FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

UT 1. <u>MÉTODOS DE ANÁLISIS BIOQUÍMICOS</u> (24/09/01)

- **<u>INTRODUCCIÓN</u>**

  - LABORATORIO DE BIOQUÍMICA: se aplican métodos químicos y bioquímicos en el estudio de la enfermedad. Los estudios bioquímicos constituyen una tercera parte de todas las determinaciones del Laboratorio.
  - UTILIDADES: diagnóstico. Valoración del pronóstico y del tratamiento, investigación, ensayos clínicos de fármacos.

- **<u>PROCESO ANALÍTICO</u>**

2.1. <u>FASE PREANALÍTICA</u>

  - <u>Correcta cumplimentación de la petición analítica</u>: legible, datos mínimos imprescindibles (edad, sexo, raza, fecha de la solicitud) y datos complementarios (juicio clínico, semanas de embarazo, día del ciclo en caso de hormonas sexuales en mujeres, medicación, etc..
  - <u>Preparación del paciente</u>: (25/09/01)

    - ♦ Ayuno: se aconseja de forma generalizada. Se puede beber agua.
    - ♦ Alcohol: altera la concentración de lactato, ácido úrico, enzimas hepáticas...
    - ♦ Tabaco: contraindicado si se piden catecolaminas, cortisol, ácidos grasos...
    - ♦ Ejercicio físico: altera los niveles de enzimas musculares como la creatinfosfoquinasa (CPK).
    - ♦ Estrés: puede alterar los resultados de los análisis.
    - ♦ Dieta: algunos parámetros requieren restricciones o cambios en la dieta previos a la determinación. Ej. Aclaramiento de creatinina: no tomar exceso de carne.
    - ♦ Supresión de la medicación: para el aclaramiento de creatinina suprimir por ejemplo antiinflamatorios no esteroideos.
  - <u>Obtención de la muestra</u>:
    - ♦ Extracción de sangre: en posición sentado o tumbado.
    - ♦ Recogida de orina de 24 horas: algunos parámetros requieren condiciones de acidez por lo que habrá que añadir un ácido al recipiente de recogida (Ej. El 5−hidroxiindolacético, aldosterona en orina, etc).
    - ♦ Niveles de fármacos: hay que tener en cuenta la hora de la administración. Se suelen tomar las muestras 3−4 horas antes de la siguiente dosis. Hay casos particulares.
    - ♦ Ritmo cardíaco: hay que tenerlo en cuenta para algunas sustancias como ACTH, cortisol, etc.

2.2. <u>FASE ANALÍTICA</u>

  - **TÉCNICAS ANALÍTICAS**: son los diferentes procedimientos de análisis basados en el comportamiento de la materia ante la Energía:

    - ♦ Espectrofotometría: autoanalizadores − Electroforesis
    - ♦ Cromatografía − Electroquímica
    - ♦ Química seca − Inmunoensayos

(25/09/01)

- **MÉTODOS ANALÍTICOS:** son aplicaciones de las técnicas, en casos determinados, con parámetros y protocolos concretos. Su nombre hace referencia a:

- Alguna característica analítica: método del punto final, métodos cinéticos, métodos colorimétricos, métodos enzimáticos, métodos de curva de calibración, etc.
- Alguno de los reactivos usados: método de la glucosa−oxidasa, método del verde bromocresol, etc.
- A la persona que optimizó el método: método de Biuret, método de Jaffé, etc.
- **FASE POSTANALÍTICA**

Es el conjunto de procesos que van desde la obtención de los resultados analíticos hasta que el clínico solicitante tiene el informe de resultados. Es una fase compleja pero decisiva para cumplir una calidad total.

- **Validación de resultados**

  - Valoración técnica: es la aceptación de los resultados obtenidos por las distintas técnicas.
  - Valoración clínica: los resultados deben ser coherentes con la clínica.

· **Informe de resultados**
· **Tiempo de respuesta**: es el tiempo que transcurre hasta que se entregan los resultados al médico solicitante. Debe ser lo más corto posible, sin sacrificar la calidad.
· **Teoría de los valores de referencia**: son intervalos de normalidad de los resultados, los límites superior e inferior no son rígidos (se pueden usar los valores anteriores del propio sujeto aunque normalmente no se tienen datos suficientes).
· **Variabilidad de los resultados analíticos:**
  - Variaciones analíticas: toda determinación analítica está sometida a una variación que se denomina error analítico
  - Variaciones extraanalíticas: pueden ser fisiológicas, tanto interindividuales como intraindividuales.

- **CONTROL DE CALIDAD**
- **Control de calidad interno:**
- Calidad en el Laboratorio: se basa en controlar los resultados que emite el Laboratorio. Es muy importante porque la calidad de los resultados analíticos puede afectar a la salud de las personas y puede traer importantes consecuencias económicas. Para controlar la calidad del Laboratorio se pone en marcha el programa de control de calidad.

- Programa de Control de Calidad: (25/09/01)

  - **Objetivos:**

1. Asegurar que los datos producidos por un determinado método analítico son científicamente válidos, defendibles ante terceras personas y tienen unas conocidas y aceptadas precisión y exactitud.

2. Evaluar de forma real la capacidad funcional habitual de un Laboratorio con respecto a otros.

3. Identificar problemas a medida que surgen.

4. Resolver los problemas.

- **Requisitos:**
- Participación de todo el personal del Laboratorio.
- Debe ser coordinado con la máxima eficacia por el responsable de la calidad.
- Se debe informar periódicamente al personal del Laboratorio.
    - ♦ **Fundamento:** el control de calidad se basa en la manipulación de datos estadísticos que se obtienen de la repetición de los ensayos. Se realizan un conjunto de experimentos sistemáticos encaminados a asegurar la precisión y la exactitud de los análisis.
    - ♦ **Concepto de Exactitud y Precisión:**

Exactitud: es el acercamiento de un resultado o de la media de un grupo de resultados al valor verdadero o a un valor aceptado como tal.

Precisión: es el grado de concordancia entre medidas repetidas de una misma muestra, es decir, está relacionada con la dispersión que tiene varias determinaciones de una misma muestra.

El valor numérico que define la precisión es la Desviación Estándar:

Y también se define por otro valor, que es el Coeficiente de Variación:

Para calcular la SD se deben determinar como mínimo 20 mediciones sucesivas del parámetro en cuestión.

El 95% de los resultados deben encontrarse entre los siguientes valores:

- ♦ X ± 2 SD
- ♦ En la práctica X ± 3 SD

(26/09/01)

La SD expresa la amplitud de la variación de los resultados de tal manera que ésta se debe sólo a errores aleatorios y los valores se distribuyen como una curva normal o de Gauss:

- ♦ **Tipos de errores experimentales:**
    - Errores Sistemáticos: son de causa ajena a lo que es el propio método en sí. Afectan tanto a la exactitud como a la precisión. Estos errores no deben existir, siempre que se de uno hay que buscar las causas y evitarlo.
    - Errores Aleatorios: rigen la precisión del método y dependen del propio método. No se pueden evitar.
    - Control de calidad interno basado en el empleo de muestras control.

      C.1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD: se emplean preparados comerciales de referencia que son liofilizados.

      C.2. GRÁFICOS CONTROL: hay distintos tipos, el más extendido en el LDC es el gráfico de Levey−Jennings, en el cual los resultados de control son expresados en el eje de ordenadas con respecto al tiempo o a las determinaciones sucesivas en el eje de abcisas.

      Se introduce la muestra control una vez al día o una vez por turno de trabajo y se van anotando los resultados del análisis. Cuando tengamos como mínimo 20 determinaciones se hace la interpretación

del gráfico.

En la gráfica se apunta el valor medio esperado que es el valor que resulta de la media de todos los valores de las muestras de referencia analizadas. El valor medio esperado se utiliza para valorar la precisión del método.

En el caso de la exactitud será el valor medio de referencia que tiene la muestra control cuando es suministrada por el Laboratorio de referencia.

El valor medio se representa como una gruesa línea en el centro de la gráfica. Se señalan los límites de control aceptados, que se representan por una línea de puntos en el gráfico de control.

(26/09/01)

Modificaciones frecuentes en los gráficos de control:

- Dispersión: cuando los errores aleatorios o la imprecisión aumentan
- Tendencia: es la desviación sistemática de los valores observados cuando el método analítico sufre un problema en desarrollo progresivo.
- Desviación: es una modificación abrupta o brusca con respecto al valor medio establecido.

TÉCNICA MULTIRREGLA DE WESTGARD

- 1: 3 SD una observación supera la media ± el límite de 3SD
- 2: 2 SD dos observaciones consecutivas superan la misma media ± 2SD
- R:4 SD dos observaciones consecutivas se diferencian más de 4SD
- 4: 1 SD cuatro observaciones superan la media ± 1SD
- 10:MEDIA diez observaciones caen a un mismo lado de la media.

Las reglas 1:3SD y R: 4SD generalmente sugieren un error aleatorio. Las reglas 2:2SD, 4:1SD y 10:MEDIA suele ser un error sistemático.

- **Control de calidad externo**

Tiene como objetivo principal conocer la comparación de los resultados analíticos de diferentes Laboratorios. En la actualidad existen 2 tipos de programas:

- Programas de vigilancia o pruebas de eficacia, en las que gran número de laboratorios analizan las mismas muestras varias veces al año.

- Programas de control de calidad regional, en los que un grupo de laboratorios de una Región emplea los mismos lotes de muestras control para su programa de calidad interno. Se analizan durante un período de aproximadamente un año y, los resultados son enviados semanal o mensualmente al suministrador de programa. Éste compara el valor medio y la SD con los otros laboratorios.

(27/09/01)

UT. 2 MÉTODOS FOTOMÉTRICOS DE ANÁLISIS I

- **NATURALEZA DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA**

La Radiación Electromagnética es una forma de Energía radiante que se propaga en forma de ondas. En este fenómeno ondulatorio se define:

- Longitud de onda ( ): es la distancia entre dos máximos de un ciclo completo del movimiento ondulatorio. Se expresa, según el S.I. en nanómetros (nm) y sus equivalencias son: 1nm = 1m =10 A0 = 10−9 m.
- Frecuencia ( ): es el número de ciclos por segundo. Es inversa a la longitud de onda. Su fórmula es: = c/ , y se mide en ciclos por segundo o hertzios.
- Fotones: la luz está formada por fotones, y estos son paquetes discontinuos de E. La E de un fotón depende de la frecuencia y de la longitud de onda, según la siguiente expresión: E = h x = h x c/ (h = Cte. de Planck = 6,62.10−27erg/seg.). La Energía Electromagnética se mide el Ergios. La relación entre la longitud de onda y la Energía es inversa, por lo tanto a menor longitud de onda mayor Energía y viceversa.
- Espectro Electromagnético: cubre un amplio intervalo de E radiante, desde los rayos de longitud de onda corta hasta las ondas de radio, de longitud de onda larga. Se divide en varias regiones, las más interesantes para nosotros son:
    - Región Ultravioleta: = 10−380 nm
    - Región Visible: = 380−780 nm
    - Región Infrarroja: = 780−30.000 nm

  En la Región Visible, la luz se descompone en colores. La luz blanca contiene todo el espectro de longitudes de onda. Si interacciona con una molécula puede ser dispersada o absorbida.

- **FENÓMENOS DE INTERACCIÓN ENTRE LUZ Y MATERIA**
- **FENÓMENO DE ABSORCIÓN**

Cuando una partícula que se encuentra en estado de reposo o estado fundamental interacciona con un haz de luz, absorbe E y se transforma en una partícula en estado excitado. La molécula absorbe la E de la onda y aumenta su energía, y ese aumento de energía es igual a la E de la Radiación Electromagnética absorbida (E = h.). La partícula en estado excitado tiende a volver de forma espontánea a su estado de reposo desprendiendo la E absorbida en forma de calor.

(27/09/01)

Espectro de Absorción. Cada especie absorbente, que recibe el nombre de cromógeno, tiene un determinado espectro de absorción. El espectro de absorción es un gráfico donde se representa en ordenadas la Absorbancia y en abcisas la longitud de onda. La medida de la cantidad de luz absorbida por una solución es el fundamento de la espectrofotometría de absorción.

Por eso es importante trabajar a la longitud de onda a la que la sustancia estudiada absorbe la mayor cantidad de luz (a mayor cantidad de luz, mayor cantidad de sustancia).

- **FENÓMENO DE EMISIÓN**

Algunos compuestos, tras ser excitados por la luz, vuelven al estado fundamental produciendo la emisión de energía radiante. En este caso, lo que se mide es la energía emitida y, en este fenómeno se basa la fotometría de llama o la fluorescencia.

- **LEYES DE ABSORCIÓN**

Cuando un haz de luz pasa a través de un medio, se registra una cierta pérdida de intensidad, debido a la absorción por parte de la sustancia.

Se llama TRANSMITANCIA (T) a la relación entre la luz incidente y la luz transmitida:

$T = Is / I0$; $\%T = (Is / I0) \times 100$.

Se puede perder intensidad por la interacción con la cubeta o el solvente. Para evitar este error se hace una primera medida con una solución de referencia o BLANCO, que contiene todos los posibles compuestos que intervienen en la lectura menos el que vamos a medir. Todas las medidas que se hagan con posterioridad serán referidas a esta medida inicial y se harán en la misma cubeta que se utilizó en la medida del blanco.

La Transmitancia se usa poco, se emplea más la Absorbancia (A) porque la relación entre A y la concentración de una solución es directamente proporcional y la de la T es inversamente proporcional.

(28/09/01)

La relación entre la absorbancia y la transmitancia es la siguiente:

- Si el $\%T = 100$ $A = 2-\log T = 2-\log 100 = 0$
- Si el $\%T = 0$ $A = 2-\log 0 =$ "

En los aparatos que se usan actualmente se presentan absorbancias, pero el aparato lo que mide realmente es %T que luego transforma a absorbancia.

3.1. LEY DE BEER

La absorbancia de una solución es directamente proporcional ala concentración y a la longitud del paso de la luz.

A = . b. c

Siendo:

A: absorbancia. No tiene unidades.

: el coeficiente de extinción molar, también llamado coeficiente de absorción. Es constante para un compuesto dado siempre que se fijen condiciones de longitud de onda, de pH, de temperatura, de solventes, etc. Sus unidades son 1/ (mol/cm).

b: es la longitud de paso de la luz, en cm.

c: es la concentración del absorbente. Se mide en mol/L.

La aplicación práctica de la Ley de Beer es, que conociendo la absorbancia de una sustancia podemos averiguar su concentración y esto lo podemos hacer de dos formas:

- Por comparación con una solución conocida: si tenemos 2 soluciones, una problema (P) y una estándar (S), podemos establecer la siguiente relación matemática entre ellas:
- A través de una curva de calibración: la curva de calibración es la representación gráfica en un eje de coordenadas de la Absorbancia (eje de ordenadas) frente a la Concentración (eje de abcisas). Se ensayan varias soluciones de concentración conocida y se determinan sus A, construyéndose la curva de calibrado, que es una recta. Una vez ensayadas las soluciones problemas, su concentración se averigua por interpolación de las A de las soluciones problema en la curva de calibración.

Hay que tener en cuenta la LINEALIDAD, que es el intervalo de concentraciones del cromógeno entre las cuales existe una relación lineal entre Absorbancia y Concentración.

Cuando la concentración del cromógeno sobrepasa los límites de linealidad se deja de cumplir la Ley de Beer, convirtiéndose la recta en una curva. La lectura de la Absorbancia fuera de los límites de linealidad se traduce en una concentración falsamente baja de cromógeno. En esta situación, hay que diluir la muestra para que su concentración entre en los límites de la linealidad.

- **Empleo de los Factores de Calibración:** Para reactivos estables y sistemas fotométricos estables, este factor se puede mantener constante, siendo sólo necesario ensayar las muestras problema multiplicando la A resultante por el factor F.

(03/10/01)

4. ESPECTROFOTÓMETRO

Se distinguen dos tipos de aparatos:

- Fotómetro o Colorímetro: se caracterizan porque utilizan filtros que solo permiten el paso de una determinada longitud de onda.
- Espectrofotómetros: utilizan cromadores. Con ellos se obtiene un haz de luz monocromático cuya longitud de onda se varía a voluntad. Los monocromadores pueden ser de dos tipos: prismas y redes de difracción.

Monocromador de Prisma

- **COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO**

1. Fuente de luz: proporciona energía radiante en forma de luz visible o no visible.

- Tipos de lámparas:
- Lámparas de filamento de tungsteno: se utilizan para longitudes de onda del espectro visible y el ultravioleta próximo. Son fuentes de un espectro continuo de energía radiante entre 360−950 nm.
- Lámparas de filamentos de haluros de tungsteno: son de mayor duración y emiten energía radiante de mayor intensidad.
- Lámparas de Hidrógeno y Deuterio: producen un espectro continuo en la región ultravioleta entre 220−360 nm.
- Lámparas de vapores de Mercurio: Emiten un espectro discontinuo o espectro de líneas que se utilizan para calibración de longitudes de onda, se emplean solo para espectrofotómetros y cromatografía HPLC.
- Precauciones:
    - Las subidas y bajadas bruscas de tensión producen sufrimiento de la lámpara y cambios en las lecturas de la Absorbancia.
    - La lámpara tiene una vitalidad limitada y se debe vigilar para que funcione bien el aparato.

(03/10/01)

2. Rendija de entrada: tiene como función reducir al máximo la luz difusa y evitar que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de onda.

3. Monocromadores. Pueden ser:

- Prismas: son fragmentos con forma de cuña de un material que permite el paso de la luz. Ej. De vidrio para trabajar en el espectro visible o cuarzo para trabajar en el ultravioleta lejano.

- Redes de difracción: son un gran número de líneas paralelas situadas a distancias iguales entre sí y son hendiduras sobre un vidrio o una superficie metálica. Cada una de estas hendiduras se comporta como un pequeño prisma.

4. <u>Rendija de salida</u>: tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer. (04/10/01)

5. <u>Cubeta</u>: es el recipiente donde se coloca la muestra para la medición. Pueden ser de distintos tipos y tamaños (cuadradas, rectangulares, redondas). Se obtienen mejores resultados usando cubetas de bordes paralelos. Si se utilizan cubetas redondas se deben marcar e introducir en el aparato siempre en la misma posición. Suelen estar fabricadas en vidrio o en plástico.

6. <u>Detector</u>. Puede ser de dos tipos:

- <u>Fotocélulas o células fotovoltaicas</u>:

Es una lámina de Cobre sobre la que se extiende una capa de Selenio o de Óxido de Cobre. A ésto se le conoce como semiconductor. Sobre el semiconductor hay una capa de metal transparente que sirve de electrodo. La luz incide sobre el Selenio y éste desprende electrones, que pasan a la placa de Cobre originando una diferencia de potencial por existir carga negativa sobre el Cobre y positiva sobre el Selenio. El conjunto se conecta a un amperímetro que señala el paso de corriente.

<u>Características</u>: son resistentes; económicas; sensibles desde el ultravioleta hasta los 1.000 nm. de longitud de onda; no se requiere batería externa, ni vacío,...; la corriente producida es directamente proporcional a la Energía que llega y tienen efecto fatiga, es decir, que presentan una subida inicial de corriente, que luego decrece progresivamente hasta el equilibrio. Por eso hay que esperar entre 30−60 segundos entre una lectura y otra.

- <u>Fototubos multiplicadores</u>:

(04/10/01)

Un fototubo multiplicador es un tubo que contiene un cátodo que emite electrones de forma proporcional a la Energía que incide sobre él. Tiene un ánodo que recoge los electrones y la corriente se multiplica varias veces al chocar los electrones sobre sucesivos ánodos que van teniendo un voltaje superior al precedente. La señal se amplifica en cientos o miles de veces.

<u>Características</u>: el tiempo de respuesta es muy rápido, no tienen efecto fatiga tan altos como la anterior y son muy sensibles.

7. <u>Medidor</u>: son sistemas de lectura de la Energía eléctrica que recoge el detector y que puede ser lectura directa (se utiliza una célula fotovoltaica) o puede ser amplificadores de señal como en el caso del fototubo multiplicador. Los actuales aparatos incorporan

lectura digital y cálculos automáticos de concentraciones con relación a las curvas de calibración.

(05/10/01)

4.2 TIPOS DE APARATOS

- ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ SIMPLE: es igual que la descripción dada para el espectrofotómetro en general. Consta de los mismos elementos (Ej. Bilirrubinómetro: para determinar bilirrubina directa en capilar).
- ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ EN EL ESPACIO: todos los componentes están duplicados, menos la lámpara y el medidor. Dos haces de luz pasan al mismo tiempo por los distintos componentes separados en el espacio. Esto compensa las variaciones de intensidad de luz y de absorbancia.
- ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ DOBLE EN EL TIEMPO: utilizan los mismos componentes que el espectrofotómetro de haz simple. Dos haces de luz pasan por los mismos componentes pero no al mismo tiempo. Emplean un Chopper consistente en un interruptor rotativo del haz luminoso colocado a continuación de la rendija de salida. Un sistema de espejos dirige la porción de luz reflejada por el chopper a través de una cubeta de referencia y de ahí al detector común. El detector lee alternativamente el haz procedente de la muestra y el de la cubeta de referencia. Esto compensa la variación de energía radiante.

(05/10/01)

UT. 3 MEDIDAS FOTOMÉTRICAS II

1. FLUORIMETRÍA

- CONCEPTOS GENERALES
- Luminiscencia
- Fluorescencia
- INSTRUMENTACIÓN FLUOROMÉTRICA
- Fluorómetro
- Espectrofluorómetro
- CARACTERÍSTICAS DE LA FLUORIMETRÍA
- APLICACIONES

2. FOTOMETRÍA DE LLAMA

- CONCEPTOS GENERALES
- Generalidades
- Fundamento
- Interpretación
- INSTRUMENTAL

3. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

3.1 PRINCIPIOS

3.2 INSTRUMENTAL

- Lámpara de cátodo hueco
- Quemador
- Componentes fotométricos

3.3 ABSORCIÓN ATÓMICA

4. <u>NEFELOMETRÍA Y TURBIDIMETRÍA</u>

4.1 PRINCIPIOS. LEY DE RAYLEIGH

4.2 DETECCIÓN DE LA LUZ DISPERSADA

- Turbidimetría
- Nefelometría

(09/10/01)

1. <u>FLUORIMETRÍA (FLUOROMETRÍA)</u>

- **<u>CONCEPTOS GENERALES</u>**
- **<u>LUMINISCENCIA:</u>** es un fenómeno resultante de la interacción de la luz con la materia que tiene como resultado la emisión de energía radiante. Dentro de la luminiscencia se incluyen la fluorescencia, fosforescencia y la quimioluminiscencia.
- **<u>FLUORESCENCIA:</u>** se produce cuando una molécula absorbe luz de una determinada longitud de onda y emite luz de una longitud de onda superior y, por lo tanto, de menor energía. Es un fenómeno más lento que el de la absorción. Así, entre la absorción de energía y la liberación en forma de fluorescencia se produce un retraso de 10^{-8} − 10^{-4} segundos, mientras que en la absorción, el retraso es de 10^{-15} segundos. Si el tiempo transcurrido es inferior a 10^{-4} segundos se habla de fosforescencia.

La relación entre la concentración de la sustancia y la intensidad de emisión fluorescente se deduce a partir de la Ley de Beer según la siguiente expresión: I = Intensidad transmitida

$I / I_0 = 10^{-bc}$ I_0 = Intensidad de la luz incidente

= coeficiente de extinción molar

b = longitud de paso de la luz

c = concentración

Se llama rendimiento cuántico de la fluorescencia a la relación entre los fotones emitidos y los absorbidos: = I / I0

Puede ir desde 0, para sustancias no fluorescentes; hasta 1 cuando la fluorescencia es óptima.

Realizando operaciones matemáticas, se llega a la conclusión de que la intensidad de la radiación fluorescente es proporcional a la concentración de la sustancia.

La fluorimetría combina la simplicidad de la fotometría con la alta sensibilidad y especificidad del fenómeno fluorescente.

1.2 INTRUMENTACIÓN FLUOROMÉTRICA

Se utilizan dos tipos de aparatos:

- **FLUORÓMETRO:** emplea filtros de vidrio o filtros interferenciales para seleccionar la longitud de onda de excitación y de emisión.
- **ESPECTROFLUORÓMETRO:** emplea prismas o redes de difracción para seleccionar las longitudes de onda.

Ambos aparatos tienen como componentes básicos:

- ◊ Fuente de energía radiante: son dos lámparas de arco de Xenón o lámparas de Mercurio. Emiten energía radiante de intensidad elevada.
- ◊ Rendijas de entrada y salida (= que en el espectrofotómetro)
- ◊ Monocromadores: pueden ser filtros o prismas o redes de difracción. Hay dos monocromadores:
  - · Monocromadores de excitación o primario, que selecciona las longitudes de onda de excitación.
  - · Monocromadores de emisión o secundario, que selecciona la longitud de onda de emisión antes que la luz llegue al detector.
    - Cubetas: son de sílice o cuarzo. No todas las de plástico valen porque pueden originar fluorescencia adicional.
    - Detectores: son fototubos multiplicadores. Amplían la pequeña señal fluorescente pudiéndola cuantificar. Son muy sensibles. El monocromador secundario y el detector están situados en ángulo recto en relación al haz de luz incidente para impedir que la luz procedente de la lámpara llegue al detector. Los espectros de absorción y emisión varían de un compuesto a otro, por lo que al hacer una determinación, hay que seleccionar la longitud de onda de excitación

más adecuada, que es la de máxima absorción; y hay que seleccionar la longitud de onda de emisión más adecuada, que es la del máximo de fluorescencia.

1.3 <u>CARACTERÍSTICAS DE LA FLUOROMETRÍA</u> (10/10/01)

- ♦ Tiene una muy alta sensibilidad. Es de 100 a 1000 veces más sensible que las técnicas colorimétricas normales.
- ♦ Las medidas de fluorescencia se expresan en unidades de intensidad relativa, se emplea lo que se llama Rendimiento de Fluorescencia Relativo.

La señal electrónica variará para la misma concentración de una sustancia de un instrumento a otro y, por lo tanto, no se podrán comparar.

- ♦ Las medidas de fluorescencia se deben hacer siempre en soluciones diluidas. La absorción debe ser como máximo del 2% de la radiación incidente. Por encima de esta absorbancia no se ilumina por igual todas las partes de la solución y, por lo tanto, se emitirá distinta fluorescencia en las distintas capas de la solución.
- ♦ Las cubetas no deben tener ralladuras porque aumentan la dispersión de la luz; ni se deben tocar con los dedos las caras ópticas de las cubetas, porque se produce fluorescencia contaminante.

1.4 <u>APLICACIONES</u> (10/10/01)

- ◊ FLUOROINMUNOANÁLISIS: son anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente, específicos de la sustancia que se va a estudiar.
- ◊ DETERMINACIÓN de vitaminas, fármacos, algunas enzimas, etc.

