



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
DE ANÁLISIS DE Na, K, Ca Y Mg EN SUERO
SANGUÍNEO HUMANO POR ESPECTROSCOPIA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA POR LLAMA.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

ALEJANDRO MONSERRAT GARCÍA ALEGRÍA

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DE 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACIÓN DEL JURADO

de la tesis presentada por:

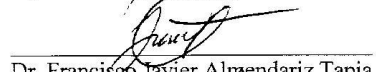
ALEJANDRO MONSERRAT GARCÍA ALEGRÍA

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

26 nov. 2012
Fecha


Dr. Agustín Gómez Álvarez
Presidente

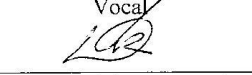
26 nov 2012
Fecha


Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia
Secretario

26 Nov/2012
Fecha


Dr. Guillermo Tiburcio Munive
Vocal

26 NOV 2012
Fecha


M.C. Leticia García Rico
Sinodal Externo

UNIVERSIDAD DE SONORA
AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

Noviembre 26 de 2012.

Por la presente se hace constar que el estudiante **Alejandro Monserrat García Alegría** ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.



Dr. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA

**COORDINADOR
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

RESUMEN

En la actualidad, no existe en la Norma Oficial Mexicana un método de referencia para evaluar la concentración de metales en suero sanguíneo humano, mediante espectroscopia de absorción atómica. Por lo que el objetivo de este trabajo de investigación, que se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, es desarrollar el procedimiento para estandarizar y validar un método analítico por espectroscopía de absorción atómica por flama para cuantificar Na, K, Ca y Mg en suero sanguíneo humano utilizando parámetros de calidad tales como exactitud, repetibilidad, linealidad, límite de detección e incertidumbre, parámetros recomendados por la Entidad Mexicana de Acreditación. Primero se trabajó en la estandarización en condiciones ideales utilizando estándares de alta pureza a concentración conocida y posteriormente se trabajó con la validación del método utilizando un estándar certificado NIST 1670a, para finalmente evaluar la utilidad de esta metodología en la determinación de metales en un compuesto de suero sanguíneo humano. Los criterios de calidad evaluados muestran valores consistentes y aceptables en función del estadístico de prueba utilizado para cada parámetro con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$) y una confiabilidad del 95%, así como un valor de incertidumbre estándar combinada por debajo de 0.05. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que esta metodología puede ser utilizada como de referencia por laboratorios de análisis clínicos en el área de servicios a la salud o en investigación clínica, así como que sea reconocida y recomendada por instancias oficiales.

ABSTRACT

Currently, there is no method of reference in the Mexican Official Norm to evaluate the concentration of metals in the human blood serum by means of spectroscopy of atomic absorption. For the objective of this research, which took place in the Chemical-Biological Sciences Department of the University of Sonora, is to develop the procedure to standardize and validate an analytic method by spectroscopy of atomic absorption by flame to quantify Na, K, Ca and Mg in human blood serum using some quality parameters such as accuracy, repeatability, linearity, limit of detection and uncertainty, parameters recommended by the Mexican Entity of Accreditation. First, some work was done in the standardization on ideal conditions using standards of high purity to known concentration and later on, work was done with the validation of the method using a certificated standard NIST 1670a, to finally evaluate the utility of this methodology in the determination of metals in a composite of human blood serum. The criteria of quality evaluated show consistent and acceptable values in function of the statistician of test used for each parameter with a significance level of 5% ($\alpha=0.05$) and a reliability of 95%, and a value of standard uncertainty combined under 0.05. In base of the results obtained it can be concluded that this methodology can be used as reference by laboratories of clinical analysis in the health services area or in clinic research, being recognized and recommended by official companies.

DEDICATORIA

A mi familia pequeña, a Luz Marina y muy especialmente a mis hijos Alejandro Monserrat y Aldo Maciel quiénes han crecido constantemente en estatura, conocimiento y experiencias, mientras este trabajo avanzaba poco a poco.

A mi familia grande....mis padres Manuel y Lydia, mis hermanos Victor y su familia, Mireya, Pável, Sachenka y su familia, Javier, Lianni y Abril; a mi hermana Lupita y su familia, Humberto, Selene y su familia Berna y Damián; a Jesús y su hijo Eliú Martín; y a mis hermanas Lila y Elvia.

Para todos ustedes...Enhorabuena y los quiero mucho!!!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xii
AGRADECIMIENTOS	xvi
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivo General	3
1.3 Objetivos Específicos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Importancia de los Electrolitos Sanguíneos	4
2.2 Patologías Asociadas a Alteraciones de los Niveles de Electrolitos	6
2.2.1 Sodio (Na)	6
2.2.2 Potasio (K)	8
2.2.3 Calcio (Ca)	9
2.2.4 Magnesio (Mg)	12
2.3 Métodos de Análisis Químico de Electrolitos en Muestras Biológicas	14
2.3.1 Métodos Espectrofotométricos (Colorimetría)	14
2.3.2 Métodos Espectrofotométricos de Emisión (Fotometría de Llama)	14
2.4 Ventajas y Desventajas de los Métodos de Análisis de Electrolitos en Muestras Biológicas por Métodos Espectrofotométricos (Colorimetría)	15
2.5 Ventajas de los Métodos Instrumentales [(Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA)]	16
2.6 Importancia de la Estandarización y Validación de un Método Analítico	17
2.7 Métodos Estadísticos para Estandarizar y Validar un Método Analítico	18
2.7.1 Exactitud	18

TABLA DE CONTENIDO (Continuación...)

	Página
2.7.2 Precisión	18
2.7.2.1 Repetibilidad	18
2.7.2.2 Reproducibilidad	18
2.7.3 Linealidad	18
2.7.4 Límite de Detección	19
2.7.5 Incertidumbre	19
2.8 Métodos para la Evaluación de la Incertidumbre	20
2.8.1 Evaluación Tipo A	20
2.8.2 Evaluación Tipo B	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Localización del Área de Estudio	23
3.2 Preparación de Materiales	23
3.3 Preparación de Estándares Grado Analítico para Trabajar en Condiciones Ideales	23
3.3.1 Primera Etapa	23
3.3.2 Segunda Etapa	24
3.3.3 Tercera Etapa	26
3.3.4 Cuarta Etapa	26
3.4 Aplicación del Método Estandarizado y Validado	27
3.4.1 Análisis de Suero Sanguíneo Humano	27
3.4.2 Colecta de las Muestras	27
3.4.3 Descomposición de las Muestras de Suero Sanguíneo Humano	27
3.5 Calibración del Equipo	28
3.6 Estandarización y Validación del Método	28
3.6.1 Parámetros para el Análisis Estadístico	28
3.6.1.1 Exactitud	28
3.6.1.2 Precisión	30
3.6.1.2.1 Determinación de la Repetibilidad	30
3.6.1.3 Linealidad	32
3.6.1.4 Límite de Detección	36
3.6.1.5 Incertidumbre	38

TABLA DE CONTENIDO (Continuación...)

	Página
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Exactitud	41
4.1.1 Exactitud para Estándares Individuales	41
4.1.2 Exactitud para Estándares Mixtos	45
4.2 Repetibilidad	48
4.2.1 Repetibilidad para Estándares Individuales	48
4.2.2 Repetibilidad para un Estándar Mixto	51
4.3 Linealidad	53
4.4 Límite de Detección	57
4.5 Determinación de la Exactitud a Partir de un Estándar de Referencia Certificado	61
4.6 Estimación de la Incertidumbre Estándar en las Mediciones	63
4.6.1 Concentración de Masa del Metal Medido en el Instrumento a Través de la Curva de Calibración	63
4.6.1.1 a Respuesta del Instrumento	63
4.6.1.2 b Material de Referencia Certificado (NIST 2670a)	68
4.6.2 Estimación de la Incertidumbre Debida al Factor de Dilución	68
4.6.3.- Estimación de la Incertidumbre Estándar en Base al Valor del Blanco	77
4.6.4.- Estimación de la Incertidumbre Estándar en Base a la Repetibilidad	79
4.7 Determinación de la Concentración de Na, K, Ca y Mg a Partir de Suero Sanguíneo Humano	84
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
5.1 Conclusiones	86
5.2 Recomendaciones	87
6. BIBLIOGRAFÍA	88
7. ANEXOS	96
ANEXO A. Datos para Análisis de Exactitud para un Estándar Individual	96
ANEXO B. Datos para Análisis de Exactitud para un Estándar Mixto	100

TABLA DE CONTENIDO (Continuación...)

	Página
ANEXO C. Datos para Análisis de Repetibilidad para un Estándar Individual	104
ANEXO D. Datos para Análisis de Repetibilidad para un Estándar Mixto	108
ANEXO E. Datos para Calcular la Linealidad y el Límite de Detección	109
ANEXO F. Datos para Calcular la Concentración de los Metales (ppm) a Partir de Suero Sanguíneo Humano	110
ANEXO G. Datos para Calcular la Concentración de los Metales (ppm) a Partir de un Estándar Certificado de Orina NIST 2670a	112
ANEXO H. Datos para la Calibración del Material Volumétrico Mediante Gravimetría y para Calibración de la Balanza Analítica	114
ANEXO I. Datos para Estimar la Repetibilidad en Base al Valor de los Blancos	116

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de Ishikawa o de causa-efecto o de cola de pescado.	22
2	Curva de regresión ajustada para Na para evaluar la linealidad.	55
3	Curva de regresión ajustada para K para evaluar la linealidad.	55
4	Curva de regresión ajustada para Ca para evaluar la linealidad.	56
5	Curva de regresión ajustada para Mg para evaluar la linealidad.	56
6	Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de Na.	58
7	Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de K.	58
8	Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de Ca.	59
9	Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de Mg.	59
10	Diagrama de Ishikawa (de causa-efecto) de acuerdo a las fuentes de incertidumbre del presente trabajo.	64

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales causas de hiponatremia e hipernatremia.	7
2	Principales causas de hipopotasemia e hiperpotasemia.	10
3	Principales causas de hipocalcemia e hipercalcemia.	11
4	Causas de hipomagnesemia e hipermagnesemia.	13
5	Condiciones de operación del equipo de EAA para cada metal a cuantificar.	25
6	Resultados de las determinaciones de Na por semana a tres diferentes niveles de concentración.	42
7	Resultados de las determinaciones de K por semana a tres diferentes niveles de concentración.	42
8	Resultados de las determinaciones de Ca por semana a tres diferentes niveles de concentración.	43
9	Resultados de las determinaciones de Mg por semana a tres diferentes niveles de concentración.	43
10	Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 500, K 25, Ca 25 y Mg 10 ppm).	46
11	Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 1000, K 50, Ca 50 y Mg 25 ppm).	46
12	Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 2000, K 100, Ca 100 y Mg 50 ppm).	47
13	Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 4000, K 200, Ca 200 y Mg 100 ppm).	47
14	Datos de Repetibilidad para el método instrumental utilizado a partir de estándares individuales.	50
15	Datos de Repetibilidad para el método instrumental utilizado a partir de un estándar mixto.	52

LISTA DE TABLAS (Continuación...)

Tabla		Página
16	Determinación de la Linealidad en base al estadístico F^* ($\alpha = 0.05$).	60
17	Concentración para Na, K, Ca y Mg (ppm) obtenida a partir de un estándar de referencia certificado (SRM NIST 2670a), incluyendo el porcentaje de recuperación de cada metal.	62
18	Cálculo de incertidumbre para la concentración de masa a partir de las curvas de calibración.	66
19	Parámetros utilizados para la estimación de la incertidumbre estándar para la concentración de masa de Na, K, Ca y Mg en respuesta del instrumento.	66
20	Incertidumbre para la concentración de masa individual para Na, K, Ca y Mg, en respuesta del instrumento calibrado.	67
21	Datos de incertidumbre para el Material de Referencia Certificado (NIST 2670a).	69
22	Incertidumbre estándar debida a la calibración del material volumétrico y equipo.	72
23	Incertidumbre estándar debida a la repetibilidad del material volumétrico y equipo.	72
24	Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Na, K, Ca y Mg, debida al primer factor de dilución (20).	73
25	Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Na, debida al segundo factor de dilución (400, 200, 100, 50 y 25).	73
26	Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de K debida al segundo factor de dilución (200, 100, 50, 20 y 10).	74
27	Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Ca debida al segundo factor de dilución (200, 100, 50, 20 y 10).	75

LISTA DE TABLAS (Continuación...)

Tabla		Página
28	Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Mg, debida al segundo factor de dilución (400, 200, 100, 50 y 25).	76
29	Cálculo de la incertidumbre para la curva de calibración con dos diluciones.	78
30	Estimación de la incertidumbre estándar debida al valor del blanco.	78
31	Estimación de la incertidumbre estándar para la concentración de masa para Na, K, Ca y Mg, combinando las mediciones de la curva de calibración, blanco y material de referencia certificado.	80
32	Estimación de la incertidumbre estándar considerando la repetibilidad de cada metal.	81
33	Estimación de la incertidumbre estándar combinada considerando todas las fuentes involucradas.	83
34	Concentración obtenida para Na, K, Ca y Mg (ppm) a partir de suero sanguíneo humano.	85

LISTA DE ANEXOS

Anexo		Página
A	Datos para análisis de Exactitud para estándar individual.	96
B	Datos para análisis de Exactitud para estándar mixto.	100
C	Datos para análisis de Repetibilidad para estándar individual.	104
D	Datos para análisis de Repetibilidad para estándar mixto.	108
E	Datos para calcular la Linealidad y el Límite de Detección del método.	109
F	Datos para calcular la concentración de los metales (ppm) a partir de suero sanguíneo humano.	110
G	Datos para calcular la concentración de los metales (ppm) a partir de un estándar certificado de orina NIST 2670a.	112
H	Datos para la calibración del material volumétrico mediante gravimetría y para calibración de balanza analítica.	114
I	Datos para estimar la Repetibilidad en base al valor de los blancos.	116

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales, Dr. Francisco Javier Almendáriz Tapia, Dr. Guillermo del Carmen Tiburcio Munive, M en C. Leticia García Rico por su paciencia y asesoría en la realización del presente trabajo; y muy especialmente al Dr. Agustín Gómez Álvarez por haberme brindado la oportunidad de realizar un proyecto de investigación y rescatar el tiempo perdido para poder culminar el proceso del posgrado y sacar esa molesta piedra en el zapato en lo que se estaba convirtiendo esta aventura académica. Gracias por todo!!!

A los compañeros de profesión quiénes amablemente cooperaron con el material biológico para avanzar en este proyecto: QB Ethelbina Peralta Palacios del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Infantil del Estado de Sonora, M en C Irma Elena Barroso Herrera y Cairo del Laboratorio de Análisis Clínicos del Instituto de Seguridad Social y Servicios de los Trabajadores del Estado; QB Carlos López del Laboratorio Análisis Clínicos de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano de Seguridad Social.

A la Dra Diana Meza Figueroa del Departamento de Geología de la Universidad de Sonora por su aportación con el Material de Referencia Certificado.

A la M en C Mercedes Serna Félix por su paciencia, experiencia y asesoría en el desarrollo del análisis estadístico de los datos.

A todos ustedes...infinitamente...Gracias!!!!!!!!!!!!!!

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Los electrolitos son iones capaces de llevar una carga eléctrica. Se clasifican como aniones o cationes con base en el tipo de carga que llevan. Los aniones tienen carga negativa y se mueven hacia el ánodo y los cationes tienen carga eléctrica positiva y se mueven hacia el cátodo (Bishop, 2007). Una persona pierde electrolitos cuando suda o cuando presenta un cuadro patológico y debe reponerlos tomando líquidos. En este sentido, es importante mantener un equilibrio de electrolitos en el cuerpo, debido a que ellos afectan la cantidad de agua corporal, la acción de los músculos, el mantenimiento del potencial de membrana, la transmisión del impulso nervioso, la regulación del equilibrio ácido-base (pH), la presión osmótica y la fuerza iónica de los medios intracelular y extracelular. Los electrolitos están presentes en la sangre como ácidos, bases y sales, entre los principales se encuentran sodio (Na), calcio (Ca), potasio (K), cloruro (Cl⁻), fósforo (P), magnesio (Mg), manganeso (Mn) y bicarbonato (HCO₃⁻); éstos se pueden medir por medio de estudios de la sangre en el laboratorio. Los niveles de Na indican el equilibrio de sal y agua. Éstos también son una señal de la función de los riñones y de las glándulas suprarrenales. Los niveles de Na anormales a menudo indican que el volumen de sanguíneo es demasiado bajo (debido a la deshidratación) o demasiado alto. Lo anterior también puede ocurrir cuando el corazón no bombea normalmente la sangre o cuando los riñones no funcionan correctamente. El K afecta algunos órganos mayores principales, incluso el corazón. Los niveles de K aumentan por el mal funcionamiento del riñón y pueden ser anormales debido a vómitos o diarrea (Goodman-Gilman *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 2002).

Como se puede observar, las concentraciones de electrolitos (que de ahora en adelante llamaremos metales) sanguíneos se relacionan con algunos estados patológicos por lo que es muy importante su correcta cuantificación para poder establecer un diagnóstico acertado. Sin embargo, la mayoría de los métodos utilizados para la determinación de

Na, K, Ca y Mg subestiman los valores reales. Entre estos métodos de rutina, en laboratorios de Análisis Clínicos se encuentran la fotometría de llama, métodos colorimétricos o a través de electrodos de ión selectivo. La gran mayoría de las empresas que venden estos equipos o reactivos son de compañías extranjeras por lo que los valores normales o de referencia son tomados principalmente de individuos Europeos, los cuales no necesariamente corresponden a los valores normales para una población humana de México (Kraut y Madias, 2007).

Los fluidos corporales están constituidos por diferentes fracciones de muestras biológicas, los más comunes son orina, sangre completa, plasma y suero sanguíneo. Dentro de estos fluidos se encuentran electrolitos considerados como elementos traza, cuyas concentraciones son tan bajas que andan en el orden de partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb), por lo que los métodos colorimétricos no los pueden detectar y es cuando se requiere el uso de métodos instrumentales que permitan su correcta cuantificación, entre estos métodos se encuentra la Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), como método de elección (van Loon, 1985; Rouessac y Rouessac, 2003; Christian, 2009).

Actualmente en México, no existe en la Norma Oficial Mexicana (NOM) un método de referencia que permita evaluar la concentración de Na, K, Ca y Mg en fluidos biológicos, mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA). Por otro lado, la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos que realizan de rutina la determinación de electrolitos sanguíneos, como Na, K, Ca, Mg, lo hacen utilizando métodos colorimétricos, que subestiman los valores de las concentraciones de estos metales en sangre o suero, o en su defecto, el límite de detección de estos métodos no permite la cuantificación de los mismos y esto puede impactar en el diagnóstico de alguna patología asociada, especialmente las relacionadas con deficiencia de los electrolitos séricos. En este sentido, la relevancia del presente trabajo consiste en estandarizar y validar un método de análisis de Na, K, Ca y Mg por EAA en suero sanguíneo humano, que permita ser utilizado en laboratorios de análisis clínicos.

1.2 Objetivo General

Estandarizar y validar un método de análisis de Na, K, Ca y Mg en suero sanguíneo humano, mediante Espectroscopía de Absorción Atómica por flama (EAA) y que, en base a los parámetros de calidad y su confiabilidad, pueda ser utilizado como método de referencia en laboratorios de análisis clínicos.

1.3 Objetivos Específicos

Estandarizar un método de análisis de electrolitos séricos de importancia clínica como Na, K, Ca y Mg, primero bajo condiciones ideales, utilizando soluciones preparadas a partir de estándares de alta pureza.

Estandarizar y validar el método de análisis de electrolitos séricos en base a parámetros estadísticos tales como exactitud, repetibilidad, linealidad, límite de detección e incertidumbre.

Comprobar la funcionalidad del método analítico estandarizado, utilizando suero sanguíneo humano, así como un estándar de referencia certificado, para la determinación de Na, K, Ca y Mg, mediante Espectroscopía de Absorción Atómica.

Establecer, en base a los resultados del análisis estadístico, la confiabilidad en la determinación de electrolitos séricos para que esta metodología pueda ser utilizada como referencia por laboratorios de análisis clínicos.

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia de los Electrolitos Sanguíneos

Los compuestos que tienen uniones que les permite disociarse en soluciones acuosas en partículas independientes se llaman electrolitos. Las partículas disociadas se llaman iones y tienen cargas positivas (cationes) o negativas (aniones). El papel que juegan los electrolitos en el cuerpo humano es el de mantener el equilibrio de los fluidos en las células para que éstas funcionen correctamente, manteniendo la homeostasis. Todas las formas de vida superiores requieren de un sutil y complejo balance de electrolitos entre el medio ambiente intracelular y extracelular. En particular, el mantenimiento de la intensidad osmótica precisa de electrolitos indispensables para las células. Tales intensidades osmóticas regulan la hidratación corporal, la presión arterial y el pH sanguíneo, que son críticos para el buen funcionamiento corporal (Goodman-Gilman *et al.*, 1996). Entre los electrolitos más comunes en el cuerpo humano en tejido sanguíneo, suero o plasma están: sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{++}), magnesio (Mg^{++}), cloruros (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-) (Thibodeau *et al.*, 1998).

La actividad física y el calor del medio ambiente externo, hace que se pierda agua corporal a través de la sudoración y esto ocasiona que también se pierdan electrolitos corporales que conllevan a la deshidratación. Entre los electrolitos que se pierden a través del sudor se consideran el Na, K y Cl^- , principalmente. Por esta razón, es conveniente rehidratar inmediatamente durante y después de hacer ejercicio o alguna otra actividad física que provoque sudoración, ya que de no hacerlo puede subir la temperatura corporal o sobrevenir calambres musculares, que en situaciones no críticas generan malestar corporal generalizado (Krupp *et al.*, 1996; Tierney *et al.*, 2001).

El contenido de agua promedio del cuerpo humano varía de 40 a 75% del peso corporal total, con valores que disminuyen con la edad, y en particular con la obesidad. Las mujeres tienen menor contenido de agua promedio que los varones como resultado de un mayor contenido de grasa. El agua es el disolvente para todos los procesos del cuerpo humano. Transporta nutrientes a la células, determina el volumen celular por su transporte dentro y fuera de la célula, elimina productos de desecho por medio de la orina y actúa como refrigerante del cuerpo por medio de la sudoración (Bishop *et al.*, 2007).

El agua se localiza en compartimientos intra y extracelulares. El líquido intracelular (*LIC*) es el líquido dentro de las células y constituye cerca de dos tercios del agua corporal total. El líquido extracelular (*LEC*) equivale al otro tercio del agua corporal total y se puede subdividir en líquido extracelular intravascular (plasma) y el líquido extracelular intersticial que rodea a las células en el tejido. El plasma normal tiene cerca del 93% de agua, con el volumen restante ocupado por lípidos y proteínas, principalmente. Las concentraciones de iones dentro de las células y en el plasma se mantienen tanto por procesos de transporte activo o transporte pasivo (Tresguerres, 1992; Murray *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2007).

