



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN
LLAMA Y ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN
MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE CALCIO EN
SOLUCIONES ACUOSAS**

AUTOR:

Br. Yenisca Zambrano

Tutor:

Prof. Dr. Francisco Ustáriz

Mérida – Venezuela

2015



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN
LLAMA Y ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN
MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE CALCIO EN
SOLUCIONES ACUOSAS**

Requisito que presenta Br. Yenisca Nataly Zambrano Novoa
Para optar al título de Licenciada en Bioanálisis.

Tutor:

Prof. Dr. Francisco Javier Ustáriz Fajardo

Mérida – Venezuela

2015

ÍNDICE

	Pág.
CAPÍTULO I. Marco Teórico.	
I.1. Fundamentos Teóricos.....	1
I.1.1. El calcio y su función en el organismo.....	1
I.1.2. Metabolismo del calcio.....	2
I.1.3. Valores de referencia del calcio en el organismo.....	4
I.1.4. Determinación de los valores de calcio en el organismo.....	4
I.1.5. Validación de Métodos.....	5
I.1.5.1. Linealidad.....	5
I.1.5.2. Límite de Detección.....	8
I.1.5.3. Límite de Cuantificación.....	9
I.1.5.4. Exactitud.....	10
I.1.5.5. Precisión.....	11
I.1.5.6. Especificidad.....	12
CAPÍTULO II. Planteamiento del Problema. Antecedentes de la Investigación. Objetivos. Hipótesis.	
II.1. Planteamiento del Problema.....	13
II.2. Antecedentes de la Investigación.....	15
II.3. Hipótesis.....	19
II.4. Objetivos.....	20
II.4.1. Objetivo General.....	20
II.4.2. Objetivos Específicos.....	20
CAPÍTULO III. Metodología y Plan de Trabajo	
III.1. Materiales y Métodos.....	21
III.1.1. Materiales.....	21

III.1.2. Reactivos.....	22
III.1.3. Soluciones.....	22
III.1.4. Instrumentos.....	22
III.2. Metodología analítica.....	23
III.2.1. Procedimiento analítico.....	23
III.2.2. Métodos analíticos.....	23
III.2.3. Instrumentación Analítica.....	
CAPÍTULO IV. Validación de la Metodología	
IV.1. Validación de la metodología analítica para la determinación de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama.....	29
IV.1.1. Determinación de la Linealidad para el calcio.....	30
IV.1.2. Determinación de Limite de Detección y Limite de Cuantificación.....	31
IV.1.3. Determinación de la Precisión para el calcio.....	32
IV.1.3.1. Análisis de Repetibilidad.....	33
IV.1.3.2. Análisis de la Precisión intermedia.....	33
IV.1.4. Determinación de la Exactitud para el calcio.....	33
IV.1.4.1. Curva de Adición estándar para la determinación de calcio.....	34
IV.1.4.2. Porcentaje de Recuperación para calcio.....	34
IV.2. Validación de la metodología analítica para la determinación de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Molecular.....	35
IV.2.1. Determinación de la Linealidad para el calcio.....	36
IV.2.2. Determinación de Limite de Detección y Limite de Cuantificación.....	37
IV.2.3. Determinación de la Precisión para calcio.....	37

IV.2.3.1. Análisis de Repetibilidad.....	37
IV.2.3.2. Análisis de la Precisión intermedia.....	38
IV.2.4. Determinación de la Exactitud para el calcio.....	38
IV.2.4.1. Curva de Adición estándar para la determinación de calcio.....	38
IV.2.4.2. Porcentaje de Recuperación para calcio.....	38
CAPÍTULO V. Resultados y Discusión	
V.1.- Validación de la metodología analítica para la determinación de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama (EAA).....	40
V.1.1. Determinación de la linealidad para el calcio.....	40
V.1.2. Determinación de Limite de Detección y Limite de Cuantificación.....	43
IV.1.3. Determinación de la Precisión para el calcio.....	44
IV.1.3.1. Análisis de Repetibilidad.....	45
IV.1.3.2. Análisis de la Precisión intermedia.....	46
IV.1.4. Determinación de la Exactitud para el calcio.....	47
IV.1.4.1. Curva de Adición estándar para la determinación de calcio.....	47
IV.1.4.2. Porcentaje de Recuperación para calcio.....	49
V.2.- Validación de la metodología analítica para la determinación de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Molecular (EAM).....	50
V.2.1. Determinación de la linealidad para el calcio.....	50
V.2.2. Determinación de Limite de Detección y Limite de Cuantificación.....	54
IV.2.3. Determinación de la Precisión para el calcio.....	54
IV.2.3.1. Análisis de Repetibilidad.....	55

IV.1.3.2. Análisis de la Precisión intermedia.....	55
IV.1.4. Determinación de la Exactitud para el calcio.....	57
IV.1.4.1. Curva de Adición estándar para la determinación de calcio.....	57
IV.1.4.2. Porcentaje de Recuperación para calcio.....	59
CAPÍTULO VI. Conclusión	60
CAPÍTULO VII. Recomendación	61
REFERENCIAS	

bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Criterios de aceptación de parámetros estadísticos de comprobación de la linealidad de un método analítico.....	8
Tabla 2. Definiciones de términos de la Ley de Beer.....	25
Tabla 3. Condiciones de trabajo del espectrofotómetro Perkin Elmer 3110 para determinación de calcio por absorción atómica.....	27
Tabla 4. Preparación de las soluciones para el Análisis de Recuperación de calcio por EAA con Llama.....	35
Tabla 5. Preparación de las soluciones para el Análisis de Recuperación de calcio por EAM.....	39
Tabla 6. Valores de las absorbancias en función de las concentraciones de los patrones de calcio obtenidas mediante su análisis por EAA con Llama.....	40
Tabla 7. Resultados del Análisis de Varianza en EAA.....	42
Tabla 7.1. Resultados del Análisis de Varianza en EAA.....	42
Tabla 8. Resultados de los criterios de aceptación de parámetros estadísticos de comprobación de la linealidad de un método analítico.....	43
Tabla 9. Valores de las absorbancias de las soluciones blanco obtenidos para la determinación del Límite de detección y Limite de cuantificación para calcio mediante EAA con Llama...	43
Tabla 10. Resultados de las lecturas del patrón intermedio calcio de concentración (0,30 mg/dL) para el análisis de repetibilidad del método EAA con Llama.....	45
Tabla 11. Resultados de las absorbancias del patrón intermedio	46

de calcio de concentración (0,30mg/dL) para la determinación la precisión intermedia del método.....

Tabla 12. Resultados obtenidos en la prueba de Adición Estándar para determinación de calcio por el método de EAA con Llama.....

Tabla 13. Resultados del Análisis de Recuperación de calcio mediante EAA con Llama.....

Tabla 14. Resultados del porcentaje de recuperación de calcio mediante EAA con Llama.....

Tabla 15. Valores de las absorbancias en función de las concentraciones de los patrones de calcio obtenidas mediante su análisis por EAM, con longitud de onda de 572,5 nm.....

Tabla 16. Resultados del Análisis de Varianza en EAM.....

Tabla 16.1. Resultados del Análisis de Varianza en EAM.....

Tabla 17. Resultados de los criterios de aceptación de parámetros estadísticos de comprobación de la linealidad de un método analítico.....

Tabla 18. Valores de las absorbancias de las soluciones blanco obtenidos para la determinación del Límite de detección y Limite de cuantificación para calcio mediante EAM.....

Tabla 19. Resultados de las lecturas del patrón intermedio calcio de concentración (5 mg/dL) para el análisis de repetibilidad del método EAM.....

Tabla 20. Resultados de las absorbancias del patrón intermedio de calcio de concentración (5mg/dL) para la determinación la precisión intermedia del método.....

Tabla 21. Resultados obtenidos en la prueba de Adición Estándar para determinación de calcio por el método de

47

49

49

51

52

53

53

53

55

56

57

EAM.....

Tabla 22. Resultados del Análisis de Recuperación de calcio 59
mediante EAM.....

Tabla 23. Resultados del porcentaje de recuperación de calcio 48
mediante EAM.....

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema estructural de un instrumento de Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama.....	27
Figura 2. Esquema estructural de un Fotocolorímetro.....	28
Figura 3. Espectrofotómetro Perkin Elmer 3110.....	30
Figura 4. Fotocolorímetro BioStat – Fax 1915.....	36

bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1. Curva de Calibración para la determinación de calcio mediante EAA con Llama.....	41
Grafica 2. Curva de regresión lineal para la determinación de calcio mediante EAA con Llama.....	41
Grafica 3. Curvas de calibración simple sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas mediante EAA con Llama.....	48
Grafica 4. Curvas de calibración con regresión lineal sin adición y con adición de estándar con Regresión lineal para la determinación de calcio en soluciones acuosas mediante EAA con Llama.....	48
Grafica 5. Curva de Calibración simple para la determinación de Calcio mediante EAM.....	51
Grafica 6. Curva de calibración con regresión lineal para la determinación de calcio mediante EAM.....	52
Grafica 7. Curva de calibración simple sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas por EAM.....	58
Grafica 8. Curva de calibración con regresión lineal sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas por EAM.....	58

bdigital.ula.ve

Dedicatoria

A Gisela Novoa, por hacer

Posible este sueño.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por la vida y las oportunidades, por ser testigo y acompañante en todo este camino.

A mi Madre, por su amor incondicional y motivación, por ser mi pilar... por creer en mí.

A mi hermana, por el apoyo y siempre estar presente.

A mi sobrina, por alegrar e inspirar mis días.

A mis Ángeles: Papi y Abuela Flor, sé que desde el Cielo me guían.

A toda mi familia por apoyarme en cada paso dado, por siempre estar para mí.

A David Salcedo, por compartir conmigo este sueño, escucharme y alentarme. Por su amor.

A la ilustre Universidad de Los Andes y la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por abrirme sus puertas, donde transite todo este camino hasta la añorada meta.

A mi tutor el Profesor Francisco Ustáriz, por el tiempo, apoyo y dedicación para que este trabajo concluyera exitosamente.

A la Profesora Ledy Linares, por su ayuda, tiempo dedicado y sobre todo paciencia.

A la profesora Evelia Arévalo con quien inicie este trabajo.

A la profesora Anunziata De Santis por su colaboración.

A todos los que hacen vida en el Laboratorio de Análisis Instrumental por su aporte educativo, enseñanzas brindadas y sus palabras para animarme.

A mis amigas por cada momento compartido, este es solo el inicio del resto de nuestra vida profesional.

...Yenisca!

VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN LLAMA Y ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE CALCIO EN SOLUCIONES ACUOSAS

Autora: Br. Yenisca Nataly Zambrano Novoa

Tutor: Prof. Dr. Francisco Ustáriz

Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Escuela de Bioanálisis.

Laboratorio de Análisis Instrumental. Mérida –Venezuela.

0274-2403463

RESUMEN

Los minerales son sustancias inorgánicas requeridas por el cuerpo para una variedad de funciones. Uno de los minerales más importante para el ser humano es el calcio. Se considera un elemento esencial para el organismo. La determinación de los niveles de calcio juega un papel fundamental en el diagnóstico clínico, tanto para asegurarnos del funcionamiento óptimo de nuestro organismo como para la determinación de ciertas patologías caracterizadas entre otros signos y síntomas por un exceso o un déficit de calcio. Tradicionalmente, ha sido difícil medir el calcio de manera exacta y precisa, habiéndose desarrollado una gran variedad de métodos para este efecto. Entre los cuales se encuentran los métodos clásicos, métodos instrumentales y métodos electroquímicos. En este estudio se escogió el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama (EAA) y Espectrofotometría de Absorción Molecular (EAM). Esta determinación se debe hacer por métodos que estén validados, esta validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. El resultado del proceso de validación permitió determinar que tanto el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) y Espectrofotometría de Absorción Molecular (EAM) cumplen con los parámetros establecidos de calibración, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud para la determinación de calcio en soluciones acuosas, según las normas para la calidad analítica establecida por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

Palabras claves: Validación, Calcio, Espectrofotometría Atómica, Espectrofotometría Molecular.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

I.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

I.1.1.- El calcio y su función en el organismo

El análisis del cuerpo humano revela la presencia de una amplia variedad de minerales o elementos de tipo inorgánicos, de los cuales algunos son esenciales para la vida. Estos minerales denominados biogénicos o bioelementos son los elementos químicos naturales que por selección natural participan en la integración y funcionamiento de los seres vivos, formando parte de las biomoléculas. Se considera que cerca del 99% de los seres vivos está formado por: hidrogeno (H), carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), fosforo (P) y azufre (S), estos integran el grupo de los bioelementos primarios. Junto a los seis elementos anteriores, otros cuatro elementos representan cerca del 1% restante de la materia viva, entre estos se encuentran sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca) y cloro (Cl), reciben el nombre de bioelementos secundarios. ⁽¹⁾

Como señalamos antes, entre estos elementos esenciales para el ser humano tenemos el calcio, el cual desempeña un papel clave en muchos procesos fisiológicos. Entre sus funciones se citan las siguientes:

- Provee rigidez y fortaleza a huesos, dientes y encías.
- Ayuda en la regulación de la frecuencia cardiaca, y en la transmisión de impulsos nerviosos.

