molécula conjugada puede dar lugar a una detección por fluorescencia, por quimioluminiscencia o por colorimetría.

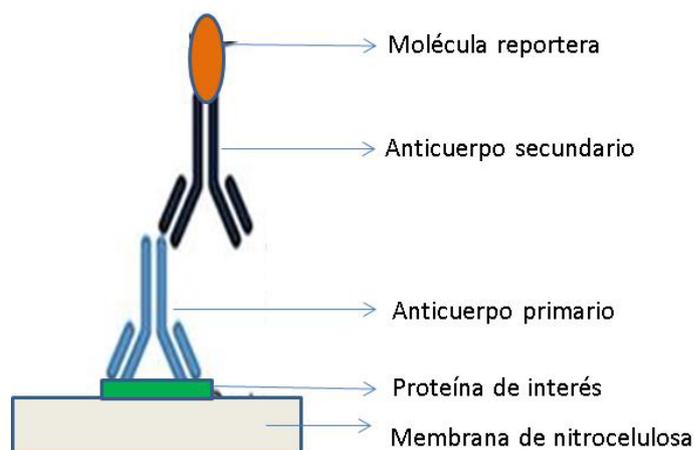


Figura 4.12. Representación de la reacción involucrada en la inmunodetección de un Western Blot

Electroforesis Capilar

Se han desarrollado muchas técnicas electroforéticas para ser realizadas en tubos capilares, entre ellas la más comúnmente utilizada es la electroforesis capilar de zona (ECZ). En términos generales, es una electroforesis pero que se lleva a cabo en columnas capilares. Algunos autores sugieren que se trata de una técnica híbrida entre una electroforesis y una cromatografía líquida de alta resolución (Mikkelsen y Cortón, 2011). La separación de analitos ocurre por la migración diferencial de especies cargadas a través de un medio fluido bajo la acción de un campo eléctrico. Dentro del capilar se encuentra una solución buffer que actúa como conductor de la corriente eléctrica y controla la carga de las sustancias a analizar. Como en toda electroforesis, la velocidad de migración de los analitos dependerá de las características propias (carga, masa y forma), de la intensidad del campo aplicado y de las características del medio en el que se produce el movimiento. Pero, en una electroforesis capilar, el movimiento de las especies se ve afectado por el fenómeno denominado electroósmosis.

La electroósmosis se genera a partir de la carga que posee la cara interna del capilar de sílice; esta carga es negativa y atrae a su superficie iones de carga opuesta generando una atmósfera catiónica en la interfaz entre la pared de sílice y la solución. Al aplicar el campo eléctrico la nube de iones positivos se desplaza en dirección al cátodo generando un flujo electroosmótico que va a influir en la movilidad electroforética de cada analito en particular. El flujo electroosmótico arrastrará a todos los analitos presentes en el medio, pero los cationes suman su propia velocidad y van más rápido. Los aniones restan su propia movilidad ya que se desplazan en dirección opuesta por lo tanto se desplazan más lentos y los analitos neutros se desplazan con la velocidad del flujo electroosmótico por lo que no podrán separarse entre ellos.

Para realizar una electroforesis capilar se requiere de un equipo sencillo formado por una fuente de alto poder para generar el campo eléctrico, ya que se necesitan voltajes elevados (kV),

dos recipientes para contener el buffer, un capilar recubierto con una protección de poliimida y un detector (Figura 4.13).

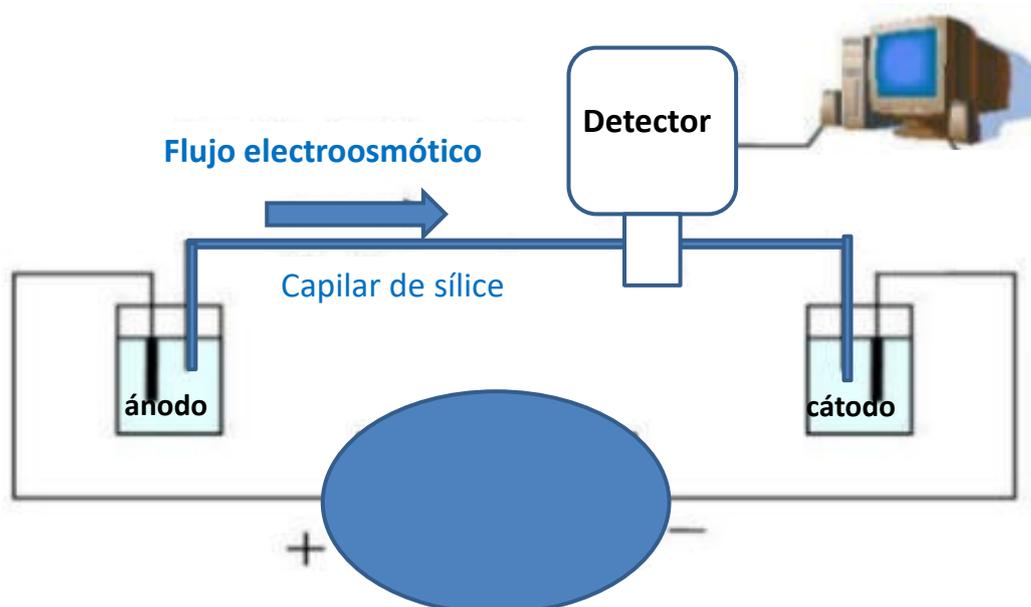


Figura 4.13. Esquema del equipo necesario para ECZ.

Fuente de alto voltaje (entre 10 a 30 kV) y dos compartimentos con el buffer de electroforesis donde están sumergidos los electrodos. Un capilar de 50 a 100 cm de largo cuyos extremos deben estar sumergidos en el ánodo y en el cátodo. Cerca del extremo catódico del capilar se ubica el detector asociado al adquisidor de datos para obtener el registro de la corrida electroforética. Las dimensiones del capilar facilitan la disipación del calor generado por la resistencia eléctrica del electrolito dentro del capilar.

Los volúmenes de muestra a inyectar en el equipo no deben afectar a la eficiencia del método, por lo que se trabaja con volúmenes muy pequeños tales que no ocupen más de un 1-2 % del volumen del capilar. Por este motivo, se requieren etapas de concentración de muestras para que resulte más fácil detectar a los analitos. El equipo trae un sistema de inyección de muestras que generalmente es por inyección hidrodinámica, el recipiente con la muestra (vial) se coloca en el extremo de ingreso al capilar y se aplica presión o bien se coloca en el extremo de salida y se hace vacío. En cuanto a los sistemas de detección, generalmente son medidas de absorbancia en la región ultravioleta-visible o bien por fluorescencia.

Reactivos y procedimiento para preparar en el laboratorio un SDS-PAGE para el análisis de proteínas

El protocolo de trabajo que se propone en este libro se basa en el procedimiento clásico de Laemmli (1970), al que se considera como el procedimiento estándar para esta técnica. La metodología propuesta es para electroforesis SDS-PAGE vertical con geles de 1,5 mm de espesor. Varios reactivos utilizados en las técnicas electroforéticas son tóxicos, cancerígenos, mutagénicos o neurotóxicos además de irritantes y corrosivos. Por este motivo, es muy importante antes de trabajar en el laboratorio con esta técnica, que el usuario se familiarice con la ficha de datos de seguridad correspondiente a cada uno de los compuestos químicos con los que va a trabajar

y que siempre utilice el material de seguridad adecuado: guantes, mascarillas, lentes protectores y campana extractora de gases cuando sea necesario. Otro punto importante a considerar desde el punto de vista de la seguridad en el laboratorio es el adecuado manejo de equipos de alto voltaje. Se debe prestar atención a trabajar siempre aislados de la corriente y manipular el equipo cuando está apagado.

Preparación de los buffer y soluciones necesarias

Buffer muestra 2X: Buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4 % m/v; glicerol 10 % v/v y 2-mercaptoetanol 10 %.

Buffer *stacking*: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Buffer de resolución: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Solución acrilamida/bisacrilamida: 30 % de acrilamida con 1 % de bisacrilamida. Se trabaja con barbijo, guantes y cuidadosamente.

Buffer de corrida 4X: Tris- HCl 0,2 M, glicina 1,5 M, SDS 0,4 %.

Solución de SDS al 20 %

Solución de APS al 10 %

Solución del colorante azul de Coomassie: 1 g de azul brillante Coomassie R250, 500 mL de etanol, 100 mL ácido acético y agua destilada hasta completar 1 L de solución. Esta solución puede reutilizarse varias veces.

Solución decolorante: 200 mL de etanol, 70 mL de ácido acético y agua destilada hasta completar 1 L de solución.

Preparación de las muestras para analizar mediante una electroforesis desnaturizante

A modo de ejemplo se propone trabajar con hojas jóvenes y senescentes de cebada y de maíz para preparar extractos que denominaremos CS y CJ para cebada y MS y MJ para maíz. La selección de hojas senescentes y jóvenes se puede realizar en base a la observación del color de las hojas o bien en base a la posición de la hoja en la planta. Las hojas superiores son las más jóvenes y las hojas inferiores serán las más senescentes.

