

# OTROS MÉTODOS INSTRUMENTALES

## 1- Electroforesis

### 2- Turbidimetría y Nefelometría

### 3- Potenciometría (peachímetro)

---

## 1- Electroforesis

La electroforesis es un método de análisis en el cual se separan moléculas cargadas en un medio semisólido (gel) bajo la acción de un campo eléctrico. Al aplicar un campo eléctrico las moléculas con carga migrarán hacia el polo de carga opuesta y la velocidad de migración dependerá de la carga, la forma y el tamaño de la molécula y de la intensidad del campo eléctrico aplicado:

$$V_{\text{ión}} = \mu_{\text{ión}} \times E$$

**v:** velocidad de migración iónica

**μ:** movilidad iónica (depende de la carga, peso molecular y forma del ión)

**E:** campo eléctrico aplicado

El **campo eléctrico** aplicado tiene dos polos:

Polo positivo: atrae a los aniones (iones de carga negativa)  
por lo que se denomina **ANODO**.

Polo negativo: atrae a los cationes (iones de carga positiva)  
por lo que se denomina **CATODO**.

Se aplica al estudio de proteínas y ácidos nucleicos (ambos son analitos con cargas).

Las electroforesis para proteínas se realizan sobre geles de Poliacrilamida y las electroforesis para ácidos nucleicos sobre geles de agarosa. En ambos casos se arman geles utilizando moldes adecuados. Una vez armado el gel se colocan las muestras que contienen los analitos cargados que queremos separar cerca de un extremo y se aplica el campo eléctrico. Una vez finalizada la electroforesis, se debe realizar una etapa de revelado para evidenciar los analitos separados sobre el gel. Por ejemplo para revelar proteínas las dos tinciones más comunes que se utilizan son: Azul brillante de Coomasie y la tinción con  $\text{AgNO}_3$  (Figura 1).

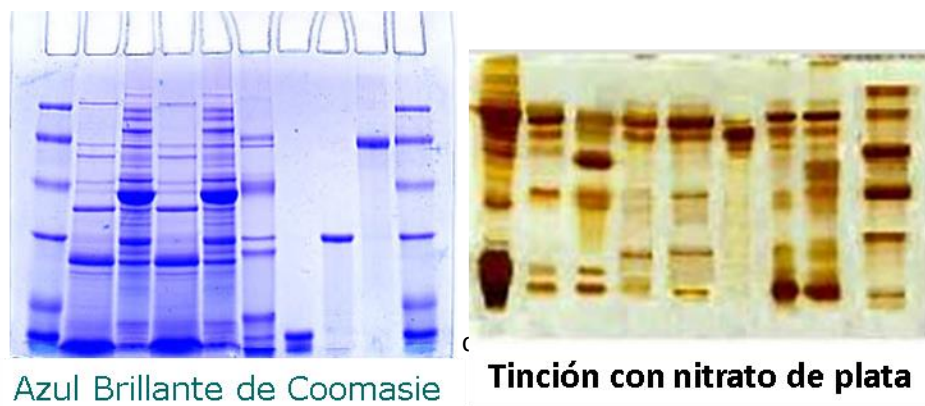


Figura 1- Geles de poliacrilamida donde se separaron proteínas. Fotos reales luego del revelado. Las bandas (líneas coloreadas) corresponden a proteínas.

La separación de los analitos en una electroforesis se realiza en función de la relación carga/masa: cuanto mayor sea la carga más rápido va a migrar el analito, y cuanto mayor sea la masa (el peso) más lento va a migrar. La velocidad final de migración depende de la relación entre ambas características.

#### **Caso particular de las electroforesis desnaturizantes para el análisis de proteínas:**

Cuando se realiza una electroforesis desnaturizante para proteínas, quiere decir que a las proteínas se les agrega previamente un detergente iónico (SDS dodecil-sulfato de sodio de carga egativa) cuyo efecto es romper la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas (desnaturaliza a las proteínas) y cada proteína queda tapizada por moléculas de SDS con su carga negativa. El efecto final del SDS es que las proteínas sólo difieren en su masa, pero no en su carga (todas tienen la carga del SDS). Por lo tanto en una electroforesis desnaturizante las proteínas se separan sólo por su masa y es el estudio indicado para determinar el peso molecular de estos analitos.