2. <u>FOTOMETRÍA DE LLAMA</u>

2.1 <u>CONCEPTOS GENERALES</u>

- **<u>GENERALIDADES:</u>** La fotometría de llama se basa en el fenómeno de emisión de luz. Se utiliza para la determinación de Sodio, Litio y Potasio (Na, Li, k) en líquidos biológicos.
- **<u>FUNDAMENTO:</u>** un átomo en estado fundamental sometido a la energía calorífica de una llama excita sus electrones pasando éstos a niveles superiores de energía. Como allí son inestables, vuelven a su estado inicial emitiendo el exceso de energía en forma de luz. La luz desprendida puede tener distintas longitudes de onda. Se debe seleccionar para un elemento aquella longitud de onda en la que

emite con mayor intensidad y hay menos posibilidades de tener longitudes de onda cercanas que interfieran.

- **INTERPRETACIÓN:** la intensidad luminosa es directamente proporcional al número de átomos que emiten energía, que a su vez es directamente proporcional a la concentración del ión de la muestra.

Los metales alcalinos (Li, Na, y K) son los más fáciles de excitar con una llama. Al ponerse en contacto con la llama, cada metal tiene un color característico que es: Litio−rojo; Na−amarillo y K−violeta. Y las longitudes de onda correspondientes a estos colores son las que se usan para determinar los iones correspondientes.

2.2 INSTRUMENTAL

Se usan aparatos iguales al espectrofotómetro pero sustituyendo la lámpara por una llama.

- GASES: suele usarse gas natural, acetileno o propano con aire u oxígeno. La elección del gas depende de la temperatura que se desee. Normalmente se utiliza propano−aire para Na y K. El flujo de gas debe ser constante, para ello se necesitan reguladores.
- ATOMIZADOR: tiene como función disgregar la solución problema en pequeñas gotas para que los átomos absorban la energía térmica de la llama y se exciten. Se debe aspirar previamente agua y soluciones estándar, además de un calentamiento previo para que la llama mantenga la temperatura constante. Se introducen comprobaciones con estándares de concentración conocida entre las determinaciones.

3. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Se utiliza para la determinación de Calcio, Magnesio, Cobre, Zinc, Plomo y otros metales

3.1 PRINCIPIOS

La técnica de basa en la absorción de la luz por parte de los átomos vaporizados en estado de reposo. El espectro de absorción de un átomo es muy estrecho (corto), recibe el nombre de espectro de líneas y va de 0,001 a 0,01 nm.

Se basa en medir la cantidad de luz a la longitud de onda seleccionada que es absorbida cuando la luz pasa a través de una nube atómica.

Los átomos de corresponden al metal que se va a medir y se cumple que a mayor concentración del metal, mayor absorción.

3.2 INSTRUMENTAL

Los espectrofotómetros de absorción atómica constan de:

LÁMPARA DE CÁTODO HUECO: Es la fuente de luz. Está constituida por un cátodo hueco del metal que se va a medir, que emite el espectro de líneas característico de este metal.

El ánodo y el cátodo se encuentran en un cilindro de vidrio sellado y relleno de un gas inerte (Ej. Ne, Ar). En el cilindro hay una ventana de vidrio o de cuarzo que permite la transmisión de la luz.

CHOPPER

QUEMADOR: tiene como función colocar al metal en estudio en un estado en el que se produzca la absorción de la luz. Para ello tienen lugar 2 procesos:

- Nebulización de la muestra, es decir, transformar la solución en un fino aerosol antes de ser introducida en la llama.
- Atomización: consiste en la evaporación del solvente dentro de la llama dando lugar a la formación de átomos. El combustible utilizado es el acetileno, usándose llamas aire−acetileno.

RENDIJA DE ENTRADA; MONOCROMADOR; RENDIJA DE SALIDA; DETECTOR; MEDIDOR.

4. NEFELOMETRÍA Y TURBIDIMETRÍA (15/10/01)

4.1 PRINCIPIOS

Cuando un haz de luz choca contra una partícula en suspensión sufre una serie de fenómenos:

- DISPERSIÓN de la luz
- REFLEXIÓN
- ABSORCIÓN
- TRANSMISIÓN

La DISPERSIÓN de la luz depende de varios factores, que son:

- Tamaño y peso molecular de las partículas
- Longitud de onda de la luz incidente
- Distancia del detector a la cubeta
- Concentración de partículas

Todos estos factores se relacionan mediante complejas fórmulas matemáticas, por la Ley de Rayleigh.

4.2 DETECCIÓN DE LUZ DISPERSADA

Se utilizan dos métodos para detectar la dispersión:

- **TURBIDIMETRÍA:** Es la medida de la intensidad de un haz de luz incidente cuando éste pasa a través de una suspensión de partículas. La turbidimetría se mide a 0 grados del haz incidente, es decir, en su

misma dirección. La disminución de la intensidad se puede medir como %T o como A en cualquier espectrofotómetro o autoanalizador.

- **NEFELOMETRÍA:** Es la medida de la luz dispersada en ángulos distintos al de incidencia. Lo más frecuente es que sea entre los 15º−19º. La medida se realiza en aparatos diseñados con el sistema de detección situado a ángulos predeterminados.

4.3 INSTRUMENTAL

FUENTE DE LUZ: es una fuente de energía radiante. Puede ser cualquier tipo de lámpara (tungsteno, halógeno, etc), pero la mejor es el láser porque produce haces de luz estables de intensidad adecuada a la técnica y bien colimados, es decir, paralelos.

COLIMADOR: es una lente o espejo, que tiene como misión hacer paralelos los haces de luz. Si la fuente es láser no será necesario.

MONOCROMADOR: filtros, prismas, redes de difracción...No es necesario si la fuente es láser.

CUBETA: = espectrofotometría.

SISTEMA DE DETECCIÓN: si está colocado a 0º la técnica se denomina Turbidimetría, pero si el ángulo es distinto de 0º, la técnica se denomina Nefelometría.

(16/10/01)

UT. 4 MÉTODOS FOTOMÉTRICOS DE ANÁLISIS III

1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS POR ANÁLISIS FOTOMÉTRICOS

Se usan reacciones químicas de las sustancias que se valoran. Para ellos se utilizan los reactivos adecuados y se detectan los productos de estas reacciones por técnicas espectrofotométricas.

La determinación de la concentración de un compuesto se puede medir de tres formas:

- Midiendo la absorbancia del compuesto directamente si éste absorbe luz.
- Haciéndolo reaccionar con reactivos adecuados, transformando la sustancia inicial en un producto que absorbe luz.
- Haciendo que el compuesto forme parte de una reacción en la que otra sustancia experimente un cambio en sus propiedades de la absorción de la luz.

2. MÉTODOS PARA MEDIR LA CONCENTRACIÓN DE UNA SUSTANCIA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

2.1 MÉTODOS DE PUNTO FINAL (ó de equilibrio):

Se incuba la muestra y el reactivo durante un tiempo determinado y a una temperatura determinada para que se complete totalmente la reacción, de tal forma que la sustancia que buscamos debe consumirse totalmente. Si no fuera así y quedase parte de la sustancia sin consumir, al medir el producto, estaríamos midiendo menos cantidad de la que realmente hay. Por lo tanto se mide al final de un tiempo fijo de incubación.

La concentración de un sustancia es igual a la absorbancia por un factor llamado Factor de Calibración (K), que coincide con la pendiente de la recta de calibración:

$Y = a + bX$

a: punto donde la recta corta al eje Y (ordenada en el origen)

b: pendiente de la recta

Si a = 0, entonces $Y = bX$ ––––––––––––––––––––––––––––––
$C = K . A$

2.2 REACCIONES ACOPLADAS:

Cuando se va a determinar una sustancia que se transforma en una reacción que no provoca cambios medibles por espectrofotometría, se utiliza otra reacción ligada a la anterior para medir el compuesto.

Se llama Reacción Auxiliar a la que se utiliza para transformar la sustancia a determinar.

Se llama Reacción Indicadora a la que se utiliza para la medida fotométrica o colorimétrica.

Ambas reacciones se llevan a cabo en la misma mezcla de ensayo y se dice que están acopladas.

Las REACCIONES COLORIMÉTRICAS pueden ser de dos tipos: Precedentes y Subsiguientes.

(16/10/01)

- R. Colorimétricas Precedentes (muy poco habituales): van antes que la reacción auxiliar. Se obtiene un producto que reacciona con la sustancia que vamos a determinar (A) dando un producto medible.

U + Y ! X +Y (Reacción precedente)

A + Y ! B + C (Reacción auxiliar)

- R. Colorimétricas Subsiguientes: van después de la reacción

auxiliar. Medimos un producto de la reacción auxiliar (D).
A +B ! C + D (Reacción auxiliar)

D + P ! Q + R (Reacción indicadora)

2.3 MÉTODOS CINÉTICOS:

En ellos se mide la velocidad de la reacción mediante la medida de la variación de la Absorbancia en el tiempo y esto se relaciona con la concentración. Es una medición continua, a diferencia de la del punto final, se mide en tiempos regulares. Se puede medir la cantidad de sustrato no transformado ó la cantidad de producto formado.

Métodos cinéticos enzimáticos (Reacciones enzimáticas):

El caso más sencillo es el de una reacción irreversible como Sustrato ! Producto

Lo más frecuente es que se utilicen reacciones de primer orden que se caracterizan por presentar curvas de concentración frente al tiempo exponenciales. Se produce una variación de la Absorbancia en el intervalo de tiempo que es directamente proporcional a la concentración inicial de sustrato si se mantienen constantes los tiempos de medida.

Métodos cinéticos enzimáticos (Reacciones enzimáticas):

Las reacciones enzimáticas están basadas en la Ley de Acción de Masas o Equilibrio de las Reacciones, que sigue el siguiente esquema:

Los enzimas (E) reaccionan ofreciendo su sitio activo al sustrato (S) con el cual se acoplan y forman un complejo (ES), donde el enzima actúa con gran rapidez hasta liberar el producto transformado (P). El enzima no se altera, quedando libre para volver a fijar otra molécula de sustrato. Si mantenemos constantes las condiciones de la reacción (pH; temperatura; cofactores y la concentración de la enzima) la velocidad aumentará a medida que aumente la concentración del sustrato, hasta que lleguemos a un punto en el cual se

(16/10/01)

alcanza la Velocidad Máxima (Vmax) y a partir del cual la velocidad es constante. Aunque sigamos aumentando la concentración del sustrato, como la enzima está saturada, la velocidad deja de aumentar.

Ecuación de Michaelis−Menten: **V = K . [S]**

V: velocidad de la reacción

K ó KM: constante de Michaelis−Menten. Es la concentración de un

sustrato en moles/L con la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Es característica de cada enzima con su sustrato y nos da información de la afinidad que tiene el enzima por su sustrato.

Cinética de primer orden: se habla de cinética de primer orden cuando las concentraciones de sustrato son bajas y, por lo tanto, la velocidad es una función lineal de la cantidad de sustrato.

Cinética de orden cero: se habla de cinética de orden cero cuando la concentración de sustrato es muy alta y, por lo tanto, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato.

Para una KM alta, la mitad de la Vmax se alcanzará con una concentración de sustrato alta, y la velocidad de la reacción es lenta.

Para una KM baja, la velocidad de la reacción es rápida porque con una concentración baja se llega rápido a la velocidad máxima.

Por lo tanto, las determinaciones cinéticas de las concentraciones de sustancias requieren enzimas con constantes de Michaelis altas para que la velocidad de la reacción sea lenta, se tarde más en llegar a la velocidad máxima y podamos medir mayor cantidad de sustrato.

(18/10/01)

UT. 5 MEDICIÓN DEL PH EN LÍQUIDOS BIOLÓGICOS. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.

1. BASES DE ELECTROQUÍMICA

- **CONCEPTO DE ELECTROQUÍMICA:** son un conjunto de métodos analíticos cuantitativos, basados en las propiedades eléctricas de la disolución de un analito cuando forma parte de una célula eléctrica..
- **FUNDAMENTO:**
- SEMICÉLULA DEL ÁNODO: un metal sumergido en una disolución produce una diferencia de potencial por la tendencia de los átomos del metal a pasar a la disolución en forma de iones, liberando electrones en el proceso. La reacción que se produce es la siguiente: (M0 es el átomo metálico neutro y M+ es el ión positivo)

M0 ____! M+ + e−

La lámina de metal introducida en la disolución recibe el nombre de electrodo.

El sistema completo (electrodo + disolución) recibe el nombre de semicélula.

La reacción que se produce recibe el nombre de oxidación, ya que el átomo neutro pasa al estado positivo y se pierden electrones.

- SEMICÉLULA DEL CÁTODO: con algunos metales ocurre el proceso contrario, es decir, los iones metálicos de la disolución toman electrones y pasan a átomos neutros que se depositan en el electrodo. Ésta es una reacción de reducción del ión metálico y, el electrodo, recibe el nombre de cátodo.
- **ECUACIÓN DE NERNST**

La relación entre el potencial generado en la semicélula y la concentración de la disolución implicada viene dada por la Ec. de Nernst.

E: Potencial de la semicélula

E0: Potencial de la semicélula en condiciones estándar, que está calculado experimentalmente para las distintas semicélulas.

R: Constante general de los gases

T: temperatura absoluta (K)

n: nº de electrones que se intercambian en el proceso

F: Constante de Faraday

(18/10/01)

2. LA CÉLULA ELECTROQUÍMICA

La célula electroquímica se constituye por la unión de dos semicélulas de forma que los potenciales generados en cada una de ellas se combinan formando una célula electroquímica con una diferencia de potencial que se manifiesta por un flujo de corriente eléctrica medible con un voltímetro.

El ejemplo más típico es la célula de Zn/Cu. El Zn va a formar parte de la semicélula del ánodo y el Cu la del cátodo. Las dos semicélulas están unidad por un puente salino formado por Cl^- y K^+, que es el que establece la conexión eléctrica. El circuito se completa con un potenciómetro.

El ánodo(Zn) tiene un exceso de electrones, mientras que el cátodo (Cu) tiene un déficit de electrones, por lo tanto, el exceso de electrones va desde el ánodo hasta el cátodo, y esto constituye la corriente eléctrica.

3. ELECTRODOS DE REFERENCIA

Para medir el potencial E de una disolución necesitamos un electrodo indicador y un electrodo de referencia.

Electrodo de Referencia: debe mantener el voltaje constante, en condiciones controladas durante un tiempo significativo. De esta

forma, se transforman las diferencias de potencial relativas, según el par Redox que se utilice, a tablas de potenciales absolutos al enfrentarse los pares Redox con un par de referencia al que se le asigna un valor cero de potencial.

Los electrodos de referencia más usados son:

- ♦ Electrodo Estándar de Hidrógeno: consiste en un electrodo de Platino sumergido en una disolución de iones Hidrógeno. Tiene pH = 0, Tª = 25ºC. Se elige el par Redox del Hidrógeno: 2H+ + 2e− ! H2

A este se le asigna de forma arbritaria el valor 0, de tal forma, que conectando cualquier semicélula a ésta y midiendo el E desarrollado se obtiene el E relativo de la segunda semicélula.

El electrodo de Hidrógeno no se utiliza habitualmente en los sistemas de medida porque es de muy difícil mantenimiento.

- ♦ Electrodo de Calomelanos (Hg2Cl2 = calomel): está compuesto por Mercurio metálico en equilibrio con una disolución saturada de Cloruro Mercurioso y una concentración conocida de Cloruro Potásico. La reacción de oxid−red es la siguiente: Hg2Cl2 + 2e− ! 2Hg0 + 2Cl
- ♦ Electrodo de Plata−Cloruro de plata: está constituido por un asa de Ag recubierta de AgCl: AgCl + e− ! Ag0 + Cl−

Electrodo indicador: responde proporcionalmente a la concentración de la sustancia de interés. Lo que se mide realmente es la variación de potencial con respecto al electrodo de referencia. (19/10/01)

4. TIPOS DE SISTEMAS ELECTROQUÍMICOS

4.1 MÉTODOS EN LA INTERFASE DEL ELECTRODO CON LA FINA CAPA DE DISOLUCIÓN ADYACENTE:

- **Estáticos o potenciométricos**: son los que miden el potencial existente entre dos electrodos en solución sin que haya paso de la corriente eléctrica.
  - ♦ Potenciometría analítica: Mide la actividad de los iones de la disolución que está relacionada con la concentración por un Factor de Actividad, según la siguiente fórmula: ai = Ci . fi

    ai: actividad de los iones de una solución.

    Ci: concentración de los iones medidos.

    Fi: Factor de Actividad.

  - ♦ **Dinámicos o amperométricos:** se basan en la medida de la cantidad de corriente eléctrica que fluye cuando se aplica un voltaje constante al electrodo de medida.
    - ◊ Columbimetría: es una técnica que mide la carga

total necesaria para la oxidación o reducción total de una especie. Se usa fundamentalmente para la determinación de Cloro en líquidos biológicos, utilizando el clorímetro de Cotlove.

◊ Amperometría.

4.2 MÉTODOS EN EL SENO DE LA DISOLUCIÓN

A. Conductimetría.

- **MEDIDAS DEL PH**

pH−metro: es el aparato que mide el pH y que consta de dos electrodos, el de 2Referencia y el Selectivo.

◊ Electrodo de Referencia: es un electrodo de calomelanos.

◊ Electrodo Selectivo: es un electrodo que está lleno de una solución de pH constante. La conexión a un medidos de voltaje se realiza por medio de un hilo de Ag cubierto de AgCl e inmerso en una solución de HCl 0,1M.

Los pasos a seguir en la medida del pH son los siguientes:

· Lavar el electrodo con agua destilada.
· Colocar un tampón de calibración de pH cercano al pH que se quiere medir.
· Ajustar el valor del pH.
· Colocar otro tampón de pH conocido. Suelen ser tampones fosfato (pH = 6,8) y ajustamos el pH de nuevo.
· Colocar la solución cuyo pH se quiere medir.

- **MEDIDA DE LA PRESIÓN PARCIAL DE CO2:**

Se utiliza el electrodo de Severing−Havs, que es una modificación de la medida del pH cuyos electrodos están separados de la muestra por una membrana que deja pasar el CO2 selectivamente.

♦ **MEDIDA DE LA PRESIÓN PARCIAL DE O2:**

Se utiliza el electrodo de Clark: las moléculas de O2 disueltas en una solución acuosa determina la corriente eléctrica, que es la que mide el electrodo y, que es proporcional, a la presión parcial de O2.

♦ **ELECTRODOS SELECTIVOS**

Concepto: son sistemas electroquímicos que tienen mecanismo de selección asociado al electrodo, que lo hace solo sensible a variaciones de potencial debidas a la concentración de un determinado ión.

La selectividad ideal se consigue con electrodos de polímeros orgánicos porosos.

Tipos:

- ◊ Electrodo de vidrio para medir hidrogeniones (H+)
- ◊ Electrodo de vidrio para medir Sodio
- ◊ Electrodo de Polivinilcloruro/Valinomicina: se usa para la determinación de Potasio
- ◊ Electrodo de Sulfuro de Plata/Cloruro de Plata: para medir Cloro
- ◊ Electrodo recubierto de un enzima (Ej. Ureasa, para medir Urea−Amonio)

♦ **ANALIZADORES DE PH Y GASES** (22/10/01)

9.1 CONCEPTO: Miden automáticamente el pH, la presión parcial de CO2 y la de O2. Estas medidas las hacen directamente y, el resto de medidas se calculan por microprocesadores incorporados a los autoanalizadores. Tenemos como parámetros asociados, por ejemplo el bicarbonato plasmático (CO3H−); CO2 total; exceso de base; etc. Las medidas se realizan con electrodos selectivos.

9.2 COMPONENTES

- ◊ Sistema de aspiración: la muestra (sangre arterial) es aspirada por una bomba peristáltica que coge normalmente de 50−250 L.
- ◊ Cámara de medida: donde se localizan los electrodos. Está a temperatura constante.
- ◊ Electrodos: de pH, CO2 y O2.
- ◊ Tampones de calibración: se calibran con 2 puntos, uno a pH = 7,382 y otro a pH = 6,838, estableciéndose entre ambos una recta.
- ◊ Gases con sistema de humidificación: para la calibración de la presión parcial de CO2 y O2.
- ◊ Contenedor de desechos
- ◊ Microprocesador: encargado de dirigir la operación
- ◊ Impresora

9.3 ERRORES MÁS FRECUENTES (22/10/01)

♦ Procesamiento inadecuado de la muestra:

- ◊ La entrada de aire en la muestra, bien en el recipiente de extracción ó en la cámara de medida (aire ambiental: la presión parcial de O2 = 160 mmHg y la de CO2 = 0 mmHg).
- ◊ Demora en la realización del análisis. Esto determina el consumo de O2 por parte de las células sanguíneas y consiguiente formación de CO2.

2. Alteraciones en los electrodos:

- Se pueden contaminar con las proteínas de la muestra. Para evitarlo, se debe pasar una solución desproteinizante con frecuencia.
- El envejecimiento de la membrana del electrodo de CO_2, que se hace entonces permeable a los hidrogeniones. Se debe cambiar periódicamente la membrana.
- Alteración del electrolito de relleno.

3. Contaminación de los tampones: Se debe vigilarlos, comprobándolos periódicamente y cambiarlos.

UT. 6 MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos principales de los Laboratorios es la separación de mezclas de sustancias en sus componentes, ya sea con fines cualitativos o cuantitativos.

2. CENTRIFUGACIÓN

2.1 CONCEPTO: Es un método que utiliza la fuerza centrífuga para separar elementos de densidades distintas o de pesos moleculares distintos.

2.2 FUNDAMENTO: La FCR (Fuerza Centrífuga Relativa) es la fuerza requerida para que se produzca la separación. Las unidades de esta fuerza se expresan como el número de veces mayor que la fuerza de la gravedad y se calcula mediante la fórmula:

$$FCR = 1{,}118 \cdot 105 \cdot r \cdot n2$$

r: distancia horizontal del radio en centímetros desde el centro de rotación hasta el fondo del tubo durante la centrifugación.

n: Velocidad de rotación del motor (r.p.m)

Es fundamental observar el principio de equilibrio. Para ello se colocarán tubos y cubetas de igual forma, peso y tamaño en posiciones opuestas en la cabeza de la centrífuga, buscando una disposición geométricamente simétrica, utilizando tubos de agua si fuera necesario.

2.3 DESCRIPCIÓN DE LA CENTRÍFUGA

· ROTOR O CABEZAL: Es el lugar donde se colocan las muestras. Hay dos tipos

- Cabezal oscilante u horizontal: los contenedores oscilan libremente entre las ramas del rotor. Las muestras, dentro de los contenedores, oscilan hasta ponerse en posición horizontal, en ángulo recto con el eje de rotación y adoptan la posición vertical o de reposo cuando la centrífuga está parada.
- Cabezal angular o de ángulo fijo: los tubos de muestra están en posición fija formando un ángulo de entre 25−40º con el eje de rotación. Solamente forman un ángulo de 90º en una centrífuga especial para el estudio del hematocrito.

(24/10/01)

· EJE: Es el vástago que soporta el rotor y que actúa como eje de rotación.
· MOTOR: Acciona el vástago y el rotor.
· ACCESORIOS: El rotor está incluido en una cámara que generalmente lleva tapadera con una cerradura de seguridad que impide abrirla hasta que haya terminado la centrifugación. Otros accesorios son el temporizador, control de velocidad (r.p.m), refrigerador para disminuir la temperatura de la cámara, freno,...

2.4 UTILIDADES

- Separación de suero o plasma.
- Concentración de células: en líquidos biológicos se concentran las células para facilitar su estudio microscópico (Ej. Sedimento de orina).
- Separación de sustancias: Ej. Para el estudio del HDL colesterol, se precipitan previamente las lipoproteínas LDL y VLDL.
- Aclaración de líquidos orgánicos: separando las fases líquidas de distinta densidad.
- Separar quilomicrones del suero o fraccionar las distintas lipoproteínas: para esto se necesitan ultracentrífugas (alcanzan grandes

velocidades).

2.5 CONTROL Y MANTENIMIENTO

Se deben tener en cuenta las siguientes precauciones:

- Utilizar tubos resistentes a la FCR
- No debe sobresalir el tubo del portatubos
- Equilibrar correctamente la centrífuga.
- Tapar los recipientes para evitar la evaporación por el aumento de la temperatura.
- No forzar el paro de la centrífuga.
- Chequeo de la velocidad de centrifugación cada 3 meses con un tacómetro externo.
- Limpieza periódica de la cámara y los contenedores.

3. ELECTROFORESIS

3.1 PRINCIPIOS

- **Concepto:** es el movimiento de partículas cargadas por aplicación de un campo eléctrico externo.
- **Movimiento de una partícula cargada en el seno de un campo eléctrico:** cuando una partícula cargada se coloca dentro de un campo eléctrico se moverá hacia el polo positivo (ánodo) si está cargada negativamente (anión), ó hacia el polo negativo (cátodo) si la partícula está cargada positivamente (catión).

La fuerza que ejerce el campo eléctrico sobre la partícula cargada es proporcional a la carga de la partícula (Q) y al voltaje del campo eléctrico aplicado (V):

$$F = Q \cdot V$$

Sin embargo, existe otra fuerza opuesta al movimiento de la partícula que es proporcional al tamaño y forma de la misma, y a la viscosidad del tampón (v):

$$Fr = f \cdot v$$

Siendo f el coeficiente de fricción, que es una característica de cada partícula. Estas dos fuerzas (F y Fr) se equilibran cuando la partícula comienza a migrar y hacen que alcance una velocidad constante. La velocidad de migración por unidad de campo eléctrico se llama movilidad electroforética ( ) y tiene como unidades cm2 / V . seg (centímetro

cuadrado/Voltios por segundo)

- **Factores que afectan a la migración de las partículas:**
  - La carga neta de la partícula: La carga neta de las partículas en solución está determinada por el pH del tampón en que se encuentran, que es lo que decide el grado de ionización de las mismas. El grado de ionización es el balance entre las cargas positivas y negativas de una partícula en solución.

Las proteínas son anfóteras (tienen cargas positivas y negativas) y éstas dependen del pH del medio. Existe un pH para el cual, el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas, dando como resultado una carga neta cero. Este pH recibe el nombre de Punto Isoeléctrico. La mayoría de las proteínas tienen un punto isoeléctrico ácido, que oscila entre 4,6 para la Albúmina y 6,2 para algunas globulinas. A un pH superior al del punto isoeléctrico la partícula posee más cargas positivas que negativas comportándose como un catión. Si el pH es inferior al punto isoeléctrico tendría más cargas positivas que negativas, comportándose como un anión.

- La fuerza iónica del tampón: A mayor concentración del tampón, éste transportará más corriente y, por tanto, las partículas transportarán menos corriente y migrarán más despacio. La concentración del tampón debe ser la suficiente para que éste cumpla sus funciones, que son dos: mantener un pH constante y transportar la corriente.
- Tamaño y forma de las partículas: La importancia es relativa, es más importante cuando se emplean soportes de electroforesis que permiten el paso selectivo de las moléculas según su tamaño reteniendo las más grandes y dejando pasar las más pequeñas. (26/10/01)
- Potencial del campo eléctrico: Cuanto más alto sea el potencial mayor es el movimiento de la partícula. Esto viene determinado por:

$V = R . I$

Siendo **V** = voltaje; **R** = Resistencia del medio; **I** = Intensidad de corriente. Al aumentar el V aumentamos también la temperatura y esto determina la desnaturalización de las proteínas y la

evaporación del tampón o buffer. Por lo tanto, los voltajes de trabajo están limitados y sólo se utilizarán voltajes altos si el aparato tiene sistema de refrigeración.

3.2 REALIZACIÓN DE LA ELECTROFORESIS

- Preparación de la muestra: Las principales muestras son suero, plasma, sangre total, orina, líquido cefalorraquídeo,...

Suero y plasma no suelen necesitar preparación. Para la electroforesis de hemoglobina hay que utilizar un hemolizado de hematíes. Para la de proteínas urinarias se utiliza una orina que se debe preparar mediante concentración, etc.

- Selección del soporte: La electroforesis se lleva a cabo sobre soportes tomando el nombre de electroforesis de zona ó zonal. Los principales soportes utilizados son de dos tipos:
  - No restrictivos:
    - Papel
    - Acetato de celulosa: se utiliza en forma de tiras que están formadas por fibras de este compuesto y que engloban aire entre ellas. Cuando se van a usar se sumergen en el tampón de tal forma que éste ocupa los huecos. El tampón es el encargado de transportar la corriente eléctrica a través de la tira. **Ventajas:** es de fácil manejo, de fácil lectura, son de rápida ejecución y son económicos.
    - Gel de agarosa: se utiliza a una concentración de entre 0,5−1 gramos por 100 cm3 de tampón. Su aspecto es claro y transparente y se puede medir por fotodensitometría.
      - Restrictivos: El soporte ejerce algún tipo de impedimento al desplazamiento de las partículas de la

muestra. Este desplazamiento depende del tamaño del poro del gel y, por lo tanto, del tamaño de las partículas. Hay dos tipos fundamentales:

- Gel de almidón: Tiene como ventaja que aumenta el número de fracciones separadas. Tiene muchos inconvenientes: preparación extratemporánea del gel, preparación complicada para obtener una capa de espesor y porosidad uniformes, prácticamente imposible medir por densitometría,...
- Gel de poliacrilamida: Es el soporte ideal si se quieren conseguir más y mejores separaciones electroforéticas. Se usa solo en laboratorios de investigación.
    - Aplicación de

la muestra: Se puede aplicar según tres técnicas:

- Apli sobr la supe del sopo deja que la mue pene (Ej. Suer en elect con aceta de celu
- Prac orifi o ranu en los gele (Ej. En inmu se traba con gele que tiene las conc exca o prep
- Inclu la mue en

el
proc
de
polin
del
gel.

- Revelado: Tiene por objeto la localización de las distintas fracciones de la muestra. Esto se consigue mediante la tinción de la tira. Previamente a este paso se debe parar el proceso de difusión que se consigue con distintos métodos. El colorante empleado dependerá del compuesto que queramos localizar (Ej. Para proteínas, el negro amido). Una vez sumergida la tira en el colorante se debe eliminar el exceso mediante lavados con una solución aclarante.
- Lectura y evaluación: Se puede leer de dos formas:
- Elución: Cada zona se recorta y se eluye en un disolvente adecuado al colorante. Se obtiene así una disolución coloreada que se mide en el espectrofotómetro.
- Densitometría: Consiste en la lectura directa de la tira mediante un fotodensitómetro. En este aparto se elige la longitud de onda adecuada, se hace pasar un haz de luz a través de la tira y, dependiendo de la densidad de color de cada fracción se absorberá más o menos luz. Un detector

recibe el haz de luz y dependiendo de la intensidad de la luz recibida se determina la concentración. El aparato es capaz de elaborar una gráfica de registro del recorrido de la luz. En esta gráfica, cada banda aparece como un pico cuya altura depende de la densidad de color que a su vez depende de la concentración de la sustancia.

3.3 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

Electroforesis en acetato de celulosa: es una de las técnicas más utilizadas en la rutina diaria por diversos motivos: se trata de un soporte económico, es de fácil manejo, fácil aplicación de la muestra, supone una rápida separación, es de fácil lectura por densitometría y tiene una buena resolución.

La tira más empleada es el cellogel que es acetato de celulosa gelatinizado y que tiene como ventaja que se puede transparentar previamente a la lectura en el densitómetro.

Electroforesis en gel de agarosa: es de muy amplia difusión en el LDC. Puede venir preparado o bien fabricarlo en el laboratorio. La muestra se sitúa en posillos excavados en el gel.

Electroforesis en gel de almidón

Electroforesis en gel de poliacrilamida: es un gel restrictivo. Dependerá de la carga y el tamaño de las partículas. Cuando transcurre el proceso electroforético, las partículas comienzan a migrar de acuerdo con su carga eléctrica, pero son frenadas en su avance según su tamaño. Con esto se consigue una separación más completa y un mayor número de bandas.

Los geles de pueden emplear en placas o en tubos y pueden ser de dos tipos:

- Continuos: el tamaño del poro varía de forma gradual.
- Discontinuos: el tamaño del poro varía en zonas bien diferenciadas.

Isoelectroenfoque: se basa en la separación de sustancias conforme a su punto isoeléctrico, por lo tanto, sirven para separar

sustancias anfóteras como las proteínas.

Sobre un medio soporte se establece un gradiente de pH mediante una mezcla de anfolitos. El gradiente de pH aumenta desde el ánodo (+) al cátodo (−).

Cuando una proteína se introduce en este gradiente migrará de acuerdo con su carga neta. Si su carga neta inicial es positiva migrará hacia el cátodo. A medida que avanza hacia el cátodo va recorriendo una zona en la que el pH cambia y, por lo tanto, también cambiarán sus cargas, perdiendo cargas positivas y ganando cargas negativas. Llegará un momento en el que las cargas positivas y negativas se igualen, resultando su carga neta 0 (punto isoeléctrico). En este punto permanecerá estática. De esta manera se alcanzará una posición de equilibrio formando una banda definida.

El voltaje empleado para crear el gradiente de pH con los anfolitos tiene que ser muy elevado. Se emplean voltajes de hasta 2000 V lo que determina la formación de calor en gran cantidad (será necesario un sistema de enfriamiento de la cubeta).

Ventaja principal: tiene gran poder de resolución. Permite separar sustancias cuyos puntos isoeléctricos se diferencian en 0,02 unidades de pH.

3.4 APLICACIONES CLÍNICAS
(05/11/01)

La Electroforesis en acetato de celulosa es la más utilizada habitualmente en el LDC y se usa fundamentalmente para la separación de las proteínas séricas y separación de aminoácidos.

La Electroforesis en gel de agarosa se utiliza para la separación de las lipoproteínas, para la separación de isoenzimas y en la inmunoelectroforesis.

La Electroforesis en gel de poliacrilamida se usa para la separación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina, para determinar pesos moleculares de proteínas y para

investigación.

El Isoelectroenfoque se utiliza para el estudio de las inmunoglobulinas y para estudiar algunos isoenzmas.

3.5 ASPECTOS PRÁCTICOS

- **Problemas con el tampón:** El tampón se contamina muy fácilmente y, para evitarlo, se debe guardar refrigerado. Si el volumen de tampón utilizado es pequeño se deberá desechar, mientras que si es grande se deberá guardar en una botella a 4ºC.
- **Fuente de alimentación y cubetas:**
    - La cubeta debe estar en posición horizontal con los dos receptáculos de tampón nivelados y llenos por igual.
    - Los dos extremos del puente salino deben estar bien impregnados en tampón.
    - Las cubetas se deben mantener limpias y siempre tapadas.
        - **Aplicación de la muestra:** Los aplicadores deben estar perfectamente limpios antes de cada uso y hay que respetar la cantidad de muestra de la técnica indicada.
        - **Voltaje y calentamiento:** Si se incrementa el voltaje se incrementa la movilidad de las partículas pero se genera un calentamiento. Este calentamiento puede traer como efecto no deseado la aparición de bandas arqueadas debido a la desecación de los bordes de la tira que

hace que en ellos la movilidad sea más lenta.

◊ **Tinción y lectura:** La tira debe tener un fondo transparente y uniforme, para poderla leer por fotodensitometría.

4. CROMATOGRAFÍA

4.1 PRINCIPIOS GENERALES

Es un método de análisis en el cual, una fase móvil (gas o líquido), que contiene la muestra provoca la separación de sus componentes mediante la distribución diferencial entre esta fase y una fase estacionaria (sólida o líquida). De esta forma, un compuesto que tenga más afinidad que otro por la fase estacionaria se retrasará en su avance a través de ésta, mientras que el que tiene poca afinidad la atravesará antes.

4.2 CLASIFICACIÓN

- Según las características físicas de las fases móvil y estacionaria
  - ♦ Móvil: Líquida ó Gaseosa
  - ♦ Estacionaria: Sólida ó Líquida
- Según el mecanismo físico que lleva a la separación de los solutos:
- Adsorción
- Partición
- Intercambio iónico
- Afinidad
- Exclusión molecular
- Según la forma física de los sistemas:
- En columna
- En soportes planos

CROMATOGRAFÍA

LÍQUIDA GASEOSA

SÓLIDA LÍQUIDA SÓLIDA LÍQUIDA

(L / S) (L / L) (G / S) (G / L)

Mecanismos Mecanismo Mecanismo

Mecanismo

- Exclusión Molecular Partición Adsorción Partición
- Adsorción
- Intercambio iónico

La cromatografía de gases se lleva a cabo siempre en columna.

La cromatografía líquida se puede llevar a cabo en soporte plano o en columna.

4.3 FORMAS DE CROMATOGRAFÍA

Cromatografía en papel:

- Características Físicas de las fases: L / L
- Mecanismo: Partición, que es un proceso por el cual un soluto se distribuye entre dos fases inmiscibles.
- Soporte: plano. Consiste en una hoja de papel de celulosa
- Fase estacionaria: constituida por la hoja de papel recubierta de una capa de agua.
- Fase móvil: Es líquida y está formada por solventes cuya polaridad se elige según la naturaleza de los componentes a separar.

Como la fase estacionaria es agua, las partículas de mayor polaridad se retendrán más en la fase estacionaria y las de menor polaridad se moverán más.

- Técnica general:
- Aplicación de la muestra: se hace sobre el papel, en un extremo, y se espera a que se seque.
- Se introduce el soporte en la cámara, que es una cubeta que contiene el solvente, en posición vertical, de manera que el solvente podrá atravesarlo por capilaridad en sentido ascendente o descendente, arrastrando a su paso los componentes de la muestra.
- Separación de los componentes de la mezcla en función de su reparto entre las dos fases. Cuando el

solvente ha alcanzado el frente del papel se quita el papel de la cámara y se deja secar.

- Detección: Las sustancias separadas se detectan por distintos procedimientos físicos o químicos según la naturaleza de las sustancias. Se obtiene un cromatograma que es una serie de bandas separadas o zonas detectadas ya sea visualmente o indirectamente.
- Se puede hacer una determinación bidimensional girando el papel 90º y ejecutando una segunda cromatografía.

Cromatografía en capa fina
(08/11/01)

- Características físicas de las fases: L / S
- Mecanismo: Adsorción, que es un proceso por el cual una sustancia se adhiere a otra a causa de las fuerzas de atracción de los átomos de las superficies de ambas.
- Soporte: Plano. Consiste en una capa muy fina de partículas situadas sobre una superficie de vidrio. Este soporte constituye la fase estacionaria.

· Fase Móvil: Es líquida y está formada por solventes de polaridad adecuada.

Cromatografía en Columna

LÍQUIDA GASEOSA

LÍQDA / LÍQDA LÍQDA / SÓLIDA GAS / LÍQDA GAS / SÓLIDA

Partición Adsorción Partición Adsorción

Las columnas están formadas por un tubo de longitud y ancho variables que llevan en su interior un soporte sólido o bien puede ir asociado a un líquido, que serían la fase estacionaria.

La fase móvil es un solvente en la cromatografía líquida o un gas en la cromatografía gaseosa. La muestra se introduce en la fase móvil.

Una vez separadas las sustancias, éstas salen por elución, que es la separación de cuerpos adsorbidos, por lavados progresivos. Se efectúan lecturas sobre el eluido obteniéndose un registro en el cual, los distintos componentes se detectan en forma de picos de distinta altura y anchura.

En la actualidad se emplean 2 tipos fundamentales de cromatografía:

- **HPLC:** Es la cromatografía líquida de alta resolución. Realiza separaciones en tiempos cortos.

Esquema. Cromatografía liquida en columna.

- **Cromatografía de gases:** La fase móvil es un gas que proviene de un tanque a

presión. En el gas se inyecta la muestra y, la mezcla pasa por la columna, que se encuentra incluida en un sistema calefactor, que tiene como misión volatilizar la muestra.

4.4 FUNDAMENTOS DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

◊ **Coeficiente de Distribución (Kd):** Es la relación entre la concentración de soluto en la fase estacionaria y la concentración de soluto en la fase móvil.

El valor de la Kd muestra la afinidad del soluto por las distintas fases. Cuanto mayor sea Kd mayor es la proporción de soluto retenido en la fase estacionaria.

◊ **Relación al frente del solvente (Rf):** En la cromatografía en placas (papel o capa fina) Rf es la relación entre la distancia desde el punto de aplicación de la muestra a la mancha (dm) y la distancia desde el punto de aplicación al frente del solvente (ds).

◊ **Volumen de retención (Vr):** Es el volumen de elusión en el cual sale un compuesto de interés. (Vm es el volumen de la fase móvil para eluir un compuesto sin afinidad por la fase

estacionaria. Por lo tanto, a mayor Kd de un soluto, mayor será su Vr)

◊ **Tiempo de Retención (tr):** El tiempo de retención para un soluto dado será el tiempo en el que éste sale eluido. Está relacionado con el volumen de retención según la siguiente fórmula:

F = flujo de la elusión, es decir, la velocidad en mL/min de la elusión.

◊ **Selectividad ( ):** Es la relación entre los coeficientes de distribución de dos solutos (A, B) en estudio. Para estudiar dos sustancias nos interesa que sea lo mayor posible, habitualmente mayor de 1.

◊ **Resolución (R):** Es la capacidad para separar sustancias lo mejor posible. En los cromatogramas se mide:

◊ Las distancias a las que aparecen los picos desde un punto de referencia, que suele ser la respuesta del detector (d1 , d2 , ...)

◊ El ancho de la base de cada pico. Se miden en las misma unidades de las distancias (a1 , a2 ,...)

Las distancias pueden ser medidas como tiempos de aparición de la sustancia (tiempo al que aparece el máximo del pico), como volúmenes de retención ó como distancias en medidas de longitud.

Se requiere un valor de R " 1,25 para considerar que una separación cromatográfica es buena. Si R " 0,4, la forma del pico no mostrará claramente la presencia de dos componentes.

4.5
MECANISMOS DE SEPARACIÓN
(09/11/01)

Características físicas de las fases:
L / S

Mecanismo: el fundamento de la separación de las sustancias está en las diferencias entre el signo y la magnitud de sus cargas eléctricas.

Fase estacionaria: Es una resina de intercambio iónico, es decir, que tiene grupos cargados. Puede ser resina de intercambio aniónico si la carga de la resina es positiva y, por lo tanto, separa aniones (carga−), ó puede ser de intercambio catiónico si la carga de la resina es negativa y separará cationes (carga+).

Intercambio aniónico (M−R+) + F− ___! M− + (R+F−)

Intercambio catiónico (M+R−) + F+ ___! M+ + (R−F+)

Siendo: R = resina

M = iones de la muestra

F = iones del flujo de la fase móvil

Fase móvil: es un líquido.

Cuando se produce el paso de la fase móvil a través de la

fase estacionaria los iones de la muestra compiten con los iones de la fase móvil por los sitios de unión en la resina (fase estacionaria). De manera que, aquellos que tienen mayor fuerza de unión, son más retenidos y saldrán más tarde de la columna.

La fuerza de unión con la fase estacionaria se puede modificar cambiando el pH. Por esta circunstancia, cuando se quiere terminar el proceso se puede cambiar el pH y eluir la muestra que fue más retenida.

Características físicas de las fases: L / S. Se utiliza para averiguar pesos moleculares, para separar inmunoglobulinas, etc.

Mecanismo: El fundamento de la separación se basa en el tamaño molecular. La separación se lleva a cabo por exclusión molecular: la solución con las

sustancias que queremos separar se introduce en la columna de tal forma que las sustancias de tamaño mayor que el poro pasan sin ser retenidas, y las sustancias con un tamaño menor que el poro quedan retenidas en el gel eluyéndose más tarde.

Fase estacionaria: Es un gel que tiene poros que son de un tamaño determinado. Los geles utilizados son muy variados. El más conocido es el SEPHADEX.

UT.7
ANALIZADORES AUTOMÁTICOS PARA QUÍMICA CLÍNICA

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La Química Clínica hospitalaria inició un cambio hacia principios de los años 60 por dos motivos fundamentales:

- La mecanizació de las determinacio
- La producción industrial de

los reactivos

El primer autoanalizador se utilizó en los años 50 y era un autoanalizador de flujo continuo para la determinación de Glucosa y Nitrógeno Ureico.

◊ **CONCEPTO DE AUTOMATIZACIÓN**

AUTOMATIZACIÓN

Se aplica a aquellos procesos donde el instrumento lleva a cabo una serie de test con un mínimo de intervención de los técnicos. En el LDC los aparatos son regulados por los operarios, por lo tanto, se debería hablar se mecanización y no de automatización.

ANALIZADOR AUTOMÁTICO

Es un aparato que mecaniza las diferentes etapas del análisis de la muestra.

VENTAJAS DEL AUTOANALIZADOR

- Elim el facto hum en etap repe y

delic
del
anál

- Aum
la
prec
y
la
exac
de
los
resu

- Son
de
cost
alto
pero
se
com
con
el
ahor
de
pers
y
reac

- **ETA**
DEI
ANA
DE
UNA
MU