



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOFÍSICA

“ESTUDIO PRELIMINAR DE GRUPOS FUNCIONALES EN PLASMA SANGUÍNEO EN LOS ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE BIOFISICA DE LA ESPOCH, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT/IR”

Trabajo de titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para obtener el grado académico de

BIOFÍSICO

AUTOR: GONZALO SEBASTIÁN CUADRADO GUEVARA

DIRECTORA: Biof. MARÍA FERNANDA HEREDIA MOYANO

Riobamba-Ecuador

2020

© 2020, Gonzalo Sebastián Cuadrado Guevara

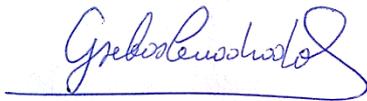
Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Gonzalo Sebastián Cuadrado Guevara declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados de este son auténticos.

Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 09 de marzo del 2020.



Gonzalo Sebastián Cuadrado Guevara

060422752-0

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOFÍSICA

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo experimental, **“ESTUDIO PRELIMINAR DE GRUPOS FUNCIONALES EN PLASMA SANGUÍNEO EN LOS ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE BIOFISICA DE LA ESPOCH, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT/IR”**, realizado por el señor **GONZALO SEBASTIAN CUADRADO GUEVARA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación .

	FIRMA	FECHA
Biof. Miguel Ángel Sáez Paguay PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	2020-03-09
Biof. María Fernanda Heredia Moyano DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 _____	2020-03-09
Dr. Quim. Robert Alcides Cazar Ramírez MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 _____	2020-03-09

DEDICATORIA

A Dios por permitirme cumplir con una meta mas en mi vida, a mi padre Edwin que desde el cielo me cuida y sé que está orgulloso por este nuevo logro, a mi madre Marcela por siempre confiar y creer en mí durante todo este tiempo, por todas sus enseñanzas, y su esfuerzo para hacer de mi un hombre mejor. A mis hermanas Mariela y Camila. A mi hijo Juan Sebastián y a mi novia Sole por todo su apoyo en esta etapa.

Gonzalo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mis padres Edwin y Marcela por todo el esfuerzo y apoyo que me han dado durante todo este tiempo, lo que han logrado con sus enseñanzas y sus valores, demostrar que todo el sacrificio que han hecho por mí hoy da sus frutos.

A mi hermana Camila por siempre ayudarme y estar pendiente de mis estudios por todo el esfuerzo que ha hecho durante toda mi carrera universitaria, y por darme la dicha de ser tío de mis queridos sobrinos, Mariano y José María.

A la Biof. Fernanda Heredia por impartir todos sus conocimientos, y por todo el tiempo brindado desde el primer día que fue mi tutora de tesis.

A mi novia Sole J. que fue quién fue mi apoyo desde el comienzo para lograr este objetivo y ha estado conmigo siempre que lo necesité.

A todos los docentes de la carrera de Biofísica quienes con sus conocimientos han logrado crear excelentes profesionales

Gonzalo

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO.....	5
1.1. Modos Vibracionales.....	5
1.1.1. Regla de Selección.....	6
1.1.2. Modo Vibracional de Tensión.....	7
1.1.3. Modo Vibracional de Flexión.....	7
1.2. Técnica Espectroscópica.....	7
1.2.1. Espectroscopia F/TIR.....	8
1.2.2. Generalidades de la FTIR.....	8
1.2.3. Ventajas de la FTIR.....	9
1.3. Ley de Beer-Lambert.....	10
1.4. Plasma Sanguíneo.....	10
1.4.1. Sustancias orgánicas:.....	11
1.4.2. Sustancias inorgánicas:.....	11
1.5. Grupos funcionales.....	12

CAPITULO II

2. MARCO METODOLOGICO.....	14
2.2. Diseño de la Investigación.....	14
2.3. Población del Estudio.....	14
2.4. Equipo y Materiales.....	14

2.4.1. Equipos	14
2.4.2. Materiales.....	14
2.5. Preparación de Muestras	15
2.6. Técnicas de recolección de Datos	16
2.7. Procedimiento lugar y condiciones de la recolección de datos:	16
2.7.1. Obtención de Datos mediante el uso de espectrofotómetro	17
2.8. Pre-procesamiento de datos.....	19
2.8.1. Promedio de datos.....	19
2.8.2. Desviación estándar.....	20
2.8.3. Derivada segunda	20

CAPITULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	21
---	----

CONCLUSIONES.....	28
-------------------	----

RECOMENDACIONES	29
-----------------------	----

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: La micro espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos.....	12
Tabla 1-2: Total de resultados hombre y mujeres	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura: 1-1: Vibraciones de estiramiento, simétrico y asimétrico	7
Figura: 2-1: Ilustración esquemática de un interferómetro de Michelson	8
Figura: 3-1: Plasma sanguíneo	12
Figura: 1-2: Centrifugadora	15
Figura: 2-2: Extracción de plasma sanguíneo con micropipeta	16
Figura: 3-2: Espectrofotómetro Infrarrojo FT/IR 4100	18

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico: 1-1: Energía potencial para un oscilador armónico. Las rayas horizontales indican las energías permitidas	5
Gráfico: 2-1: Un enlace químico No es verdaderamente un oscilador armónico pues la energía potencial aumenta más cuando disminuimos la distancia por debajo de la del equilibrio que cuando le aumentamos.....	6
Gráfico: 1-2: Espectro de plasma sanguíneo analizado en el rango entre 4180 y 580 cm^{-1}	19
Gráfico 1-3: Espectro típico del plasma sanguíneo.....	21
Gráfico 2-3: Todos los espectros de las muestras desde 400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}	22
Gráfico 3-3: Espectro promedio de las 54 muestras analizadas.....	23
Gráfico 4-3: Espectro con un corte de la región alta entre 3000 y 2000 cm^{-1}	24
Gráfico 5-3: Segunda derivada del espectro en la región Fingerprint.....	25
Gráfico 6-3: Segunda derivada del espectro en la región high región	26
Gráfico 7-3: a) Espectro en rojo muestra el plasma sanguíneo del estudio en Italia (Heredia, 2018), b) Espectro en negro muestra el plasma de este estudio.....	27

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: LISTADO DE ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE BIOFÍSICA DE LA ESPOCH, DE LOS CUALES SE OBTUVIERON LAS MUESTRAS DE SANGRE

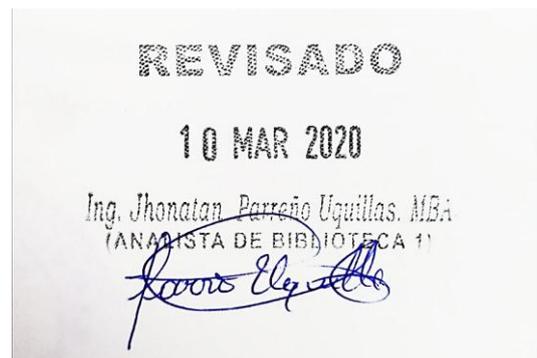
ANEXO B: DATOS TOTALES OBTENIDOS DEL PLASMA SANGUÍNEO EN ORIGINPRO 2018

ANEXO C: PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y DERIVADA SEGUNDA DE LOS DATOS TOTALES OBTENIDOS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN ORIGINPRO 2018

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue estudiar los grupos funcionales del plasma humano, mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT/IR) en estudiantes de la ESPOCH. y con un estudio estadístico de los datos obtenidos. Para lo cual se tomaron muestras de sangre a 54 estudiantes de la carrera de Biofísica y posteriormente se extrajo el plasma sanguíneo mediante centrifugación, se utilizó 20 μ l de plasma y se colocó una gota en el centro del cristal del espectrofotómetro, el cual hace una lectura de la absorción versus el número de onda; esta medición se realizó dos veces por cada muestra. Y finalmente del equipo se exportaron los datos en formato TXT los cuales fueron tratados con ORIGINPRO 2018 versión 1. Dentro de los resultados que se obtuvieron, se identificó que las muestras de los 54 individuos son homogéneas. Asimismo, se denotaron el pico 1 a 3339,62 cm^{-1} con un ancho entre 3498.24 y 3150.39 cm^{-1} que presenta el componente de agua y el pico 2 a 1635.09 cm^{-1} con un ancho entre 1668.36 y 1610.51 cm^{-1} que presenta el componente proteico. En conclusión, se encontraron diferencias entre los grupos funcionales de un plasma sanguíneo típico en el cual se identifica la parte proteica, la parte lipídica e hidrocarburo y por el contrario en el plasma sanguíneo del estudio, se encuentra solo la parte proteica y no permite evidenciar una diferencia entre la parte lipídica e hidrocarburo, siendo a su vez muy evidente la presencia de agua. Se recomienda ampliar el número de datos, y cambiar el diseño experimental, para tener una base de datos que se pueda considerar como un espectro de plasma sanguíneo típico de Riobamba.