### Caso particular del ISOELECTROENFOQUE:

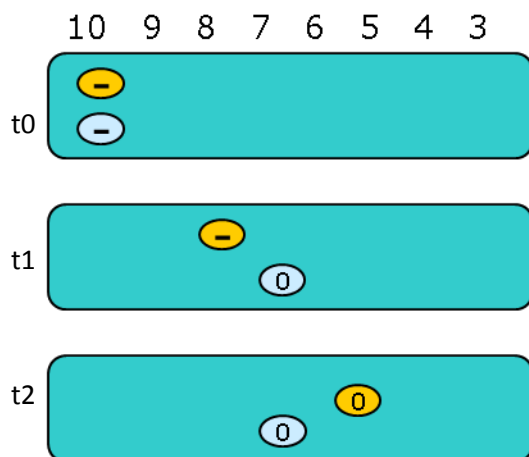
Un caso particular de separación de proteínas bajo la acción de un campo eléctrico es la técnica denominada **Isoelectroenfoque**.


Para comprender cómo funciona este método necesitamos repasar algunas características de las proteínas:

- 1- Son largas cadenas de aminoácidos unidos por uniones peptídicas.
- 2- Las proteínas tendrán grupos cargados dependiendo de los aminoácidos que las componen.
- 3- Las cargas de las proteínas dependen del pH en el que se encuentran.
- 4- Cada proteínas posee un “Punto isoeléctrico” característico que corresponde al pH al cual la proteína tiene carga neta cero.

En la técnica denominada Isoelectroenfoque las proteínas se separan según su punto isoeléctrico. Para ello se arma un gel especial, en el que se establece un gradiente de pH a lo largo del gel. Se siembra la mezcla de proteínas 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 del gel hasta que llegue a la zona de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. En ese punto la carga neta es cero y la proteína no migra más (Figura 2).

Gradiente de pH inmovilizado en un gel PAGE + anfolitos



Proteína con pI entre 6 y 7 


Proteína con pI entre 5 y 6 

Figura 2- Esquema que representa un gel con zonas definidas de pH (10, 9, ...,3) sobre el que se realizó un isoelectroenfoque. Se sembraron las proteínas en el extremo de pH 10 y se aplicó el campo eléctrico. Luego de un tiempo (t1) una de las proteínas alcanzó su punto isoeléctrico y ya no se moverá más mientras que la otra seguirá avanzando. En el tiempo t2 la otra proteína alcanzó su punto isoeléctrico.

## 2- Turbidimetría y nefelometría



Ambos métodos se utilizan para medir **turbidez**.

Definición de turbidez según el diccionario:

“La **turbidez** es un término que hace referencia a una medida que indica el grado de falta de transparencia de un líquido, debido a la presencia de sólidos que se encuentren en suspensión.”

Podemos interpretar entonces que cuanto **mayor sea la cantidad de sólidos en suspensión** presentes en el líquido **mayor será la turbidez**. Lo que se observa a simple vista es que cuanto mayor es la turbidez **mayor es la opalescencia del líquido**.

### ¿Cómo se origina la turbidez?

Cuando un haz de luz incide sobre una partícula ocurren 3 fenómenos:

- 1- Reflexión (regresa con un ángulo igual al de incidencia)
- 2- Absorción (la partícula absorbe parte de la Energía lumínica, proceso de excitación)
- 3- Dispersión (desviación de la dirección de la luz incidente)

La importancia relativa de cada proceso dependerá del tamaño de la partícula. Cuando hablamos de **soluciones** (homogéneas, partículas muy pequeñas) el proceso más importante es el la **Absorción** (2-), este fenómeno lo estudiamos como el fundamento de los métodos de **Espectrofotometría de absorción**”, las soluciones no presentan turbidez. Ahora, cuando el tamaño de la partícula sobre la que incide la luz es relativamente considerable (**dispersiones**) el fenómeno más importante es la **Dispersión** de la luz (3-) y se observa turbidez.

*Turbidimetría y Nefelometría son métodos instrumentales que se basan en medir la luz dispersada por las partículas presentes en la muestra turbia.*

## Diferencias entre ambos métodos:

En la **Turbidimetría** se mide la disminución de la intensidad de la luz luego de atravesar la muestra turbia, para ello es necesario que la luz incidente y el detector del equipo estén en la misma dirección (Figura 2). 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 para este método se denomina turbidímetro sin embargo se utiliza generalmente el Espectrofotómetro de absorción, ya que este equipo tiene el detector en la misma dirección que la luz incidente. Sus componentes básicos son: 1. Fuente de luz 2. Sistema óptico (colimador + selector de longitud de onda). 3. Cubeta de medición. 4. Detector en la misma dirección que la luz incidente (Figura 2).

En la **Nefelometría** se mide la luz dispersada (desviada) en una dirección determinada (en general se define a  $90^\circ$ ) por las partículas presentes en la suspensión. En este método se **mide directamente la luz dispersada**, es más sensible que la turbidimetría por lo que es el método recomendado para mezclas con muy baja turbidez. Para la nefelometría es necesario emplear un equipo con características específicas, que recibe el nombre de nefelómetro. Sus componentes básicos son: 1. Fuente de luz 2. Sistema óptico (colimador + selector de longitud de onda). 3. Cubeta de medición. 4. Detector a  $90^\circ$  (Figura 2).

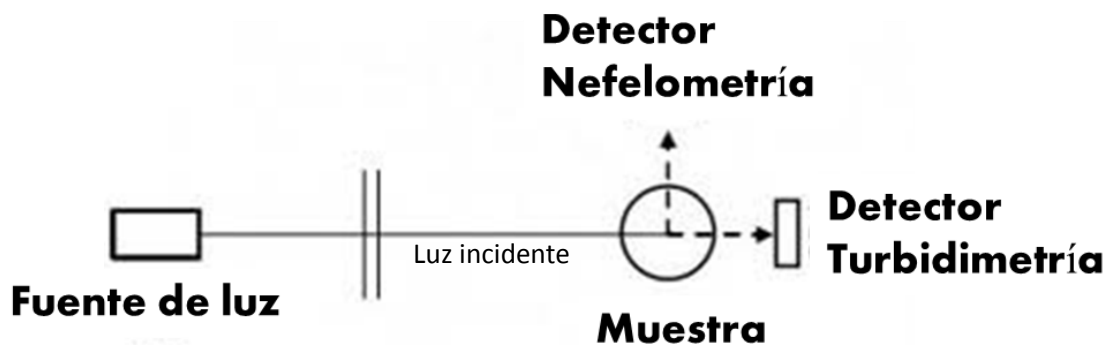


Figura 2 – Esquema del camino de la luz en los métodos turbidimétricos y nefelométricos. En la nefelometría el detector se ubica a  $90^\circ$  respecto a la luz incidente; en la turbidimetría el detector se ubica en la misma dirección de la luz incidente.

## Aplicaciones agronómicas y forestales de la turbidimetría

- 1- Medida de sulfatos en muestras de agua
- 2- Medida de turbidez como parámetro de calidad y medida de sulfatos en jugos comerciales de fruta (control de agregado de conservantes)
- 3- Medida de microorganismos (control de crecimiento de cultivos bacterianos, control de contaminaciones, etc).

---

### 3- Métodos potenciométricos

#### Peachímetro



Los métodos potenciométricos se basan en la medida de una diferencia de potencial entre dos electrodos. La diferencia de potencial medida debe estar relacionada con la concentración del analito que queremos medir. Para lograr esta medida es necesario armar una celda galvánica (celda electroquímica), es decir dos electrodos separados físicamente pero conectados con un puente salino que completa el circuito y entre ellos un galvanómetro que mide la diferencia de potencial entre los electrodos (Figura 3).

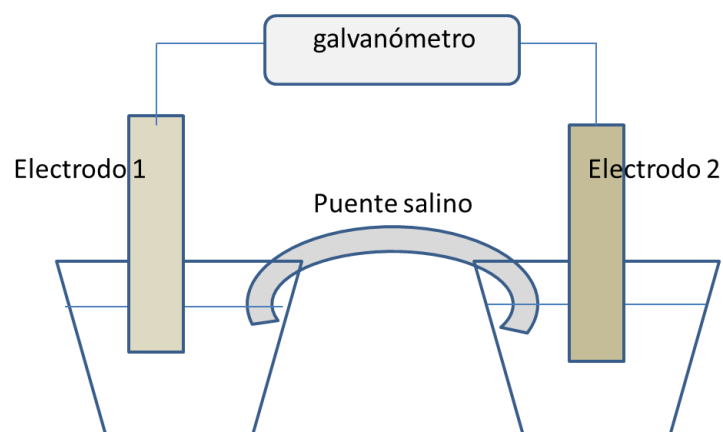
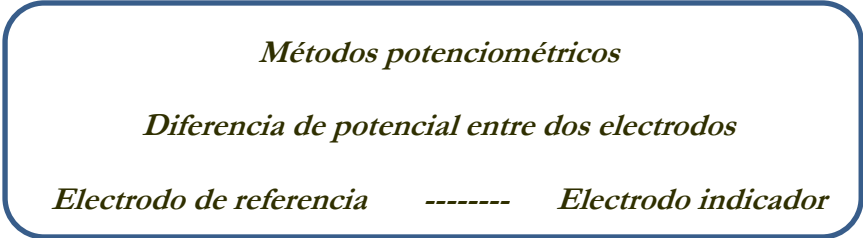


Figura 3- Esquema de una celda galvánica. Cada electrodo tendrá su valor de potencial ( $E_1$  y  $E_2$ ) y la diferencia de potencial de la celda galvánica será  $E = E_1 - E_2$

Para que la diferencia de potencial dependa sólo de la concentración del analito que queremos medir será necesario que uno de los electrodos de la celda galvánica tenga un potencial constante es decir que sea un **electrodo de referencia**. El otro electrodo de la celda debe generar un potencial que varíe con la concentración del analito que queremos medir, por esta razón se denomina **electrodo indicador**.



Por lo tanto para las mediciones potenciométricas es necesaria una celda electroquímica formada por un **electrodo de referencia** y un **electrodo indicador**. El potencial de la celda estará dado por la diferencia de potencial entre los electrodos:

$$E_{\text{celda}} = E_{\text{referencia}} - E_{\text{indicador}}$$

Dado que el potencial del electrodo de referencia permanece constante el potencial de celda medido dependerá del electrodo indicador y por lo tanto de la concentración del analito.

### **3.1- PEACHÍMETRO (ELECTRODO COMBINADO)**

Es el instrumento para medir pH de variadas muestras (agua, suelo, producciones agroindustriales como vino, cerveza, jugos, se usan durante el control de procesos, etc).

Si recordamos la definición de pH, comprendemos fácilmente que el analito en este método es la concentración de iones hidrógeno ( $H^+$ ):

$$pH = -\log [H^+]$$

#### **Fundamento del peachímetro:**

Se trata de un método potenciométrico, en el que se mide una diferencia de potencial entre dos electrodos que se relaciona directamente con la concentración de iones hidrógeno (protones) de la solución donde se sumerge el peachímetro.

Por lo tanto un **peachímetro** está formado por dos electrodos, uno de referencia y otro indicador. Como electrodo de **referencia** generalmente se usa un electrodo de plata con cloruro de plata ( $\text{Ag}^0/\text{AgCl}$ ) y como electrodo **indicador** se utiliza un electrodo de membrana denominado **electrodo de vidrio** (Figura 4). Los dos electrodos están combinados en una única unidad (Figura 5).

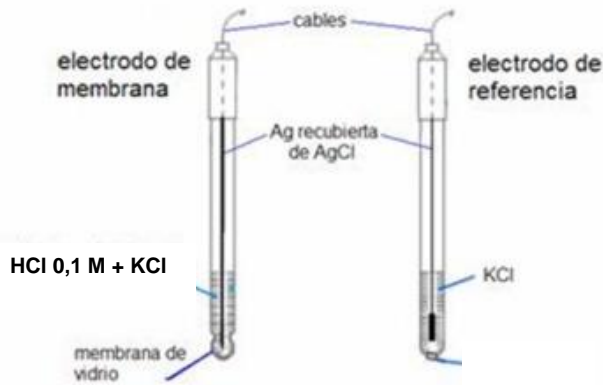


Figura 4- Electrodos que componen un peachímetro: electrodo de referencia y electrodo indicador (electrodo de membrana o electrodo de vidrio). Observar que el electrodo de membrana requiere además una referencia interna.

