

**Validación del método de cuantificación de
calcio en sangre del cordón umbilical
utilizando la o-cresolftaleína complexona**

Colectivo de Autores

Edición: Liset Ravelo Romero
Corrección: Fernando Gutiérrez Ortega
Diagramación: Roberto Suárez Yera

Tahiry Gómez Hernández, Olga Lidia González González, Gisela Peralta Meseguer,
Leticia Cristina Bequer Mendoza, Margarita Rodríguez Pérez y Angel Mollineda Trujillo,
2011

Editorial Feijóo, 2011

ISBN: 978-959-250-597-1



EDITORIAL
Feijóo

Editorial Samuel Feijóo, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a
Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

Resumen

En el trabajo se validó el método espectrofotométrico UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical, a través de la evaluación de la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, sensibilidad y robustez, demostrándose la adecuación de su funcionamiento y fiabilidad al propósito deseado. Se elaboraron tres procedimientos que abarcan los procesos de muestreo, manipulación y ensayo de calcio en sangre del cordón umbilical, desarrollados durante el proceso de validación; específicamente los procedimientos descritos para la obtención y manipulación de las muestras son de gran importancia, porque garantizan la homogeneidad de estos procesos en el montaje de otras técnicas destinadas a evaluar parámetros bioquímicos en esta matriz. Se aplicó la técnica validada y los procedimientos elaborados a la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical, obteniéndose valores medios similares a los reportados en la literatura. Los resultados alcanzados forman parte de la línea de investigación que se desarrolla en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas perteneciente a la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, en la temática de las posibles aplicaciones de la sangre del cordón umbilical.

INDICE

Introducción	6
Capítulo I: Revisión Bibliográfica	9
1.1 Calcio	9
1.2 Consideraciones analíticas	12
1.3 Validación de los métodos analíticos	19
Capítulo II: Materiales y Métodos	32
2.1 Muestra utilizada en la validación del método espectrofotométrico UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona para la cuantificación de calcio en sangre de cordón umbilical	32
2.2 Precauciones a tener en cuenta para evitar interferencias espectrofotométricas por contaminación de la cristalería con calcio	33
2.3 Materiales e Instrumental utilizados en la validación del método espectrofotométrico UV-VIS con la o-cresolftaleína complexona	34
2.4 Técnica en estudio: Espectrofotometría UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en sangre de cordón umbilical	34
2.5 Técnica de referencia: Espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de calcio en un pool de suero de sangre de cordón umbilical	36
2.6 Validación del método espectrofotométrico UV-VIS que utiliza la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en sangre de cordón umbilical	38
2.7 Desarrollo de los procedimientos para el muestreo, manipulación y ensayo de calcio en las muestras de sangre de cordón umbilical	47
2.8 Aplicación de la técnica validada y los procedimientos elaborados a la cuantificación de calcio en sangre de cordón umbilical	48
Capítulo III: Resultados y Discusión	49
3.1 Validación del método espectrofotométrico UV-VIS que utiliza la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en sangre de cordón umbilical	49
3.2 Desarrollo de los procedimientos para el muestreo, manipulación y ensayo de calcio en las muestras de sangre de cordón umbilical	60
3.3 Aplicación de la técnica validada y los procedimientos elaborados a la	

cuantificación de calcio en sangre de cordón umbilical	61
Conclusiones	62
Recomendaciones	63
Bibliografía	64

INTRODUCCIÓN

Durante la gestación, la placenta y la circulación sanguínea feto-placentaria cubren un importante número de funciones imprescindibles para el correcto desarrollo fetal. A pesar de ello, hasta hace poco, la placenta y la sangre contenida en ella han sido consideradas productos de desecho después del alumbramiento. Lógicamente, unas estructuras tan cruciales durante el largo período de la gestación debían poseer características que podían ser de alguna utilidad, sin embargo, hasta hace unos años, el reducido conocimiento que se poseía de éstas era un exponente más de la limitación de los métodos de investigación y análisis vigentes. Los principales estudios actuales en la sangre del cordón umbilical están relacionados con su utilidad para la obtención de células madres y con la optimización de su conservación con estos fines.

En el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas perteneciente al Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, se estudia el comportamiento de varios parámetros bioquímicos en muestras de sangre del cordón umbilical provenientes del salón de parto del Hospital Universitario Gineco-Obstétrico “Mariana Grajales” de Santa Clara. Entre los parámetros bioquímicos que se analizan en nuestro laboratorio se encuentran los niveles séricos de la enzima Ganma Glutamil Transferasa, las proteínas C₃ y C₄ y los metales hierro, cobre, cinc, sodio, potasio, magnesio y calcio. Particularmente el conocimiento de los niveles de calcio es de importancia vital pues tanto el déficit como el exceso de este elemento puede significar un peligro para el recién nacido.

En el neonato, los iones calcio son esenciales para la conservación de la estructura del esqueleto, activación de diversas enzimas, coagulación de la sangre, contracción muscular y transmisión de los impulsos nerviosos. Debido a su importancia en varios procesos esenciales, la concentración de calcio, que se encuentra en un intervalo de normalidad muy estrecho (entre 2,0 y 2,6 mmol/L), es controlada en el organismo por diferentes vías. Este control global de la calcemia brinda un mecanismo rápido de amortiguamiento para evitar que la concentración de calcio se eleve o descienda en situaciones transitorias de exceso o déficit de disponibilidad de este elemento.⁽¹⁾

Varias son las técnicas analíticas desarrolladas para la medida de la concentración de calcio en sangre del cordón umbilical; si bien el método de referencia es la Espectrofotometría de absorción atómica, el más utilizado es la Espectrofotometría UV-VIS empleando como reactivo desarrollador del color la o-cresoltaleína complexona a pH alcalino⁽²⁾, que aparece publicado en la literatura científica para ser aplicado en suero de sangre venosa y sólo aporta las características de ejecución más importantes establecidas. El empleo de sangre del cordón umbilical implica un cambio de matriz en el desarrollo del método pues se ha descubierto que la sangre de la placenta, fácilmente accesible a través del drenaje de la vena umbilical, posee cualidades diferentes de la sangre adulta. A. de Toro Salas y colaboradores han encontrado que el valor de calcio cuantificado en suero de sangre del cordón umbilical resulta superior al obtenido en sangre materna en el momento del parto.⁽³⁾

La selección y desarrollo de métodos analíticos necesita de un estudio de validación previo que demuestre la adecuación de su funcionamiento al propósito deseado. El proceso de validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad en la calidad de los resultados, en las características de funcionamiento y en el cumplimiento de las exigencias legales del método analítico que se seleccionó.^(4,5)

La extensión del trabajo de validación depende de las características del método de ensayo y el componente a determinar⁽⁵⁾; y la fiabilidad de sus resultados depende del estricto cumplimiento de los procedimientos para el muestreo, manipulación y ensayo de las muestras^(4,6,7). Estos procedimientos, desarrollados en el proceso de validación, deben ser debidamente documentados para asegurar que la introducción del método en la rutina de trabajo aporte resultados confiables. Específicamente los procedimientos descritos para la obtención y manipulación de las muestras son de gran importancia en el montaje de otras técnicas destinadas a evaluar parámetros bioquímicos en esta matriz, que forman parte de la línea de investigación que se desarrolla en la temática de las posibles aplicaciones de la sangre del cordón umbilical.

En nuestro laboratorio se carecía de un método analítico validado que permitiera determinar calcio en sangre del cordón umbilical de manera confiable en nuestras condiciones de trabajo y de la documentación necesaria para garantizar la calidad de

los resultados obtenidos, lo cual impedía su aplicación en las tareas científico-técnicas del centro; por tanto, consideramos como hipótesis que es posible validar el método espectrofotométrico UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona, para cuantificar calcio en sangre del cordón umbilical de manera confiable.

En consecuencia, los objetivos del trabajo fueron:

- Validar el método espectrofotométrico UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona, para la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical en las condiciones de trabajo del Laboratorio de Diagnóstico Molecular.
- Elaborar los procedimientos para el muestreo, manipulación y ensayo de calcio en sangre del cordón umbilical desarrollados durante el proceso de validación.
- Aplicar la técnica validada y los procedimientos elaborados a la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical.

Capítulo I: Revisión bibliográfica

1.1 Calcio

1.1.1 Calcio inorgánico

Es el quinto elemento y el tercer metal más abundante en la corteza terrestre, de número atómico 20 y símbolo químico Ca. La distribución del calcio es muy amplia; se encuentra en casi todas las áreas terrestres del mundo. Este elemento es esencial para la vida de las plantas y animales, ya que está presente en el esqueleto de los animales, en los dientes, en la cáscara de los huevos, en el coral y en muchos suelos. El cloruro de calcio se halla en el agua del mar en un 0,15 %. En el cuerpo humano este macromineral es el cuarto componente después del agua, las proteínas y las grasas.⁽⁸⁾

1.1.2 Calcio en el organismo humano

El calcio es importante para muchos sistemas en el organismo; los iones calcio son esenciales para la conservación de la estructura del esqueleto, activación de diversas enzimas, coagulación de la sangre, contracción muscular y transmisión de los impulsos nerviosos, además disminuyen la permeabilidad de las membranas celulares y de los capilares y deprimen la excitabilidad neuromuscular. Los huesos y dientes contienen más del 99 % del calcio total, en el hueso está presente principalmente en forma de fosfato cálcico.⁽¹⁾

1.1.3 Calcio como nutriente

La leche y sus derivados son las principales fuentes de calcio en la dieta. Intervienen muchos factores en la absorción de calcio a nivel del intestino delgado a partir de estos alimentos: entre los factores que promueven la absorción intestinal del calcio se encuentra una concentración elevada de calcio, un pH bajo, la vitamina D, que es esencial, y la paratohormona (dependiente de la vitamina D). Durante la infancia, embarazo y lactancia, las necesidades dietéticas (0,8 g/día) deben ser aumentadas en un 25 % a 75 % para mantener un equilibrio cálcico adecuado; esto es esencial para las necesidades metabólicas, especialmente durante las fases de crecimiento y desarrollo del hueso.⁽¹⁾

1.1.4 Calcio en la sangre

Como los eritrocitos carecen prácticamente de calcio, el suero o el plasma contienen casi todo el calcio, cuya concentración varía normalmente entre 2,20 y 2,60 mmol/L. El calcio sérico está presente en tres diferentes formas: 1) cerca del 45 % (1.0 a 1.1 mmol/L) se encuentra unido a las proteínas, sobre todo a la albúmina; 2) cerca del 5 % (0.15 a 0.2 mmol/L) se encuentra en forma de complejos, fundamentalmente con citrato, bicarbonato y fosfato; 3) el restante 50 % del calcio sérico (1,15 a 1,2 mmol/L) es la fracción ionizada Fig. 1. La regulación de la calcemia es ejecutada de manera precisa y llevada a cabo por diferentes mecanismos. Ante las posibles variaciones de la calcemia se ponen de manifiesto diversas líneas de regulación que operan tratando de llevar la misma a sus valores normales.^(1,9)

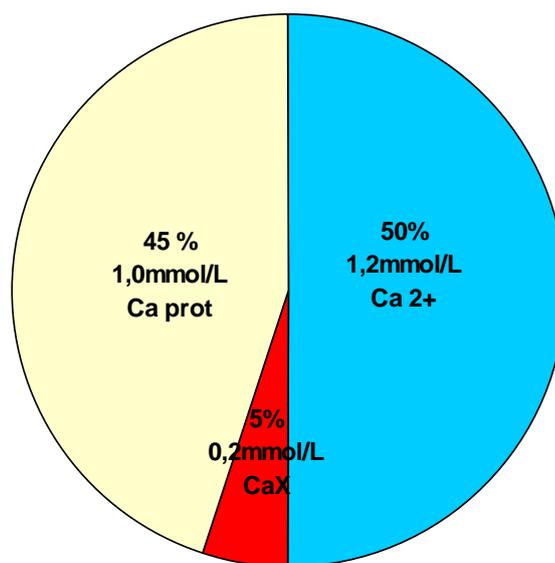


Fig. 1. Formas en que está presente el calcio sérico

1.1.5 Estabilidad del calcio en sangre del cordón umbilical

El calcio es estable en el suero por una semana entre 2-8 °C y hasta un año congelado. No se requiere de aditivos o preservantes especiales para el suero.⁽¹⁰⁾

1.1.6 Particularidades de la función del calcio en el recién nacido

1.1.6.1 Mecanismos de regulación de la calcemia en recién nacidos

El cuerpo de un neonato sano tiene un control estricto de los niveles de calcio en la sangre. Existen varias causas comunes de hipocalcemia en el recién nacido, que incluyen prematuridad, estrés, infección, diabetes materna y algunos medicamentos. Igualmente, existen algunas enfermedades poco comunes, como los trastornos del metabolismo, que pueden provocar niveles bajos de calcio.^(1,11)

La regulación de los niveles de calcio sérico en el recién nacido depende de un complejo sistema metabólico similar al adulto, en el que se hallan involucradas 3 hormonas: paratohormona (PTH), 1,25 dihidroxi-vitamina D (1,25 Vit D) y calcitonina.

La PTH es secretada por las células paratiroides cuando los niveles de calcio iónico disminuyen. Provoca movilización de calcio y fosfato del hueso, aumenta la reabsorción tubular renal de calcio e induce fosfaturia, además de estimular la producción renal de 1,25 Vit D.

