

PRÁCTICA 1

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN SUERO POR REFRACTOMETRIA

1. Introducción teórica

Cuando una radiación electromagnética alcanza un medio material, el vector campo eléctrico de la radiación interacciona con los átomos y moléculas del medio, pudiendo dicha radiación ser transmitida, absorbida o dispersada.

Experimentalmente, se ha observado que la velocidad con que se propaga la radiación a través de una sustancia transparente, es menor que su velocidad en el vacío y depende además de las especies y concentración de los átomos, iones o moléculas, pero no observándose variación en la frecuencia de la radiación.

Entre los distintos métodos para la determinación del contenido proteico de fluidos biológicos (fundamentalmente, suero sanguíneo), el de refractometría es uno de los más utilizados, cuando no se precisa una elevada exactitud.

El índice de refracción del agua a 20° C ($n=1.3330$) se incrementa con una cierta proporcionalidad con la concentración de soluto en diluciones acuosas de concentración moderada. Este hecho ha encontrado aplicación clínica para la determinación rápida del contenido total de proteínas en el suero sanguíneo, para lo cual se parte del hecho de que prácticamente el índice de refracción de un suero a otro varía en función de su contenido en proteínas y no difieren entre sí apreciablemente en lo que respecta a solutos, electrolitos u otros metabolitos simples de carácter orgánico.

Las ventajas de este método radican en la rapidez, mínima cantidad de muestra y facilidad operatoria, si bien, como queda indicado, su exactitud no es muy elevada, pero cubre correctamente las necesidades clínicas de carácter rutinario.

El índice de refracción de un medio es, en cierta manera, una medida de la magnitud de dicha interacción, y se define por:

$$n = \frac{c}{v_1}$$

donde n es el índice de refracción a una frecuencia determinada, v_1 la velocidad de la radiación en el medio considerado y c su velocidad en el vacío, donde es máxima.

El índice de refracción de una sustancia se determina, midiendo el cambio de dirección de una radiación cuando pasa de un medio a otro:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\text{sen}(\theta_1)}{\text{sen}(\theta_2)}$$

donde

v_1 es la velocidad de propagación en el medio menos denso.

v_2 es la velocidad de propagación en el medio más denso.

n_1 y n_2 los índices de refracción respectivos.

θ_1 y θ_2 los ángulos de incidencia y de refracción respectivamente.

Para la determinación del índice de refracción se utilizan los aparatos denominados Refractómetros, siendo el más utilizado el de Abbe, basado en la medida del *ángulo límite*. Si se hace que el ángulo de incidencia sea prácticamente igual a 90° (incidencia rasante), el ángulo de refracción alcanza su valor máximo, recibiendo el nombre de *ángulo límite de refracción*.

El refractómetro de Abbe, contiene dos prismas rectangulares, opuestos por sus hipotenusas, fijo el superior y móvil el inferior, sobre el que se coloca la muestra problema. La luz procedente de una lámpara se hace incidir, de modo que el haz atraviese los prismas con la muestra problema situada entre ambos y son enviados hacia el tubo telescópico donde se encuentra un retículo marcado con un aspa. Observando por el ocular y moviendo el mando giratorio de los prismas, se hace coincidir la divisoria del campo con el centro del retículo, lo que ocurrirá exactamente cuando se observe la mitad del campo clara y la otra mitad oscura. En ese momento, con ayuda del flexo auxiliar, iluminamos por reflexión una escala graduada en la que directamente se observa el índice de refracción de la muestra problema.

Cuando se utiliza una luz no monocromática, se produce una dispersión cromática en el campo, que debe eliminarse mediante el acromatizador que lleva incorporado el instrumento.

La lectura debe realizarse bajo termostatación.

2. Parte experimental

a. Instrumentación y productos

2 Pipetas Pasteur
2 Chupetes
1 Gradilla
1 Frasco lavador
Refractómetro de Abbe
Flexo
Suero problema

b. Procedimiento experimental

Colocar el refractómetro frente a una buena fuente de iluminación. Una vez comprobado que los prismas están perfectamente limpios, con una pipeta Pasteur y sobre la superficie del prisma inferior (en posición horizontal), se ponen 1 ó 2 gotas de suero problema, se cierra el prisma. Abriendo la ventana se hace incidir un haz de radiación. Observando por el ocular, con el acromatizador (mando situado a la derecha), corregimos la aberración cromática y a continuación ajustamos la medida del índice de refracción con el mando situado abajo a la derecha. La escala de lectura situada en la parte inferior del campo se ilumina con el flexo auxiliar.

Datos, medidas y cálculos

Tabla de lectura de índices de refracción correspondientes a distintas concentraciones proteicas realizadas a 17.5° C.

<u>Índice de refracción</u>	<u>g% de proteínas</u>
1.3431	3.96
1.3435	4.15
1.3438	4.34
1.3442	4.53
1.3446	4.71
1.3450	4.90
1.3453	5.08
1.3457	5.27
1.3461	5.46
1.3465	5.65
1.3468	5.83
1.3472	6.02
1.3476	6.20
1.3479	6.39
1.3483	6.58
1.3487	6.76
1.3491	6.95
1.3494	7.13
1.3498	7.32
1.3502	7.50
1.3505	7.69
1.3509	7.87
1.3513	8.06
1.3516	8.24
1.3520	8.42
1.3524	8.61
1.3527	8.79