



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica
Pabellón II 4º piso, Ciudad Universitaria
(1428) Buenos Aires, Argentina

Q.B. 2007

32

AÑO: 2006

1. Departamento: **QUÍMICA BIOLÓGICA**
 2. Carrera de a) Licenciatura en **CIENCIAS BIOLÓGICAS**
b) Doctorado y/o Posgrado
 3. Cuatrimestre: **PRIMERO**
 4. N° de código de carrera: 05
 5. Materia: **INSTRUMENTACIÓN BIOLÓGICA**
Nº de código: 6010
 6. Puntaje propuesto para el doctorado: **5 PUNTOS**
 7. Plan de estudio del año: **1984**
 8. Carácter de la materia: **OPTATIVA**
 9. Duración: (en semanas) **15**
 10. Horas de clase semanales: **10**
 - a) Teóricas. **4. TOTALES: 60 h**
 - b) Problemas---
 - c) Laboratorio **6. TOTALES: 80 h**
 - d) Seminarios **10 h totales**
 - e) Teórico-problemas
 - f) Teórico-prácticas
 - g) Total
 11. Carga horaria total: (horas semanales por cantidad de semanas de dictado): **150 h**
 12. Asignaturas correlativas: **FÍSICA I Y II, QUÍMICA BIOLÓGICA**
 13. Forma de evaluación: Informes de trabajos Prácticos. Tres exámenes parciales. Examen final.
 14. Programa analítico: (Se adjunta) Aprobado Res. CD 1909/04
 15. Bibliografía: (Se adjunta) Aprobado Res. CD 1909/04

Fecha 21 de diciembre de 2005

Firma Profesor 

Aclaración — ALCIBIA NESSE

Dra. NELIDA A. CANDURRA
DIRECTORA ADJUNTA
Dpto. QUÍMICA BIOLÓGICA
ES.F. N. U.P.A.

Firma Director:

Aclaración Dpto. QUÍMICA BIOLÓGICA
E.C.E. y N. -UBA

Firma Subcomisión de Doctorado

Girola Inc. Inc.

Massachusetts

INSTRUMENTACIÓN BIOLÓGICA.

OBJETIVO: Aprendizaje de los fundamentos teóricos y aplicaciones de métodos instrumentales para la separación, purificación, detección, caracterización y cuantificación de moléculas de interés biológico.

PROGRAMA ANALITICO:

Módulo 1. TÉCNICAS DE CENTRIFUGACIÓN

Procesos de transporte en un campo centrífugo. Ecuación de Svedberg. Coeficiente de sedimentación. Equipos. Rotores. **Ultracentrifugación preparativa y analítica.** Métodos de centrifugación preparativa. Centrifugación diferencial, zonal, zonal en un gradiente de densidad, isopícnica. Centrifugación en gradiente. Recuperación de las muestras tras una separación en gradiente. Condiciones de centrifugación. **Aplicaciones a muestras biológicas.** Separación de células. Fraccionamiento subcelular. Determinación del coeficiente de sedimentación de proteínas. Centrifugación isopícnica de muestras de ADN. Centrifugación en rotores de flujo continuo.

MÓDULO 2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía en fase gaseosa. Principios. Componentes del equipo. Eficiencia. Velocidad óptima. Teoría y técnica de la columna cromatográfica. Detectores. Parámetros importantes de un cromatograma. Capacidad. Resolución. Análisis cuali y cuantitativo.

Sistemas cromatográficos de elevada resolución (HPLC, FPLC). Características y propiedades generales. Columnas: resolución, eficiencia, selectividad, factor de capacidad. Cromatografía sólido-líquido. Mecanismos. Interacciones adsorbente-soluto. Preparación de columnas. Selección de solventes. Precolumnas. Aspectos prácticos y ejemplos.

Cromatografía de Partición, Intercambio Iónico, Exclusión Molecular, Afinidad. Fundamentos y aplicaciones.

MODULO 3. TÉCNICAS ELECTROFORETICAS

Electroforesis. Factores que influyen en electroforesis: eléctricos, físicos, químicos. Movilidad electroforética. Equipamiento: fuentes de poder, unidades electroforéticas. Medios soporte. **Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).** Características de la polimerización. Catalizadores. Tamaño de poro. Movimiento de las moléculas en el gel. PAGE en condiciones nativas y desnaturizantes. Utilización de dodecil sulfato de sodio (SDS) y agentes reductores. Procedimientos analítico y preparativo. Sistemas homogéneos. Sistemas de *buffers* discontinuos: límite móvil, isotacoforesis y ley de Kohlrausch. Determinación de pesos moleculares: diagrama de Ferguson, SDS-PAGE y gradientes de poro. Técnicas de detección de macromoléculas. Transferencia eléctrica a membranas de nitrocelulosa.