Para obtener los extractos (muestras con proteínas a analizar) se cortan con un sacabocados 3 discos de hoja de 1 cm de diámetro y se colocan en un mortero de porcelana que se mantiene a baja temperatura (sobre hielo) junto con una mínima cantidad de cuarzo y 1,5 mL de buffer muestra 2X. Se homogeniza y trasvasa a un tubo pequeño con tapa (tubo tipo ependorff), se centrifuga a 10000 g y 4 °C. Se recupera el sobrenadante, se calienta a 100 °C durante 1 min para inactivar proteasas y se agregan 2 µL de azul de bromofenol. Las muestras estarán listas para sembrar en el gel. Es importante realizar la cuantificación de proteínas en el extracto obtenido ya que según cual sea la pregunta a resolver mediante la electroforesis, la cantidad de muestra a sembrar puede definirse por volumen de extracto o por concentración de proteínas en el extracto.

Armado del gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Se necesita armar un gel para realizar la electroforesis. Las recetas que se proponen a continuación corresponden al armado de un gel usando el molde para geles pequeños de 1,5 mm de espesor. Los equipos usados para geles pequeños se suelen denominar mini-protean.

Para armar el gel se debe colocar primero el gel de resolución, el que ocupará aproximadamente 2/3 del total del molde. Se espera el tiempo suficiente para que polimerice por completo el gel de resolución y sobre este se coloca el gel de *stacking* e inmediatamente el peine para moldear las calles. Se espera el tiempo necesario para que polimerice el *stacking* (Figura 4.6).

Gel de resolución 12 % de acrilamida

Para preparar 10 mL del gel se deben mezclar 2,3 mL de buffer de resolución, 4 mL de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 3,44 mL de agua bidestilada y 200 μ L de SDS 20 %. Por último, se agrega 10 μ L de TEMED y 54 μ L de APS 10 %, se mezcla y se carga inmediatamente el molde del gel antes que comience la polimerización. Una vez cargado el gel de resolución, se puede cargar una fina película de butanol sobre el mismo para favorecer la polimerización.

Gel de *stacking*

Para preparar 5 mL del gel se deben mezclar 1,25 mL del buffer de *stacking*, 1 mL de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 2,55 mL de agua bidestilada, 100 μ L de SDS 20 % y finalmente 5 μ L de TEMED y 50 μ L de APS 10 %. Se mezclan rápidamente y se carga en el molde.

Siembra de muestras y corrida electroforética

El gel polimerizado dentro del molde se coloca en la cuba de electroforesis. Se completa el sistema cargando buffer de corrida en el compartimento catódico y anódico. Con este paso, las calles del gel donde se siembran las muestras quedan completas con buffer. En cada calle se siembra un volumen de muestra que no supere la capacidad de la misma, suele ser un volumen máximo de 45 μ L. Se observará que la muestra se deposita en el fondo de la calle. En general se coloca en una calle una muestra de referencia que permitirá controlar que el procedimiento fue adecuado durante toda la electroforesis. Lo más común es usar como referencia una mezcla de proteínas conocidas que serán las referencias de pesos moleculares. Finalizada la siembra de las muestras, se cierra el circuito colocando la tapa del equipo y conectándolo a la fuente de alto voltaje. Se programa una corrida a 100 V y se controla el avance de las bandas de migración para determinar el momento final de la electroforesis. Suele ser aproximadamente 2 h para el gel descrito (12 % de acrilamida y 1,5 mm de espesor).

Tinción y decoloración del gel

Finalizada la electroforesis, se interrumpe el campo eléctrico aplicado, se abre la cuba electroforética y se retira cuidadosamente el gel del interior del molde. Se coloca el gel en un recipiente y se lo cubre con la solución colorante. Se deja en contacto durante toda la noche. Finalmente se retira la solución colorante del recipiente y se reemplaza por la solución decolorante. Se mantiene en agitación y se reemplaza varias veces esta solución decolorante hasta que aparecen las bandas azules que corresponden a la tinción específica de las

proteínas. El gel puede escanearse para guardarlo como un archivo. Luego comienza la etapa de análisis de los resultados.

Análisis de los resultados

Una vez obtenido el perfil de proteínas para cada muestra se proponen tres actividades diferentes:

- 1- Análisis comparativo entre las proteínas de hojas jóvenes y senescentes para cada especie, cebada y maíz.
- 2- Análisis comparativo del perfil de proteínas entre maíz (especie de metabolismo C4) y cebada (especie con metabolismo C3).
- 3- Determinar el peso molecular de las bandas más abundantes y en base a datos bibliográficos de pesos moleculares tratar de identificar las subunidades de proteínas vegetales abundantes: RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa), proteínas vegetativas de almacenamiento foliares (VSP), etc.

Para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas en cada muestra se grafica una curva de calibración en base a los pesos moleculares conocidos de la mezcla de proteínas de referencia que se sembró en el gel. La curva de calibración se obtiene al graficar el log de la masa molecular aparente *versus* la distancia recorrida sobre el gel.

Ejemplos de aplicación de los métodos electroforéticos

Análisis de diferentes isoformas de la enzima glutamina sintetasa (GS) en hojas de cebada

Una enzima clave en el metabolismo de nitrógeno en plantas es la enzima glutamina sintetasa que cataliza la incorporación del amonio (nitrógeno inorgánico) como glutamina (aminoácido, nitrógeno orgánico) la que será utilizada para la interconversión de aminoácidos y posterior síntesis de proteínas. Los vegetales presentan varias isoformas de la enzima glutamina sintetasa, que presenta diferente localización dentro del tejido vegetal (cloroplásticas, citosólicas, específicas de tejido vascular) y diferente peso molecular. En hojas jóvenes la isoforma más abundante es GS cloroplástica (GS2), involucrada activamente en la asimilación de nitrógeno inorgánico proveniente de la nutrición mineral, mientras que en etapas de activa degradación de proteínas (senescencia foliar) aparece la isoforma citosólica (GS1) muy activa para reasimilar el amonio producido durante la proteólisis.

Para analizar las diferentes isoformas de la enzima GS en diferentes etapas del cultivo de cebada podemos obtener primero el perfil de proteínas mediante una electroforesis y luego, mediante inmunodetección, revelar las diferentes isoformas sobre el perfil de proteínas obtenido utilizando anticuerpos específicos que reconocen las isoformas GS1 o GS2 como anticuerpos primarios. Relacionado a este ejemplo de aplicación se sugiere la lectura de Avila-Ospina y col. (2015).

Análisis de los cambios en el perfil de proteínas de diferentes forrajes luego de una incubación con líquido ruminal de bovinos

Los forrajes aportan proteína dietaria a los animales. En el caso de rumiantes, un porcentaje de la proteína dietaria será fermentada en el rumen donde habitan microorganismos fermentadores con intensa actividad proteolítica y degradarán la mayor parte de las proteínas transformándolas en péptidos y aminoácidos. Una parte de la proteína dietaria llegará al intestino del animal sin sufrir modificaciones; a esta porción de proteínas se la denomina proteínas no degradables. Se pueden analizar los cambios que produce el líquido ruminal sobre el perfil inicial de proteínas de un forraje para estimar el porcentaje de proteína no degradable que contiene. Esta información se puede sumar para facilitar la formulación de dietas basadas en las proteínas metabolizables y absorbibles para los animales (Slanac y col., 2014). Para ello, se puede realizar una electroforesis desnaturante SDS-PAGE en la que se compare el perfil de proteínas del forraje inicial con el perfil de proteínas del mismo forraje luego de ser incubado en contacto con líquido ruminal del animal. Se sugiere la lectura de Slanac y col. (2014).

Referencias

- Avila-Ospina, L., Marmagne, A., Talbotec, J., Krupinska, K. y Masclaux-Daubresse. C. (2015). The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 66(7), 2013-2026.
- García Trejo, J.J. y Ortega, R. (2021). Historia, fundamentos y métodos de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. *Mensaje bioquímico*, 45, 90-108. Recuperado de <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Huerta-Ocampo, J.A., Briones-Cerecero, E.P., Mendoza-Hernández, G., De León Rodríguez, A. y Barba de la Rosa, A.P. (2009). Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Science*, 170, 990-998.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Mikkelsen, S. R. y Cortón, E. (2010). Capítulo 11 Isoelectroenfoque. En *Química Bioanalítica* (pp. 263-274). Eudeba.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2001). *Principios de Bioquímica*. Omega.
- Slanac, A.L., Sgroppo, S.C., Kucseva, C.D. y Balbuena, O. (2014). Digestión ruminal. Caracterización electroforética de proteínas de la “paja amarilla” (*Sorghastrum setosum*) incubada en rumen de bovinos. *Revista Veterinaria*, 25(2), 120-125.

CAPÍTULO 5

Métodos para analizar ácidos nucleicos

Mariela P. Bayardo y Alejandra Bárcena

Conceptos generales sobre ácidos nucleicos

La Biología Molecular es una de las ramas de la Biología más dinámicas dentro de las Ciencias Biológicas, en constante cambio. Se define a la Biología Molecular como el estudio de los mecanismos mediante los cuales los ácidos nucleicos participan en los procesos de transmisión de la información genética. Los límites de esta disciplina se entrelazan con ramas de la Biología como la Bioquímica, la Microbiología y la Genética (Peña-Castro y col., 2013).