La adquisición de la Vit D en el feto es vía placentaria, dado que la síntesis en la piel por estímulo de la luz solar no es posible. El hígado sintetiza 25 Vit D y luego el riñón con este sustrato elabora 1,25 Vit D; la vitamina biológicamente activa. La 1,25 Vit D incrementa los niveles plasmáticos de calcio y fosfato aumentando la absorción intestinal y la movilización de calcio y fosfato del hueso.

La calcitonina cumple un papel importante en la regulación del calcio durante la vida fetal y el periodo neonatal. Secretada por las células C del tiroides inhibe la resorción ósea y produce un efecto hipocalcemiante. Al momento del parto se interrumpe el flujo de calcio transplacentario y los niveles de calcio sérico disminuyen progresivamente durante las primeras 24 a 48 horas. Esto estimula la producción de PTH y permite recuperar lentamente la calcemia durante la primera semana de vida a través de la lactancia materna.^(1, 11)

1.1.6.2 Alteraciones en los niveles de calcio en el recién nacido

Hipocalcemia neonatal:

La hipocalcemia neonatal se define como una concentración de calcio entre 1,50 y 2,0 mmol/L. Se plantea que la hipocalcemia se presenta como consecuencia de la inmadurez de las glándulas paratiroides, que son las responsables del control de la calcemia. Este trastorno es más frecuente en los prematuros y en los recién nacidos con bajo peso al nacer, debido a que sus glándulas paratiroides son más inmaduras. También puede presentarse en neonatos con un parto difícil y neonatos de madres diabéticas. Los valores de calcio sérico bajos están entre las complicaciones que constituyen un riesgo para la vida.

Los síntomas de la hipocalcemia pueden no ser evidentes en los recién nacidos; los más comunes son: irritabilidad, espasmos musculares, impaciencia, temblores, letargo, convulsiones, sin embargo cada neonato puede experimentarlos de una forma diferente.

Además del examen físico y los antecedentes médicos completos, el diagnóstico de la hipocalcemia incluye análisis de sangre para determinar los niveles de calcio.^(9,11)

Hipercalcemia neonatal:

La hipercalcemia neonatal es un cuadro poco frecuente, se define como valores de calcio sérico mayores que un 2,60 mmol/L. Muchas veces es una patología asintomática, pero puede ser de presentación dramática cuando los valores de calcio son muy elevados pues pueden causar coma y paro cardíaco.^(9,11)

1.2 Consideraciones analíticas

1.2.1 Métodos de cuantificación del calcio sérico

1.2.1.1 Calcio total

Existen toda una serie de antecedentes analíticos encaminados a la determinación de calcio sérico. Se han desarrollado varias técnicas para este fin:

Técnicas volumétricas:

En la bibliografía consultada aparecen reportadas diferentes técnicas volumétricas utilizadas en la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical; dos ejemplos de ellas se relacionan a continuación. La primera se basa en la precipitación del calcio directamente en el suero con oxalato de amonio. La adición de ácido sulfúrico disuelve el precipitado de oxalato de calcio y libera ácido oxálico, que es medido luego por titulación redox con permanganato de potasio (oxidante); la aparición del color rosa, por exceso de permanganato, representa el final de la reacción. La segunda utiliza el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como agente quelante, cuando el calcio se encuentra quelado con el EDTA se produce un cambio de color de ciertos indicadores específicos (p. ej. Cal-red, eriocromo negro T y purpurato de amonio). El pH es decisivo para evitar al máximo las reacciones con otros iones divalentes, especialmente el Mg.^(9,12)

Técnicas fluorométricas:

La técnica de determinación fluorométrica del calcio se basa en la fluorescencia producida por la calceína o fluoresceína-complexona en una solución muy alcalina en presencia de calcio pero no de magnesio. Tiene como ventaja que requiere solo 20 µL de suero y poco tiempo para el análisis; las principales desventajas son las posibles interferencias no sospechadas en la prueba y la necesidad del equipamiento específico.⁽⁹⁾

Técnicas espectroscópicas:

La aplicación de la fotometría de llama (emisión) ha sido también descrita en las determinaciones de calcio sérico⁽¹³⁾, sin embargo, la espectroscopía de absorción atómica es el método de elección, así como de referencia. Aunque los métodos de absorción atómica generalmente están libres de interferencias espectrales, las interferencias químicas son eliminadas o compensadas a través de estándares calibrados. Las proteínas y los aniones fosfatos y sulfatos tienden a disminuir la absorción en la llama, para lo primero sólo se necesita una simple dilución de 100 veces y en el caso de los aniones, adicionando sales de estroncio o lantano al 0,1 %. En la técnica espectrofotométrica de absorción atómica, el elemento de interés en la muestra no se excita, sino que se disocia de sus enlaces químicos y se coloca en un

estado no excitado, no ionizado y en un estado mínimo de energía. En estas condiciones el elemento es capaz de absorber radiación externa que es la que se mide. Se usan lámparas de cátodo hueco como fuentes de luz o energía. La luz proveniente de la lámpara de cátodo hueco pasa a través de una llama en la cual se aspira la muestra.⁽¹⁴⁾

Técnicas espectrofotométricas:

Mientras diferentes metodologías han sido introducidas para el ensayo del calcio total, la que ofrece máxima sensibilidad y especificidad con fácil manejo, es la Espectrofotometría UV-VIS que involucra el uso de o-cresolftaleína complexona para unir al calcio en medio alcalino pues forma un complejo de color violeta que absorbe a 570 nm. La interferencia por el magnesio es minimizada por la adición de 8 hidroxiquinolona.^(2,15)

1.2.1.2 Calcio iónico

Han sido desarrolladas técnicas destinadas a la determinación del calcio iónico, muy útiles específicamente en el diagnóstico de la hipercalcemia relacionada con el hiperparatiroidismo. Un ejemplo de estas basa su detección en el uso de electrodos selectivos a iones que no responde a los aniones y tampoco a los quelatos de calcio, siendo por tanto muy específico para el Ca^{2+} . La muestra (suero, sangre total heparinizada o plasma heparinizado) debe ser recogida y manipulada anaeróbicamente, a fin de evitar cambios en el pH. Si se extrae en jeringa o capilar, se debe ocluir totalmente la entrada; si se usa tubo de vacío, no se debe abrir o manipular la muestra hasta su análisis. Para evitar cambios en el pH, debidos al metabolismo celular, la muestra debe ser procesada inmediatamente o ser centrifugada en tubo con gel separador, donde es estable a 4 °C, aproximadamente durante una semana, dado que la concentración del ión calcio se ve fundamentalmente influida por el valor del pH.^(9,16)

1.2.2 Fundamento teórico de la técnica de determinación de calcio sérico total por formación de complejos a través de la espectrofotometría UV-VIS

Muchos reactivos orgánicos quelatantes han sido aplicados a la separación y determinación de cationes inorgánicos. Los compuestos quelato coloreados son

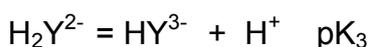
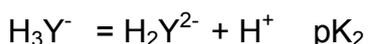
ampliamente utilizados en métodos espectrofotométricos de análisis y su formación y estabilidad están considerablemente influenciadas por el pH.

En 1945 G. Schworzenbach sugirió el empleo de aminas terciarias que contienen grupos carboxílicos para la formación de complejos estables. Estos reactivos se denominan "complexonas" las cuales forman una familia y son muy utilizadas para la determinación de diversos iones metálicos formándose en la reacción compuestos de coordinación o iones complejos. Estos compuestos de coordinación se forman, por lo general, cuando un ion metálico reacciona con especies donantes de pares de electrones; las especies donantes tienen uno o más pares de electrones disponibles para ser compartidos y se llaman ligandos. Los ligandos se clasifican en mono y polidentados; en general, los complejos formados con ligandos polidentados son más estables que los monodentados.

Los ligandos polidentados, como lo son las complexonas, forman con los iones metálicos complejos internos o quelatos los cuales tienen estructuras de anillos. Estos anillos están cerrados por uno o dos enlaces coordinados, favoreciendo la estabilidad del quelato cuando hay cinco o seis miembros en su estructura.

Para la aplicación de la formación de compuestos complejos en análisis cuantitativo, es importante considerar, entre otros aspectos, el número de ligandos, la velocidad de formación y la constante de estabilidad.

La característica fundamental de las complexonas es la presencia del grupo N-(CH₂COOH). Como ejemplo de complexonas se tienen el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y la o-cresolftaleína complexona, ambas son ácidos débiles que pueden disociarse según:



Los dos primeros protones se pierden más fácilmente que los otros dos. Además de los cuatro hidrógenos ácidos, existen en la molécula dos átomos de nitrógeno, cada uno con un par de electrones libres; por esta razón ambas complexonas son

ligandos hexadentados y los complejos que forman con iones metálicos son muy estables. Esta gran estabilidad puede explicarse por la estructura de los complejos ya que el número de grupos dentro de la molécula que se enlazan al ión metálico, lo rodean y lo aíslan.

La estabilidad de los complejos formados por la o-cresolftaleína complexona y el EDTA con iones metálicos es afectada por el pH del medio, mientras más baja sea la estabilidad del complejo mayor será el pH que deberá mantenerse durante la determinación. Considerando estos aspectos, para evaluar las posibilidades prácticas de una determinación complejométrica no basta con conocer el valor de la constante de estabilidad, sino que es necesario tener en cuenta también el pH del medio. ^(12,17)

En la literatura no aparecen reportados los valores de las constantes de estabilidad de los complejos de la o-cresolftaleína complexona con iones metálicos; sí pueden encontrarse estos valores para el EDTA, como se muestra en la Tabla 1.

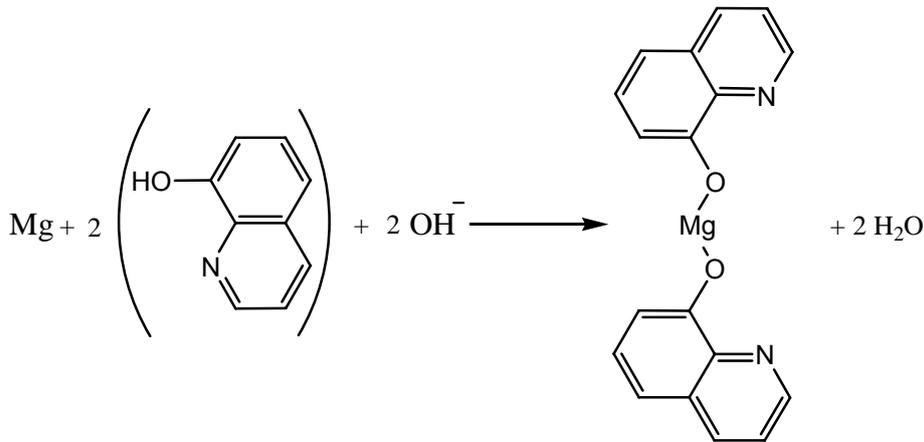
Tabla 1. Constantes de estabilidad de complejos del EDTA con algunos iones metálicos, a 20 (C y fuerza iónica 0.1 mol/L⁽¹⁷⁾

Catión	Log K(MY)
Ag ⁺	7,32
Mg ²⁺	8,69
Ca ²⁺	10,70
Sr ²⁺	8,63
Ba ²⁺	7,76

Además del efecto del pH sobre la estabilidad del complejo es importante considerar la posibilidad de que existan reacciones secundarias.

En la determinación espectrofotométrica de calcio sérico total utilizando la o-cresolftaleína complexona, esta se une al calcio en medio alcalino para formar una coloración púrpura la cual absorbe como máximo 570 nm y la intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración del calcio. El ión magnesio compite con el calcio debido a que se pueden formar complejos entre este ligando y el magnesio. La interferencia por el magnesio es minimizada por la

adición de 8-hidroxiquinolina ^(15,18), que se une al magnesio con mayor preferencia que al calcio a través de la reacción siguiente:



La preferencia de la 8-hidroxiquinolina por el magnesio más que por el calcio se justifica en los valores de las constantes de estabilidad de los complejos formados con estos iones metálicos que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Constantes de estabilidad de los complejos de la 8-hidroxiquinolina con los iones calcio y magnesio.⁽¹⁷⁾

Catión	Log K1	Log K2
Ca ²⁺	3,3	-
Mg ²⁺	4,7	3,7

1.2.3 Posibles interferencias en la determinación de calcio sérico a través del método espectrofotométrico que utiliza la o-cresolftaleína complexona

En la determinación de calcio por el método de la o-cresolftaleína complexona las interferencias se producen porque las determinaciones se realizan en complejas matrices constituidas por líquidos biológicos. Estos fluidos contienen cientos de compuestos que pudieran interaccionar, en cierto grado, con los reactivos utilizados o emular propiedades físicas o espectrales de la variable analítica estudiada. Esto se complica aún más teniendo en cuenta que la composición química de estos líquidos orgánicos puede variar según la naturaleza y el grado de los procesos patológicos.⁽¹⁵⁾

El origen y las causas de las interferencias son múltiples y múltiples serán por tanto las soluciones. Con el objeto de adaptar procedimientos para eliminar las

interferencias es importante distinguir aquellas que son inherentes al procedimiento in vivo y los del procedimiento in vitro:

1.2.3.1 In vivo

- *Uso de fármacos:* La determinación del calcio en sangre del cordón umbilical se altera por el uso de medicamentos como anticonvulsivantes, tiazidas, litio, etc. La administración de agentes quelantes en las intoxicaciones por plomo puede provocar resultados por defecto.^(2,16,19)

1.2.3.2 In vitro

Las interferencias in vitro son las que pueden producirse durante la determinación analítica.

