

Técnico Superior  
en Laboratorio de  
Diagnóstico Clínico  
y Biomédico

# Análisis bioquímico (I)

Coordinadora

*M<sup>a</sup> Teresa Sanz Casla*

ARÁN





# Autores

## Director

### **Julián Sanz Ortega**

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996. Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales. Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

## Coordinadora

### **María Teresa Sanz Casla**

Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid. Cursó la especialidad de Análisis Clínicos en el Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid y se doctoró en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid con la Tesis sobre factores pronóstico en cáncer de mama.

Comenzó a ejercer su labor profesional, después de finalizar el periodo MIR, como Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid, donde continúa trabajando en la actualidad. Como docente ha participado y organizado cursos de formación para Técnicos Especialistas en Laboratorio y ha sido ponente en congresos y cursos sobre su especialidad. Dentro de su labor en el campo de la investigación destacan la dirección de tesis doctorales, la publicación de capítulos de libros y de artículos en revistas nacionales e internacionales, así como su participación en distintos proyectos de investigación.

## **Autores**

### **M.<sup>a</sup> Cruz Cárdenas Fernández**

Facultativo Especialista Análisis Clínicos Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

### **Carmen Cotarelo Pérez**

Facultativo Especialista de Análisis Clínicos. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

### **María Fenollar Cortés**

Facultativo Especialista de Bioquímica Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

### **Elena Hernández Álvarez**

Facultativo Especialista Análisis Clínicos Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

### **Raluca Oancea Ionescu**

Facultativo Especialista de Análisis Clínicos. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

### **Isabel Ortega Madueño**

Facultativo Especialista de Bioquímica Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

### **M.<sup>a</sup> Teresa Sanz Casla**

Facultativo Especialista Análisis Clínicos. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

### **M.<sup>a</sup> Josefa Torrejón Martínez**

Facultativo Especialista Bioquímica Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

# Índice

## Capítulo 1

<b>Aplicación de técnicas utilizadas en el laboratorio de bioquímica clínica ...</b>	15
1. Métodos ópticos. Conceptos básicos .....	16
2. Espectrometría de absorción molecular .....	22
3. Espectrometría de absorción atómica .....	31
4. Espectrometría de emisión atómica .....	34
5. Espectrometría de luminiscencia .....	36
6. Espectrometría de dispersión de la radiación .....	40
7. Fotometría de reflectancia. Química seca .....	43
8. Refractometría de líquidos .....	47
9. Espectrometría de masas .....	49
10. Cromatografía .....	55
11. Osmometría .....	63
12. Automatización .....	65
13. Uso eficiente de los recursos .....	68

## Capítulo 2

<b>Análisis de magnitudes bioquímicas relacionadas con el metabolismo de principios inmediatos .....</b>	79
1. Patrones de alteración del metabolismo hidrocarbonado: determinaciones...	80
2. Patrones de alteración del metabolismo de lípidos y lipoproteínas: determinaciones .....	100

3. Patrones de alteración del metabolismo de proteínas: determinaciones. Separación de proteínas.....	122
--	-----

### Capítulo 3

<b>Análisis de magnitudes bioquímicas relacionadas con los productos finales del metabolismo</b> .....	151
1. Compuestos nitrogenados no proteicos: urea y creatinina. Determinaciones. Aclaramientos .....	152
2. Cuerpos cetónicos .....	164
3. Determinación de bilirrubina total, directa e indirecta.....	168
4. Ácido láctico y pirúvico.....	174
5. Alteraciones del metabolismo de las purinas: determinación de ácido úrico..	181

### Capítulo 4

<b>Determinación de enzimas</b> .....	193
1. Utilidad de la determinación enzimática en el diagnóstico clínico.....	194
2. Enzimas. Fisiología y cinética enzimática. Clasificación de las enzimas. Determinación de la actividad enzimática .....	212
3. Isoenzimas. Determinación.....	225
4. Patrones de alteración enzimática .....	233
<b>Soluciones “Evalúate tú mismo”</b> .....	247

capítulo

I

## APLICACIÓN DE TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

*Isabel Ortega Madueño*

### Sumario

1. Métodos ópticos. Conceptos básicos
2. Espectrometría de absorción molecular
3. Espectrometría de absorción atómica
4. Espectrometría de emisión atómica
5. Espectrometría de luminiscencia
6. Espectrometría de dispersión de la radiación
7. Fotometría de reflectancia. Química seca
8. Refractometría de líquidos
9. Espectrometría de masas
10. Cromatografía
11. Osmometría
12. Automatización
13. Uso eficiente de los recursos