- Es esencial en la mayoría de las reacciones de la coagulación sanguínea.
- Activa diferentes enzimas y mantiene la permeabilidad de las membranas celulares. ⁽²⁾

El calcio es necesario durante todas las etapas de la vida. En la niñez, se requiere calcio para evitar su deficiencia y asegurar buenos hábitos de consumo para el futuro. En la adolescencia, el calcio es una clave para el desarrollo de masa ósea, el punto máximo de acumulación dentro del potencial genético. En etapa reproductiva, el calcio sigue siendo importante para mantener la masa ósea adquirida y evitar su pérdida. Alrededor de la menopausia, etapa de mayor pérdida de masa ósea, el consumo de calcio permite reponer el calcio perdido, aunque la masa ósea no responde tanto a la suplementación con calcio. ⁽³⁾

I.1.2.- Metabolismo del calcio

El calcio a diario ingresa al organismo a través de los alimentos que consumimos en nuestra dieta, encontrándolos en una gran variedad de ellos, como: los productos lácteos, los frutos secos y semillas (almendras, semillas de sésamo), las sardinas y las anchoas y, ya en menor medida, los vegetales de hojas verdes (espinaca, acelga, brócoli) y legumbres. La leche es la fuente principal de calcio en la dieta (un vaso aporta unos 250 mg), siendo, además, la materia prima principal en la elaboración de diversos derivados lácteos ricos en calcio como el queso, el yogurt y otras leches fermentadas. ⁽⁴⁾ El proceso de absorción del calcio tiene lugar a través del intestino, y depende en gran parte de la acción de la vitamina D. Se absorbe entre 30 y 80% del calcio

ingerido, la absorción del Ca^{2+} se ajusta a las necesidades corporales; la absorción se incrementa en presencia de una insuficiencia del Ca^{2+} y disminuye en el caso de un exceso de este. Asimismo, las proteínas facilitan la absorción del Ca^{2+} , pero los fosfatos y los oxalatos la inhiben debido a que estos aniones forman sales insolubles con el Ca^{2+} en el intestino. ⁽⁵⁾

Una vez absorbido el calcio, su distribución en el organismo es la siguiente: solo aproximadamente el 0,1% del calcio corporal total se localiza en el líquido extracelular, alrededor del 1% se encuentra en el interior de las células y el resto permanece almacenado en los huesos; Mientras que, su circulación en plasma es bajo tres formas: 1) aproximadamente el 41% circula combinado con proteínas plasmáticas y en esta forma no se difunde a través de las membranas capilares; 2) alrededor del 9% del calcio difunde a través de las membranas capilares, pero esta combinado con los aniones del plasma y los líquidos intersticiales de una forma no ionizada, y 3) el 50% restante del calcio plasmático difunde a través de las membranas capilares y se encuentra ionizado. ⁽²⁾

El calcio total del organismo, resulta del balance entre la ingesta y la excreción, tanto intestinal como urinaria. La ingesta normal de calcio varía entre 500 a 1000 mg de calcio elemental en 24 horas. El rol de la función excretora renal, en el balance de calcio es el de una regulación fina, eliminándose entre 100 y 200 mg en 24 horas, mientras que, por vía fecal la excreción es del orden de 400 a 800 mg al día. Aproximadamente el 10% (100 mg/día) del calcio ingerido se elimina con la orina. ⁽⁶⁾

I.1.3.- Valores de referencia del calcio en el organismo

El nivel normal de calcio en el plasma es de 8.5 a 10.5 mg/dL. El calcio total en suero es la suma de los componentes ionizados y no ionizados.⁽⁷⁾

La concentración de calcio sérico mantiene niveles de variación muy pequeños, aún bajo condiciones de sobrecarga de calcio importante. Pero, en circunstancias de alteración del nivel de proteínas plasmáticas (disminución o elevación), el calcio sérico puede variar significativamente, sin embargo el nivel de calcio iónico, permanece casi invariable. ⁽⁶⁾

Los valores de referencia establecidos para el calcio sérico son los siguientes: Niños (1 mes): 7 – 11,5 mg/dL, Niños (mayores de 1 año): 8,6 – 11,2 mg/dL y adultos: 8,2 – 10,2 mg/dL. ⁽⁸⁾

I.1.4.- Determinación de los valores de calcio en el organismo

Para la determinación de estos valores se han utilizado diferentes técnicas y métodos de laboratorio, tales como la Espectrofotometría de Absorción Molecular, la Espectrofotometría de Absorción Atómica, métodos electroquímicos, Espectrofotometría de Masa, entre otros.

Indistintamente de la técnica y método que se utilice para la determinación de calcio, debemos trabajar con métodos confiables que nos suministren valores exactos y precisos, para ello se debe realizar la validación del método analítico a utilizar en el laboratorio.

I.1.5.- Validación de métodos

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. ⁽⁹⁾

En consecuencia para lograr la validación de los métodos de análisis se deben determinar ciertos parámetros de desempeño del método que no son más que las propiedades, características o capacidades cuantificables de este que indican su grado de seguridad; incluyen: la calibración y la determinación de la linealidad del método a utilizar, la determinación de los límites de detección y de cuantificación, así como la determinación de la exactitud (veracidad), la precisión (repetibilidad y reproducibilidad), la especificidad, la sensibilidad y la robustez. ⁽⁹⁾

Para una mejor comprensión de los términos antes mencionados se procede a definir cada uno de ellos:

I.1.5.1.- La Linealidad: capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. ⁽⁹⁾

Para determinar la linealidad es necesario construir la llamada Curva de Calibración. La linealidad debe ser evaluada por inspección visual de un gráfico de respuesta en función de la concentración o contenido del analito. Si hay una relación lineal, los resultados de la prueba deben ser evaluados por métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, mediante

el cálculo de la regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados.⁽¹⁰⁾

Una Curva de Calibrado es un gráfico que representa la respuesta de un método analítico en función de las cantidades conocidas del analito y para trazar la mejor recta se debe escoger la que deje la misma cantidad de puntos por arriba y por debajo de ella.⁽¹¹⁾ Para la construcción de la Curva de Calibración se debe tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Se debe disponer de al menos seis estándares de calibración;
- Los estándares de calibración se deben distribuir de forma regular en el intervalo de concentraciones de interés; y
- Los estándares de calibración se deben analizar al menos por duplicado y preferentemente por triplicado o más veces, en un orden aleatorio. ⁽¹²⁾

Para corregir cualquier error aleatorio en el proceso de medición con la curva de calibración, se aplica el método de los mínimos cuadrados, este se basa en buscar la línea más recta que pase a través de los puntos, por medio de una serie de cálculos matemáticos.⁽¹³⁾ El estudio estadístico de la linealidad implica además de la representación gráfica la comprobación de dicha linealidad. Fundamentalmente se utilizan además del gráfico de la recta de regresión, la ecuación de la recta, los coeficientes de correlación y de determinación, el análisis de varianza, el test de proporcionalidad (t de student para el intercepto), el test de linealidad (coeficiente de variación). ⁽¹⁴⁾

El Coeficiente de Correlación nos indica el grado de relación entre la variable X, (concentración) y la variable Y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una elevada probabilidad. Un valor nulo indica que no hay relación lineal entre las variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es: $\geq 0,9990$. El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina *coeficiente de determinación* e indica la proporción de la varianza total de y que es explicada por el modelo lineal de regresión. El coeficiente de determinación (r^2) es el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo. ⁽⁹⁾

La recta de regresión está dada por: $Y = b \cdot x + a$, donde, (x) es la concentración, (y) es la respuesta del instrumento, (b) el valor de la pendiente y, (a) es el término independiente (intercepto). ⁽¹⁴⁾

Se debe realizar el análisis estadístico de la pendiente y el intercepto. La pendiente (b) se relaciona con la sensibilidad del método, estableciéndose que a mayor pendiente mayor sensibilidad es decir, mayor es la respuesta del método frente a los cambios en la concentración del analito. La varianza de la pendiente se utiliza como expresión matemática de la linealidad: a menor varianza mejor linealidad. ⁽¹⁴⁾

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{X})^2}{N - 1}$$

Los criterios de aceptación a tomar en cuenta son:

Coeficiente de correlación lineal (r)	0,98 – 1,00
Coeficiente de determinación (r ²)	>0,95
Coeficiente de variación de factores respuesta	< 5%
Pendiente distinta de cero	F _{exp} > F _{critico}
Intercepto distinto de cero	t _{exp} < t _{tab}

Tabla 1.- Criterios de aceptación de parámetros estadísticos de comprobación de la linealidad de un método analítico. ⁽¹⁵⁾

Este análisis estadístico se puede realizar con el Software Microsoft Excel 2013, con el SPSS o cualquier otro paquete estadístico. ⁽¹⁶⁾

I.1.5.2.- El Límite de Detección: es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo condiciones experimentales establecidas. Por lo tanto, las pruebas de límite simplemente demuestran que la cantidad de analito está por encima o por debajo de un cierto nivel. El límite de detección se expresa habitualmente como la concentración de analito (por ejemplo: en porcentaje, µg/mL) en la muestra. Se puede determinar con la pendiente de la Curva de Calibración y la Desviación Estándar de las respuestas. ⁽¹⁷⁾

El valor más bajo que puede obtenerse está determinado por las fluctuaciones. Tales fluctuaciones pueden provenir de fluctuaciones en la intensidad de la fuente, fluctuaciones en el proceso de la atomización, ruidos en el detector, en el amplificador y en el sistema de lectura. La definición está usualmente establecida en términos de relación señal-

ruido, donde por ruido se entiende todas las fluctuaciones incontroladas del sistema. ⁽¹⁸⁾

La definición de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) adoptada en 1975, establece que "el límite de detección expresado como una concentración C_L , (o cantidad, q_L) se deriva de la medida más pequeña, Y_L , que puede detectarse con razonable certeza para un procedimiento analítico dado". ⁽¹⁹⁾

Experimentalmente, el límite de detección se determina involucrando todos los factores que afectan la medida y se define, en general, para obtenerlo en unidades de concentración como:

$$LOD = 3S_B / m_{cal}$$

Donde:

S_B = Desviación Estándar de los blancos.

m_{cal} = es la pendiente de una Curva de Calibración del sistema.

I.1.5.3.- El Límite de Cuantificación: se define como la menor cantidad de analito en la muestra que se puede determinar con aceptable exactitud y precisión, bajo condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa como la concentración del analito (por ejemplo: porcentaje, $\mu\text{g/mL}$) en la muestra. ⁽¹⁷⁾

$$LOQ = 10 S_B / m_{cal}$$

Donde:

S_b = Desviación Estándar de los blancos.

m_{cal} = es la pendiente de una Curva de Calibración del sistema.

I.1.5.4.- La Exactitud: expresa el grado de proximidad de los resultados obtenidos, por el método, con los verdaderos valores. Este parámetro permite cuantificar los errores sistemáticos de las lecturas realizadas, se expresa como porcentaje de recuperación o como diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza. Los documentos de la ICH (International Conferencia on Harmonization) recomiendan que la exactitud debe ser evaluada usando un mínimo de nueve determinaciones sobre, al menos, tres niveles de concentración abarcando el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres réplicas de cada concentración).⁽¹⁵⁾⁽²⁰⁾

Se puede determinar mediante una prueba de adición/recuperación. El porcentaje de recuperación de un analito que se añade a una muestra blanco es una relación medible que compara la cantidad encontrada por el análisis de la cantidad añadida a la muestra. En la interpretación de recuperación, es necesario reconocer que el analito añadido a la muestra no se comporta de la misma manera que el analito acumulado biológicamente. En concentraciones relativamente altas, la recuperación analítica se espera que llegue al 100%. En concentraciones más bajas y en particular con los métodos que involucran una serie de pasos incluyendo extracción, aislamiento, purificación y concentración, las recuperaciones suelen ser más bajas. Independientemente del promedio de recuperación observado, la recuperación con baja variabilidad es deseable.⁽²¹⁾

$$\% R = \frac{(CE - COM)}{CA} \times 100$$

CE: Calcio esperado

COM: Calcio obtenido

CA: Calcio agregado

I.1.5.5.- La Precisión: expresa el grado de concordancia entre los resultados de una prueba individual cuando el método es aplicado repetitivamente a múltiples lecturas de una muestra homogénea. La precisión del método analítico es usualmente expresado como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de medidas. Esta puede ser una medida en términos de repetibilidad o de precisión intermedia dentro de condiciones normales de operación. La repetibilidad expresa la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo instrumento. La precisión intermedia, expresa la variación de las lecturas realizadas dentro del laboratorio, en diferentes días por diferentes analistas o instrumento. ⁽²⁰⁾

En términos generales la Precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la Desviación Estándar y la Desviación Estándar Relativa. La ICH, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se pueden trabajar tres niveles diferentes de concentración (80, 100, 120 %), con tres muestras independientes de cada nivel. Datos con los que se cuenta si al evaluar la exactitud, se llevó a cabo por el método de adición-

recuperación. Otra forma de evaluarlo es, analizando por lo menos seis muestras independientes a la concentración normal de trabajo. ⁽²²⁾

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100$$

I.1.5.6.- La Especificidad: se entiende como la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc. Y, en general se acepta que la sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Dos factores limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibrado y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. Entre dos métodos que tengan igual precisión, será más sensible aquel cuya curva de calibrado tenga mayor pendiente. ⁽¹³⁾Mientras que la Robustez es la Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. ⁽²³⁾

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN. OBJETIVOS. HIPÓTESIS.

II.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los minerales son sustancias inorgánicas requeridas por el cuerpo para una variedad de funciones. Uno de los minerales más importante para el ser humano es el calcio. Se considera un elemento esencial para el organismo. De los minerales que forman parte del organismo se tiene que el 50% corresponde a calcio, el 25% a fósforo y la otra parte corresponde a minerales como magnesio, sodio, potasio y cobre, entre otros. El 98% del calcio que tiene nuestro organismo se encuentra formando parte de los huesos, el 0,5% de los dientes y el resto se encuentra en circulación sanguínea y puede estar ligado a proteínas, en forma iónica o formando complejos con ácidos. El calcio específicamente tiene las siguientes funciones: constitución de fluidos y tejidos, regulación cardíaca, componente de los sistemas enzimáticos, conducción nerviosa, proliferación celular, estimulante de la secreción hormonal, contracción muscular, coagulación sanguínea y, la más importante, el mantenimiento de la estructura y calidad de la masa ósea. ⁽²⁴⁾

La determinación de los niveles de calcio juega un papel fundamental en el diagnóstico clínico, tanto para asegurarnos del funcionamiento óptimo de nuestro organismo como para la determinación de ciertas patologías caracterizadas entre otros signos y síntomas por un exceso o un déficit de calcio, tales como la osteodistrofia renal, la osteoporosis, la

osteomalacia, etc. Tanto la hipocalcemia (valores bajos de calcio en sangre) como la hipercalcemia (valores altos de calcio en sangre) se consideran trastornos graves para el organismo.

Para la determinación de los niveles de calcio es necesario contar con métodos de análisis seguros y confiables. Tradicionalmente, ha sido difícil medir el calcio de manera exacta y precisa, habiéndose desarrollado una gran variedad de métodos para este efecto. Entre los cuales se encuentran los métodos clásicos tales como la precipitación de oxalato mediante titulación, la quelación con EDTA, y los métodos instrumentales como la espectrofotometría de absorción molecular mediante la formación de complejos coloreados de calcio los cuales son los más utilizados en el laboratorio clínico, la espectrofotometría de emisión con llama, la espectrofotometría de absorción atómica y los métodos electroquímicos.

En el caso de la determinación del calcio, luego de los métodos clásicos, los métodos más utilizados son la espectrometría de absorción molecular y la espectrofotometría de absorción atómica, la primera se basa en medir la cantidad de luz absorbida por las moléculas de calcio que se han hecho reaccionar con un reactivo de color para formar un complejo de calcio, la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la cantidad de calcio presente en la muestra. En la absorción atómica también se mide la cantidad de luz absorbida pero una vez que la muestra ha sido atomizada y sobre ella se ha hecho incidir una determinada radiación, se trabaja directamente con la muestra de suero sanguíneo sin reacciones adicionales y permite la detección de elementos trazas en cantidades de las partes por millón

(ppm) y hasta las partes por billón (ppb), lo cual no podemos hacerlo por las técnicas de absorción molecular. ⁽¹³⁾

Entre las ventajas de la espectrofotometría de absorción atómica tenemos que permite la determinación cuantitativa de más de 60 elementos metálicos o metaloides, y que es potencialmente específico, ya que las líneas de absorción atómica son considerablemente estrechas (de 0,002 a 0,005 nm) y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento. Por otro lado su desventaja es que las limitadas anchuras de la línea crean un problema que generalmente no se encuentra en la Espectrofotometría de Absorción Molecular. ⁽¹³⁾

Por lo tanto, cualquiera que sea la técnica y el método seleccionado para medir el calcio, es necesario que este sea confiable, por lo tanto debemos asegurarnos, verificar y demostrar la confiabilidad del mismo y para ello se debe realizar una validación del método a utilizar y garantizar así la fiabilidad de los resultados analíticos. En el presente estudio se realizará la validación de los métodos de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama y la Espectrofotometría de Absorción Molecular para la determinación de calcio en soluciones acuosas.

II.2.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

La validación de método es una herramienta importante para el aseguramiento del control de calidad, por eso la diversidad de estudios que se han realizado al respecto de diferentes métodos y un sinnúmero de analitos. De un modo general en lo que se refiere a distintos analitos, a

través de la revisión bibliográfica realizada se consiguieron los siguientes experimentos de validación de métodos:

En la ciudad de La Habana en el año 2000, se realizó la validación de 2 métodos espectrofotométricos que posibilitan cuantificar taninos y flavonoides en la droga cruda de *Psidium guajaba*, L., pues la literatura no cuenta con métodos oficiales que permitan cuantificar dichos compuestos en esta planta. Se determinó que ambos métodos (método del tungsto-molibdicofosfórico para taninos descrito por Miranda M y el método espectrofotométrico para flavonoides totales expresados como quercetina, de Kostennikova Z y modificado por Méndez G) cumplían con todos los requisitos de validación propuestos para el control químico de calidad de la especie (linealidad, precisión [repetibilidad y reproducibilidad], exactitud y especificidad).⁽²⁵⁾

Para la industria farmacéutica es de interés la validación de los métodos analíticos por la necesidad de satisfacer normas legales y reglamentarias oficiales además de garantizar el aseguramiento de la calidad, es por ello que Fernández y col.(2002) realizaron un estudio de Validación para el método de análisis de determinación de calcio en tabletas de Carbonato de Calcio 500 mg, establecido en la convención farmacopea de Estados Unidos (U.S.P) 1995 y además modificaron uno de los pasos del procedimiento descrito en la Farmacopea de manera que una vez validado el método, realizaron la comparación del método original con el mismo método modificado y propuesto por ellos y demostraron que ambos métodos tenían una precisión semejante y no diferían significativamente.⁽²⁶⁾

En 2005, se validaron 2 métodos analíticos por Espectrofotometría y por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el control de la calidad y el estudio de estabilidad, respectivamente, en la solución nebulizadora de salbutamol 0,5 %. En la validación se evaluaron los parámetros de especificidad para estos fines, linealidad del sistema, exactitud y precisión expresada en sus 2 formas: repetibilidad y precisión intermedia. Los métodos analíticos resultaron ser específicos, lineales, precisos, exactos en el intervalo de concentraciones estudiadas. ⁽²⁷⁾

Suárez y col en 2009, efectuaron la validación de un método para la determinación de magnesio eritrocitario mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama. En el proceso de validación se estimaron los valores para los parámetros que determinan el rendimiento del método. Se demostró que el método validado cumple con los niveles de aceptación establecidas por las normas nacionales e internacionales relacionadas con la calidad en el laboratorio, y aseguran que el método es adecuado para ser aplicado en el análisis de magnesio eritrocitario en pacientes con diferentes patologías. ⁽¹⁴⁾

El Carbonato de calcio, presente como componente fundamental en el Suplecal® (suplemento nutricional), es una sal inorgánica adquirida de una fuente natural, el exoesqueleto de los corales marinos Porites variedad aragonit. La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad de los métodos analíticos y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo producto. En 2010, Becquer y col. utilizaron el método de valoración con EDTA, a una concentración de 0,05N utilizando como indicador el hidroxinaftol azul y como patrón de referencia el carbonato de calcio reactivo MERCK con certificado de

calidad. El HCl concentrado se empleó en la disolución de las muestras y el NaOH IN para garantizar el medio básico en la valoración. Fueron determinados parámetros como linealidad, precisión y exactitud. Concluyendo que el método analítico desarrollado demostró ser lineal $R=0,9994$, preciso ($CV=0,9\%$) y exacto en el rango de concentraciones seleccionado (25-75 mg).⁽²⁸⁾

En 2013, se comprobó la validez de un método propuesto para evaluar la concentración de bromuro en el rango de 34 a 200 mg/L, se establecieron las condiciones específicas para el tratamiento de las muestras y se ha validado el método siguiendo la guía de IUPAC para validaciones realizadas por un solo laboratorio. Se comprobó que el método es robusto, preciso, veraz y que las concentraciones máximas de sales que pueden estar presentes en la muestra sin interferir en la cuantificación de iones bromuro es de 224 ppm de sulfato de calcio, 292 ppm de cloruro de potasio, 657 ppm de cloruro de sodio, 1527 ppm de sulfato de magnesio y 40 542 ppm de cloruro de magnesio. Además, se obtuvo la incertidumbre expandida del método igual a $\pm 0,1418$ ppm.⁽²⁹⁾

De igual manera, reunimos algunos ejemplos de validación de métodos en la determinación del analito que nos compete, el calcio:

Gómez, Validó el método de E.A.A. en llama para determinar el contenido de metales pesados tales como Hierro, Manganeso, Sodio, Potasio, calcio y Magnesio, en muestras de aguas (superficiales, subterráneas y residuales) del Laboratorio de Análisis de Aguas de la Corporación Autónoma Regional del Risaralda. Evaluó aspectos técnicos como sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud

y precisión cumpliendo así con requisitos mínimos de calidad para su implementación en el laboratorio y dando oportunidad para mejoras continuas en futuros ensayos. ⁽³⁰⁾

Dos años más tarde en la misma Universidad, Londoño D, validó el método de determinación de calcio y magnesio en agua cruda y tratada por Espectroscopia de Absorción Atómica, por medio de siete sesiones de laboratorio consecutivas, a través de la lectura de los estándares, estándares y muestras de agua cruda y tratada, por duplicado, con esto se demostró que el método sirve para determinar calcio y magnesio en una matriz de agua sea cruda o tratada. ⁽³¹⁾

II.3.- HIPÓTESIS

La Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama y la Espectrofotometría de Absorción Molecular han sido descritos en la bibliografía como métodos confiables para la determinación de múltiples minerales entre ellos el calcio; por tanto, la elaboración de un protocolo de validación de los métodos antes mencionados permitiría conocer y demostrar que los mismos son aceptables para la determinación de calcio en soluciones acuosas según los parámetros de calidad analítica nacionales e internacionales.

II.4.- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

II.4.1.- Objetivo General

Validar los métodos de Espectrofotometría de Absorción Atómica y Espectrofotometría de Absorción Molecular para la determinación de calcio en soluciones acuosas según los parámetros de la ICH.

II.4.2.- Objetivos Específicos

- Realizar la validación del método de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama aplicando los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad para la determinación de calcio en soluciones acuosas.
- Realizar la validación del método de Espectrofotometría de Absorción Molecular aplicando los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad para la determinación de calcio en soluciones acuosas.
- Analizar e interpretar los resultados para comprobar o no la hipótesis establecida.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

III.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.1 Materiales

- Balones aforados (25, 100, 500 y 1000 mL de capacidad).
- Cilindros graduados (50 y 100 mL).
- Vasos de precipitado 50, 100, 500 mL de capacidad.
- Varillas de vidrio.
- Matraz.
- Jeringas
- Tubos de ensayo.
- Algodón
- Alcohol
- Vidrios de Reloj.
- Pipetas volumétricas para volúmenes de 1, 2, 3, 5 y 10 mL.
- Pipetas graduadas para volúmenes de 5 y 10 mL.
- Pipetas automáticas para volúmenes entre 1–10 μL ; 10 – 100 μL y 100–1000 μL .
- Puntillas para pipetas automáticas.
- Espátula.
- Papel parafilm.

III.1.2 Reactivos

- Ácido Clorhídrico (HCl concentrado grado analítico)
- Carbonato de calcio de grado analítico. Merck®
- Cloruro de Lantano
- Agua Desionizada (resistividad 18,2 MΩ/cm)
- Kit comercial de reactivos para determinación de calcio en suero sanguíneo por Espectrofotometría de Absorción Molecular DiagnoTest. ⁽³²⁾

III.1.3. Soluciones

Se prepararán las siguientes soluciones:

- Solución de Lantano (0,1% m/v).
- Solución Madre de calcio (500 mg/L).
- Solución de ácido nítrico (HNO₃) al 10% v/v.

III.1.4.- Instrumentos

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Llama Perkin Helmer 3110.
- Lámpara de Cátodo Hueco de calcio.
- Balanza analítica.
- Centrífuga
- Desionizador EASY pure® II ultrapure water system, 18 MΩ-cm de pureza.
- Fotocolorímetro BioStat-Fax 1915.

III.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

III.2.1.- Procedimiento analítico

El primer paso en un análisis de laboratorio es el conocimiento y manejo de los instrumentos a utilizar, así como el dominio de la técnica y del método analítico a aplicar. Es fundamental que el analista disponga de suficiente tiempo para familiarizarse con los instrumentos a utilizar, con su constitución y procedimientos de operación y mantenimiento, además también se debe disponer de tiempo para comprender y dominar el protocolo a seguir en la validación; así como también es fundamental asegurar el control de calidad adecuado para cada método.

En la fase analítica, en lo que se refiere a las mediciones por espectrofotometría de absorción molecular se seguirán las indicaciones establecidas en el kit comercial de calcio Diagnostest ⁽³²⁾ y se trabajará con un Fotocolorímetro BioStat Fax 1915. Para las determinaciones con la Técnica de Absorción Atómica, se procederá de acuerdo con lo indicado en el manual para el procesamiento de muestras del espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 3110. ⁽³³⁾ La fase pos-analítica comprenderá el registro de los datos de una manera lógica.

III.2.2.- Métodos Analíticos

Los métodos a validar en este trabajo tienen el mismo fundamento, por ser métodos espectrofotométricos de absorción, tal como nos lo explica Arévalo E. y col. (1984). La Espectrofotometría mide a una determinada longitud de onda la cantidad de energía electromagnética absorbida por

la sustancia, esta energía es proporcional a la cantidad de átomos o moléculas presentes en el paso de la radiación electromagnética. ⁽³⁴⁾

La **Espectroscopia de Absorción Atómica** es un método para la detección y la determinación de elementos químicos, particularmente de elementos metálicos. ⁽³⁵⁾ Se fundamenta básicamente en la propiedad que tienen los átomos de absorber radiación a longitudes de onda específicas de cada elemento. Esta técnica mide la cantidad de luz que es absorbida por los átomos en estado fundamental presentes en la muestra, al hacer incidir radiación proveniente de una fuente de luz, comúnmente una lámpara de cátodo. ⁽³⁶⁾

Los átomos requeridos para las mediciones espectroscópicas de absorción atómica se generan mediante la adición de suficiente energía térmica a la muestra, lográndose de esta manera la disociación de los compuestos químicos (se rompen los enlaces químicos y se colocan en un estado de reposo no excitado, no ionizado) y la formación de átomos libres. Bajo condiciones apropiadas de temperatura, muchos de los elementos atomizan, permaneciendo sus átomos en el paso óptico (en estado fundamental), y por un tiempo determinado. Así los átomos formados son capaces de absorber radiación electromagnética de una longitud de onda apropiada proveniente de fuentes tales como las lámparas de cátodo hueco o de las lámparas de descarga sin electrodos. ⁽³⁶⁾

La **Espectroscopia de Absorción Molecular** se emplea primariamente en análisis cuantitativo y es probablemente el procedimiento más usado en los laboratorios químicos y clínicos de todo el mundo. Se basa en la

medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de b cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la Ley de Beer: ⁽¹³⁾

$$A = -\log T = \log P_o/P = \epsilon bc$$

Termino y símbolo	Definición
Potencia radiante incidente, P_o	Potencia radiante en watts que incide en la muestra
Potencia radiante transmitida, P	Potencia radiante que transmite la muestra
Absorbancia, A	$\text{Log}(P_o/P)$
Transmitancia, T	P/P_o
Longitud de trayectoria de la muestra, b	Longitud sobre la que ocurre la atenuación
Concentración del absorbente, c	Concentración en unidades especificadas
Absortividad molar, ϵ	$A/(bc)$

Tabla 2. Definiciones de términos de la Ley de Beer. ⁽¹³⁾

III.2.3. Instrumentación Analítica

Los sistemas constituyentes de un **Espectrofotómetro de Absorción Atómica** comprenden:

- Fuente de radiación
- Sistema de atomización de muestras: llama
- En el caso de la Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama comprende también el sistema de introducción de muestras a la llama.
- Sistema de monocromador, transductor, amplificador y registrador de la señal.

La radiación electromagnética originada por una fuente de radiación, a la longitud de onda de resonancia y de intensidad inicial I_0 , se enfoca sobre una llama o a través de un horno de grafito, los cuales contienen átomos en el estado fundamental. La intensidad inicial de la radiación disminuye en una cantidad proporcional a la concentración de los átomos existentes en el paso óptico. Luego, la radiación electromagnética se dirige sobre un detector, donde se evalúa la intensidad disminuida. La cantidad de radiación absorbida se determina por comparación de I e I_0 .

I : Intensidad transmitida

I_0 : Intensidad Incidente

La facilidad y la rapidez con las cuales se pueden hacer determinaciones exactas y precisas de muchos elementos químicos, utilizando la

Espectrofotometría de Absorción Atómica, han hecho de esta técnica una de las más populares para la determinación de aproximadamente 70 metales, en diferentes tipos de matrices y condiciones.

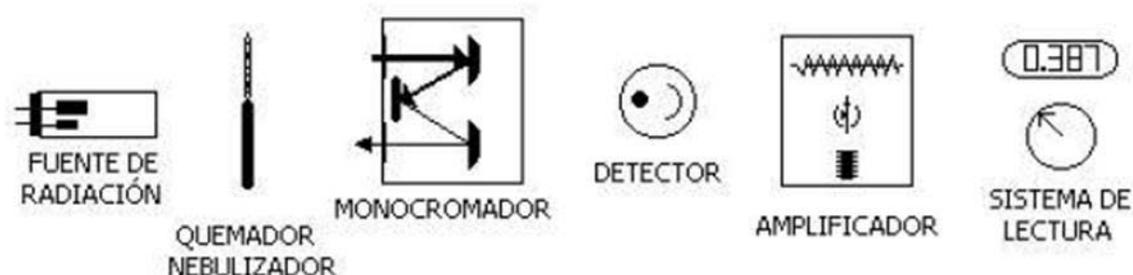


Figura 1. Esquema estructural de un Instrumento de Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama.

La Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama tiene ciertos Parámetros instrumentales

Método	Llama	λ (nm)	Ancho de rendija (nm)
EAA	Si	422,7	0,7

Tabla 3. Condiciones de trabajo del espectrofotómetro Perkin Elmer 3110 para determinación de calcio por absorción atómica. ⁽³³⁾

En los métodos basados en la **Espectrofotometría de Absorción Molecular** las determinaciones se realizan previa una reacción de color entre el analito a determinar y un reactivo, lo cual da lugar a la formación de un compuesto coloreado cuya intensidad de color varía según la concentración del analito, a mayor concentración de analito mayor será la cantidad de radiación absorbida. La radiación procede de

una lámpara cuya constitución depende de la zona del espectro donde se trabaja, generalmente las determinaciones se realizan en la zona visible y ultravioleta. Esta radiación se hace incidir sobre la respectiva muestra, previamente tratada y un detector que también depende de la zona de trabajo capta la cantidad de luz transmitida por la muestra luego de la respectiva absorción.

En la Figura 2 se muestran los componentes principales de un espectrofotómetro.

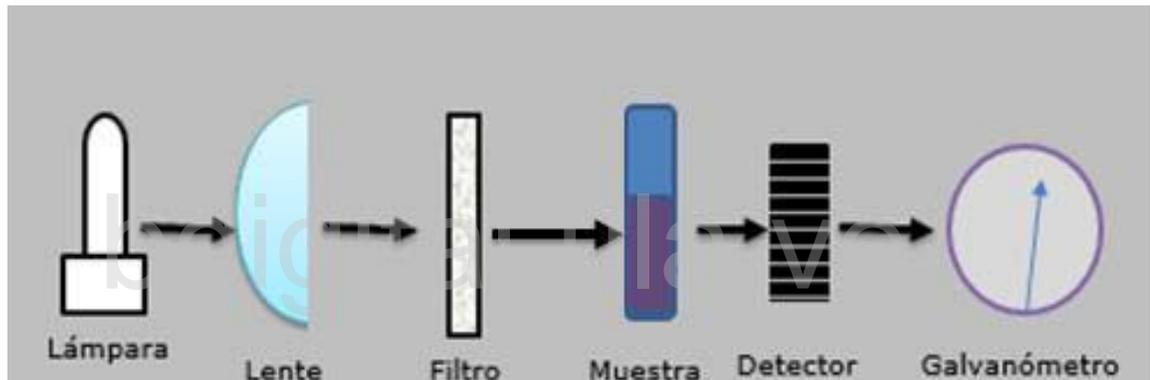


Figura 2. Esquema estructural de un Fotocolorímetro.

CAPÍTULO IV

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

IV.1.- VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA.

La confiabilidad de un método analítico viene dada por su capacidad para determinar el analito aportando resultados óptimos. Para que un método sea considerado confiable al ser evaluado, debe demostrar: exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad, linealidad entre otras.⁽³⁷⁾

Para comprobar las condiciones de confiabilidad del método se procedió a preparar soluciones estándares de diferentes concentraciones, provenientes de una solución madre de calcio de 500 mg/L, utilizando el Cloruro de Lantano al 0,1% para evitar interferencias y agua desionizada como solvente.

La solución de Cloruro de Lantano al 0,1% se preparó a partir de la sal de Cloruro de Lantano heptahidratado ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de peso molecular 371,270 g/ mol. Para preparar esta solución se consideró el peso molecular anhidra: 244,360 g /mol y el peso de la sal heptahidratada 371,270 g/ mol. Por lo tanto para preparar 1 litro de solución de Cloruro de Lantano al 0,1% se pesó 0,152 g. de la sal, se disolvió y se aforo con agua desionizada hasta completar 1 litro.

Para la determinación de calcio por el método de Espectroscopia de Absorción Atómica con Llama se siguió el procedimiento señalado en el Manual del espectrofotómetro Pekín Elmer 3110. ⁽³³⁾



Figura 3. Espectrofotómetro Perkin Elmer 3110.