- *Uso de anticoagulantes:* No se deben emplear anticoagulantes como el citrato, oxalato o EDTA, ya que forman complejos con el calcio que interfieren con los métodos espectrofotométricos ya que disminuyen los niveles.^(2,16)

- *Contaminación del material de extracción y almacenamiento con calcio:* En este procedimiento no debe trabajarse con materiales metálicos y el material, de vidrio o plástico, utilizado debe seguir una técnica de limpieza escrupulosa con el fin de evitar contaminación.⁽²⁾

Interferencia espectrofotométrica:

- *Hemólisis:* Los mecanismos por los cuales la hemólisis interfiere en los distintos análisis son varios, en las determinaciones espectrofotométricas la hemoglobina interfiere por su propio color. La hemólisis puede ser evitada estrictamente durante el procesamiento desde la toma de la muestra.

- *Ictericia:* La presencia de bilirrubina conjugada puede interferir en la determinación espectrofotométrica del calcio.

- *Lipemia:* La turbidez provocada por una concentración alta de triglicéridos provocará resultados aparentemente altos debido a que las diversas partículas de lípidos también absorben luz.

- *Interferencia matricial del magnesio:* Esta interferencia es eliminada al complejar el ión Mg^{2+} utilizando 8-hidroxiquinolina, que forma un compuesto de coordinación con el magnesio II más fuerte que el que forma la o-cresolftaleína complexota.⁽¹⁸⁾

1.3 Validación de los métodos analíticos

Existen numerosas definiciones de validación; según la norma ISO 8402 se define como: "la confirmación mediante el examen y la provisión de evidencia objetiva de que se han satisfecho los requisitos particulares para un uso pretendido y específico" donde se implica el concepto de adecuación a la finalidad o propósito perseguido, *'fit-for-purpose'*.

1.3.1 Necesidad de la validación de los métodos analíticos

La necesidad de efectuar el proceso de validación es resumida en los aspectos:⁽²⁰⁾

- Proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, lo que se traduce en una disminución del número de fallos y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados.
- Permite un conocimiento profundo de las características de funcionamiento del método analítico.
- Hace posible el cumplimiento de las exigencias legales.

1.3.2 Criterios para la selección de los parámetros de desempeño

El campo de aplicación del método determinará la extensión del trabajo de validación, por otro lado, los parámetros o elementos de desempeño analítico se proponen teniendo en cuenta el método de ensayo y el componente a determinar.

- Teniendo en cuenta el método de ensayo.

Se consideran seis categorías diferentes de métodos de ensayos químicos (Tabla 3) aplicables en los laboratorios químicos, entre los que se encuentran los laboratorios de química sanguínea.

Tabla 3. Diferentes categorías de métodos de ensayo según el grado de validación y el trabajo adicional recomendado

	Grado de validación externa	Validación interna recomendada
1	Método validado externamente mediante un ensayo colaborativo.	Verificación de veracidad y precisión.
2	Método validado externamente pero se utiliza para una nueva matriz o con nuevo instrumento.	Verificación de veracidad y precisión, también es posible establecer el límite de detección.
3	Método bien establecido, pero no validado.	Verificación, es posible una validación más extensa.
4	Método publicado en la literatura científica y con las características de ejecución más importantes establecidas.	Verificación, es posible una validación más extensa.
5	Método publicado en la literatura científica sin presentación de las características de ejecución.	El método necesita una validación completa.
6	Método desarrollado internamente.	El método necesita una validación completa.

- Según el analito a determinar.

Se puede considerar que los métodos de ensayo químicos se agrupan generalmente en dos grandes categorías, según este criterio:

- Cuantificación de un componente mayoritario.
- Cuantificación de una traza o componente minoritario.

Los métodos analíticos utilizados para determinar concentraciones próximas al límite de detección del método, requieren una validación más extensa que aquellos utilizados para determinar concentraciones muy por encima del límite de detección.^(5,19,21,22)

1.3.3 Parámetros de desempeño del método analítico

1.3.3.1 Linealidad

Se entiende como linealidad, la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito

para los cuales el método es satisfactorio. Debe definirse la linealidad para concentraciones que cubran el ámbito total de interés.

El rango especificado es normalmente derivado de los estudios de linealidad y depende de la aplicación del procedimiento. Se establece mediante confirmación que el procedimiento provee un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión cuando se aplica a muestras conteniendo cantidades de analito dentro o en los extremos del rango especificado del procedimiento analítico.

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del mismo. Para la realización de este ensayo en primer lugar conviene cerciorarse de que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar, para lo cual debe efectuarse un tanteo previo con varios patrones que abarquen un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer. Posteriormente se prepara una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes. El número de soluciones patrón puede estar comprendido entre 3 y 10 y el intervalo de concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra.^(23,24)

Interpretación estadística de la regresión:

a) *Por el coeficiente de correlación.* El coeficiente de correlación (r) refleja el grado de relación entre las variables "x" (concentración) e "y" (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil o no existe; si r es cercano a la unidad, el ajuste es bueno y esto es indicativo de una fuerte relación entre "x" e "y", o sea, significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Existen tablas de r que dan el grado de significación del valor obtenido para dicho coeficiente.

En análisis químico se obtienen valores de r elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien, en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,990).

Valores muy elevados de r no deben tomarse erróneamente como indicadores de linealidad; la linealidad se demuestra estadísticamente por otros procedimientos.

No conviene, por tanto, fijarse solo en la ecuación deducida y en el coeficiente de correlación para saber si la relación es lineal o presenta curvatura, sino que resulta recomendable ver la representación gráfica de los diferentes valores y del resultado del ajuste.

b) Por ensayos de linealidad. Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

I- Coeficiente de variación de los factores respuesta.

El factor de respuesta es la relación entre la lectura y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5 % indican falta de linealidad.

II- Significación estadística de la varianza de la pendiente "b" de la recta de regresión.

La pendiente "b" se llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad.

La desviación estándar relativa de la pendiente " $S_{brel}(\%)$ " se utiliza como expresión matemática de la linealidad y el criterio de aceptación es: $S_{brel}(\%) \leq 2 \%$.

c) Por test de proporcionalidad

En el caso ideal el valor de la intersección con el eje de las ordenadas u ordenada en el origen (a) debe ser cero pues indica el error sistemático del método. Si los límites de confianza del término independiente incluyen al cero, se cumple la condición de proporcionalidad.^(25,26)

1.3.3.2 Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea, o la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. Es la estimación de la variabilidad de las mediciones. Expresa la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra.

Cuando el estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra incluyendo todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental, se le denomina precisión del método. Si el estudio consiste en hallar la variabilidad de respuesta de una solución patrón entonces se le denomina precisión del sistema instrumental.

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudios:

Repetibilidad: Es la medida de la precisión de un método realizado bajo las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis realizados en un corto intervalo de tiempo.^(24,27)

Algunos autores plantean que la repetibilidad puede ser evaluada usando:

- a) Un mínimo de 9 determinaciones de la sustancia de interés variando los niveles de concentraciones especificados para el procedimiento, por ejemplo 3 concentraciones diferentes con 3 réplicas cada una.
- b) Un mínimo de 6 determinaciones y calcular la media aritmética (\bar{X}), desviación estándar (S), y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

En análisis que utilizan la técnica espectrofotométrica UV-VIS suelen darse como buenos, coeficientes de variación inferiores al 2-3 % en el ensayo de repetibilidad.⁽²⁵⁾

Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios, por ejemplo en estudios colaborativos, estandarizaciones de metodologías, etc.

Precisión intermedia: (*usualmente reproducibilidad intralaboratorio*) Precisión en condiciones intermedias entre repetibilidad y reproducibilidad. Por ejemplo, precisión con el mismo método, diferentes operadores, diferentes instrumentos y durante un intervalo de tiempo largo en el mismo laboratorio.⁽⁵⁾

Se pueden encontrar reportados en la literatura valores típicos de desviaciones típicas relativas aceptables para la precisión intermedia, basadas en las

concentraciones del analito, como se muestra en la Tabla 4⁽⁵⁾. El procedimiento estándar se basa en analizar 6 muestras diarias durante 3 días.⁽²⁵⁾

Tabla 4. Desviaciones típicas relativas aceptables recomendadas para la precisión a diferentes concentraciones del analito

Concentración del analito	CV (%)
1000 g/kg (100 %)	-
100 g/kg (10 %)	2
10 g/kg (1 %)	3
1 g/kg (10 ⁻¹ %)	4
100 mg/kg (10 ⁻² %)	5
10 mg/kg (10 ⁻³ %)	7
1 mg/kg (10 ⁻⁴ %)	11
100 µg/kg (10 ⁻⁵ %)	15
10 µg/kg (10 ⁻⁶ %)	21
1 µg/kg (10 ⁻⁷ %)	30
0.1 µg/kg (10 ⁻⁸ %)	43

Este criterio se fundamenta en la ecuación de Horwitz, que resume de manera concisa y útil la precisión relativa de los análisis realizados en la práctica.

A través de un análisis de varianza (*one way ANOVA*, $\alpha = 0.05$) es posible investigar si existen o no diferencias significativas entre los resultados de los diferentes días a partir del test de F.⁽²⁵⁾

El test de homogeneidad de varianza permite, además, el cálculo del estadígrafo de Cochran, técnica numérica para valores erráticos o atípicos. Si el experimento consta de varios niveles, la Prueba de Cochran se aplica en cada nivel por separado. El criterio de esta prueba se aplica estrictamente sólo cuando todas las desviaciones típicas se derivan del mismo número (n) de resultados de ensayos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad. Si la mayor desviación típica clasifica como un valor errático o atípico, entonces se debe omitir el valor y repetir la prueba de Cochran en los restantes valores.

La prueba de Cochran es una prueba para la variabilidad dentro del laboratorio y debe aplicarse primero, después se debe tomar cualquier acción necesaria, repitiendo las pruebas, si es necesario.^(5,25)

1.3.3.3 Exactitud o veracidad

Según la IUPAC (*international Union of Pure and Applied Chemistry*), la exactitud se define como el grado de concordancia de un resultado (o la media aritmética de un grupo de resultados) con el valor verdadero estimado o aceptado del componente químico que se está midiendo. Sobre este parámetro influyen cada una de las etapas del proceso analítico, desde la toma de muestra hasta la obtención del resultado, siendo, en la mayoría de los casos, la propia medida analítica la de menor influencia. Los errores sistemáticos dan lugar a desviaciones, siempre en el mismo sentido, de los resultados obtenidos respecto del valor verdadero; se deben a varias causas entre las que se encuentran defectos en el método, prácticas de análisis deficientes, mal funcionamiento de los instrumentos, patrones incorrectos, efectos de matriz, presencia de contaminación, errores en la curva de calibrado, pérdidas del elemento a determinar, etc. El error sistemático es aquella componente del error de medida que permanece constante o varía de una manera predecible, durante el curso de un número de medidas repetidas de la misma muestra.^(7,24)

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, o bien, en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero. El criterio de aceptación establecido para el recobro en métodos espectrofotométricos UV-VIS es $R = 97-103 \%$.^(22,24)

Estadísticamente suele efectuarse una prueba t de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. Si $t_{\text{calculado}} < t_{(\alpha; N-1)}$ cuando $\alpha = 0.05$ el método puede ser considerado exacto.

La determinación de la exactitud se puede llevar a cabo según:⁽²⁵⁾

a) Análisis repetitivo de una muestra de concentración única conocida. Se analiza varias veces (6-10) la muestra de concentración conocida de analito patrón y se evalúa la exactitud expresando los resultados en porcentaje respecto al teórico (recuperación), además, se efectúa una prueba t.

- b) Análisis repetitivo de varias muestras de concentraciones diferentes conocidas.
- c) Método de adición de patrón.
- d) Comparación con otro método analítico ya validado.

1.3.3.4 Especificidad

Selectividad y Especificidad

La selectividad describe la capacidad de un método analítico para diferenciar varias sustancias en la muestra. Este concepto es aplicable a métodos en los que se separan y cuantifican dos o más componentes.

En contraste con la selectividad, la especificidad describe la capacidad del método para medir inequívocamente el componente de interés en presencia de todos los demás constituyentes que se espera que puedan estar presentes. En este caso, este término se aplica a técnicas analíticas en las que se puede medir un único parámetro.

Según la IUPAC, la especificidad es considerada como una consecuencia de la selectividad, es decir, se basa en la suposición de que no pueden producirse interferencias. Ambos términos se usan frecuentemente de forma indistinta, y su conexión se ve claramente en la definición de especificidad siguiente: es la capacidad de medir exactamente y específicamente el componente a determinar en presencia de otros constituyentes que se espera que puedan estar presentes.⁽²⁴⁾

Existen varios procedimientos que permiten demostrar la especificidad de un método:⁽⁵⁾

- a) Se prepara un blanco de la muestra problema y se determina el analito en las condiciones del método.
- b) Se adiciona una cantidad de un patrón del analito a una porción del blanco recién preparado y se compara la respuesta con la de una solución patrón del analito. En ambas la concentración del analito será similar a la concentración teórica del mismo en el producto.
- c) Se añade una cantidad de una solución patrón de analito cargado con impurezas en concentraciones adecuadas a una porción del blanco recién preparado y se

compara la respuesta con una solución patrón del analito. La concentración del analito será similar a la concentración teórica del mismo.