Palabras clave: <PLASMA SANGUÍNEO>, <GRUPOS FUNCIONALES>, <ESPECTROFOTÓMETRO>, <ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT/IR)>, <PLASMA TÍPICO>.



ABSTRACT

The objective of the present investigation was to study the functional groups of the human plasma, by means of FT/IR spectroscopy in ESPOCH students and with a statistical study of the data obtained. For which blood samples were taken from 54 students of the Biophysics career and subsequently the blood plasma was extracted by centrifugation, 20 μl of plasma was used and a drop was placed in the center of the spectrophotometer crystal, which makes a reading of absorption versus wave number; This measurement was performed twice for each sample. Finally, the team exported the data in TXT format which were treated with ORIGINPRO 2018 version 1. Among the results that were obtained, it was identified that the samples of the 54 individuals are homogeneous. Likewise, peak 1 at 3339.62 cm^{-1} with a width between 3498.24 and 3150.39 cm^{-1} that presents the water component and peak 2 at 1635.09 cm^{-1} with a width between 1668.36 and 1610.51 cm^{-1} were denoted. It presents the protein component. In conclusion, differences were found between the functional groups of a typical blood plasma in which the protein part, the lipid part and the hydrocarbon part are identified and, conversely, in the blood plasma of the study, only the protein part is found and does not allow evidence a difference between the lipid and hydrocarbon part, while the presence of water is very evident. Therefore, since the functional groups have already been identified in this study. It is recommended to expand the number of data, and change the experimental design, to have a database that can be considered as a typical blood plasma spectrum of Riobamba.

Keywords: <BLOOD PLASMA>, <FUNCTIONAL GROUPS>, <FOURIER TRANSFORMED INFRARED SPECTROSCOPY (FT/IR)>, <TYPICAL PLASMA> , <SPECTROPHOTOMETER>.



INTRODUCCIÓN

Los grupos funcionales son conjuntos de átomos que muestran una “función” consistente (propiedades y reactividad) independientemente de la molécula exacta en la que se encuentran. Las moléculas biológicas están compuestas por un esqueleto de carbono y algunos otros átomos, incluyendo oxígeno, nitrógeno o azufre. Estas pueden contener muchos tipos y combinaciones diferentes de grupos funcionales, y el conjunto particular de grupos de una biomolécula afectará muchas de sus propiedades, incluida su estructura, solubilidad y reactividad (Barraza, et al., 2018).

La Espectroscopía Infrarroja de la Transformada de Fourier (FT/IR) es una técnica analítica que ayuda a estudiar los cambios conformacionales de sistemas dinámicos y biológicos. Puede proveer un análisis objetivo de un dominio clínico de biofluidos como son los componentes sanguíneos y en este caso en particular del plasma sanguíneo. Asimismo, la espectroscopía vibracional es una técnica no invasiva para el estudio de patologías en el componente sanguíneo que permite diagnosticar o monitorear biomarcadores en enfermedades o el estado (Heredia, 2018).

El plasma sanguíneo es un biofluido muy utilizado para el diagnóstico de enfermedades y al ser un compuesto orgánico, la determinación de los grupos funcionales permite identificar características diferentes en individuos sanos y enfermos (Montalvo 2010, p.46).

El material que se presenta en este trabajo de tesis ha sido organizado en tres capítulos. El Capítulo I trata sobre las bases teóricas y conceptuales que debemos tomar en cuenta para la realización correcta de este trabajo de titulación tales como: modos vibracionales y sus tipos, técnica espectroscópica, Ley de Beer-Lambert, el plasma sanguíneo y los grupos funcionales.

El Capítulo II se describe la zona de estudio, la metodología utilizada, la cual es la aplicación de espectroscopia FT/IR para la identificación de grupos funcionales en el plasma sanguíneo. Además, se detalla el método experimental aplicado.

El Capítulo III trata sobre el análisis e interpretación de los resultados obtenidos referentes a los grupos funcionales del plasma sanguíneo de los estudiantes de la carrera de Biofísica de la ESPOCH, a través de los cuales se llegaron a conclusiones y recomendaciones.

MARCO REFERENCIAL

Antecedentes

Max Diem (2018), realizó un estudio sobre la espectroscopia FT/IR que mostró que al ser un método rápido y versátil facilita la investigación de marcadores de enfermedad puesto que detecta variaciones en las características de biofluidos. Sin embargo, el análisis de muestras por métodos espectrales debe considerar la influencia de factores externos como la variación inherente en la concentración de pequeñas moléculas en el plasma sanguíneo que varía entre individuos.

En el 2018, Heredia realizó un estudio en donde se identificaron los grupos funcionales a través del espectro de plasma sanguíneo en una población de Italia, donde se evidencia que existe solo un pico proteico de alta intensidad, asimismo se puede observar la presencia de agua y no se pueden identificar con claridad la parte lipídica e hidrocarburo.

Hasta el momento no existen investigaciones de FTIR en la sangre de ninguna índole específicamente en la ciudad de Riobamba, por lo que el presente trabajo será el primero en esta área.

Planteamiento del problema

En el Ecuador no existen estudios del plasma sanguíneo utilizando espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier y es importante determinar los grupos funcionales del plasma sanguíneo para contar con una base de datos preliminar que nos permita realizar comparaciones en casos de enfermedad. Cabe resaltar que estos datos son de importancia para posteriores estudios que facilitarán el diagnóstico de enfermedades degenerativas.

Justificación

Los grupos funcionales al ser agrupaciones de átomos enlazados de una determinada forma presentan una estructura y propiedades fisicoquímicas, que caracterizan a los compuestos orgánicos que los contienen. Éstos pueden ser estudiados aplicando espectroscopia FT/IR, la cual opera en un rango de números de onda de 4000 a 600 cm^{-1} característica de acuerdo con el grupo funciona. Este método se basa en la vibración de los enlaces de una molécula, de tal manera que facilita el análisis de la conformación y orientación de lípidos y proteínas asociados a membranas.

La espectroscopia FT/IR se ha convertido en una herramienta potente que asiste a los actuales métodos de control o detección de enfermedades.

Además, la espectroscopia FT/IR tiene la ventaja de ser eficaz, versátil y relativamente económica en comparación con otros métodos, facilitando la detección de cambios conformacionales para obtener diferencias espectrales antes y después de perturbaciones en soluciones fisiológicas (Tamm y Tatulian 1997, pp.367-375).

A través de mediciones utilizando espectroscopia FT/IR en muestras de membrana, se ha obtenido información relevante referente a la orientación de grupos químicos y subestructuras dentro de las membranas moleculares, que por otros métodos es muy difícil obtener. (Tamm y Tatulian 1997, pp.367-375).

El plasma sanguíneo es un compuesto orgánico, por lo que los grupos funcionales presentes influirán en sus características tales como su estructura, solubilidad y reactividad. En base a lo cual, la identificación de grupos funcionales permite la comparación entre plasma sanguíneo de diferentes individuos y determinar si hay normalidad o presenta alteraciones. Debido a su importancia, se han realizado varios estudios en otros países para levantar una base de datos de los grupos funcionales en individuos sanos, sin embargo, en el Ecuador no se cuenta con estos estudios y a su vez no existe una base de datos de grupos funcionales obtenidos de personas sanas, considerando que la genética es una variante importante.

Con este estudio se desea obtener una base de datos de individuos sanos para posteriormente se puedan realizar estudios para comparar con individuos enfermos. Siendo un estudio preliminar abre muchos campos de investigación en la salud. Al momento, el diagnóstico y la identificación de la etiología de enfermedades degenerativas ha sido poco explotado, por lo que este estudio puede servir como una herramienta para mejorar la identificación de dichas enfermedades.

Asimismo, como profesional de la rama de Biofísica se está aplicando un método físico para una investigación médica.