Electroforesis y detección inmunológica. Fundamento de las técnicas. Inmunofijación, inmunoelectroforesis, contrainmunoelectroforesis, electroinmunodifusión monodimensional ("rocket") y bidimensional.

Electroforesis en geles de agarosa. Factores que afectan la separación. Condiciones técnicas. Selección de reactivos. Detección en geles con bromuro de etidio. Transiluminador. Aplicación a productos de PCR y apoptosis ("ladder").

Isoelectroenfoque. Teoría general. Principios fisicoquímicos. Medios soporte: gel de acrilamida y de agarosa. Anfolitos. Formación y determinación de gradientes de pH. Gradientes naturales e inmovilizados. Determinación de puntos isoeléctricos de proteínas. Ecuación diferencial del poder resolutivo. Curvas de titulación. Equipos. Fuentes de poder de alto voltaje. Sistemas de refrigeración.

Electroforesis bidimensional: combinación de isoelectroenfoque y SDS-PAGE. Detección. Perfiles proteicos. Bases de datos. Análisis computacional.

Electroforesis capilar: Fundamento, principios. Equipamiento. Capilares. Métodos de detección. Factores que afectan el poder resolutivo. Campo eléctrico, fuerza electroendosmótica, dispersión, movilidad, tiempo de migración. Modos de operación: de zona (CZE), cromatografía miscelar electrocinética (MEKC), isoelectroenfoque (CIEF), isotacoforesis (CITP). Equipos. Factores que modifican el fraccionamiento. Aplicaciones.

MÓDULO 4. ESPECTROFOTOMETRIA

Energía radiante, su interacción con la materia y delimitación de zonas de trabajo. Partes constituyentes de un espectrofotómetro. Fuentes: UV, Vis, IR; clases y características de las mismas. Monocromadores: distintos tipos. Ventajas y limitaciones de cada uno. Celdas, clases y ámbitos de trabajo. Detectores de vacío y de estado sólido, tipos y características. Propiedades de los elementos constituyentes y sus materiales. Equipos de simple haz y de doble haz: sistemas de registro de espectros. Comparación entre sistemas. Parámetros óptimos en espectrofotometría. Ancho de banda. Ancho de ranura. Relaciones entre los mismos: resolución, luz espuria. Estudio detallado de algunos aparatos típicos y su mecanismo de funcionamiento. Detalles operativos. Verificación de los equipos: reproducibilidad, exactitud fotométrica, exactitud de la longitud de onda, resolución, cifra de luz espuria, etc. Sistemas y normas de control de parámetros instrumentales.

Espectrofotometría de derivadas. Conceptos básicos y fundamentos del métodos. Métodos de obtención de espectros de derivadas: ópticos, por derivación electrónica analógica y por procesamiento digital de la información.

Otras técnicas espectrofotométricas modernas: sistemas a detectores integrados extensos de fotodiodos ("Linear array"). Principios operativos de la espectrofotometría a doble longitud de onda ("dual wavelength").

MÓDULO 5. FLUORIMETRIA

Fluorescencia, fosforescencia. Sus aplicaciones en Química Biológica. Teoría, mecanismos de excitación y emisión. Extinción ("quenching") intermolecular e

intramolecular. Transferencia de energía. Rendimiento cuántico. Fuentes de excitación, sus características y condiciones de trabajo. Cubetas. Filtros ópticos y monocromadores empleados en espectrofluorómetros. Diferencias entre espectros de absorción y excitación. Ejemplos de utilización de la técnica para estudios cualitativos estructurales. Tiempo de vida media. Calibración de instrumentos, en linealidad fotométrica y en longitud de onda. Selección de condiciones óptimas operacionales. Normas de control y verificación de equipos.

MÓDULO 6. MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

Fundamentos y alcances de las mediciones de pH, CO₂ y análogas. Electrodo de referencia e indicadores. Requerimientos impuestos por los electrodos al sistema de medición. Principios electrónicos de funcionamiento y características de los potenciómetros actuales. Acción de los controles sobre las isotermas del instrumento. Punto isopotencial. Verificación del sistema de medición.