Las referencias más actualizadas consultadas plantean que la especificidad será sólo estimada cuando sea posible, o lo que es igual, cuando la técnica usada para el análisis de la muestra permita investigar la especificidad, por ejemplo HPLC-DAD o GC/MS; en caso contrario, el estudio de la especificidad podrá ser reforzado a través de la comparación con otro método ya validado.^(4,25)

1.3.3.5 Sensibilidad. Limite de detección y Limite de cuantificación

Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo.

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación o determinación es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Numéricamente es mayor el límite de cuantificación y representa la menor cantidad de analito que puede analizarse con un coeficiente de variación aceptable. Concentraciones menores pueden detectarse pero no cuantificarse.

La determinación de los límites de detección y cuantificación cobra mayor importancia cuando el nivel inferior del rango del método analítico se acerca a estos límites.⁽²⁸⁾

Varios son los procedimientos que pueden utilizarse para la determinación de los límites de detección y cuantificación:^(5,25)

Basado en la evaluación visual:

El límite de detección es determinado por el análisis de muestras con concentraciones decrecientes conocidas del analito, estimando el nivel mínimo al cual puede ser detectado. El límite de cuantificación es generalmente determinado

por este procedimiento evaluando la menor cantidad del analito que puede ser cuantificado con aceptable precisión y exactitud.

Basado en la relación señal-ruido:

Este procedimiento es solo aplicado a técnicas analíticas que presentan línea base de ruido (técnicas cromatográficas), La determinación de la relación señal-ruido puede ser llevada a cabo por comparación de la señal de una muestra con una baja concentración conocida del analito con la respuesta de muestras blanco y estabilizando la concentración mínima a la cual puede ser detectado el analito. Una relación señal-ruido entre 3 o 2:1, es generalmente considerada aceptable para estimar el límite de detección. Por su parte el límite de cuantificación se establece para una relación señal-ruido 10:1.

Basado en el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración:

Si la recta de calibración del ensayo de linealidad se ha confeccionado con un rango de concentraciones bajo, se admite utilizar el término independiente a para estimar, aproximadamente, el límite de detección. El límite inferior de la respuesta se toma como $3 |a|$ y el límite de detección expresado en las mismas unidades que las abscisas en la recta de calibración es $3 |a| / b$.

Basado en la desviación estándar de la respuesta y en la pendiente:

El límite de detección (LD) o cuantificación (LC) puede ser expresado como:

$$C_L = \frac{K * S_{bl}}{b}$$

Donde:

C_L = límite de detección o cuantificación.

K = constante ($K = 3,3$ para límite de detección y $K = 10$ para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración.

La pendiente puede ser estimada por la curva de calibración del analito. La estimación de la desviación estándar puede ser desarrollada de varias formas, por ejemplo ^(5,25,29):

- a) *Basada en la desviación estándar del blanco*: analizando un número apropiado (al menos 10) de muestras blanco y calculando la desviación estándar de la respuesta. Este procedimiento es utilizado en métodos con corrección de lectura frente al blanco como por ejemplo la espectrofotometría UV-VIS, espectrofluorimetría, etc, en los que la lectura del problema se obtiene por comparación con un blanco.
- b) *Basada en la curva de calibración*: realizando una curva de calibración específica para este estudio usando muestras que contengan al analito en el intervalo del límite de detección y cuantificación. La desviación estándar residual de una línea de regresión o la desviación estándar del intercepto y de la línea de regresión puede ser usada como desviación estándar.

1.3.3.6 Robustez

El estudio de robustez evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico. Se entiende por robustez o solidez, un estudio destinado a demostrar experimentalmente el grado de afectación del procedimiento analítico por las variaciones de los factores que son sospechosos de alterar el método.

Entonces, si el procedimiento es “robusto” y, por consiguiente, inmune a modestas (e inevitables) desviaciones de alguna rutina habitual, los resultados obtenidos no deben alterarse debido a estas desviaciones menores. Si los resultados se alteran deberíamos conocer, por todos los medios, sobre estas desviaciones.

Existe un programa para hacer ligeras modificaciones en el método que tiene una eficiencia muy elevada para identificar aquellos cambios productores de efectos. La idea básica consiste en no estudiar una alteración por separado, sino introducir varios cambios de una vez de tal manera que el efecto de los cambios individuales pueda ser averiguado. La información obtenida en los ensayos de robustez puede ser utilizada para especificar las condiciones de aplicación del método.^(5,30)

1.4 Documentación en la validación. Procedimientos escritos

La fiabilidad de los resultados de la validación de un método analítico depende del estricto cumplimiento de los procedimientos para el muestreo, la manipulación y el ensayo de las muestras ^(6,31). Un procedimiento es aquel documento que describe la manera de realizar una actividad o proceso, contiene el propósito y ámbito de la actividad del proceso y describe lo que será hecho y por quién, cuándo y cómo será hecho, qué recursos serán usados y cómo será controlado.

El formato de los procedimientos contiene aspectos que pueden ser de carácter obligatorio u opcional: ^(7,32)

Título - *obligatorio*

Objetivo - *obligatorio*

Alcance - *obligatorio*

Términos y definiciones - *opcional*

Responsabilidades - *obligatorio*

Condiciones de seguridad - *opcional*

Equipamiento, materiales, reactivos - *opcional*

Operaciones preliminares - *opcional*

Procedimiento - *obligatorio*

Cálculo e interpretación de los resultados - *opcional*

Controles - *obligatorio*

Observaciones - *opcional*

Requisitos de documentación - *obligatorio*

Referencia - *opcional*

Bibliografía - *opcional*

Anexos - *opcional*

Encabezado con datos del procedimiento – *obligatorio*

1.4.1 Procedimientos de muestreo

Según la norma ISO/IEC 17025:2006, el laboratorio debe tener un plan y procedimientos para el muestreo cuando efectúe el muestreo de sustancias que luego ensaye. El procedimiento para el muestreo debe estar disponible en el lugar donde se realiza y debe tener en cuenta los factores a controlar, para asegurar las condiciones homogéneas en la toma de muestras, que garanticen la validez de los resultados del ensayo.

Los datos y operaciones relacionados con el muestreo que forma parte de los ensayos, deben ser registrados. Estos registros deben incluir el procedimiento de muestreo utilizado, la identificación de la persona que lo realiza, las condiciones ambientales (si corresponde) y los diagramas u otros medios equivalentes para identificar el lugar del muestreo según sea necesario.^(6,33)

1.4.2 Procedimientos para la manipulación de los ítems de ensayo

Los procedimientos para el transporte, la recepción, la manipulación, la protección, el almacenamiento y la conservación o disposición final de los ítems o muestras de ensayo, deben estar explícitamente documentados, incluyendo todas las disposiciones necesarias para proteger la integridad del ítem de ensayo.^(6,7)

1.4.3 Procedimientos para los métodos de ensayo

Cuando se utilizan métodos publicados en la literatura que sólo contienen las características de ejecución más importantes establecidas no es necesario que estos sean reescritos como procedimientos internos, pero sí proporcionar detalles adicionales que son los que conforman el procedimiento para el correcto desarrollo del método.^(7,34)

Capítulo II: Materiales y Métodos

2.1 Muestra utilizada en la validación del método espectrofotométrico UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona para la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical

En este estudio se utilizaron muestras de sangre del cordón umbilical provenientes del salón de partos del Hospital Universitario Gineco-Obstétrico “Mariana Grajales”.

2.1.1 Selección, toma y registro de los datos de la muestra de sangre de cordón umbilical

2.1.2 Selección de la muestra de sangre de cordón umbilical

La selección de la muestra de sangre de cordón umbilical se realiza considerando los criterios de inclusión y rechazo definidos para este estudio:

Criterios de inclusión:

Se incluyen los partos que:

- Tras valoración de la historia obstétrica, en el momento de la llegada a la maternidad, ésta se considere normal y los controles serológicos y de VIH de rutina previos, efectuados a la madre durante el embarazo, sean negativos.
- Se desarrollen de forma compatible con la realización de la recolección.

Criterios de rechazo:

Se consideran excluidos de la obtención de la sangre de cordón umbilical aquellos partos en que exista evidencia de enfermedad infecciosa transmisible.

Constituyen también una base para el criterio de rechazo la presencia de interferentes analíticos potenciales tales como suero icterico, turbidez, lipemia y hemólisis.

2.1.2.1 Toma de muestra de sangre de cordón umbilical

Tras el parto, el cordón umbilical se pinza precozmente (menos de 35 segundos) a 5,0 cm del ombligo con dos pinzas y a continuación se corta el cordón. Se inicia la recogida de la sangre mediante el drenaje por gravedad, cuando la placenta está aún dentro del útero. El cordón es previamente desinfectado con alcohol y soluciones yodadas. La muestra es tomada manteniendo la posición adecuada y sujeción efectiva del cordón umbilical para lograr un muestreo con éxito.

La sangre no debe precipitarse en el fondo del tubo para evitar la hemólisis, debe deslizarse por las paredes del tubo de ensayo.

2.1.2.2 Registro de los datos de la muestra de sangre de cordón umbilical

Cada muestra registrada se acompaña de la planilla informativa con los datos siguientes:

- N° de historia clínica (N° de TSH [hipotiroidismo congénito])
- Nombre y apellidos de la madre
- Dirección particular
- Tiempo de gestación a la hora del parto
- Sexo del neonato
- Peso al nacer
- Complicaciones perinatales

2.2 Precauciones a tener en cuenta para evitar interferencias espectrofotométricas por contaminación de la cristalería con calcio

En la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical no se utilizan materiales metálicos y todo material (de vidrio o plástico) es sometido a una técnica de limpieza escrupulosa con el fin de evitar contaminación de acuerdo a las instrucciones siguientes:^(2,16)

- Antes de ser usado, todo material es remojado en una solución de detergente en agua de la pila para remover toda grasa o residuos de sustancias químicas.
- Después de la limpieza inicial, la cristalería es sumergida en ácido clorhídrico 0,5 mol/L durante 24 horas, enjuagada con agua destilada hasta obtener un pH similar al del agua de enjuague (tres veces) y secada a 100° Celsius.

2.3 Materiales e Instrumental utilizados en la validación del método espectrofotométrico UV-VIS con la o-cresolftaleína complexona

- Viales plásticos de 1,5 mL tipo eppendorf con tapa
- Micro pipetas de 1- 5 μ L, 20 - 200 μ L y de 1000 μ L
- Puntas amarillas y azules para micro pipetas
- Tubos de centrifuga de cristal o plástico tratados con HCl 0,5 mol/L
- Volumétricos de 10, 50 y 100 mL
- Cronómetro

2.4 Técnica en estudio: Espectrofotometría UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical

2.4.1 Reactivos y equipos utilizados en la validación del método bajo estudio

- Juego de reactivos para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical por el método de la o-cresolftaleína complexona que contiene:⁽¹⁸⁾
 - Reactivo 1– Solución reguladora de pH 11 – 2,2 aminometilpropanol (3.5 mmol/L)
 - Reactivo 2 – Solución reactivo de color - o-cresolftaleína complexona (0.16 mol/L) y 8-hidroxiquinolina (6,89 mol/L)
 - Reactivo 3 – Solución patrón de calcio (2,5 mmol/L)
- Suero de referencia certificado Precipath U
- Solución estándar de magnesio 1000 mg/L certificada por la MERCK
- Espectrofotómetro Génesis 10
- Foto colorímetro Spekol 11

2.4.1.1 Preparación de los reactivos

Preparación del suero de referencia Precipath U:⁽³⁵⁾

El vial se destapa cuidadosamente con el fin de evitar la pérdida del material liofilizado; se agregan exactamente 5 mL de agua desionizada y se cierra cuidadosamente el vial. Se mezcla suavemente por inversión y se esperan 30 minutos hasta dilución completa. Para evitar la formación de espuma, se realizan suaves movimientos giratorios sin agitar.

Especificaciones del suero de referencia.⁽³⁵⁾

- El contenido de calcio es igual a 3,3100 mmol/L.
- El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta si se almacena de 2-8 °C y se protege de la luz.
- Los componentes en el suero reconstituido serán estables:
12 horas, entre 15 y 25 °C
5 días, entre 2 y 8 °C
1 mes, entre -25 y -15 °C (no congelar más de una vez)

Preparación de la solución de referencia Precipath U de concentración 2,5156 mmol/L de calcio y una adición de 4,6830 mmol/L de magnesio para descartar la posible interferencia del magnesio en la determinación de calcio:

A 38 µL del suero de referencia Precipath U (que contiene 3,3100 mmol/L de Ca y 1,8300 mmol/L de Mg) se le adicionan 4 µL de la solución estándar de magnesio (1000 mg/L) y se completan a un volumen de 50 µL con agua desionizada; obteniéndose la solución que contiene 2,5156 mmol/L de calcio y 4,6830 mmol/L de magnesio, que se utiliza en el análisis de la interferencia del magnesio en la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical.

2.4.2 Preparación de las muestras de sangre utilizadas en la validación del método espectrofotométrico UV-VIS con la o-cresolftaleína complexona

Los tubos de ensayo con sangre del cordón umbilical sin anticoagulante se centrifugan a 2500 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células del suero. Cada una de las muestras de suero se transfiere a viales de almacenamiento para la realización de la determinación de calcio.