Objetivos

General:

Estudiar los grupos funcionales del plasma humano, mediante espectroscopia FT/IR en estudiantes de la carrera de Biofísica de la ESPOCH.

Específicos:

- Analizar el plasma sanguíneo de estudiantes de la carrera de Biofísica de la ESPOCH en condiciones normales de salud mediante espectroscopia FT/IR con un estudio estadístico de los datos obtenidos.
- Identificar las bandas del número de onda en donde se encuentran los grupos funcionales.
- Examinar si existen diferencias en los grupos funcionales de un plasma sanguíneo típico y el plasma sanguíneo del estudio.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Modos Vibracionales

Los espectros infrarrojos resultan de transiciones entre los estados de energía vibracional cuantificados. Las vibraciones moleculares pueden ser desde un movimiento simple articulado de los dos átomos de una molécula diatómica hasta el movimiento mucho más complejo de cada átomo en una molécula polifuncional grande (Griffiths y Haseth 1983, pp.;3-6).

Las moléculas con N átomos tienen $3N$ grados de libertad, tres de los cuales representan movimientos de traslación en direcciones perpendiculares y movimientos de rotación alrededor de los ejes x , y & z . Los $3N-6$ grados de libertad restantes, proveen el número de formas en que los átomos en una molécula no lineal pueden. La energía potencial, $V(r)$ de un oscilador armónico se muestra a través de una línea discontinua como se muestra en la Fig. 1 en función de la distancia entre los átomos, r . Independientemente del modo en el que los átomos vibren con un movimiento armónico simple (Ley de Hooke), los estados de energía vibracional, V_{iv} , pueden describirse:

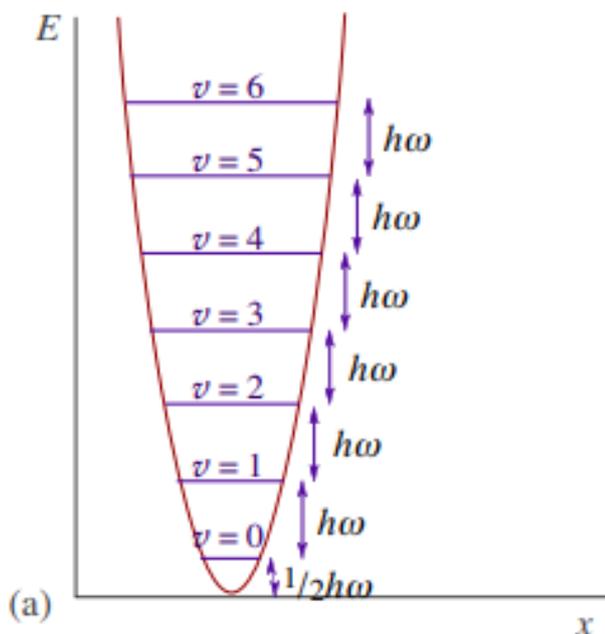


Gráfico 1-1 Energía potencial para un oscilador armónico.

Fuente: Espectroscopia vibracional, licenciatura en química. Universidad de Alcalá. P.14

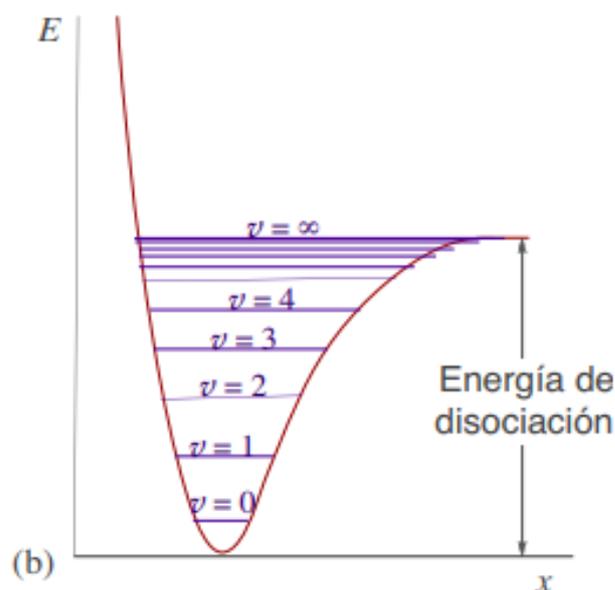


Gráfico: 2-1 Oscilador inarmónico

Fuente: Espectroscopia vibracional, licenciatura en química. Universidad de Alcalá. P.14

Por la ecuación:

$$V_{iv} = h\nu_i \left(v_i + \frac{1}{2} \right) \quad (1)$$

donde h es la constante de Planck, ν_i la frecuencia fundamental del modo particular, y v_i el número cuántico vibracional del modo i th ($v_i = 0, 1, 2, \dots$). Considerando, que la frecuencia en unidades de hertz tiene el símbolo ν . Las frecuencias vibracionales se expresan en unidades de número de onda, el número de ondas por unidad de longitud. La unidad de longitud comúnmente utilizada es el centímetro, donde el número de onda tiene unidades de cm^{-1} y muchos químicos le asignan como símbolo. La diferencia de energía para las transiciones entre el estado fundamental ($v_i = 0$) y el primer estado excitado ($v_i = 1$) de la mayor parte de los modos vibracionales corresponde a la energía de la radiación en el espectro del infrarrojo medio (400 a 4000 cm^{-1}) (Griffiths y Haseth, 1983, pp.:3-6).

Para el movimiento armónico se aplica la ecuación descrita a continuación:

$$V_{iv} = h\nu_i \left(v_i + \frac{1}{2} \right) + h\nu_i x_i \left(v_i + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2)$$

1.1.1. Regla de Selección

La regla de selección se basa en especificar las posibles transiciones entre niveles cuánticos, dependiendo de la absorción o emisión de radiación electromagnética. La regla principal de selección se define sobre los requerimientos característicos para que los átomos o moléculas muestren un tipo de espectro como una espectroscopia de microondas o espectroscopia IR.

Cuando el átomo o las moléculas siguen las reglas de selección general, para determinar si puede ocurrir o no una cierta transición en el número cuántico, debe aplicarse al átomo o a las moléculas la regla de selección específica.

1.1.2. *Modo Vibracional de Tensión*

Las tensiones generan un estrechamiento o un estiramiento del enlace (Barraza, et al., 2013)

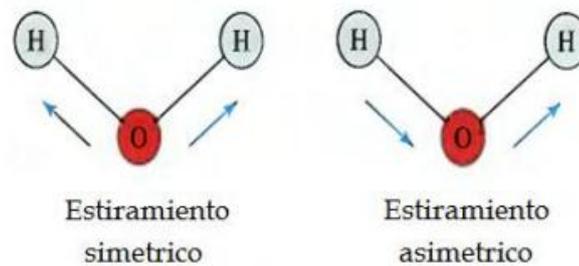


Figura 1-1 Vibraciones de estiramiento, simétrico y asimétrico

Fuente: Prentice, 2002

1.1.3. *Modo Vibracional de Flexión*

Estas vibraciones de flexión también se denominan de deformación y ocurren cuando:

- Hay un cambio en el ángulo del enlace entre los enlaces con un átomo en común.
- Hay un movimiento de un grupo de átomos con respecto al resto de la molécula.

1.2. **Técnica Espectroscópica**

La espectroscopia en la región del infrarrojo medio (IRM) es una de las técnicas analíticas disponibles que facilitan la obtención de información sobre aspectos cualitativos y cuantitativos. La espectroscopia de transformada de Fourier (FTIR) fue desarrollada para sobrepasar las limitaciones encontradas en el uso de los instrumentos dispersivos (Navarta, M., et al., 2008, pp.:93-96).

1.2.1. Espectroscopia F/TIR

La espectroscopia infrarroja (IR) es el estudio de las características de absorción que surgen a partir del movimiento molecular de los materiales. debido al desplazamiento atómico posterior a la interacción íntima con una fuente de materiales.

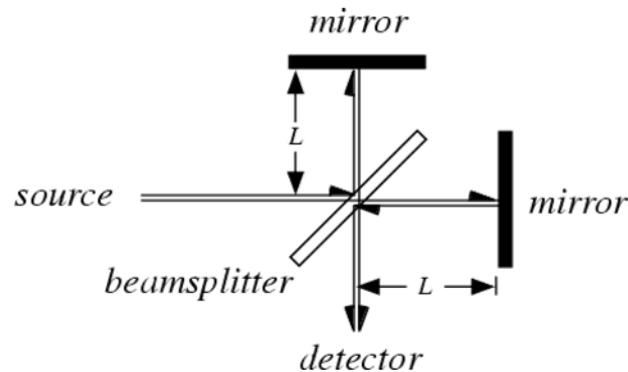


Figura 2-1. Ilustración esquemática de un interferómetro de Michelson.

Fuente: Motta, 2007

1.2.2. Generalidades de la FTIR

Una de estas técnicas es la microespectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, la cual nació de la integración de la microscopia óptica y la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. Esta técnica permite analizar de manera total el estado bioquímico de la célula, monitoreando los niveles de las principales biomoléculas presentes en su interior.

El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarroja (que están comprendidos en un número de onda entre 4000 a 600 cm^{-1}), lo cual genera movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula. Los movimientos vibracionales se diferencian por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, pudiendo ser vibraciones de flexión o tensión. Además, en el caso de que el número de átomos que forman un enlace es de tres o más, los movimientos también pueden ser simétricos y asimétricos. Los movimientos simétricos están caracterizados porque los enlaces se desplazan en direcciones contrarias y por otro lado los movimientos asimétricos se caracterizan por un movimiento en el mismo sentido o dirección.

El análisis de una muestra por FTIR provee un espectro de absorción de infrarrojo, el cual tiene información de la estructura y concentración molecular.

Todas las moléculas tienen una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde a un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, a lo que se le conoce como “fingerprint” del compuesto. La mayoría de los componentes de un enlace químico tienen movimientos vibracionales con frecuencias dentro del infrarrojo medio, por otro lado, tienen un espectro de infrarrojo específico las moléculas como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, y otras presentes en una muestra biológica. La radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética utilizada es la misma que la del enlace propio, permitiendo la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos.

El número de onda absorbida por un enlace vibracional depende del tipo de enlace formado, los átomos que lo forman, y el tipo de vibración inter e intramolecular. En muestras biológicas que son complejas, el conocimiento de los distintos constituyentes permite identificar el origen de un enlace en particular en el espectro infrarrojo. Por ejemplo, los enlaces C=O absorben el infrarrojo en un número de onda cercano a los 1650 cm^{-1} , las moléculas que contienen un número significativo de enlaces C=O como los que se encuentran en los grupos amida de una proteína presentan un pico de absorción en dicho número de onda.

Los espectros de absorción obtenidos de una muestra biológica normalmente son tomados en los números de onda comprendidos entre los 4000 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , en donde constan dos regiones de interés, la primera está comprendida entre los 3400 cm^{-1} y 2800 cm^{-1} y la segunda entre los 1800 cm^{-1} y 900 cm^{-1} . En estos dos intervalos se encuentran la mayoría de los enlaces de interés biológico, como por ejemplo, las principales bandas de absorción de los lípidos constan en la región de 3000 a 2800 cm^{-1} , las vibraciones de los enlaces C-H de los metilos se encuentran en las bandas 2956 y 2874 cm^{-1} , mientras en el caso de las vibraciones de los CH₂ están en las bandas 2922 y 2852 cm^{-1} .

Los resultados obtenidos del análisis de la muestra se observan en forma de espectros de infrarrojo y su interpretación depende en gran parte del conocimiento de las propiedades espectroscópicas de la muestra. El uso de espectros de IR para muestras puras es prácticamente simple y directo, en cambio en la FTIRM, el análisis de células o tejidos biológicos tiene mayor complejidad, puesto que la técnica no solo puede detectar una molécula, sino que además permite observar la composición química de toda la célula (Barraza, et al., 2013, pp 126-127).

1.2.3. Ventajas de la FTIR

Dentro de las ventajas de la espectroscopia FTIR tenemos (Jackson y Mantsch 1995,p.95):

1. Versatilidad
2. Operabilidad a distancia

3. Aplicaciones in situ
4. Medida prácticamente en tiempo real

1.3. Ley de Beer-Lambert

La espectroscopia infrarroja se basa en la absorción de radiación electromagnética por la materia debido a los diferentes modos de vibración de los enlaces químicos. La luz infrarroja pasa a través de la muestra y la absorbancia, definida como:

$$A = -\log(I/I_0) \quad (3)$$

Se puede calcular a partir de las intensidades de luz transmitida e incidente, I y I_0 respectivamente. La relación $T = I/I_0$ se llama la transmitancia. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración, c , de las moléculas absorbentes y la longitud de la trayectoria, l , de la célula de medición (ley de Beer-Lambert) (Tamm & Tatulian., 1997,p.367).

$$A = \epsilon cl \quad (4)$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar. Existen dos factores importantes que deben ser tomados en cuenta en la transmisión por infrarrojos de soluciones acuosas de proteínas. En primer lugar, los coeficientes de extinción por vibración son generalmente bajos y en segundo lugar, las bandas de absorción de agua líquida se superponen con varias bandas que son de interés en la proteína y la espectroscopia de membrana (Tamm y Tatulian 1997,p.368).

En la espectroscopia FTIR, con el objetivo de minimizar estos problemas, se utilizan concentraciones de proteína relativamente altas y longitudes de trayectoria cortas. El alto rendimiento de los espectrómetros FTIR facilita la sustracción de fondo precisa y el registro confiable de espectros de proteínas en soluciones acuosas. lo cual no era posible con los instrumentos dispersivos más antiguos (Tamm y Tatulian 1997,p.368).

Existen dos ventajas principales de la espectroscopia, la primera es que la absorción debida al agua y otras moléculas en la solución a granel se reduce considerablemente y la segunda es que se pueden determinar las orientaciones moleculares en muestras orientadas con luz polarizada (Tamm & Tatulian., 1997,p.368).

1.4. Plasma Sanguíneo

El plasma sanguíneo es el fluido extracelular de la sangre, el cual corresponde al 55% del volumen total. Dentro de sus características más importantes es que es de un color ambarino claro, con pH ligeramente alcalino (7.3 a 7.4), además de estar constituido por sustancias orgánicas e inorgánicas (Montalvo., 2010, p.46).

1.4.1. Sustancias orgánicas:

- a) Proteínas plasmáticas:** Son de tres tipos: fibrinógeno, seroalbúminas y seroglobulinas. Intervienen en el mantenimiento de la presión osmótica y oncótica del plasma, proporcionan la viscosidad de la sangre y participan en la regulación del equilibrio ácido básico de la misma; en la defensa inmunológica del organismo (globulinas) y en la coagulación sanguínea (fibrinógeno).
- b) Sustancias nutritivas:** El plasma sanguíneo contiene los productos finales del metabolismo de los alimentos: aminoácidos, glucosa, ácidos grasos y glicerol (grasas neutras), vitaminas.
- c) Gases:** se encuentran disueltos en el plasma el oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno.
- d) Productos del metabolismo proteínico:** El ácido úrico, la urea, la creatinina, y otros componentes se transportan por el plasma sanguíneo para ser excretadas por los riñones y otros órganos de eliminación.
- e) Hormonas y anticuerpos:** Las hormonas son sustancias secretadas por las glándulas endocrinas y utilizan la sangre como un medio para ser transportadas y llegar rápidamente a los órganos “blanco”, donde ejercerán su acción (Montalvo., 2010, p.46).

1.4.2. Sustancias inorgánicas:

- a) Agua:** componente principal de la sangre (90%). El agua interviene en la termorregulación del cuerpo.
- b) Sales minerales;** o electrolitos como por ejemplo el cloruro de sodio y de potasio, bicarbonato, fosfatos y carbonatos de calcio y de magnesio, etc. que son sustancias que, al ser puesta en solución, se disocian en cationes y aniones, provienen de los alimentos ingeridos y del producto de las reacciones químicas que se efectúan en el organismo.