La osmolalidad es una propiedad física de una disolución que se basa en la concentración de solutos (expresada como milimoles, principalmente) por kilogramo de disolvente (p/p). La osmolalidad en el plasma es importante porque es el parámetro al que responde el hipotálamo. La regulación de la osmolalidad también afecta la concentración de sodio en el plasma, en gran medida porque el Na y sus aniones relacionados regulan cerca del 90% de la actividad osmótica en el plasma. La homeostasis en el cuerpo humano está controlada eficientemente por medio de hormonas entre las cuales se encuentran la antidiurética, aldosterona y paratohormona producidas en el hipotálamo, así como las glándulas suprarrenales y tiroides, respectivamente, que regulan el volumen de agua, el volumen de sangre y la

concentración de electrolitos bajo diferentes condiciones fisiológicas normales y patológicas (Bishop *et al.*, 2007).

En algunos estados patológicos se alteran los niveles de electrolitos, y por ende se requiere cuantificar su concentración para poder establecer un diagnóstico oportuno y preciso, para que se pueda elaborar una estrategia terapéutica a tiempo. Incluso, en muchos pacientes hospitalizados por diversas causas, la administración de suero puede provocar hiponatremia con hipervolemia, debido a que no se cuantifican correctamente los niveles de electrolitos sanguíneos en situaciones normales y/o patológicas (Málaga *et al.*, 2006; Hong-Long y Hong-Guang, 2008).

2.2. Patologías Asociadas a Alteraciones en los Niveles de Electrolitos.

2.2.1 Sodio (Na).

El Na es el catión más abundante en el organismo, el 70% del Na total corporal se encuentra en forma libre, de este porcentaje el 97% se encuentra en el *LEC* y el 3% en el *LIC*; el 30% restante está en forma fija, no intercambiable en hueso, cartílago y tejido conectivo. El Na libre es responsable de más del 90% de la osmolalidad del *LEC*, y su concentración está íntimamente relacionada con el balance hídrico. En la práctica, el electrolito que arroja mayor utilidad clínica es el Na, por eso se le considera el acuatocrito (o acuacrito) del organismo ya que su concentración indica el grado de hidratación del organismo. El resto son K, Cl⁻, Mg y Ca que están muy relacionados con acidosis y alcalosis respiratoria y metabólica (Angel y Angel, 2000; Schrier y Bansal, 2008).

Los riñones son los órganos reguladores del metabolismo del Na, exhibiendo una capacidad casi ilimitada para excretarlo. Normalmente el organismo adulto ingiere 150 mEq de Na en la dieta diaria y el riñón excreta 140 mEq. El resto se excreta por piel y sudor (5 mEq/día) y por heces fecales (5 mEq/día), para completar 150 mEq de la ingestión diaria (Pizarro-Torres, 2004). En este sentido, bajos niveles de Na (<136

mEq/L) indican hiponatremia y altos niveles de Na (>145 mEq/L) indican hipernatremia (Nguyen y Kurtz, 2004). Ambos trastornos clínicos están relacionados con diversas patologías, tal y como se puede apreciar en la Tabla 1. Aunque los trastornos más comunes asociados a deficiencia de hidratación y electrolitos son la diarrea, mala absorción, insuficiencia pancreática y renal, principalmente. Además de las condiciones clínicas anteriores, también está la edad avanzada de ancianos y niños recién nacidos que pueden tener problemas de hidratación (Angel y Angel, 2000; Biswas y Davies, 2007; Luckey y Parsa, 2003; Modi, 2007; Gross, 2008).

Existen otras patologías más graves asociadas a desequilibrios de la concentración de electrolitos y/o hormonas que controlan el equilibrio homeostático, entre ellas la hormona paratiroidea, aldosterona, así como los niveles de vitamina D, que cuando se encuentran alteradas pueden asociarse con mieloma múltiple, hipoparatiroidismo, nefrosis, desórdenes neuromusculares y acidosis diabética severa, entre otras (Randox, 1993; Henry, 1997; Tierney *et al.*, 2001).

Una de estas patologías asociada a desequilibrios en los niveles de sodio y cloruros es la fibrosis quística (FQ) la cual es un trastorno hereditario multisistémico, que resulta del rasgo recesivo con peligro para la vida más habitual de la raza blanca. Afecta a niños y adultos y se caracteriza principalmente por una obstrucción crónica grave e infección de las vías respiratorias. Es responsable de la mayor parte de los casos de insuficiencia pancreática exocrina en la primera etapa de la vida. Estas manifestaciones pueden presentarse en los primeros meses de la vida y las formas leves algunas veces se diagnostican en la adolescencia y en otras ocasiones resultan ser hallazgos necrópsicos. La afección parece ser por causa de la alteración de un gen en el brazo largo del cromosoma 7. Este gen normalmente produce una proteína (cuya abreviatura en inglés es CFTR) y su función principal es el servir de intercambio de iones, sobre todo de Cl⁻ y Na, a través de la pared celular. Al mutarse el gen, del cual se han descrito más de 600 mutaciones, ocurre una alteración cuantitativa o cualitativa de la proteína que produce. Al nivel de las glándulas sudoríparas la CFTR de las células del conducto excretor no

Tabla 1.- Principales causas de hiponatremia e hipernatremia.

CAUSAS DE HIPONATREMIAS	CAUSAS DE HIPERNATREMIAS
Pérdida excesiva de iones Hipoadrenalismo Deficiencia de potasio Uso de diuréticos Cetonuria Nefropatía con pérdida de sal Vómito prolongado o diarrea Quemaduras graves	Pérdida excesiva de agua Diabetes insípida Trastorno tubular renal Diarrea prolongada Sudoración excesiva Quemaduras graves
Retención excesiva de agua Insuficiencia renal Síndrome nefrótico Cirrosis hepática Insuficiencia cardíaca congestiva	Ingestión reducida de agua Personas ancianas Infantes Daño mental
Desequilibrio del agua Ingestión de agua en exceso SIADH* Pseudohipernatremia	Ingestión excesiva o retención de agua Hiperaldosteronismo Exceso de bicarbonato de sodio Exceso de líquido de diálisis

* = (Secreción Inadecuada de Hormona Antidiurética (SIADH)).

Fuente: Pizarro-Torres, 2004; Reynolds et al., 2006; Bishop et al., 2007.

reabsorbe el Cl^- ni el Na^+ , lo que produce sudoración acompañada con estos dos elementos (Marrero-Rodríguez *et al.*, 2002; Gozdzik *et al.*, 2008). A saber, esto se genera por secreción inapropiada de la hormona antidiurética, hipoadrenalismo, status postoperatorio, enfermedades pulmonares y cerebrales, alcalosis y acidosis e hipertensión arterial (Angel y Angel, 2000; Rolleman *et al.*, 2008; Slee *et al.*, 2008).

2.2.2 Potasio (K).

El K es el principal catión intracelular en el cuerpo, con una concentración veinte veces mayor dentro de la célula que fuera de ella. Muchas funciones celulares requieren que el cuerpo mantenga una concentración de *LEC* baja de K. Como resultado, solo 2% del K total del cuerpo circula en plasma, el 98% restante se encuentra en el *LIC*. Las funciones del K en el cuerpo incluyen regulación de la excitabilidad neuromuscular, contracciones del corazón, volumen de *LIC* y concentración de iones hidrógeno. En este sentido, la concentración del ión K es importante en las contracciones del músculo esquelético y cardíaco, de tal manera que una baja en los niveles de K (hipopotasemia o hipokalemia) del orden de 3.5 mEq/L, o una alta concentración (hiperpotasemia o hiperkalemia) por encima de 5 mEq/L, estos músculos pueden dejar de contraerse y en casos graves provocar un paro cardíaco e inducir la muerte de una persona (Du Plooy *et al.*, 1994; Seamark *et al.*, 1999; Mirsamadi *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2007; Sevastos *et al.*, 2008; Greenlee *et al.*, 2009; Petenusso *et al.*, 2009; Hoeskstra *et al.*, 2010; Kalita *et al.*, 2010). Algunas de las causas de estos trastornos clínicos se pueden apreciar en la Tabla 2.

2.2.3 Calcio (Ca).

Cerca del 99% del Ca en el cuerpo es parte de hueso y/o de la estructura ósea, en tanto que el 1% restante está en sangre y *LEC*. De hecho, la concentración de Ca ionizado en la sangre es 5000 a 10000 veces mayor que en el citosol de células del músculo cardíaco

y liso. Aunque la mayor parte del Ca en sangre está unido a proteínas (40%), principalmente albúmina, o está asociado a especies aniónicas más pequeñas como bicarbonato, citrato, fosfato y lactato (15%), la fracción de Ca biológicamente activa se encuentra como Ca iónico libre (45%). Por su papel en varias reacciones enzimáticas y en los mecanismos de transporte de membranas, el Ca iónico es de vital importancia en la coagulación sanguínea, la conducción nerviosa, la transmisión neuromuscular y la contracción muscular. Los niveles de Ca en sangre están regulados por la hormona paratiroides (PTH), por la vitamina D y por la hormona calcitonina. Un aumento en la concentración de Ca (hipercalcemia) puede provocar la entrada en coma de una persona, en tanto que una disminución en los niveles de Ca (hipocalcemia), puede provocar calambres (tetania), reducción del trabajo del gasto cardíaco y una depresión de la función del ventrículo izquierdo. A la larga la hipocalcemia puede provocar osteoporosis y fracturas óseas. En la Tabla 3 se puede apreciar las causas de la hipocalcemia e hipercalcemia (Moe, 2008; Acosta-García *et al.*, 2009; Alfaro-Martínez *et al.*, 2009; Carrillo-López *et al.*, 2009; Teruel *et al.*, 2009).

2.2.4 Magnesio (Mg).

El Mg es el cuarto catión más abundante en el cuerpo humano y el segundo ion intracelular más abundante. El cuerpo humano promedio (70 Kg) contiene 1 mol (24 g) de Mg. Alrededor de 53% de Mg en el cuerpo se encuentra en los huesos, 46% en el músculo y otros órganos y tejidos suaves, y menos de 1% está presente en suero y eritrocitos. Del Mg presente en el suero sanguíneo, cerca de un tercio se enlaza a proteínas, sobre todo albúmina. De los dos tercios restantes, 61% existe en el estado libre o ionizado, y cerca de 5% está compuesto de otros iones, como fosfato o citrato. Similar al Ca, es el ion libre el que es fisiológicamente activo en el cuerpo. La función del Mg en el cuerpo es muy amplia. Es un cofactor esencial de más de 300 enzimas, incluso las que son importantes en la glucólisis, el transporte intracelular de iones, la transmisión neuromuscular, la síntesis de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como la liberación y respuestas a ciertas hormonas (Wagner, 2007).

Tabla 2.- Principales causas de hipopotasemia e hiperpotasemia.

CAUSAS DE LA HIPOPOTASEMIA	CAUSAS DE LA HIPERPOTASEMIA
Pérdida gastrointestinal Vómito. Diarrea. Succión gástrica. Tumor intestinal. Malabsorción. Tratamiento de cáncer: quimio y radioterapia. Dosis grandes de laxantes.	Excreción renal reducida Insuficiencia renal aguda o crónica. Hipoaldosteronismo. Enfermedad de Addison. Uso de diuréticos.
Pérdida renal Uso de diuréticos. Nefritis. Acidosis tubular renal. Hiperaldosteronismo. Síndrome de Cushing. Hipomagnesemia. Leucemia aguda.	Desplazamiento celular Acidosis. Lesión muscular/celular. Quimioterapia. Leucemia. Hemólisis.
Desplazamiento celular Alcalosis. Sobredosis de insulina.	Ingestión reducida
Ingestión reducida	Artificial Hemólisis de la muestra. Trombocitosis. Uso prolongado de torniquete o cerrar con fuerza el puño.

Fuente: *Bishop et al., 2007; Greenlee et al., 2009.*

Tabla 3.- Principales causas de hipocalcemia e hipercalcemia.

CAUSAS DE LA HIPOCALCEMIA	CAUSAS DE LA HIPERCALCEMIA
Hipoparatiroidismo primario: aplasia glandular, daño o eliminación glandular quirúrgica.	Hiperparatiroidismo primario: adenoma o hiperplasia glandular.
Hipomagnesemia.	Hipertiroidismo.
Hipermagnesemia.	Hipocalciuria familiar benigna.
Hipoalbuminemia (solo calcio total), hepatopatía crónica, síndrome nefrótico, desnutrición.	Malignidad.
Pancreatitis aguda.	Mieloma múltiple.
Deficiencia de vitamina D.	Vitamina D incrementada.
Enfermedad renal.	Uso de diuréticos de tiacida.
Rabdomiólisis.	Inmovilización prolongada.
Pseudohipoparatiroidismo.	

Fuente: *Bishop et al., 2007; Moe, 2008; Teruel et al., 2009.*

De manera muy eficiente, los riñones se encargan de mantener los niveles de Mg en sangre y se regula de manera coordinada con los niveles de Na y Ca. De tal manera, que cuando los niveles de Mg se alteran se generan una serie de trastornos clínicos importantes. En la Tabla 4 se muestran las causas que provocan que los niveles de Mg disminuyan (hipomagnesemia) y las causas que provocan que los niveles de Mg aumenten (hipermagnesemia) (Monnens *et al.*, 2000; Tapia *et al.*, 2007; Wagner, 2007; Alexander *et al.*, 2008; Negri, 2008; Kuipers *et al.*, 2009; Assadi, 2010).

2.3 Métodos de Análisis Químico de Electrolitos en Muestras Biológicas

2.3.1 Métodos Espectrofotométricos (Colorimetría)

De manera tradicional, el método que más se utiliza para determinar analitos en sangre, plasma o suero sanguíneo y orina es la espectrofotometría de absorción mediante colorimetría. Entre estos analitos se encuentran proteínas totales, colesterol, triglicéridos, glucosa, ácido úrico y electrolitos como Na, K, Mg, Ca, P, Cl y HCO_3^- , entre otros (Randox, 1993; Alvarado y Peñaloza, 2006). La colorimetría se basa en la formación de un compuesto colorido debido a la reacción química de un elemento con un reactivo químico específico. Si la intensidad del color es proporcional a la concentración del compuesto, se obtiene una estimación cuantitativa del elemento. La intensidad del color se mide a través de la absorción de luz en un intervalo estrecho de longitudes de onda.

2.3.2 Métodos Espectrofotométricos de Emisión (Fotometría de Flama)

Es una técnica de emisión que utiliza una flama como fuente de excitación y un fotodetector electrónico como dispositivo de medida. Se trata principalmente de un método de análisis cuantitativo más sencillo y preciso para el análisis de metales alcalinos, la mayor parte de los metales alcalinotérreos y algún otro elemento metálico. También es posible realizar un análisis cualitativo examinando todas las longitudes de onda del espectro de emisión (espectrofotometría de flama o fotometría de flama). Su

Tabla 4.- Causas de hipomagnesemia e hipermagnesemia.

CAUSAS DE LA HIPOMAGNESEMIA	CAUSAS DE LA HIPERMAGNESEMIA
Ingestión reducida Dieta deficiente o inanición Tratamiento intravenoso prolongado con deficiencia de magnesio Alcoholismo crónico	Excreción reducida Insuficiencia renal aguda Hipotiroidismo Hipoaldosteronismo Hipopituitarismo
Absorción reducida Síndrome de malabsorción Secreción quirúrgica de intestino delgado Succión nasofaríngea Pancreatitis Vómito Diarrea Abuso de laxantes Neonatal	Ingestión reducida Antiácidos Enemas Catárticos Terapéutica: eclampsia, arritmia cardíaca
Excreción renal incrementada Trastorno tubular Glomerulonefritis Pielonefritis	Diversas Deshidratación Carcinoma óseo Metástasis ósea
Excreción endocrina excesiva Hiperparatiroidismo Hiperaldosteronismo Hipertiroidismo Hipercalcemia Cetoacidosis diabética	

Fuente: Bishop et al., 2007; Tapia et al., 2007; Negri, 2008.

aplicación es limitada si se compara con la espectroscopia de emisión ordinaria por flama, ya que la energía de la flama permite excitar únicamente de 30 a 50 elementos, siendo este número función del tipo de flama utilizada. La muestra a analizar debe de estar en solución (Frankenberg *et al.*, 1951).

En espectrometría de emisión por flama se consigue que los átomos emitan pocas líneas porque la temperatura que se alcanza con la flama es pequeña. Solo se consigue que pocos átomos pasen del nivel fundamental a niveles activados. No se puede usar para análisis cualitativo, se emplea para análisis cuantitativo para determinar la concentración de Na, K, Ca en materiales biológicos (suero sanguíneo), entre otros. Este método presenta desventajas: a) las sustancias que acompañan al Na absorben también parte de la radiación o pueden emitir. Si no se conocen esas sustancias, no se pueden añadir a las muestras patrones y luego se producen variaciones en la medida de la muestra patrón, b) la radiación de fondo depende de la temperatura de la flama, y c) se presentan variaciones en la velocidad de flujo (muestra o del gas oxidante). Por lo tanto, este método no se utiliza mucho.

2.4 Ventajas y Desventajas de los Métodos de Análisis de Electrolitos en Muestras Biológicas por Métodos Espectrofotométricos (Colorimetría).

La determinación de la concentración de un analito gracias a su absorción de la radiación visible (Vis) o ultravioleta (UV) es uno de los métodos analíticos cuantitativos más utilizados. Una de las razones de su popularidad es que mucho de los compuestos orgánicos o inorgánicos poseen fuertes bandas de absorción en la región UV/Visible del espectro electromagnético. Además, en muchas ocasiones, los analitos que no absorben radiación UV/Visible, o que solo lo hacen en escasa medida, pueden unirse químicamente a una especie que si lo haga. Sin embargo, el análisis de las muestras clínicas suele complicarse debido a la complejidad de la matriz de la muestra, que puede contribuir con una importante absorción de fondo en la longitud de onda investigada

(Harvey, 2002). Actualmente se cuenta con distintas técnicas que utilizan reactivos comerciales (kits) que permiten realizar las cuantificaciones por el método de espectrofotometría visible. Además, la principal desventaja analítica de este método es que requiere la presencia de una concentración relativamente alta del analito (mg/dL) para poder obtener un resultado de interés clínico. Esto significa que el límite de detección es su principal desventaja analítica. Algunas determinaciones de electrolitos como Ca y Mg se hacían mediante volumetría por titulación con EDTA. En tanto que Na, Ca y K se hacían con electrodos de ión selectivo. Cabe señalar que en la actualidad estas determinaciones ya no se realizan en laboratorios de análisis clínicos, ya que son métodos que han sido superados por otras metodologías con mayor sensibilidad y mayor límite de detección (Randox, 1993; Christian, 2009).

2.5 Ventajas de los Métodos Instrumentales [Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA)]

El método de elección para la determinación de electrolitos séricos es la Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA). La principal ventaja analítica es que se pueden obtener determinaciones clínicas de concentraciones de electrolitos en mg/L (ppm) o menos (Higson, 2007). Esto significa que la EAA tiene un mejor límite de detección que permite la cuantificación de electrolitos séricos a nivel traza, y cuyas deficiencias clínicas pueden estar relacionadas con ciertas patologías importantes, como las señaladas anteriormente (Van Loon, 1985; Christian, 2009). Además, la EAA tiene otras ventajas en la cuantificación de electrolitos séricos entre las que destacan la alta sensibilidad, bajo costo, tiempo corto, rapidez de análisis y facilidad de operación, entre otras (Higson, 2007; Christian, 2009).

El principio de operación de un espectrofotómetro de absorción atómica por flama es que la radiación del elemento químico que interesa, cuya fuente de luz suele ser una lámpara de cátodo hueco, se dirige a través de la flama que contiene el gas atómico. La solución del analito se nebuliza por medio de un atomizador o nebulizador en finas

gotitas y se lleva a la flama. El disolvente de las gotas se evapora de inmediato y las partículas de sal se descomponen en átomos, iones y electrones. Los átomos de la muestra absorberán la radiación que emita el mismo átomo en la lámpara de cátodo hueco, con lo que se atenúa la energía de la fuente. Mediante un monocromador se separa la línea espectral del elemento que interesa de cualquier otra radiación que venga de la fuente o de la flama. La energía radiante de la fuente se transforma en corriente eléctrica en un detector y posteriormente se pasa a un sistema de lectura. La absorción de radiación es directamente proporcional a la concentración de la solución radiada en la flama (Skoog, *et al.*, 2001; Gómez-Álvarez, 2004; Christian, 2009)

Esta metodología ha sido utilizada extensamente en diferentes áreas científicas. En este sentido, en la literatura se puede encontrar artículos en donde se señala que la espectroscopía de absorción atómica ya se ha utilizado para la cuantificación de electrolitos o metales en suero, sangre, orina o en diferentes tejidos corporales, tales como cobre, zinc, plomo, arsénico, selenio, sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, mercurio, litio, cadmio, berilio, aluminio, entre otros (Frech *et al.*, 1982; Pruszkowska *et al.*, 1983; Hou-Chuan *et al.*, 2001; Barret *et al.*, 2005; Stephan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009). Más sin embargo, en las metodologías empleadas no se describe el procedimiento analítico para la estandarización y validación del método.

2.6 Importancia de la Estandarización y Validación de un Método Analítico.

El *Committee on Environmental Improvement* de la *American Chemical Society* (citada en Christian, 2009) define la **estandarización** como el proceso por el que se establece la relación entre la señal medida y la cantidad de analito. La **estandarización** de un método analítico es un proceso riguroso que tiene como objetivo establecer o definir las condiciones de análisis en que se pretende cuantificar un analito, que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz o matrices, el analito, la cantidad de parámetros de estandarización y de la metodología empleada para su

desarrollo puede requerir de un tiempo considerable, en algunos casos puede superar los seis meses (Coy, 1999; Harvey, 2002).

La **validación** es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista en la Norma Oficial Mexicana (NMX-CH-152-IMNC-2005). Un analito es una especie de interés a determinar en un análisis (NMX-CH-152-IMNC-2005, citada en CENAM-EMA, 2009). Por otro lado, la **validación** también se define como el proceso en el que se comprueba que un procedimiento proporciona resultados aceptables, principalmente en función de la precisión y de la exactitud (Harvey, 2002; Christian, 2009).

Se puede validar un nuevo método por comparación de los resultados de la muestra con los resultados obtenidos con otro método aceptado; para ello se utilizan estándares certificados o materiales de referencia que se pueden analizar para asegurar la exactitud del método que se utiliza. En este sentido, a nivel internacional el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) prepara materiales de referencia estándar de diferentes composiciones de matriz que han sido certificados en cuanto al contenido de analitos específicos mediante medición cuidadosa de por lo menos dos métodos independientes. Los estándares se deben analizar en forma intermitente con las muestras y también se debe analizar una muestra control por lo menos una vez al día, y graficarse los resultados como función del tiempo para preparar una gráfica de control de calidad, que se compara con la desviación estándar del método (Harvey, 2002; Christian, 2009).

2.7 Métodos Estadísticos para Estandarizar y Validar un Método Analítico.

Para estandarizar y validar el método analítico para la determinación de los electrolitos séricos (Na, K, Ca y Mg) mediante espectroscopía de absorción atómica, se recomienda utilizar los parámetros analíticos de control de calidad como: exactitud, repetibilidad,

linealidad, límite de detección e incertidumbre. A continuación se describe cada uno de ellos (Coy, 1999; Harvey, 2002; Christian, 2009).