IV.1.1.-Determinación de la Linealidad para calcio

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener los resultados de las pruebas directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. ⁽¹⁵⁾

Se determina mediante la preparación en forma independiente de 3 curvas de calibrado con soluciones estándar de al menos 6 concentraciones, las cuales deben encontrarse dentro de los intervalos establecidos, graficando posteriormente la respuesta de la medición, contra la concentración del analito, sobre esta curva se determina y se comprueba dicha linealidad mediante la curva de regresión lineal. ⁽¹⁵⁾

Se procedió a realizar tres curvas de calibración simple para nuestro analito, el calcio, en diferentes días, preparando en cada una 6 estándares de concentraciones 0,100 mg/dL, 0,200 mg/dL, 0,300 mg/dL, 0,400 mg/dL, 0,500 mg/dL y 0,600 mg/dL, respectivamente, a partir de la solución madre de CaCO_3 (500 mg/L), preparadas en balones de 50 mL.

Se obtuvo el promedio de las absorbancias de las soluciones estándares en las tres curvas y con estos promedios se realizó la curva de calibración simple. Para comprobar la linealidad se halló la curva de regresión, que nos da los parámetros: coeficiente de correlación, pendiente y el punto de corte que demuestran la linealidad.

IV.1.2.- Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación para el calcio

El límite de detección de un procedimiento analítico es la más baja cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como valor exacto. Se determina mediante la cuantificación de 10 soluciones blancos preparados a la concentración más baja aceptada, se calcula el valor promedio de las concentraciones y la desviación. Mientras que el límite de cuantificación se define como la más baja cantidad de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con adecuada precisión y exactitud. Se determina utilizando las siguientes formulas: $LC = 10 S_B/m$ y el $LD = 3 S_B/m$. ⁽¹⁵⁾

Para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación en la determinación de calcio, se prepararon diez (10) muestras blanco,

las cuales fueron leídas con el método de Absorción Atómica con Llama. Dichas determinaciones se llevaron a cabo en dos oportunidades durante el periodo de trabajo, obteniendo en cada lectura las respectivas absorbancias. Los resultados se muestran en la tabla 11.

IV.1.3.- Determinación de la Precisión para el calcio

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. ⁽⁹⁾

Puede llevarse a cabo en tres niveles: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia.

La **repetibilidad** es la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento en un corto intervalo de tiempo, es también llamado intraensayo de precisión. Por otra parte la **reproducibilidad** expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, por lo general se aplica a la normalización de la metodología) y la **precisión** intermedia se expresa según se varié el laboratorio: se realice en diferentes días, o por diferentes analistas, o diferentes instrumentos. La precisión de un procedimiento analítico se expresa habitualmente como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de mediciones. ⁽¹⁵⁾

IV.1.3.1.- Análisis de Repetibilidad

Para la determinación de la precisión mediante el análisis de repetibilidad, se procedió a preparar 10 soluciones patrón de concentración 0,300 mg/dL, a partir de una solución de Carbonato de calcio (CaCO_3). Este procedimiento se realizó en un mismo día por el mismo operador, en el mismo laboratorio, con los mismos reactivos y el mismo instrumento. ⁽⁹⁾

IV.1.3.2.- Análisis de la Precisión Intermedia

El análisis de la precisión intermedia se realizó utilizando los resultados obtenidos de la lectura de seis soluciones estándares de concentración 0,300 mg/dl, las cuales fueron preparadas variando una condición, es decir, por dos operadores distintos, con los mismos reactivos, en el mismo día y leídas en el mismo instrumento de absorción atómica con llama. Posteriormente se calculó el coeficiente de variación (CV) utilizado para estimar la precisión del método. ⁽⁹⁾

IV.1.4.- Determinación de la Exactitud para el calcio

La exactitud de un método es el grado de concordancia entre el resultado de una determinación o la media de n resultados y el valor "verdadero" del analito en la muestra en cuestión, para su determinación se dispone de pruebas sencillas como: adición/recuperación. La prueba de adición estándar es especialmente útil para analizar muestras cuya matriz compleja hace altamente probable la presencia de interferencias no espectrales midiendo la

respuesta del analito en la muestra problema. En tanto la prueba de recuperación se emplea para demostrar si el método mide todo o solo parte del analito (su recuperación), ya que en mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analitos en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores. ^(15, 38, 39)

IV.1.4.1.- Curva de Adición Estándar

Para la prueba de adición estándar para calcio se prepararon dos curvas de calibrado, de concentraciones 0,100 mg/dL, 0,200 mg/dL, 0,300 mg/dL, 0,400 mg/dL, 0,500 mg/dL y 0,600 mg/dL. Utilizando la primera de ellas, como curva base y la segunda curva tendría el añadido de la sustancia que hay que analizar (0,100 mL suero). Posteriormente fueron leídos en el instrumento de absorción, para luego obtener la gráfica correspondiente. Esta curva se realizó a fin de verificar la ausencia de interferencias que pudieran existir. ⁽⁹⁾

IV.1.4.2.- Porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación para calcio se realizó preparando cuatro soluciones de concentraciones 6 mg/dL, 8 mg/dL, 10 mg/dL y una solución base. Los estándares se realizaron a través de una solución madre de Carbonato de calcio de 100 mg/dl y siguiendo el esquema que se presenta a continuación. ⁽⁹⁾

Solución 1 (Base)	1 mL de suero + 0,100 mL de agua desionizada
Solución 2 (P 6mg/dL)	1 mL de suero + 0,100 mL de patrón 6 mg/dL
Solución 3 (P 8mg/dL)	1mL de suero + 0,100 mL de patrón 8 mg/dL
Solución 4 (P 10mg/dL)	1mL de suero + 0,100 mL de patrón 10 mg/dL

Tabla 4. Preparación de las soluciones para el Análisis de Recuperación de calcio por EAA con Llama

Luego de realizar la medición y de obtener los datos se multiplicaron por 50 (Factor de Dilución) para obtener el valor verdadero debido a que la preparación se realizó en balones de 50mL; y así realizar los cálculos correspondientes con los cuales se halló el porcentaje de recuperación mediante el cálculo de calcio medido, calcio agregado y el calcio recuperado.

IV.2.- VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (EAM)

El método de calcio Diagnetest ⁽³²⁾ es la reacción de la cresolftaleina complexona con el calcio de la muestra para formar un complejo cromógeno que es medido fotométricamente a 575 ± 5 nm. La interferencia del magnesio se previene secuestrándolo con 8-hidroxiquinolina, mientras que otros metales divalentes son enmascarados con el ion cianuro.

Se utiliza 2-Etilaminoetanol para establecer un pH de 12 y el Dimetilsulfoxido para bajar la constante dieléctrica, evitando la ionización de la Cresolftaleina complexona.

mg/dL y 10 mg/dL. Graficando posteriormente el promedio de la respuesta de la medición, contra la concentración del analito, sobre esta curva se determina y se comprueba dicha linealidad mediante la curva de regresión lineal.

IV.2.2.- Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación en la determinación de calcio, se prepararon diez (10) muestras blanco, las cuales fueron leídas con el método de absorción molecular. Dichas determinaciones se llevaron a cabo en dos oportunidades durante el periodo de trabajo, obteniendo en cada lectura las respectivas absorbancias. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

IV.2.3.- Determinación de la Precisión para el calcio

IV.2.3.1.- Análisis de Repetibilidad

Para la determinación de la precisión mediante el análisis de repetibilidad, se procedió a preparar 10 soluciones patrón de concentración 5 mg/dL a partir del patrón original. Este procedimiento se realizó en un mismo día por el mismo operador, en el mismo laboratorio, con los mismos reactivos y el mismo instrumento.

IV.2.3.2.-Precisión intermedia

El análisis de la precisión intermedia se realizó utilizando los resultados obtenidos de la lectura de diez soluciones estándares de concentración 5 mg/dl, las cuales fueron preparadas variando una condición, es decir, por dos operadores distintos, con los mismos reactivos, en el mismo día y leídas en el mismo instrumento de absorción molecular. Posteriormente se calculó el coeficiente de variación (CV) utilizado para estimar la precisión del método.

IV.2.4.- Determinación de la Exactitud para el calcio

IV.2.4.1.-Curva de Adición Estándar

Para la prueba de adición estándar para calcio se prepararon dos curvas de calibrado, de concentraciones 1 mg/dL, 2 mg/dL, 4 mg/dL, 6 mg/dL, 8 mg/dL y 10 mg/dL. Utilizando la primera de ellas, como curva base y la segunda curva tendría el añadido de la sustancia que hay que analizar (50µL suero). Posteriormente fueron leídos en el instrumento de absorción, para luego obtener la gráfica correspondiente. Esta curva se realizó a fin de verificar la ausencia de interferencias que pudieran existir.

IV.2.4.2.- Porcentaje de Recuperación para calcio

El porcentaje de recuperación para calcio se realizó preparando tres soluciones de concentraciones 5 mg/dL, 10 mg/dL y una solución base.⁽⁹⁾

Muestra	Concentración
Solución 1 (base)	2mL de reactivo 1 + 2mL de reactivo 2 + 30µL de suero + 20 µl de agua desionizada
Solución 2 (5 mg/dL)	2mL de reactivo 1 + 2mL de reactivo 2 + 30µL de suero + 20 µL de patrón
Solución 3 (10 mg/dL)	2mL de reactivo 1 + 2mL de reactivo 2 + 30µL de suero + 20 µL de patrón

Tabla 5. Preparación de las soluciones para el Análisis de Recuperación de calcio por EAM

Luego de realizar la medición y de obtener los datos se multiplicaron por el factor único; y así realizar los cálculos correspondientes con los cuales se halló el porcentaje de recuperación mediante el cálculo de calcio medido, calcio agregado y el calcio recuperado.

bdigital.uia.ve

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

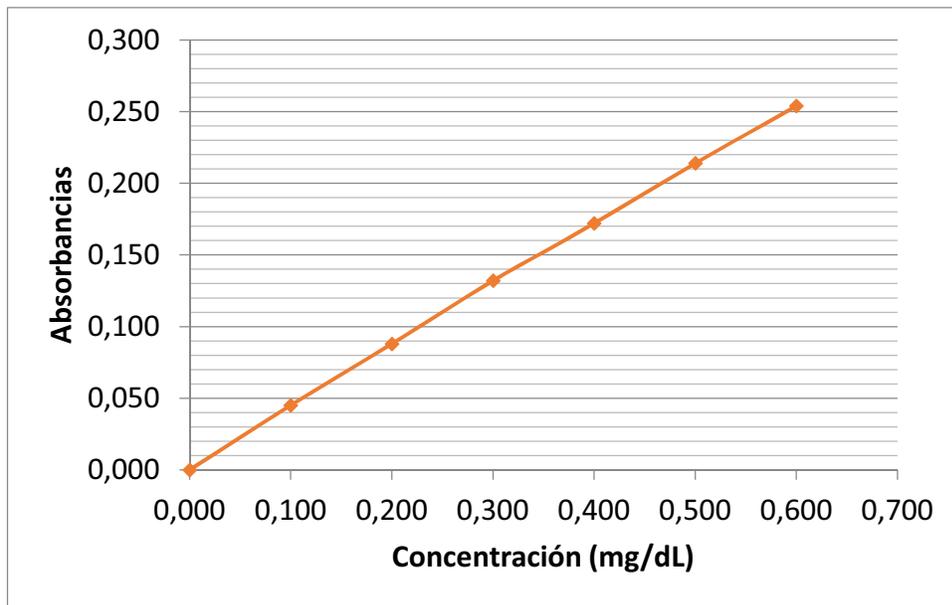
V.1.- Parámetros de validación de la metodología analítica para la determinación de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama (EAA).

V.1.1.- Determinación de la Linealidad para el calcio

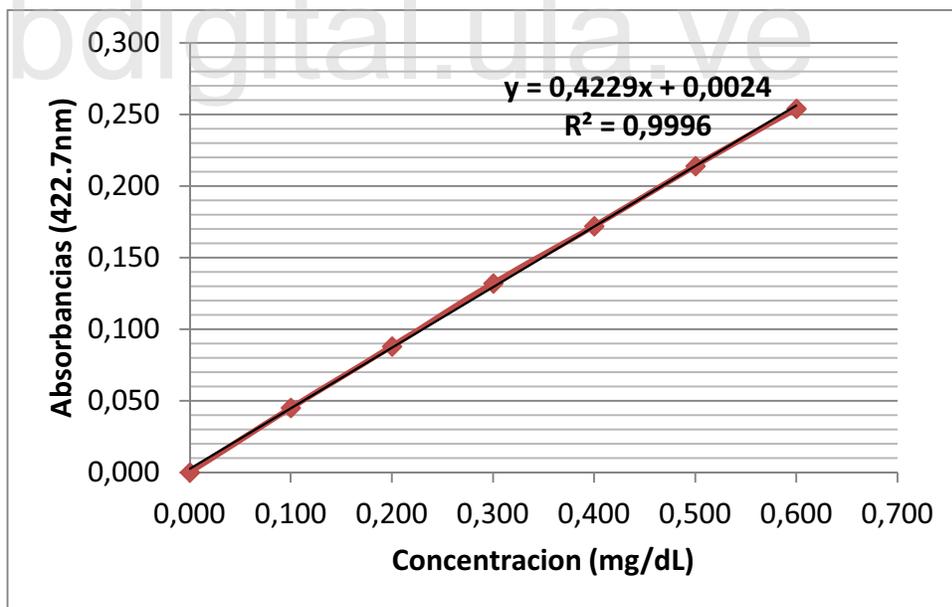
Para determinar la linealidad es necesario construir la llamada curva de calibración. En la siguiente tabla se muestran los resultados de los valores de absorbancia y sus promedios obtenidos en función de la concentración del analito en cada solución patrón en las tres curvas calibración para calcio realizadas mediante EAA con Llama. ⁽⁹⁻¹⁴⁾

Concentración mg/dL	Absorbancia Curva 1	Absorbancia Curva 2	Absorbancia Curva 3	Promedio de Absorbancias
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,100	0,048	0,046	0,042	0,045
0,200	0,092	0,089	0,082	0,088
0,300	0,137	0,132	0,126	0,132
0,400	0,177	0,172	0,170	0,172
0,500	0,214	0,215	0,212	0,214
0,600	0,250	0,260	0,251	0,254

Tabla 6. *Valores de las absorbancias en función de las concentraciones de los estándares de calcio obtenidas mediante su análisis por EAA con Llama.*



Grafica 1. Curva de Calibración simple para la determinación de calcio mediante EAA con Llama



Grafica 2. Curva de regresión lineal para la determinación de calcio mediante EAA con Llama

Para la construcción de la curva de regresión lineal se utilizó el Software Microsoft Excel 2013 y se obtuvieron los siguientes parámetros como resultados:

$$m = 0,422$$

$$b = 0,002$$

$$r^2 = 0,999$$

Los resultados obtenidos para el coeficiente de determinación (r^2) indican estadísticamente un alto el grado de relación entre los niveles de concentración del calcio y los niveles de absorbancia ⁽⁹⁾, indicativo de la linealidad del método de EAA con Llama en la determinación de calcio en soluciones acuosas.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,0305767	0,0305767	15037,7213	2,6521E-08
Residuos	4	8,13333E-06	2,03333E-06		
Total	5	0,030584833			

Tabla 7. Resultados del Análisis de Varianza en EAA.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	0,0045333	0,00132	3,414973	0,026904	0,000847	0,0082190	0,000847	0,008219
0	0,418	0,00340	122,6283	2,65E-08	0,408536	0,4274639	0,408536	0,427463

Tabla 7.1. Resultados del Análisis de Varianza en EAA.

Coeficiente de Correlación	0,997
Coeficiente de determinación (r^2)	0,999
Coeficiente de variación de factor respuesta	2,790 %
Pendiente distinta de cero	$F_{exp}(0,422) > F_{critico}(2,652E-08)$
Intercepto distinto de cero	$t_{exp}(0,002) < t_{tab}(0,004)$

Tabla 8. Resultados de los criterios de aceptación de parámetros estadísticos de comprobación de la linealidad de un método analítico.

V.1.2.-Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación para el calcio

En la tabla que se muestra a continuación se observan los resultados obtenidos para las lecturas de las soluciones blancos analizados para la determinación del límite de detección y cuantificación para el método de EAA con Llama.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	$\Sigma xi-x$
Blanco	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002	0,000	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	
xi-x	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000		0,004

Tabla 9. Valores de las absorbancias de las soluciones blanco obtenidos para la determinación del Límite de detección y Limite de cuantificación para calcio mediante EAA con Llama

$$n = 10$$

$$DS_B = \sqrt{\frac{(\sum x_i - x)^2}{n-1}}$$

$$DS_B = \sqrt{\frac{(0,004)^2}{9}} = 0,0013$$

El valor de la pendiente utilizado para el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación se halló de la curva de regresión lineal obtenido anteriormente, donde $m = 0,422$.

Límite de Detección

$$LD = 3 S_b/m$$

$$LD = 3 * 0,0013 / 0,422$$

$$LD = 0,0095 \text{ mg/dL}$$

Límite de Cuantificación

$$LOQ = 10 S_b/m$$

$$LOQ = 10 * 0,0013 / 0,422$$

$$LOQ = 0,0316 \text{ mg/dL}$$

V.1.3.- Determinación de la Precisión para el calcio

Puede llevarse a cabo en tres niveles: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia. ⁽⁹⁾ Sin embargo el presente estudio solo se estudiará la repetibilidad y la precisión intermedia.

V.1.3.1.- Análisis de Repetibilidad

Los resultados obtenidos del estudio de la repetibilidad se muestran en la siguiente tabla.

Concentraciones del patrón Intermedio [0,30 mg/dL]	Absorbancias		Promedio = 0,136 Desviación Estándar = 0,002 Coefficiente de Variación = 1,47%	
	1	0,135		
	2	0,135		
	3	0,137		
	4	0,136		
	5	0,135		
	6	0,135		
	7	0,137		
	8	0,136		
	9	0,136		
	10	0,135		

Tabla 10. Resultados de las lecturas del patrón intermedio calcio de concentración (0,30 mg/dL) para el análisis de repetibilidad del método EAA con Llama.

El coeficiente de variación calculado para el estudio de la repetibilidad del método en estudio es de 1,47%, valor considerado aceptable según la ICH ⁽¹⁵⁾ para este parámetro que tiene como criterio de aceptación un valor máximo de hasta 2%.

V.1.3.2.- Análisis de la Precisión Intermedia

En la siguiente tabla se observan los valores de las absorbancias obtenidos en el análisis del patrón intermedio de calcio para la determinación de la precisión del Método de EAA con Llama.

Concentración del patrón intermedio (0,30mg/dL)	Absorbancias operador 1	Absorbancias operador 2
	0,135	0,132
	0,134	0,134
	0,133	0,133
Promedio	0,134	0,133
Desviación Estándar	0,0014	0,0014
Coefficiente de variación	1,04%	1,04%
Coefficiente de variación promedio = 1,04%		

Tabla 11. Resultados de las absorbancias del patrón intermedio de calcio de concentración (0,30mg/dL) para la determinación la precisión intermedia del método.

En el análisis de precisión intermedia permitió determinar que el método de EAA con Llama obtuvo un coeficiente de variación de 1,04%, porcentaje menor que el valor máximo para este parámetro (5%), según el criterio de aceptación de la ICH ⁽¹⁵⁾; es decir que este resultado indica que el método en estudio está dentro de los parámetros de aceptación.

En base a los resultados obtenidos para las pruebas de repetibilidad y precisión intermedia se puede afirmar que el método de EAA con Llama es preciso para el análisis de calcio en soluciones acuosas.

IV.1.4.- Determinación de la Exactitud para el calcio

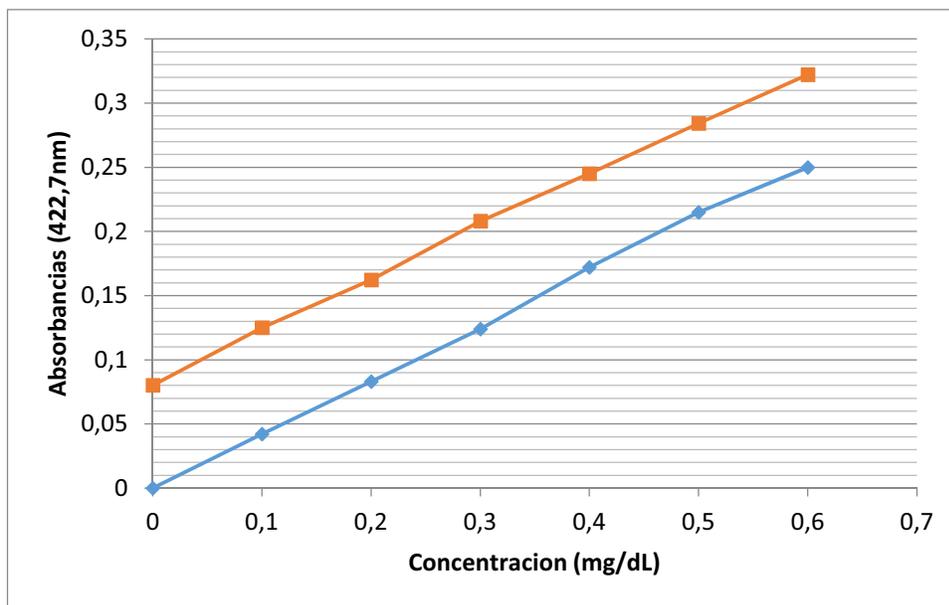
La exactitud de un método se determina a través de pruebas de adición / recuperación. ⁽¹⁵⁾

IV.1.4.1 Prueba de Adición de Estándar

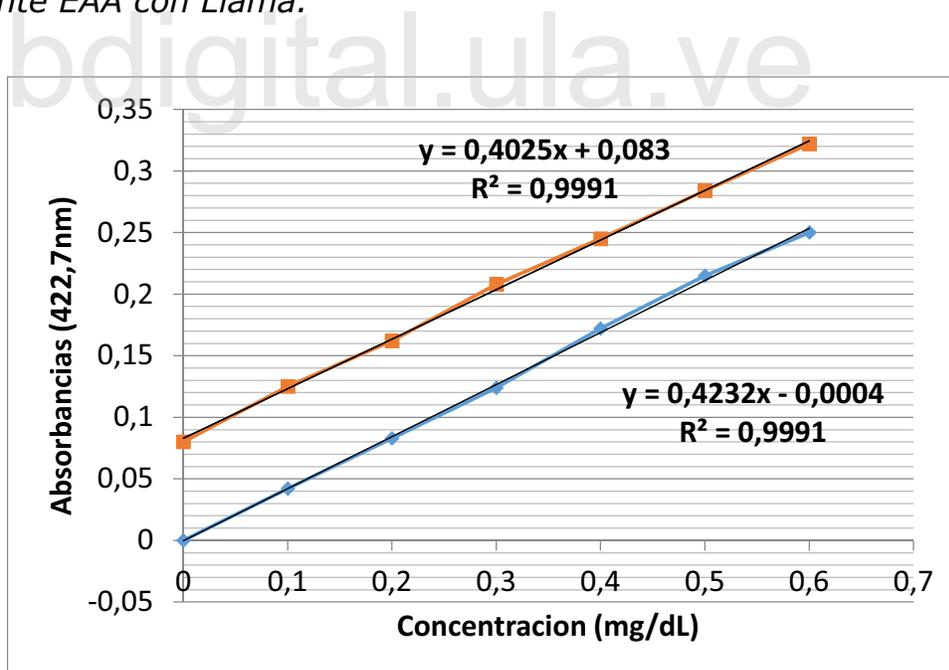
En la tabla que se presenta a continuación se observan los resultados de la prueba de adición de estándar para el Método de EAA con Llama para la determinación de calcio.

Estándares	Curva sin adición		Curva con adición	
	Concentración	Absorbancias	Concentración	Absorbancias
Blanco	0	0	0 + 0,100 mL	0,080
P1	0,100	0,042	0,1 + 0,100 mL	0,125
P2	0,200	0,083	0,2 + 0,100 mL	0,162
P3	0,300	0,124	0,3 + 0,100 mL	0,208
P4	0,400	0,172	0,4 + 0,100 mL	0,245
P5	0,500	0,215	0,5 + 0,100 mL	0,284
P6	0,600	0,250	0,6 + 0,1 mL	0,322
Suma	2,100	0,887	2,100	1,426
Promedio	0,350	0,126	0,350	0,237

Tabla 12: Resultados obtenidos en la prueba de Adición Estándar para determinación de calcio por el método de EAA con Llama.



Grafica 3. Curvas de calibración simple sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas mediante EAA con Llama.



Grafica 4. Curvas de calibración con regresión lineal sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas mediante EAA con Llama.

V.1.5.- Porcentaje de Recuperación para calcio

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las concentraciones de los estándares obtenidos durante la prueba de análisis de recuperación de calcio mediante el método de EAA con Llama.

Muestra	Absorbancia	Concentración Corregida mg/dL
Solución 1 (Base)	0,191	9,550
Solución 2 (P 6mg/dL)	0,202	10,100
Solución 3 (P 8mg/dL)	0,215	10,750
Solución 4 (P 10mg/dL)	0,218	10,090

Tabla 13. Resultados del Análisis de Recuperación de calcio mediante EAA con Llama

	Ca Medido (mg/dL)	Ca Agregado	Ca recuperado	% de Recuperación
Solución 1 (Base)	9,550	---	---	---
Solución 2 (P 6mg/dL)	10,100	0,545	0,550	100%
Solución 3 (P 8mg/dL)	10,750	0,727	1,200	165%
Solución 4 (P 10mg/dL)	10,090	0,909	0,540	59%

Tabla 14. Resultados del porcentaje de recuperación de calcio mediante EAA con Llama

El resultado del análisis de recuperación obtenido con EAA con Llama para la determinación de calcio en soluciones acuosas alcanzó un 108%; se considera aceptable ya que, el porcentaje obtenido es > al 98% criterio de aceptación para este parámetro según la ICH ⁽¹⁵⁾. Por tanto el método de EAA con Llama para la determinación de calcio en soluciones acuosas es exacto.

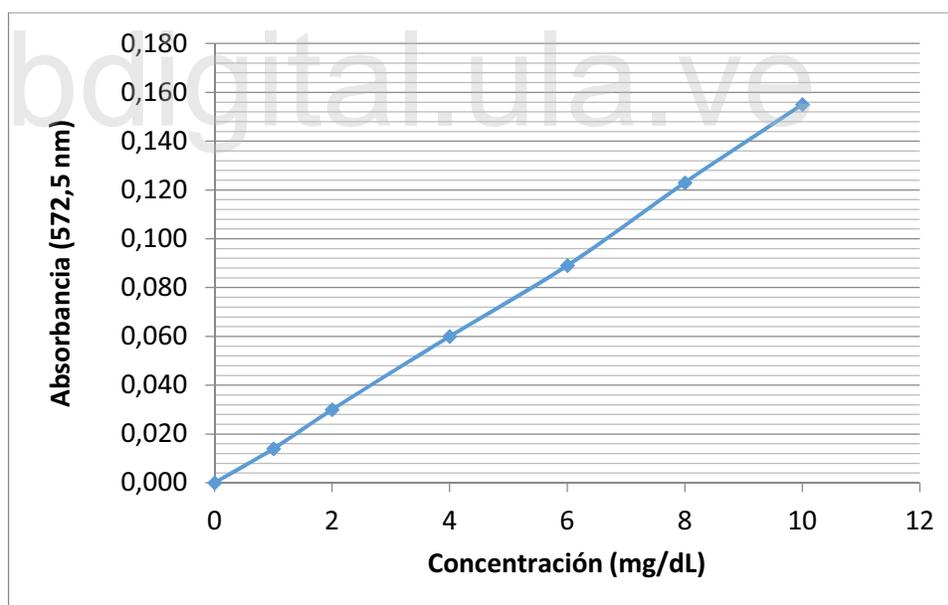
V.2.- Validación de la metodología analítica para la determinación de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Molecular.

V.2.1.- Determinación de la Linealidad para calcio

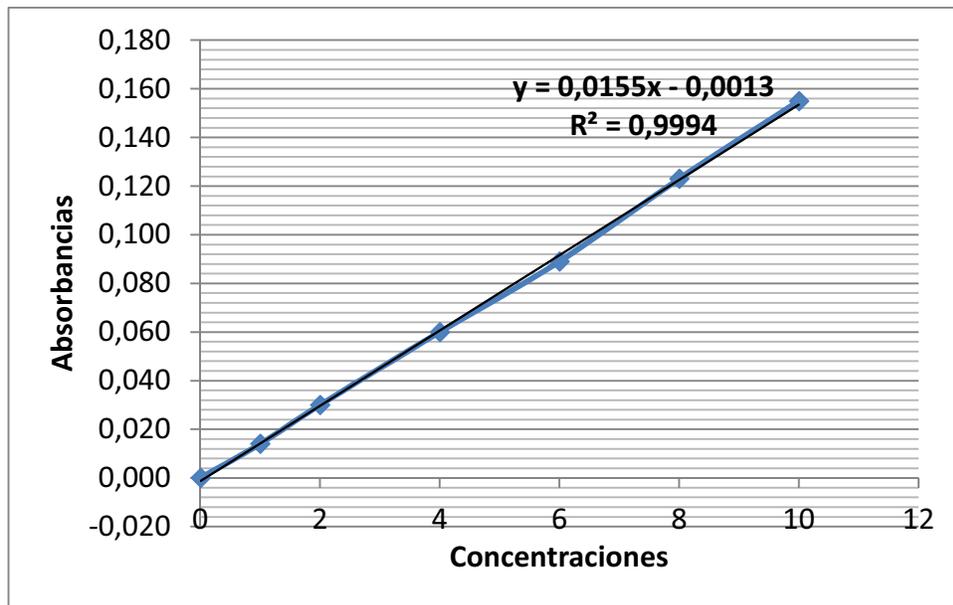
Para determinar la linealidad es necesario construir la llamada curva de calibración. En la siguiente tabla se muestran los resultados de los valores de absorbancia y sus promedios obtenidos en función de la concentración del analito en cada solución patrón en las tres curvas calibración para calcio realizadas mediante EAM. ⁽⁹⁻¹⁴⁾

Concentración mg/dL	Absorbancia Curva 1	Absorbancia Curva 2	Absorbancia Curva 3	Promedio de Absorbancias
0	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,015	0,010	0,019	0,014
2	0,030	0,031	0,029	0,030
4	0,065	0,056	0,061	0,060
6	0,092	0,096	0,092	0,089
8	0,129	0,121	0,120	0,123
10	1,163	0,151	0,152	0,155

TABLA 15. Valores de las absorbancias en función de las concentraciones de los estándares de calcio obtenidas mediante su análisis por EAM, con longitud de onda de 572,5 nm



Grafica 5. Curva de Calibración simple para la determinación de calcio mediante EAM



Gráfica 6. Curva de calibración con regresión lineal para la determinación de calcio mediante EAM

Para su construcción se utilizó el programa de computación Microsoft Excel 2013 y se obtuvieron los siguientes parámetros.

$$m = 0,015$$

$$b = 0,0013$$

$$r^2 = 0,999$$

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,014788804	0,014788804	6802,663516	1,29529E-07
Residuos	4	8,69589E-06	2,17397E-06		
Total	5	0,0147975			

Tabla 16. Resultados del Análisis de Varianza en EAM.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	0,00205	0,00114	-1,793371	0,147370	-0,005242	0,001127	-0,005242	0,001127
0	0,01559	0,00018	82,47826	1,29E-07	0,015066	0,016116	0,015066	0,016116

Tabla 16.1. Resultados del Análisis de Varianza en EAA.

Coeficiente de correlación (r)	0,999
Coeficiente de determinación (r ²)	0,999
Coeficiente de variación de factores respuesta	3,640 %
Pendiente distinta de cero	$F_{ex}(0,015) > F_{critico}(1,295E-07)$
Intercepto distinto de cero	$t_{exp}(0,001) < t_{tab}(0,002)$

Tabla 17. Resultados de los criterios de aceptación de parámetros estadísticos de comprobación de la linealidad de un método analítico.

V.2.2.- Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación

En la tabla que se muestra a continuación se observan los resultados obtenidos para las lecturas de las soluciones blancos analizados para la determinación del límite de detección y cuantificación para el método de EAM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	$\Sigma Xi - X$
BLANCO	0,096	0,087	0,087	0,082	0,083	0,082	0,085	0,084	0,084	0,086	0,085	-
$\bar{X}i - X$	0,011	0,002	0,002	0,003	0,002	0,003	0	0,001	0,001	0,001	-	0,026

Tabla 18. Valores de las absorbancias de las soluciones blanco obtenidos para la determinación del Límite de detección y Limite de cuantificación para calcio mediante EAM.

$$n = 10$$

$$DS_B = \sqrt{\frac{(\sum x_i - x)^2}{n-1}}$$

$$DS_B = \sqrt{\frac{(0,026)^2}{9}} = 0,008$$

El valor de la pendiente utilizado para el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación se halló de la curva de regresión lineal obtenido anteriormente, donde $m = 0,015$

Límite de Detección

$$LD = 3 S_b/m$$

$$LD = 3 * 0,008 / 0,015$$

$$LD = 1,670 \text{ mg/dL}$$

Límite de Cuantificación

$$LOQ = 10 S_b/m$$

$$LOQ = 10 * 0,008 / 0,015$$

$$LOQ = 5,580 \text{ mg/dL}$$

V.2.3.- Determinación de la Precisión para el elemento calcio

Puede llevarse a cabo en tres niveles: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia. ⁽¹⁵⁾ Sin embargo el presente estudio solo se estudiará la repetibilidad y la precisión intermedia.

V.2.3.1.- Análisis de Repetibilidad

Los resultados obtenidos en el análisis de repetibilidad se muestran en la siguiente tabla.

Absorbancias del patrón intermedio de [5 mg/dL]	Absorbancias		Promedio: 0,078 Desviación Estándar: 0,002 Coefficiente de Variación: 2,670 %
	1	0,080	
	2	0,079	
	3	0,079	
	4	0,078	
	5	0,075	
	6	0,082	
	7	0,077	
	8	0,079	
	9	0,076	
	10	0,081	

Tabla 19. Resultados de las lecturas del patrón intermedio calcio de concentración (5 mg/dL) para el análisis de repetibilidad del método EAM.

El coeficiente de variación calculado es de 2,670%, inaceptable según la ICH que tiene como criterio de aceptación 2%. ⁽¹⁵⁾

V.2.3.2.- Análisis de la Precisión Intermedia

En la siguiente tabla se observan los valores de las absorbancias obtenidos en el análisis del patrón intermedio de calcio para la determinación de la precisión del Método de EAM.

	Absorbancias operador 1	Absorbancias operador 2
Patrón Intermedio 5 mg/dL	0,080	0,075
	0,079	0,079
	0,079	0,074
	0,078	0,083
	0,075	0,080
	0,082	0,076
	0,077	0,075
	0,079	0,074
	0,076	0,075
	0,081	0,079
	Promedio	0,0786
Desviación Estándar	0,002	0,003
Coefficiente de Variación	2,670%	3,890%
Coefficiente de Variación promedio	3,280%	

Tabla 20. Resultados de las absorbancias del patrón intermedio de calcio de concentración (5 mg/dL) para la determinación la precisión intermedia del método.

En el análisis de precisión intermedia permitió determinar que el método de EAM obtuvo un coeficiente de variación de 3,280%, porcentaje menor que el valor máximo para este parámetro (5%), según el criterio de aceptación de la ICH ⁽¹⁵⁾; es decir que este resultado indica que el método en estudio está dentro de los parámetros de aceptación.

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que el método de EAM es preciso para el análisis de calcio en soluciones acuosas, aunque en la prueba de repetibilidad esté por encima del valor de aceptación.

V.1.4.- Determinación de la Exactitud para el calcio

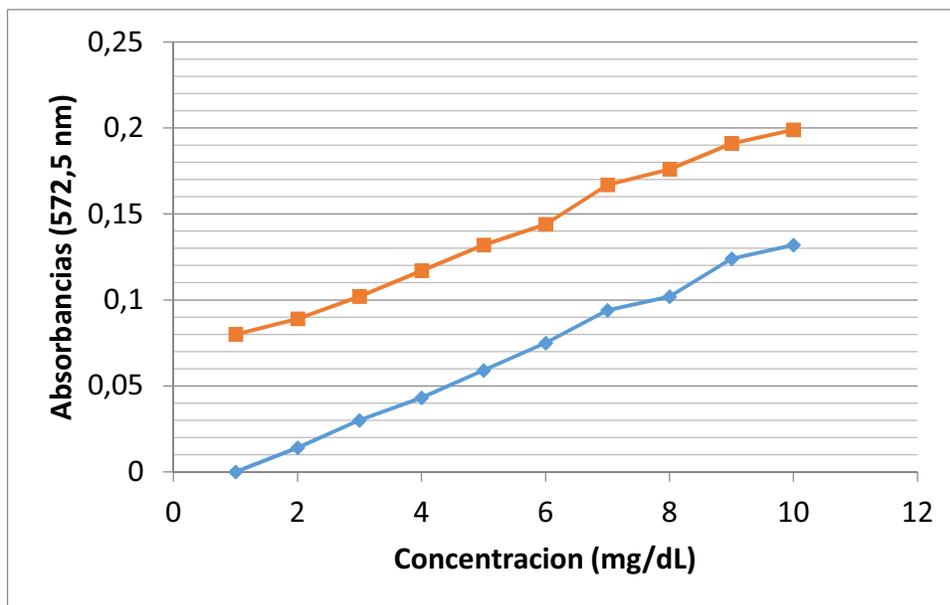
La exactitud de un método se relaciona a través de las pruebas de adición/ recuperación.

V.1.4.1.-Curva de Adición Estándar para la determinación de calcio

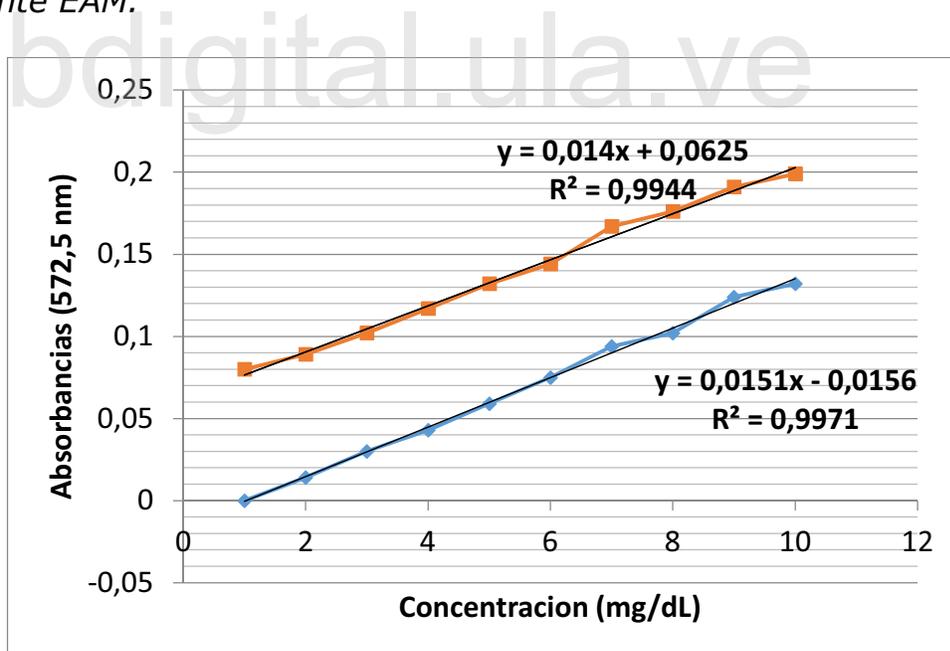
En la tabla que se presenta a continuación se observan los resultados de la prueba de adición de estándar para el Método de EAM para la determinación de calcio.

Estándares	Curva sin adición		Curva con adición	
	Concentración (mg/dL)	Absorbancias	Concentración (mg/dL)	Absorbancias
Blanco	0	0	0 + 30 μ L	0,080
P1	1,000	0,014	1,000 + 30 μ L	0,089
P2	2,000	0,030	2,000 + 30 μ L	0,102
P3	3,000	0,043	3,000 + 30 μ L	0,117
P4	4,000	0,059	4,000 + 30 μ L	0,132
P5	5,000	0,075	5,000 + 30 μ L	0,144
P6	6,000	0,094	6,000 + 30 μ L	0,167
P7	7,000	0,102	7,000 + 30 μ L	0,176
P8	8,000	0,124	8,000 + 30 μ L	0,191
P9	9,000	0,132	9,000 + 30 μ L	0,199

Tabla 21. Resultados obtenidos en la prueba de Adición Estándar para determinación de calcio por el método de EAM.



Grafica 7. Curva de calibración simple sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas mediante EAM.



Grafica 8. Curva de calibración con regresión lineal simple sin adición y con adición de estándar para la determinación de calcio en soluciones acuosas mediante EAM.

V.1.4.2.- Porcentaje de Recuperación para calcio

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las concentraciones de los estándares obtenidos durante la prueba de análisis de recuperación de calcio mediante el método de EAM.

Muestra	Absorbancia	Concentración Corregida
Solución 1 (base)	0,073	4,898
Solución 3 (5 mg/dL)	0,104	6,978
Solución 3 (10 mg/dL)	0,137	9,192

Tabla 22. Resultados del Análisis de Recuperación de calcio mediante EAM

Muestra	Ca medido (mg/dl)	Ca agregado	Ca recuperado	% de Recuperación
Solución 1 (base)	4,898	-	-	-
Solución 2	6,978	2	2,080	104,005
Solución 3	9,192	4	4,294	107,360

Tabla 23. Resultados del porcentaje de recuperación de calcio mediante EAM

El resultado del análisis de recuperación obtenido con EAM para la determinación de calcio en soluciones acuosas se considera aceptable ya que, el porcentaje obtenido es > al 98% criterio de aceptación para este parámetro según la ICH ⁽¹⁵⁾. Por tanto, el método de EAM para la determinación de calcio en soluciones acuosas es exacto.

VI.- CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos durante el proceso de validación de los métodos analíticos de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama y Espectrofotometría de Absorción Molecular para la determinación de calcio en soluciones acuosas, permiten demostrar que ambos métodos analíticos cumplen con todos y cada uno de los criterios de aceptación estadísticos de calidad analítica establecidos nacional e internacionalmente. Por tanto, ambos métodos son confiables para la determinación de calcio en soluciones acuosas.

bdigital.ula.ve

VII.- RECOMENDACIÓN

Se recomienda para trabajos posteriores realizar estudios de validación complementarios y de comparación de los métodos de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama y Espectrofotometría de Absorción Molecular para suero humano y de esta forma poder establecer si la Espectrofotometría de Absorción Atómica es un método confiable para la determinación de calcio sérico comparado con el método de la Espectrofotometría de Absorción Molecular y puede sustituir a éste.

bdigital.ula.ve

REFERENCIAS

1. Gama M. Biología I. Un enfoque constructivista. 3ra. edición. México: Pearson Educación; 2007.
2. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología médica. 11ra edición. España: Elsevier; 2006.
3. Palacios C. Lo nuevo en los requerimientos de calcio, propuesta para Venezuela. Canales venezolanos de nutrición. 2007; 20 (2): 99-107.
4. Sierra Isabel, Morante Sonia, Pérez Damián. Experimentación en química analítica. Editorial DYKINSON, SL. Meléndez Valdés. Madrid, 2007.
5. Ganong W. Fisiología Médica. 18° Edición. México – Santa Fe de Bogotá: El Manual Moderno.
6. Cipriano E. Metabolismo del calcio. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima Perú.
7. D'Isa Gabriela y Sand Guillermina. Revista Bioanálisis. Capítulo Bioquímico de la Sociedad Argentina de Terapia Intensiva, a través de su comisión de normalización.
8. Ángel G, Ángel M. Interpretación clínica del Laboratorio. 7ma Edición. Bogotá: Medica Panamericana; 2006.
9. A.E.F.I. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. España, 2011.
10. Union Europea, Japón, EE.UU. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: methodology; 1996.
11. Harris DC. Métodos de Calibrado. Análisis químico cuantitativo. Tercera edición. Barcelona-España: Reverté S.A; 2007: 80-93.
12. Comisión del Codex alimentarius. Validación por un solo laboratorio examen de las directrices armonizadas de la UIQPA para la validación interna de métodos de análisis. Italia, Roma: FAO; 2002.

13. Skoog Douglas A., Holler James y Nieman Timothy A. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw-HILL. Quinta edición. 2001
14. Suárez R, Arévalo E, Linares L, Ustáriz F y Hernández G. Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. Avances en Química, 4(2),53-62 (2009)
15. International conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical Procedures: Text and methodology ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005.
16. García P, Concepción J, Gómez L, Fusté V. Desarrollo y validación de un método analítico para el control de calidad de ergocalciferol inyectable al 0,5 %. Lat. Am. J.Pharm. 2007; 26(1): 103-107
17. USPC Official. Validation of compendial procedures; 2008:1-10.
18. Vickers TJ. Atomic Fluorescence and Atomic Absorption Spectroscopy. Physical Methods in Modern Chemical Analysis. Edited by Theodore Kuwana. Academic Press. New York. (1). 1978: 235-239.
19. Long GL. Winefordner JD. Report Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition. Analytical Chemistry 1983; 55(7): 712-724
20. Herrera Choque VC. Toxicidad del extracto de alcaloides totales de la Galipea longiflora Krause Kallunki (Evanta) en fase preclínica. [Tesis doctoral]. La Paz- Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2008)
21. Austria, IAEA. Validation of Analytical Methods for Food Control. Viena: FAO; 1997
22. Sánchez-Ramos S y Jorge María D. El calcio en los materiales cerámicos y su problemática analítica. I. Métodos de Análisis Químico. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio 1991; 30(4):269-272
23. Guía de validación de métodos analíticos. Editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos México, A. C. http://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico

24. Valencia F, Roman M, Cardona D. El calcio en el desarrollo de alimentos funcionales. Revista lasallista de Investigación. 2011; 8 (2): 104 – 116.
25. Gutiérrez Y, Martínez M, Varona N, Rodríguez A. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajaba, L. Revista Cubana Farmacia v.34 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2000.
26. Fernández M, Díaz R, Cordero R. 2002. Validación del método de cuantificación de calcio en tabletas de carbonato de calcio 500mg. Optimización y validación. Revista electrónica SINTEFARMA 8(2): julio-diciembre.) bvs.sld.cu/revistas/sint/vol8_2_02/sint4202.htm. bajada de internet el 06/04/2012
27. García C, Fernández D, Núñez L, Gómez M, Martínez V. Validación de los métodos analíticos para el control de la calidad y estudio de estabilidad del salbutamol 0,5 % en solución nebulizadora. Revista Cubana Farmacia 2005; 39(2).
28. Becquer Romagoza CE, Paredes Varela G, Rodríguez Calero I, Rodríguez Cristóbal O, Sánchez Hechavarría AM. Desarrollo y validación del método de cuantificación de carbonato de calcio en Suplecal®. Revista CENIC. Ciencias Químicas 2010411-8. Disponible en: <http://oai.redalyc.org/articulo.oa?id=181620500004>. Fecha de consulta: 26 de octubre de 2015.
29. Gallegos Hellen. Propuesta y validación de un nuevo método para cuantificar bromo. [Tesis para optar el Título de Licenciada en Química]. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, mayo del 2013.
30. Gómez Diego. Validación de la metodología por el método estándar 3111^a – Absorción Atómica para el análisis de metales pesados en muestras de aguas y aguas residuales. Pereira. Universidad tecnológica de Pereira. 2011.
31. Londoño, Diana. Validación del método de determinación de Calcio y Magnesio por Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama para el

- laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. [Trabajo de grado requisito parcial para optar al título de: Químico industrial]. Pereira. Universidad tecnológica de Pereira. 2013.
32. Arévalo E, Becerra G, Araujo J. Análisis Instrumental. Mérida – Venezuela: Textos Universidad de los Andes. Colección Ciencias De La Salud. Serie Bioanálisis. CP. ULA; 1984.
33. Walton H, Reyes J. Análisis químico e instrumental moderno. España: Reverte; 1983.
34. Arévalo E. Guías de Análisis Instrumental. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela. 2009
35. (Repett J y col. Reactivos y materiales in Rodríguez N. Aseguramiento de la calidad en los Laboratorios Clínicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Mérida (Venezuela); 2007)
36. Métodos cuantitativos de análisis empleando EAA y EAA con Llama. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Caracas 2003
37. Organismo Argentino de acreditación (OAA). Guía para validación de métodos de ensayo. Versión 1.2003.