Error ácido y alcalino. Error de suspensión. Influencia de la temperatura. Histeresis. Precauciones especiales en sistemas biológicos. Potencial de unión líquida en los diversos tipos de electrodos.

Potencial de asimetría. Resistencia, envejecimiento, blindaje, efecto de la agitación, renovación y demás datos de interés práctico para electrodos combinados, monobastón y otros (ISFET). Biosensores. Instrumentos. Aplicaciones.

MÓDULO 7. RADIOQUÍMICA

Transformaciones radiactivas: desexcitación nuclear, desintegración nuclear. Leyes de las transformaciones radiactivas. Interacción de las radiaciones α y β con la materia: ionización específica. Interacción de la radiación γ con la materia: efecto fotoeléctrico, efecto Compton, formación de pares.

Detección de partículas y fotones. Contadores de ionización: cámara de ionización, contador proporcional, contador Geiger-Müller, detectores sólidos, semiconductores. Contadores de excitación: centelleo en fase sólida, centelleo en medio líquido.

Medición de la radiación. Registro de los pulsos: escalímetros, integradores, espectrómetros. Dosímetros termoluminiscentes, películas fotográficas, dosímetros químicos. Selección del equipo de conteo. Sistemas de conteo.

Medidas de protección radiológica. Distancia, tiempo, blindaje, confinamiento. Monitoreo individual y ambiental.

Radioinmunoensayos. Aplicaciones.

SEMINARIOS

Presentación, por parte de los alumnos, y discusión general de trabajos en los que se presenten nuevas metodologías. Introducción de los conceptos de control de calidad de los resultados, estandarización y validación de métodos y empleo de herramientas estadísticas para el análisis.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA GENERAL:

- Borman Stuart A. *Instrumentation in Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 1986.
- Curtius H, Roth M (editores). *Clinical Biochemistry. Principles and Methods*, Walter de Gruyter Ed., Nueva York, USA, 1997.
- García-Segura JM et al. *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*, Editorial Síntesis, Madrid, España, 1999.
- Malmstadt N, Enke C, Crouch G. *Electronics and Instrumentation for Scientists*, Benjamin-Cummings, 1989.
- Skoog DA, West DM. *Análisis Instrumental*, McGraw-Hill, Madrid, España, 1993.
- Willard H, Merritt L, Dean J. *Metodos Instrumentales de Análisis*, Grupo Editorial Iberoamerica, 1991.
- Wilson K, Walker J (editores). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, Cambridge University Press, Edimburgo, UK, 2000.
- Work TS, Work E (editores). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, Holanda, 1996.

BIBLIOGRAFÍA ESPECIFICA PARA LOS DIFERENTES MODULOS:

- Andrews AT. *Electrophoresis. Theory, techniques and Biochemical and Clinical Applications*, Oxford University Press, Nueva York, USA, 1992.
- Bates RG. *Determination of pH, Theory and Practice*, Wiley.
- Burgess C, Knowles A. *Techniques in Vis and UV Spectrometry*, Vol.1-3, Chapman and Hall, 1995.
- Burgess C, Mielenz KD. *Advances in Standards and Methodology in Spectrophotometry*. Elsevier, Amsterdam, Holanda, 1987.
- Faires RA, Parks BH. *Radioisótopos. Técnicas de laboratorio*. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Argentina, 1973.
- Hames BD, Rickwood D (editores). *Gel electrophoresis of proteins. A practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 1990.
- Heiger DN. *High Perfomance Capillary Electrophoresis*, Editado por Hewlett-Packard Company, Alemania, 1993.
- Rickwood D (editor). *Centrifugation, Practical Approach to Biochemistry Series*, IRL Press, oxford, UK, 1984.
- Robards K, Hadad PR, Jackson PE. *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Academic Press, Londres, UK, 1994.
- Rodríguez -Pasqués R. *Radiactividad, rayos X y otras radiaciones ionizantes*. Editorial Plus Ultra, Buenos Aires, Argentina, 1978.
- Strobel H, Heineman W. *Chemical Instrumentation: A Systematic Approach*, Wiley Intercience, Nueva York, USA, 1989.
- Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development*, Wiley Intercience, Nueva York, USA, 1997.