Model 3320  
Osmometer

TECIL

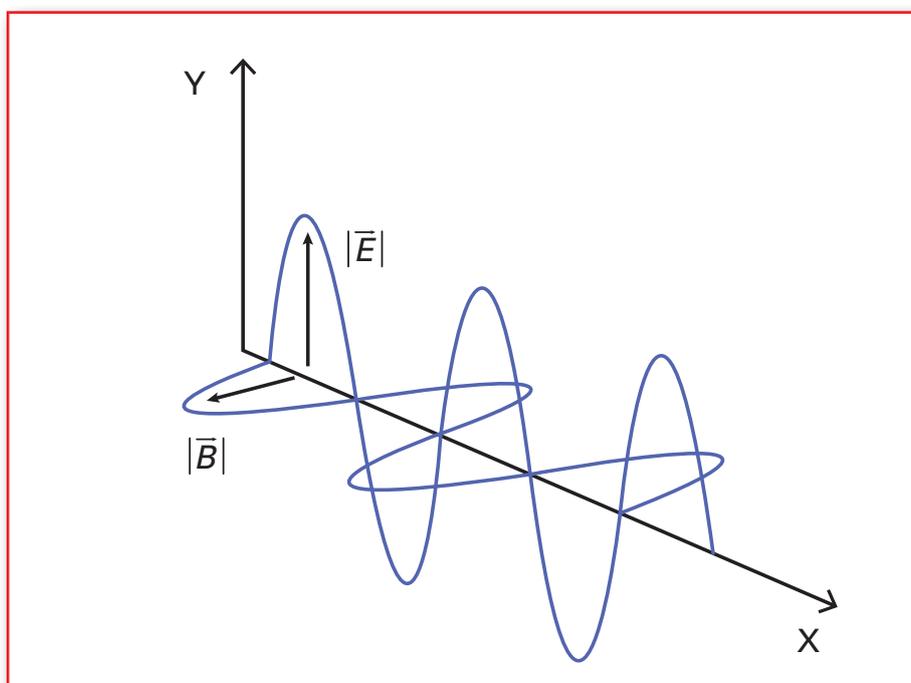


En este capítulo se van a describir una serie de métodos instrumentales utilizados en los laboratorios de análisis para la separación (**cromatografía**), detección y cuantificación (**métodos ópticos**) e identificación (**espectrometría de masas**) de metabolitos y proteínas con interés clínico. También se hablará de la mejora del tiempo de respuesta, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad de los métodos gracias a la **automatización**, así como de la importancia de un uso eficiente de los recursos para sacar el mayor rendimiento a los laboratorios hospitalarios.

## I. MÉTODOS ÓPTICOS. CONCEPTOS BÁSICOS

### I.1. Naturaleza de la luz

La luz se propaga como una onda electromagnética formada por un campo eléctrico  $\vec{E}$  y un campo magnético  $\vec{B}$ , que vibran en direcciones perpendiculares y perpendicularmente a la dirección de propagación (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de una onda electromagnética desplazándose a través del espacio.



#### RECUERDA QUE

La luz está formada por fotones que son partículas que no tienen carga ni masa.

No necesita un medio material para propagarse, siendo su velocidad en el vacío ( $c$ )  $3 \cdot 10^8$  m/s. Viene caracterizada por:



**RECUERDA QUE**

Los métodos ópticos se basan en el estudio de la interacción de la luz con la materia.

dispersados tienen la misma energía que el haz incidente, ya que la dispersión solo afecta a la dirección de propagación de la luz.

» **Reflexión.** Se produce cuando los rayos de luz que llegan a una superficie chocan con ella, se desvían y regresan al medio del que salieron formando un ángulo igual al de la radiación incidente.

Independientemente del tipo de proceso que se quiera estudiar (absorción, emisión, dispersión o reflexión), los **instrumentos** utilizados para estudiar la interacción de la luz con la materia tienen una serie de componentes comunes (Figura 6):

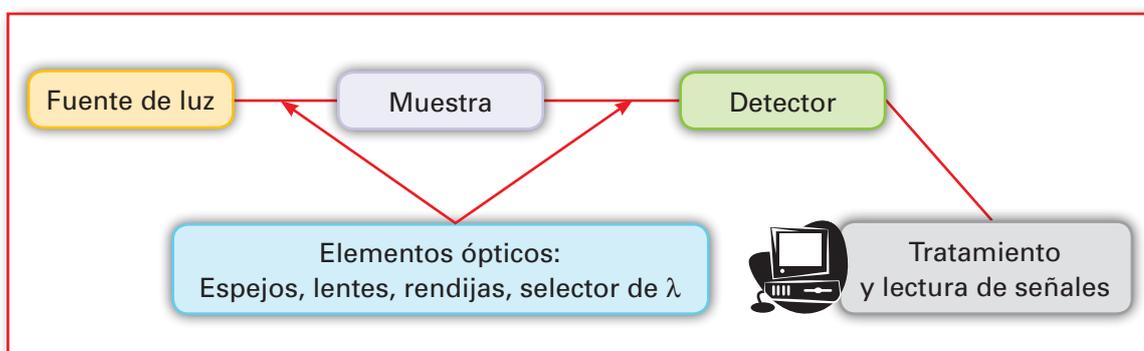


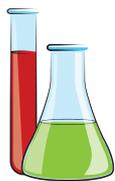
Figura 6. Componentes de los instrumentos utilizados en los métodos ópticos de análisis.