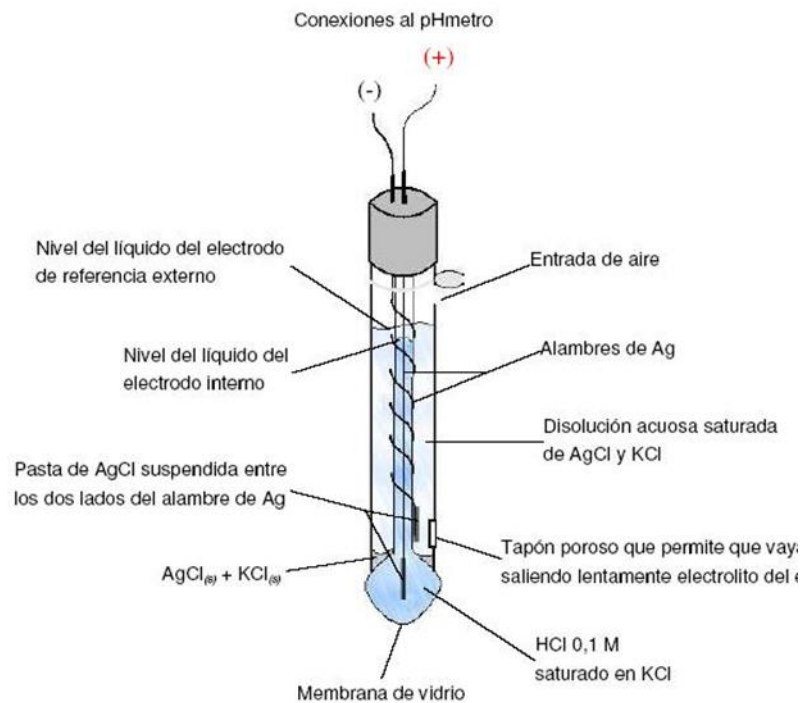


Figura 5- Electrodo combinado (peachímetro). En una única unidad se encuentran los dos electrodos (referencia + indicador). El electrodo indicador al ser un electrodo de membrana tiene además una referencia interna de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ .



### Descripción del electrodo indicador de membrana de vidrio:

La parte sensible del electrodo de vidrio es la fina membrana de vidrio que se encuentra en el extremo inferior del instrumento formando el bulbo de vidrio. Esta membrana de vidrio genera un potencial a través de la membrana cuando la concentración de protones es diferente en ambos lados de la membrana. El lado interno de la membrana está en contacto con una concentración fija de protones dada por el HCl 0,1M saturado en KCl (ver la figura 5). El lado externo de la membrana de vidrio es lo que queda sumergido en la solución cuyo pH queremos medir (Figura 6).



Figura 6- Peachímetro sumergido en una solución para medir el pH. El bulbo de vidrio queda sumergido en la solución. El lado interno de la membrana de vidrio tiene una solución de HCl 0,1 M y el lado externo de la membrana está en contacto con la concentración de protones es la de la solución del vaso.

**¿Qué mide el peachímetro? ¿Cómo se relaciona la lectura del peachímetro con la concentración del analito?**

La lectura que arroja el peachímetro está dada por la siguiente ecuación (Ecuación de Nerst):

$$E_{celda} = cte + \beta \cdot 0,059 \log \frac{[H^+]_{exterior}}{[H^+]_{interior}}$$

Cte: potencial de asimetría de la membrana (si ambas caras son perfectas vale cero).

$\beta$ : es un valor que depende de la calidad del vidrio del peachímetro.

En un peachímetro dado, el término cte, el valor de  $\beta$  y la concentración interior de protones serán valores determinados. Por lo tanto la medida del peachímetro depende sólo de la concentración de protones en el exterior de la membrana por lo tanto de la concentración de protones donde se sumerge el peachímetro.

### **¿Por qué debo calibrar un peachímetro antes de usarlo?**

Para validar la escala de pH de un instrumento dado es necesario calibrarlo antes de realizar las medidas. La calibración del peachímetro se realiza con soluciones buffer de pH conocidas y siguiendo las instrucciones del manual de cada peachímetro. La calibración permite “llevar a cero” los efectos del potencial de membrana, la calidad del vidrio y la concentración del lado interno de la membrana lo que resulta necesario para validar la lectura de pH que dará el equipo.