Las técnicas de Biología Molecular en las últimas décadas han adquirido gran relevancia en las distintas áreas de investigación, no siendo el área de las Ciencias Agrarias y Forestales una excepción. Las aplicaciones de estas técnicas se ven reflejadas en desarrollos biotecnológicos que buscan mejorar el rendimiento de los cultivos a través de modificaciones a nivel genético, que provocan ya sea cambios en la información o la expresión de proteínas o enzimas que cumplirán alguna función específica. Se describen a continuación algunos ejemplos.

- El maíz conocido como *Bt* resistente a plagas. Se trata de maíz modificado genéticamente que expresa proteínas insecticidas en sus tejidos y de este modo se protegen frente al ataque de insectos plaga. La denominación *Bt* deriva de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, el organismo donante de los genes que aportan la característica deseada.
- Manzanas y papas resistentes al pardeamiento. Son vegetales modificados genéticamente que se oxidan más lentamente. El pardeamiento u oxidación es un proceso natural en frutos y hortalizas que ocurre cuando los tejidos internos del vegetal quedan expuestos al oxígeno, mediante heridas o cortes. Los cambios en el aspecto del vegetal reducen el valor comercial del producto ya que suele descartarse. Con técnicas de Biología Molecular se desarrollaron manzanas y papas que no se oxidan mediante la inhibición de la enzima responsable del proceso, una polifenol oxidasa (PPO).
- El arroz dorado es un tipo de arroz al que se le ha introducido la información genética necesaria para fabricar betacaroteno, pigmento vegetal precursor de la vitamina A.
- Quimosina para elaboración de queso. El cuajo y los coagulantes son preparaciones de enzimas que se emplean para fabricar queso desde hace miles de años. La fuente natural de la enzima coagulante de la leche denominada quimosina es el cuarto estómago (cuajo) de terneros, a partir de donde se la purifica. La quimosina producida por

organismos recombinantes o genéticamente modificados (OGM) está presente en el mercado desde 1990. Se trata de una quimosina producida por microbios a los que se les ha incorporado el gen para la síntesis de quimosina bovina. En Argentina, se aprobó en 2017 el cártamo transgénico (modificado genéticamente), desarrollo argentino, y la primera incorporación de un cultivo que genera una enzima de uso agroalimentario que se purifica con alta eficiencia a partir de las semillas de la planta oleaginosa (Figura 5.1).



Figura 5.1. Planta de cártamo.

Antes de comenzar con el estudio de los métodos utilizados por el biólogo molecular, se mencionarán algunos conceptos básicos de la disciplina.

Los ácidos nucleicos son las macromoléculas encargadas de almacenar y transmitir información genética. Hay dos tipos de ácidos nucleicos, el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico). El ADN y el ARN están formados por largas cadenas de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, una molécula de azúcar pentosa, y una base nitrogenada. La molécula de azúcar en el ADN es la desoxirribosa y en el ARN es la ribosa, en ella se unen los grupos fosfato para formar la cadena de nucleótidos. Los nucleótidos de cada ácido nucleico pueden contener una de cuatro bases nitrogenadas. El ADN contiene: adenina, timina, citosina, y guanina, y el ARN se diferencia en que tiene uracilo en lugar de timina. Las bases nitrogenadas que forman una cadena del ADN tienen la capacidad de hibridar, es decir, de unirse a la base complementaria de la otra cadena de ADN, mediante la formación de fuerzas puentes de hidrógeno. La adenina se une con la timina estableciendo 2 puentes de hidrógeno, y la citosina se une con la guanina a través de 3 de estas fuerzas intermoleculares. Para referirse a los ácidos nucleicos se utiliza la cantidad de bases que los forman como unidad de tamaño, entonces se define kilobase (kb) a la unidad de medida que se usa para designar la longitud del ADN o el ARN. Una kilobase es igual a 1000 pares de bases (pb). La molécula de ADN es una doble cadena helicoidal y el ARN es una cadena simple (Figura 5.2). Las cadenas de polinucleótidos tienen una dirección definida en base al extremo de la ribosa o desoxirribosa que queda libre del grupo fosfato, puede ser extremo 5' o 3'. Es importante notar que las cadenas que forman una molécula de ADN tienen una orientación invertida una con respecto de la otra; en efecto, mientras una cadena se orienta en la dirección 5'-3' la otra lo hace en la dirección 3'-5'. Esta situación se describe diciendo que las cadenas son antiparalelas.

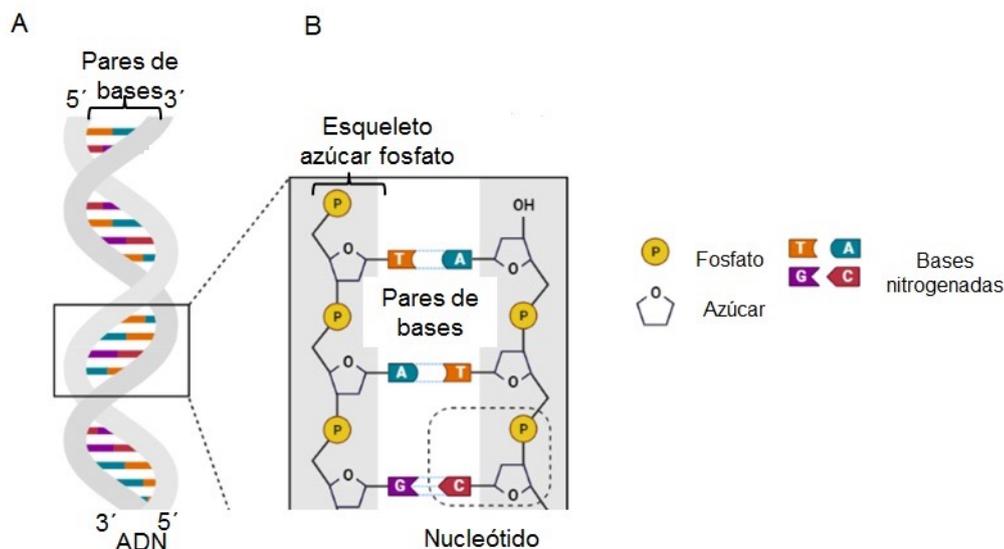


Figura 5.2. Estructura del ADN.
A) Doble cadena helicoidal. B) Detalle de los nucleótidos.

El ADN que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas, y como molécula circular libre en células procariotas (bacterias), se lo denomina ADN genómico (ADNg). Sirve como molde para la síntesis de ARN mensajero (ARNm). Este mecanismo se denomina transcripción. La ARN polimerasa es la enzima encargada de copiar la secuencia de ADN en una secuencia de ARNm. Luego, la información de la secuencia del ARNm es decodificada en los ribosomas y traducida en una secuencia de aminoácidos que formarán proteínas, este mecanismo se denomina traducción (Figura 5.3).

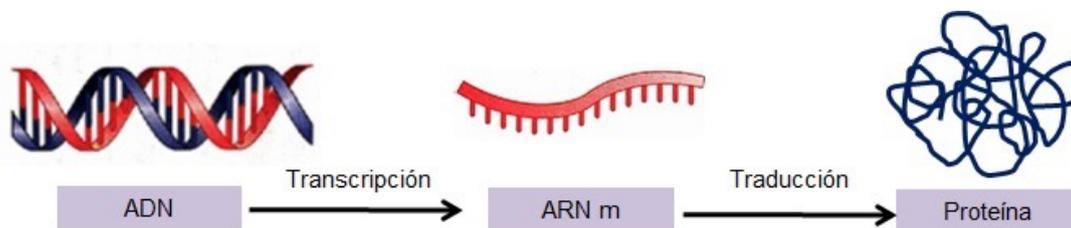


Figura 5.3. Esquema del flujo de la información genética

El mecanismo de replicación del ADN en el cual se duplica la información genética es realizado por varias enzimas, entre ellas las ADN polimerasas. Este proceso ocurre, por ejemplo, cuando una célula se divide (mitosis) para dotar a las células hijas con la misma información genética (ADN) que la célula que les dio origen. Dentro del ADN podemos diferenciar zonas de ADN codificante (1 %), que involucra a los genes que se transcribirán a ARNm y luego a proteínas, y zonas de ADN no codificante (99 %), que son secuencias de bases nucleotídicas que no son traducidas a proteínas.

Los genes tienen una estructura básica formada por una región promotora próxima a donde se unirá la enzima ARN polimerasa y proteínas que actúan como factores de transcripción, para comenzar la copia de la información de ADN a ARNm en el mecanismo de transcripción. Tienen

también una secuencia terminadora que indica que se ha completado el transcrito de ARN (ARNm), permitiendo que el mismo sea liberado de la ARN polimerasa (Figura 5.4).

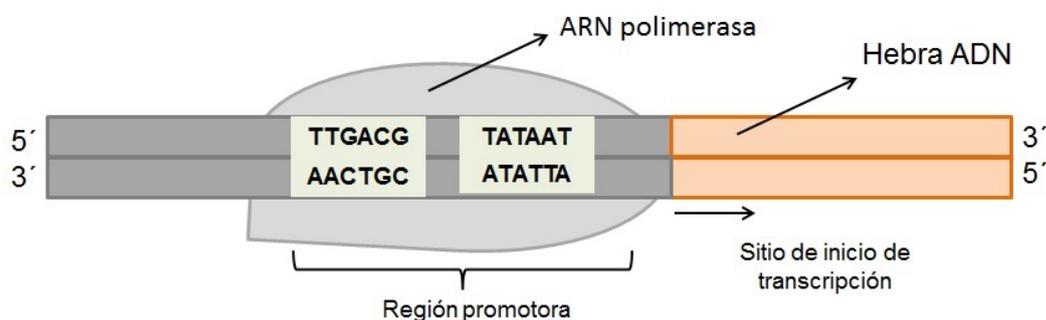


Figura 5.4. Unión de la ARN polimerasa al ADN para realizar la transcripción. En el esquema se muestra el sitio de unión de la ARN polimerasa en la región promotora, donde se iniciará la copia de la información de ADN a ARNm.