Para la preparación del pool, utilizado en el estudio de validación que se desarrolla en este trabajo, se toman alícuotas de 20 muestras de suero de sangre del cordón. El volumen de las alícuotas depende de la disponibilidad de suero en cada una de las 20 muestras seleccionadas.

2.4.3 Desarrollo del método espectrofotométrico UV-VIS utilizando la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en el pool de suero

Condiciones de reacción:

Longitud de onda de trabajo: 570 nm

Volumen de muestra de suero: 50 µL

Volumen de reactivo 1 (solución reguladora): 2000 µL

Volumen de reactivo 2 (reactivo de color): 2000 µL

Volumen de reactivo 3 (solución patrón de calcio): 50 µL

Volumen total: 4,05 mL

Realización del ensayo de cuantificación de calcio en el pool de suero por el método espectrofotométrico UV-VIS de la o-cresolftaleína complexona:

Se espera que los reactivos alcancen la temperatura ambiente y se homogenizan antes de usarse.

Se colocan 2000 µL del reactivo 1 dentro de tubos marcados como blanco, patrón y problema y se añaden 2000 µL del reactivo 2 a cada uno de los tubos. Se adicionan 50 µ de suero, solución patrón o agua destilada en el tubo apropiado y se mezcla bien. Se leen y registran las absorbancias de patrón y muestras a 570 nm.

Método para los cálculos:

La concentración de calcio en la muestra se calcula utilizando las respuestas de absorbancia para la muestra y patrón, a través de la fórmula:

$$C_m = \frac{A_m * C_p}{A_p}$$

Donde:

C_m: concentración de calcio en la muestra (mmo/L)

C_p: concentración de calcio en la solución patrón (mmo/L)

A_m: absorbancia de la muestra

A_p: absorbancia de la solución patrón

2.5 Técnica de referencia: Espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical

2.5.1 Reactivos y equipo utilizados

- Solución de cloruro de lantano al 10 %

- Solución estándar de calcio 1000 mg/L certificada por la MERCK
- Equipo Pye Unicam Sp 9. Inglés

2.5.1.1 Preparación de los reactivos

Preparación de la solución de cloruro de lantano al 0,1 %

Se pipetea 10 mL de la solución de cloruro de lantano al 10 % y se enrasa en un volumétrico de 100 mL con agua desionizada.

Preparación de las soluciones para la verificación de la curva de calibración de calcio

Partiendo de la solución estándar de calcio de 1000 mg/L, se prepara una de 100 mg/L con agua desionizada, de la cual se toman alícuotas de 250, 500 y 1000 μ L que se enrasan en volumétricos de 50 mL con la solución de cloruro de lantano al 0,1 %. Estas soluciones representan los puntos para la verificación de la curva de calibración de calcio correspondientes a las concentraciones: 1,25; 2,50 y 4,99 mmol/L considerando el factor de dilución de 0,1 en 10 mL.

2.5.2 Preparación de las muestras del pool de suero analizadas por el método espectrofotométrico de absorción atómica

Se toman 0,1 mL del pool de suero de sangre del cordón umbilical, preparado como se indica en el epígrafe 2.4.2 de este capítulo y se transfieren a un volumétrico de 10 mL. Se enrasan con solución de cloruro de lantano al 0,1 %, resultando una dilución de 0.1 en 10 mL.

2.5.3 Desarrollo del método espectrofotométrico de absorción atómica para la determinación de calcio en el pool de suero

Ajuste de las condiciones de trabajo en el equipo

Longitud de onda: 422,7 nm

Monocromador: 0,2 nm

Quemador: 10 cm de aire/acetileno

Altura de la observación: 10 mm

Flujo de aire: 4,2 L/min

Presión de aire: 30 psi

Flujo de acetileno: 1,2 L/min

Presión de acetileno: 10 psi

Corriente de la lámpara: 5 mA

Tiempo de integración: 3

Precisión: 3 lecturas

Estándar: 4,99 mmol/L

Programa: 3

Realización del ensayo de cuantificación de calcio en el pool de suero por el método espectrofotométrico de absorción atómica:

El equipo se ajusta con el blanco (solución de cloruro de lantano al 0,1 %) y se verifica la curva de calibración de calcio con las tres soluciones de calcio preparadas para este fin; luego son leídas las muestras del pool.

2.6 Validación del método espectrofotométrico UV-VIS que utiliza la o-cresolftaleína complexona para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical

2.6.1 Linealidad

Se construyen tres curvas de calibración en el intervalo de concentraciones 0,9268 y 3,3100 mmol/L, con valores intermedios de 1,3240; 1,7212; 2,1184; 2,5156 y 2,9128 mmol/L. Para ello se utiliza la sustancia de referencia Precipath U de concentración de calcio 3,3100 mmol/L, a partir de la cual se realizan las diluciones siguientes con agua desionizada.

Volumen de Precipath U tomado para completar a 50 µL con agua desionizada.	Concentración de Ca resultante.
14,0 µL	0,9268 mmol/L
20,0 µL	1,3240 mmol/L
26,0 µL	1,7212 mmol/L
32,0 µL	2,1184 mmol/L
38,0 µL	2,5156 mmol/L
44,0 µL	2,9128 mmol/L
50 µL	3,3100 mmol/L

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales, se determina la ecuación de la recta, se calcula el coeficiente de correlación lineal (r), el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), la desviación estándar relativa de la pendiente [Sbrel

(%)] y el intervalo de confianza del intercepto (i). Se realiza también una prueba de t de Student para evaluar la sensibilidad del calibrado.

Los criterios de aceptación definidos para evaluar la capacidad del método analítico propuesto para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de calcio en sangre del cordón umbilical dentro del intervalo seleccionado, a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la linealidad, son:

- El coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,99.
- El cumplimiento de la condición de linealidad, que incluye el valor del coeficiente de variación menor al 5 % y de la desviación estándar de la pendiente menor del 2 %.
- El cumplimiento de la condición de proporcionalidad, que considera la inclusión del cero en el intervalo de confianza del intercepto.
- Los resultados del test de t para la pendiente con valores de $t_{exp} \geq t_{tab}$.

2.6.2 Precisión. Repetibilidad y Precisión intermedia

Para determinar el comportamiento de la repetibilidad del método se realizan seis réplicas del pool preparado con varias muestras de suero, bajo condiciones homogéneas para el análisis y se calcula la media de la concentración de calcio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la repetibilidad (CV_r) de los seis resultados obtenidos. El diseño para el experimento es el siguiente:

Parámetros estadísticos	Valores
Réplicas	N
Media (mmol/L)	X
Desviación estándar	S
CV_r (%)	CV

Para el estudio de la precisión intermedia se realiza el experimento anterior en tres días y por tres analistas diferentes. El experimento para cada día se diseña según el esquema siguiente:

Parámetros estadísticos	Día 1	Día 2	Día 3
Réplicas	n_1	n_2	n_3
Media (mmol/L)	X_1	X_2	X_3
Desviación estándar	S_1	S_2	S_3
CV (%)	CV_1	CV_2	CV_3

Los valores obtenidos en los tres días se analizan en un solo grupo y se calcula la media ($\langle x \rangle$); la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV %) de las 18 determinaciones efectuadas en los tres días.

Se calcula, además, la desviación estándar ($S_{\text{entre días}}$) y el coeficiente de variación entre los días ($CV_{\text{entre días}}$), así como el coeficiente de variación teórico según Horwith ($CV\%_{\text{Horwitz}}$).

La desviación estándar entre los días se calcula según:

$$S_{\text{entre días}} = \sqrt{[(MS_{\text{entre}} - MS_{\text{dentro}})/n] + MS_{\text{dentro}}}$$

Donde: n = número de mediciones por día.

El cálculo del coeficiente de variación entre los días se realiza utilizando la expresión:

$$CV_{\text{entre días}} = S_{\text{entre días}} / \langle x \rangle$$

El coeficiente de variación se calcula según:

$$CV\%_{\text{Horwitz}} = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

Donde: C = la media de las concentraciones de los tres días expresada en m/m que es calculada según:

Consideramos $C \text{ (mmol/L)} = C \text{ (mmol/kg)} = 0,001 \text{ mol/kg}$

Como la masa molar del calcio es 40 g/mol, entonces:

$$0,001 \text{ mol/kg} * 40 \text{ g/mol} = 0,04 \text{ g/kg} \text{ y}$$

$$0,04 \text{ g/kg} = 0.04 \text{ g}/1000 \text{ g} = 4*10^{-5} \text{ g/g}$$

Se realiza un análisis de varianza (one way ANOVA, $\alpha = 0,05$) para determinar el valor de $F_{\text{calculado}}$ con el objetivo de conocer si existen o no diferencias significativas entre los resultados de los diferentes días.

A partir del test de F se calcula el estadígrafo de Cochran (C) para conocer la homogeneidad de varianza en cada día por separado, para ello se computa la varianza de cada día (j) y se divide la mayor (máxima varianza) entre la suma de todas ellas utilizando la expresión:

$$C = [(s_{\text{máx}})^2 / \sum (s_i)^2]$$

Los criterios de aceptación definidos para evaluar la capacidad del método propuesto de dar resultados semejantes de concentración de calcio cuando se aplica repetidamente a una muestra de suero, a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la precisión son:

Criterio de aceptación para evaluar la repetibilidad del método bajo estudio:

- El coeficiente de variación de la repetibilidad no supera el valor del 3 %.

Criterios de aceptación para el análisis de la precisión intermedia del método propuesto:^(3,23)

- El valor de $CV\%_{\text{Entre días}} < CV\%_{\text{Horwitz}}$, entonces el coeficiente de variación obtenido en la precisión intermedia es aceptable y el método es considerado preciso.
- El valor de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$, criterio que demuestra que los resultados obtenidos en los diferentes días no difieren entre sí y que el método es preciso.
- Si el valor de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, pero $CV\%_{\text{Entre días}} < CV\%_{\text{Horwitz}}$ el método es también considerado de precisión aceptable.
- El valor $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabulado}}$ es un criterio a favor de la precisión del método porque no existen variaciones del método para los tres días estudiados.

2.6.3 Exactitud

Para determinar la exactitud del método UV-VIS a través del análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida, se realizan seis réplicas a una solución de

2,5156 mmol/L del suero de referencia Precipath U y el experimento se diseña según el esquema siguiente:

Parámetros estadísticos	Valores
Réplicas	n
Conc. media experimental (mmol/L)	\bar{C}_x
Concentración teórica (mmol/L)	C_{TEOR}

El valor medio determinado experimentalmente y el certificado se comparan a través de la expresión:

$$\frac{\bar{C}_x}{C_{TEOR}} = \frac{R}{100\%}$$

Donde:

\bar{C}_x : Concentración media experimental

C_{TEOR} : concentración teórica

R: % de recuperación media

Además, se realiza una prueba de hipótesis t de Student, planteando como hipótesis nula que: $\bar{C}_x = C_{TEOR}$ y como hipótesis alternativa: $\bar{C}_x \neq C_{TEOR}$ para demostrar si los recobrados obtenidos difieren significativamente de 100; para ello se utiliza la expresión:

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV}$$

Donde:

R: % de recuperación media

n: número de determinaciones

CV: coeficiente de variación del % de recuperación en cada determinación

El valor experimental de t, (t_{exp}), se compara con el valor t de la tabla, ($t_{(1-\alpha),v}$), donde $\alpha = 5\%$ y $v = n-1$.

Los criterios de aceptación considerados para evaluar la exactitud del método a través del análisis repetitivo de una muestra de referencia de concentración única conocida son:

- El valor de la recuperación media se encuentra en el intervalo $97 \% \leq R \leq 103 \%$, criterio que demuestra que $\bar{C}_x = C_{\text{TEOR}}$ y el método es considerado exacto.
- El valor de $t_{\text{exp}} < t_{(1-\alpha),v}$, por lo que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y 100, confirmando la veracidad del método.

Para comprobar la exactitud del método espectrofotométrico UV-VIS sometido a la validación, se compara con el de espectrofotometría de absorción atómica; para ello se realizan repetidas determinaciones al pool por ambos métodos ($n = 13$). Las medias de la concentración de calcio obtenidas, se comparan a través de la prueba t de comparación de medias de muestras independientes, utilizando el programa Stat Graphics-5.

Se considera como hipótesis nula: $\text{media}_{(\text{UV-VIS})} = \text{media}_{(\text{EAA})}$ y como hipótesis alternativa: $\text{media}_{(\text{UV-VIS})} \neq \text{media}_{(\text{EAA})}$

2.6.4 Especificidad

Para investigar la posible interferencia del magnesio en la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical por el método propuesto, se obtuvo el espectro UV-VIS de una solución de suero de referencia Precipath U con concentración de calcio 2,5156 mmol/L, contaminada con 4,6830 mmol/L de magnesio (Ca con interferente), de una solución estándar de magnesio de concentración 2,8500 mmol/L (interferente) y de una solución de referencia Precipath U sin magnesio (Ca sin interferente). Se comparan las señales espectrales de la primera solución con cada una de las otras dos.

Además, se cuantifican las concentraciones de calcio en seis réplicas de la solución de suero de referencia Precipath U, con concentración de calcio 2,5156 mmol/L y de magnesio 4.6830 mmol/L. Se calcula la media experimental y el valor del % de recobro. Se comparan los resultados del valor del % de recobro obtenido experimentalmente con interferente en la muestra ($R_{\text{con interferente}}$) y el obtenido sin interferente ($R_{\text{sin interferente}}$).

El criterio de aceptación definido para evaluar la capacidad del método propuesto para medir inequívocamente el calcio en presencia del magnesio, como posible

interferente en el suero, a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la especificidad es:

- El método da iguales resultados con y sin interferente, lo que se demuestra a través de los valores del % de recobro en ambos casos.

El estudio de la especificidad del método es corroborado a través de la comparación con otro método ya validado, la espectrofotometría de absorción atómica, que se describió anteriormente como un procedimiento para determinar la exactitud.

2.6.5 Sensibilidad. Límite de detección(LD) y Límite de cuantificación(LC)

Se determinan los límites de detección y cuantificación utilizando el procedimiento basado en la desviación estándar de la respuesta y en la pendiente, para ello se preparan una serie de 10 muestras blancos y se le realizan las correspondientes lecturas de absorbancia.

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se procede según:

$$C_l = \frac{K * S_{bl}}{b}$$

Donde:

C_l : límite de detección o cuantificación

$K = 3,3$ para límite de detección y $K = 10$ para límite de cuantificación

S_{bl} : desviación estándar de la respuesta de los n blancos

b : pendiente de la recta de calibración

El criterio de aceptación considerado para analizar los resultados de la sensibilidad del método es:

- La menor cantidad de calcio que es posible cuantificar, permite la utilización del método propuesto para la determinación de este analito en suero de sangre del cordón umbilical.

2.6.6 Robustez

Se desarrolla el ensayo de robustez a través del análisis de tres parámetros que podrían originar fluctuaciones, ellos son: equipos de marcas diferentes para la lectura, lote de reactivos químicos (recientemente abierto y con varias semanas de

uso), y tiempo de estabilidad del complejo en la determinación (a tiempo cero y a los 30 min después de desarrollado el color).

Para diseñar la prueba de robustez se otorgan dos valores (normal y alternativo) a cada uno de los tres factores de variabilidad y se desarrolla un diseño factorial 2^3 . Las tres condiciones se designan con las letras A, B y C y los valores cambiados con las correspondientes letras minúsculas.

Factor de variabilidad	Normal	Alternativo
Equipo (A/a)	Génesis 10 (A)	Spekol (a)
Reactivo (B/b)	Reactivo nuevo (B)	Reactivo usado (b)
Tiempo de estabilidad del complejo (C/c)	Tiempo 0 (C)	30 min (c)

Se efectúan 8 análisis de la muestra de pool y cada análisis es una combinación diferente de los tres factores. Para cada factor se definen cuatro combinaciones de los valores “normales” y cuatro de los “alternativos”. Los resultados para los análisis se designan por las letras **s a z**.

El diseño presentado para la prueba de las condiciones experimentales es el siguiente:

Condición experimental	Valores de las condiciones en la determinación N°							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Equipo	A	A	A	A	a	a	a	a
Reactivo	B	B	b	b	B	B	b	b
Tiempo	C	c	C	c	C	c	C	c
Valor experimental	s	t	u	v	w	x	y	z

Para hallar si el factor cambiante **A** a **a** tiene efecto, se compara el promedio $(s+t+u+v)/4$ con el promedio $(w+x+y+z)/4$; el diseño anterior muestra que las determinaciones 1, 2, 3 y 4 son corridas con el factor en el nivel **A** y las determinaciones 5, 6, 7 y 8 con el factor en el nivel **a**.

Diferencias para cada factor:

$$D_A = \frac{1}{4}(s+t+u+v) - \frac{1}{4}(w+x+y+z) = A-a$$

$$D_B = \frac{1}{4}(s+t+w+x) - \frac{1}{4}(u+v+y+z) = B-b$$

$$D_C = \frac{1}{4}(s+u+w+y) - \frac{1}{4}(t+v+x+z) = C-c$$

Se obtienen las diferencias de los promedios de **A-a**, **B-b** y **C-c** y se ordenan sus valores modulares de mayor a menor. Si algún factor tiene efecto, sus diferencias serán sustancialmente mayores que las diferencias asociadas con otros factores.

Se determinan los factores que tienen diferencias significativas en los resultados de ensayo, comparando el valor hallado en D_A , D_B y D_C con la expresión:

$$S_r \sqrt{2}$$

donde S_r es la desviación típica de la repetibilidad del método de ensayo. Para estimar la desviación típica, se elevan al cuadrado las diferencias y se extrae la raíz cuadrada de $\frac{2}{3}$ de la suma de los cuadrados de esas diferencias.

$$s = \sqrt{\frac{2}{3} \left[\sum_{i=1}^n (dif)^2 \right]}$$

El criterio de aceptación considerado para analizar si el método es robusto ante estos cambios es:

- Las diferencias superiores en valor absoluto a $S_r \sqrt{2}$ se consideran significativas⁽³⁾ y por tanto el método es sensible al factor que origina esa diferencia.

2.6.6.1 Estudio de la estabilidad en el tiempo del complejo del calcio con la o-cresolftaleína complexona

La técnica descrita en la literatura para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical por el método de la o-cresolftaleína complexona, plantea que el color desarrollado en la reacción es estable durante 30 minutos. Teniendo en cuenta que en este trabajo se valida el método espectrofotométrico UV-VIS con el fin de aplicarlo para la investigación, sería conveniente contar con un margen más amplio de tiempo para poder determinar varias muestras a la vez, sin afectar la fiabilidad de los resultados.

Se obtuvieron las lecturas de absorbancia de 11 réplicas del pool a los tiempos 0, 40, 50 y 60 minutos, para desarrollar el estudio del comportamiento de la estabilidad del complejo en los tiempos seleccionados. Se realizó una prueba t para comparación de medias de dos muestras dependientes a través del programa Stat Graphs-5. Para ello se comparan las medias de los tiempos 0 y 40, 0 y 50, 0 y 60; asumiendo como grupo 1 el tiempo 0 y como grupo 2, los tiempos 40, 50 ó 60 minutos, según corresponda.

Se considera como hipótesis nula: $(\text{grupo 1} - \text{grupo 2}) = 0$ y como hipótesis alternativa: $(\text{grupo 1} - \text{grupo 2}) \neq 0$.

2.7 Desarrollo de los procedimientos para el muestreo, manipulación y ensayo de calcio en las muestras de sangre del cordón umbilical

Se desarrollaron los procedimientos que abarcan los procesos de muestreo, manipulación y ensayo de la técnica validada para la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical. Se utilizó el formato indicado para la confección de Procedimientos de laboratorio.

En el encabezado se relacionan los datos relacionados con el procedimiento en particular y en el contenido se incluyen los aspectos siguientes:

- Objetivo
- Alcance
- Responsabilidades
- Condiciones de seguridad
- Local
- Equipos, materiales, reactivos (según proceda)
- Desarrollo
- Registro
- Control
- Referencias (si procede)

2.8 Aplicación de la técnica validada y los procedimientos elaborados a la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical

Con el objetivo de aplicar la técnica validada y los procedimientos elaborados en este trabajo, se determinaron los valores de calcio sérico en sangre del cordón umbilical a un total de 174 muestras y se calculó la media y desviación estándar.

Capítulo III: Resultados y Discusión

3.1 Validación del método espectrofotométrico UV-VIS que utiliza la o-cresoltaleína complexona para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical

3.1.1 Linealidad

Los resultados experimentales (comprendidos en el intervalo 0,9268 y 3,3100 mmol/L) obtenidos para cada nivel de concentración analizado en el estudio de linealidad, se muestran en la Tabla 5 y se grafican en la curva de calibración de la Figura 1. Los parámetros de la recta de regresión calculados aparecen en la Tabla 6.

Tabla 5. Resultados experimentales del estudio de linealidad

x (conc. mmol/L)	y (absorbancia)	f = y/x (factor de respuesta)
0,9268	0,199	0,2147
0,9268	0,218	0,2352
0,9268	0,191	0,2061
1,3240	0,271	0,2047
1,3240	0,278	0,2100
1,3240	0,269	0,2032
1,7212	0,347	0,2016
1,7212	0,359	0,2086
1,7212	0,344	0,1999
2,1184	0,439	0,2072
2,1184	0,444	0,2096
2,1184	0,428	0,2020
2,5156	0,526	0,2091
2,5156	0,532	0,2115
2,5156	0,519	0,2063
2,9128	0,623	0,2139
2,9128	0,613	0,2104
2,9128	0,615	0,2111
3,3100	0,699	0,2112
3,3100	0,692	0,2091
3,3100	0,700	0,2160

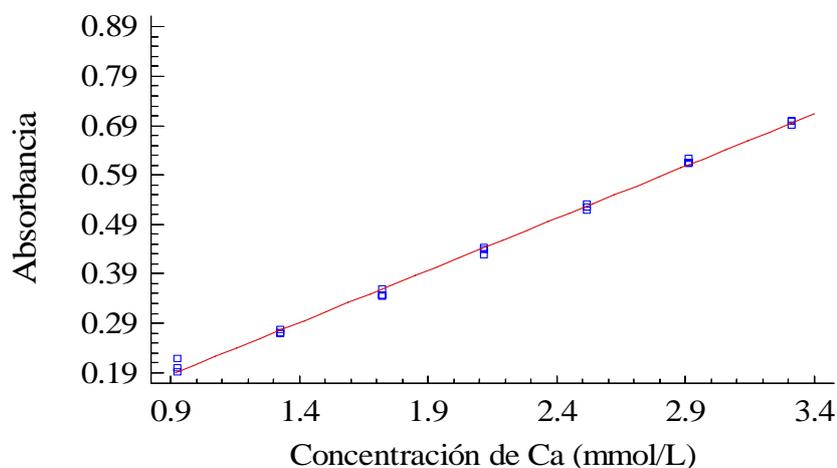


Figura 1. Curva de calibración para el calcio en sangre del cordón umbilical

Tabla 6. Parámetros de la recta de regresión del estudio de linealidad

Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Número de datos (n)	21	-
Intervalo de linealidad (mmol/L)	0,9268 – 3,3100	-
Coefficiente de correlación (r)	0,9985	$r \geq 0,99$
Pendiente (b)	0,2111	-
Desviación estándar relativa de la pendiente (Sbrel (%))	1,2582	$Sbrel \leq 2,00 \%$
Ordenada en el origen (a)	-0,004	-
Intervalo de confianza de a	-0,01658 a 0,00858	Que contenga el cero
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (CVf(%))	3,4181	$CVf \leq 5 \%$
Test estadístico de b (t tab(19; p = 0.05))	tcalc = 79,4782 ttab = 1,73	texp \geq ttab

A través de los parámetros de linealidad calculados para los datos anteriores, se obtiene que el coeficiente de correlación es mayor que 0,99, valor establecido como criterio para la linealidad en métodos espectrofotométricos UV-VIS. El coeficiente de variación de los factores respuesta es menor que el 5 % y la desviación estándar relativa de la pendiente es menor que el 2 %, por lo que se cumple con la condición de linealidad. El intercepto no difiere significativamente del punto (0,0), resultado que responde acertadamente a la condición de proporcionalidad y el test de t de la pendiente resultó $t_{exp} \geq t_{tab}$, criterio que avala la linealidad del método.

Como el estudio de la linealidad cumple con los criterios de aceptación establecidos, se considera que el método analítico propuesto, es capaz de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de calcio en sangre del cordón umbilical, dentro del intervalo de concentraciones de 0,9268 a 3,3100 mmol/L. Estos resultados demuestran la utilidad clínica del método propuesto, teniendo en cuenta que las cantidades esperadas de analito en la muestra están entre 1,50 y 3,31 mmol/L.⁽³⁶⁾

3.1.2 Precisión. Repetibilidad y Precisión intermedia

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la repetibilidad, obtenidos bajo condiciones homogéneas de análisis, y en la Tabla 8 los resultados derivados del estudio de la precisión intermedia efectuados en tres días y por tres analistas diferentes.

Tabla 7. Resultados de la repetibilidad del método espectrofotométrico UV-VIS en estudio

Parámetros estadísticos	Valores
Réplicas (mmol/L)	2,4586
	2,5276
	2,4539
	2,4770
	2,4908
	2,5459
Media(mmol/L)	2,4923
Desviación estándar	0,0373
CVr (%)	1,4982

Tabla 8. Resultados de la precisión intermedia obtenidos en tres días y por tres analistas diferentes

Parámetros estadísticos	Valores		
	Día 1	Día 2	Día 3
Réplicas (mmol/L)	2,4586	2,5929	2,5956
	2,5276	2,5155	2,6138
	2,4539	2,5232	2,5319
	2,4770	2,4807	2,5865
	2,4908	2,5039	2,5274
	2,5459	2,5309	2,6097
Media (mmol/L)	2,4923	2,5245	2,5775
Desviación estándar	0,0373	0,03780	0,0384
CV (%)	1,4982	1,4975	1,4881

A diferencia de la repetibilidad, en la precisión intermedia se analizan los datos obtenidos en los tres días como un solo grupo; los resultados del análisis estadístico se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros obtenidos en el estudio de la precisión intermedia teniendo en cuenta los resultados experimentales de los tres días

Parámetros estadísticos	Valores
Media (mmol/L)	2,5314
Desviación estándar	0,0507
Coefficiente de variación (CV %)	2,00
Desviación estándar entre los días ($S_{\text{entre días}}$)	0,0550
Coefficiente de variación entre los días ($CV\%_{\text{Entre días}}$)	2,18
Coefficiente de variación teórico (CV_{Horwitz})	7,98
$F_{\text{calculado}}$	7,7536
F_{tabulado} (F(0.05,2,15))	3,68
$C_{\text{calculado}}$	0,3426
C_{tabulado}	0,707

Según lo expuesto en Tabla 7 para la repetibilidad del método, los resultados cumplen con el criterio de aceptación de este parámetro debido a que el coeficiente de variación obtenido (1,50 %) es menor que un 3 %.

Se obtiene, a través del análisis de la precisión intermedia expuesto en la Tabla 9, que los cálculos realizados para los coeficientes de variación entre los días y según Horwitz, confirman que $CV\%_{\text{Entre días}} < CV\%_{\text{Horwitz}}$, por tanto se considera este criterio como de precisión aceptable del método. La comparación de los valores de F obtenidos de ANOVA evidencian que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ lo que indicando que los resultados obtenidos en los tres días son significativamente diferentes, posiblemente por el cambio de analistas en cada uno de los días estudiados. El resultado anterior no es excluyente para la evaluación de la precisión intermedia porque se obtuvo que $CV\%_{\text{Entre días}} < CV\%_{\text{Horwitz}}$ y por tanto el método es considerado de precisión aceptable. La comparación del valor de la C de Cochram calculado con el tabulado muestra que $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabulado}}$, entonces la variación del método es considerada igual para los tres días estudiados y es este un criterio que avala la precisión intermedia del método.

Como el estudio de la precisión, evaluado a través de los resultados de los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, cumple con los criterios de aceptación establecidos, se considera que el método estudiado es capaz de dar resultados semejantes de concentración de calcio cuando se aplica repetidamente a una muestra.

3.1.3 Exactitud

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la evaluación de la exactitud del método UV-VIS a través del análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida. En la Tabla 11 aparecen los resultados experimentales de la cuantificación de calcio en el pool de suero, determinada por el método bajo estudio y por espectrofotometría de absorción atómica y en el Anexo 1, el análisis estadístico de la comparación de las medias de la concentración de calcio, obtenidas por ambas técnicas.

Tabla 10. Parámetros obtenidos en el estudio de la exactitud a través del análisis repetitivo de una muestra de la sustancia de referencia de concentración 2.5156 mmol/L

Parámetros estadísticos	Valores
Réplicas (mmol/L)	2,4861
	2,5465
	2,5232
	2,4535
	2,4582
	2,4628
Concentración media experimental (\bar{C}_x)	2,4884 mmol/L
Concentración conocida (C_{TEOR})	2,5156 mmol/L
Valor de recobrado obtenido (R)	98,91 %
t_{exp}	1,99
t_{tab} (t(5,0.05))	2.01

Tabla 11. Valores obtenidos en la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical por el método UV-VIS estudiado y por espectrofotometría de absorción atómica

Parámetros estadísticos	Concentración de calcio (mmol/L)	
	UV-VIS	EAA
Réplicas (mmol/L)	2,5274	2,58
	2,5276	2,53
	2,5865	2,53
	2,4770	2,55
	2,4908	2,56
	2,5459	2,45
	2,5929	2,53
	2,5155	2,55
	2,5232	2,57
	2,5319	2,49
	2,5039	2,57
	2,5309	2,58
	2,5956	2,51
Media (mmol/L)	2,5345 +/- 0,02264	2,5384 +/- 0,02299
t _{exp}	0,26	t _{exp} < t _{tab}
t _{tab} (t(12,0.05))	1,78	

El valor de recobrado para el nivel de concentración evaluado se encuentra dentro del rango 97-103 % y el test de t resultó $t_{exp} < t_{tab}$, criterios que avalan la exactitud del método, como se observa en la Tabla 10. Considerándose que no existen diferencias significativas entre la concentración teórica conocida y la obtenida experimentalmente ($\bar{C}_x = C_{TEOR}$), con un aceptable coeficiente de variación.

Como se evidencia en la Tabla 11 y el Anexo 1, al comparar las medias de las concentraciones de calcio en sangre del cordón umbilical, obtenidas por las dos técnicas cuantitativas, el valor de $t_{exp} < t_{tab}$ y la significación es mayor que 0,05, por lo que se acepta la hipótesis nula y no existen diferencias significativas entre las medias.

El estudio de la exactitud a través del análisis repetitivo de una muestra de sustancia de referencia Precipath U de concentración conocida por el método evaluado y de la comparación con otro método ya validado, evidencia que el método desarrollado en este trabajo se encuentra libre de errores sistemáticos que den lugar a desviaciones de los resultados obtenidos respecto al valor verdadero.

El resultado obtenido de la comparación del método en estudio con el de absorción atómica, es un criterio de confirmación que corrobora los resultados del estudio de especificidad.^(2,23)

3.1.4 Especificidad

En las Figuras 2 y 3 se muestran los espectros de absorción obtenidos para descartar la posible interferencia del magnesio en la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical y en la Tabla 12, los valores de los parámetros evaluados experimentalmente con interferente ($R_{\text{con interferente}}$) y sin interferente ($R_{\text{sin interferente}}$) en la muestra.

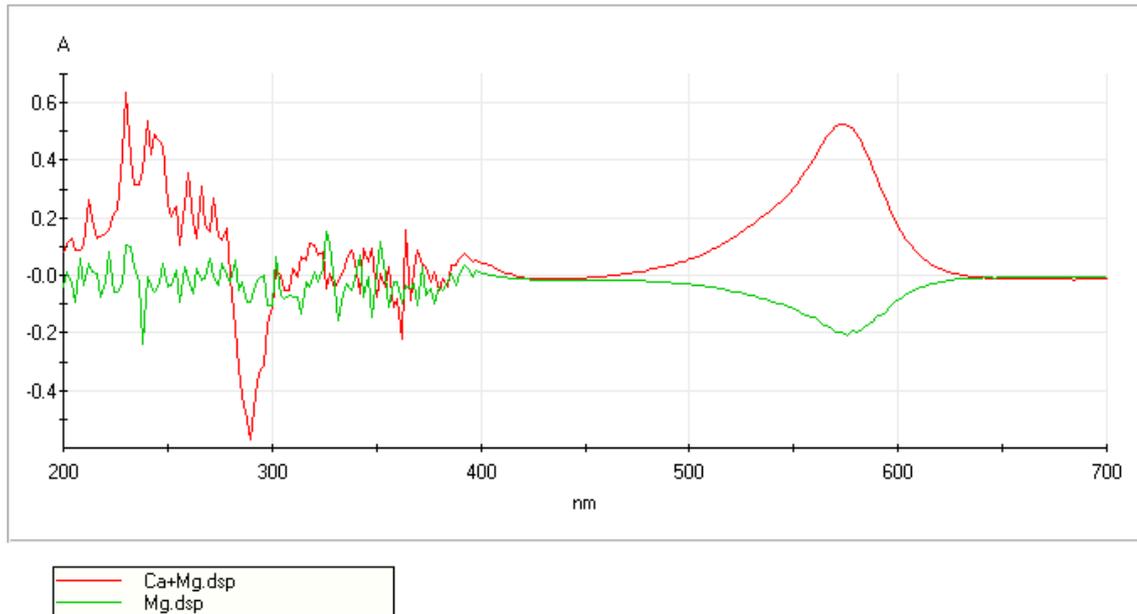


Figura 2. Espectros de absorción correspondientes a la solución (Ca con interferente) y a la solución (interferente)

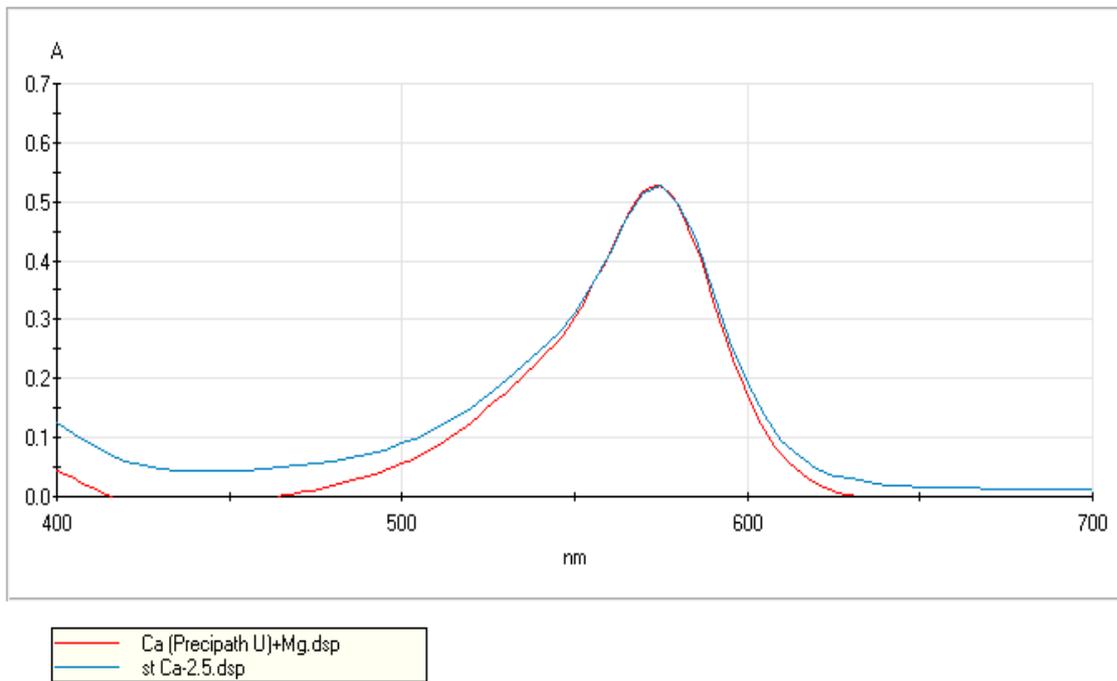


Figura 3. Espectros de absorción correspondientes a la solución (Ca con interferente) y a la solución (Ca sin interferente)

Tabla 12. Parámetros obtenidos para el análisis de la posible interferencia del magnesio en la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical

Parámetros estadísticos	Valores sin magnesio	Valores con magnesio
Réplicas	2,4861	2,4971
	2,5465	2,5363
	25232	2,5134
	2,4535	2,4632
	2,4582	2,4550
	2,4628	2,4627
Concentración media experimental (\bar{C}_x)	2,4884 mmol/L	2,48795 mmol/L
Concentración conocida (C_{TEOR})	2,5156 mmol/L	
Valor de recobrado obtenido (%)	98,91	98,90

Como se muestra en la Figura 2, al comparar el espectro UV-VIS de la solución de suero de referencia Precipath U con concentración de calcio 2,5156 mmol/L, contaminada con 4,6830 mmol/L de magnesio (Ca con interferente), con el de la solución estándar de magnesio de concentración 2,8500 mmol/L (interferente) y en la Figura 3, al comparar el espectro UV-VIS de la solución de suero de referencia Precipath U con concentración de calcio 2,5156 mmol/L, contaminada con 4,6830 mmol/L de magnesio (Ca con interferente) con el de la solución de referencia sin

magnesio (Ca sin interferente), se observa que el ión Mg^{2+} no interfiere con la lectura realizada a 570 nm.

A través del análisis de los valores expuestos en la Tabla 12, se observa que los valores del % de recobro con interferente ($R_{\text{con interferente}}$) y sin interferente ($R_{\text{sin interferente}}$) son iguales por lo que la cuantificación de calcio por el método propuesto no se afecta con la presencia del magnesio. Estos resultados demuestran la utilidad clínica del método bajo estudio, teniendo en cuenta que los niveles normales del magnesio en suero están entre 0,7 y 1,0 mmol/L.⁽¹⁾

Los criterios para comprobar la especificidad del método espectrofotométrico UV-VIS estudiado, son corroborados a través de su comparación con el de absorción atómica que se expone como parte del análisis del parámetro exactitud.

Como los resultados obtenidos en el estudio de la especificidad, cumplen con los criterios establecidos para este parámetro, se considera que el método propuesto es específico para cuantificar inequívocamente el calcio en presencia de los constituyentes presentes en el suero de sangre del cordón umbilical.

3.1.5 Sensibilidad: Límite de detección(LD) y Límite de cuantificación(LC)

En la Tabla 13 se muestran los límites de detección y cuantificación de calcio obtenidos en suero de sangre del cordón umbilical.

Tabla 13. Límites de detección y cuantificación obtenidos para la cuantificación de calcio por el método espectrofotométrico UV-VIS en estudio

Límite de detección: $LD = \frac{3.3 * S_{bl}}{b}$	0,17 mmol/L
Límite de cuantificación: $LC = \frac{10 * S_{bl}}{b}$	0,52 mmol/L

A partir de los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación se considera que el método analizado es sensible para determinar calcio en sangre del

cordón umbilical y se conoce un estimado de la menor cantidad de este analito que es posible analizar.

Los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación demuestran la adecuación del método a las exigencias de su aplicación clínica porque los valores de concentración de calcio en sangre del cordón umbilical, siempre estarán por encima de los límites determinados ya que los mecanismos de regulación de la concentración de calcio en suero (calcemia) predicen que el intervalo normal está entre 2,0 y 2,6 mmol/L y que la calcemia inferior a 1,5 mmol/L es incompatible con la vida.^(1,36)

3.1.6 Robustez

En la Tabla 14 aparecen los resultados de las ocho combinaciones originadas por los tres parámetros escogidos para el estudio de la robustez (equipos, reactivos y tiempo de estabilidad del complejo). El análisis del efecto de los tres factores señalados anteriormente aparece en la Tabla 15.

Tabla 14. Resultados del estudio de robustez

Condición experimental	Valores de las condiciones en la determinación N°							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Equipo	A	A	A	A	a	a	a	a
Reactivo	B	B	b	b	B	B	b	b
Tiempo	C	c	C	c	C	c	C	c
Valor experimental	2,4749	2,4900	2,248	2,5250	2,5805	2,4548	2,4094	2,4849

A: Equipo Génesis

a: Equipo Spekol

B: Reactivo recién abierto

b: Reactivo con varias semanas de uso

C: Tiempo de lectura inmediato

c: Tiempo de lectura a los 30 minutos de iniciada la reacción

Tabla 15. Análisis de la influencia de cada factor en el resultado analítico

Diferencias para cada factor		Significación
D _A (equipo)	0,0062	Sr = 0,0373
D _B (reactivo)	0,0415	s = 0,0375
D _C (tiempo)	0,0187	S _r √2 = 0,0527

Como ninguna de las diferencias (en valor absoluto) para cada factor sobrepasa el valor de $S_r\sqrt{2}$, se cumple con el criterio de aceptación establecido para el ensayo de robustez y se considera que las condiciones estudiadas no alteran el resultado analítico por lo que el método es robusto ante estos cambios.

3.1.6.1 Estudio de la estabilidad en el tiempo del complejo del calcio con la o-cresoltaleína complexota

El estudio experimental de la estabilidad del complejo se muestra en la Tabla 16 y el resumen estadístico en el Anexo 2.

Tabla 16. Valores de Absorbancia obtenidos para cada tiempo estudiado

Parámetros estadísticos	Absorbancia a cada tiempo de lectura			
	Tiempo 0	40 min.	50 min.	60 min.
Réplicas	0,548	0,488	0,479	0,471
	0,489	0,457	0,452	0,444
	0,580	0,542	0,535	0,528
	0,552	0,514	0,507	0,501
	0,527	0,496	0,492	0,487
	0,563	0,522	0,515	0,508
	0,549	0,495	0,488	0,481
	0,542	0,506	0,502	0,499
	0,562	0,526	0,521	0,517
	0,533	0,495	0,490	0,486
	0,532	0,483	0,477	0,473
Media	0,5434	0,5022	0,4962	0,4905
Desv. Est.	0,0057	0,0055	0,0054	0,0056
CV (%)	1,04	1,08	1,08	1,14

En el análisis de la Tabla 16 y Anexo 2, reportado por el programa estadístico, se obtienen valores para la significación menores que 005 en todas las comparaciones, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se considera que existen diferencias significativas entre las lecturas de absorbancia tomadas a tiempo 0, 40, 50 y 60 minutos, por lo que no es posible extender el tiempo para la lectura por encima de los 30 minutos.

3.2 Desarrollo de los procedimientos para el muestreo, manipulación y ensayo de calcio en las muestras de sangre del cordón umbilical

En los Anexos 3, 4 y 5 se muestran los procedimientos desarrollados para el muestreo, manipulación y ensayo de calcio en las muestras de sangre del cordón umbilical utilizadas.

Los procedimientos elaborados constituyen documentos que contienen la descripción de los aspectos que es necesario tener en cuenta para la correcta realización de la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical, en ellos se incluyen las medidas de Bioseguridad y las precauciones que deben cumplirse para garantizar un resultado confiable. Específicamente los procedimientos para la toma y manipulación de las muestras, serán utilizados en trabajos futuros, destinados a la

validación y puesta en práctica de otras técnicas para determinar parámetros bioquímicos en este tipo de muestra.

3.3 Aplicación de la técnica validada y los procedimientos elaborados a la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical

Se determinaron los valores de calcio sérico en sangre del cordón umbilical a un total de 174 muestras y se obtuvo la media y la desviación estándar que aparece en la Tabla 17, siendo similar a la encontrada en la literatura.^(1,9)

Tabla 17. Resultados obtenidos de la aplicación del método validado

Media (mmol/L)	2,2058
Desviación estándar	0,3842

Como se evidencia los valores de calcio determinados en las muestras de sangre del cordón analizadas se encuentran por encima de los límites de detección y cuantificación determinados en este trabajo; además, estos se encuentran dentro del rango de normalidad de concentración de calcio sérico para recién nacidos reportado en la literatura, demostrando las garantías de calidad que ofrece la técnica validada y la utilización de los procedimientos de laboratorio.

CONCLUSIONES

1. La evaluación de los parámetros de validación: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, sensibilidad y robustez en el método espectrofotométrico UV-VIS, que utiliza la o-cresolftaleína complexona, demostró su adecuado funcionamiento y fiabilidad para determinar calcio en sangre del cordón umbilical.
2. Se elaboraron tres procedimientos que abarcan los procesos de muestreo, manipulación y ensayo de calcio en las muestras de sangre del cordón umbilical.
3. Los resultados obtenidos al aplicar la técnica validada y los procedimientos elaborados a la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical, se encuentran dentro del rango de normalidad de concentración de calcio en suero reportado en la literatura.

RECOMENDACIONES

1. Aplicar los procedimientos para la toma y manipulación de las muestras de sangre del cordón umbilical en el montaje de otras técnicas destinadas a evaluar parámetros bioquímicos en este tipo de muestra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 10^{ma} ed. México: Mc Wraw Hill Interamericana; 2001.
2. Suardíaz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio clínico. La Habana: Ciencias Médicas; 2004.
3. De Toro Salas A, Dueñas J, De Jaime E. Concentraciones de calcio y de marcadores de remodelamiento óseo en sangre del cordón umbilical y en orina del recién nacido en el parto. Anales de pediatría [serie en Internet]. 2001 [citado Dic 2007] 54 (3): [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://db.doyma.es/cgibin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.resumen?pident=10021547>
4. Regulación No. 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: CEDMED; 2007.
5. Norma cubana NC-TC-368:2004. Guía para la validación de métodos químicos. La Habana; 2004.
6. Álvarez M. La Calidad de los Laboratorios Analíticos. Cuba: Universidad de la Habana; 2007.
7. Norma ISO/IEC 17025:2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración; 2006.
8. Shriver D, Atkins F. Inorganic chemistry. 3nd ed. New York: Freeman and Company; 2003.
9. Burtis C, Ashwood E. Fundamentals of clinical chemistry. 5th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
10. Cruz L, Monge N, Valero J, et al. Estabilidad de las magnitudes bioquímicas. Quim Clin. 2002;21:52-61.
11. Blumsohn, A.; Hadari, A. Parathyroid hormone: what are we measuring and does it matter? Ann Clin Biochem 2002; 39:169-72.
12. Harris D, Quantitative Chemical Analysis. 6th ed. New York: Freeman and Company; 2003.
13. Norma cubana NC 20-06-20:1987 Ciencias Médicas. "Determinación fotométrica de calcio en suero humano". Método de análisis químico.
14. Milner B, Whiteside P. Introduction to atomic absorption spectrophotometry. England: Pye Unicam Ltd. York Street ; 1984.
15. Kang H, Scott M, Joe B. Model for predicting the impact of gadolinium on plasma calcium measured by the o-cresolphthalein method. ClinChem. 2004;50(4):741-6.
16. Morán L. Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006.
17. Aguilar A, Chacón E, Cordeiro E. Temas de Química Analítica II. Universidad de la Habana; 1988.
18. HELFA Diagnósticos. Calcio en suero. La Habana: Suministrador E.P.B. "Carlos J. Finlay"; 2007
19. Siest, G. Análisis clínicos y medicamentos. Ed. Doyma. 2002.
20. Joachim E, John H. Method validation in pharmaceutical analysis. A guide to best practice. Belgium: Mc B. Miller; 2005.

21. Ríos G, Fernández S. Validación de los métodos analíticos empleados en el estudio de inyectable de fosfato de disopiramida. *Rev Cubana Farm.* 2003;37(2):51-7.
22. Ríos A, Téllez H. *Trends in Anal. Chem.* 2005;24:509.
23. Reichenbacher M, Einax J. *The analytical challenge.* Germany: Friedrich-Schiller-Universität. Inst. of Inorganic and Analytical Chem; 2006.
24. AOAC International, Method validation programs. Peer Verified Programs. [article of the internet]. 2002 [cited 2006 Dec 10]; [about 3p.]. Available from: [http://aoac.org/vmeth/peerverimtd\[1\].htm](http://aoac.org/vmeth/peerverimtd[1].htm).
25. Apers S, Theunis M. *Validation. Laboratory of pharmacognosy.* Belgium: University of Antwerp; 2006.
26. Trygg J, Svante W. *Introduction to statistical experimental.* Australia: University of Queensland; 2003.
27. Pulido I, Ruisánchez R. *Analítica. Chim. Acta.* 2002;455:267-77.
28. Morales S, Calvo A, Estévez D. *Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y HPLC para la determinación de G-1 en plasma humano.* Trabajo de Diploma. Facultad de Química y Farmacia. UCLV. 2006.
29. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC, *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis,* (IUPAC Technical report), *Pure Appl. Chem.* 2002; 74:835.
30. Romero R, Gazquez D, Sanchez-Viñas M. *A geometric approach to robustness testing in analytical HPLC.* *LCGC North America.* 2002;20(1):72.
31. Cámara C. *Toma y tratamiento de muestras.* La Habana: Editorial Síntesis; 2002.
32. Angelini N. *Consultoría Internacional de la FAO. Validación de metodología para Análisis Químico.* 2006.
33. *Norma cubana NC-ISO 2859-0:2000. Procedimientos de Muestreo.*
34. Sardinias O, Hernández T. *Aseguramiento de la calidad en un laboratorio acreditado.* *Rev Cub Hig Epidemiol.* 2002;40(1):16-9.
35. Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim. 2007.
36. Heil W, Koberstein R, Zawta B. *Reference ranges for adults and children. Preanalytical considerations.* Francais: Roche Diagnostics; 2002.

Anexo 1. Comparación estadística de los resultados analíticos obtenidos por las técnicas espectrofotométricas UV-VIS y de Absorción Atómica.

Summary Statistics

	Col_1 UV-VIS	Col_2 EAA
Count	13	13
Average	2.53455	2.53846
Variance	0.00139489	0.00144744
Standard deviation	0.0373483	0.0380452
Minimum	2.477	2.45
Maximum	2.5956	2.58
Range	0.1186	0.13
Std. skewness	0.710773	-1.61052
Std. kurtosis	-0.363608	0.771746

Comparison of Means

95.0% confidence interval for mean of Col_1: 2.53455 +/- 0.0225694
[2.51198,2.55712]

95.0% confidence interval for mean of Col_2: 2.53846 +/- 0.0229905
[2.51547,2.56145]

95.0% confidence interval for the difference between the means

Assuming equal variances: -0.00390769 +/- 0.0305179 [-0.0344256, 0.0266102]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

Assuming equal variances: t = -0.264274 P-value = 0.793825

The Stat Advisor

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -0.0344256 to 0.0266102. Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95.0% confidence level.

A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is not less than 0.05, we cannot reject the null hypothesis.

Anexo 2. Resumen estadístico del estudio de la estabilidad del complejo del calcio con la o-cresolftaleína complexona en el tiempo.

Test para la comparación de las lecturas de absorbancia obtenidas a tiempo 0 y 40 minutos:

Sample mean = 0.0411818

t-test

Null hypothesis: mean = 0.0

Alternative: not equal

Computed t statistic = 14.8004

P-Value = 3.97625E-8

Reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

The StatAdvisor

This pane displays the results of three tests concerning the center of the population from which the sample of Col_1-Col_2 comes. The first test is a t-test of the null hypothesis that the mean Col_1-Col_2 equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the mean Col_1-Col_2 is not equal to 0.0. Since the P-value for this test is less than 0.05, we can reject the null hypothesis at the 95.0% confidence level.

Test para la comparación de las lecturas de absorbancia obtenidas a tiempo 0 y 50 minutos:

Sample mean = 0.0471818

t-test

Null hypothesis: mean = 0.0

Alternative: not equal

Computed t statistic = 14.9363

P-Value = 3.64232E-8

Reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

The StatAdvisor

This pane displays the results of three tests concerning the center of the population from which the sample of Col_1-Col_3 comes. The first test is a t-test of the null hypothesis that the mean Col_1-Col_3 equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the mean Col_1-Col_3 is not equal to 0.0. Since the P-value for this test is less than 0.05, we can reject the null hypothesis at the 95.0% confidence level.

Test para la comparación de las lecturas de absorbancia obtenidas a tiempo 0 y 60 minutos:

Sample mean = 0.0529091

t-test

Null hypothesis: mean = 0.0

Alternative: not equal

Computed t statistic = 15.517

P-Value = 2.52355E-8

Reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

The StatAdvisor

This pane displays the results of three tests concerning the center of the population from which the sample of Col_1-Col_4 comes. The first test is a t-test of the null hypothesis that the mean Col_1-Col_4 equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the mean Col_1-Col_4 is not equal to 0.0. Since the P-value for this test is less than 0.05, we can reject the null hypothesis at the 95.0% confidence level.