

1. ESPECTROFOTOMETRÍA

Un gran número de las determinaciones que se realizan habitualmente en el Laboratorio Clínico se basan en la medida de la energía radiante emitida, absorbida, transmitida, dispersada y/o reflejada por un preparado de laboratorio cuando sobre él incide la citada energía. La energía radiante se obtiene a partir de una fuente luminosa/calorífica (lámpara, llama o reacción química). Puesto que la luz no es más que una sucesión de fotones, todas estas técnicas se agrupan bajo la denominación de FOTOMETRÍA, término que engloba a los siguientes métodos analíticos:

- Fotometría de absorción molecular (visible y ultravioleta).
- Fotometría de luminiscencia (emisión del luz o fluorimetría y quimioluminiscencia).
- Fotometría de dispersión (turbidimetría y nefelometría).
- Fotometría de emisión de llama.
- Fotometría de absorción atómica.
- Fotometría de refracción.
- Fotometría de reflexión

TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

Interacción radiación-muestra

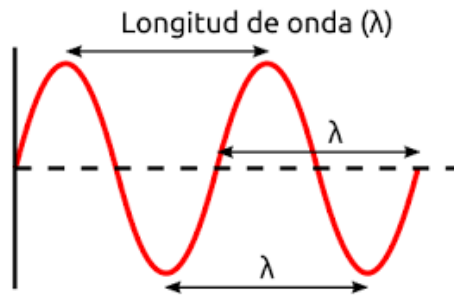
- **TRANSMISIÓN.** Se produce cuando la radiación incide sobre una sustancia y no se produce pérdida de energía ni cambios de dirección.
- **ABSORCIÓN.** Se produce cuando existe una pérdida de intensidad de la radiación al atravesar la sustancia. Las moléculas o partículas que absorben radiación ganan energía (estado excitado).
- **EMISIÓN.** Se produce cuando moléculas o átomos en estado excitado liberan su energía y vuelven a su estado de reposo.
- **DISPERSIÓN.** Se produce cuando el haz de radiación choca contra una partícula en suspensión y cambia de dirección sin variar su energía.
- **REFRACCIÓN.** El haz de radiación al atravesar una solución se desvía o cambia de dirección por la diferente naturaleza del medio de propagación.
- **REFLEXIÓN.** El haz de luz incide sobre una superficie y se produce un efecto de rebote y cambio de dirección.
- **DIFRACCIÓN.** El haz de luz se desvía al pasar por el extremo de una superficie o al atravesar una rendija.

Como hemos visto, todas las técnicas fotométricas tienen su fundamento en las interacciones de las radiaciones electromagnéticas (energía radiante) sobre la materia, razón por la cual conviene conocer en primer lugar la naturaleza de dicha radiación.

2. NATURALEZA DE LA RADIACION ELECTROMAGNETICA (REM)

La REM es una forma de energía radiante que tiene propiedades ondulatorias. De una manera sencilla, puede considerarse como un conjunto de corpúsculos de energía (fotones) que se mueven en forma de ondas. En todo fenómeno ondulatorio debemos considerar dos conceptos fundamentales:

- **LONGITUD DE ONDA (λ):** es la distancia existente entre dos picos consecutivos de un ciclo completo del movimiento ondulatorio. Se mide en nanómetros (nm): $1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$



- **FRECUENCIA (f):** es el número de ciclos completos por unidad de tiempo (segundo). Es inversa a la longitud de onda, de tal forma que:

$$f=c/\lambda \quad c=\text{velocidad de la luz en el vacío (3.108 m/s)}$$

La frecuencia se expresa en ciclos por segundo (s^{-1}) o Hertzios (Hz). Un Hz es igual a 1 ciclo/s. Mediante la fórmula anterior podemos calcular λ a partir de f o viceversa

- **ENERGÍA (E).** La energía de un fotón cualquiera (y, por tanto de la REM) viene definida por su frecuencia:

$$E=h\cdot f \rightarrow E=h\cdot c/\lambda \quad \text{Donde h es la constante de Planck (h=6,6.10-34 J.s)}$$