Técnicas básicas de Biología Molecular

Cualquiera sea la técnica que se va a utilizar en Biología Molecular se realizará teniendo en cuenta pautas metodológicas y de seguridad indispensables. Se trabaja en condiciones de esterilidad para preservar la integridad de las muestras biológicas y evitar su contaminación. El material de laboratorio empleado es esterilizado (generalmente por autoclavado) previo a su uso; las soluciones se preparan con agua bidestilada esterilizada y en muchos casos es necesario trabajar en flujo laminar (Figura 5.5).



Figura 5.5. Cabina de flujo laminar.

El flujo de aire en la cabina circula desde la rejilla que se observa frente al operario hacia el mismo, de esta forma se impide que se contamine el material de trabajo. También es habitual el uso del mechero, como se observa a la derecha de la imagen.

De los numerosos métodos utilizados por el biólogo molecular, algunos de los de mayor importancia en el desarrollo de esta rama de la ciencia son: electroforesis (método desarrollado en el Capítulo 4), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación, clonación molecular, hibridación *in situ*, entre otros (Peña-Castro y col., 2013). El punto de partida para cualquiera de las técnicas mencionadas es el aislamiento de ácido nucleico, por lo tanto, será siempre el primer paso en Biología Molecular. Se describen a continuación los procedimientos de algunas de las técnicas mencionadas.

Extracción de material genético vegetal (ADNg, ARN)

Para estudios moleculares la extracción de material genético de elevada pureza y calidad es fundamental. Para la extracción de ADNg a partir de tejidos vegetales, como raíz, tallo, hoja, flor, semilla y fruto, el método más utilizado es el método CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1987). Mientras que, para la extracción de ARN, el método más utilizado es el que utiliza tiocianato de guanidinio- Fenol (TRIZOL) como *buffer* de extracción (Chomczynski y Sacchi, 1987). El protocolo de extracción de ARN es más delicado que la extracción de ADN, debido al riesgo de contaminación por las ARNasa, enzimas que degradan ARN. Por lo tanto, para eliminar la contaminación de ARNasa, todo el material de vidrio y de plástico debe esterilizarse (Sah y col., 2014) (Figura 5.6).



Figura 5.6. Condiciones de trabajo para realizar extracción de ADN

Extracción de ADNg con el método CTAB

La extracción de ADN consta básicamente de tres etapas: lisis celular, purificación y recuperación.

La etapa de lisis, en tejidos vegetales, consiste en la ruptura de la pared celular y la membrana plasmática. Para romper la pared celular se congela el tejido con nitrógeno líquido y se obtiene

un pulverizado. Para romper la membrana plasmática se utiliza el detergente CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, es un surfactante catiónico) que se encarga de desestabilizar la membrana y formar complejos con las proteínas y polisacáridos, pero no precipita ácidos nucleicos. Se trabaja a una temperatura entre 50-70 °C para favorecer la ruptura de los lípidos que componen la membrana celular. La temperatura no debe superar los 80 °C para evitar la degradación del ADN.

En la etapa de purificación, se busca eliminar otros componentes celulares que son liberados al medio junto con el ADN. En general se realizan uno o dos lavados con solventes orgánicos como fenol o cloroformo. Luego de estos lavados, las fases orgánica y acuosa se separan por centrifugación. En la fase orgánica quedan retenidos, lípidos, proteínas y la mayoría de los polisacáridos. Mientras que, en la fase acuosa quedan el ADN, ARN y algunos polisacáridos.

Finalmente, en la etapa de recuperación, a la fase acuosa obtenida en la etapa anterior se le agrega alcohol, etanol o isopropanol y sales, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, y acetato de amonio, para neutralizar la carga negativa del ADN favoreciendo su precipitación. El precipitado formado, frecuentemente es visible y puede ser sedimentado por centrifugación. A este precipitado luego se lo lava con alcohol para eliminar las sales remanentes. Por último, el precipitado se trata con ARNasa para degradar el ARN y obtener ADNg. El ADNg obtenido se almacena a -20 °C.

Los protocolos de extracción deben ser ajustados para cada especie vegetal e incluso para distintos órganos (raíz, tallo, hoja, flor, semilla y fruto) de una misma especie (Sahu y col., 2012).

Extracción de ARN

La extracción de ARN consta de cuatro etapas básicas: lisis celular, extracción, purificación y recuperación. Presenta similitudes con la extracción de ADN, pero cabe destacar que se requieren más cuidados por ser el ARN una molécula más lábil.

La primera etapa consiste en la ruptura mecánica en presencia de nitrógeno líquido de la pared celular y membrana plasmática del tejido vegetal. Se trabaja en frío para evitar la degradación.

En la segunda etapa, el tejido se resuspende en un *buffer* de extracción que produce la lisis del mismo, la solubilización de las membranas lipoproteicas y la desnaturalización de las proteínas, y el ARN es protegido de la acción de enzimas degradativas.

En la tercera etapa, se realiza una extracción con solventes orgánicos (fenol ácido pH 4,5 y cloroformo), y se separan por centrifugación las fases orgánica y acuosa. La fase orgánica retiene lípidos, proteínas y la mayoría de los polisacáridos. La fase acuosa retiene el ARN y ADN por ser polímeros de composición muy similar. A la fase acuosa obtenida se le agrega alcohol (etanol o isopropanol) y el material genético precipita, y puede ser sedimentado por centrifugación.

En la cuarta etapa, el ARN es resuspendido en agua bidestilada estéril libre de ARNasas (agua tratada con dietil pirocarbonato, DEPC). Para eliminar el ADN contaminante presente en la muestra purificada, se incuba con la enzima ADNasa, encargada de su degradación.

Métodos para evaluar la calidad y cantidad del material genético vegetal extraído (ADNg y ARN)

Para evaluar la calidad del ADNg y ARN obtenido se realiza la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible, y una corrida en gel de agarosa para evaluar su integridad.

La pureza de los ácidos nucleicos se evalúa a partir de las relaciones de absorbancias A260/A280 y A260/A230. La absorbancia a 260 nm se asocia a la presencia de ácidos nucleicos, a 280 nm se asocia a proteínas, y a 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, sustancias presentes en las soluciones empleadas en los protocolos de extracción de los ácidos nucleicos.

Para la pureza del ADN el valor óptimo de la relación A260/A280 es 1,8, y para el ARN es de 2. En cuanto a la relación de pureza A260/A230, para ambos materiales genéticos un rango entre 1,8 y 2,2 es aceptado como “puro”. Valores de estas relaciones por fuera de dichos rangos indican contaminación con proteínas, fenoles o carbohidratos (Healey y col., 2014).

Con respecto a la cuantificación del material genético, se realiza la lectura de absorbancia a 260 nm y se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{Valor de A (260 nm)} \times \text{Factor de dilución} \times 50 \mu\text{g ADN mL}^{-1}$$

En donde el valor de A260nm es la absorbancia medida; el factor de dilución corresponde a la dilución de la muestra del ADN (generalmente se diluye 1:40 o 1:50 en agua, siendo el factor 40 o 50 según el caso). El coeficiente 50 $\mu\text{g ADN mL}^{-1}$ corresponde a la concentración de ADN doble cadena que da un valor de absorbancia de 1. Si se trata de cuantificar ADN simple cadena el coeficiente es 33 $\mu\text{g ADN mL}^{-1}$, y en el caso de ARN simple cadena 40 $\mu\text{g ARN mL}^{-1}$.

Para la determinación de la integridad de los ácidos nucleicos se realiza una electroforesis en gel de agarosa tal como se explicó en el Capítulo 4. Brevemente, se siembra en el gel de agarosa un marcador de peso molecular y las muestras que corresponden a los fragmentos de ácidos nucleicos obtenidos. Luego de la separación de los fragmentos, se realiza la etapa de revelado para evidenciar las bandas en el gel. Para realizar el revelado se utiliza una solución de bromuro de etidio. El bromuro de etidio es un agente intercalante de bases, mutagénico, por lo que es necesario extremar los cuidados al trabajar con este reactivo, usar guantes y manipular el gel con cuidado. La visualización de las bandas se realiza por exposición del bromuro a luz UV. La radiación UV es dañina para la vista, por lo que es necesario utilizar anteojos que bloqueen los rayos, y la fuente de luz debe estar protegida por un acrílico que filtre los rayos perjudiciales para el usuario.