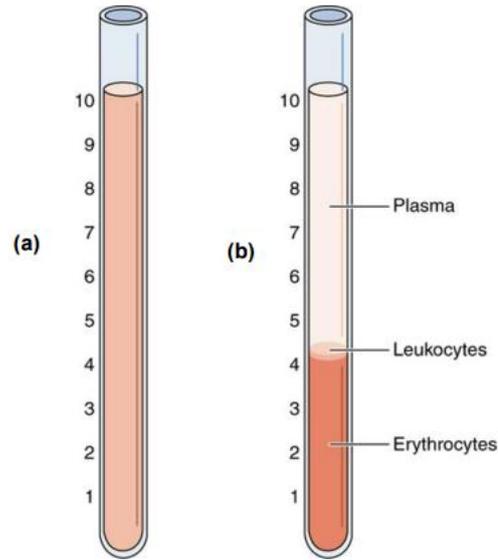


Figura: 3-1 Plasma Sanguíneo

Fuente: Montalvo, 2010

1.5. Grupos funcionales

Los grupos funcionales son un conjunto de átomos que están enlazados de una forma específica y presentan una estructura y propiedades fisicoquímicas que caracterizan a los compuestos orgánicos que los contienen.

Estos se los puede estudiar mediante un análisis de espectroscopia infrarrojo que tiene una longitud de 600 a 4000 cm^{-1} característica de acuerdo con el grupo funcional como podemos ver en la Tabla No 1 para ciertos tipos:

Tabla 1-1: La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos.

Moléculas	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de enlace	Tipo de vibración
Proteínas	3300	N-H (Amida A)	Tension de enlace
	3100-3030	N-H (Amida B)	Tension de enlace
	1660	C=O (Amida I)	Tension de enlace
		C-N	Tension de enlace
		N-H	Flexion del enlace
	1630	C=O (Amida I)	Tension de enlace
	1545	N-H (Amida II)	Flexion del enlace
		C-N	Tension de enlace
	1315	C-H	Vibraciones del esqueleto proteico
	1300-1230	Amida III	Mezcla compleja de desplazamientos
	1140	C-N	Tension de enlace
Lípidos	2960	CH3 Asimetrico	Tension asimétrica del enlace
	2930	CH2 Asimetrico	Tension asimétrica del enlace
	2870	CH3 Simetrico	Tension asimétrica del enlace
	2850	CH2 Simetrico	Tension simétrica del enlace
	1750-1720	C=O	Tension de enlace
	1460	CH3 Asimetrico	Flexion asimétrica del enlace
	1440	CH3 Simetrico	Flexion simétrica del enlace
	1380	CH3 Simetrico	Flexion simétrica del enlace
	1170	COC	Flexion asimétrica del enlace
	1060	C=O	Tension de enlace
	1035	C-H	Tension de enlace
Ácidos nucleicos	1240	P=O Asimetrico	Tension asimétrica del enlace
	1080	P=O Simetrico	Tension simétrica del enlace
Carbohidratos	1170	COC	Flexión asimétrica del enlace
	1155	C-O	tensión y flexión del enlace

Fuente: Barraza, et al., 2018, Pag. 128

CAPITULO II

2. MARCO METODOLOGICO

2.2. Diseño de la Investigación

Esta investigación se va a realizar utilizando un método cuantitativo, por lo tanto, está basada en un diseño experimental, dado que se va a realizar toma de muestras sanguíneas a un grupo de individuos para posteriormente ser analizadas con espectroscopia FT/IR.

2.3. Población del Estudio

La población de estudio serán los estudiantes de la carrera de biofísica considerando todos los estudiantes por nivel entre hombres y mujeres que tienen un rango de edad desde los 18 años hasta los 27 años.

2.4. Equipo y Materiales

2.4.1. Equipos

- Micropipeta 100-1000 μ Bang4Buck
- Centrifugadora Becton Dickinson – Clay Adams DYNAC III CENTRIFUGE
- Espectrofotómetro Jasco FT/IR-4700 (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROMETER)
- Laptop Dell Inspiron 3467 Core I5 7200U

2.4.2. Materiales

- Tubos Eppendorf
- Agujas Vacutainer
- Pipetas Pasteur
- Tubos al vacío de tapa lila
- Torundas

- Puntas de plástico
- Jeringa
- Agua destilada
- Algodón
- Torundas
- Bolsa Ziploc
- Guantes de Latex
- Marcador

2.5. Preparación de Muestras

Se procedió a extraer 54 muestras de sangre de estudiantes de la carrera de Biofísica, continuamente se centrifugó la sangre a una velocidad de 5000 rpm durante 5 minutos, se utilizó la centrifugadora Becton Dickinson – Clay Adams DYNAC III CENTRIFUGE, (Fig 7-2).



Figura: 1-2: Centrifugadora Becton Dickinson – Clay Adams DYNAC III CENTRIFUGE.

Fuente: Cuadrado, G.2020

Al haber separado la sangre y el suero, se extrae 0.5 ml de plasma y se coloca en los tubos eppendorf utilizando una micropipeta (fig 8-2)



Figura: 1-2: Extracción de plasma sanguíneo con micropipeta

Fuente: Cuadrado, G. 2020

Todas las muestras fueron identificadas con un código y se las mantuvo en congelación hasta el momento de su análisis en el espectrofotómetro. Las mediciones se realizaron bajo condiciones normales de temperatura.

2.6. Técnicas de recolección de Datos

Se analizó el plasma sanguíneo de los estudiantes de la carrera de Biofísica tanto en hombres como en mujeres, mediante espectroscopia FT/IR en donde se obtuvieron una serie de datos con los que se realizó un estudio estadístico para luego identificar las bandas de localización de los grupos funcionales.

2.7. Procedimiento lugar y condiciones de la recolección de datos:

Se extrajo el plasma sanguíneo mediante centrifugación, se utilizó 20 μ l de plasma y se colocó una gota en el centro del cristal del espectrofotómetro, el cual hace una lectura de la absorción versus el número de onda; esta medición se realizó dos veces por cada muestra.

Del equipo se exportaron los datos en formato TXT para su posterior procesamiento.

Se incluye:

- a) La investigación será base de observación directa de los hechos
- b) El proceso de recolección, clasificación, registro y codificación de los datos que se analizarán

Tabla 1-2: Total de resultados hombre y mujeres.

Hombres	Mujeres	Total
29	25	54

Fuente: Cuadrado, G. 2020

- Rango de edad de entre los 18 a los 27 años.

Se realizó una carta de consentimiento indicando los fines del estudio, para que las personas que participen en el mismo estén de acuerdo con proporcionar una muestra sanguínea.

El procesamiento de datos se realizó en dos regiones tal indica la metodología de otras investigaciones publicadas.

2.7.1. Obtención de Datos mediante el uso de espectrofotómetro

Se utilizó el espectrofotómetro FT/IR -4700, cuyas características son las siguientes:

- Ventanas no higroscópicas de KRS-5 que evitan daños por humedad
- Detector DLaTGS estabilizado por sistema peltier
- Láser HeNe de alta estabilidad de emisión
- Fuente de cerámica de alto rendimiento
- Cristal de NaCl
- Alineación óptica permanente del interferómetro está garantizada por la óptica con espejos “Corner Cube Mirrors”
- Resolución de $0,4 \text{ cm}^{-1}$.

Este equipo se encuentra en el laboratorio de Analítica e Instrumental en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, el Técnico de este laboratorio es el Ing, Fausto Tapia quien ha dado la apertura de realizar las mediciones de las muestras de plasma.



Figura 3-2: Espectrómetro de infrarrojo FT/IR-4700.

Fuente: Cuadrado, G. 2020

Se coloca la gota de plasma en el centro del cristal, se cierra el espectrofotómetro para posteriormente desde el computador mandar a ejecutar y utilizando el programa **Spectra Analysis** obtener la imagen del espectro, en el gráfico 6 se visualiza el espectro analizado en el rango entre 4180 y 580 cm^{-1} .