» **Fuente de luz.** Proporciona la luz que va a incidir sobre la muestra. Esta tiene que ser suficientemente intensa y de potencia constante (que no dependa de la fuente de alimentación de la lámpara). Existen diferentes tipos de lámparas según la luz que emiten (Tabla 1).

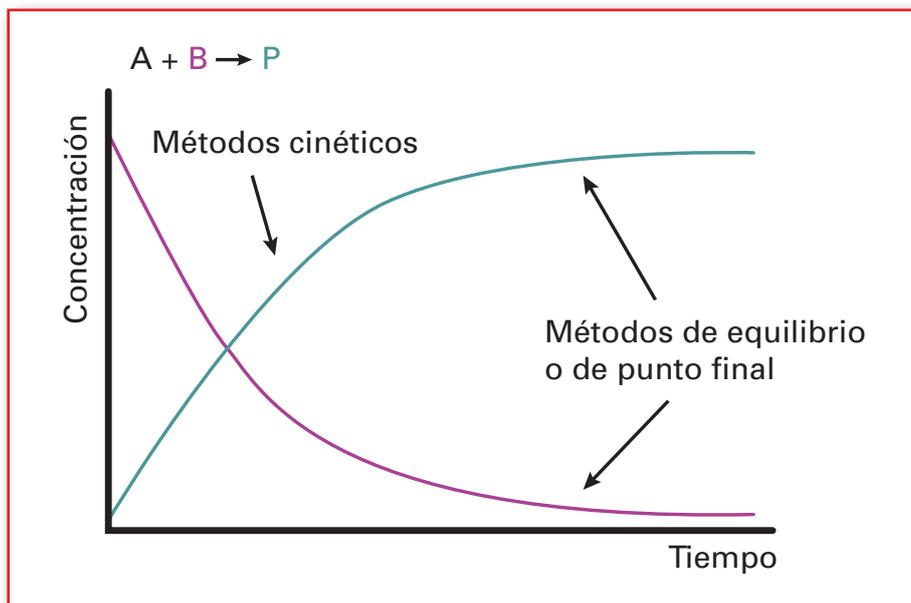
TABLA 1

Fuentes de luz utilizadas en espectroscopia

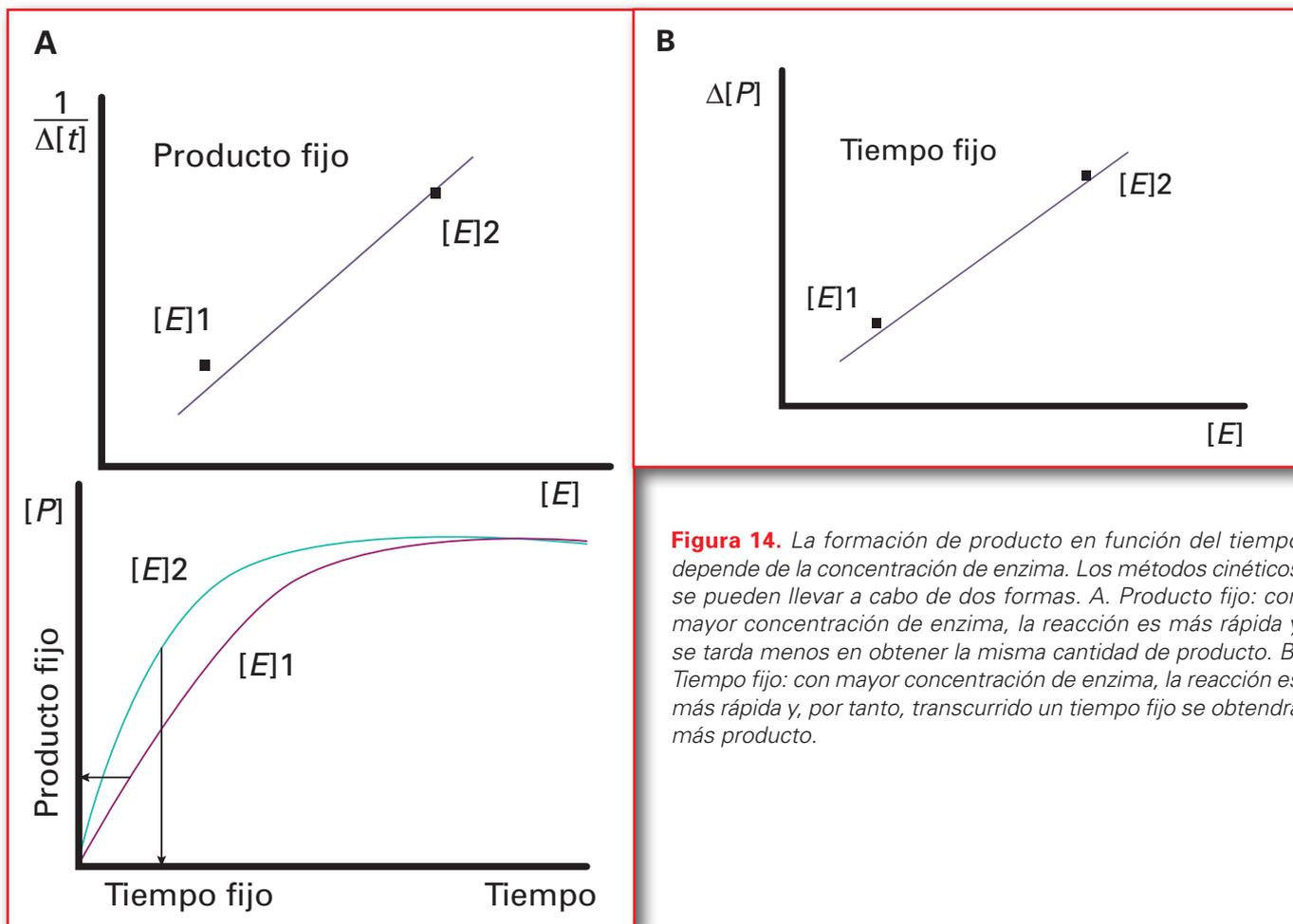
	Fuente	Región de $\lambda$ , nm	Aplicación
<b>Fuentes continuas</b>	Lámpara de Xenon	250-600	Fluorescencia
	Lámpara de H <sub>2</sub> y D <sub>2</sub>	160-380	Absorción molecular UV
	Lámpara de W	350-2200	Absorción molecular VIS
	Lámpara de W y halógeno	240-2500	Absorción molecular UV-VIS
<b>Fuentes de líneas</b>	Lámpara de cátodo hueco	UV-VIS (depende del material del cátodo)	Absorción atómica
	Láser	UV-VIS (depende del material del láser)	Absorción molecular, fluorescencia



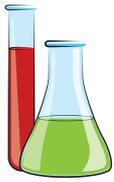
Para que se produzca absorción, la energía de la radiación incidente tiene que ser igual a la diferencia de energía de los niveles electrónicos de la molécula que absorbe.



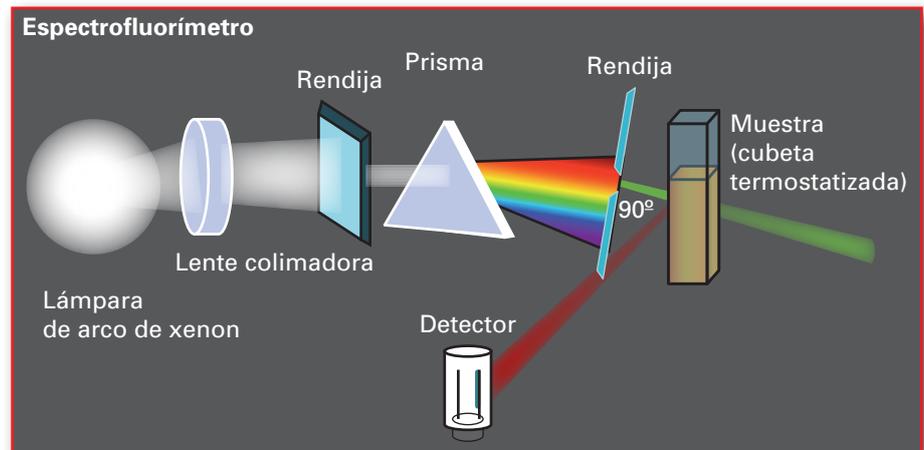
**Figura 13.** Formación de producto en función del tiempo (azul) y desaparición de sustrato en función del tiempo (rosa). En los métodos cinéticos se mide la absorbancia mientras se produce la reacción; en los métodos de equilibrio se mide la absorbancia cuando finaliza la reacción.



**Figura 14.** La formación de producto en función del tiempo depende de la concentración de enzima. Los métodos cinéticos se pueden llevar a cabo de dos formas. A. Producto fijo: con mayor concentración de enzima, la reacción es más rápida y se tarda menos en obtener la misma cantidad de producto. B. Tiempo fijo: con mayor concentración de enzima, la reacción es más rápida y, por tanto, transcurrido un tiempo fijo se obtendrá más producto.



*La instrumentación de la espectrometría de emisión atómica es cara y requiere personal altamente especializado.*



**Figura 20.** Representación esquemática de los elementos más significativos de un espectrofluorímetro.

Básicamente se componen de los mismos elementos que los espectrómetros de absorción molecular, aunque existen algunas diferencias:

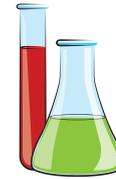
- 】 Fuente de excitación.** Cuando una molécula emite luz lo hace en todas las direcciones. Esto implica que al detector solo le llega una pequeña parte de la emisión total. Por tanto, para tener una señal de fluorescencia aceptable, es necesario excitar el mayor número posible de moléculas. Para ello, los espectrómetros de emisión molecular utilizan lámparas capaces de emitir luz de alta intensidad (**lámpara de arco de xenón**).
- 】 Rendijas.** Son más anchas que en los espectrofotómetros de absorción, ya que se opta por aumentar la intensidad de la radiación a costa de que la banda sea más ancha (menos monocromática).
- 】 Monocromadores.** Se emplean dos monocromadores: uno para seleccionar la  $\lambda$  de excitación (entre la lámpara y la muestra) y otro para seleccionar la  $\lambda$  de emisión (entre la muestra y el detector).
- 】 Detector.** Como no existe una dirección preferente de emisión de fluorescencia, generalmente el detector se coloca a  $90^\circ$  del haz de luz de excitación, para que la radiación transmitida no interfiera en la detección de la luz emitida.
- 】 Cubetas.** Necesariamente las cubetas deben ser rectangulares y tener las cuatro caras transparentes, ya que la detección se hace perpendicularmente a la excitación. Una diferencia fundamental respecto a las de absorción, es que deben estar termostatazadas, ya que la fluorescencia depende fuertemente de la temperatura.



#### RECUERDA QUE

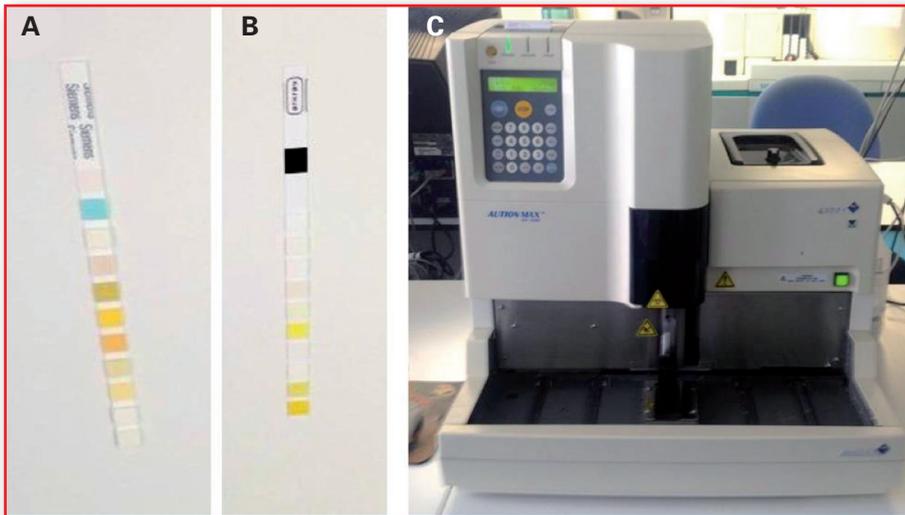
*Cuando las moléculas absorben radiación electromagnética pasan a un estado electrónico excitado.*

llevar a cabo el análisis de pruebas bioquímicas. La ventaja de los *slides* respecto a los reactivos líquidos utilizados en autoanalizadores basados en espectrometría de absorción es que presentan **mayor estabilidad** y se pueden introducir directamente en el equipo sin necesidad de reconstituirlos o agitarlos.



Los reactivos

de química seca se diseñan para ser utilizados específicamente con un fotómetro de reflectancia concreto, capaz de leerlos e interpretar los resultados.



**Figura 27.** A. Tira reactiva para el análisis de orina manual: comparación visual con patrones; B. Tira reactiva para el análisis de orina mediante fotómetro de reflectancia. En la parte superior se observa el código magnético que contiene la información para realizar la lectura; C. Fotómetro de reflectancia para el análisis de tiras reactivas de orina

## 8. REFRACTOMETRÍA DE LÍQUIDOS

### 8.1. Fundamento

La **refracción** se define como el **cambio de velocidad** que experimenta la radiación electromagnética al pasar de un medio transparente a otro.

Cada medio posee un **índice de refracción** ( $n$ ) característico que mide la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en dicho medio. A través de la **ley de Snell** se puede relacionar el índice de refracción de dos materiales con el ángulo que se desvía la radiación al pasar de un material a otro:

$$n_1 \cdot \text{seno } \theta_1 = n_2 \cdot \text{seno } \theta_2$$

$n_1$  = Índice de refracción del medio 1.

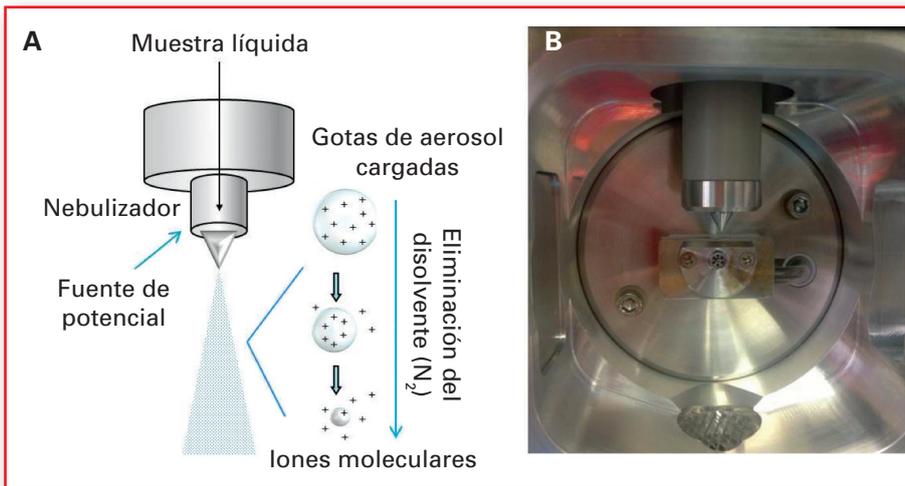
$n_2$  = Índice de refracción del medio 2.



#### RECUERDA QUE

Cuando un rayo de luz atraviesa dos materiales distintos experimenta una desviación en su trayectoria.

iones moleculares. Este tipo de ionización es muy utilizado para el **análisis de moléculas grandes y complejas**. Además, el ESI tiene la ventaja de que se puede acoplar en línea con un cromatógrafo para identificar los componentes de una mezcla que se van separando por cromatografía.



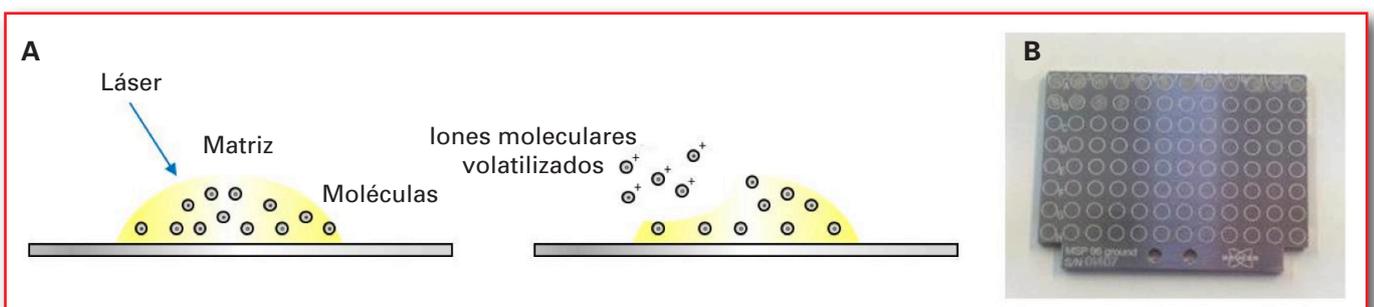
**Figura 30.** A. Esquema de una fuente de ionización por electroespray (ESI). La muestra líquida llega al nebulizador, donde se aplica un potencial y se generan gotas cargadas. Se va eliminando el disolvente mediante una corriente de N<sub>2</sub> hasta que se obtienen los iones moleculares. B. Fotografía de un electroespray (ESI).

► **MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**. Se utiliza una matriz que absorbe energía UV y la disipa en forma de calor. La muestra líquida se solidifica dentro de esta matriz, de manera que cuando se aplica un pulso láser, la energía se transfiere a las moléculas para ionizarlas y expulsarlas en forma gaseosa (Figura 31). También es una fuente de ionización suave, por lo que solo se obtienen iones moleculares, ya que prácticamente no se produce fragmentación. Fundamentalmente se utiliza para el **estudio de proteínas**.

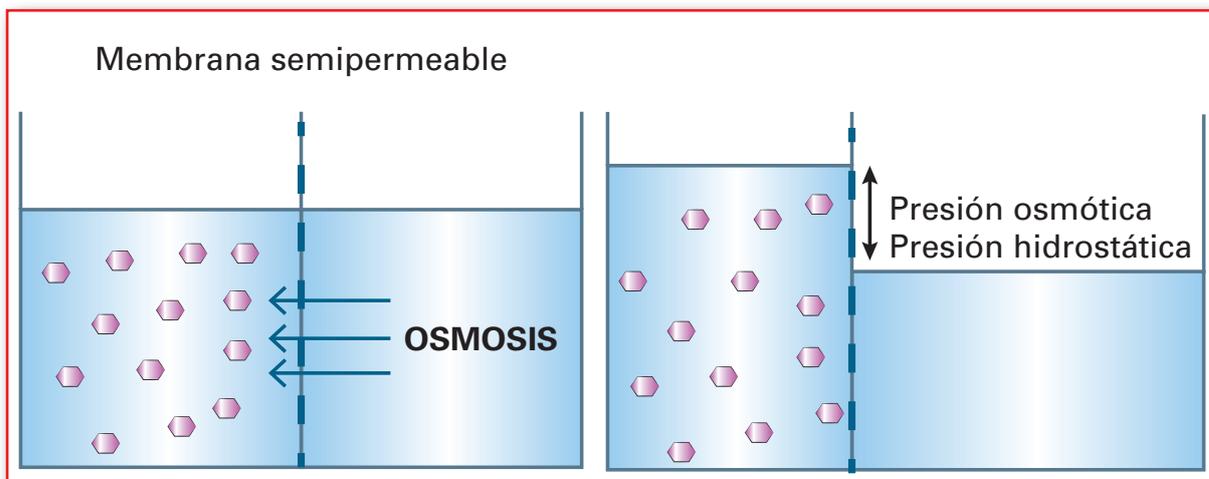


**RECUERDA QUE**

*Un láser es un haz luminoso, monocromático, coherente y muy intenso.*



**Figura 31.** A. Fuente de ionización por MALDI. Al incidir el láser sobre la matriz se produce la volatilización/ionización de las moléculas. B. Fotografía de una placa para llevar a cabo la ionización por MALDI. En cada uno de los círculos se coloca la matriz junto con la muestra y se espera hasta que solidifica. A continuación, se introduce en el espectrómetro de masas para llevar a cabo el análisis.



**Figura 43.** El disolvente pasa hacia la disolución más concentrada hasta que se alcanza el equilibrio. El volumen aumenta según el valor de la presión osmótica que ejercen los solutos en la disolución.

► **Osmómetro dinámico de membrana.** El fundamento es igual que en los osmómetros estáticos, pero, en este caso, para medir la diferencia de presión a ambos lados de la membrana semipermeable que separan las dos disoluciones, se utiliza una **microburbuja de aire** situada entre ellas. La presión osmótica produce una deformación de la microburbuja que puede ser detectada y medida mediante un haz luminoso que la atraviesa y que es captado por una célula fotoeléctrica. Con este tipo de osmómetros se puede obtener la **medida de la presión osmótica en pocos minutos.**



**Figura 44.** Fotografía de un osmómetro de descenso crioscópico.

► **Osmómetro de presión de vapor.** Se mide la disminución de la presión de vapor. Para ello, se utiliza un **higrómetro** (instrumento que mide el grado de humedad en el aire), mediante el que se compara la presión de vapor del disolvente puro con la presión de vapor de la disolución problema a la misma temperatura. Un microprocesador relaciona la disminución de la presión de vapor debida a los solutos, con su concentración.

► **Osmómetro de descenso crioscópico.** Utilizando un sensor de temperatura (**termistor**), se mide el descenso crioscópico, que es la disminución del punto de congelación que experimenta una disolución respecto al disolvente puro como consecuencia de los solutos que contiene (Figura 44).

## RESUMEN

- ✓ En los laboratorios hospitalarios se van a determinar **sustancias con interés clínico** que puedan contribuir al **diagnóstico, pronóstico y seguimiento** de los pacientes.
- ✓ Para ello, se cuenta con una serie de técnicas que permiten la **identificación y cuantificación** de gran cantidad de **analitos**.
- ✓ La mejora de la instrumentación para llevar a cabo estas medidas (lámparas, detectores, sistemas de procesamiento de datos, etc.) permite que cada vez se puedan realizar **análisis con más sensibilidad y especificidad**.
- ✓ Además, la combinación de las técnicas de separación, identificación y cuantificación permiten una mejora sustancial en los límites de detección.
- ✓ También cabe destacar que estos avances instrumentales están permitiendo el **desarrollo de nuevos métodos** para el estudio de moléculas con interés clínico que hasta ahora no podían ser estudiadas.
- ✓ Por otro lado, la **automatización del proceso analítico**, desde la extracción de la muestra hasta la emisión del informe, ha permitido **minimizar errores y mejorar la reproducibilidad** de los resultados. Todo esto implica que los valores analíticos que recibe el clínico para la toma de decisiones cada vez sean más fiables y con un tiempo de respuesta más bajo.
- ✓ En conclusión, el gran avance de las técnicas instrumentales, así como la automatización del proceso analítico hacen que el **laboratorio** se haya convertido en una **herramienta fundamental** en el abordaje de la enfermedad por parte de los clínicos.

## G L O S A R I O

---

**Autoanalizador o analizador automático:** instrumento de un laboratorio clínico diseñado para determinar sustancias químicas o caracterizar muestras biológicas con una asistencia humana mínima.

**Cromatografía:** método físico de separación de los componentes de mezclas complejas.

**Cromatografía líquida de alta eficacia o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC):** cromatografía en columna donde la fase móvil se bombea a alta presión sobre la fase estacionaria, mejorándose la resolución de la separación de compuestos respecto a la cromatografía clásica.

**Cromatograma:** resultado gráfico de la cromatografía. Representa la señal analítica en función del tiempo de retención o del volumen de elución de cada uno de los compuestos separados de una mezcla compleja.

**Espectro de absorción:** representa la absorción de radiación electromagnética que experimenta un material cuando la luz incide sobre él, en función de la longitud de onda.

**Espectro de emisión:** representa la emisión de radiación electromagnética que experimenta un átomo o molécula cuando vuelve al estado fundamental desde un estado excitado, en función de la longitud de onda.

**Espectro de masas:** representación de las relaciones masa/carga ( $m/z$ ) de todas las especies iónicas producidas a partir de una molécula en función de su intensidad relativa.

**Espectrómetro óptico:** instrumento que sirve para medir las propiedades de la luz en un intervalo de longitudes de onda. La variable que se mide generalmente es la intensidad luminosa.

**Fluorescencia:** luminiscencia en la que la excitación de las moléculas que emiten se lleva a cabo por absorción de radiación electromagnética.

**Ionización por electroespray (ESI):** técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas.

**Ley de Lambert Beer:** ecuación matemática obtenida empíricamente que relaciona la absorción de la luz con las propiedades del material que absorbe.



## EJERCICIOS

› E1. **Selecciona cuatro equipos del laboratorio y, con ayuda de la información comercial y técnica, explica dentro de qué tipo de autoanalizadores se encuadra cada uno de ellos.**

› E2. **Describe cómo se llevaría a cabo la separación de tres aminoácidos mediante cromatografía de intercambio iónico eluyendo con un gradiente de pH:**

Lisina (pKa= 10), Histidina (pKa= 6) y Aspártico (pKa= 4).

› E3. **Para la determinación de proteínas en orina se han preparado patrones de concentración conocida y se ha medido la absorbancia obteniéndose los siguientes resultados:**

Proteínas (mg/dL): 0, 25, 50, 70, 100, 150, 200.

Absorbancia: 0; 0,038; 0,074; 0,100; 0,140; 0,200; 0,230.

- Construye la curva de calibración.
- Calcula la concentración de proteínas totales de la muestra 1 y de la muestra 2, para las que se han obtenido unos valores de absorbancia de 0,085 y 0,22 respectivamente.

› E4. **La cantidad de estradiol en suero se determina mediante un inmunoensayo competitivo con anticuerpos marcados con un fluoróforo. Se han preparado disoluciones patrón y se ha medido la fluorescencia obteniéndose los siguientes resultados:**

Concentración (pg/ml): 0, 125, 590, 1.870, 3.230, 4.800.

RLU (Unidades relativas de luz): 1.007.226, 655.582, 308.724, 147.201, 111.416, 85.567.

- Construye la curva de calibración y determina la concentración de una muestra en la que se ha obtenido un valor de RLU de 600.000.
- Teniendo en cuenta que la intensidad de fluorescencia tiene una relación lineal con la concentración del fluoróforo, ¿por qué no se obtiene una recta como curva de calibración?



## EVALÚATE TÚ MISMO

### 1. En función de su energía, ¿cuál es el orden de las radiaciones en el espectro electromagnético?:

- a) Rayos X > Ultravioleta > Visible > Infrarrojo > Microondas > Ondas de Radio.
- b) Ultravioleta > Rayos X > Visible > Infrarrojo > Microondas > Ondas de Radio.
- c) Rayos X > Visible > Ultravioleta > Infrarrojo > Ondas de Radio > Microondas.
- d) Rayos X > Visible > Ultravioleta > Infrarrojo > Microondas > Ondas de Radio.

### 2. Si duplicamos la energía de una radiación electromagnética:

- a) Se duplica su intensidad y la longitud de onda se reduce a la mitad.
- b) La intensidad se reduce a la mitad y la longitud de onda se duplica.
- c) La intensidad no varía y la longitud de onda se reduce a la mitad.
- d) Se duplican la intensidad y la longitud de onda.

### 3. Indica cuál es el enunciado correcto:

- a) Cuando la luz interacciona con la materia siempre se producen cuatro fenómenos: absorción, emisión, dispersión y reflexión.
- b) Para que un átomo o molécula absorba, la diferencia de energía entre el nivel fundamental y el excitado tiene que ser igual a la energía del haz incidente.
- c) Todas las moléculas que absorben emiten radiación electromagnética.
- d) Si una molécula absorbe radiación electromagnética vuelve al estado fundamental emitiendo luz de la misma energía que la radiación absorbida.

### 4. Los componentes básicos de un espectrofotómetro son:

- a) Espejos, lentes, rendijas, prisma de refracción, detector.
- b) Lámpara, espejos, lentes, rendijas, detector.
- c) Lámpara, espejos, lentes, rendijas, filtro, detector.
- d) Fuente de luz, monocromador, detector.

### 5. ¿Cuánto vale la absorbancia de una muestra que tiene una transmitancia del 100 %?:

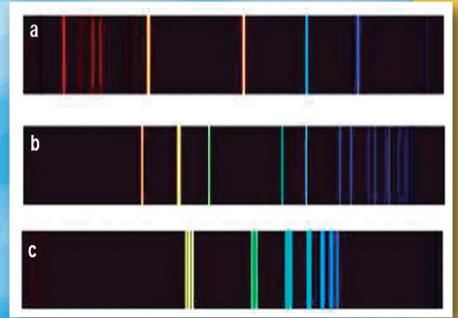
- a) 0.
- b) 2.
- c) 0,1.
- d) Infinito.



**SOLUCIONES**  
**EVALÚATE TÚ MISMO**



[http://www.aranformacion.es/\\_soluciones/index.asp?ID=19](http://www.aranformacion.es/_soluciones/index.asp?ID=19)



Avalado por:



Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia