

METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

OBJETIVOS

- Resignificar los fundamentos teóricos y las aplicaciones de la espectrofotometría.
- Comprender las propiedades que deben reunir los métodos de análisis en química clínica.
- Adquirir destreza en el manejo del espectrofotómetro.
- Valorar la importancia del dominio de técnicas auxiliares para poderlas aplicar con criterio ante los problemas planteados.

INTRODUCCION

Espectroscopía: conjunto de todas las técnicas instrumentales basadas en la absorción y emisión de la radiación electromagnética (REM)

Espectrofotometría: método instrumental de análisis para medir la absorción de radiación ultravioleta y visible que interactúa con la materia (átomos y moléculas), técnica considerada como cuantitativa basándose en la medición del color o de la longitud de onda de una radiación e intensidad de la misma.

Cómo medir la radiación emitida o la radiación absorbida por los cuerpos?

Un instrumento capaz de obtener el espectro de una radiación, es decir, de separar la radiación en sus componentes, se llama un **espectroscopio**. Si el aparato es capaz de fotografiarla se llama un **espectrógrafo** y si es capaz de medirla diremos que se trata de un **espectrómetro**. Cuando es capaz de medir también la intensidad de la radiación, se llama **espectrofotómetro**.

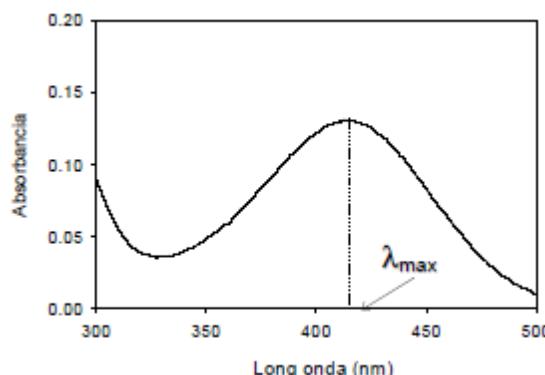
Si la especie química a medir absorbe en el visible, y la disolución tiene color, la técnica se llama vulgarmente **colorimetría** y los aparatos utilizados se llaman **colorímetros o fotocolorímetros**.

En muchos casos la especie estudiada no absorbe en el VIS-UV pero sí un complejo formado con otro compuesto. Ej. el ion fosfato no absorbe en el VIS pero forma un complejo con el ion molibdato y el vanadato (fosfomolibdovanadato) que tiene una gran intensidad de absorción a 430 nm (azul) y se emplea para análisis de fósforo en aguas, suelos, etc. En estos casos la determinación espectrofotométrica no es directa, sino que previamente se hace reaccionar la muestra con unos reactivos adecuados (**reacción colorimétrica**) y posteriormente se mide la absorbancia de la mezcla.

ESPECTRO DE ABSORCION

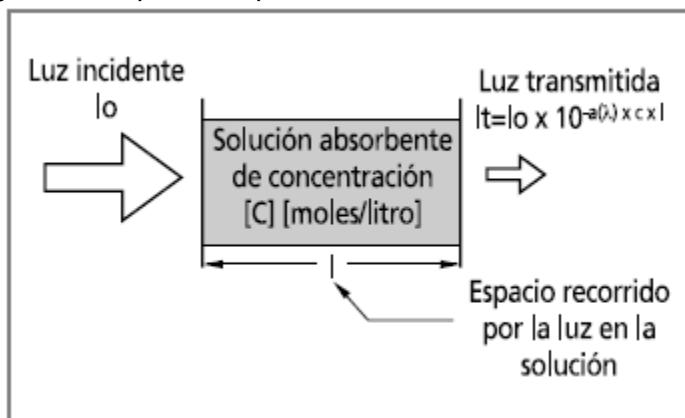
Las soluciones absorben energía preferentemente en una ó más regiones del espectro electromagnético, siendo la absorción inferior o nula en las demás regiones. Se denomina **Espectro de absorción** a la representación gráfica de la probabilidad de absorción en función de la longitud de onda. El espectro de absorción se determina midiendo la absorbancia a distintas longitudes de onda para establecer la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}).

En el siguiente ejemplo, la λ_{max} es aproximadamente 420nm (indicada por la flecha).



LEY DE LAMBERT Y BEER

El siguiente esquema explica el fenómeno de la absorbancia (A):



La Ley de Lambert y Beer se puede resumir según la siguiente expresión:

$$\log Io / I = A = a \times c \times b$$

Demostrando que la concentración de moléculas absorbentes de luz en la muestra es proporcional a la absorbancia de la muestra.

Cuando el paso óptico está expresado en cm y la concentración en molaridad (M), la absorbtividad se denomina "coeficiente de extinción molar o absorbtividad molar" (ϵ) y sus unidades son $M^{-1}cm^{-1}$.

Cuando $b = 1$ cm la absorbancia se denomina Densidad óptica (DO).

$$DO = A = \epsilon \times l \times C$$

donde:

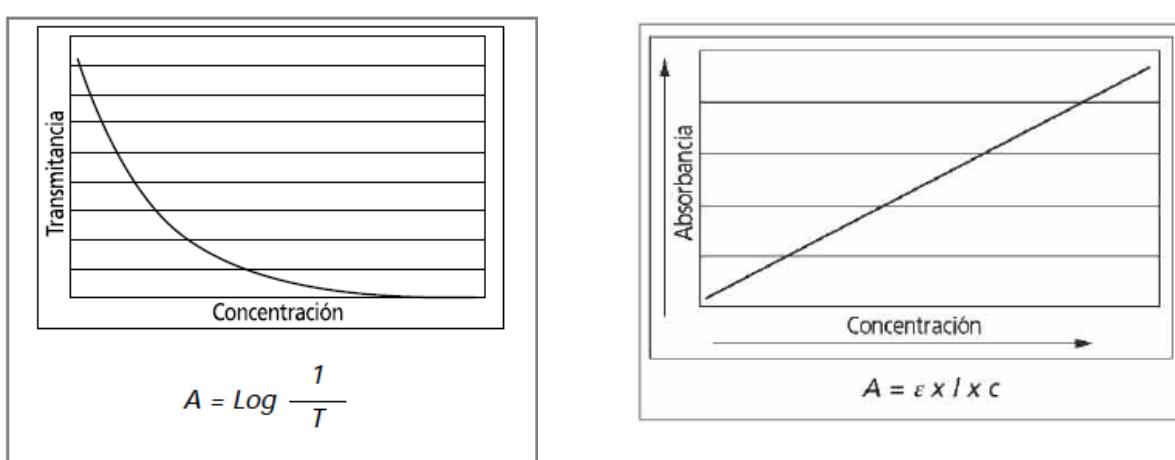
A = absorbancia medida

ϵ = coeficiente de absorbtividad molar (litros/moles/cm)

l = distancia de la trayectoria recorrida por la luz dentro de la muestra (1 cm)

C = concentración de la muestra [moles/litros]

Las curvas que se presentan a continuación muestran cómo varía la absorbancia (A) y la transmitancia (T) en función de la concentración (C), de acuerdo con la ley de Lambert y Beer, en la que se basa la espectrofotometría.



Como conclusión puede inferirse que, a medida que aumenta la concentración de una sustancia, la transmitancia disminuye y que, al aumentar la concentración de la sustancia, aumenta la absorbancia.

La mayoría de los problemas analíticos reales comienzan con una compleja mezcla a partir de la cual es necesario aislar, identificar y cuantificar uno o más componentes de la misma.

Se pueden plantear las siguientes cuestiones:

- de carácter cualitativo: ¿de qué componente se trata?
- de carácter cuantitativo: ¿cuánto hay de ese componente?

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE SOLUTO EN UNA SOLUCION

Dadas una disolución de concentración desconocida a la que llamaremos “**problema**” y otra disolución de concentración conocida a la que llamaremos “**testigo**”, aplicando la ley de Lambert y Beer a cada disolución se obtienen las siguientes expresiones:

$$A_p = a \times b \times C_p \quad A_t = a \times b \times C_t$$

Dado que el “problema” y el “testigo” son disoluciones de una misma sustancia cuyos valores de absorbancia se determinan a la misma λ , los valores de absorvidad serán iguales. Además, dado que se utiliza la misma cubeta para medir la A, los valores de b también serán iguales.

En consecuencia, dividiendo m.a.m.:

$$\frac{A_p}{A_t} = \frac{a \times b \times C_p}{a \times b \times C_t}$$

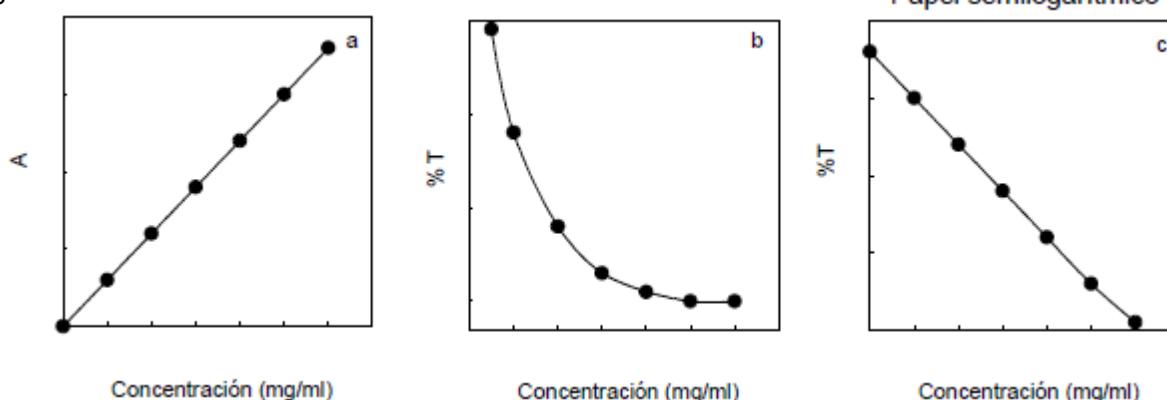
podemos simplificar a y b, y al despejar queda: $C_p = \frac{C_t \times A_p}{A_t}$

donde: A_p = absorbancia del problema. C_p = concentración del problema.
 A_t = absorbancia del testigo. C_t = concentración del testigo.

CURVA DE CALIBRACION

Una **curva de calibración** es un gráfico de A o %T en función de la concentración de soluto; su empleo es necesario en los trabajos cuantitativos en los que hay que calcular la concentración del absorbente.

Fig. 1



En general se grafica A en función de la concentración (Fig.1a) pero, hay instrumentos que sólo miden %T (Fig.1b). En éste caso, deben transformarse las lecturas de %T en valores de A, mediante el empleo de la ecuación $A = 2 - \log (% T)$.

Alternativamente, puede trazarse el gráfico de %T en función de la concentración en papel semilogarítmico (Fig.1c). De otro modo, resultaría difícil utilizando un número limitado de puntos obtenidos experimentalmente, comprobar gráficamente si la lectura sigue o no la ley de Lambert y Beer.

La linealidad de la ley de Lambert Beer se ve afectada, si se presentan las siguientes condiciones:

1. Corrimientos en el equilibrio químico de la muestra como una función de la concentración.
2. Desviaciones en los coeficientes de absorvidad, concentraciones mayores de 0,01 M debido a la interacción electrostática entre moléculas cercanas.
3. Cambios en el índice de refracción a altas concentraciones del analito.
4. Difusión de la luz debido a partículas en la muestra.
5. Fluorescencia o fosforescencia de la muestra.
6. Radiación no monocromática.

MEDICION DE LA ABSORBANCIA

- 1) Para conocer la concentración de un analito en el suero de un paciente colocamos una alícuota del mismo en un tubo al que denominaremos **tubo problema** y agregamos reactivo de trabajo. Podemos conocer dicha concentración midiendo la absorbancia en el fotocolorímetro o espectrofotómetro a una longitud de onda apropiada.
- 2) Previamente a la lectura, el aparato es llevado a cero de absorbancia con un tubo que contiene reactivo de trabajo sin la sustancia problema y se denomina **blanco de reactivos**. La finalidad de usar el tubo blanco es descontar la absorción de sustancias que no sean específicamente el analito en estudio.
- 3) Un tercer tubo que denominamos **testigo o estándar** corresponde a una solución de concentración conocida de la sustancia en estudio. Se lee al fotocolorímetro, llevado previamente a cero de absorbancia con el blanco, de la misma forma que se hizo con el tubo problema.
- 4) La concentración del tubo problema se puede calcular mediante la comparación con un testigo o la interpolación del valor de absorbancia en una curva de calibración, para lo cual es necesario la preparación de varios tubos testigos de diferente concentración.
- 5) Lo descripto en los puntos anteriores es válido para medir la concentración de sustancias incoloras siempre que estas sustancias sean capaces de reaccionar con otras, dando productos de reacción coloreados y que el color finalmente obtenido sea proporcional a la concentración de la sustancia en estudio. El tubo blanco, el cual no contiene la sustancia que desarrolla color, deberá ser tratado de forma similar al tubo problema y a los testigos, es decir tendrá los mismos reactivos y se los procesará de forma similar y paralela a los otros tubos. Hay sustancias incoloras que tienen la propiedad de absorber la luz ultravioleta; en estos casos pueden ser cuantificadas sin tratamiento previo, midiendo la absorbancia a una λ comprendida entre 200 y 400 nm (correspondiente al rango de luz ultravioleta).

Aplicar estos conceptos teóricos a la determinación de glucosa en plasma utilizando un método enzimático colorimétrico

ENZIMAS

Estas proteínas actúan como catalizadores biológicos, para que muchas reacciones metabólicas puedan transcurrir en condiciones fisiológicas. Como tales, se hallan en cantidades mínimas dificultando su cuantificación con métodos químicos directos como los utilizados para otros analitos en análisis clínicos. Debido a esto, se desarrollaron métodos basados en su función, es decir su capacidad de acelerar la reacción donde un sustrato se convierte en producto, denominada actividad enzimática.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La **actividad de una enzima** es la cantidad de sustrato convertida en producto por unidad de tiempo, para una reacción particular y en determinadas condiciones. Se puede expresar en términos de unidad de enzima o **unidad internacional (UI)**. La UI (recomendada por la Unión Internacional de Bioquímica) de cualquier enzima es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato en un minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$). El Sistema Internacional de Unidades (SI) adoptado originalmente por la OMS estableció el **katal** definido como un mol de sustrato transformado por segundo. $1 \text{ UI} = 16,7 \text{ nK}$.

La **actividad específica** es el número de unidades internacionales de enzima por miligramo de proteína ($\text{UI}/\text{mg de proteína}$).

Método continuo para la determinación de actividad enzimática

Los métodos utilizados para determinar las actividades enzimáticas pueden ser de dos tipos: los métodos de **Punto Final** (habitualmente llamados "colorimétricos") y los métodos **Continuos** (habitualmente llamados "cinéticos").

Un **método continuo** para la determinación de la actividad de una enzima consiste en la lectura de muchos puntos de datos primarios (podría ser absorbancia o fluorescencia) durante el tiempo que dura la determinación. Si el sustrato o producto de la reacción no presentan absorbancia o fluorescencia fácilmente detectable se emplean reacciones acopladas a la reacción enzimática a determinar. Se utiliza el producto de la reacción como sustrato de una segunda reacción "acoplada" que producirá un cambio que se puede monitorear fácilmente en un espectrofotómetro. A menudo la reacción acoplada también está catalizada por una enzima. Esta reacción no debe ser limitante de la velocidad, lo que se logra agregando una gran cantidad de la enzima que cataliza la reacción acoplada, para que todo el producto formado por la primera reacción sea consumido en la reacción acoplada inmediatamente después de su formación.

En la mayoría de los casos las reacciones enzimáticas se acoplan a una segunda reacción en la que interviene una enzima que tiene como cofactor al NAD^+ o al NADH . Como resultado de estas reacciones acopladas la concentración de NADH irá disminuyendo o aumentando en función del tiempo, en forma proporcional a la aparición del producto de la primera reacción.



El cofactor tiene un espectro de absorción diferente en su forma oxidada (NAD^+) o en su forma reducida (NADH) (ver Figura 8). La concentración de NADH se puede determinar espectrofotométricamente siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm.

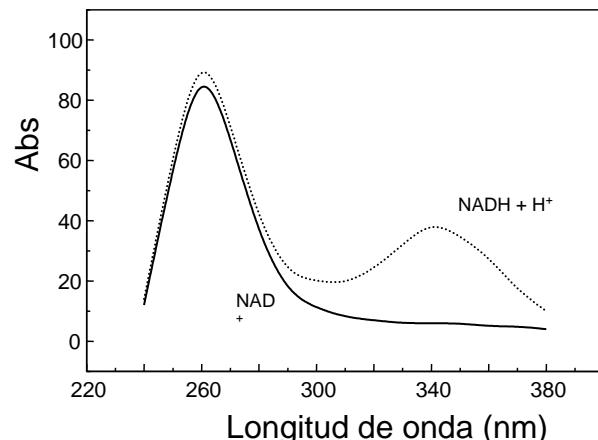


Figura 8. Espectro de absorción del NAD^+ y NADH .

Utilizando el método espectrofotométrico, en general se supone que a 340 nm el NADH posee un coeficiente de absorción molar $\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ y si $b = 1 \text{ cm}$ para una reacción que cumple la ley de L-B, tenemos:

$$C = \frac{10^3}{6,22} A$$

Teniendo en cuenta la definición de la actividad enzimática como la variación del sustrato en función del tiempo y considerando la dilución que sufre la muestra en los reactivos, nos queda:

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{10^3}{6,22} \times \frac{V_t}{V_m}$$

Donde vemos que determinando el cambio de absorbancia en intervalos de tiempo es posible calcular el número de micromoles, en este caso del NADH, formado o consumido.

Podemos considerar lo constante como factor, quedando:

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = f \times \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

$$f = \frac{10^3}{6,22} \times \frac{V_t}{V_m}$$

Aplicar estos conceptos teóricos a la determinación de LDH en plasma utilizando un método cinético.

EJERCICIOS DE APLICACION

- 1) Calcule la concentración de glucemia si, ajustando a cero de absorbancia con blanco de reactivos, obtuvo los siguientes resultados:

Absorbancia del testigo = 0,333 para Concentración del testigo = 100 mg/dl

Absorbancia de la muestra en la solución coloreada final = 0,440

- 2) Segundo la información provista por el fabricante del método para determinar urea en líquidos biológicos (buscar el inserto en el vademécum de Wiener), responda:

Utilizando un espectrofotómetro de sensibilidad fotométrica comprobada y dado el intervalo de referencia para urea en sangre, la sensibilidad analítica es suficiente?

Si obtiene una lectura de absorbancia de la muestra = 0.730 y absorbancia del blanco = 0.050, supera el límite de linealidad?

- 3) Calcule la actividad de LDH según: Δtiempo= 10 seg., λ: 340 nm

Abs.: 1,161 – 1,151 – 1,140 – 1,131 – 1,121 – 1,112 – 1,103 – 1,093 – 1,082

Vol. Reactivos: 1,0 ml

Vol. Muestra: 100 μl

Vol. Total: 1,0 + 0,1 = 1,1 ml

εNADH(340 nm): 6,3 cm²/μmol.

- 4) Se determinó AMILASA en orina de 24 hs. por método cinético a 405 nm (Bencilideno pNO₂fenil maltoheptaósido). Calcular la actividad sabiendo que: Δt = 10 seg.; ε: 9,49 cm²/μmol

Abs.: 0,474 – 0,491 – 0,514 – 0,540 – 0,565 – 0,590 – 0,616 – 0,643 – 0,669 – 0,696 – 0,723 – 0,749

Vol. Reactivos: 1,0 ml

Vol. Muestra: 0,02 ml