La integridad de los ácidos nucleicos se verifica al visualizar un patrón de bandas nítido y característico correspondiente al material sin degradar, mientras que, si se visualiza un patrón sin bandas definidas, es indicador de que el material genético ha sido degradado.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Un ADN complementario (ADNc) de cadena simple puede ser sintetizado *in vitro* utilizando como molde el ARNm. Esta reacción es catalizada por la enzima transcriptasa reversa (RT), la cual es una ADN polimerasa dependiente de ARN. Se utilizan cebadores o *primers* que son secuencias de longitud variable de 15 a 20 nucleótidos dado que la RT requiere de la presencia de nucleótidos hibridados previamente para poder sintetizar la cadena. Consisten en hexámeros de secuencia al azar u oligodT, que tienen nucleótidos con timina como base nitrogenada (Levitus y col., 2010). Estos últimos cebadores hibridan con la cola poliA del ARNm (150 a 200 residuos de adenina en el extremo 3' del ARNm) y la enzima RT comienza la síntesis del ADNc (Figura 5.7).

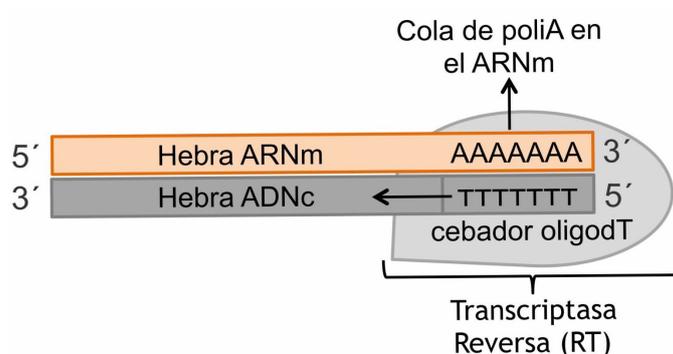


Figura 5.7. Síntesis de ADNc a partir de ARN por la enzima Transcriptasa Reversa.

En el esquema se muestra la unión del cebador oligodT a la secuencia de poliA del ARNm a partir de donde la enzima RT sintetizará una hebra de ADN simple cadena usando de molde la secuencia del ARNm.

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, de sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), también conocida como PCR a tiempo final, es empleada con el propósito de amplificar e incrementar en cantidad una secuencia de interés (gen, promotor, secuencia no codificante, etc.) presente en una muestra de ADN. Se emplean secuencias específicas diseñadas para tal fin denominadas cebadores o *primers*, y se utiliza la enzima ADN polimerasa.

La PCR permite detectar e identificar de manera específica secuencias de interés presentes en una muestra a analizar. Por ejemplo, si se quisiera determinar la presencia del serotipo O157:H7 de la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*), que produce el síndrome urémico hemolítico, en un alimento como puede ser un embutido o hamburguesa, se procederá a realizar una PCR en las muestras alimenticias empleando *primers* específicos para un gen de *E.coli*. Si el resultado revela que ha ocurrido la amplificación del gen bacteriano, podemos concluir que los alimentos están contaminados con dicho microorganismo. Es decir que, con la PCR en tiempo final podemos decir si el gen está presente o no.

Fundamento de la técnica

Mediante el proceso de amplificación, una secuencia de ADN que inicialmente se encuentra en baja concentración es multiplicada *in vitro*. El objetivo de la amplificación es aumentar el número de copias de la secuencia de interés para poder ser detectada.

Los reactivos necesarios para la reacción de PCR son: ADN en estudio, los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), ADN polimerasa termoestable (es la enzima que sintetiza numerosas copias a partir de un fragmento de ADN, a altas temperaturas), cloruro de magnesio (como co-factor de la enzima), cebadores o *primers* específicos para la secuencia en estudio, un *buffer* para mantener el pH óptimo para el funcionamiento de la enzima (Sambrook y col., 1989).

Diseño y elección de secuencias *primers* o cebadores del gen de interés a amplificar

El objetivo del diseño de *primers* es la especificidad, es decir cada parte del *primer* debe pegarse a la secuencia de ADN en estudio. Para el diseño de *primers* se utilizan bases de datos, la más conocida es NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Al realizar un diseño de *primers* es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La longitud debe ser de 18-30 nucleótidos
- El contenido de GC debe ser 40-60 %.
- La temperatura de desnaturalización de los *primers* (o *melting*), temperatura a la cual la mitad de las moléculas del *primer* están apareadas con el ADN molde monocatenario, debe ser 50-70 °C, y la diferencia entre ambos pares de *primers* no debe ser más de 5 °C. La temperatura es calculada por programas de diseño de *primers* y tiene en consideración tanto su longitud como su composición.
- La longitud del producto dependerá del propósito de la PCR. Si es para clonado, deberá amplificarse el gen completo (varias kb), si es para determinar presencia o ausencia del gen, la longitud del producto puede ser entre 100-150 pb.
- Evitar que la secuencia dentro del *primer* y entre *primers* sean complementarias
- Tras diseñar la secuencia del *primer*, se evalúa que no tenga complementariedad con otras secuencias publicadas de la especie de interés para evitar la amplificación de otras secuencias (contaminación). Se realiza lo que se denomina un *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), este algoritmo permite realizar un alineamiento entre la secuencia de los *primers* diseñados y las secuencias publicadas de la especie en la base de datos génica para verificar que el grado de complementariedad sea lo suficientemente bajo con secuencias no relacionadas para que no ocurran amplificaciones de secuencias indeseadas (contaminación).

Descripción del protocolo, del equipo y programa de corrida

Un ciclo de PCR, consta de 3 etapas: desnaturalización, hibridación y elongación.

La etapa de desnaturalización de la doble cadena de ADN ocurre entre 92-95 °C, y se obtiene la simple cadena de ADN (ADN monocatenario) (Figura 5.8, etapa1).

Luego, ocurre la hibridación, los cebadores o *primers* se unen a la cadena complementaria del ADN de simple cadena (Figura 5.8, etapa 2). La temperatura a la que ocurre esta etapa depende de la secuencia y tamaño de los cebadores, puede variar entre 35-60 °C.

En la etapa de elongación, la síntesis del ADNc por acción de la ADN polimerasa ocurre próxima a 72 °C, que es la temperatura óptima para la enzima (Figura 5.8 etapa 3).

Este ciclo se repite numerosas veces, y en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN (Levitus y col., 2010).

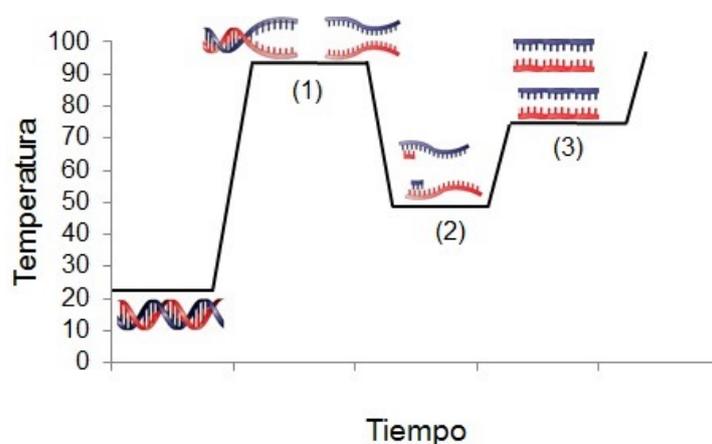


Figura 5.8. Esquema reacción en cadena de la polimerasa.
1) Desnaturalización, 2) Hibridación, 3) Elongación. En cada ciclo aumenta 2ⁿ veces la cantidad de ADN (n es el número de ciclos).

El equipo que se utiliza para realizar la reacción se denomina termociclador, permite controlar los tiempos y temperaturas necesarios en cada etapa de la PCR (Figura 5.9).

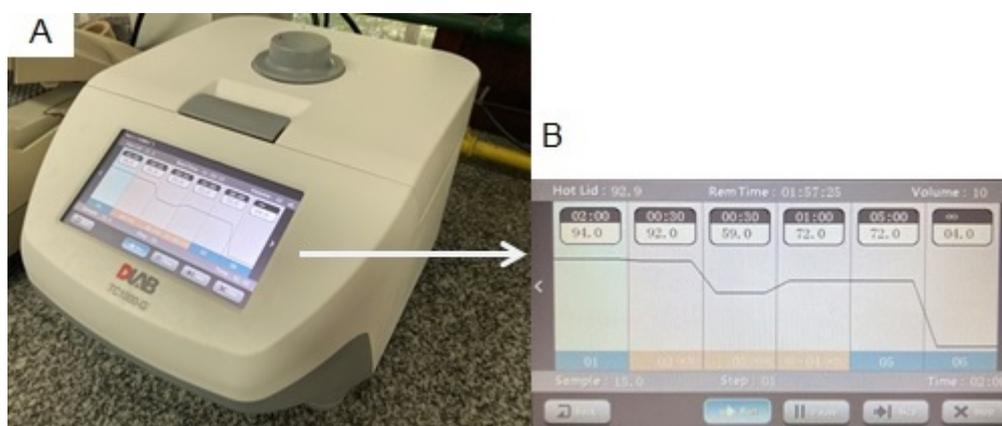


Figura 5.9. Equipo termociclador.
A. Fotografía del termociclador. En (B) se muestra un detalle de la pantalla del termociclador donde se observan los tiempos y temperaturas de los ciclos de una reacción en curso.

Purificación del fragmento amplificado en un gel de agarosa

Para visualizar los fragmentos amplificados por PCR, se realiza una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos de ADN y se revela con bromuro de etidio (como se explicó anteriormente). Para determinar el tamaño del fragmento amplificado se utilizan marcadores moleculares a modo de referencia, que consisten en una mezcla de fragmentos de pesos moleculares conocidos. Por comparación de los marcadores moleculares con el fragmento amplificado se estima su tamaño (Levitus y col., 2010, Figura 5.10, calles 1, 2 y 3).