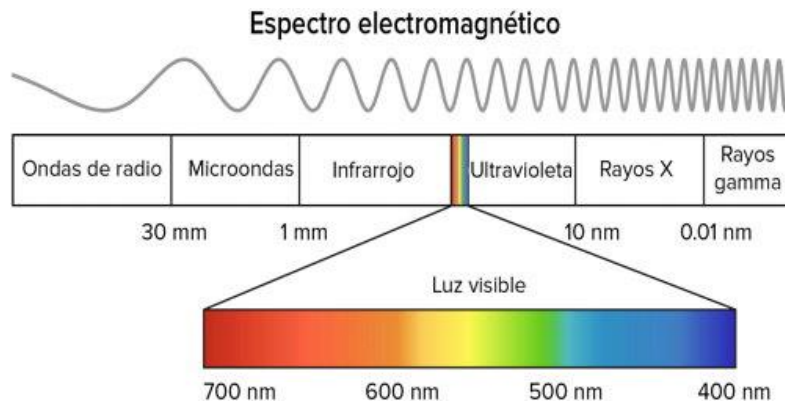
De acuerdo con la ecuación anterior, las longitudes de onda más cortas poseen mayor energía que las longitudes de onda más largas.

3. ESPECTRO ELECTROMAGNETICO (EEM)

Se denomina EEM al conjunto de REM que existen en nuestro entorno. Dicho espectro incluye desde los rayos γ (con longitudes de onda muy bajas y niveles energéticos altísimos), hasta las ondas de radio (con longitudes de onda muy altas y niveles energéticos muy bajos).

Este espectro se ha dividido en varias regiones en función de las longitudes de onda de las REM que lo componen:

- Rayos γ (<1nm).
- Rayos X (1-100nm).
- Ultravioleta-UV (100-340nm).
- Visible (340-700nm).
- Infrarrojo-IR (700-100.000nm).
- Microondas (100.000-1.000.000nm).
- Ondas de radio (>1.000.000nm).



La región visible del espectro es la zona de longitudes de onda a cuya energía responde el ojo humano. Está formada, a su vez, por las siguientes subregiones:

- Violeta (340-425nm).
- Azul (425-490nm).
- Verde (490-575nm).
- Amarillo (575-585nm).
- Naranja (585-650nm).
- Rojo (650-700nm).

La luz blanca es la suma de todas las radiaciones correspondientes a la zona visible del espectro. Cuando una REM visible incide sobre la superficie de una sustancia, esta absorbe selectivamente unas longitudes de onda y transmite y/o refleja otras; las longitudes de onda transmitidas y/o reflejadas son las responsables del color que adquiere la sustancia.

Ej. 1. ¿Cuál es la frecuencia de una radiación electromagnética de $\lambda = 650 \text{ nm}$ que corresponde al color rojo?

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{3 \cdot 10^8 \text{ m/s}}{650 \text{ nm}} \cdot \frac{10^9 \text{ nm}}{1 \text{ m}} = 4,6 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1} = 4,6 \cdot 10^{14} \text{ Hz}$$

Ej. 2. ¿Cuál será la energía del fotón correspondiente a la radiación roja de $\lambda=650 \text{ nm}$? ¿Y la de un fotón de una radiación ultravioleta de $\lambda=50 \text{ nm}$?

$$E = h \cdot \nu = 6,6 \cdot 10^{-34} \cdot 4,6 \cdot 10^{14} = 3,0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda} = 6,6 \cdot 10^{-34} \cdot \frac{3 \cdot 10^8 \text{ m/s}}{50 \cdot 10^{-9} \text{ m}} = 4,0 \cdot 10^{-18} \text{ J}$$

ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION MOLECULAR

1. DEFINICIÓN

Puede definirse como "un método que mide la concentración de un analito en una muestra basándose en la capacidad de dicho analito para absorber luz de una determinada longitud de onda al ser excitado por una REM".

Cuando un haz de luz incide sobre una muestra problema, esta absorbe radiación de una determinada longitud de onda; el resto de las radiaciones serán transmitidas y aparecerá a la vista un color que no es sino la suma de las longitudes de onda que no han sido absorbidas; a este color se le denomina COMPLEMENTARIO del color ABSORBIDO. En la siguiente tabla se indican los colores complementarios en función de la longitud de onda absorbida:

λ (nm) ABSORBIDA	COLOR ABSORBIDO	COLOR COMPLEMENTARIO
340-425	Violeta	Amarillo-verde
425-475	Azul	Amarillo
475-495	Verde-azul	Naranja
495-505	Azul-verde	Rojo
505-555	Verde	Púrpura
555-575	Verde-amarillo	Violeta
575-600	Amarillo	Azul
600-620	Naranja	Azul-verde
620-700	Rojo	Verde-azul

La luz UV y la IR también sufren el fenómeno de absorción, pero, al encontrarse fuera de la zona visible del espectro, el resultado no es un color complementario captable por el ojo humano. Más adelante veremos las manipulaciones necesarias para poder utilizar estos tipos de luz en las determinaciones fotométricas.

De la tabla anterior se desprende una consecuencia de importancia: para obtener la máxima sensibilidad en una determinación fotométrica, el color de la luz que incide sobre la muestra problema debe coincidir con el que presenta la máxima absorción (así, una disolución problema que presente un color verde-azul absorbe con fuerza el color rojo, por lo que la luz que hagamos incidir sobre ella debe presentar una longitud de onda situada en la región roja del espectro visible).

2. EL PROCESO DE ABSORCION

Existen moléculas o partes de moléculas que, al interactuar con una REM, absorben parte de su energía y experimentan saltos en sus electrones desde unas órbitas a otras más alejadas del núcleo (excitación). A estas moléculas se les denomina ESPECIES ABSORBENTES, o también CROMÓFOROS o CROMÓGENOS (ya que, generalmente, el proceso de absorción de una REM genera un color).

Pues bien, cuando una partícula con estas características se encuentra en estado de reposo e interactúa con un haz de luz, absorbe energía y pasa a lo que se llama un estado excitado; la partícula en estado excitado tiende a regresar espontáneamente a su estado de reposo desprendiendo la energía absorbida en forma de calor:



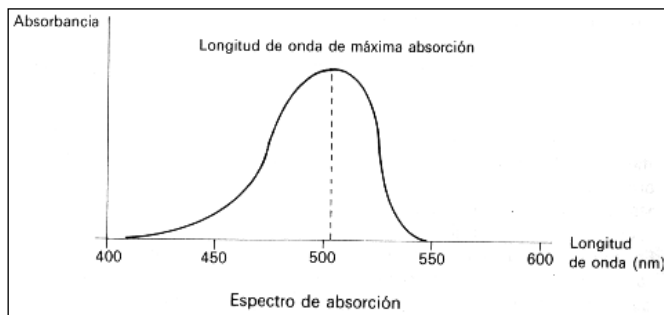
A^0 = Absorbente en estado de reposo

A^* = Absorbente en estado excitado

h = Cte. de Planck

f = Frecuencia de la REM

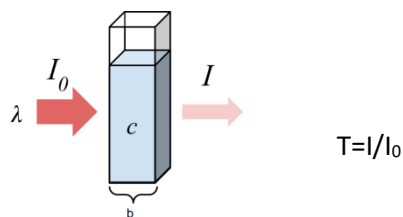
Cada especie absorbente (cromógeno) tiene lo que se llama un ESPECTRO DE ABSORCIÓN característico. Este espectro representa la relación existente entre la longitud de onda de la REM incidente y la absorción que presenta la disolución problema que contiene el cromógeno. El espectro de absorción se representa en unos ejes cartesianos.



Los espectros de absorción son de utilidad tanto para seleccionar la longitud de onda más adecuada para una medida fotométrica (determinación cuantitativa), como para fines de identificación de una sustancia (determinación cualitativa).

-TRANSMITANCIA Y ABSORBANCIA:

Cuando un haz de luz de intensidad I_0 incide sobre una cubeta que contiene una solución capaz de absorber REM de una determinada longitud de onda, el haz de luz resultante tendrá una intensidad I menor que I_0 . Se define como TRANSMITANCIA la relación existente entre la intensidad de la luz incidente y la de la luz resultante o transmitida:



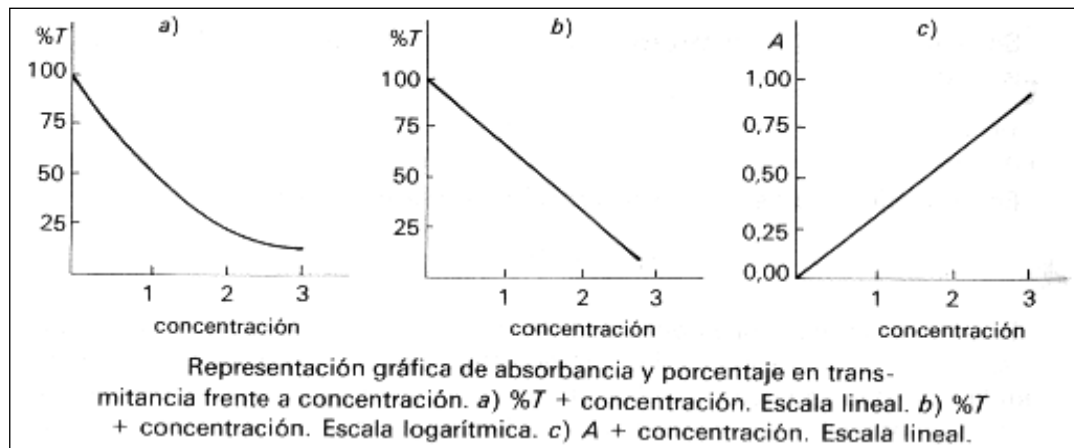
Dicha transmitancia tiende a expresarse en porcentaje (%T), variando sus valores entre 0 y 100 en función de que la solución absorba toda la luz incidente o no absorba nada en absoluto.

En la práctica, en lugar del valor de transmitancia se emplea el de ABSORBANCIA, que se obtiene del primero a través de la siguiente expresión matemática:

$$A = 2 - \log \%T$$

En los fotómetros que se utilizan actualmente, las lecturas de %T pueden ser transformadas en absorbancia y presentadas así al operador, pero conviene no olvidar que la absorbancia no es en sí misma una cantidad medible, sino que se obtiene por cálculo matemático a partir de la transmitancia medida por el sistema fotométrico.

Si representamos gráficamente en un eje de coordenadas la relación existente entre %T y concentración del analito medido, obtendremos una línea curva que muestra una relación inversa (es decir, cuando aumenta %T, disminuye la concentración); esta línea curva puede convertirse en una recta utilizando para la representación gráfica una escala semilogarítmica. Sin embargo, si en la gráfica representamos la absorbancia en lugar del %T, obtendremos una línea recta que muestra una relación directa entre los parámetros considerados:



3. LEY DE LAMBERT-BEER

La relación entre las cantidades de absorbente de una disolución y el grado en que esta absorbe la luz se rige por la LEY DE ABSORCIÓN DE LAMBERT-BEER (L-B). Esta ley relaciona el grado de absorción de la disolución con la concentración del absorbente (analito) y la longitud del trayecto que el haz de luz recorre a través de la disolución:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

A=Absorbancia
a=Coeficiente de absorción (l/mol×cm)
b=Longitud de paso de la luz (cm)
c=Concentración del analito (mol/l)

El coeficiente de absorción *a* (absortividad) es característico de cada sustancia y, cuando las unidades empleadas son l, mol y cm, toma el nombre de *coeficiente de extinción molar* (ϵ). Dicho coeficiente es constante para cada sustancia dada cuando se fijan las condiciones de longitud de onda, pH y temperatura. Si el coeficiente es alto, el método analítico detectará concentraciones menores de la sustancia buscada, lo que supondrá un aumento de su sensibilidad.

La ley de L-B tiene una aplicación práctica: nos permite determinar métodos experimentales a partir de los cuales averiguar la concentración de una sustancia de interés en una disolución. Efectivamente, basándonos en la relación lineal existente entre absorbancia y concentración, podemos conocer esta última de dos maneras:

- Por comparación con una disolución de parámetros conocidos: si tenemos dos disoluciones (m→muestra problema de concentración desconocida y p→patrón de concentración conocida) podemos establecer la siguiente relación matemática entre ellas:

$$A_p/A_m = C_p/C_m \rightarrow C_m = A_m \cdot C_p / A_p$$

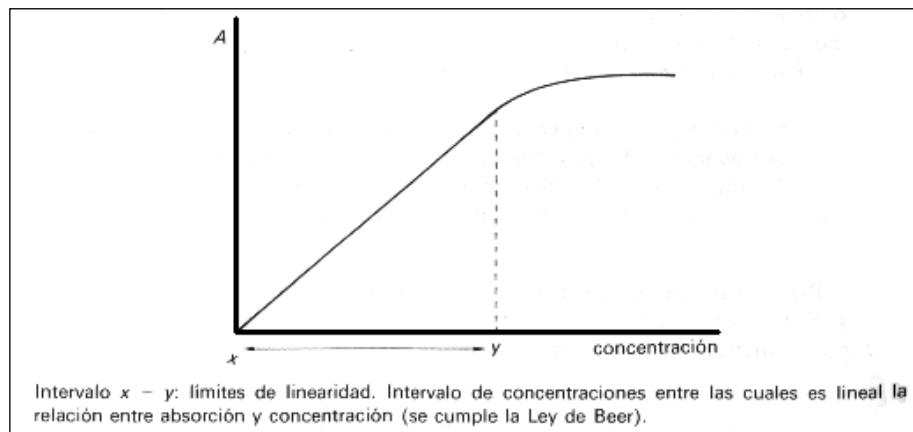
C=Concentración

A=Absorbancia

C_p/A_p =Factor de calibración

Conocemos el valor de C_p y podemos calcular el de A_p y A_m ; con estos datos calculamos el cociente C_p/A_p (factor de calibración) y, al multiplicarlo por A_m , obtendremos la concentración del problema (C_m).

- Por transposición a una curva de calibración: una curva de calibración es la representación gráfica en un eje de coordenadas de absorbancia frente a concentración. El método de trabajo consiste en ensayar varias disoluciones de distintas concentraciones conocidas (patrón a diversas diluciones) y determinar sus absorbancias. Los valores obtenidos se trasladan a la gráfica y se obtienen unos puntos a partir de los



cuales se traza la curva de calibración (que debe ser rectilínea). Cuando trabajamos con una disolución problema, su absorbancia se traslada a la recta, lo que nos permite obtener su concentración.

En las determinaciones espectrofotométricas debemos conocer un parámetro denominado LINEALIDAD, que no es sino el intervalo de concentraciones del cromógeno entre las cuales existe una relación lineal concentración/absorbancia (o, lo que es lo mismo, se cumple la ley de L-B). Cuando la concentración del cromógeno en la disolución sobrepasa los límites de linealidad, la citada ley deja de cumplirse, convirtiéndose la recta de la gráfica en una curva; la lectura de una absorbancia fuera de los límites de linealidad se traduce en una concentración alterada del analito. En estas situaciones hay que diluir la muestra para que su concentración entre dentro de los límites de linealidad y luego multiplicar el resultado por el factor de dilución.

LIMITACIONES DE LA LEY DE LAMBERT-BEER

Existen una serie de circunstancias en las que la ley de L-B no se cumple; a continuación se indican las más importantes:

- Cuando se miden concentraciones muy elevadas de cromógeno.
- Cuando la radiación incidente no es monocromática.
- Cuando la absorbancia del solvente es significativa respecto de la del soluto.
- Cuando existe luz errática o dispersa.
- Cuando los lados de la cubeta no son paralelos.
- Cuando existen interferencias por otros cromógenos.
- Cuando el cromógeno emite fluorescencia.

4. EL ESPECTROFOTÓMETRO

Es el instrumento que se utiliza para las medidas de absorción de las REM.

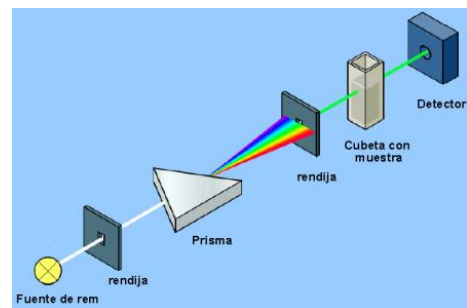
Existen distintos tipos de aparatos útiles en la medida de la absorción de las REM. Según el sistema selector de longitud de onda pueden ser:

- Colorímetros o fotómetros: emplean filtros de vidrio o de interferencia y obtienen luz monocromática a longitudes de onda discretas (a saltos).
- Espectrofotómetros: emplean monocromadores (prismas o redes de difracción) y obtienen luz monocromática en un intervalo continuo de longitudes de onda.

4.1 COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO

Constan esencialmente de los siguientes componentes:

- Fuente estable de energía radiante.
- Rejillas de entrada y salida.
- Selector de longitud de onda.
- Cubetas destinadas a contener la muestra.
- Detector de energía radiante.
- Medidor-presentador de datos.



=FUENTE DE ENERGÍA RADIANTE:

Es el dispositivo emisor de radiación electromagnética. Generalmente emite una banda muy amplia de radiaciones continuas alrededor de la λ deseada.

Según la zona del espectro que emite hay tres tipos:

- Visible: la más utilizada para las medidas en la región visible del espectro es la lámpara de wolframio o de tungsteno. También se utilizan lámparas halógenas que proporcionan energía radiante de mayor intensidad y son más duraderas. Actualmente se utilizan fuentes de luz láser (formadas por haces de luz de una sola longitud de onda y totalmente paralelos \rightarrow colimados).
- Ultravioleta: Para las medidas en la región UV se utilizan las lámparas de descarga de hidrógeno o deuterio.
- Infrarrojos: Fuentes especiales de óxidos de tierras raras (disprosio, holmio, erbio.) o carburos (de silicio). Estos emiten radiación en IR a elevadas temperaturas (1000-2000°C).

=REJILLAS:

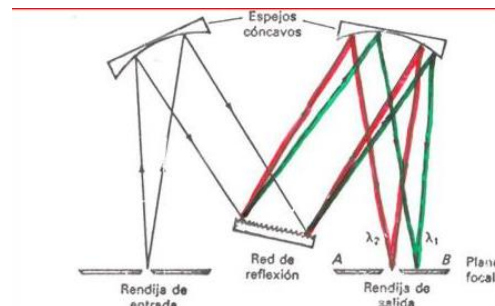
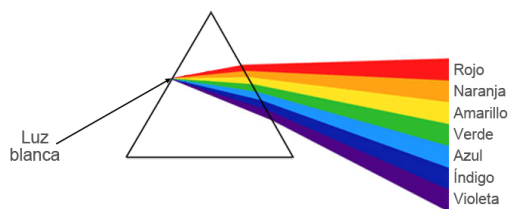
La rejilla de entrada pretende reducir al máximo la luz difusa y evitar que la luz dispersa entre en el sistema selector de longitud de onda. La rejilla de salida tiene como función evitar que la luz difusa atraviese la cubeta. Ambas intentan conseguir un haz de rayos luminosos paralelos, por lo que no son necesarias si la fuente de luz es láser.

=SISTEMA SELECTOR DE LONGITUD DE ONDA:

La longitud de onda de la luz incidente puede seleccionarse por medio de filtros o de monocromadores.

Los FILTROS son los sistemas más simples y están formados por materiales que dejan pasar de forma selectiva las longitudes de onda deseadas, absorbiendo el resto; los más sencillos son simples vidrios coloreados, aunque existen otros, denominados de interferencia, formados por dos películas de vidrio semitransparente revestidas de material plateado entre las cuales se sitúa un material dieléctrico.

Los MONOCROMADORES pueden ser simples prismas (de vidrio, cuarzo, etc.) capaces de descomponer la luz en sus distintas longitudes de onda, o redes de difracción formadas por una placa metálica en la que se graban un gran número de surcos equidistantes (1.000 a 2.000 por mm) de tal forma que cada surco actúa como un pequeño prisma. Los sistemas de selección de longitud de onda, ya sean filtros o monocromadores, se catalogan por su **amplitud de banda** o **paso de banda** (anchura en nanómetros de la curva de transmitancia/absorbancia en el punto medio del pico → intervalo de longitudes de onda que pasa a través de la rejilla de salida de un sistema selector de λ). Los filtros de vidrio tienen amplitudes de banda del orden de los 50 nm, los de interferencia de 5-10 nm, los prismas 0'5-1'5 nm y las redes de difracción de menos de 0'5 nm. Con fuentes de luz láser no son necesarios los sistemas selectores de longitud de onda, ya que emiten con una amplitud de banda menor de 0'01 nm.



=CUBETAS:

Son los recipientes donde se colocan las soluciones para las medidas de absorbancia. Pueden ser cuadradas, rectangulares o redondas y se construyen en vidrio, plástico o cuarzo. Las cubetas de vidrio son útiles para las medidas entre 340 y 1.000 nm y las de plástico entre 310 y 1.000 nm; para lecturas por debajo de 310 nm (región ultravioleta) se precisan cubetas de cuarzo. Las cubetas de los espectrofotómetros poseen diferentes longitudes de paso de luz; las más utilizadas son de 1 cm. El compartimento donde se introducen las cubetas puede estar termostatzado por agua o aire caliente.

=DETECTORES DE ENERGÍA RADIANTE

Son sistemas que convierten la energía luminosa que les llega en energía eléctrica (corrientes de electrones). Los dos tipos de detectores más utilizados son las células fotovoltaicas o de barrera y los tubos fotomultiplicadores (estos últimos, además de detectar la señal, la amplifican). Las células de barrera pueden presentar el llamado "efecto fatiga" (a consecuencia del cual, tras una lectura, conviene esperar de 30 a 60 segundos antes de hacer otra).

=MEDIDORES-PRESENTADORES DE DATOS

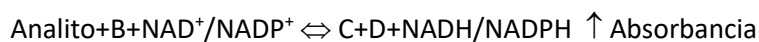
La señal eléctrica generada en el detector se lleva hasta unos dispositivos adecuados que reflejen su valor numéricamente. En la actualidad, los sistemas analógicos de aguja han sido sustituidos por otros digitales que nos presentan en un display los valores de absorbancia o transmitancia.

4.2 MANEJO DEL FOTÓMETRO DE ABSORCIÓN

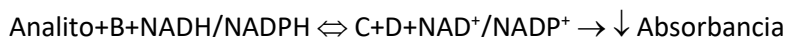
Aunque cada aparato posee sus instrucciones propias, que deben consultarse siempre que se utilice por primera vez, en general los pasos a dar son los siguientes:

- Conectar el aparato a la red y encender la lámpara (generalmente es necesario un tiempo de espera para que la emisión luminosa se estabilice).
- Seleccionar la longitud de onda deseada.
- Realizar el blanco con objeto de eliminar interferencias; para ello ajustamos a 0 la absorbancia con uno de los siguientes métodos:
 - = Utilizando un blanco de muestra: muestra diluida en un solvente inerte (elimina las interferencias producidas por la cubeta y la muestra → hemólisis, lipemia, bilirrubina, urobilina, etc.).
 - = Utilizando un blanco de reactivo: reactivos sin muestra (elimina las interferencias que pudiera producir la cubeta y el reactivo).
- Medir la absorbancia de patrones y muestras, haciendo los cálculos necesarios para obtener concentraciones.
- Apagar la lámpara y desenchufar el aparato de la corriente eléctrica.

Si la medición espectrofotométrica se hace con luz ultravioleta (no visible) no podemos basarla en su absorción por una solución coloreada, sino en otro principio: efectivamente, existen sustancias (como el NAD^+ o el NADP^+) que no son absorbentes a 340-360 nm; sin embargo, cuando estas sustancias son reducidas (a NADH o NADPH) adquieren capacidad absorbente. Si hacemos participar al analito buscado en una reacción química en la que se produzca el paso $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ a NADH/NADPH , se producirá una absorbancia tanto mayor cuanto más analito exista en la muestra:



Si, por el contrario, utilizamos una reacción química en la que el NADH/NADPH se transforma en $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, la absorbancia experimentará una disminución directamente relacionada con la concentración del analito:



-Aspectos de mantenimiento:

Los aparatos deben mantenerse limpios y evitar los agentes que produzcan cualquier interferencia en el sistema fotométrico (polvo, líquidos derramados, etc.). Las fluctuaciones bruscas de la luz afectan al sistema óptico del aparato, que sufre con ellas; por otro lado, hay que vigilar el estado de la lámpara, puesto que experimenta un desgaste con el tiempo (lo que obliga a calibrarlo periódicamente). Las cubetas a usar deben estar perfectamente limpias y su superficie no debe presentar rayadura alguna; no se deben tocar con los dedos las caras de la

cubeta por las que haya de incidir el rayo de luz. Una vez formado el cromógeno, debemos proceder a su lectura lo más rápidamente posible, ya que el color resultante puede degradarse por exposición a la luz ambiental.

5. TIPOS DE MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Existen tres grandes variantes a la hora de realizar una medida con el espectrofotómetro: las medidas a punto final, las medidas a dos puntos y las medidas cinéticas.

- = *Medidas a punto final*: en ellas, tras poner en contacto patrón y muestra con los reactivos correspondientes y esperar a que tenga lugar la formación del cromógeno (y previa medida del blanco), se procede a hacer una única lectura de absorbancia y a transformar el valor obtenido en concentración utilizando el factor de calibración ($C_m = A_m \cdot C_p / A_p$) o la curva de calibración. Si la espectrofotometría se hace con luz UV no se forma un color visible y el periodo de espera viene determinado por el tiempo necesario para que la reacción química en la que participa el analito estudiado alcance el equilibrio.
- = *Medidas a dos puntos*: no precisan de blanco y suponen la realización de dos medidas de absorbancia (A_1 y A_2) separadas por un intervalo determinado de tiempo; dichas medidas se hacen sobre la muestra y sobre el estándar, realizando a continuación el siguiente cálculo, para conocer la concentración del analito en la muestra:

$$C_m = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{muestra}}}{(A_2 - A_1)_{\text{estándar}}} \cdot C_p$$

- = *Medidas cinéticas*: se utilizan especialmente en determinaciones de enzimas con luz UV. En ellas se mide la variación de la absorbancia en la solución problema conforme va teniendo lugar la reacción química en la que está implicado el enzima. Básicamente consiste en realizar varias medidas a intervalos de tiempo constantes (normalmente cada 20 o 60 segundos) y calcular la media de las diferencias existentes entre las distintas absorbancias obtenidas; la multiplicación de este valor por un factor determinado da directamente la concentración del analito (el factor viene dado por la casa comercial y es muy sensible a las condiciones de trabajo, especialmente la temperatura). No precisan de blanco ni de patrón.

6. INTERFERENCIAS EN LAS DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Los ejemplos más típicos de interferencias en las técnicas fotométricas son la lipemia y la hemólisis. La corrección puede hacerse por eliminación del producto indeseado (precipitación de las lipoproteínas y posterior centrifugación), pero existen otros métodos como puede ser la utilización de un blanco adecuado (blanco de muestra). Otra forma de corregir las interferencias es recurrir a métodos cinéticos.

Debemos decir, a modo de conclusión, que las determinaciones de fotometría de absorción han tenido un gran auge en los últimos años. Sus principales ventajas son una sensibilidad y especificidad suficientemente elevadas, así como la facilidad con que permite realizar determinaciones rápidas. Todo ello, unido a su adaptación a los autoanalizadores, hacen de esta fotometría una técnica imprescindible hoy por hoy en el LDC.