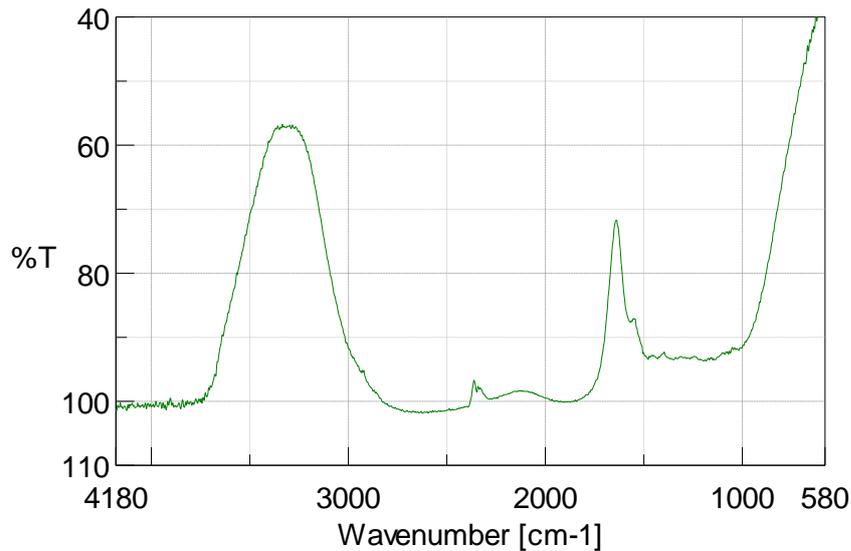


Gráfico: 3-2: Espectro de plasma sanguíneo analizado en el rango entre 4180 y 580 cm^{-1}

Fuente: Cuadrado, G. 2020

2.8. Pre-procesamiento de datos

La importancia de procesar los datos es obtener un resultado preciso para poder interpretar y hacer correcciones. Los datos obtenidos han sido tratados con ORIGINPRO 2018 versión 1.

El espectro del plasma sanguíneo se debe analizar en dos regiones: una región llamada “*fingerprint*” en la cual es evidente la presencia de la parte proteica del plasma en el rango de número de onda 1800-900 cm^{-1} en el cual se puede evidenciar el 7% y la segunda región llamada “*high región*” en el rango de número de onda 3000-2800 cm^{-1} en la cual se puede evidenciar la presencia de lípidos y carbohidratos (Heredia, 2018, p.38).

Se agruparon los datos, se realizó un promedio por cada fila dándonos un solo espectro final, a partir del cual se obtuvo la desviación estándar de los datos, y se graficó. Del espectro final se realizó un corte en X que muestra el número de onda entre 1800 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} y entre 2500 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} a estos se los realizó una segunda derivada para evidenciar mejor los picos existentes.

2.8.1. Promedio de datos

Es el valor que se obtiene al sumar los datos obtenidos y dividir el resultado con el número total de los datos.

Fórmula:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{N} \quad (4)$$

2.8.2. *Desviación estándar*

Es una medida que cuantifica la variación o dispersión de un grupo de datos obtenidos.

Fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (X_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (5)$$

2.8.3. *Derivada segunda*

Cuando se deriva una función se obtiene una nueva función que se le conoce como derivada segunda y esta función es la que mide el ritmo en que crece o decrece una función.

Fórmula:

$$f''(x) = (f'(x))' \quad (6)$$

(Salazar & Del Castillo, 2018)

CAPITULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de este trabajo de tesis es estudiar los grupos funcionales del plasma humano, mediante espectroscopia FT/IR en estudiantes de la ESPOCH. Para cumplir con el objetivo, se hicieron las mediciones del plasma sanguíneo en el espectrofotómetro Jasco FT/IR-4700, y así identificar los grupos funcionales.

Cabe indicar que es importante tener esta base de datos y la identificación de los grupos funcionales del plasma sanguíneo proveniente de sangre de los estudiantes de Biofísica que se encuentran en condiciones normales de salud para la realización de estudios posteriores.

En la figura 10-3 se puede distinguir las regiones del espectro del plasma sanguíneo en sus regiones lipídica, proteica e hidrocarburo.

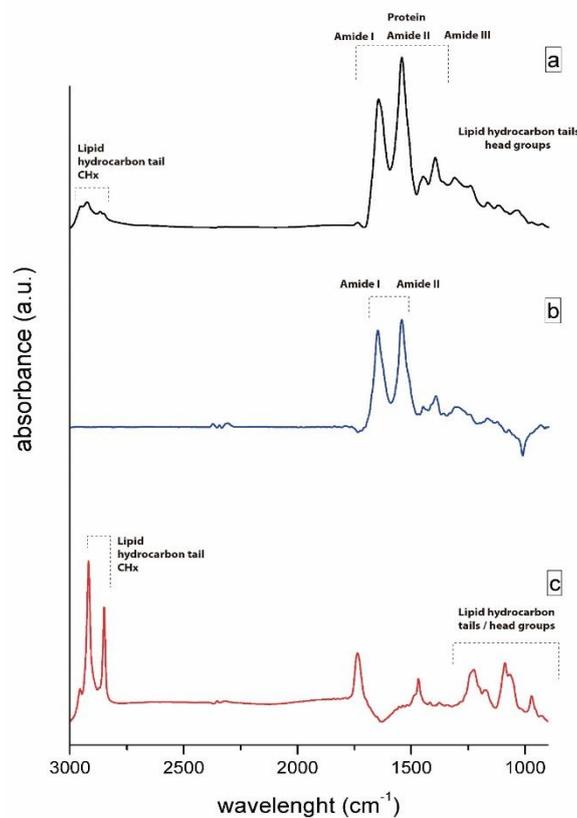


Gráfico 1-3: Espectro típico del plasma sanguíneo

Fuente: Heredia, 2018

El grupo de espectros obtenidos se los visualiza en la Grafico 2-3, donde se observa que todos siguen la misma tendencia. Esto quiere decir que las 54 muestras del plasma son similares.

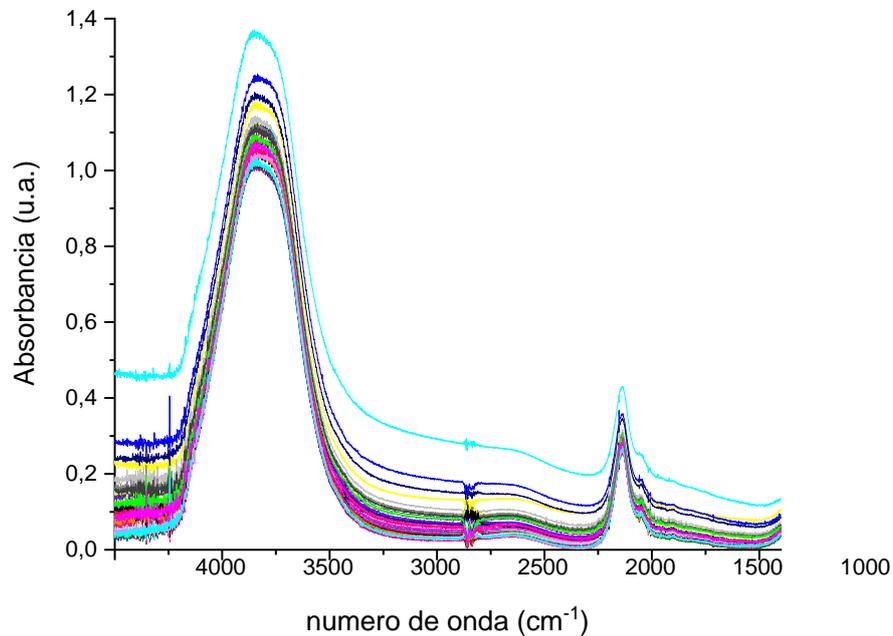


Gráfico 2-3: Todos los espectros de las muestras desde 400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} .

Fuente: Cuadrado, G. 2020

Para poder identificar los grupos funcionales es importante tomar en cuenta el número de onda de las curvas pronunciadas del espectro y para esto se realizó un promedio de los datos que el gráfico X muestra.

En este gráfico se puede observar la presencia de agua, la cual compone el plasma sanguíneo en un 91%. Asimismo, en la segunda curva del espectro se puede ver la presencia del grupo proteico.

A 3339,62 cm^{-1} se encuentra el pico 1 central con un ancho entre 3498.24 y 3150.39 cm^{-1} que presenta el componente de agua

A 1635.09 cm^{-1} se encuentra el pico 2 con un ancho entre 1668.36 y 1610.51 cm^{-1} que presenta el componente proteico.

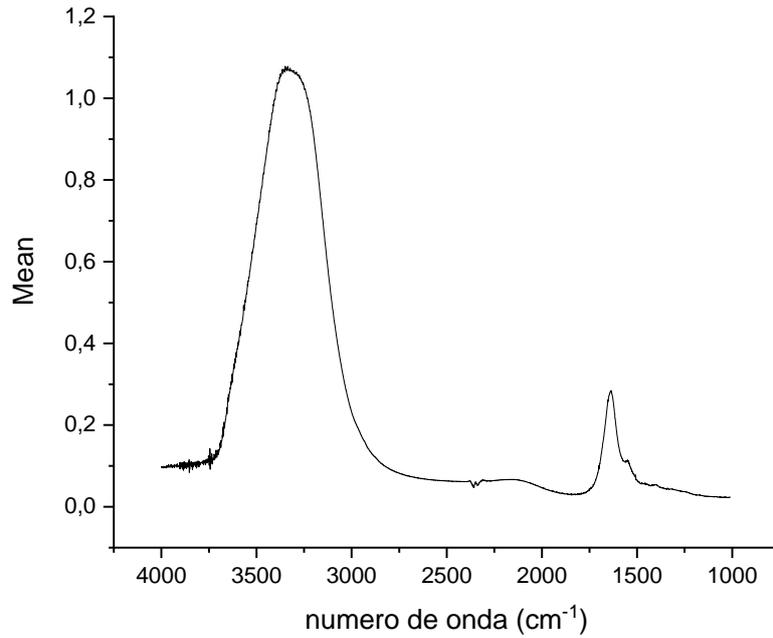


Gráfico 3-3: Espectro promedio de las 54 muestras analizadas

Fuente: Cuadrado, G. 2020

Se realiza el corte de la región alta que se muestra en el gráfico 4-3, entre 3000 a 2000 cm^{-1} en donde se observa la parte lipídica como único componente, para este gráfico se hace el corte de la escala en X y se selecciona en el cuadro el número de onda de la región alta.

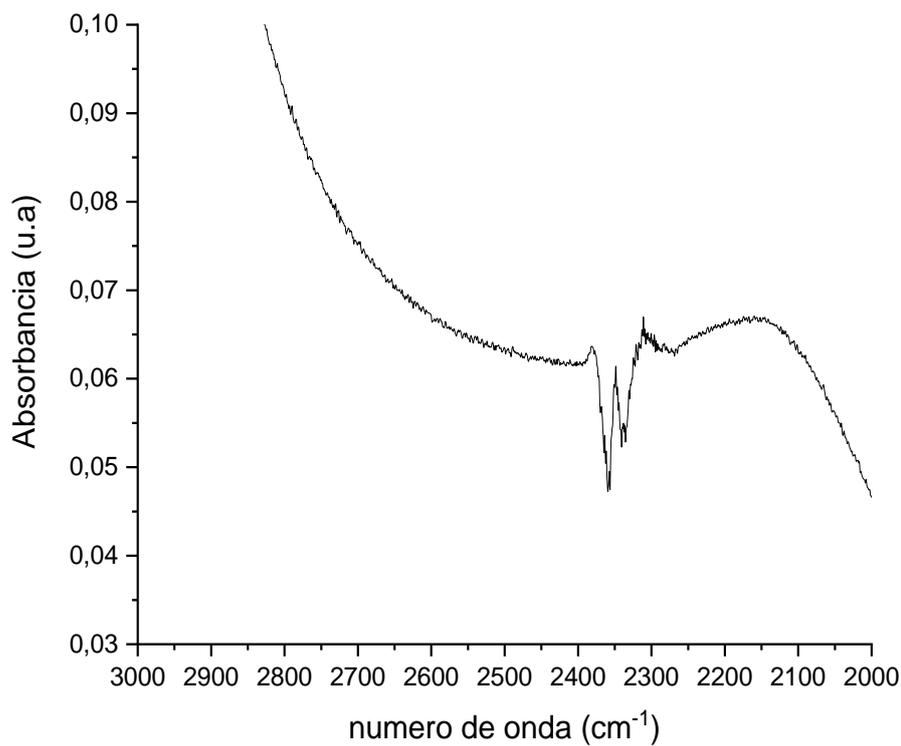


Gráfico 4-3: Espectro con un corte de la región alta entre 3000 y 2000 cm^{-1}

Fuente: Cuadrado, G. 2020

Para poder evidenciar la presencia de otros componentes se realizó la segunda derivada de los espectros en dos regiones. La región Fingerprint se muestra en el Grafico 5-3, en donde se visualizan 6 picos. Es importante la presencia porque gracias a la segunda derivada se pueden evidenciar componentes que en el gráfico 4-3 no se podían reconocer.

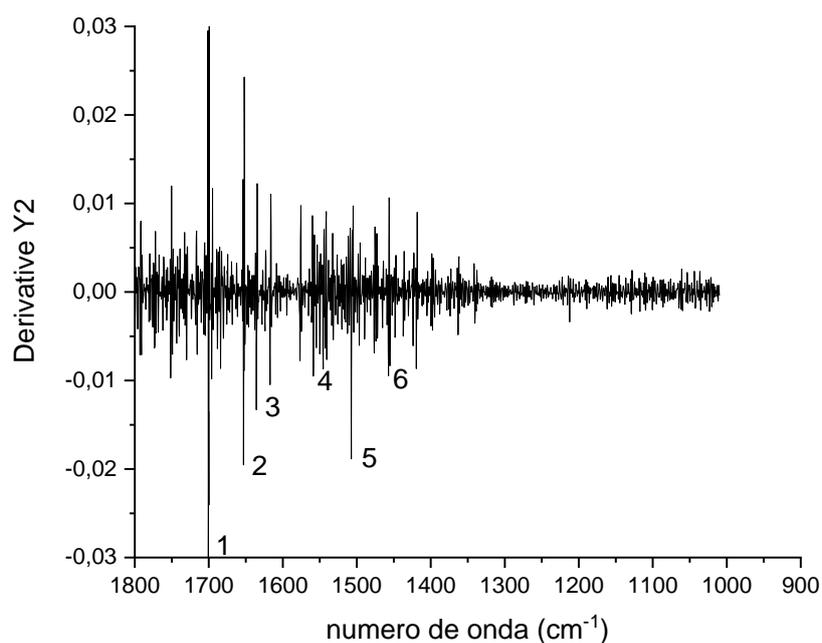


Gráfico 5-3: Segunda derivada del espectro en la región Fingerprint

Fuente: Cuadrado, G. 2020

En el punto 1 a 1700 cm^{-1} se da la vibración de tensión del componente C=O (Lípido)

En el punto 2 a 1653.18 cm^{-1} se da la vibración de tensión del componente C=O (Amida I)

En el punto 3 a 1635.82 cm^{-1} se da la vibración de tensión del componente C=O (Amida I)

En el punto 4 a 1558.68 cm^{-1} se da la vibración de flexión del componente N-H (Amida II)

En el punto 5 a 1507.34 cm^{-1} se da la vibración de flexión del componente CH₃ asimétrico (Lípido)

En el punto 6 a 1455.26 cm^{-1} se da la vibración de flexión del componente CH₃ asimétrico (Lípido)

Para la región “HIGH REGION”, la segunda derivada muestra 4 puntos relevantes que se pueden observar en el gráfico 6-3.

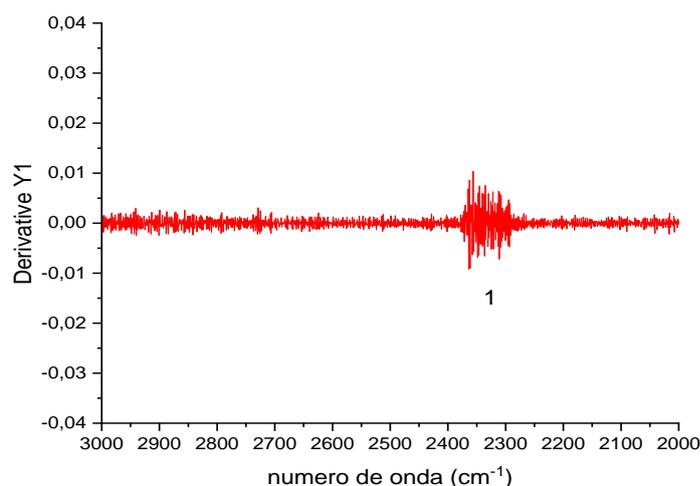


Gráfico 6-3: Segunda derivada del espectro en la región high región

Fuente: Cuadrado, G. 2020

En el punto 1 a 2363.33 cm^{-1} se da la vibración de tensión del componente CH_2 simétrico (Lípido)

En el punto 2 a 1700.67 cm^{-1} se da la vibración de tensión del componente $\text{C}=\text{O}$ (Lípido)

En el punto 3 a 1653.17 cm^{-1} se da la vibración de tensión del componente $\text{C}=\text{O}$ (Amida I)

En el punto 4 a 1507.33 cm^{-1} se da la vibración de flexión del componente CH_3 asimétrico (Lípido)

Una parte importante es la comparación de los espectros obtenidos en este estudio preliminar y el obtenido por Heredia (2018) donde en la figura 4.1 se muestra el espectro de plasma sanguíneo en Italia, donde se evidencia que existe solo un pico proteico de alta intensidad, asimismo se puede observar la presencia de agua y no se pueden identificar con claridad la parte lipídica e hidrocarburo.

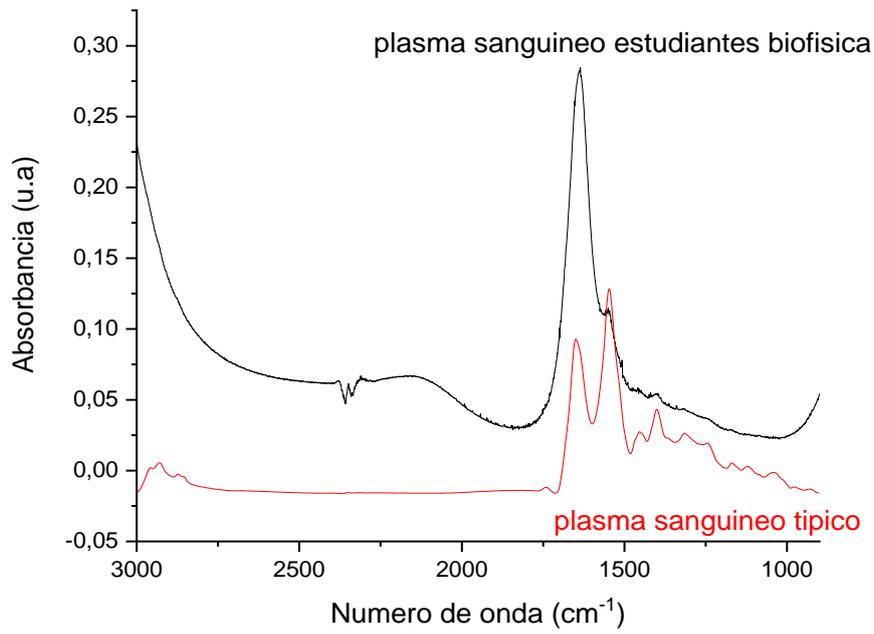


Gráfico 7-3: a) Espectro en rojo muestra el plasma sanguíneo del estudio en Italia (Heredia, 2018), b) Espectro en negro muestra el plasma de este estudio.

Fuente: Cuadrado, G. 2020

CONCLUSIONES

- Se estudiaron los grupos funcionales del plasma humano de los estudiantes de la carrera de Biofísica de la ESPOCH mediante el uso del espectrofotómetro Jasco FT/IR -4700 para poder obtener los datos de absorción del plasma sanguíneo.
- Se analizó el plasma sanguíneo de los estudiantes de la carrera de Biofísica de la ESPOCH que se encontraban en condiciones normales de salud a través de un estudio de espectroscopia FT/IR, sometiendo los datos obtenidos a análisis estadísticos como promedio, desviación estándar y segunda derivada para homogenizar los datos obtenidos, evidenciando que no existe una diferencia de la tendencia de las curvas de los plasmas obtenidos, por lo cual para los resultados finales se utilizó únicamente el espectro promedio.
- Se identificaron las bandas del número de onda en donde se encuentran los grupos funcionales, que indica el eje x del espectro donde encontramos dos picos prominentes; el pico 1 central a 3339,62 cm^{-1} con un ancho entre 3498.24 y 3150.39 cm^{-1} que presenta el componente de agua y el pico 2 a 1635.09 cm^{-1} con un ancho entre 1668.36 y 1610.51 cm^{-1} que presenta el componente proteico.
- Se examinaron las diferencias entre los grupos funcionales de un plasma sanguíneo típico y el plasma sanguíneo del estudio, encontrándose diferencias evidentes dado que en un plasma sanguíneo típico se identifica la parte proteica, la parte lipídica e hidrocarburo y por el contrario en el plasma sanguíneo de los estudiantes de la carrera de Biofísica se encuentra solo la parte proteica y no permite evidenciar una diferencia entre la parte lipídica e hidrocarburo, siendo a su vez muy evidente la presencia de agua. Esto podría deberse a que en promedio los mestizos están compuestos por 61% de genes indígenas, 32% caucásicos, y 7% afroecuatorianos, mientras que la sangre europea es caucásica.
 - En conclusión, el trabajo de tesis aporta a la investigación a través de este estudio preliminar evidenciando que los grupos funcionales de plasma sanguíneo de los estudiantes de la carrera de Biofísica en condiciones normales de salud es diferente a un espectro de plasma sanguíneo típico.

RECOMENDACIONES

- Al ser un estudio preliminar se recomienda la aplicación de otra técnica de análisis para poder corroborar los resultados obtenidos.
- Se podría trabajar con los datos en extensiones compatibles con programas que ayudan a estudiar específicamente el plasma sanguíneo.
- Al tener ya identificado los grupos funcionales en este estudio, es importante ampliar el número de datos, y cambiar el diseño experimental, para tener una base de datos que se pueda considerar como un espectro de plasma sanguíneo típico de Riobamba.

BIBLIOGRAFÍA

GRIFFITHS, P. & HASETH, J., *Fourier transform infrared spectrometry*. Segunda. New Jersey-EEUU: John Wiley & Sons, Inc. 1983. ISBN 9780471194040. pp. 15-24.

HEREDIA, M. Searching for Multiple Sclerosis biomarkers by using blood-based vibrational spectroscopy (Trabajo de Titulación) (Maestría). Università della Calabria, Physics Department, 2018 Calabria-Italia. pp. 35-44. [Consulta 2020-02-02]. Disponible en: <file:///C:/Users/soled/Desktop/TESIS/Tesi.pdf>.

JACKSON, M. & MANTSCH, H.H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 30, no. 2, pp. 95. 1995. ISSN 10409238. DOI 10.3109/10409239509085140.

LACOMBE, C., et.al., Rapid screening of classic galactosemia patients: A proof-of-concept study using high-throughput FTIR analysis of plasma. *Royal Society of Chemistry* [en línea], vol. 140, no. 7, pp. 2280. 2015. ISSN 13645528. DOI 10.1039/c4an01942c. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c4an01942c>.

LUCCHINETTI, C., et.al., Heterogeneity of multiple sclerosis lesions. *American Neurological Association*, vol. 47, 2000. pp. 707-708.

MONTALVO, C., Tejido Sanguíneo. *Universidad Nacional Autónoma de México*. Biología Celular e Histología Médica, 2010. pp. 46.

MORDECHAI, S., et.al., Early diagnosis of Alzheimer's disease using infrared spectroscopy of isolated blood samples followed by multivariate analyses. *The Royal Society of Chemistry*, vol. 142, no. 8, pp. 1276-1278. 2017. ISSN 13645528. DOI 10.1039/c6an01580h.

NAVARTA, M., et.al., Aplicación de la Espectroscopia del Infrarrojo Medio en Química Analítica de Procesos. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, vol. 2, no. 3, pp. 93-96. 2008. DOI 1870-1809.

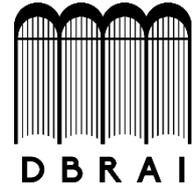
PINE, S, et.al., *Química Orgánica*. Cuarta. México: McGraw-Hill/Interamericana. 2015. ISBN 968-451-363-1.

SALAZAR, C & DEL CASTILLO S., *Fundamentos Básicos de Estadística*. [en línea] Primera. 2018. [Consulta: 05 febrero 2020], Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13720/3/Fundamentos%20B%C3%A1sicos%20de%20Estad%C3%ADstica-Libro.pdf>

TAMM, L.K. & TATULIAN, S.A., *Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers.* [en línea]. S.l.: s.n. 1997. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634652>.



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO**



**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

Fecha de entrega: 12 / 03 / 2020

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)

Nombres – Apellidos:

Gonzalo Sebastián Cuadrado Guevara

INFORMACIÓN INSTITUCIONAL

Facultad:

Ciencias

Carrera:

Biofísica

Título a optar:

Biofísico

f. Analista de Biblioteca responsable: