

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
"DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ"
SANTA CLARA, VILLA CLARA

EVALUACIÓN ANALÍTICA DE UNA TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
CALCIO EN SANGRE DEL CORDÓN UMBILICAL

Por:

MSc. Tahiry Gómez Hernández¹, Dra. C. Olga Lidia González González², Lic. Leticia Cristina Béquer Mendoza³, MSc. Gisela Peralta Messeguer⁴, MSc. Rafael Sosa Martínez⁵ y Téc. Ángel Mollineda Trujillo⁶

1. Máster en Química Analítica. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Instructora. Aspirante a Investigadora. ISCM-VC. e-mail: tahirygh@iscm.vcl.sld.cu
2. Doctora en Ciencias Médicas. Unidad de Investigaciones Biomédicas. ISCM-VC. Profesora Titular. ISCM-VC.
3. Licenciada en Biología. Unidad de Investigaciones Biomédicas. ISCM-VC. Aspirante a Investigadora. ISCM-VC.
4. Máster en Pedagogía. Licenciada en Química. Facultad de Química-Farmacia. Profesora Auxiliar. UCLV.
5. Licenciado en Química. Investigador Agregado. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV.
6. Técnico en Análisis Químico. Centro de Investigaciones Agropecuarias. UCLV.

Resumen

En el presente trabajo se evaluaron los indicadores de desempeño analítico: linealidad, precisión y exactitud en el método espectrofotométrico ultravioleta visible, utilizando la o-cresoltaleína complexona para la determinación de calcio en sangre del cordón umbilical; se demostró la adecuación de su funcionamiento y fiabilidad al propósito deseado. 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 al Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, en el montaje de técnicas destinadas a evaluar parámetros bioquímicos en sangre del cordón umbilical.

Descriptores DeCS:

ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/
métodos
SANGRE FETAL/química
CALCIO/sangre

Subject headings:

SPECTROPHOMETRY, ULTRAVIOLET/
methods
FETAL BLOOD/chemistry
CALCIUM/blood

Introducción

Durante la gestación, la placenta y la circulación sanguínea fetoplacentaria cubren importantes funciones que son imprescindibles para el correcto desarrollo fetal. Sin embargo, anteriormente, la placenta y la sangre contenida en ella han sido consideradas productos de desecho después del alumbramiento, lo que ha significado la principal causa de la limitación de los métodos de investigación y análisis vigentes¹.

En el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas perteneciente al Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, se trabaja en el montaje de técnicas para estudiar el comportamiento de varios indicadores bioquímicos en muestras de sangre del cordón umbilical provenientes del salón de partos del Hospital Universitario Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de Santa Clara; entre ellos se encuentran los niveles séricos de metales: hierro, cobre, cinc, sodio, potasio, magnesio y calcio. Particularmente, el estudio de los niveles séricos de calcio se ve limitado por la inexistencia de un método validado que permita cuantificar este macroelemento en sangre del cordón umbilical, de manera confiable.

El método analítico más utilizado para la medida de la concentración de calcio en suero es la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS), en la que se emplea como reactivo desarrollador del color, la o-cresoltaleína complexona a pH alcalino²⁻⁴; en las publicaciones sobre este método, no se describen los criterios de validación, y se limitan a argumentar el protocolo de trabajo.

La selección y desarrollo de métodos analíticos necesita de un estudio de validación previo, que demuestre la adecuación de su funcionamiento al propósito deseado. La extensión del trabajo de validación depende de las características del método de ensayo y del componente a determinar⁵⁻⁸.

Por estos motivos, es de gran interés científico evaluar los parámetros de desempeño analítico: linealidad, precisión y exactitud del método espectrofotométrico UV-VIS, utilizando la o-cresoltaleína complexona para la cuantificación de calcio en sangre del cordón umbilical, en las condiciones de trabajo del Laboratorio de Diagnóstico Molecular.

Métodos

Para evaluar la precisión, se utilizó una mezcla de sueros de sangre del cordón umbilical provenientes del salón de partos del Hospital Universitario Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de Santa Clara.

Para evaluar la linealidad y la exactitud del método estudiado, se utilizó la sustancia de referencia Precipath U⁹.

Al analizar la linealidad, se construyeron tres curvas de calibración^{10,11} en el intervalo de concentraciones, desde 0,9268 hasta 3,3100 mmol/L, con valores intermedios de 1,3240, 1,7212, 2,1184, 2,5156 y 2,9128 mmol/L, y se determinó la ecuación de la recta y los estadígrafos necesarios para la evaluación de los criterios de este indicador.

La precisión se estudió teniendo en cuenta los criterios establecidos para la repetibilidad y la precisión intermedia del método^{7,11}.

Para determinar el comportamiento de la repetibilidad, se realizaron seis réplicas de la mezcla de suero con condiciones homogéneas para el análisis, y se calculó la media de la concentración de calcio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la repetibilidad (CV) de los seis resultados obtenidos. En el estudio de la precisión intermedia, se desarrolló el experimento anterior en tres días y por tres analistas diferentes. Los valores obtenidos en los tres días se analizaron en un solo grupo y se realizó un análisis de varianza (one way ANOVA, $\alpha = 0,05$), con el objetivo de determinar los estadígrafos necesarios para la evaluación de los criterios de aceptación de este indicador.

La exactitud del método se determinó a través del análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida; se realizaron seis réplicas a una solución de 2.5156 mmol/L del suero de referencia Precipath U¹¹.

El valor medio obtenido experimentalmente y el certificado se compararon 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 y R: Por ciento de recuperación media.

Además, se realizó una prueba de hipótesis t de Student para demostrar si los recobrados obtenidos difieren significativamente de 100; para ello se utilizó la expresión: $t_{exp} = \frac{|100-R|\sqrt{n}}{CV}$

Donde: R: Por ciento de recuperación media; n: número de determinaciones y CV: coeficiente de variación del por ciento de recuperación en cada determinación^{12,13}.

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

Resultados

La representación gráfica de los resultados experimentales obtenidos para cada nivel de concentración analizado en el estudio de linealidad, se muestran en la figura. Los parámetros de la recta de regresión calculados aparecen en la tabla 1.

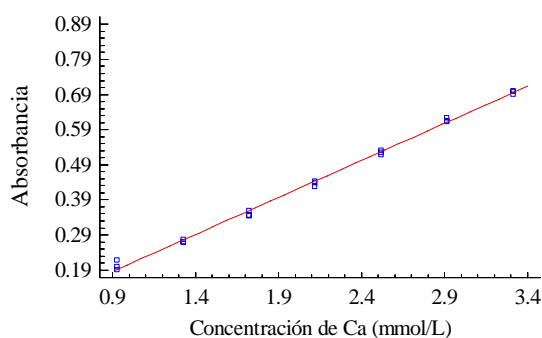


Figura Curva de calibración para el calcio.

Tabla 1 Indicadores de la recta de regresión del estudio de linealidad.

Parámetros estadísticos	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	$CVf \leq 5\%$
Prueba estadística de b (t tab(19; p = 0,05))	tcalc = 79,4782 ttab = 1,73	$t_{exp} \geq t_{tab}$

En la tabla 2 se muestran los resultados de la repetibilidad, obtenidos en condiciones homogéneas de análisis, y en la tabla 3, los resultados derivados del estudio de la precisión intermedia efectuados en tres días y por tres analistas diferentes.

Tabla 2 Resultados de la repetibilidad del método espectrofotométrico UV-VIS en estudio.

Parámetros estadísticos	Valores
n	6
Media (mmol/L)	2,4923
Desviación estándar	0,0373
CVr (%)	1,50

Tabla 3 Indicadores obtenidos en el estudio de la precisión intermedia teniendo en cuenta los resultados experimentales de los tres días.

Indicadores 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
$F_{\text{tabulado}} (F(0.05,2,15))$	3,68
$C_{\text{calculado}}$	0,3426
C_{tabulado}	0,707

En la tabla 4 se analizaron los resultados de la evaluación de la exactitud del método UV-VIS a través del análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida.

Tabla 4 Indicadores obtenidos en el estudio de la exactitud.

Parámetros estadísticos	Valores
n	6
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
$t_{\text{tab}} (t(5,0.05))$	2,01

Discusión

Mediante los parámetros de linealidad, se halló 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, 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 la prueba de t de la pendiente resultó $t_{exp} \geq t_{tab}$, criterio que avala la linealidad del método^{10,11}.

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 de 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 del analito en la muestra están entre 1,50 y 3,30 mmol/L, límites de concentración de calcio compatibles con la vida del recién nacido^{1,14,15}.

Los resultados de la repetibilidad del método cumplen con el criterio de aceptación de este indicador, debido a que el coeficiente de variación obtenido (1,50 %) es menor que un 3 %⁷.

En el análisis de la precisión intermedia, se calcularon los coeficientes de variación entre los días y según Horwitz; estos confirman que $CV\%_{Entre\ días} < CV\%_{Horwitz}$; por tanto, se considera este criterio como de precisión aceptable del método. La comparación de los valores de F obtenidos de ANOVA evidencian que $F_{calculado} > F_{tabulado}$ e indican que los resultados obtenidos en los tres días son significativamente diferentes, posiblemente por el cambio de los 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 $CV\%_{Entre\ días} < CV\%_{Horwitz}$ y, por tanto, el método es considerado de precisión aceptable. La comparación del valor de la C de Cochran calculado con el tabulado muestra que $C_{calculado} < C_{tabulado}$, por lo que la variación del método es considerada igual para los tres días estudiados y es este un criterio que avala la precisión intermedia del método^{7,11}.

Como el estudio de la precisión –evaluado mediante 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 de sangre de cordón umbilical.

El valor de recobrado para el nivel de concentración evaluado se encuentra dentro del rango 97 - 103 % y la prueba de t resultó $t_{exp} < t_{tab}$, criterios que avalan la exactitud del método. Se considera, por tanto, 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.⁽¹¹⁻¹³⁾

Summary

The present study assessed the analytical performance indicators: linearity, accuracy and exactness in the visible ultraviolet spectrophotometric method using the o-cresolphthalein complexone for the determination of the calcium in blood from the umbilical cord. The adequateness of its functioning was demonstrated as well as the reliability for the intended purpose. The results achieved in the study are part of the research line developed by the Molecular Diagnosis Laboratory of the Biomedical Research Unit belonging to the Medical University of Villa Clara for the assembly of techniques devoted to assess the biochemical parameters in the blood of the umbilical cord.

Referencias bibliográficas

1. Guyton A, Hall J. Fisiología fetal y neonatal. En: Tratado de fisiología médica. 10^{ma} ed. México: McGraw-Hill; 2001. p. 1153-63.
2. Kang H, Scott M, Joe B. Model for predicting the impact of gadolinium on plasma calcium measured by the o-cresolphthalein method. Clin Chem. 2004;50(4):741-6.
3. Suardíaz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio clínico. La Habana: Ciencias Médicas; 2004.
4. HELFA Diagnósticos. Calcio en suero. La Habana: Suministrador EPB. "Carlos J. Finlay"; 2007.
5. AOAC International, Method validation programs. Peer Verified Programs. [serial on the Internet]. 2002 [cited 2006 Dec 10];[about 3 p.]. Available from: [http://aoac.org/vmeth/peerverimtd\[1\].html](http://aoac.org/vmeth/peerverimtd[1].html)

6. Regulación No. 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: Cedmed; 2007.
7. NC-TC-368:2004. Guía para la validación de métodos químicos. La Habana; 2004.
8. 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.
9. Stoeppler M, Wolf W. Reference materials for chemical analysis. Certification, availability and proper usage. New York: Freeman and Company; 2001.
10. Joachim E, John H. Method validation in pharmaceutical analysis. A guide to best practice. Belgium: McB Miller; 2005.
11. Apers S, Theunis M. Validation. Laboratory of Pharmacognosy. Belgium: University of Antwerp; 2006.
12. Norma ISO/IEC 17025:2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración; 2006.
13. Trygg J, Svante W. Introduction to statistical experimental. Australia: University of Queensland; 2003.
14. Heil W, Koberstein R, Zawta B. Reference ranges for adults and children. Preanalytical considerations. Francais: Roche Diagnostics; 2002.
15. Shriver D, Atkins F. Inorganic chemistry. 3nd ed. New York: Freeman and Company; 2003.