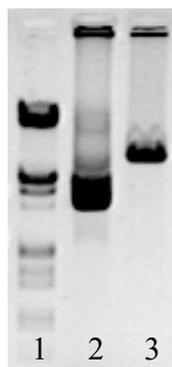


Figura 5.10. Producto de PCR en un gel de agarosa.
En la calle 1, marcadores de peso molecular (21200-564 pb); calle 2, ADN genómico;
calle 3, producto de amplificación de PCR.

La purificación del producto de PCR consiste en eliminar los restos de los reactivos utilizados en la reacción (*primers*, dNTPs, enzimas, etc.). La purificación del producto de PCR puede realizarse con una serie de soluciones e incubaciones o también utilizando kits comerciales. El objetivo es obtener el fragmento puro para usarlo en aplicaciones posteriores como secuenciación (técnica que permite determinar de manera ordenada y exacta los nucleótidos que conforman una secuencia genética) o digestión con enzimas de restricción (para utilizarlo posteriormente en transformaciones, como se detalla más adelante).

Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR)

Se conoce como PCR cuantitativa (qPCR), o PCR en tiempo real, a una variación de la técnica de PCR a tiempo final que permite cuantificar la cantidad inicial de un fragmento determinado presente en la muestra analizada, ya sea ADNg o ADNc (a partir de ARNm). Algunas de sus aplicaciones más empleadas son estudios de expresión génica, detección de patógenos alimentarios, determinación de la carga viral en muestras biológicas, etc.

Hay una relación cuantitativa entre la cantidad de la secuencia de interés inicial y la cantidad del producto de PCR en cualquier ciclo de la amplificación. Mediante el empleo de fluoróforos (el más utilizado es el *SYBR Green*, que es un reactivo que se intercala entre las bases del ADN confiriendo

fluorescencia, lo que permite visualizar los productos de la PCR) se puede monitorear el progreso en tiempo real de la reacción de amplificación. Se mide la fluorescencia liberada cada vez que se realiza una copia del ADN molde, puesto que el incremento de la intensidad de ésta es proporcional a la cantidad de ADN generado. A medida que procede la amplificación, la fluorescencia aumenta conforme lo hace la cantidad de producto. Es fundamental incluir en las corridas de qPCR la amplificación de genes normalizadores o endógenos (*housekeeping*) cuyos niveles de expresión sean constantes en la muestra a analizar, pues el procesamiento de los datos de los amplicones de interés (secuencias de ADN amplificadas) son relativizados a los valores obtenidos de estos otros genes, junto con el de las muestras control. Finalmente, con un *software*, se procesan los datos para su análisis. Para profundizar estos contenidos se sugiere la lectura de los manuales de la técnica Real-Time PCR publicados por las empresas que comercializan los equipos, los cuales son de libre acceso en la *web*, por ejemplo, el manual de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_053237.pdf).

Consideraciones metodológicas

El instrumental en el laboratorio que se utiliza es un termociclador (similar al de PCR tiempo final) pero con lector óptico para la detección de la fluorescencia emitida en las corridas. Permiten el análisis de hasta 96 muestras por corrida al admitir el formato de placa de 96 *wells* o pocillos. Se puede realizar la detección simultánea de más de un fluoróforo y, por lo tanto, la detección de más de una secuencia en un mismo tubo. Al igual que la PCR tiempo final utiliza los mismos reactivos (*primers*, dNTP, PCR *buffer*, taq polimerasa, ADN molde). En este caso el *buffer* utilizado contiene además el fluoróforo elegido (*SYBR Green* u otro).

Consideraciones técnicas

Al ser una técnica tan sensible de detección, es primordial evitar la contaminación cruzada para evitar resultados erróneos. Algunas medidas que se sugieren en este sentido, y otras buenas prácticas de laboratorio, son las siguientes:

- Organizar áreas de trabajo separadas en el laboratorio: área de preparación de las muestras, área de armado de la PCR, área de carga de las muestras y controles a la placa, área de amplificación
- Respecto de los reactivos: mantenerlos siempre cerrados hasta su uso, almacenados adecuadamente, minimizar los ciclos de congelamiento, mezclar en vortex siempre antes de separar en alícuotas, utilizar siempre material plástico estéril y los tips de las micropipetas automáticas deben ser con filtro
- El operario deberá utilizar guantes de nitrilo, o bajos en polvo, así como evitar hablar sobre las muestras y reactivos durante la manipulación de las mismas.

Ejemplo de aplicación de un análisis por PCR en tiempo final

Análisis diferencial de la expresión de la proteasa SAG12 asociada a senescencia en función de la edad de la hoja en plantas de tomate

Durante el crecimiento y maduración de frutos de tomate, se desarrolla la senescencia en las hojas de la planta. Este proceso se caracteriza por una intensa actividad proteolítica y removilización de nitrógeno desde las hojas hacia los frutos. Una proteasa característica asociada con el proceso de senescencia foliar es la proteasa cisteínica conocida como SAG12. Para analizar si esta enzima está involucrada en la senescencia de hojas de tomate se comparará de manera cualitativa la expresión de la enzima en hojas jóvenes y senescentes de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) mediante la técnica de PCR.

Se obtendrán las muestras de hojas jóvenes y senescentes de plantas de tomate y se colocarán inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se pulverizarán en un mortero de porcelana. Se realizará la extracción del ARN con el protocolo de fenol ácido y cloroformo anteriormente descrito. Se cuantificará y se determinarán las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 para determinar pureza y concentración. La integridad será determinada mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1 %. Si la integridad de la muestra es correcta el resultado esperado en el gel son dos bandas definidas correspondientes a las dos subunidades del ARN ribosomal.

Se procederá a realizar la síntesis del ADNc, y a continuación, la reacción de PCR con cebadores específicos para el gen de la proteasa SAG12. Como control de reacción negativo se preparará una mezcla de reacción sin agregar ADNc, y como control de reacción positivo se agregará ADNc de una muestra conocida, para asegurar que los reactivos y condiciones de reacción funcionan.

El producto de amplificación será separado por electroforesis en un gel de agarosa. Se analizará el resultado obtenido, comparando cualitativamente la intensidad de banda del producto de amplificación de SAG12 en los dos estadios de desarrollo evaluados (hojas jóvenes y senescentes). Con la técnica de PCR a tiempo final realizamos la comparación cualitativa, si se requiere cuantificar la expresión de la enzima SAG12 se deberá realizar el método de PCR en tiempo real.

Clonado de un fragmento de ADN en un vector de clonado o expresión

Para la clonación molecular se emplea un conjunto de técnicas experimentales para ensamblar fragmentos de ADN dentro de una molécula circular de ADN llamada plásmido o vector de clonación, de origen bacteriano. El ADN recombinante será incorporado a un organismo receptor, generalmente bacterias, donde se inducirá su expresión, o bien, oficiará como reservorio y amplificador de la secuencia de interés. Un vector de clonación contiene elementos como el origen de replicación, un sitio múltiple de clonación (SMC), que es una secuencia específica reconocida

por diversas enzimas de restricción para poder insertar el ADNc del gen de interés, y un marcador de selección (antibiótico) (Salazar y col., 2013). El siguiente esquema representa los pasos de la clonación de un fragmento de ADN (Figura 5.11):

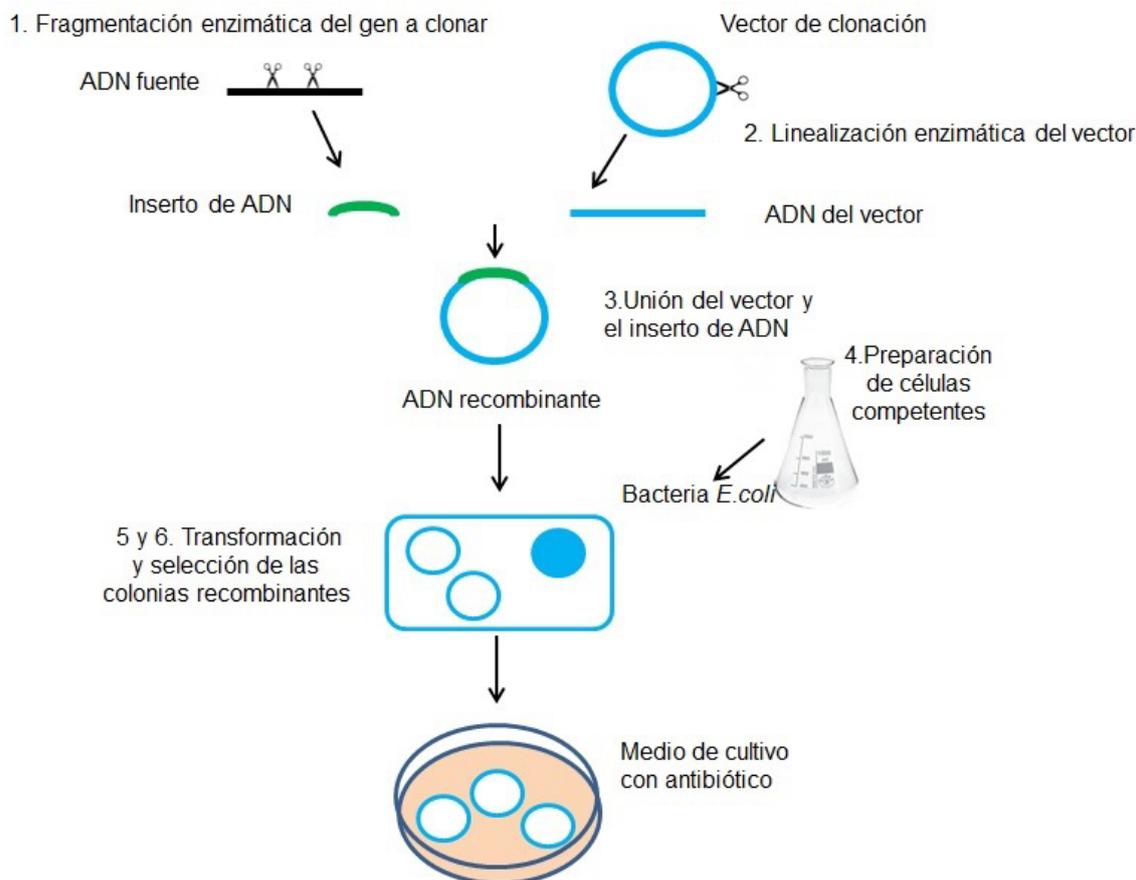


Figura 5.11. Marcha de pasos de Clonación Molecular.

- 1) Preparación del inserto de ADN que se va a clonar.
- 2) Preparación del vector para clonación.
- 3) Unión del inserto con el vector.
- 4) Preparación de células competentes.
- 5) y 6) Transformación en bacterias e identificación de las colonias que contienen el vector recombinante.

El paso 1 requiere de enzimas de restricción, son enzimas que funcionan como tijeras moleculares encargadas de reconocer secuencias específicas de ADN y cortarlo en ese punto. Estas mismas enzimas cortan el plásmido o vector de clonación (paso 2). Luego, se realiza la unión del inserto de ADN y el ADN vector mediante la acción de la enzima ADN ligasa, obteniéndose moléculas de ADN recombinante (paso 3). Usualmente, la célula hospedadora del vector es la bacteria *Escherichia coli* (paso 4). El vector es introducido en la bacteria, por el mecanismo denominado transformación (paso 5). El objetivo de la transformación celular es que el material genético se incorpore de manera extracromosómica y se replique, transcriba y traduzca empleando la maquinaria enzimática de la célula hospedadora (Salazar y col., 2013). Luego, las bacterias crecen en un medio de cultivo en presencia de antibiótico, de manera de seleccionar las bacterias que contengan el plásmido recombinante (paso 6). Finalmente, las bacterias crecen en los medios de cultivo apropiados para favorecer su división celular. Al reproducirse, se replica también

el plásmido recombinante y lo pasan a su descendencia, y de esta forma hacen copias del ADN que contienen. Las bacterias actúan como reservorio y como fábricas donde la secuencia clonada se multiplica miles de veces (Figura 5.11).

En resumen, la clonación de un fragmento de ADN (clonación molecular) involucra los siguientes pasos:

- 1) “Cortar y pegar”:
 - Preparación del inserto de ADN que se va a clonar
 - Preparación del vector para la clonación
 - Unión del inserto y el vector
- 2) Transformación y selección:
 - Preparación de células competentes
 - Transformación celular
 - Identificación de colonias bacterianas que contienen el ADN recombinante

Ejemplo de aplicación

Clonado de un gen de tomate que determina la forma alargada del fruto (gen SUN)

Los científicos han clonado un gen, denominado SUN, que controla la forma alargada de los tomates, un descubrimiento que podría ayudar a entender las enormes diferencias morfológicas entre las frutas y verduras comestibles, así como a proporcionar una nueva perspectiva sobre los mecanismos del desarrollo de las plantas (Lazzaro y col., 2018).

Se obtendrán muestras de hojas jóvenes de plantas de tomate y se colocarán inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se pulverizarán en mortero de porcelana. Se realizará la extracción del ADNg según el protocolo descrito previamente. Se cuantificará y se determinarán las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 para determinar pureza y concentración. La integridad será determinada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se procederá a realizar la síntesis del ADNc, y a continuación, la reacción de PCR con cebadores específicos para el gen de tomate SUN, que es el que queremos clonar. El producto de amplificación será separado por electroforesis en un gel de agarosa, y a partir del gel se lo purificará para luego realizar la digestión con las enzimas de restricción elegidas en función del vector de clonado destino (Figura 5.12). En simultáneo, se purificará el vector de clonado y se lo incubará con las mismas enzimas de restricción que al producto de PCR. Luego, se combinarán los fragmentos con ADN ligasa, la cual los une para formar un plásmido recombinante que contenga el gen SUN.

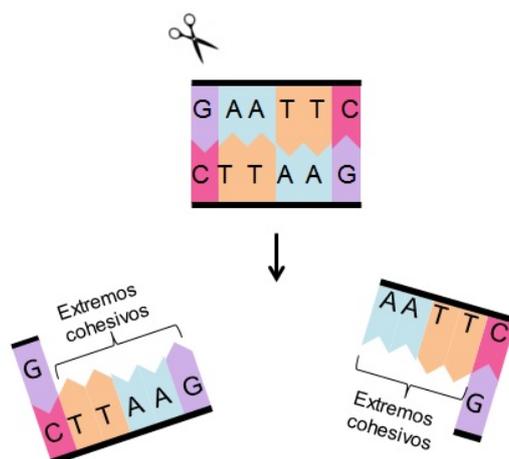


Figura 5.12. El esquema representa la actividad de una enzima de restricción. La tijera en el esquema representa la enzima de restricción que reconoce el sitio de corte dentro de la secuencia de ADN. Al reconocer la secuencia específica, corta y libera los dos fragmentos con extremos cohesivos quedando listos para ligarse a las bases complementarias, por ejemplo, de un vector de clonado que también ha sido cortado con esta misma enzima.

Mediante el proceso de transformación se introducirá el plásmido en la bacteria *E. coli*. Durante la transformación, a las células bacterianas se les aplica un breve choque térmico que ayudará a incorporar el plásmido recombinante que contiene el gen SUN. Para identificar las bacterias transformadas se utilizan marcadores de selección proporcionados por los vectores. Después de la transformación, las bacterias crecen en cajas Petri con agar suplementado con el antibiótico de selección, para el cual el plásmido es resistente. Si la transformación ha sido exitosa las bacterias serán capaces de metabolizar el antibiótico y vivirán, lo que indicará que incorporaron el vector, de lo contrario, las bacterias sin plásmido morirán. Para confirmar la presencia del inserto clonado en el vector que contienen estas bacterias, se realiza una PCR con los cebadores específicos del gen SUN usando de molde el ADN recombinante.

De esta manera, se ha logrado clonar el gen de interés en un vector de clonado, herramienta muy útil para realizar otros procedimientos, tales como la secuenciación del gen, el subclonado en un vector de expresión para generar la proteína recombinante de tomate o la incorporación de dicho gen en otra línea de tomate para evaluar cambios fenotípicos, por ejemplo, en la forma del fruto.

Transformación de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*

La ingeniería genética de plantas está dirigida a la producción de genotipos que expresen características de interés, mediante la integración de segmentos de ADN exógeno en el genoma vegetal. Este ADN altera las características de la planta, mediante la modificación dirigida y controlada de su genoma, al añadir, eliminar o modificar alguno o varios de sus genes (Danilova, 2007).

Diferentes sistemas de transformación de plantas han sido desarrollados con el objeto de hacer más fácil y eficiente esta metodología. El método más difundido para la transformación

genética de plantas es el mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria que vive en el suelo e infecta a un amplio rango de plantas (Karimi y col., 2007). Esta bacteria tiene como blanco de infección a las heridas en raíces o en el tallo de la planta inmediatamente sobre el nivel del suelo, donde ataca a las células vegetales, causando su proliferación y formación de tumores. Esta enfermedad se conoce como “*agalla de la corona*”.

El desarrollo de los tumores se debe a que *Agrobacterium* tiene la capacidad de transferir parte de su propio material genético a la planta hospedante. El mecanismo natural de ingeniería genética utilizado por *Agrobacterium* para transferir parte de su ADN a las células vegetales, es aprovechado por los investigadores para transferir genes de interés a las plantas.

Para ello, primero los científicos trabajan con el plásmido Ti insertando la secuencia nueva con el gen de interés y un gen de selección, como se muestra en los pasos 1-3 en la Figura 5.11 (clonación molecular). El paso 1 de la Figura 5.13 muestra el plásmido obtenido llevando el gen *Bt* (gen de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que confiere resistencia a plagas en plantas) que se transfiere a células de *Agrobacterium*. Luego, la bacteria portando el nuevo plásmido es utilizada para transformar células vegetales. La transformación de la planta se induce a partir del contacto entre la bacteria que porta el gen de interés (gen *Bt*) en su plásmido y las células vegetales (por ejemplo, hojas, como se esquematiza en el paso 2 de la Figura 5.13). Después de la transformación, el tejido vegetal es cultivado *in vitro* en un medio adecuado con un agente selector (antibiótico) donde sólo las células transgénicas sobreviven (paso 3, Figura 5.13).

Las células vegetales transformadas son totipotentes, es decir, que pueden multiplicarse y generar la planta completa. Para eso, las células deben crecer en el medio de cultivo adecuado y en presencia de determinadas hormonas vegetales. El resultado de este método de transformación es una planta completa que lleva el gen de interés en cada una de sus células (Figura 5.13).

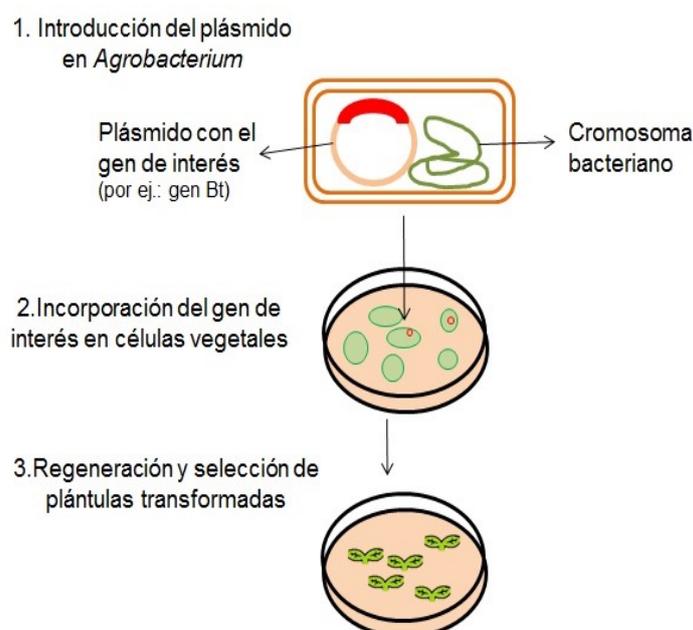


Figura 5.13. Marcha de pasos de transformación de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*.

Referencias

- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Danilova, S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5), 569-581.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T. y Henry, R. J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10(1), 1-8.
- Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R. y Wilson, P. (2007). Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology (Estados Unidos)*, 145, 1183- 1191.
- Lazzaro, M.D., Wu, S., Snouffer, A., Wang Y. y van der Knaap E. (2018). Plant organ shapes are regulated by protein interactions and associations with microtubules. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1766.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O. y Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237-246.
- Sah, S. K., Kaur, G. y Kaur, A. (2014). Rapid and reliable method of high-quality RNA extraction from diverse plants. *American Journal of Plant Sciences*, 5(21), 3129-3139.
- Sahu, S. K., Thangaraj, M. y Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Notices*, 1-6.
- Salazar, A., Sandoval, A. y Armendáriz, J. (2013). *Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGrawHill Interamericana.
- Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual, second edition*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Las autoras

Coordinadoras

Costa, Lorenza

Bioquímica y Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP). Título de la Carrera Docente Universitario, UNLP. Profesora Adjunta del curso Análisis Químico, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAYF-UNLP). Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con lugar de trabajo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE). Ha publicado numerosos artículos de investigación en revistas internacionales sobre temas de senescencia foliar, fisiología y tecnología postcosecha de hortalizas y frutos. Dirige proyectos de investigación acreditados y subsidiados por UNLP, CONICET y FONCYT en los que estudia las bases fisiológicas que permiten explicar el uso de la luz visible (LEDs) como tecnología postcosecha para retrasar la senescencia de crucíferas. Realiza actividades de Extensión en la FCAYF relacionadas con la articulación Escuela Media y Universidad.

Villabrille, Paula I.

Licenciada en Química y Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas (área Química) de la Universidad Nacional de La Plata (FCE, UNLP). Jefa de Trabajos Prácticos del Curso de Análisis Químico, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP (FCAYF, UNLP). Investigadora Adjunta del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con lugar de trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge J. Ronco" (CINDECA). Coautora de numerosos trabajos científicos en revistas internacionales en el área de catálisis ambiental. Codirige y forma parte del Grupo Responsable de Proyectos de Investigación acreditados y subsidiados por UNLP, CONICET y ANPCyT, estudiando estrategias de síntesis de materiales fotocatalíticos para el tratamiento de contaminantes orgánicos en agua. Participa de actividades de Extensión en la FCAYF relacionadas con la articulación Escuela Media y Universidad.

Ixtaina, Vanesa Y.

Ingeniera Agrónoma de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (FCAYF-UNLP) y Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de

La Plata (FCE-UNLP). Profesora Adjunta del curso de Análisis Químico (FCAYF-UNLP). Investigadora Independiente CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET-UNLP-CIC). Ha publicado numerosos trabajos científicos en revistas internacionales sobre caracterización de aceites de chía y sobre el desarrollo de innovaciones tecnológicas para generar alimentos funcionales a partir de componentes de chía. Tres de sus trabajos han sido premiados en eventos nacionales e internacionales. Dirige proyectos de investigación acreditados y subsidiados por UNLP y AN-PCyT en los que estudia alternativas de almacenamiento y conservación de germoplasma de chía y tecnologías de provisión de sus compuestos funcionales. Realiza actividades de Extensión en la FCAYF relacionadas con la articulación Escuela Media y Universidad.

Autoras

Bárcena, Alejandra

Licenciada en Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (FCAYF-UNLP) y Doctora de la facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP). Ayudante Diplomada en el curso de Análisis químico (FCAYF-UNLP). Investigadora asistente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con lugar de trabajo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE). Ha publicado artículos de investigación en revistas internacionales sobre fisiología y tecnología postcosecha de hortalizas y sobre micología. Integra proyectos de investigación acreditados y subsidiados por UNLP, CONICET y FONCYT en los que se utilizan tratamientos con pulsos de luz para retrasar la senescencia postcosecha de hortalizas verdes y analizar los cambios fisiológicos que producen estos tratamientos en los tejidos vegetales. Realiza actividades de Extensión en la FCAYF relacionadas con la articulación Escuela Media y Universidad.

Bayardo, Mariela P.

Licenciada en Ciencias Biológicas con orientación en Biología Molecular, Universidad Nacional de Buenos Aires (FCEyN, UBA). Título docente de Tramo de Formación Pedagógica para Profesionales y Técnicos Superiores (CECAUF). Profesora titular de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal de la carrera de Técnico Superior en Biotecnología en Instituto Superior de Formación Técnica (ISFDT 213) dependiente del Ministerio de Cultura y Educación de la Provincia de Buenos Aires. Profesional Principal de la Carrera de Personal de Apoyo (CPA) del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con lugar de trabajo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE). Ha publicado artículos de investigación en revistas internacionales en temas de Inmunología y de Fisiología Vegetal. Estadías en laboratorios del exterior realizando técnicas de Inmunología y Biología Molecular.

Buet, Agustina

Bioquímica y Doctora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ayudante Diplomada del curso Análisis Químico, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAYF, UNLP). Investigadora Asistente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con lugar de trabajo en el Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue. Ha publicado artículos de investigación en revistas internacionales sobre el rol del óxido nítrico en la nutrición mineral de plantas de cultivo extensivo y en la postcosecha de frutos. Dirige proyectos de investigación subsidiados por CONICET y FONCyT, en los que estudia el rol del óxido nítrico durante el desarrollo, la maduración y el almacenamiento postcosecha de frutos de la familia de las Rosáceas. Ha realizado actividades de Extensión en la FCAYF relacionadas con la articulación Escuela Media y Universidad.

Julio, Luciana

Licenciada en Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Jujuy (FI-UNJU) y Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP). Ayudante Diplomada de Analítica Básica (FCE-UNLP). Investigadora Asistente CONICET, con lugar de trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET-UNLP-CIC). Ha publicado numerosos trabajos científicos en revistas internacionales sobre sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos de la chía (*Salvia hispánica* L.). Dos de sus trabajos han sido premiados en eventos nacionales e internacionales. Dirige un proyecto de investigación acreditado y subsidiado por ANPCyT en el que estudia el desarrollo de un alimento lácteo funcional mediante la aplicación de sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos de la chía.

Rolny, Nadia S.

Ingeniera Agrónoma y Doctora de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (FCAYF-UNLP). Ayudante Diplomada del curso de Análisis Químico (FCAYF-UNLP). Técnica profesional de laboratorio (FCAYF-UNLP). Su tesis doctoral abordó temas de senescencia foliar y fisiología de cebada. Actualmente es integrante del equipo de trabajo de un proyecto de investigación acreditado y subsidiado por UNLP en el que se estudian los efectos de la luz visible de baja intensidad sobre la fisiología postcosecha de crucíferas. Ha dirigido y codirigido trabajos finales de carrera y pasantías en la FCAYF-UNLP. Realiza actividades de Extensión en la FCAYF relacionadas con la articulación Escuela Media y Universidad.

Métodos instrumentales básicos para muestras agroforestales : fundamentos y procedimientos para el análisis de muestras en el laboratorio / Alejandra Bárcena ... [et al.] ; Coordinación general de Lorenza Costa ; Paula I. Villabrille ; Vanesa Y. Ixtaina ; Prólogo de Elisa Miceli. - 1a ed - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2025.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-2524-4

1. Ingeniería Forestal. 2. Química Analítica. 3. Bioquímica. I. Bárcena, Alejandra II. Costa, Lorenza, coord. III. Villabrille, Paula I., coord. IV. Ixtaina, Vanesa Y., coord. V. Miceli, Elisa, prolog.
CDD 577.3

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2025
ISBN 978-950-34-2524-4
© 2025 - Edulp

n
naturales


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA