



XXIV Seminario de Ingeniería Biomédica
Núcleo de Ingeniería Biomédica
Facultades de Medicina e Ingeniería
UdelaR

Espectrofotometría en análisis clínicos

Paola Romero

Monografía vinculada a la conferencia del Dr. Horacio Venturino titulada “Robots preanalíticos en el laboratorio clínico” del 10 de marzo de 2015.

e-mail: paoromero.22@gmail.com

Resumen. La automatización modular en el laboratorio clínico es un factor muy importante para lograr una operación confiable, eficiente y libre de errores. Dentro del área analítica pueden encontrarse analizadores que utilizan distintos principios de medición. El foco de este trabajo está el principio de medición denominado espectrofotometría. Es el principio de medición utilizado por la gran mayoría de los instrumentos que analizan sustancias biológicas, son un equipo básico de todo laboratorio. La espectrofotometría se basa en que partir de la cuantificación de la absorción de una muestra, es posible identificar y cuantificar la presencia y concentración de determinada sustancia. La absorción puede ser calculada a partir de la medición de la transmitancia. A su vez, la Ley de Lambert-Beer establece una relación que permite conocer la concentración de la sustancia a partir de la absorbancia. Para realizar la medida se hace incidir sobre la muestra un haz de luz, de forma de obtener un espectro de absorción. El espectro de longitudes de onda requerido por un espectrofotómetro para aplicación clínica va de 320 a 800 nm, abarcando la luz visible y el ultravioleta cercano. En Uruguay, los espectrofotómetros más simples, tienen un precio entre USD1500 y USD3200. Aquellos más complejos, tienen costos que van desde los USD5000 hasta USD12500. Por otro lado, se encontró que existe una forma de construir un espectrofotómetro con fines educativos de muy bajo costo, alrededor de los USD50.

1. Introducción

En el laboratorio clínico se utiliza una gran cantidad de instrumentos, en su mayoría de medición. Dichos instrumentos presentan alto grado de complejidad, combinando varias áreas como óptica, hidráulica, mecánica, electrónica, etc. Además, dado que en su mayoría el objetivo es analizar sustancias biológicas, también se utilizan principios de medición físico-químicos y biológicos. [1]

Las enfermedades provocan cambios en el complejo bioquímico del cuerpo humano, muchos de los cuales pueden detectarse por alteraciones en la concentración de sustancias en los fluidos biológicos. El laboratorio clínico analiza muestras de pacientes para determinar la concentración de los elementos pertinentes con el fin de proporcionar información que facilite la elaboración de un diagnóstico, seguir la evolución, controlar tratamientos y prevenir enfermedades [1]. Debido a esto, se requiere que la operación del laboratorio sea confiable, eficiente y libre de errores. Por otro lado, un laboratorio clínico medio maneja alrededor de 15000 análisis diarios y los resultados deben estar disponibles en un tiempo reducido. Estos factores hacen que sea necesario realizar una automatización en los procesos, tanto en la preparación como en el análisis de las muestras.

La automatización puede ser total o modular. La segunda, es un modelo en el cual la instrumentación se agrupa en módulos de automatización (work-cells), creando áreas físicamente independientes: pre-analítica, analítica y pos-analítica. Dentro del área analítica pueden encontrarse

analizadores que utilizan distintos principios de medición, por ejemplo: Multianalizador Inmunológico (electroquimioluminiscencia), Multianalizador Hematológico (impedanciometría, citometría), Multianalizador de Coagulación (oscilometría, colorimetría) y Co-Oxímetro (espectrofotometría), entre otros.

El foco de este trabajo está en un principio de medición en particular, la espectrofotometría. Es el principio de medición utilizado por la gran mayoría de los instrumentos que analizan sustancias fisiológicas y patológicas del organismo humano [1]. Además, es una de las técnicas más accesibles desde el punto de vista económico, por lo cual los espectrofotómetros son un equipo básico de todo laboratorio [2]. A partir de la espectrofotometría pueden determinarse sustancias que estén presentes incluso en concentraciones bajas en los distintos fluidos biológicos tales como vitaminas, enzimas, fármacos, etc.

2. Principios de espectrofotometría de absorción

Absorción molecular

Cuando una molécula absorbe un fotón, su energía interna aumenta, pasando a un estado excitado. Dicho estado no es estable, por lo que rápidamente retorna al estado basal (fundamental), liberando la energía “absorbida” en forma de radiación electromagnética. La absorción de radiación, produce un paso del estado fundamental al estado excitado, mientras que en el proceso contrario, se produce una liberación de energía [3].

El aumento del nivel energético interno de la molécula produce transiciones que se clasifican en tres tipos: electrónicas, vibracionales y rotacionales. Las radiaciones más energéticas alteran el movimiento orbital de los electrones, mientras que las radiaciones menos energéticas producen cambios en los movimientos de vibración y rotación de la molécula. Éstos son específicos de cada molécula, por lo que se utilizan como técnica de identificación (ver Figura 1). Para esto, se hace incidir radiación electromagnética sobre la sustancia, de forma de obtener un espectro de absorción [3]. A partir de éste, es posible identificar y cuantificar la presencia de la sustancia. Así, la medición de la absorbancia lumínica a determinadas longitudes de onda (λ), permite conocer la concentración de una sustancia [1].

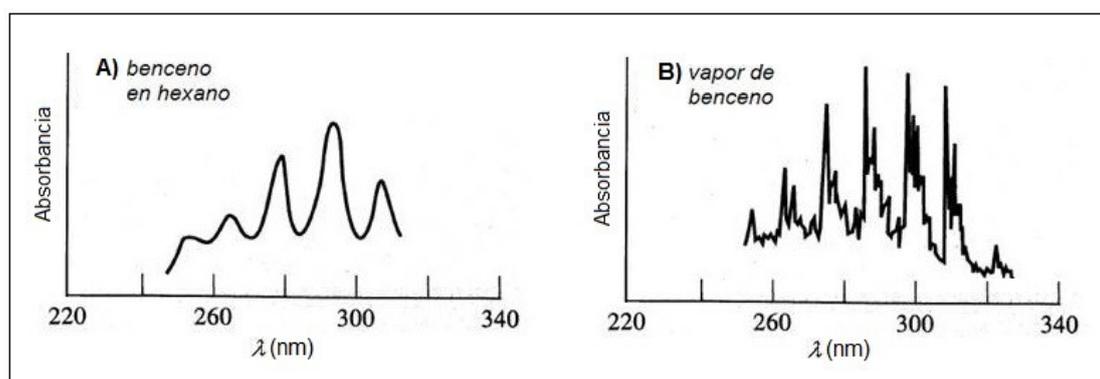


Figura 1. Espectros de absorción característicos: benceno en hexano (A) y vapor de benceno (B)
Imagen extraída de [1]

Cuantificación

Usualmente, se hace incidir luz monocromática de λ apropiada. La longitud de onda cuya luz no es absorbida determina el color de la muestra (en el caso de trabajar en el rango visible). La absorción no puede medirse directamente, sino que debe deducirse a partir de la transmitancia [1]. Se define la transmitancia como la relación entre la luz transmitida y la luz incidente. Si la potencia radiante que incide sobre la disolución es P_0 y la potencia radiante que “sale” es P , entonces la transmitancia (T), puede ser calculada a partir de la ecuación (1).

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

En general, la transmitancia se expresa porcentualmente. Cuanto mayor es la concentración de la sustancia a medir, menos luz atraviesa la sustancia, mayor es la absorción y, por lo tanto, mayor la intensidad del color percibido. La relación resultante entre la absorbancia (A) y la transmitancia (T) se define según la ecuación (2).

$$A = -\log(T) = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) \quad (2)$$

Existe una relación de proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración de la sustancia y, entre la absorbancia y el espesor de la muestra. Ésta relación está dada por la Ley de Lambert-Beer (ver ecuación (3)). Dicha ley fue descubierta independientemente y de diferentes maneras por Pierre Bouguer (1729), Johann H. Lambert (1760) y August Beer (1852) [4].

$$A = \epsilon c d \quad (3)$$

En la ecuación (3) ϵ es el coeficiente de absorción molar específico de la sustancia a la longitud de onda que se mide, c es la concentración y d es el espesor de la muestra (determinado por la cubeta). La relación entre la concentración, la transmitancia y la absorbancia se puede visualizar en la figura 2.

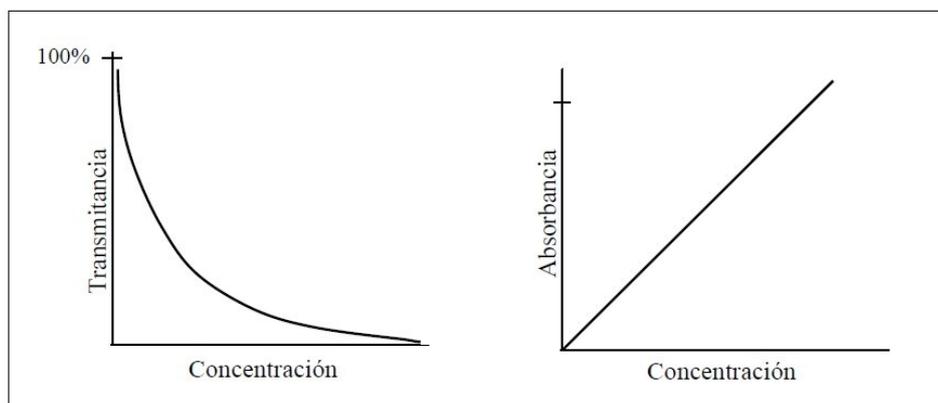


Figura 2. Relación entre concentración, transmitancia y absorbancia.
Imagen extraída de [1]

Consideraciones

La medida realizada corresponde a la suma de la sustancia y la matriz. Por lo general, los picos de absorción están bien definidos, pero distorsionados por un fondo. El fondo corresponde a la absorbancia exhibida por la matriz (reactivos y cubeta). Para cancelar este efecto, antes de medir la absorbancia de la muestra, se mide la absorbancia de la cubeta con agua. A esta medida se le denomina “blanco” y es restada a la medida de absorbancia de la muestra [2].

El espectro de longitudes de onda requerido por un espectrofotómetro para aplicación clínica va de 320 a 800 nm, abarcando la luz visible y el ultravioleta cercano. Algunos equipos tienen monocromadores que cubren el espectro de forma continua. Sin embargo, la mayoría tienen entre 8 y 15 longitudes de onda discretas que corresponden a las que se necesitan para medir sustancias biológicas [1].

3. Espectrofotómetro

Componentes de un espectrofotómetro

El espectrofotómetro tiene una fuente de luz policromática. La más utilizada es la lámpara halógena (15-25 W de potencia, 6 a 12 V alimentación), que cubre el espectro visible y parte del ultravioleta (UV) e infrarrojo cercano (300 a 800 nm). Otras fuentes de luz menos utilizadas son las lámparas de deuterio y de hidrógeno, que permiten cubrir a partir de los 190 nm y las lámparas de Xenón que presentan una gran potencia de emisión en el rango UV. Cuando se requieren unas pocas longitudes de onda, se utilizan LEDs de λ específicos [1].

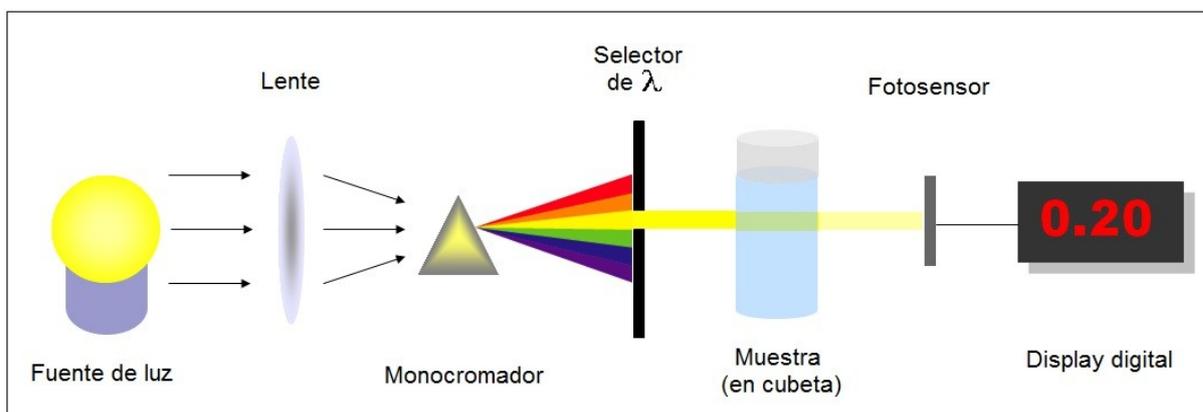


Figura 3. Esquema general de un espectrofotómetro.
Imagen modificada, ilustrada por Heesung Shim ¹.

A continuación se presenta un breve punteo de los componentes del espectrofotómetro [1].

Monocromador: tiene como objetivo aislar la luz policromática, para luego seleccionar la λ a utilizar. En su forma más simple consiste en una serie de filtros seleccionables de cristal o gel coloreado que se interponen entre la fuente de luz y la cubeta. Otro método para seleccionar λ , es utilizar un prisma para dispersar la luz y sensar la de interés. Después del prisma hay una superficie de aluminio o vidrio con surcos paralelos equiespaciados (600 a 2000 surcos/mm). Se obtienen haces de luz monocromática a partir del fenómeno de interferencia.

Cubeta: recipiente donde se coloca la muestra a analizar, sus paredes deben tener una alta transmitancia en el espectro requerido.

Fotosensores: son los transductores que reciben la luz transmitida. Generalmente, se utilizan fotodiodos o conjuntos CCDs (Charge Coupled Devices) y fotomultiplicadores en caso de que se requiera mucha sensibilidad.

Registrador: la señal del fotosensor es una corriente o un voltaje de continua proporcional a la transmitancia. Como lo que interesa es la absorbancia, se introduce la señal del sensor a un

¹ Imagen original extraída de http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry

amplificador con transferencia antilogarítmica. La salida de este amplificador se introduce en un conversor A/D que realiza el procesamiento de la información de forma digital.

El espectrofotómetro en el mercado

En Uruguay, los espectrofotómetros más simples, que trabajan en el rango de luz visible y a longitudes de onda discreta, tienen un precio entre USD1500 y USD3200. Aquellos más complejos, que trabajan en los rangos de UV y visible, pero además realizan barridos espectrales y grafican, tienen costos que van desde los USD5000 hasta USD12500. Esta información fue proporcionada por la empresa BIRIDEN.

Por otro lado, Forbes y Nöthling [5], presentan una forma novedosa de construir un espectrofotómetro de muy bajo costo bajo el concepto “build your own” llamado SpecUP. Éste tiene fines educativos por lo que no está pensado para que sea un instrumento analítico de alta precisión. Consiste en el uso de un LED, con un prisma delante de una ranura como fuente de luz y una LDR (Light-Dependant Resistor) como detector. Los autores afirman que SpecUP demostró ser lo suficientemente bueno como para determinar concentraciones con un rango de incertidumbre relativamente pequeño. Lo novedoso de este espectrofotómetro “casero” es la relación funcionalidad-precio, teniendo un costo de aproximadamente USD50.

4. Conclusiones

Se tuvo una primera aproximación a la espectrofotometría, principio de medición del espectrofotómetro. Éste, es un instrumento básico usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la concentración en una muestra. El espectrofotómetro hace incidir en la muestra un haz de luz y mide la cantidad de luz absorbida por la misma. Este proceso permite identificar la presencia de una sustancia y cuantificar su concentración en la muestra.

La espectrofotometría es una técnica de gran aplicabilidad dado la cantidad de especies absorbentes existentes. Un aspecto positivo a remarcar es su costo relativamente bajo en relación a la variedad de análisis que pueden realizarse. Además, es una técnica con la cual se pueden obtener resultados en poco tiempo. Se destaca la novedad de la propuesta con fines educativos de Forbes y Nöthling [5] en la que presentan una forma de construir un espectrofotómetro de muy bajo costo con componentes sencillos y accesibles.

5. Agradecimiento

Al Dr. Horacio Venturino, por su amabilidad, dedicación y tiempo brindado.

6. Referencias

- [1] H. Venturino, “Instrumentación del Laboratorio Clínico”, in *Ingeniería Biomédica perspectivas desde el Uruguay*, 1st ed. Montevideo, Uruguay: CEI, 2007, ch. 11, pp. 207-234.
- [2] J. Karpinska, “Basic Principles and Analytical Application of Derivative Spectrophotometry”, in *Macro to nano spectroscopy*, Dr. Jamal Uddin (Ed.), InTech 2012, ch. 13, pp. 253-268.
- [3] D.A. Skoog, F.J. Holler and T.A. Nieman, “Introducción a la espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible”, in *Principios de Análisis Instrumental*, 5th ed. Madrid, España: CFM, 2001, ch. 13-14, pp. 321-376.
- [4] A.A. Bunaciu, V.D. Hoang and H.Y. Aboul-Enein, “Applications of Differential Spectrophotometry in Analytical Chemistry”, in *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2013, Vol. 43, pp.125-130.
- [5] P.B.C. Forbes and J.A. Nöthling, “Shedding light on spectrophotometry: The SpecUP educational spectrophotometer”, *S. Afr. J. Sci.*, 2014, Vol. 110, pp. 49-53.