2.7.1 Exactitud: Es el grado de concordancia entre el valor medido y el valor real o esperado. La exactitud se determina analizando varias muestras con el analito (elemento químico) de interés dentro de un intervalo de concentración, y se hace por triplicado, cuadruplicado, quintuplicado o más réplicas. Posteriormente se realiza un análisis estadístico para determinar la distribución de los datos, donde normalmente se emplea la distribución *t* Student (Montgomery, 2001).

2.7.2 Precisión: Es el grado de concordancia de un conjunto de valores experimentales, con respecto a un valor central. Se divide a su vez en:

2.7.2.1 Repetibilidad, que es la concordancia con respecto a un valor central bajo las mismas condiciones de trabajo; y

2.7.3.2 Reproducibilidad, que es la concordancia con respecto a un valor central bajo diferentes condiciones de trabajo (analista, equipo, laboratorio, entre otras). La función estadística en que se basan estas determinaciones es la varianza.

2.7.4 Linealidad: Es la habilidad que tiene el método para observar, o no, una proporcionalidad entre la concentración de un analito de interés y una respuesta que se puede cuantificar, en un intervalo definido. La linealidad debe ser establecida considerando los resultados para muestras preparadas a las diferentes concentraciones del analito a determinar, en tanto que las concentraciones se elegirán dentro de los valores establecidos por el método. Para esto se debe calcular la media, desviación estándar relativa, pendiente, coeficiente de corrección y error estándar de la regresión.

2.7.6 Límite de Detección: Corresponde a la cantidad o concentración más pequeña de un analito (elemento químico) que puede ser detectada con exactitud por el método, dentro de cierto intervalo de confianza. Su determinación puede ser realizada en función de la desviación estándar y se puede relacionar con el límite de detección del método o límite de detección del equipo (Harvey, 2002; Christian, 2009).

2.7.7 Incertidumbre: El término incertidumbre está definido como: parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando (magnitud particular sujeta a medición) (NMX Z-055 IMNC 1996, citada en CENAM-EMA, 2008a)

Un gran número de decisiones están basadas en los resultados provenientes de mediciones químicas, estos resultados se emplean en la obtención de diagnósticos, determinación de rendimientos químicos, verificación de los valores de una propiedad de un material respecto de especificaciones o límites normativos, aceptación o liberación de productos, aplicación de regulación ambiental, entre otras. Independientemente de las decisiones que se tomen con base en los resultados, se requiere tener una indicación sobre la calidad de éstos y de su fiabilidad para el propósito al que están destinados. Actualmente hay una necesidad o requerimiento formal, por parte de los laboratorios que realizan mediciones químicas, de implantar medidas que permitan asegurar la capacidad de proporcionar datos con la calidad requerida por los usuarios. Estos requerimientos implican el uso de métodos validados de análisis, uso de procedimientos de control de calidad internos, participación en pruebas de aptitud técnica (conocidas en química clínica como esquemas de evaluación externa de la calidad), acreditación con base en la guía ISO 17025, establecimiento de trazabilidad de los resultados de las mediciones y en consecuencia el cálculo de la incertidumbre asociada al resultado de dichas mediciones (todos éstos son elementos que forman parte de la metrología en química); por lo cual se presenta la forma de tener una indicación de la calidad de las mediciones a través de la

evaluación de la incertidumbre asociada al resultado de una magnitud química, por ejemplo la concentración de electrolitos séricos (Pérez-Castorena y Guevara-Hernández, 2002; Rivas y Fernández, 2006).

En mediciones químicas, generalmente la incertidumbre asociada al valor de un mensurando, tiene diferentes contribuciones que tienen diferentes orígenes, por ejemplo muestreo, efectos de matriz, interferencias, temperatura y humedad del medio ambiente del laboratorio, variabilidad de los instrumentos para medir masa y volumen, entre otros. Cada una de éstas, se conoce como componente de incertidumbre. Cuando se expresa cada uno de estos componentes como desviación estándar entonces, se conocen con el nombre de incertidumbre estándar (CENAM-EMA, 2009).

2.8 Métodos para la Evaluación de la Incertidumbre

La contribución de los diferentes componentes de incertidumbre identificados en una medición, se puede evaluar empleando una de dos maneras, las cuales consisten en determinar o asociar una distribución de probabilidad (distribución uniforme, triangular o normal, caracterizada por su media y varianza) a los valores de dichos componentes (Pérez-Castorena y Guevara-Hernández, 2002; Rivas y Fernández, 2006). A continuación se describen estas dos formas de evaluación:

2.8.1 Evaluación Tipo A. Es aquella que evalúa la incertidumbre por métodos estadísticos de una magnitud que varía de manera aleatoria, x_i , (concentración), a partir de una serie de n observaciones experimentales.

2.8.2 Evaluación Tipo B. Es aquella que evalúa la incertidumbre por medios diferentes al análisis estadístico de una serie de observaciones. En este caso, la evaluación de la incertidumbre estándar se basa en datos o información proporcionados por el proveedor o fabricante, como certificados de materiales de referencia, certificados de calibración de instrumentos, catálogos o manuales y especificaciones técnicas, entre otros. La evaluación tipo B también puede realizarse empleando el juicio científico o

experiencia del analista. La incertidumbre estimada de esta manera deberá combinarse con otras fuentes de incertidumbre identificadas y cuantificadas empleando los métodos de evaluación tipo A y tipo B (Pérez-Castorena y Guevara-Hernández, 2002; Rivas y Fernández, 2006).

Las principales fuentes de incertidumbre se pueden determinar mediante el diagrama de Ishikawa, llamado también diagrama de causa-efecto o diagrama de espina de pescado (Figura 1). Consiste en una representación gráfica sencilla en la que puede verse de manera relacionada una especie de espina central, que es una línea en el plano horizontal, representando el problema a analizar, que se escribe a su derecha. Es una de las diversas herramientas surgidas a lo largo del siglo XX en ámbitos de la industria y posteriormente en el de los servicios, para facilitar el análisis de problemas y sus soluciones en esferas como lo son; calidad de los procesos, los productos y servicios. Este diagrama fue concebido por el Dr. Kaoru Ishikawa en el año de 1953 (http://es.wikipedia.org/wiki/Diagrama_de_Ishikawa).

El problema analizado puede provenir de diversos ámbitos como la salud, calidad de productos y servicios, fenómenos sociales, organización, entre otros. A este eje horizontal van llegando líneas oblicuas -como las espinas de un pez- que representan las causas valoradas como tales por las personas participantes en el análisis del problema. A su vez, cada una de estas líneas que representa una posible causa, recibe otras líneas perpendiculares que representan las causas secundarias. Cada grupo formado por una posible causa primaria y las causas secundarias que se le relacionan forman un grupo de causas con naturaleza común. Este tipo de herramienta permite un análisis participativo mediante grupos de mejora o grupos de análisis, que mediante técnicas como por ejemplo la lluvia de ideas, sesiones de creatividad, y otras, facilita un resultado óptimo en el entendimiento de las causas que originan un problema, con lo que puede ser posible la solución del mismo.

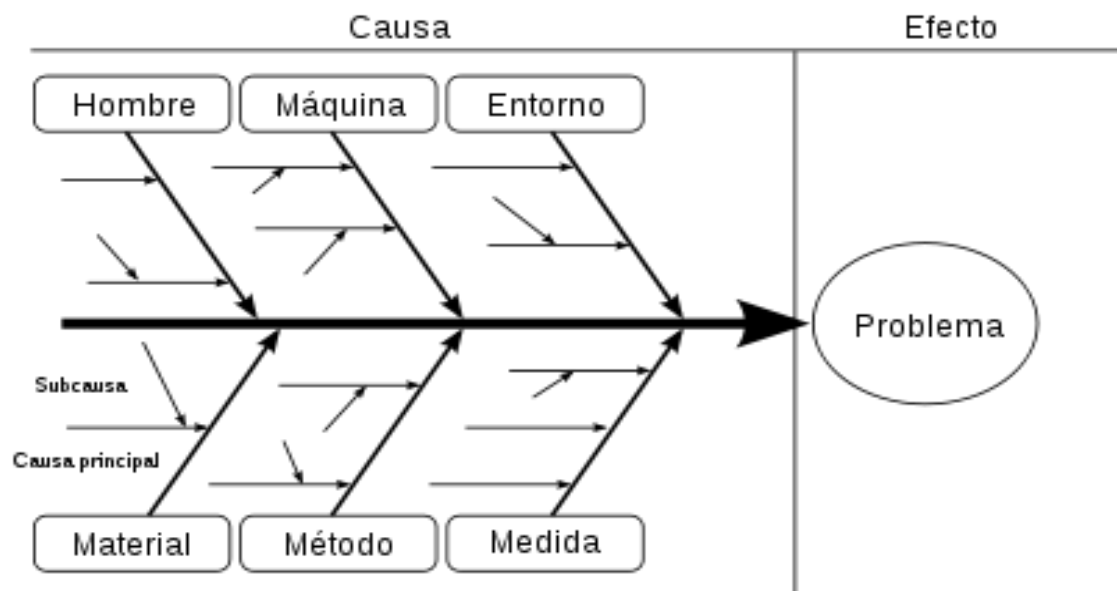


Figura 1.- Diagrama de Ishikawa o de causa-efecto o de cola de pescado.

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Diagrama_de_Ishikawa

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del Área de Estudio

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora (Unidad Regional Centro), en el área de laboratorios ubicada en el edificio 5N. Se contó con el apoyo del Laboratorio de Análisis Clínicos e Investigación de la Universidad de Sonora (LACIUS) ubicado en el mismo edificio, para el suministro de suero sanguíneo humano, así como el apoyo del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), del Laboratorio de Análisis Clínicos de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y del Laboratorio de Análisis Clínicos del Instituto de Servicios y Seguridad Social de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de Hermosillo, Sonora, México.

3.2 Preparación de Materiales

El material fue sometido a un estricto control para evitar la contaminación por elementos traza, siguiendo la metodología recomendada por la Norma Oficial Mexicana (NMX-AA-115-SCFI-2001). Los materiales de trabajo de vidrio (pipetas serológicas y volumétricas, matraces volumétricos Pyrex, entre otros) se lavaron exhaustivamente con detergente líquido comercial para después ser sometidos a una solución de HNO_3 al 20% (grado analítico 70% ACS marca Fermont) durante tres días, y posteriormente enjuagados abundantemente con agua deionizada. Una vez secado en estufa a 80°C , el material se guardó en recipientes de plástico con tapa hermética hasta su uso. Para la preparación de soluciones se utilizó agua purificada doblemente destilada y deionizada.

3.3 Preparación de Estándares Grado Analítico para Trabajar en Condiciones Ideales

3.3.1 Primera Etapa: Para las curvas de calibración individuales, se procedió a preparar soluciones con estándares de alta pureza. Los estándares son grado analítico AccuStandard (Na cas # 7440-23-5, K cas # 7440-09-7, Ca cas # 7440-70-2 y Mg cas #7439-95-4, de 1000 ppm cada uno) y se prepararon en las siguientes concentraciones conocidas dentro del rango lineal: Na y Mg 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 ppm, K y Ca 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ppm. Los estándares de Na y K fueron preparados con LiCl al 0.2% y HNO₃ al 2%, en tanto que los estándares de Ca y Mg fueron preparados con LaCl₃ al 0.2% y HNO₃ al 2%, con la finalidad de eliminar interferencias de ionización y químicas (Díaz *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2003). También se prepararon los estándares de trabajo a las concentraciones de: Na y Mg 0.5, 1.0 y 2.0 ppm, en tanto que K y Ca se prepararon a 1.0, 2.0 y 5.0 ppm. Así mismo se prepararon los estándares mixtos a concentraciones crecientes de 500, 25, 25 y 10 ppm para Na, K, Ca y Mg respectivamente; posteriormente a 1000, 50, 50 y 25 ppm; después a 2000, 100, 100 y 50 ppm; y finalmente a 4000, 200, 200 y 100 ppm para Na, K, Ca y Mg, respectivamente. Todas las soluciones fueron acondicionadas con LiCl y/o LaCl₃ y HNO₃ a las concentraciones señaladas anteriormente.

Las preparaciones de los estándares de trabajo y las lecturas en el equipo de Absorción Atómica se realizaron por septuplicado para posteriormente obtener la media, la desviación estándar (D.E.), el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) y el porcentaje de recuperación (% Rec.). En este paso y en las etapas posteriores se prepararon blancos reactivos como control. Las determinaciones de estos metales se llevaron a cabo mediante las condiciones de operación recomendadas en el manual del equipo de Espectroscopía de Absorción Atómica Perkin-Elmer, Modelo 3100 (Tabla 5).

3.3.2 Segunda Etapa: Para obtener la Repetibilidad del método, se realizó el mismo procedimiento señalado en la primera etapa, pero las determinaciones de los metales se

Tabla 5.- Condiciones de operación del equipo de EAA para cada metal a cuantificar.

PARÁMETRO	ELECTROLITO			
	Na	K	Ca	Mg
Longitud de onda (λ , nm)	589.6	766.5	422.7	285.2
Apertura (Ancho de rendija) (nm)	0.7	0.7	0.7	0.7
Lámpara	cátodo hueco	cátodo hueco	cátodo hueco	cátodo hueco
Tipo de flama	aire-acetileno	aire-acetileno	aire-acetileno	aire-acetileno
Eliminación de interferencias	LiCl 0.2%	LiCl 0.2%	LaCl ₃ 0.2 %	LaCl ₃ 0.2 %
Sensitividad	Std.* de 0.8 $\mu\text{g/mL}$ Abs**= 0.23	Std.* de 2 $\mu\text{g/mL}$ Abs**= 0.22	Std.* de 4 $\mu\text{g/mL}$ Abs**= 0.20	Std.* de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Abs**= 0.19

* = Estándar.

** = Absorbancia.

Fuente: Manual de operación del equipo de EAA de Perkin-Elmer (1976).

llevaron a cabo cada tercer semana hasta completar el ensayo en un total de 16 semanas. Esto significa que se realizó la primera determinación en la semana 1 y posteriormente se repitió la misma metodología en la semana 4, 7, 10, 13 y 16. Esto implica que se realizaron en total 6 determinaciones para cada metal y cada una de ellas se realizó por septuplicado para un total de 42 muestras para cada determinación individual.

3.3.3 Tercera Etapa: En esta etapa se llevó a cabo la preparación de soluciones estándar mixto que contenían de manera simultánea a los cuatro elementos a concentraciones conocidas. Para efectos de que las lecturas estuvieran dentro del límite de linealidad, para Na se realizaron diluciones de 5:100 (FD = 20) y 2:100 (FD = 50) con un factor de dilución final de 1000, en tanto que para K, Ca y Mg se hicieron diluciones de 5:100 (FD = 20) y 5:100 (FD = 20) con un factor

de dilución final de 400. Cada uno de los estándares mixtos se preparó y cuantificó por quintuplicado. Las concentraciones fueron de Na 500, K 25, Ca 25 y Mg 10 ppm, Na 1000, K 50, Ca 50 y Mg 25 ppm, Na 2000, K 100, Ca 100 y Mg 50 ppm, Na 4000, K 200, Ca 200 y Mg 100 ppm. La preparación de las muestras se realizó cada tercera semana durante un período de 16 semanas. Esto significa que se realizaron en total 6 determinaciones para cada estándar mixto y cada una de ellas se realizó por quintuplicado para un total de 30 muestras para cada determinación.

3.3.4 Cuarta Etapa: Determinación de metales en un Estándar de Referencia Certificado. Se utilizó un estándar de referencia certificado de orina (NIST 2670a, *National Institute of Standards and Technology*), que simula las condiciones de un estándar de referencia certificado de suero humano y que contiene los metales Na, K, Ca y Mg. Este estándar de referencia se preparó bajo las instrucciones especificadas en el certificado, que establecen que el estándar certificado se encuentra liofilizado y debe ser resuspendido con 20 mL de agua deionizada. Posteriormente, se realizaron diluciones con agua deionizada para que las concentraciones de cada uno de los metales se encontrara dentro del rango de linealidad del método. Las diluciones fueron de 5:100 y 2:100 para Na (FD = 1000), para K fueron de 5:100 y 5:100 (FD = 400) y para Ca y Mg

las diluciones fueron de 2:50 (FD = 25). Las determinaciones para cada metal se realizaron por triplicado. Por falta de presupuesto para el proyecto, se tuvo que sustituir el estándar certificado de suero humano por uno de orina.

3.4 Aplicación del Método Estandarizado y Validado

3.4.1 Análisis de Suero Sanguíneo Humano

En esta etapa se realizó la colecta de sangre humana, obtención del suero sanguíneo, descomposición del suero y finalmente la determinación de Na, K, Ca y Mg mediante EAA. Cada uno de estos pasos se describe a continuación.

3.4.2 Colecta de las Muestras

La colecta de muestra de sangre se realizó por punción venosa utilizando la técnica del torniquete. La sangre se recogió en un tubo de ensaye sin anticoagulante y posteriormente se dejó a temperatura ambiente para que ocurriera la coagulación e inmediatamente se procedió a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero sanguíneo (Henry, 1997). La cantidad de muestras obtenidas fue de 60 pacientes clínicamente sanos y ubicados en tres grupos representativos; 20 adolescentes (12 a 18 años), 20 adultos jóvenes (19 a 30 años) y 20 adultos mayores (31 a 50 años). El suero obtenido se mezcló y posteriormente se fraccionó en alícuotas de 10 mL que fueron congeladas y almacenadas a -4° C.

3.4.3 Descomposición de las Muestras de Suero Sanguíneo Humano

Para la descomposición de las muestras de suero, se prepararon tres réplicas de 5 mL cada una en un vaso de precipitado Pyrex de 100 mL. Posteriormente se adicionaron 20 mL de HNO_3 concentrado Suprapur (Merck). Las muestras se calentaron en placas de calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 120° C. El calentamiento se llevó a cabo hasta obtener un volumen final de 5 mL; posteriormente se agregaron 15 mL de

H₂O₂ al 30 %, y finalmente se adicionaron 5 mL de HNO₃ concentrado hasta la total mineralización del suero. El extracto ácido resultante se colocó en un matraz de aforación Pyrex de 100 mL y se diluyó al volumen con agua deionizada. Para la determinación de los metales de interés se utilizó una solución de LiCl al 0.2% para Na y K, en tanto que para Ca y Mg se utilizó una solución de LaCl₃ al 0.2%. Las diluciones específicas fueron de 5:100 y 2:100 para Na, en tanto que para K, Ca y Mg la dilución fue de 2:100. Los metales de interés se cuantificaron en el equipo de Absorción Atómica Perkin Elmer, modelo 3100 bajo las condiciones de operación recomendadas (Tabla 5). Las determinaciones de Na, K, Ca y Mg se hicieron por quintuplicado.

3.5 Calibración del Equipo

Como se mencionó en los apartados anteriores, para la cuantificación de metales en suero (Na, K, Ca y Mg), se utilizó un equipo de absorción atómica Perkin-Elmer Modelo 3100, bajo las condiciones de operación recomendadas (Tabla 5) (Perkin-Elmer, 1976). La calibración del equipo se llevó a cabo con estándares de alta pureza, utilizando cinco concentraciones para cada curva de calibración y éstas se realizaron por triplicado.

3.6 Estandarización y Validación del Método

3.6.1 Parámetros para el Análisis Estadístico

En la estandarización y optimización del método de análisis EAA, se utilizaron parámetros de calidad entre los cuales están: Exactitud, Repetibilidad, Linealidad, Límite de Detección e Incertidumbre. A continuación se describen cada uno de estos parámetros:

3.6.1.1 Exactitud: La exactitud es una medida de que tan cercanos o parecidos son los valores obtenidos de un valor real o establecido. Mientras más parecidos sean ambos valores mayor es la exactitud. La exactitud se determinó a partir de muestras fortificadas con estándares de alta pureza analítica y de concentración conocida. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ de Recuperación} = (\text{valor medido} / \text{valor teórico}) \times 100. \quad (1)$$

La confirmación de la exactitud se determinó en base a la prueba t de Student, la cual se determina analizando varias muestras del metal en cuestión, dentro del intervalo de concentración de interés. Esto se realizó por septuplicado y una vez obtenidos los resultados se evaluó la exactitud realizando el análisis estadístico de la prueba t de Student (Blair y Taylor, 2008). Si los resultados están dentro del criterio de aceptación, se debe determinar el intervalo de confianza, el cual se obtiene como se describe a continuación. Basándose en el concepto de que el valor medio de una serie de observaciones muestra una distribución alrededor del valor medio estimado de una serie finita, la media tiene una función de probabilidad cuya distribución se asemeja a la distribución *Gaussiana*, y es llamada la distribución de la t de Student. Los valores de t están tabulados para la probabilidad de una media en particular que pertenezca a una población de medias determinadas. Para establecer si un método analítico es exacto o no, se plantea una hipótesis nula H_0 y una hipótesis alterna H_a

$$\begin{aligned} H_0: \quad \mu &= \mu_0 & \mu_0 &= \text{recuperación del 100 \%} \\ H_a: \quad \mu &\neq \mu_0 & \mu &= \text{valor medido del porcentaje de recuperación} \end{aligned}$$

Considerando que la prueba de la t de Student es un método estadístico para detectar la diferencia entre un valor medio y un valor real, con tamaño de muestra de $n \leq 30$, se realiza el cálculo con la ecuación correspondiente (Spiegel, 1973):

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{S/\sqrt{n}} \quad (2)$$

Donde:

\bar{x} = Promedio de los resultados de recuperación de n muestras independientes

s/\sqrt{n} = Error estándar o error experimental

s = Desviación estándar

Criterio de aceptación: Considerando el valor de t para un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$) y con grados de libertad $gl = n-1$, se debe cumplir que: $t(\alpha/2, n-1) \leq t_{cal} \leq t(1 - \alpha/2, n - 1)$. Para valores de t con error de 0.05 y $n - 1$ grados de libertad se consulta la tabla para la prueba t Student. Por lo tanto, si el valor de t_{cal} está dentro del intervalo, entonces H_0 se acepta y el método es exacto.

Una vez obtenido el valor de t , se deberá determinar el intervalo de confianza considerando un valor de t de 0.975, el cual corresponde a un nivel de significancia del 95 %. Si el valor de t es cero, significa que $x = \mu_0$ y por lo tanto el análisis es totalmente exacto, y no se requerirá calcular el intervalo de confianza, ni el criterio de aceptación (Montgomery, 2001).

Intervalo de confianza:

$$X \pm \frac{t \text{ de Tablas}}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

3.6.1.2 Precisión: La precisión es una medida del grado de concordancia entre los análisis múltiples de una muestra dada. Se evalúa mediante el análisis de réplicas de análisis repetidos de una muestra o estándar. La precisión puede ser expresada con la varianza (S^2) y se evalúa en función de la repetibilidad y la reproducibilidad. En este trabajo de investigación no se determinó la reproducibilidad.

3.6.1.2.1 Determinación de la Repetibilidad

La función estadística en la que se basa esta determinación es la varianza, la cual proporciona una distribución de los resultados obtenidos por el método de análisis bajo las mismas condiciones de trabajo. En primer lugar, se calcula el parámetro X^2_{ical} (X_i o J_i cuadrada calculada) expresada por la ecuación (Spiegel, 1973):

$$x^2_{ical} = \frac{[N - 1]}{\sigma^2} S_i^2 \quad (4)$$

Donde:

N = Número de mediciones de la muestra

S_j^2 = Varianza de la muestra

σ^2 = Varianza poblacional representa la variabilidad del método

$$\sigma^2 = \frac{1}{n_t - k} \sum [n_i - 1] S_j^2 \quad (5)$$

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N} \quad (6)$$

Donde:

n_i = Mediciones de i -ésima muestra

S_j^2 = Varianza de la j -ésima muestra

K = Número de muestras

n_t = Mediciones totales (N)

El criterio de aceptación está dado por la siguiente ecuación:

$$X_{ical}^2 < X_i^2 \frac{\alpha}{2} \quad (7)$$

Donde:

$X_i^2 \frac{\alpha}{2}$ = valor teórico encontrado en tablas

Para un intervalo de confianza del 95 % y con sus grados de libertad (gl). Para calcular los grados de libertad se utiliza la siguiente ecuación (Levin, 1988):

Grados de libertad = (número de renglones – 1) (número de columnas – 1)

$$gl = (n_i - 1) (n_t - 1) \quad (8)$$

Coefficiente de Variación (CV). Este parámetro es importante considerarlo por la variabilidad recomendada para los siguientes métodos:

2% de variabilidad para métodos instrumentales.

3% para métodos volumétricos.

5% para métodos microbiológicos.

Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$CV = (s / \bar{x}) \times 100 \quad (9)$$

Donde:

s = Desviación estándar de la muestra.

\bar{x} = Promedio de las muestras.

Para estimar la precisión de los métodos analíticos, se utilizarán muestras fortificadas ($n = 5$) con concentraciones del parámetro de interés a partir de reactivos de alta pureza analítica (Van Loon, 1985; Rouessac, 2003; Gómez-Álvarez, 2008).

En la presente investigación la repetibilidad se calculó en base al análisis de varianza de los datos, utilizando para ello la prueba de la χ^2 cuadrada con un nivel de significancia del 1% ($\alpha = 0.01$). El análisis de repetibilidad se realizó utilizando 5 lecturas (una lectura semanal cada tercer semana con un total de 13 semanas) con 4 réplicas cada una. En tanto que las hipótesis que se establecieron fueron que $H_0: \chi^2_{calculada} \leq \chi^2_{tablas}$ para la hipótesis nula; y $H_a: \chi^2_{calculada} \geq \chi^2_{tablas}$ para la hipótesis alterna. La hipótesis nula establece que el método es repetible, en tanto que la hipótesis alterna establece que el método no es repetible.

3.6.1.3 Linealidad: La linealidad debe ser establecida considerando los resultados para muestras preparadas a las diferentes concentraciones del metal a determinar, las cuales se elegirán dentro de los valores establecidos por el método. Se debe mostrar la representación gráfica de la curva resultante elaborada con los valores obtenidos, con estos datos se calculan los siguientes parámetros: media, desviación estándar relativa, coeficiente de corrección y error estándar de regresión. El procedimiento es el siguiente:

a) Graficar el promedio de la cantidad de recuperación de cada concentración, obtenida anteriormente, sobre el eje de las “y” y la cantidad agregada sobre el eje de las “x”; la gráfica obtenida debe ser lineal.

b) Comprobar la linealidad de la gráfica con el cálculo de la regresión lineal o coeficiente de correlación para la ecuación de la recta:

$$y = A + Bx + E_{ij} \quad (10)$$

Donde:

A = Ordenada al origen

B = Pendiente

x = Cantidad adicionada

E_{ij} = Error asociado a la medición *i*

Y_{cal} = Valor estimado por la recta de regresión con los valores obtenidos para A y B

Los cálculos de A y B se realizan con las siguientes ecuaciones (Yamane, 1979):

$$A = \frac{\sum y}{n} - B \frac{\sum x}{n} \quad (11)$$

$$B = \frac{\sum(xy - n\bar{x}\bar{y})}{\sum x^2 - n\bar{x}^2} \quad (12)$$

E_{ij} se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$E_{ij} = \frac{\sum(y_i - y_{cal})}{n} \quad (13)$$

De esta forma se obtiene la ecuación:

$$Y_{cal} = A + Bx_i \quad (14)$$

c) Determinar la dispersión alrededor de la recta de regresión de la siguiente manera:

$$\hat{S}_{y/x} = S_{y/x} * \sqrt{\frac{n}{n-2}} \quad (15)$$

Donde:

$$S_{y/x} = \frac{\sum y^2 - A\sum y - B\sum xy}{n} \quad (16)$$

$$T_{B0} = \frac{B - B_0}{\hat{S}_{y/x} / S_x \sqrt{n-1}} \quad (19)$$

y por lo tanto:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum x^2}{\sum x^2 - n}} \quad (20)$$

El criterio de aceptación se determina de la siguiente manera:

$$t(\alpha/2, n - 2) \leq t_{B0} \leq t(1 - \alpha, n - 2) \quad (21)$$

El intervalo de confianza es el siguiente:

$$B \pm t_{1 - \alpha/2, n - 2} * \hat{S}_{y/x} / S_x \sqrt{n-1} \quad (22)$$

Con estos datos se plantea la siguiente ecuación de la recta para el método analítico en estudio:

$$y = A + Bx \quad (23)$$

Posteriormente se determina la correlación existente entre los resultados obtenidos mediante la expresión del Coeficiente de Correlación:

$$R = \frac{[a \sum y + b \sum xy - n(\hat{Y})^2]}{\sum y^2 - n\hat{Y}^2} \quad (24)$$

Donde:

$$\hat{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad (25)$$

Donde:

R = Coeficiente de Correlación de Pearson

El criterio de aceptación es:

Si $R > 0.995$ entonces el método es lineal (Levin, 1988, CENAM-EMA, 2008a)

También se puede confirmar la validez de la linealidad obtenida mediante el análisis de los residuos (o residuales), que es la diferencia entre el valor pronóstico y el valor observado. El valor pronóstico se obtiene a partir de la regresión lineal asociada a la ecuación de la recta con valores para “x” y “y”. Sustituyendo el valor para “x” se obtiene el valor pronosticado, que no necesariamente es igual al valor observado. En este sentido, se debe asegurar que el comportamiento gráfico de los residuos no muestre ninguna tendencia y los residuos deben de tener una distribución aleatoria.

Otra manera de confirmar la linealidad es mediante la prueba F, la cual se obtiene de la siguiente manera: Primeramente se debe de descomponer la varianza existente entre las señales experimentales y los valores predichos en dos aportes. Uno de ellos es el error experimental. Para tener una estimación del error experimental en la medición de señales, se debe medir “i” replicados de cada patrón, por lo que para cada punto “x” habrá varios valores de señal (y_i). Para obtener la varianza debida al error puramente experimental, se debe calcular la media de los cuadrados debida a esta contribución en base a la siguiente ecuación: MS_{PE}

$$MS_{PE} = \frac{\sum_i^k \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n - k} \quad (26)$$

Donde:

- n = Número total de mediciones
- k = Número total de patrones
- i = Repeticiones de cada patrón
- y_{ij} = Señales de todos los experimentos

Para estimar el posible error debido a una falla de ajuste por la elección de un modelo incorrecto, se calcula la media de los cuadrados debida a una “falta de ajuste” MS_{LOF}

$$MS_{LOF} = \frac{\sum_i^k n_i \cdot (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{k - 2} \quad (27)$$

Si el modelo lineal de ajuste es correcto, entonces $MS_{LOF} < MS_{PE}$

La prueba F de varianza se calcula:

$$F_{cal} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} \quad (28)$$

Si $F_{cal} < F_{k-2;n-k,\alpha}$ (obtenido de tablas) se acepta que existe un buen ajuste del modelo lineal (Miller y Miller, 1993; Skoog y Leary, 1994).

3.6.1.4 Límite de Detección: Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales, como la absorción atómica, es que son capaces de detectar y determinar cantidades de metales mucho más pequeñas que los métodos de análisis tradicionales. Esta ventaja permite apreciar la importancia de las concentraciones en el nivel de trazas en muchos materiales, por ejemplo en muestras biológicas y medio ambientales, contribuyendo así al desarrollo de muchas otras técnicas en las cuales los límites de detección bajos son el mejor criterio para aplicarlas con éxito (Miller y Miller, 1993). El límite de detección (LD) de un analito se describe como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”. El límite de detección del método se calculará con la ayuda de la zona de la representación cercana al origen, y se utiliza tanto la pendiente como la ordenada al origen (Miller y Miller, 2002). Se representa con la siguiente ecuación:

$$LD = y_B + 3s_B \quad (29)$$

Donde:

y_B = Concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco

$3s_B$ = Tres veces la desviación estándar del blanco

Para el cálculo del LD se procede de acuerdo a la NMX-AA-051-SCFI-2001, de la siguiente manera:

- Obtención de los valores de absorbancia $Y_{i,n}$ de los puntos de la curva de calibración, donde el número de estándares (i), podrán estar en el intervalo $\leq i \leq 10$) y el número de réplicas (n) pueden estar para EAA por llama entre ($3 \leq n \leq 5$).
- De cada serie de datos se obtiene la desviación estándar (S_i) y el promedio de la absorbancia (\tilde{Y}_i), con éstos dos últimos se calcula el coeficiente de variación (CV_i).
- Comprobación visual de la linealidad entre las absorbancia promedio (\tilde{Y}_i) y la concentración graficando \tilde{Y}_i vs X_i .
- Determinar el coeficiente de correlación lineal, mediante la siguiente ecuación:

$$R = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}} \quad (30)$$

Si $R \geq 0.99$ se acepta.

Si se cumplen las condiciones de los incisos c) y d), se calcula la pendiente (b) y el punto de intersección (a) de la recta en el eje Y, por medio del método de los mínimos cuadrados:

$$\mathbf{y = a + b x} \quad (31)$$

- Calculo de las desviaciones $S_{y/x}$ entre los valores calculados por medio de la línea recta (\hat{Y}_i) y los valores experimentales (\tilde{Y}_i).
- Calcular los valores de la absorbancia (\hat{Y}_i) sustituyendo en la línea recta las concentraciones (X_i)
- Con los datos anteriores obtener $S_{y/x}$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum \left(\bar{Y}_i - \hat{Y}_i \right)^2}{n-2}} \quad (32)$$

Por definición $S_{y/x}$ es igual a la desviación estándar del blanco (S_B) y el término independiente de la línea recta (a) es igual a la absorbancia del blanco (Y_B).

- h) Por último se aplica la definición de Límite de Detección de acuerdo a la Ecuación 28.

3.6.1.5 Incertidumbre

Incertidumbre de medición: Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando (CENAM-EMA, 2004). Todo resultado de medición debe ser acompañado de una estimación de su incertidumbre. La expresión de la incertidumbre de medición debe indicar claramente el intervalo de valores atribuibles razonablemente al mensurando, además de una declaración del *nivel de confianza p* asociado a ese intervalo, o una indicación con información equivalente como el llamado *factor de cobertura k*. *Nivel de confianza:* Fracción de la distribución de probabilidad caracterizada por el resultado de medición y su incertidumbre. *Factor de cobertura:* Factor que multiplica a la incertidumbre estándar combinada para calcular la incertidumbre expandida de una medición.

La declaración de la incertidumbre de medición es indispensable en los resultados de calibración o en la aplicación de mediciones en los procesos de diseminación de unidades de medida, dado que éstos denotan los eslabones de la cadena de trazabilidad. Los ensayos usualmente tienen el propósito de llevar a cabo la *verificación* de la conformidad con requisitos establecidos, mediante la comparación de éstos con los resultados de sus mediciones. Esta condición no los excluye de una declaración de la incertidumbre de medición en los resultados, además de ser una parte indispensable en la expresión de un resultado de medición. Los resultados de tal verificación pueden ser

conforme, no conforme o sin decisión. Una explicación más extensa se encuentra en la literatura y cuyos conceptos son completamente aplicables a mediciones de magnitudes diversas, aunque el documento esté enfocado a mediciones de longitud (CENAM-EMA, 2004a).

La incertidumbre estándar de la concentración de masa del elemento químico a medir “y”, mediante la respuesta del instrumento “α” se calcula como:

$$U_{(yx)} = \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(y_{(x)i} - Y_{MRC})^2}{S_{xx}}} \quad (33)$$

Donde:

- $U_{(yx)}$ = Incertidumbre del mesurando obtenida por el instrumento calibrado
- s = Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal
- b_1 = Pendiente de la recta
- p = Número de réplicas de la muestra en estudio
- n = Número de disoluciones (puntos) empleados en la curva de calibración multiplicado por el número de réplicas (lecturas) de cada disolución (punto), total de datos (ij)
- $y_{(x)i}$ = Concentración de masa (mg/L) en estudio
- Y_{MRC} = Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones empleadas en la curva de calibración
- S_{xx} = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas

La desviación estándar residual s y la suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas S_{xx} se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\alpha_j - \alpha)^2}{n - 2}} \quad (34)$$

Donde:

- S = Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal
 A_j = Las "i" lecturas observadas correspondientes a Y_{iMRC} conocidas con las que se calibró el instrumento
 α = Las "i" lecturas ajustadas correspondientes a γ_{iMRC} conocidas del instrumento en la curva de calibración
 N = Número total de datos (ij)

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (y_i - y)^2 \quad (35)$$

Donde:

- S_{xx} = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas por la curva de calibración
 y_i = Concentración de masa de cada i disolución de referencia (MRC) empleadas en la curva de calibración
 y = Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones de referencias empleadas en cada uno de los puntos de la curva de calibración

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos de los estándares de Na, K, Ca y Mg a 3 diferentes concentraciones presentaron una forma simétrica, del tipo de una distribución normal o campana de Gauss. En este sentido, hay que recordar que el tamaño de la muestra poblacional en el presente trabajo es de 42 para cada metal. Esto significa que de acuerdo al Teorema del Límite Central, a mayor sea el tamaño de muestra ($n > 30$) las distribuciones muestrales se aproximarán a la normalidad (Reyes-Castañeda, 1990; Siegel, 1990; Blair y Taylor, 2008). Por lo tanto, siendo $n = 42$, es de esperarse que la distribución muestral tenga una distribución normal. A continuación, se presentan los resultados y discusión que se obtuvieron en la presente investigación.

4.1 EXACTITUD

4.1.1 Exactitud Para Estándares Individuales: Uno de los criterios de calidad que tiene gran relevancia en la estandarización y validación de un método analítico es el de la exactitud, ya que este parámetro refleja, de manera muy evidente, el grado de concordancia entre un valor real (medido) y un valor teórico (verdadero) y generalmente se sustenta a través del porcentaje de recuperación (ó recobro) (Christian, 2009).

Los resultados obtenidos a partir de la preparación y posterior cuantificación de los estándares de Na, K, Ca y Mg de alta pureza, indican que la exactitud obtenida es aceptable, tal y como se puede apreciar en las Tablas 6, 7, 8 y 9. Es importante señalar que para el caso de Na a concentraciones de 0.50, 1.00 y 2.00 ppm, los resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación fueron de 99.66, 97.70 y 98.00, respectivamente (Tabla 6). Por otro lado, para el caso del K a concentraciones de 1.00, 2.00 y 5.00 ppm, los porcentajes de recuperación fueron de 98.9, 98.63 y 99.85, respectivamente (Tabla 7). Para el Ca (1.00, 2.00 y 5.00 ppm), los porcentajes de recuperación fueron de 98.95, 99.79 y 100.69, respectivamente (Tabla 8). Para Mg

(0.50, 1.00 y 2.00 ppm), los resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación fueron de 100.0, 100.3 y 99.71, respectivamente (Tabla 9). En términos generales se puede apreciar que los porcentajes de recuperación de los 4 metales fluctuaron en un rango de 97.70 a 100.69 %.

Es importante considerar que el valor aceptado para el parámetro Exactitud es de 85 a 115 %, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, 1999); por lo que se puede considerar que la exactitud obtenida fue aceptable. Estos porcentajes de recuperación obtenidos coinciden con los resultados encontrados para Zn por Ghasemi y Zahediasl (2012), y con los resultados obtenidos por Tomza-Marciniack *et al.* (2012) para varios metales en suero de perro, así como los resultados obtenidos por Dlugaszek *et al.* (2008) para Mg, Ca y otros elementos traza en suero humano.

Los porcentajes del Coeficiente de Variación para cada metal a tres niveles de concentración fluctuaron en los siguientes rangos: Na de 0.03 a 0.06, K de 0.02 a 0.05, Ca de 0.02 a 0.21, y Mg con 0.01 para los tres niveles de concentración. Se puede apreciar que los valores porcentuales del Coeficiente de Variación, se encuentran muy por debajo del valor del 2 % de variabilidad establecido para métodos instrumentales por la IUPAC (1999). Esto indica que los resultados para los cuatro metales presentaron una dispersión mínima y se consideran aceptables.

Tabla 6.- Resultados de las determinaciones de Na por semana a tres diferentes niveles de concentración.

Semana	Concentración de Sodio (Na)		
	0.50 ppm*	1.00 ppm*	2.00 ppm*
	Promedio	Promedio	Promedio
Primera	0.52	0.96	1.91
Cuarta	0.46	0.89	1.88
Séptima	0.49	0.97	1.96
Décima	0.50	1.00	2.00
Décima tercera	0.52	1.03	2.01
Décima sexta	0.50	1.01	2.00
Promedio \pm DE**	0.498 \pm 0.03	0.976 \pm 0.05	1.96 \pm 0.05
Recuperación (%)	99.66	97.66	98.00
Coefficiente de Variación (% CV)	0.06	0.05	0.03

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas para cada nivel de concentración para cada analito, con un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 7.- Resultados de las determinaciones de K por semana a tres diferentes niveles de concentración.

Semana	Concentración de Potasio (K)		
	1.00 ppm*	2.00 ppm*	5.00 ppm*
	Promedio	Promedio	Promedio
Primera	0.99	1.98	5.08
Cuarta	0.89	1.86	4.83
Séptima	0.99	2.00	5.01
Décima	1.02	2.00	5.02
Décima tercera	1.03	2.00	5.01
Décima sexta	1.01	2.00	5.05
Promedio \pm DE**	0.99 \pm 0.05	1.97 \pm 0.05	5.00 \pm 0.08
Recuperación (%)	99.00	98.66	100.00
Coefficiente de Variación (% CV)	0.05	0.03	0.02

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas para cada nivel de concentración para cada analito con un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 8.- Resultados de las determinaciones de Ca por semana a tres diferentes niveles de concentración.

Semana	Concentración de Calcio (Ca)		
	1.00 ppm*	2.00 ppm*	5.00 ppm*
	Promedio	Promedio	Promedio
Primera	0.96	1.95	5.01
Cuarta	0.92	1.94	5.26
Séptima	1.06	2.04	4.97
Décima	1.00	2.03	4.99
Décima tercera	1.00	2.02	5.03
Décima sexta	0.99	2.00	5.00
Promedio \pm DE**	0.99 \pm 0.05	1.99 \pm 0.04	5.04 \pm 0.08
Recuperación (%)	99.00	99.83	100.86
Coefficiente de Variación (% CV)	0.00	0.02	0.02

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas para cada nivel de concentración para cada analito con un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 9.- Resultados de las determinaciones para Mg por semana a tres diferentes niveles de concentración.

Semana	Concentración de Magnesio (Mg)		
	0.50 ppm*	1.00 ppm*	2.00 ppm*
	Promedio	Promedio	Promedio
Primera	0.494	0.997	1.982
Cuarta	0.497	0.997	1.988
Séptima	0.502	1.007	2.010
Décima	0.507	1.008	1.980
Décima tercera	0.495	1.010	2.008
Décima sexta	0.505	1.001	1.998
Promedio \pm DE**	0.50 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.99 \pm 0.01
Recuperación (%)	100	100.3	99.71
Coefficiente de Variación (% CV)	0.01	0.01	0.01

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas para cada nivel de concentración para cada analito con un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Respecto al análisis estadístico de los datos para corroborar la exactitud del método utilizado, se realizó la prueba estadística t Student con un nivel de significancia de 5 % ($\alpha = 0.05$ %) y un intervalo de confianza del 95 % y un valor de t de tablas de 2.447. Para ello, se establecieron previamente las siguientes pruebas de hipótesis para cada uno de los metales individuales: hipótesis nula $H_0: \mu = \mu_0$ que establece que los resultados obtenidos son iguales (concentración en ppm), y $H_a: \mu \neq \mu_0$ para la hipótesis alterna, en donde los resultados son diferentes (al menos uno). La variable μ representa el valor real (medido como la concentración en ppm del estándar de alta pureza) y μ_0 representa el valor teórico (preparado a partir de un estándar de 1000 ppm). Los resultados obtenidos indican que se acepta la hipótesis nula (H_0) ya que no existe evidencia significativa para establecer que los resultados obtenidos entre el valor real y el valor teórico de cada uno de los metales a los diferentes niveles de concentración, son diferentes. Esto significa que todos los valores obtenidos para t caen dentro del intervalo de aceptación mencionado al principio, incluso en los niveles de significancia de 10 % y 1 % con valores de t de tablas de 1.943 y 3.707, respectivamente (Anexo A, a1, a2, a3 y a4).

4.1.2.- Exactitud Para Estándares Mixtos: De manera similar a como se procedió para calcular la exactitud para los estándares individuales, se procedió con los estándares mixtos (Na, K, Ca, Mg). Los resultados obtenidos del porcentaje de recuperación se pueden apreciar en las Tablas 10, 11, 12 y 13, respectivamente. Los porcentajes de recuperación para Na (500 ppm), K (25 ppm), Ca (25 ppm) y Mg (10 ppm) fueron 102.13, 100.93, 98.66 y 98.00, respectivamente (Tabla 10). Para Na (1000 ppm), K, (50 ppm), Ca (50 ppm) y Mg (25 ppm), los porcentajes de recuperación obtenidos fueron 102.33, 100.54, 98.32 y 99.09, respectivamente (Tabla 11). Por otro lado, los porcentajes de recuperación obtenidos para Na (2000 ppm), K (100 ppm), Ca 100 (ppm) y Mg (50 ppm), fueron de 102.28, 103.47, 99.59 y 100.96, respectivamente (Tabla 12). Finalmente, en la Tabla 13 se aprecian los resultados obtenidos para Na (4000 ppm), K (200 ppm), Ca (200 ppm) y Mg (100 ppm), los cuales fueron 105.21, 102.01, 99.50 y 99.73 %, respectivamente. Se puede apreciar que el promedio global es de 100.79%, lo

cual indica que la exactitud es aceptable, ya que se encuentra dentro del rango de 85 a 115% de recuperación recomendado por la IUPAC (1999).

Por otro lado, los porcentajes del Coeficiente de Variación que se obtuvieron para Na (500 ppm), K (25 ppm), Ca (25 ppm) y (Mg 10), fueron de 0.04, 0.07, 0.03 y 0.02, respectivamente (Tabla 10). En tanto que para Na (1000 ppm), K (50 ppm), Ca (50 ppm) y Mg (25 ppm), fueron de 0.04, 0.02, 0.03 y 0.03 (Tabla 11). En la Tabla 12, se puede apreciar que los porcentajes del Coeficiente de Variación para Na (2000 ppm), K (100 ppm), Ca (100 ppm) y Mg (50 ppm), fueron de 0.01, 0.04, 0.04 y 0.02, respectivamente. En tanto que Na (4000 ppm), K (200 ppm), Ca (200 ppm) y Mg (100 ppm), fueron de 0.09, 0.02, 0.04 y 0.02 (Tabla 13). Los resultados obtenidos del Coeficiente de Variación para los 4 metales fluctuaron de manera global en el rango de 0.01 a 0.09%, el cual se encuentra muy por debajo del valor del 2% de variabilidad establecido para métodos instrumentales (IUPAC, 1999). Los datos originales para determinar la exactitud de los estándares individuales y mixtos se muestran en los Anexos A (a1, a2, a3 y a4) y B (b1, b2, b3 y b4).

Los resultados obtenidos en los estándares mixtos para los cuatro metales fueron analizados por la prueba *t* Student con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$), estableciéndose las siguientes hipótesis: $H_0: \mu = \mu_0$ para la hipótesis nula y $H_a: \mu \neq \mu_0$ para la hipótesis alterna.

Tabla 10.- Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 500, K 25, Ca 25 y Mg 10 ppm).

SEMANAS	Na	K	Ca	Mg
	500 ppm*	25 ppm*	25 ppm*	10 ppm*
Primera	518	24.40	25.00	10.00
Cuarta	500	24.52	25.04	9.40
Séptima	544	28.84	23.28	10.04
Décima	504	24.00	24.92	9.76
Décima tercera	506	28.84	24.84	9.80
Décima sexta	492	24.80	24.92	9.80
Promedio \pm DE**	510.66 \pm 18.40	25.23 \pm 1.79	24.66 \pm 0.68	9.8 \pm 0.23
Recuperación (%)	102.13	100.93	98.66	98
Coefficiente de Variación (% CV)	0.04	0.07	0.03	0.02

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas por cada nivel de concentración para un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 11.- Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 1000, K 50, Ca 50 y Mg 25 ppm).

SEMANAS	Na	K	Ca	Mg
	1000 ppm*	50 ppm*	50 ppm*	25 ppm*
Primera	1108	49.12	49.40	24.80
Cuarta	978	50.12	49.40	24.04
Séptima	1034	51.92	46.16	25.68
Décima	1008	49.80	50.36	24.04
Décima tercera	1004	50.40	49.92	25.44
Décima sexta	1008	50.28	49.72	24.64
Promedio \pm DE**	1023.3 \pm 45.12	50.27 \pm 0.93	49.16 \pm 1.51	24.77 \pm 0.69
Recuperación (%)	102.33	100.54	98.32	99.09
Coefficiente de Variación (% CV)	0.04	0.02	0.03	0.03

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas por cada nivel de concentración para un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 12.- Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 2000, K 100, Ca 100 y Mg 50 ppm).

	Na	K	Ca	Mg
	2000 ppm*	100 ppm*	100 ppm*	50 ppm*
Primera	2062	102.72	99.24	48.60
Cuarta	2054	104.76	102.36	48.44
Séptima	2084	111.84	92.32	51.36
Décima	2030	100.68	102.00	48.96
Décima tercera	2004	100.28	101.40	50.20
Décima sexta	2040	100.56	100.24	50.48
Promedio \pm DE**	2045.66 \pm 27.64	103.47 \pm 4.44	99.59 \pm 3.74	49.67 \pm 1.18
Recuperación (%)	102.28	103.47	99.59	100.96
Coefficiente de Variación (% CV)	0.013	0.043	0.037	0.024

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas por cada nivel de concentración para un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar

Tabla 13.- Resultados de las determinaciones para los estándares mixtos por semana a cuatro diferentes niveles de concentración (Na 4000, K 200, Ca 200 y Mg 100 ppm).

SEMANAS	Na	K	Ca	Mg
	4000 ppm*	200 ppm*	200 ppm*	100 ppm*
Primera	4098	204.28	204.56	99.48
Cuarta	4110	207.00	203.12	96.32
Séptima	4968	210.52	183.44	101.88
Décima	4028	201.20	202.12	99.76
Décima tercera	4032	200.52	200.04	100.16
Décima sexta	4016	200.64	200.72	100.76
Promedio \pm DE**	4208.66 \pm 374.04	204.02 \pm 4.07	199 \pm 7.80	99.72 \pm 1.88
Recuperación (%)	105.21	102.01	99.5	99.73
Coefficiente de Variación (% C V)	0.09	0.02	0.04	0.02

(*) = El promedio corresponde a siete réplicas por cada nivel de concentración para un total de 42 muestras.

(**) = Desviación Estándar

La hipótesis nula establece que los resultados obtenidos para la concentración (en ppm) son iguales y la hipótesis alterna establece que los resultados obtenidos de la concentración (en ppm) son diferentes. Una vez analizados los resultados obtenidos, se puede apreciar que la hipótesis H_0 se acepta ya que no existe evidencia significativa para establecer que las mediciones sean diferentes entre el valor real y el valor teórico de cada uno de los estándares a los diferentes niveles de concentración establecidos, incluso en los intervalos de aceptación del 90% ($t = 1.943$), 95% ($t = 2.447$) y 99% ($t = 3.707$) (Anexo B, b1, b2, b3 y b4). Excepto para el caso de Na (4000 ppm), cuyo valor de t (4.046) cae fuera del área del intervalo de aceptación lo cual es posible que se deba a la alta concentración que fue utilizada (4000 ppm) introduciendo factores de dilución bastante elevados ($FD = 1000$) que fue obtenido a partir de una dilución de 5:100 seguida de otra dilución de 2:100, con la finalidad de que la concentración estuviera dentro del rango de linealidad. Esto ocasiona que la dispersión aparente de los datos sea mayor y se refleja en una desviación estándar muy alta ($DE = 374.04$), aunque el porcentaje del Coeficiente de Variación está muy por debajo del límite aceptable permitido ($< 2\%$).

4.2 REPETIBILIDAD

4.2.1 Repetibilidad para Estándares Individuales

La precisión es una de las características metrológicas más importantes a tener en cuenta para la selección e implantación de un procedimiento de medida en el laboratorio clínico. Además, el conocimiento cuantitativo de esta característica es imprescindible para el establecimiento de los intervalos de tolerancia de los materiales de control interno, para la interpretación objetiva de la significación de un cambio entre dos valores consecutivos de una magnitud bioquímica, y para el cálculo de la incertidumbre. Por todas estas razones, es importante que los laboratorios clínicos puedan estudiar la precisión de una manera normalizada. La validación de la precisión de los procedimientos de medida también es un requisito de las normas internacionales que se

utilizan para implantar un sistema de gestión de la calidad en los laboratorios clínicos (Canalias, 2003).

La Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) establece que la Repetibilidad es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de un mismo mensurando, llevadas a cabo totalmente bajo las mismas condiciones de medición, basados en la Norma Mexicana NMX-Z-055-IMNC-1996. Las condiciones de Repetibilidad incluyen: el procedimiento, analista/observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto período de tiempo (CENAM-EMA, 2008a).

Cabe señalar que los métodos para determinar la Repetibilidad de las mediciones están basados en la evaluación estadística de la dispersión de los resultados, ya sea en forma de rango o su representación como varianza o desviación estándar (Llamosa *et al.*, 2007). En este sentido, en la presente investigación la Repetibilidad se calculó en base al análisis de varianza de los datos, utilizando para ello la prueba de la Xi^2 con un nivel de significancia del 1% ($\alpha = 0.01$). El análisis de Repetibilidad se realizó utilizando cinco determinaciones (una por semana y repitiendo el análisis cada tercer semana, con un total de 13 semanas) con cuatro réplicas cada una. En tanto que las hipótesis que se establecieron fueron que $H_o: Xi^2_{calculada} \leq Xi^2_{tablas}$ para la hipótesis nula que establece que el método es repetible; y $H_a: Xi^2_{calculada} \geq Xi^2_{tablas}$ para la hipótesis alterna que establece que el método no es repetible.

En relación a los resultados obtenidos de Repetibilidad para los estándares individuales, se puede observar que el método es aceptable para los cuatro estándares que contienen de manera individual a cada uno de los metales (Na, K, Ca y Mg) de acuerdo al análisis de varianza utilizando la prueba de la Xi^2 (Tabla 14). Considerando que el valor de Xi^2 calculada es menor que el valor de tablas (Anexo C, c1, c2, c3 y c4), se acepta la hipótesis nula (H_o) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ y un intervalo de confianza del 99% para los cuatro metales. Por lo tanto, el método se considera que es repetible y/o

Tabla 14.- Datos de Repetibilidad para el método instrumental utilizado a partir de estándares individuales.

Estándar Individual	Concentración (ppm)	χ^2 Calculada	Resultado del Método
Na	0.50	14.86	Repetible
	1.00	21.96	Repetible
K	1.00	15.97	Repetible
	2.00	12.20	Repetible
Ca	1.00	31.79	No Repetible
	2.00	NSPC*	Repetible
Mg	0.50	14.54	Repetible
	1.00	18.93	Repetible
χ^2 de Tablas		26.22 ($\alpha = 1\%$)	

(*) NSPC= No se puede calcular.

aceptable. Esto indica que la Repetibilidad obtenida en el análisis de los metales por parte del analista fue aceptable en el tiempo establecido que fue de 13 semanas. Con respecto a la concentración de Ca de 2.0 ppm, se observó que no hay resultado de la varianza, lo cual indica que los resultados obtenidos fueron idénticos (2.00 ± 0.00), es decir, fueron precisos y exactos. Todas las determinaciones fueron repetibles excepto Ca a 1.0 ppm, quizá debido a que se trabaja en el límite inferior del rango de linealidad y esto puede provocar resultados poco confiables.

4.2.2 Repetibilidad para Estándares Mixtos

Los resultados obtenidos en el estándar mixto son similares y consistentes como el caso de los estándares individuales. En el presente trabajo es importante señalar que solo se evaluó un estándar mixto que contiene Na 500, K 25, Ca 25, K 10 ppm, cuyos resultados indican que el método es repetible (Tabla 15). Se puede observar que en la concentración de Ca (25 ppm) y Mg (10 ppm), la X^2_{ical} no se puede calcular (NSPC); lo cual significa que no hay varianza en los resultados y por lo tanto existe una alta precisión y exactitud al ser los datos idénticos a la concentración del estándar implicado. Los datos para determinar la Repetibilidad del método se muestran en el Anexo D.

Tabla 15.- Datos de Repetibilidad para el método instrumental utilizado a partir de un estándar mixto.

Estándar Mixto	Concentración (ppm)	χ^2 Calculada	Resultado del Método
Na	500	18.2	Repetible
K	25	26.11	Repetible
Ca	25	NSPC*	Repetible
Mg	10	NSPC*	Repetible
χ^2 de Tablas		90% = 18.55 95% = 21.03 99% = 26.22 32.91 ($\alpha = 0.1\%$)	

(*) NSPC= No Se Puede Calcular.

4.3 LINEALIDAD

El concepto de Linealidad es ampliamente utilizado en la instrumentación analítica e industrial, sin embargo su definición suele ser confusa y su determinación puede llegar a ser compleja (Skoog, 2001; Christian, 2009). La Entidad Mexicana de Acreditación (CENAM-EMA, 2008b) define a la Linealidad como la capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen. La Linealidad se sigue analizando mediante métodos de consistencia gráfica, sin embargo el análisis numérico (estadístico) siempre es necesario cuando se requiere de una evaluación cuantitativa. Para ello se deben utilizar estándares de alta calidad con cinco niveles de concentración y evaluados por triplicado (Skoog, 2001; Christian, 2009).

En el presente estudio, la Linealidad se determinó mediante tres métodos: 1) en base al Coeficiente de Determinación (R^2), 2) en base al análisis de residuos y 3) en base al estadístico F. Esto es debido a que si la Linealidad no es tan evidente en la inspección visual se recomienda proceder de la siguiente forma: a) calcular la regresión lineal de todos los puntos, b) calcular para cada punto la diferencia entre las concentraciones medidas y c) las concentraciones calculadas por la recta de regresión (residuos) y representar gráficamente los residuos. Por último, utilizar un estadístico de prueba (Fisher o *t* Student). Ninguna de estas determinaciones de Linealidad excluye a las otras (Suarez, *et al.*, 2009; Serrat-Orús *et al.*, 2011)

El Coeficiente de Determinación es indicio de un ajuste aceptable de los datos a la línea de regresión, que indica que tan bueno es el modelo de regresión lineal para representar a dos variables que en este caso son absorbancia y concentración (Harvey, 2002). Los resultados obtenidos de la Linealidad en base al Coeficiente de Determinación (R^2), se presentan en las Figuras 2, 3, 4 y 5. Se puede apreciar que el Coeficiente de Determinación para los cuatro metales evaluados fue de 0.9998 para Na, 1.00 para K, 0.9999 para Ca y 0.9996 para Mg. Como se puede apreciar, se obtuvieron valores muy cercanos a 1.00, por lo que se considera que la Linealidad es aceptable, ya que un valor

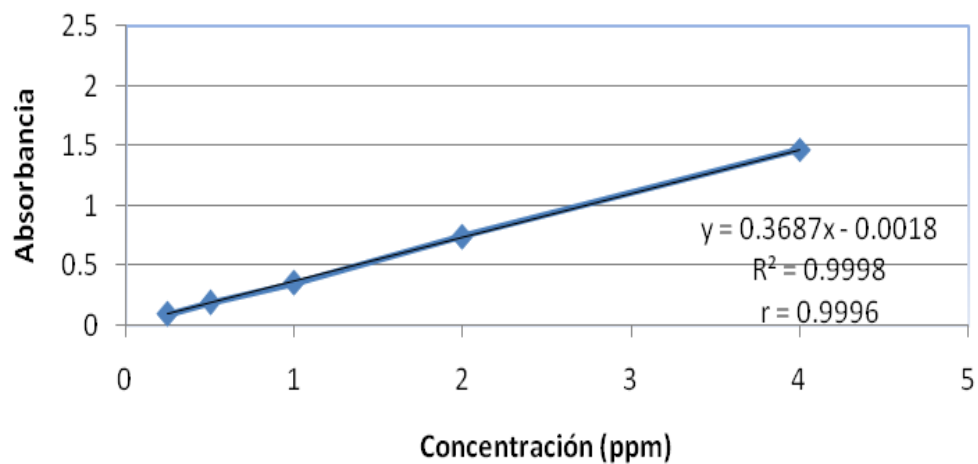


Figura 2.- Curva de regresión ajustada para Na para evaluar la linealidad.

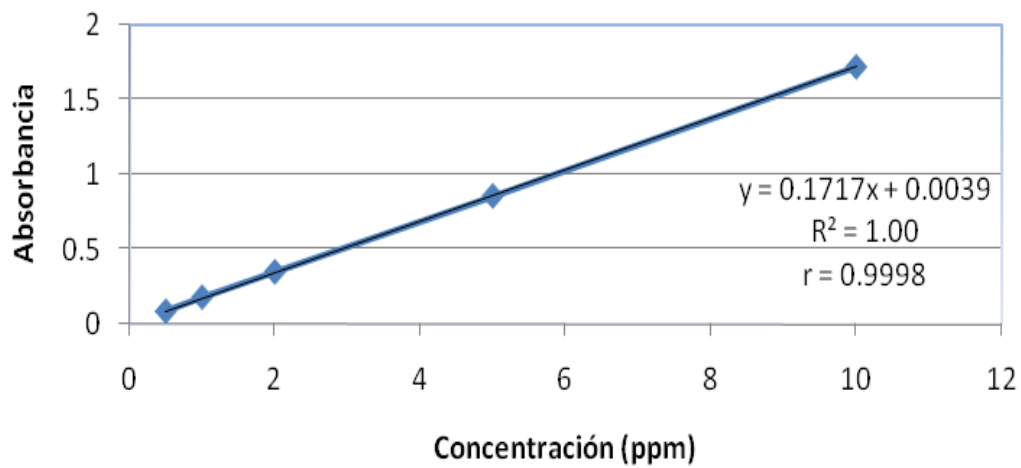


Figura 3.- Curva de regresión ajustada para K para evaluar la linealidad.

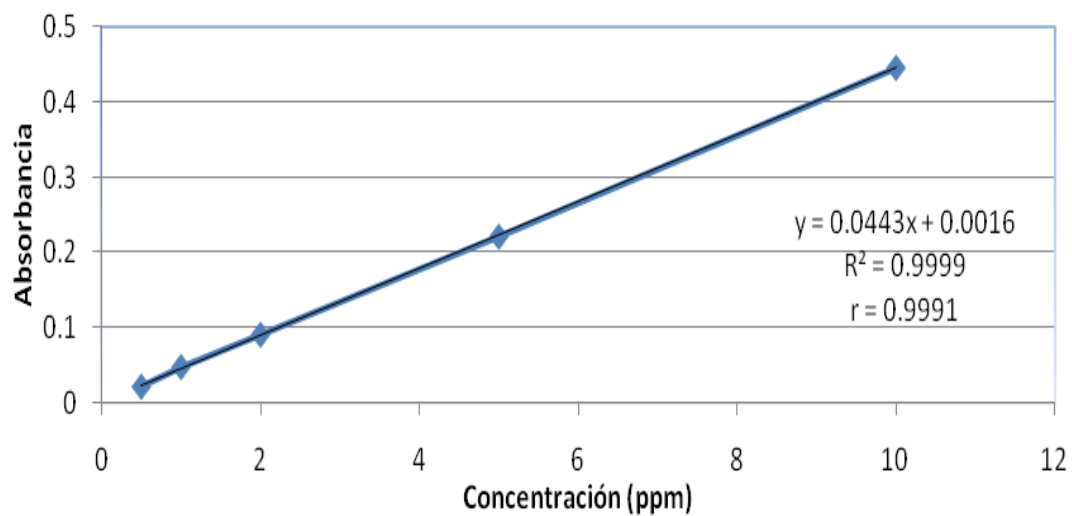


Figura 4.- Curva de regresión ajustada para Ca para evaluar la linealidad.

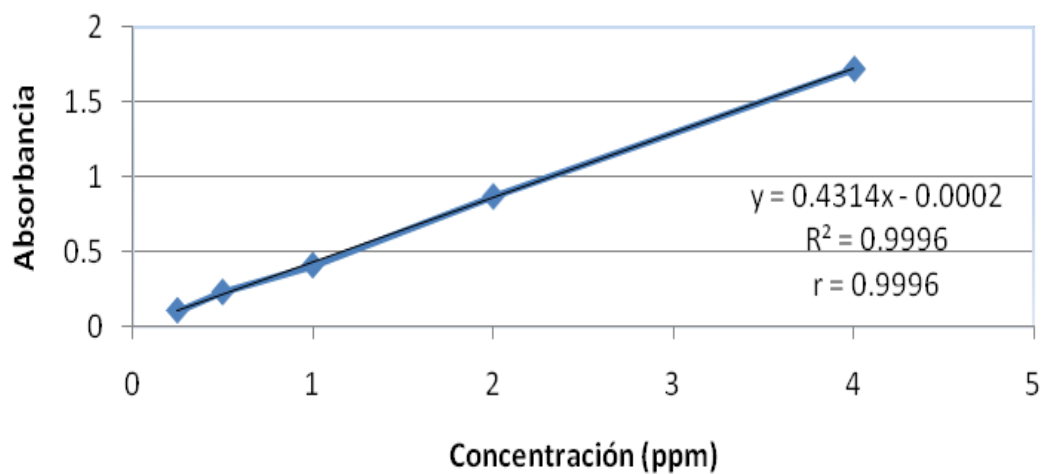


Figura 5.- Curva de regresión ajustada para Mg para evaluar la linealidad.

de $R^2 > 0.995$, es considerado como aceptable por instancias oficiales como el Centro Nacional de Metrología (CENAM) o la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) (CENAM-EMA, 2008a).

En estas gráficas también se incluye el Coeficiente de Correlación o de Pearson (R) que indica el grado de asociación entre dos variables, cuyo rango se encuentra entre 0 y 1. Entre más cercano sea el valor a 1, mayor es la asociación entre estas variables. Como se puede apreciar en las Figuras 2, 3, 4 y 5, estos valores están muy cercanos a 1. Estadísticamente se considera aceptable un valor de $R > 0.998$ (CENAM-EMA, 2008a). Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto al Coeficiente de Determinación (R^2) y para el Coeficiente de Correlación de Pearson (r) son muy similares a los obtenidos por Rivas y Fernández (2006) para las curvas de calibración en la determinación de Zn en un estándar de referencia certificado ($R^2 = 0.999$), y a los resultados obtenidos por Ghasemi y Zahediasl (2011) para Zn en suero humano ($R^2 = 0.999$), así como los obtenidos por Suárez *et al.*, (2009) para Mg en sangre humana ($r = 0.9993$).

En este estudio también se realizó el análisis de los residuos (o residuales), que es la diferencia entre el valor pronóstico y el valor observado. El valor pronóstico se obtiene a partir de la regresión lineal asociada a la ecuación de la recta con valores para “x” y “y”. Sustituyendo el valor para “x” se obtiene el valor pronosticado, que no necesariamente es igual al valor observado. En este sentido, se debe asegurar que el comportamiento gráfico de los residuos no muestre ninguna tendencia y los residuos deben de tener una distribución aleatoria. De esta manera, los resultados obtenidos muestran que la Linealidad sigue siendo consistente, ya que el análisis de los residuos no presenta ninguna tendencia y muestran una distribución aleatoria, tal y como se puede apreciar en las Figuras 6, 7, 8 y 9. Sin embargo, para corroborar la Linealidad numéricamente, se realizó el análisis estadístico de prueba F o análisis de varianza de la regresión, cuyo principio es descomponer la varianza existente entre las señales experimentales y los

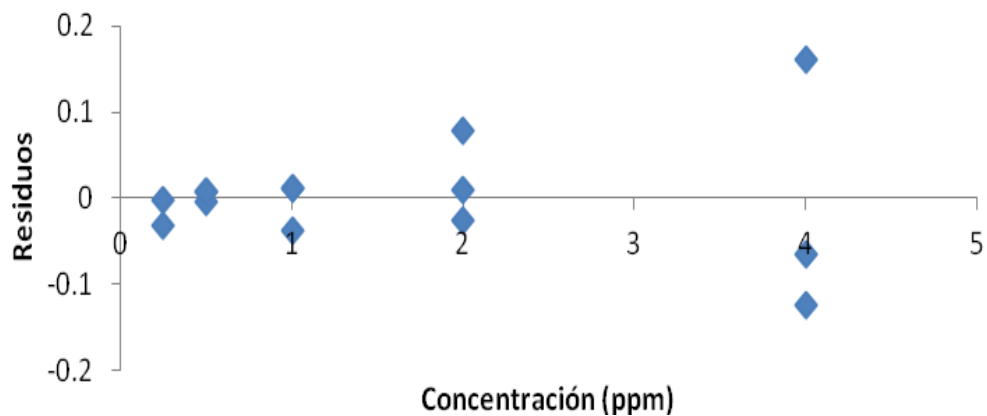


Figura 6.- Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de Na.

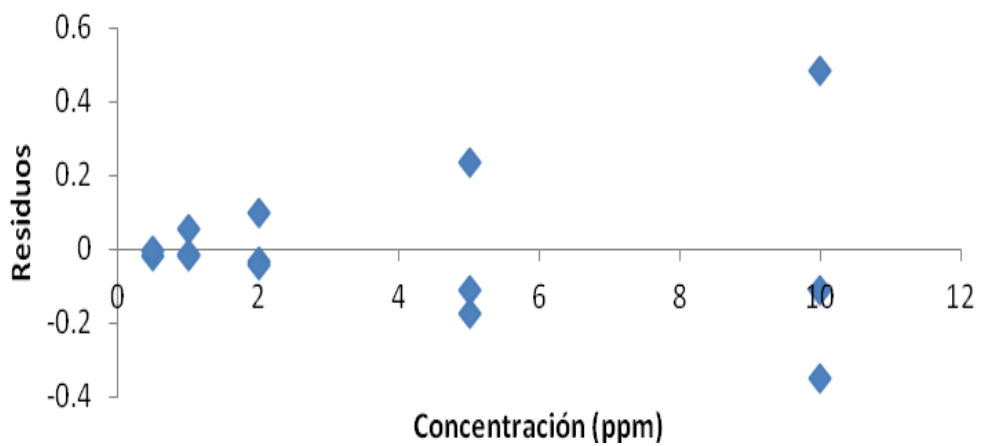


Figura 7.- Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de K.

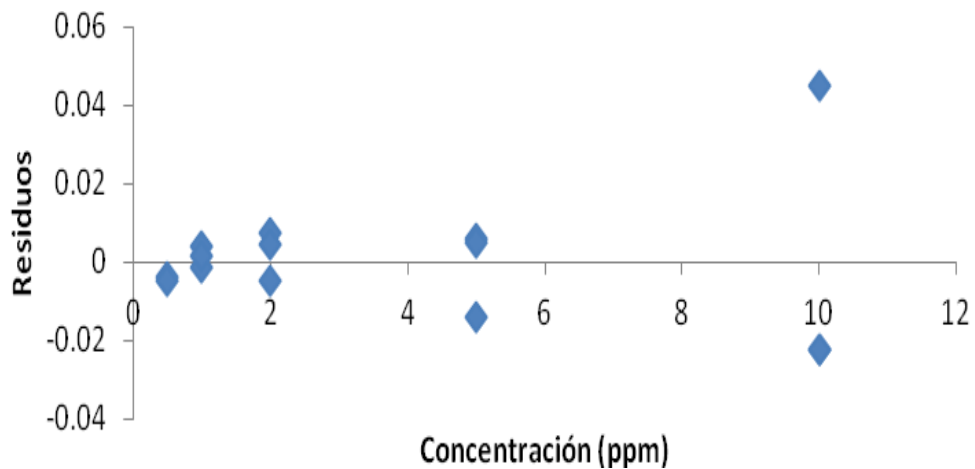


Figura 8.- Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de Ca.

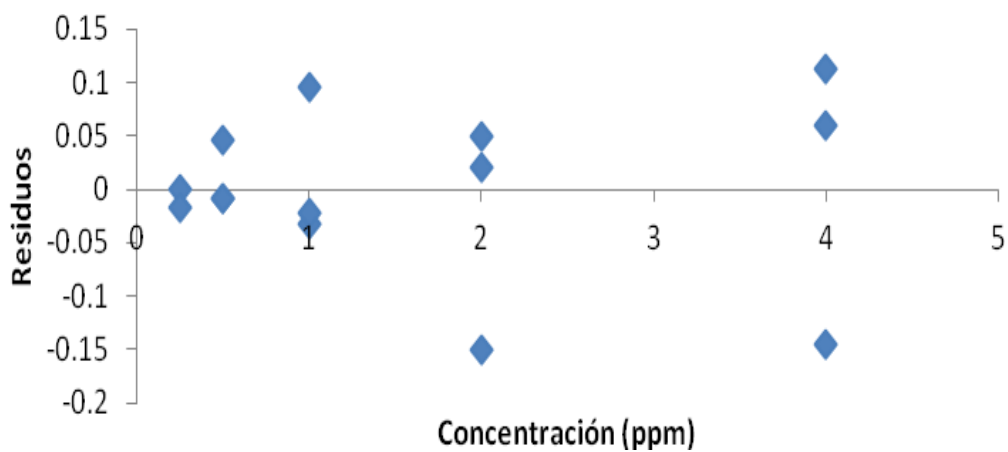


Figura 9.- Comportamiento gráfico para el análisis de los residuos de Mg.

valores predichos en dos aportes. Uno de ellos es la varianza del error experimental y el otro es debido a una falla en la varianza de ajuste de la regresión. Como se puede apreciar en la Tabla 16, todos los valores obtenidos para F calculada, caen por debajo de los valores F de tablas con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$), por lo que también para este estadístico de prueba, se acepta la Linealidad para los cuatro metales analizados. Los datos originales para determinar la Linealidad se muestran en el Anexo E (Anexo e1).

4.4 LÍMITE DE DETECCIÓN

Es importante señalar que la Entidad Mexicana de Acreditación (CENAM-EMA, 2008a) establece que el Límite de Detección es la concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas (NMX-CH-152-IMNC-2005).

Los resultados obtenidos de la determinación del Límite de Detección para cada uno de los metales estudiados fueron los siguientes: Na 0.048 ppm, K 0.052 ppm, Ca 0.050 y Mg 0.064 ppm. Los límites de detección obtenidos en este trabajo concuerdan con los Límites de Detección determinados para Ca (0.03 ppm) y Mg (0,03 ppm) en suero de pacientes con falla renal crónica, obtenidos por Dlugaszek *et al.* (2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se consideran aceptables, ya que el Límite de Detección de los métodos colorimétricos es mucho más alto, ya que para Na es de 920 ppm , para K es de 80 ppm, en tanto que para Ca es de 3.7 ppm y para Mg es de 1.7 ppm. Como se puede apreciar, la diferencia en cuanto a los Límites de Detección para el método de EAA, es enorme si se compara contra los métodos colorimétricos (Randox, 1993; SPINREACT, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d). Los datos obtenidos para determinar el Límite de Detección se presentan en el Anexo E (Anexo e1).

Tabla 16.- Determinación de la Linealidad en base al estadístico F* ($\alpha = 0.05$).

Metal	F Tablas	F Calculada	Criterio
Na	4.747	0.48676155	Se acepta la linealidad
K	4.747	0.03039482	Se acepta la linealidad
Ca	4.747	0.27281471	Se acepta la linealidad
Mg	4.747	0.62759057	Se acepta la linealidad

(*) = Concentración de estándar a 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00 ppm para Na y Mg, contra los valores de absorbancia y de 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 y 10.00 ppm para K y Ca contra los valores de absorbancia, por triplicado cada una de las determinaciones.

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis es que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que los métodos de análisis clásicos. Esta ventaja permite apreciar la importancia de las concentraciones en el nivel traza en muchos materiales, por ejemplo en muestras biológicas y del medio ambiente, contribuyendo así al desarrollo de muchas otras técnicas en las cuales los Límites de Detección bajos son el mejor criterio para aplicarlas con éxito (Miller y Miller, 1993).

4.5 Determinación de la Exactitud a Partir de un Estándar de Referencia Certificado.

La Entidad Mexicana de Acreditación (CENAM-EMA, 2008b), señala que un material de referencia certificado (MRC) es un material de referencia acompañado de un certificado cuyo(s) valor(es) de la(s) propiedad(es) es(son) certificado(s) por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual los valores de propiedad son expresados y para la cual cada valor certificado está acompañado de una incertidumbre a un nivel de confiabilidad indicado (NMX-CH-152-IMNC-2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestran en la Tabla 17. Como se puede apreciar, la concentración obtenida para cada metal se encuentra dentro del rango especificado en el estándar certificado; en tanto que el porcentaje de recuperación con respecto al promedio del estándar certificado es aceptable, ya que para Na fue de 98.08, para K fue de 99.66, para Ca fue de 102.66 y para Mg fue de 97.87. Al respecto, es importante señalar que para la IUPAC (1999) el valor aceptable del porcentaje de recuperación es de $100 \pm 15\%$, lo cual significa un rango de 85 a 115%. Los datos originales para determinar la concentración de Na, K, Ca y Mg a partir de un estándar certificado, se muestran en el Anexo F (Anexo f1, f2, f3 y f4).

Tabla 17.- Concentración para Na, K, Ca y Mg en ppm, obtenida a partir de un estándar de referencia certificado (SRM NIST 2670a), incluyendo el porcentaje de recuperación de cada metal.

Metal	Valor Obtenido (ppm)	Valor del Estándar Certificado (ppm)	Porcentaje de Recuperación
	Promedio* \pm DE**	Promedio* \pm DE** (Rango)	
Na	924 \pm 8.94	942 \pm 20 (922 – 962)	98.08
K	413.6 \pm 7.56	415 \pm 10 (405 – 425)	99.66
Ca	30.8 \pm 0.85	30 \pm 2 (28 – 32)	102.66
Mg	20.75 \pm 0.83	21.2 \pm 0.2 (21.0 – 21.4)	97.87

(*) = Promedio obtenido a partir de cinco réplicas de trabajo para cada metal.

(**) = Desviación Estándar.

4.6 Estimación de la Incertidumbre Estándar en las Mediciones.

De acuerdo a la Guía Técnica de la Entidad Mexicana de Acreditación, A. C. (CENAM-EMA, 2008b), la incertidumbre de una medición se define como el “parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando”. En el diccionario se refiere a la incertidumbre como la duda que existe, en éste caso a una medida realizada. Para la medición de la concentración de masa del elemento químico se establece el siguiente modelo matemático:

$$Y_{x(i)} = Y_{(x-B)} * fd_1 * fd_2 * f_c \quad (36)$$

Donde:

$Y_{x(i)}$ = Concentración de masa del mesurando obtenida por un método de medición

$Y_{(x-B)}$ = Concentración de masa obtenida a través de la curva de calibración

fd_n = Factor de dilución aplicado a la muestra

f_c = Factor de corrección cuando el método lo indique

En el cálculo de la incertidumbre se identifican fuentes específicas, como las presentadas en el siguiente diagrama de Ishikawa, adaptado a las condiciones del presente trabajo (Figura 10). De acuerdo a la Guía Técnica de la EMA (CENAM-EMA, 2008b) las estimaciones de las fuentes de incertidumbre se calculan de la siguiente manera:

4.6.1 Concentración de masa del elemento medido en el instrumento a través de la curva de calibración Y_{x-B} :

4.6.1.1 a Respuesta del Instrumento. Para evaluar este parámetro se realizaron diluciones a partir de un estándar de referencia de 1000 ppm para cada metal. Ésta estimación se basa en la curva de calibración y consiste en despejar la concentración:

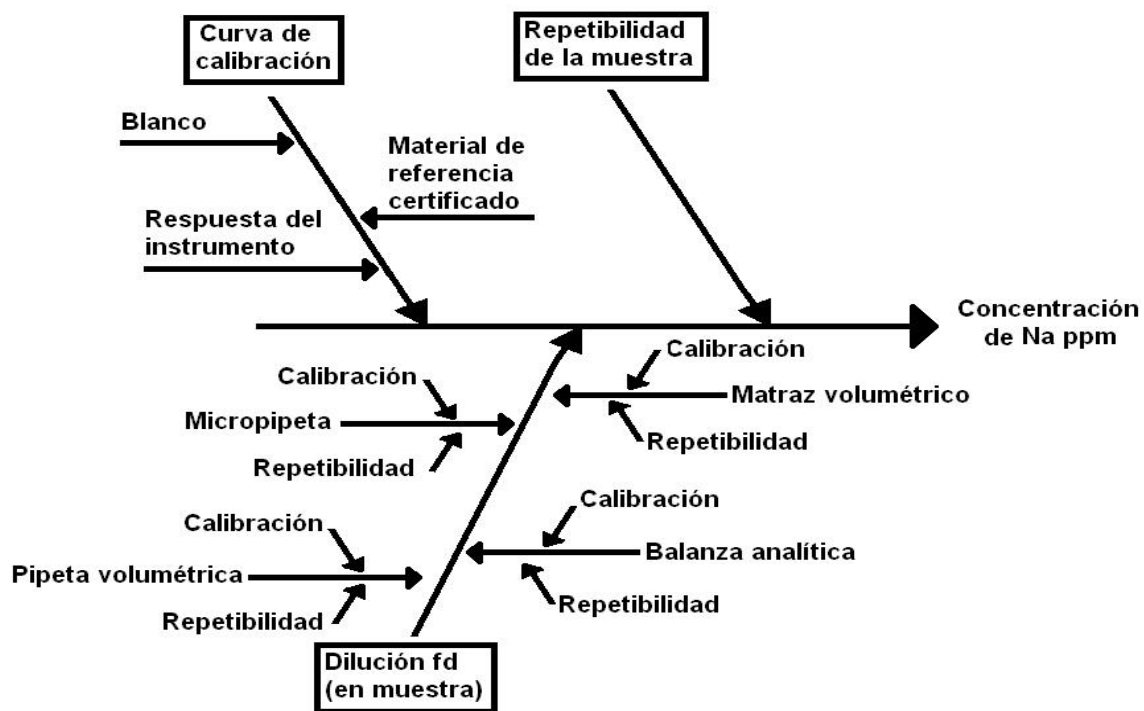


Figura 10.- Diagrama de Ishikawa (de causa–efecto) de acuerdo a las fuentes de incertidumbre del presente trabajo.

$$x = \frac{y - b_0}{b_1} \quad (37)$$

En términos de la concentración de masa se tiene:

$$Y_{(x)i} = \frac{\alpha - b_0}{b_1} \quad (38)$$

Donde:

$Y_{(x)i}$ = Concentración de masa resultado de la curva de calibración

α = Lectura observada del instrumento

b_0 = Ordenada al origen de la curva de calibración

b_1 = Pendiente de la curva de calibración

Los resultados obtenidos para la incertidumbre estándar de la concentración de masa a partir de las curvas de calibración se presentan en la Tabla 18. Para el cálculo de la incertidumbre estándar de la concentración de masa de los metales a partir de la respuesta del instrumento, los valores de concentración para Na, K, Ca y Mg se muestran en la Tabla 19.

Los resultados de la incertidumbre estándar para las concentraciones de masa individuales de Na, K, Ca y Mg en respuesta del instrumento calibrado, se presentan en la Tabla 20. Como se puede apreciar, los cuatro metales tienen resultados de incertidumbre similares. Esto se relaciona con el hecho de que las diluciones y las determinaciones fueron hechas por la misma persona y en condiciones similares. Esto es, en condiciones que generan consistencia y confiabilidad en el procedimiento y en los resultados obtenidos.

Tabla 18.- Cálculo de incertidumbre para la concentración de masa a partir de las curvas de calibración.

Metal	Curva de calibración: $y = b_0x + b_1$
Na	$y = 0.3687x - 0.0018$
K	$y = 0.1717x + 0.0039$
Ca	$y = 0.0443x + 0.0016$
Mg	$y = 0.4314x - 0.0002$

Tabla 19.- Parámetros utilizados para la estimación de la incertidumbre estándar para la concentración de masa de Na, K, Ca y Mg en respuesta del instrumento.

Concentración de Na (ppm)	Absorbancia	Concentración Estimada
0.25	0,092	0,230
0.50	0,188	0,527
1.00	0,354	1,040
2.00	0,742	2,240
4.00	1,472	4,498
Concentración de K (ppm)	Absorbancia	Concentración Estimada
0.50	0,086	0,646
1.00	0,18	1,408
2.00	0,35	2,785
5.00	0,858	6,902
10.0	1,723	13,912
Concentración de Ca (ppm)	Absorbancia	Concentración Estimada
0.05	0,02	0,426
1.00	0,05	0,985
2.00	0,09	1,910
5.00	0,22	4,705
10.0	0,45	9,523
Concentración de Mg (ppm)	Absorbancia	Concentración Estimada
0.25	0,107	0,185
0.50	0,23	0,486
1.00	0,41	0,927
2.00	0,87	2,052
4.00	1,725	4,144

Tabla 20.- Incertidumbre para concentración de masa individual para Na, K, Ca y Mg, en respuesta del instrumento calibrado.

Concentración de Na	Incertidumbre Estándar: $u_{(Yx)}$
0.5	0.02415
1	0.02335
2	0.02325
Concentración de K	Incertidumbre Estándar: $u_{(Yx)}$
1	0.02712
2	0.02567
5	0.02593
Concentración de Ca	Incertidumbre Estándar: $u_{(Yx)}$
1	0.02749
2	0.02553
5	0.02497
Concentración de Mg	Incertidumbre Estándar: $u_{(Yx)}$
0.5	0.02526
1	0.02203
2	0.02160

4.6.1.2 b Material de Referencia Certificado (NIST 2670a). Para ésta fuente de incertidumbre la Guía Técnica de la EMA (CENAM-EMA, 2008b) señala que se deben incluir los datos de incertidumbre obtenidos por el fabricante del estándar de referencia certificado. Estos datos se muestran en la Tabla 21. Para la construcción de la curva de calibración fue necesario realizar dos diluciones en cada uno de los puntos. La estimación de la incertidumbre donde se tiene un proceso de dilución involucra los siguientes elementos:

$$\frac{u_{Y_{dilMRCx}}}{Y_{dilMRCx}} = \sqrt{\left(\frac{u_{YMRC}}{Y_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{fd_n}}{fd_n}\right)^2} \quad (39)$$

Siguiendo la Guía Técnica de la EMA (CENAM-EMA, 2008b), a continuación se presenta el cálculo de la incertidumbre debida a los factores de dilución.

4.6.2 Estimación de la Incertidumbre Debida al Factor de Dilución.

El factor de dilución está dado por:

$$fd_n = \frac{V_2}{V_1} \quad (40)$$

Donde:

fd_n = Factor de dilución n

V_2 = Volumen de aforo

V_1 = Volumen de alícuota

Las fuentes de incertidumbre, según la Guía Técnica de la EMA (CENAM-EMA, 2008a) son dos: el volumen del aforo V_2 y el de la alícuota V_1 , de tal forma que la estimación de la incertidumbre relativa está dada por:

$$\frac{u_{fd_n}}{fd_n} = \sqrt{\left(\frac{u_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_2}}{V_2}\right)^2} \quad (41)$$

Tabla 21.- Datos de incertidumbre para el Material de Referencia Certificado (NIST 2670a).

Metal (Concentración \pm Incertidumbre estándar) ppm	$\frac{u_{YMRC}}{Y_{MRC}}$
Ca 30 \pm 2	0.066
Mg 21.2 \pm 0.2	0.009
K 415 \pm 10	0.024
Na 942 \pm 20	0.021

En cuanto a la estimación de la incertidumbre de la medición para el volumen de la alícuota V_1 y aforo V_2 en cualquier material volumétrico, se tienen tres principales fuentes de incertidumbre:

$$\frac{u_{V_n}}{V_n} = \sqrt{\left(\frac{u_R}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{\Delta T}}{V_n}\right)^2 + \left(\frac{u_{tol}}{V_n}\right)^2} \quad (42)$$

El efecto de la variabilidad o repetibilidad del volumen medido por el analista:

$$u_R = \frac{s_V}{\sqrt{n}} \quad (43)$$

El efecto de la variación de la temperatura en relación a la temperatura de calibración:

$$u_{\Delta T} = \frac{[(T - T_{20}) \cdot \alpha \cdot V]}{\sqrt{3}} \quad (44)$$

Donde:

- T = Temperatura del agua °C al momento de la medición
- T₂₀ = Temperatura de calibración del material volumétrico: 20°C
- α = Coeficiente de expansión del volumen de agua °C⁻¹
- V = Volumen de la pipeta o matraz

La tolerancia del material volumétrico:

$$u_{tol} = \frac{tol}{\sqrt{3}} \quad (45)$$

En el presente trabajo no se tiene información para estimar las componentes referentes a la temperatura y la tolerancia del material. Por lo tanto, las tres fuentes de incertidumbre que afectan la medición de volumen (repetibilidad del volumen, variación de temperatura y tolerancia del material volumétrico) se estiman de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{u_{V_n}}{V_n} = \sqrt{\left(\frac{u_R}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{\Delta T}}{V_n}\right)^2 + \left(\frac{u_{tol}}{V_n}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{u_R}{m}\right)^2} = \frac{u_R}{m} \quad (46)$$

En las Tablas 22 y 23 se muestran los resultados de la incertidumbre del material volumétrico, tanto para calibración como para repetibilidad. En todos los casos se puede observar una incertidumbre cercana a cero.

La estimación de la incertidumbre en los puntos en la curva de calibración se realiza de acuerdo a la siguiente la fórmula:

$$\frac{u_{fd_n}}{fd_n} = \sqrt{\left(\frac{u_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_2}}{V_2}\right)^2} \quad (47)$$

Es importante señalar que para estimar la incertidumbre en los diferentes puntos de la curva de calibración, se debe considerar como variables importantes a los factores de dilución y a la concentración del estándar de trabajo. En este sentido, los resultados obtenidos para la estimación de la incertidumbre estándar y relativa de la curva de calibración de Na, K, Ca y Mg que se muestran en la Tabla 24, sólo consideran el primer factor de dilución (5 mL aforados a 100 mL, con un $Fd = 20$). Por otro lado, los resultados obtenidos en la estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Na, considerando al segundo factor de dilución, se muestran en la Tabla 25.

En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos para la estimación de la incertidumbre estándar y relativa de la curva de calibración para K, considerando el segundo factor de dilución. Así mismo, en las Tablas 27 y 28 se observan los resultados para la estimación de la incertidumbre estándar y relativa para las curvas de calibración de Ca y Mg, respectivamente, considerando el segundo factor de dilución.

Tabla 22.- Incertidumbre estándar debida a la calibración del material volumétrico y equipo.

Volumen	Material o Equipo	S_{CALIBRACION}	U_{ESTANDAR CALIBRACION}	U_{RELATIVA CALIBRACION} $u_R = \frac{s_V}{\sqrt{n}}$	U_{ESTANDAR} $\frac{u_{V_n}}{V_n}$
0.25 mL	Micropipeta	0.00035	0.0001	0.0002	0.00008
0.50 mL	Micropipeta	0.0021	0.0003	0.0007	0.0014
1.00 mL	Micropipeta	0.0024	0.0004	0.0004	0.0004
1.00 mL	Pipeta Volumétrica	0.0052	0.0009	0.0009	0.0009
2.00 mL	Pipeta Volumétrica	0.0080	0.0014	0.0007	0.00035
5.00 mL	Pipeta Volumétrica	0.0154	0.0028	0.0005	0.0001
100 mL	Matraz Volumétrico	0.1894	0.0345	0.0003	0.000003
0.20 g	Balanza Analítica	0.0006	0.0001	0.0005	0.0025
0.50 g	Balanza Analítica	0.0001	0.00001	0.00003	0.00006
1.00 g	Balanza Analítica	0.0002	0.00003	0.00003	0.00003
100 g	Balanza Analítica	0.0004	0.00007	0.0000007	0.000000007

Tabla 23.- Incertidumbre estándar debida a la repetibilidad del material volumétrico y equipo.

Volumen	Material o Equipo	S_{REPETIBILIDAD}	U_{ESTANDAR REPETIBILIDAD}	U_{RELATIVA REPETIBILIDAD} $u_R = \frac{s_V}{\sqrt{n}}$	U_{ESTANDAR} $\frac{u_{V_n}}{V_n}$
0.25 mL	Micropipeta	0.0007	0.0002	0.0004	0.0016
0.50 mL	Micropipeta	0.0014	0.0004	0.0008	0.0016
1.00 mL	Micropipeta	0.0028	0.0008	0.0008	0.0008
1.00 mL	Pipeta Volumétrica	0.0091	0.0028	0.0028	0.0028
2.00 mL	Pipeta Volumétrica	0.0129	0.0040	0.0020	0.001
5.00 mL	Pipeta Volumétrica	0.0259	0.0082	0.0016	0.00032
100 mL	Matraz Volumétrico	0.2219	0.0701	0.0007	0.000007
0.20 g	Balanza Analítica	0.0011	0.0003	0.0018	0.009
0.50 g	Balanza Analítica	0.00008	0.00002	0.00005	0.0001
1.00 g	Balanza Analítica	0.0001	0.00003	0.00003	0.00003
100 g	Balanza Analítica	0.0001	0.00005	0.0000005	0.000000005

Tabla 24.- Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Na, K, Ca y Mg, debida al primer factor de dilución (20).

Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U _{ESTANDAR}	U _{RELATIVA}
V ₁	5	mL	100 ppm	0.0028	0.0005
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₁	20	----	----	0.00007	0.0007

Tabla 25.- Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Na, debida al segundo factor de dilución (400, 200, 100, 50 y 25).

Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U _{ESTANDAR}	U _{RELATIVA}
V ₁	0.25	mL	0.25 ppm	0.01725	0.00015
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	400	---	----	0.00002	0.00033
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U _{ESTANDAR}	U _{RELATIVA}
V ₁	0.5	mL	0.50 ppm	0.0003	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	200	---	----	0.00003	0.0007
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U _{ESTANDAR}	U _{RELATIVA}
V ₁	1	mL	1.00 ppm	0.0004	0.0004
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	100	---	----	0.00005	0.0005
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U _{ESTANDAR}	U _{RELATIVA}
V ₁	2	mL	2.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	50	---	----	0.00001	0.0007
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U _{ESTANDAR}	U _{RELATIVA}
V ₁	4	mL	4.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	25	---	----	0.00004	0.00103

Nota: Las cinco concentraciones representan los cinco puntos de la curva de calibración para Na.

Tabla 26.- Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de K debida al segundo factor de dilución (200, 100, 50, 20 y 10).

Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	0.50	mL	0.50 ppm	0.0003	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	200	---	----	0.00002	0.000761
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	1.00	mL	1.00 ppm	0.0004	0.0004
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	100	---	----	0.00003	0.0005
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	2.00	mL	2.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	50	---	----	0.00005	0.000761
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	5.00	mL	5.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	20	---	----	0.00001	0.000761
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	10.00	mL	10.00 ppm	0.0028	0.0005
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	10	---	----	0.00004	0.000768

Nota: Las cinco concentraciones representan los cinco puntos de la curva de calibración para K.

Tabla 27.- Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Ca debida al segundo factor de dilución (200, 100, 50, 20 y 10).

Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	0.50	mL	0.50 ppm	0.0003	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	200	---	----	-----	0.000761
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	1.00	mL	1.00 ppm	0.0004	0.0004
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
Fd ₂	100			0.00003	0.0005
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	2.00	mL	2.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
Fd ₂	50	---	----	0.00005	0.000761
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	5.00	mL	5.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
Fd ₂	20	---	----	0.00001	0.000761
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	10.00	mL	10.00 ppm	0.0028	0.0005
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
Fd ₂	10	----	----	0.00004	0.000768

Nota: Las cinco concentraciones representan los cinco puntos de la curva de calibración para Ca.

Tabla 28.- Estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la curva de calibración de Mg, debida al segundo factor de dilución (400, 200, 100, 50 y 25).

Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	0.25	mL	0.25 ppm	0.01725	0.00015
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	400	---	----	0.00002	0.00033
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	0.5	mL	0.50 ppm	0.0003	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	200	---	----	0.00003	0.0007
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	1.00	mL	1.00 ppm	0.0004	0.0004
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	100	---	----	0.00005	0.0005
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	2.00	mL	2.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	50	---	----	0.00001	0.0007
Magnitud	Volumen/fd	Unidades	Concentración	U_{ESTANDAR}	U_{RELATIVA}
V ₁	4.00	mL	4.00 ppm	0.0014	0.0007
V ₂	100	mL	----	0.0345	0.0003
<i>fd</i> ₂	25	---	----	0.00004	0.00103

Nota: Las cinco concentraciones representan los cinco puntos de la curva de calibración para Mg.

Como se puede apreciar, existen valores de incertidumbre cercanos a cero para el segundo factor de dilución. Esto significa que los valores de incertidumbre estándar y relativa relacionados con las curvas de calibración para los cuatro metales, tienen una incertidumbre muy baja y por lo tanto existe poca duda relacionada con las mediciones obtenidas para cada una de las curvas de calibración para los cuatro metales (Na, K, Ca y Mg). Los valores bajos de incertidumbre estándar y relativa obtenidos es posible que se deba a que éstos metales son relativamente fácil de analizarse por la técnica de espectroscopia de absorción atómica siempre y cuando se tomen las debidas precauciones como es la eliminación de las interferencias de tipo químico en el caso del Ca y Mg, y de ionización en el caso del Na y K.

Para la construcción de la curva de calibración donde se realizaron dos diluciones en cada punto, la estimación de la incertidumbre se obtiene utilizando la siguiente formula y los resultados se muestran en la Tabla 29.

$$\frac{u_{Y_{dilMRCx}}}{Y_{dilMRCx}} = \sqrt{\left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{fd_n}}{fd_n}\right)^2} \quad (48)$$

Como se puede apreciar en la Tabla 29, el K es el que presentó el valor más alto de incertidumbre con las dos diluciones. Una de las causas es debida al posible error que se presenta al realizar más de dos diluciones, específicamente para este metal que se ve más afectado con respecto a los demás.

4.6.3 Estimación de la Incertidumbre Estándar en Base al Valor del Blanco.

La incertidumbre estándar para éste componente se obtiene a partir de la siguiente formula y los resultados se observan en la Tabla 30.

$$u_{Y_B} = \frac{S_B}{\sqrt{n}} \quad (49)$$

Donde:

S_B = Desviación estándar de las lecturas

n = Número de lecturas del blanco

Tabla 29.- Cálculo de la incertidumbre para la curva de calibración con dos diluciones.

Metal	$\frac{u_{Y_{dilMRCx}}}{Y_{dilMRCx}}$
Na	0.0636
K	0.1914
Ca	0.0733
Mg	0.0814

Tabla 30.- Estimación de la incertidumbre estándar debida al valor del blanco.

Estándares	Metal	SBlanco	UEstandar
Individuales	Na	0.0248	0.0071
Mixtos	Na	0.0324	0.0083
Individuales	K	0.0302	0.0095
Mixtos	K	0.0298	0.0079
Individuales	Ca	0.0230	0.0057
Mixtos	Ca	0.0185	0.0046
Individuales	Mg	0.0263	0.0073
Mixtos	Mg	0.0318	0.0079

La estimación de la incertidumbre de la concentración de masa incluye tres elementos: la incertidumbre de la curva de calibración, la del blanco y la del material de referencia certificado. Ésta combinación se representa en la siguiente fórmula:

$$u_{Y(x-B)} = \sqrt{u_{Y(x)i}^2 + u_{YB}^2} \quad (50)$$

En la Tabla 31 se observan los resultados obtenidos para la incertidumbre combinando estos tres elementos de análisis.

4.6.4 Estimación de la Incertidumbre Estándar en Base a la Repetibilidad

De acuerdo a la Guía Técnica de la EMA (CENAM-EMA, 2008b), se debe de incluir la incertidumbre relacionada con la repetibilidad de las mediciones y ésta se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{u_{Y(x)i}}{Y(x)i} = \sqrt{\left(\frac{u_{Y(x-B)}}{Y(x-B)}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_1}}{fd_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd_2}}{fd_2}\right)^2 + (u_{REPETIBILIDAD})^2} \quad (51)$$

Los resultados para la incertidumbre estándar considerando la repetibilidad para cada uno de los metales se observan en la Tabla 32. De acuerdo a la Guía Técnica de la EMA (CENAM-EMA, 2008b), debido a que en todos los casos la fuente de información son las mediciones repetidas el tipo de análisis es A.

Tabla 31.- Estimación de la incertidumbre estándar para la concentración de masa para Na, K, Ca y Mg, combinando las mediciones de la curva de calibración, blanco y material de referencia certificado.

Metal	Incertidumbre Estándar u_{YB}	Incertidumbre Estándar $u_{Y(x)i}$	$u_{Y(x-B)}$
Na	0.0071		
0.5 ppm		0.02415	0.02517
1 ppm		0.02335	0.02440
2 ppm		0.02325	0.02430
K	0.0095		
1 ppm		0.02712	0.02873
2 ppm		0.02567	0.02737
5 ppm		0.02593	0.02761
Ca	0.0057		
1 ppm		0.02749	0.02807
2 ppm		0.02553	0.02615
5 ppm		0.02497	0.02561
Mg	0.0072		
0.5 ppm		0.02526	0.02626
1 ppm		0.02203	0.02317
2 ppm		0.02160	0.02276

Tabla 32.- Estimación de la incertidumbre estándar considerando la repetibilidad de cada metal.

Metal	Concentración (ppm)	Incertidumbre de la Repetibilidad
Na	0.5	0,00195
	1.0	0,00334
	2.0	0,00868
K	1.0	0,00256
	2.0	0,00295
	5.0	0,00650
Ca	1.0	0,00669
	2.0	0,00504
	5.0	0,00438
Mg	0.5	0,00229
	1.0	0,00216
	2.0	0,00232

Finalmente, en la Tabla 33 se muestran los resultados de la estimación completa de la incertidumbre estándar, considerando y combinando todas las fuentes de incertidumbre involucradas en éste proceso de medición, con un factor de cobertura ($\kappa = 2$) que representa un nivel de confiabilidad del 95%. A partir de la incertidumbre combinada (U_c) se calcula el porcentaje de la incertidumbre relativa (CENAM-EMA, 2004a). Bagnarelli (2008), considera que la incertidumbre relativa en los resultados del laboratorio clínico debe de ser menor al 3.5 % para que se consideren mediciones aceptables. Rivas y Fernández (2006), obtuvieron una incertidumbre relativa del 2% para la medición Zn por absorción atómica en un estándar de referencia certificado. Por otro lado, Pacheco y Gutiérrez (2006), obtuvieron una incertidumbre relativa de 4.5% para Mg en un estándar de referencia certificado y cuantificado en dos auto-analizadores. Como se puede apreciar, el resultado final de la estimación de la incertidumbre estándar combinada y de la incertidumbre relativa (%) es bajo, lo cual indica que el procedimiento de estandarización y validación utilizado para la determinación de estos metales es confiable. Los datos utilizados para estimar la incertidumbre se muestran en los Anexos A, B, C, D, E, F, G, H e I.

Tabla 33.- Estimación de la incertidumbre estándar considerando todas las fuentes involucradas*.

Metal	Incertidumbre Estándar Combinada ($C \pm U_c$)	Incertidumbre Relativa (%) (U_c/C) x 100**
Na	0.5 ± 0.01518	3.03
	1.0 ± 0.02467	2.46
	2.0 ± 0.01596	0.78
K	1.0 ± 0.02976	2.97
	2.0 ± 0.01498	0.75
	5.0 ± 0.00991	0.20
Ca	1.0 ± 0.02978	2.98
	2.0 ± 0.01459	0.73
	5.0 ± 0.00694	0.14
Mg	0.5 ± 0.01897	3.79
	1.0 ± 0.02792	2.80
	2.0 ± 0.01364	0.68

* = Concentración de masa, curvas de calibración, volumen, blanco, MRC, dilución, repetibilidad.

** C = Concentración (ppm), U_c = Incertidumbre combinada

4.7 Determinación de la Concentración de Na, K, Ca y Mg a Partir de Suero Sanguíneo Humano.

Con la finalidad de comprobar que el método de prueba está estandarizado y poder evaluar su aplicabilidad en muestras biológicas sanguíneas, se utilizó un compuesto (pool) de suero sanguíneo humano, el cual fue previamente sometido a digestión húmeda con ácido nítrico concentrado y peróxido de hidrógeno. A partir del compuesto se obtuvieron tres réplicas y cada una de ellas fue diluida con agua deionizada y la determinación de la concentración de cada uno de los metales se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 34. Los resultados originales de las determinaciones de Na, K, Ca y Mg junto con sus factores de dilución, se observan en el Anexo G (g1, g2, g3 y g4).

Como se puede apreciar, los resultados obtenidos caen dentro del rango de los valores de referencia reportado por la literatura para cada uno de los metales evaluados. Cabe señalar que estos valores de referencia se consideran como valores “normales” y se obtienen a partir de métodos colorimétricos. Los resultados obtenidos para Na, K, Ca y Mg sérico, coinciden con los resultados reportados por Díaz-Romero *et al.* (2002) para una población española, y en donde el análisis de metales en suero se realizó mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA). Así mismo, los resultados obtenidos para Ca y Mg también coinciden con lo reportado por Acosta-García *et al.* (2009) en un estudio realizado en una población de Venezuela. En tanto que Villarino *et al.* (2003) encontraron resultados similares a los obtenidos en este estudio, para Ca y Mg cuantificados mediante EAA, para una población de ancianos en León, España. Lo importante de estas determinaciones son los estados patológicos, donde los valores se encuentran por debajo de lo normal y que los métodos colorimétricos tienen un alto límite de detección, comparado contra el método de EAA que tienen un bajo límite de detección.

Es importante señalar que los protocolos de SPINREACT (2004a, b, c, d) para la cuantificación de metales en suero sanguíneo, mediante métodos colorimétricos, sólo consideran un rango de valores de referencia amplio y en ellos se incluyen hombres,

mujeres, niños y/o ancianos, es decir, no importa la edad ni el sexo del paciente. En dichos protocolos se señala que los valores de referencia son orientativos y que es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En cambio, los protocolos de Randox (1999), si establecen rangos de estos valores por edad y sexo. Sí se analizan los valores de referencia, se puede apreciar que no hay diferencias, al menos para Na, K, Ca y Mg.

Tabla 34.- Concentración obtenida para Na, K, Ca y Mg en ppm a partir de suero sanguíneo humano.

Metal	Valor Obtenido (ppm)*	Valor de Referencia (ppm)**
Na	3422 \pm 120 (3302 – 3542)	3130 – 3360
K	175 \pm 7 (168 – 182)	137 – 199
Ca	96 \pm 14 (82 – 110)	82 – 102
Mg	20 \pm 0 (20)	17 – 27

(*) = Promedio obtenido a partir de tres réplicas y cada una obtenida por triplicado, para un total de nueve muestras.

(**) = Valor de referencia por métodos colorimétricos (Randox, 1993; SPINREACT, 2004a, b ,c, d)

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El método para la determinación de Na, K, Ca y Mg mediante Espectroscopía de Absorción Atómica por flama, fue estandarizado adecuadamente en condiciones ideales a partir de estándares de alta pureza.

El proceso de estandarización del método propuesto se considera satisfactorio a partir de los resultados obtenidos mediante la utilización de parámetros de calidad como Exactitud, Precisión (Repetibilidad), Linealidad, Límite de Detección e Incertidumbre, de acuerdo a la Entidad Mexicana de Acreditación.

La validación de la metodología propuesta se demostró y comprobó utilizando un estándar de referencia certificado de orina (NIST 2670a), en tanto que la funcionalidad del método se corroboró con un compuesto de suero sanguíneo humano, con resultados confiables y aceptables.

La confiabilidad de los resultados obtenidos mediante parámetros estadísticos de calidad fue aceptable. Por lo tanto esta metodología se considera útil para la determinación de Na, K, Ca y Mg en suero sanguíneo humano y se podría utilizar como referencia en laboratorios de Análisis Clínicos.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda que la metodología de estandarización y validación obtenida en la presente investigación pueda ser considerada por las instancias correspondientes, y pueda ser utilizada en laboratorios clínicos en áreas de servicio o investigación, específicamente para metales Ca, Mg, Na, K en suero sanguíneo humano.

Evaluar otros parámetros estadísticos como robustez, gráficos de control, límite de cuantificación, entre otros.

Corroborar los resultados del método evaluado, utilizando un estándar de referencia certificado de suero sanguíneo humano.

Elaborar por escrito un protocolo de validación que incluya equipo utilizado, criterios de aceptación, verificación del método, reporte de validación, programa de validación del método normalizado, entre otros.

Continuar realizando proyectos de investigación en el área de química clínica en la estandarización y validación de metodologías para cuantificar otros metales de interés toxicológico, como Pb, Cd, Cr, Al, entre otros, específicamente en suero sanguíneo humano.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-García, E., Páez, M.C., Barón, M.A., Velásquez, E., Solano, L. (2009). Valores de Referencia de Calcio, Magnesio y Cobre en Niños en Edad Escolar de Valencia, Venezuela. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* vol. 43(4):619-623.
- Alexander, R.T., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2008). Molecular Determinants of Magnesium Homeostasis: Insights From Human Disease. *J Am Soc Nephrol.* vol. 19:1451-1458.
- Alfaro-Martínez, J.J., Botella-Romero, F., Lamas-Olivera, C., Hernández-López, A. (2009). Severe Hypocalcemia Secondary to Hypomagnesaemia, Successfully Treated by Self-Administered Subcutaneous Magnesium. *Nutr Hosp.* vol. 24(3): 354-356.
- Alvarado, V.P., Peñaloza, L.R. (2006). Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de Diferentes Métodos para el Análisis de Sodio y Potasio en Suero Humano. *Cuadernos del Hospital de Clínicas.* vol. 51(1):19-26.
- Álvarez, M., Cañizares, M.E., Curbelo, A., González, B., Rivero, Y., Thomas, A. (2003). Validación de un Procedimiento Analítico para la Determinación de Metales Alcalinos y Alcalino-Térreos en Suero de Ratones. *Revista de Toxicología en Línea.* pp 1-11. Cuba.
- Angel, M., Angel, R. (2000). Interpretación Clínica del Laboratorio. Sexta edición. Ed. Panamericana. pp. 172-173. Colombia.
- Assadi, F. (2010). Hypomagnesemia. *Iranian Journal of Kidney Disease.* vol. 4(1):13-19.
- Bagnarelli, A.E. (2008). Incertidumbre en los Resultados de Laboratorio Clínico. *Bioquímica y Patología Clínica.* vol. 72(1):11-16.
- Barret, W.J., Barreto, S.R.G., Ruiz, L.D., Ishikawa, D.N., Scarminio, I.S. (2005). Simultaneous Spectrophotometry Determination of Hg^{2+} , Pb^{2+} , and Cu^{2+} by Zn (dmit) Using the Multivariate Calibration Method. *Analytical Science.* vol. 21:549-552.
- Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (2007). Química Clínica. Principios, Procedimientos y Correlaciones. Quinta edición. Ed. McGraw-Hill. pp. 314-363. México, D.F.
- Biswas, M., Davies, J.S. (2007). Hyponatraemia in Clinical Practice. *Postgrad Med J.* vol. 83: 373-378.

- Blair, R.C., Taylor, R.A. (2008). Bioestadística. Primera edición. Ed. Pearson Prentice Hall. México, D.F.
- Canalías, R. F. (2003). Recomendaciones para el Estudio de la Precisión de los Procedimientos de Medida en el Laboratorio Clínico. *Química Clínica*. vol. 22(2):63-65.
- Carrillo-López, N., Fernández-Martín, J.L., Cannata-Andia, J.B. (2009). Papel del Calcio, Calcitriol y sus Receptores en la Regulación de la Paratiroides. *Nefrología*. vol. 29(2):103-108.
- CENAM. (2004a). Guía para Estimar la Incertidumbre de la Medición. México, D.F.
- CENAM-EMA. (2004b). Guía Genérica para la Elaboración de Guías Técnicas para Mediciones Analíticas. pp. 20-21. México.
- CENAM-EMA. (2008a). Guía para la Validación y la Verificación de los Procedimientos de Examen Cuantitativos Empleados por el Laboratorio Clínico. pp. 7. México.
- CENAM-EMA. (2008b). Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que Emplean las Técnicas de Espectrofotometría de Absorción Atómica y de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente. pp. 21. México.
- CENAM-EMA. (2009). Guía de Trazabilidad Metrológica de los Valores Asignados a los Calibradores y Material de Control Empleados por el Laboratorio Clínico. pp. 7-12. México.
- Christian, G.D. (2009). Química Analítica. Sexta edición. Ed McGraw Hill. pp. 65-113. México.
- Coy, G.A. (1999). Protocolo. Estandarización de Métodos Analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. pp. 3-10. Bogotá, Colombia.
- Díaz-Romero, C., Henríquez-Sánchez, P., López-Blanco, F., Rodríguez-Rodríguez, E., Serra-Majem, Ll. (2002). Concentraciones de Na, K, Ca y P en Sueros de una Muestra Representativa de la Población Canaria. *Nutr. Hosp.* XVII vol. (4):204-212.
- Długaszek, M., Szopa, M., Rzeszotarsky, J., Karkowiak, P. (2008). Magnesium, Calcium and Trace Elements Distribution in Serum, Erythrocytes, and Hair of Patients with Chronic Renal Failure. *Magnesium Research*. vol. 21(2):109-117.

- Du Plooy, W.J., Hay, L., Kahler, C.P., Schutte, P.J., Brandt, H.D. (1994). The Dose-Related Hyper-and-Hypokalemic Effects of Salbutamol and its Arrhythmogenic Potential. *Br. J. Pharmacol.* vol. 111:73-76.
- Frankenberg, B., Hospadaruk, V., Neufeld, A.H. (1951). Flame Spectrophotometry. Clinical and Laboratory Notes. *Canad. M.A.J.* vol. 65:388-389.
- Frech, W., Cedergren, A., Vessman, J. (1982). Evaluation of Some Critical factors Affecting Determination of Aluminum in Blood, Plasma, or Serum by Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy. *Clin. Chem.* vol. 28(11):2259-2263.
- Ghasemi A., Zahediasl, S. (2012). Reference Values for Serum Zinc Concentration and Prevalence of Zinc Deficiency in Adult Iranian Subjets. *Biol. Trace Elem. Res.* DOI 10.1007/s12011-012-9445-2. Online.
- Gómez-Álvarez, A. (2004). Manual de Métodos Analíticos para Rocas y Minerales. pp. 21- 25. Editorial Universidad de Sonora.
- Gómez-Álvarez, A. (2008). Estudio de Caracterización y Biodisponibilidad de Metales Pesados (Agua y Sedimento) del Río San Pedro, Localizado en una Región Semi-Árida del Noroeste de México. pp. 199. Proyecto de Tesis Doctoral. Programa de Doctorado en Ciencias e Ingeniería. Convenio entre la Universidad de Sonora y la Universidad Autónoma de Baja California.
- Goodman-Gilman, A., Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinof, P.B., Ruddon, R.W. (1996). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Octava edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 962-983. México.
- Gozdzik, J., Cofta, S., Piorunek, T., Batura-Gabryel, H., Kosickf, J. (2008). Relationship Between Nutritional Status and Pulmonary Function in Adult Cystic Fibrosis Patients. *J. of Phys. And Phar.* vol. 59 (6): 253-260.
- Greenlee, M., Wingo, Ch.S., McDonough, A.A., Young, J.H., Bruce, B.C. (2009). Narrative Review: Evolving Concepts in Potassium Homeostasis and Hypokalemia. *Annals of Internal Medicine.* vol. 150(9): 619-626.
- Gross, P. (2008). Treatment of Hyponatremia. *Int Med.* vol. 47: 885-891.
- Harvey, D. (2002). Química Analítica. Cuarta edición. Ed. McGraw Hill. pp 30-33. México.
- Henry, J.B. (1997). Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. Novena edición. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. pp. 132-133. España.

- Higson, S.P.J. (2007). *Química Analítica*. Primera edición. Ed. McGraw-Hill. pp. 179-206. México, D.F.
- Hoeskstra, M., Vogelzang, M., Drost, J.T., Janse, M., Loef, B.G., van der Horst, I.C.C., Zijlstra, F., Nijsten, M.W.N. (2010). Implementation and Evaluation of a Nurse-Centered Computerized Potassium Regulation Protocol in the Intensive Care Unit-a Before and After Analysis. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. vol. 10(5): 1-10.
- Hong-Long, J., Hong-Guang, N. (2008). Electrolyte and Fluid Transport in Mesothelial Cells. *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* vol. 1:1-7.
- Hou-Chuan, W., P. Hsien-wen, K. Mao-sung. (2001). Determination of Beryllium and Selenium in Human Urine and of Selenium in Human Serum by Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. *Analytical Science*. vol. 17:527-532.
- http://es.wikipedia.org/wiki/Diagrama_de_Ishikawa. Consultado el 26 de Agosto de 2012.
- IUPAC. (1999). Harmonized Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement, *Pure and Appl. Chem.* vol. 71:337-348.
- Kalita, J., Nair, P.P., Kumar, G., Misra, U.K. (2010). Renal Tubular Acidosis Presenting as Respiratory Paralysis: Report of a Case and Reviews of Literature. *Neurology Indians*. vol. 58: 1-6.
- Kateman, G., Pijers, F.W. (1981). *Quality Control in Analytical Chemistry*. A Wiley-Interscience Publication. pp 204. New York.
- Kraut, J.A., Madias, N.E. (2007). Serum Anion Gap: Its Uses and Limitations in Clinical Medicine. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* vol. 2:162-174.
- Krupp, M.A., Tierney, J.M., Jawetz, E.H., Roe, R.L., Camargo, C.A. (1996). *Diagnóstico Clínico y de Laboratorio*. Octava edición. Ed. El Manual Moderno. pp. 457.460. México.
- Kuipers, M.T., Thang, H.D., Arntzenius, A.B. (2009). Hypomagnesaemia Due to Use of Proton Pump Inhibitors- a Reviews. *The Journal of Medicine*. vol. 67(5):169-172.
- Levin, R.I. (1988). *Estadística para Administradores*. Segunda edición. Prentice Hill. pp. 476. México.

- Llamosa, R. L. E., Meza, C.L.G, Botero, A. M. (2007). Estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad Utilizando el Método de Promedios y Rangos para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados de Calibración de Acuerdo con la Norma Técnica NTC-ISO/IEC 17025. *Scientia et Technica*. vol. XIII, No. 035:455-460.
- Lorenz, J.M. (1997). Assessing Fluid and Electrolyte Status in the Newborn. *Clinical Chemistry*. vol. 43(1):205-210.
- Luckey, A.E., Parsa, C.J. (2003). Fluid and Electrolytes in the Aged. *Arch Surg*. vol. 138:1055-1060.
- Malaga, R.G.J., De Pino V.D.M., Cieza, Z.J. (2006). Efecto de la Fluido Terapia Endovenosa en los Electrolitos y Gases Arteriales de Pacientes Ancianos Hospitalizados. Estudio Comparativo: Solución Hartmann y Solución Salina Hipotónica. *Rev. Med. Hered*. vol. 17 (4):189-195.
- Manage. (2009). Diagrama Causa-Efecto. 12 Manage The Executive Fast Track. http://www.12manage.com/methods_ishikawa_cause_effect_diagram_es.html
Consultado: Agosto 29, 2012.
- Marrero-Rodríguez, R.M., Escalona, O., Pérez, P. (2002). Valores de Referencia de Electrolitos en el Sudor de una Población Infantil del Hospital Pediátrico Docente “Juan Manuel Márquez”. *UNIV DIAG*. vol. 2(2):7-10.
- Miller, J.C., Miller, J.N. (1993). Estadística para Química Analítica. Segunda edición. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. pp. 100. México, D.F.
- Miller, J.N., Miller, J.C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Cuarta edición. Ed. Pearson Prentice Hall. pp. 21-41. España.
- Mirsamadi, M., Nourmohammadi, I., Imamian, M. (2004). Comparative Study of Serum and K⁺ Levels in Senile Cataract Patients and Normal Individual. *Int. J. Med. Sci*. vol. 1(3):165-169.
- Modi, N. (2007). Avoiding Hypernatraemic Dehydration in Healthy Term Infants. *Arch Dis Child*. vol. 92:474-475.
- Moe, S.M. (2008). Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. *Prim Care*. vol. 35(2):215-233.
- Monnens, L., Starremans, P., Bindels, R. (2000). Great Strides in the Understanding of Renal Magnesium and Calcium Reabsorption. *Nephrol Dial Transplant*. vol. 15:568-571.

- Montgomery, D. C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*. Fiveth edition. Ed. John Wiley and Sons, INC. EUA.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2001). *Bioquímica de Harper*. Quinceava edición. Editorial El Manual Moderno. pp. 17-28. México, D.F.
- Nakahara, T. (2005). Development of Gas-Phase Sample-Introduction Techniques for Analytical Atomic Spectrometry. *Analytical Sciences*. vol. 21:477-484.
- Negri, A.L. (2008). Trastornos Hereditarios del Magnesio Revelan Nuevas Proteínas Comprometidas en su Transporte Renal. *Nefrología*. vol. 28(5):549-553.
- Nguyen, M.K., Kurtz, I. (2004). New Insights into the Pathophysiology of the Dysnatremias. *Am J Physiol Renal Physiol*. vol. 287:172-180.
- Norma Mexicana. (2001). NMX-AA-115-SCFI-2001. Análisis de Agua - Criterios Generales para el Control de la Calidad de Resultados Analíticos.
- Norma Mexicana. (2001). NMX-AA-051-SCFI-2001. Determinación de Metales por Absorción Atómica en Aguas Naturales, Potables, Residuales y Residuales Tratadas.
- Norma Mexicana. (2005). NMX-CH-152-IMNC-2005. Metrología en Química. Vocabulario.
- Pacheco, C.A.; Gutiérrez, M.M. (2006). Estimación de la Incertidumbre en la Determinación de Magnesio Sérico en Dos Autoanalizadores. *Simposio de Metrología*. Octubre de 2006. pp. 1-6. México, D.F.
- Pérez-Castorena, A., Guevara-Hernández, A. (2002). Cálculo de la Incertidumbre Asociada al Resultado de la Medición de Glucosa. *Bioquímica* vol. 27(2):32-40.
- Perkin Elmer. (1976). *Manual de Condiciones Estándar en Absorción Atómica. Modelo 3100*.
- Petenuzzo, M., Valenti, V.E., Abreu, L.C., Colombari, E., Fonseca, F.L.A., Sato, M.A. (2009). Vehicle Influence on Potassium Replacement Effectiveness in Hypokalemic Rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. vol. 24(3):367-372.
- Pizarro-Torres, D. (2004). Alteraciones Hidroelectrolíticas y Ácido-Base Más Frecuentes en el Paciente con Diarrea. *Bol Med Hosp Infant Mex*. vol. 62:57-68.
- Pruszkowska, E., Carnrick, G.R., Slavin, W. (1983). Direct Determination of Cadmium in Urine with Use of a Stabilized Temperature Platform and Zeeman Background Correction. *Clin. Chem*. vol. 29(3):477-480.

- Randox. (1993). Manual de Técnicas de Bioquímica Clínica. pp. 76-79. México.
- Reyes-Castañeda, P. (2004). Bioestadística Aplicada. Quinta reimpresión. Ed. Trillas. México, D.F.
- Reynolds, R.M., Padfield, P.L., Sechl, J.R. (2006). Disorders of Sodium Balance. *BMJ*. vol. 332:702-705.
- Rivas, H., Fernández, P. (2006). Estimación de Incertidumbre para Medición de Zn por Espectrofotometría de Absorción Atómica-Flama. *Simposio de Metrología*. Octubre de 2006. pp. 1-6. México, D.F.
- Rollerman, E.J., Hoorn, E.J., Zietse, R. (2008). Guilty as Charged: Unmeasured Urinary Anions in a Case of Pyroglutamic Acidosis. *The Journal of Medicine*. vol. 66(8):351-353
- Rouessac, F., Rouessac, A. (2003). Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. Primera edición. Ed. McGraw Hill. pp. 223-246. España.
- Schrier, R.W., Bansal, S. (2008). Diagnosis and Management of Hyponatremia in Acute Illness. *Curr Opin Crit Care*. vol. 14(6):627-634.
- Seamark, D., Backhouse, S., Barber, P., Hichens, J., Salzmann, M., Powell, R. (1999). Transport and Temperature Effects on Measurement of Serum and Plasma Potassium. *J R Soc Med*. vol. 92:339-341.
- Serrat-Orús, N., Gella Tomás, F.J., Alonso Nieva, N., Boned Juliani, B., Canalías Reverter, F., Izquierdo Álvarez, S., Lopez Martínez, R. (2011). Procedimiento Recomendado para el Estudio de la Linealidad de los Procedimientos de Medida en el Laboratorio Clínico. *Revista de Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. Documento Técnico. pp.2-5.
- Sevastos, N., Theodossiades, G., Archimandritis, A.J. (2008). Pseudohyperkalemia in Serum: A New Insight into an Old Phenomenon. *Clinical Medical and Research*. vol. 6(1):30-32.
- Siegel, S. (2005). Estadística No Paramétrica. Ed. Trillas. Segunda Edición. México, D.F.
- Skoog, D.A., Leary, J.J. (1994). Análisis Instrumental. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill. Apéndice I. México, D.F.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2001). Química Analítica. Séptima edición. Ed. McGraw-Hill. pp. 647. México, D.F.

- Slee, T.M., Vleming, L.J., Valentijn, R.M. (2008). Renal Failure Due to Acute Phosphate Nephropathy. *The Journal of Medicine*. vol. 66(10):438-441.
- Spiegel, M.R. (1973). Teoría y Problemas de Estadística. Serie de Compendios Schaun. pp. 188. Mcgraw-Hill. Colombia.
- SPINREACT. (2004a). Manual de Técnicas de Bioquímica Clínica. Determinación Cuantitativa de Sodio. Método Mg-Uranilacetato.
- SPINREACT. (2004b). Manual de Técnicas de Bioquímica Clínica. Determinación Cuantitativa de Calcio. Método Arsenazo III. Colorimétrico.
- SPINREACT. (2004c). Manual de Técnicas de Bioquímica Clínica. Determinación Cuantitativa de Potasio. Método TPB-Na.
- SPINREACT. (2004d). Manual de Técnicas de Bioquímica Clínica. Determinación Cuantitativa de Magnesio. Calmagita - EGTA. Colorimétrico.
- Stephan, Ch., Fournier, M., Prouseau, P., Sauvé, S. (2008). Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry as a Routine Method for the Quantification of Beryllium in Blood and Serum. *Chemical Central Journal*. vol. 2(14):1-8.
- Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F., Hernández, G. (2009). Validación de un Método para la Determinación de Magnesio Eritrocitario. *Avances en Química*. vol. 4(2):53-69.
- Tapia, H., Mora, C., Navarro, J.F. (2007). Magnesio en la Enfermedad Renal Crónica. *Nefrología*. vol. 27(6):674-680.
- Teruel, J.L., Fernández-Lucas, M., Rodríguez-Mendiola, N. (2009). Aporte de Calcio en la Insuficiencia Renal Crónica. *Nefrología*. Vol. 29(1):10-12.
- Thibodeau, G.A., Paton, K.T., Howard, K. (1998). Estructura y Función del Cuerpo Humano. Sexta edición. Ed. Elsevier. pp. 362. España.
- Tierney, J.M., McPhee, S.J., Papadakis, M.A. (2001). Diagnóstico Clínico. Trigésima sexta edición. Ed. El Manual Moderno. pp. 857-882. México.
- Tomza-Marciniak, A., Pilarczyk-Malgorrata, B., Ligocki, M., Gaik, M. ((2012). Lead, Cadmium and Others Metals in Serum of Pet Dogs from an Urban Area of NW Poland. *Biol. Trace Elem. Res.* DOI 10.1007/s12011-012-9433-6. Online
- Tresguerres, J.A.F. (1992). Fisiología Humana. Primera edición. Editorial McGrawHill-Interamericana.. pp. 354. Madrid, España.

- Van Loon, J.C. (1985). Selected Methods of Trace Metal Analysis: Biological and Environmental Samples. Ed John Wiley and Sons. pp. 169-227. New York.
- Villarino-Rodríguez, A., García-Linares, M.C., García-Fernández, M.C., García-Arias, M.T. (2003). Evaluación Dietética y Parámetros Bioquímicos de Minerales en un Colectivo de Ancianos de la Provincia de León (España). *Nutr. Hosp.* vol. XVIII(1):39-45.
- Wagner, C.A. (2007). Disorders of Renal Magnesium Handling Explain Renal Magnesium Transport. *J. Nephrol.* vol. 20:507-510.
- Yamane, T. (1979). Estadística. Primera edición. Editorial Harla. pp 224-225. México DF.
- Zhao, J., Gao, P., Wu, S., Zhu, D. (2009). Determination of Trace Lithium in Human Urine by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using Nitric Acid as a Chemical Modifier to Eliminate the Interference of Chloride. *Analytical Science.* vol. 25:639-643.

7. ANEXOS

ANEXO A.- Datos para análisis de Exactitud para un estándar individual.

Anexo a1.- Datos para análisis de Exactitud para estándar individual de sodio.

Réplica	Na 0.50 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	0.57	0.49	0.47	0.50	0.51	0.50
2	0.54	0.45	0.49	0.51	0.53	0.51
3	0.52	0.47	0.49	0.50	0.54	0.50
4	0.54	0.43	0.48	0.49	0.50	0.50
5	0.53	0.42	0.53	0.48	0.52	0.49
6	0.52	0.44	0.49	0.50	0.49	0.51
7	0.54	0.45	0.48	0.49	0.53	0.52
Réplica	Na 1.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	0.97	0.90	0.98	1.01	1.02	1.01
2	0.97	0.90	0.97	1.01	1.03	1.00
3	0.96	0.88	0.96	1.02	1.00	0.99
4	0.95	0.88	0.97	1.00	1.05	1.02
5	0.95	0.88	0.97	1.00	1.03	1.00
6	0.97	0.88	0.97	0.98	1.00	1.03
7	0.95	0.90	0.94	1.01	1.05	1.01
Réplica	Na 2.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	1.95	1.90	1.91	1.99	1.99	1.99
2	1.93	1.88	1.97	1.98	2.03	2.00
3	1.09	1.92	1.93	2.00	2.02	2.01
4	1.93	1.89	1.98	2.00	1.98	1.98
5	1.92	1.87	1.99	2.00	2.00	2.01
6	1.90	1.86	1.99	2.01	1.99	2.00
7	1.86	1.86	1.96	2.00	2.05	2.03

Anexo a2.- Datos para análisis de Exactitud para estándar individual de potasio.

Réplica	K 1.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	0.98	0.90	0.97	1.01	1.05	1.00
2	1.00	0.90	1.02	1.02	1.06	1.00
3	1.01	0.89	1.00	1.02	1.03	1.01
4	1.01	0.89	0.99	1.03	1.02	1.02
5	0.99	0.89	0.98	1.01	1.02	1.03
6	0.98	0.88	0.99	1.02	1.01	1.01
7	0.99	0.90	0.99	1.03	1.03	0.99
Réplica	K 2.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	2.00	1.88	2.01	1.99	1.99	1.99
2	1.95	1.83	2.00	1.98	1.98	2.01
3	1.95	1.88	1.99	2.00	2.01	1.98
4	2.00	1.87	2.02	2.00	2.00	1.99
5	2.00	1.85	1.98	1.99	2.00	2.00
6	1.99	1.89	2.00	2.02	1.99	2.01
7	1.95	1.84	2.01	2.03	2.02	2.00
Réplica	K 5.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	5.1	4.8	5.04	5.04	5.04	4.99
2	5.02	4.79	4.97	5.04	5.02	5.00
3	5.11	4.83	5.01	5.02	5.00	5.01
4	5.12	4.82	4.96	5.04	4.99	5.01
5	5.03	4.83	5.03	5.03	5.02	5.01
6	5.09	4.86	5.04	5.01	5.00	5.02
7	5.09	4.88	5.02	5.01	5.01	5.00

Anexo a3.- Datos para análisis de Exactitud para estándar individual de calcio.

Réplica	Ca 1.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	0.96	0.92	1.05	1.00	0.98	0.99
2	0.96	0.95	1.05	1.00	0.99	0.98
3	0.95	0.93	1.05	1.01	0.99	0.99
4	0.97	0.92	1.06	1.01	1.01	0.99
5	0.97	0.93	1.08	1.00	1.00	1.00
6	0.96	0.90	1.05	0.99	1.00	1.02
7	0.94	0.90	1.09	1.02	1.02	1.00
Réplica	Ca 2.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	1.96	1.95	2.05	2.03	2.02	2.00
2	1.95	1.92	2.03	2.03	2.03	2.01
3	1.95	1.98	2.06	2.03	2.02	1.99
4	1.92	1.92	2.03	2.04	2.00	1.98
5	1.95	1.92	2.04	2.02	2.01	2.01
6	1.97	1.95	2.04	2.02	2.00	2.01
7	1.92	1.95	2.06	2.02	2.05	2.00
Réplica	Ca 5.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	5.02	5.2.	4.98	4.98	5.05	4.99
2	5.01	5.2.	4.97	4.97	5.06	5.01
3	4.97	5.18	5.01	5.00	5.02	5.02
4	5.01	5.2.	4.96	5.00	5.01	4.98
5	5.06	5.22	4.94	5.01	5.02	5.02
6	4.99	5.23	4.99	5.02	5.03	5.00
7	5.02	5.21	4.97	4.96	5.01	4.97

Anexo a4.- Datos para análisis de Exactitud para estándar individual de magnesio.

Réplica	Mg 0.50 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	0.50	0.50	0.51	0.50	0.49	0.50
2	0.49	0.50	0.50	0.50	0.49	0.50
3	0.49	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
4	0.49	0.50	0.50	0.51	0.48	0.51
5	0.50	0.50	0.50	0.52	0.49	0.52
6	0.50	0.49	0.50	0.52	0.50	0.48
7	0.49	0.49	0.51	0.50	0.52	0.53
Réplica	Mg 1.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	1.00	1.00	1.01	1.00	1.02	1.00
2	0.99	0.99	1.02	1.00	1.00	1.01
3	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	1.02
4	1.00	1.00	1.01	1.01	1.00	1.00
5	0.99	1.00	1.01	1.01	1.02	1.00
6	0.99	0.99	1.00	1.02	1.02	0.99
7	1.01	1.00	1.01	1.02	1.01	0.99
Réplica	Mg 2.00 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	1.98	1.99	2.01	1.97	1.99	1.98
2	1.98	1.99	2.01	1.98	2.01	1.99
3	2.02	1.97	2.01	1.96	2.00	2.01
4	2.01	1.98	2.02	1.97	2.00	2.00
5	1.95	1.98	2.01	1.98	2.02	2.00
6	1.98	2.00	2.00	2.00	2.01	1.99
7	1.96	2.01	2.01	2.00	2.03	2.02

ANEXO B.- Datos para análisis de Exactitud para un estándar mixto.

Anexo b1.- Datos para análisis de Exactitud para estándar mixto (Na 500, K 25, Ca 25 y Mg 10 ppm).

Réplica	Na 500 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	500	500	570	510	500	510
2	520	500	530	500	510	480
3	520	510	530	520	490	490
4	520	480	540	500	520	480
5	530	510	550	490	510	500
Réplica	K 25 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	25.0	24.4	29.2	24.0	24.8	25.0
2	24.6	24.2	29.0	23.8	25.0	24.8
3	24.4	24.8	28.6	24.0	24.6	24.6
4	24.0	24.6	29.0	24.2	24.8	24.4
5	24.2	24.6	28.4	24.0	25.0	25.2
Réplica	Ca 25 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	25.0	25.0	23.8	24.8	24.6	25.2
2	25.2	25.2	22.8	24.6	24.8	25.0
3	25.2	24.8	23.8	25.0	24.6	25.0
4	25.0	24.6	22.8	25.0	25.2	24.6
5	24.6	25.6	23.2	25.2	25.0	24.8
Réplica	Mg 10 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	10.0	9.4	10.2	9.6	10.0	9.6
2	10.0	9.4	10.0	9.8	10.2	9.8
3	10.0	9.4	10.0	9.6	9.6	9.6
4	10.0	9.4	10.2	9.8	9.4	10.0
5	10.0	9.4	9.8	10.0	9.8	10.0

Anexo b2.- Datos para análisis de Exactitud para estándar mixto (Na 1000, K 50, Ca 50 y Mg 25 ppm).

Réplica	Na 1000 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	1090	980	1020	1000	1010	1010
2	1220	1000	1090	1010	1000	1010
3	1090	980	980	1020	1010	1010
4	1080	960	1020	1010	1000	1000
5	1060	970	1060	1000	1000	1010
Réplica	K 50 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	47.6	50.2	52	49.8	50.2	50.2
2	48	50.2	51.8	49.6	50.4	50.2
3	50.2	49.8	51.2	50	50	50
4	50	50.4	52	50	50.8	50.6
5	49.8	50	52.6	49.6	50.6	50.4
	49.12	50.12	51.92	49.8	50.4	50.28
Réplica	Ca 50 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	49.6	51	46.6	50.2	49.8	49.4
2	49.4	50.6	46.8	50.4	49.6	49.4
3	49.6	51.2	46.6	50.2	49.8	49.8
4	49.4	51.4	45.6	50.4	50.2	49.8
5	49	51.3	45.2	50.6	50.2	50.2
Réplica	Mg 25 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	24.8	23.8	25.8	24	25.6	24.6
2	24.8	24	25.8	24.2	25.2	24.4
3	24.6	24.2	25.8	24.4	25.4	24.6
4	25	24.2	25.6	23.8	25.2	24.8
5	24.8	24	25.4	23.8	25.8	24.8

Anexo b3.- Datos para análisis de Exactitud para estándar mixto (Na 2000, K 100, Ca 100 y Mg 50 ppm).

DATOS PARA ANÁLISIS DE EXACTITUD PARA ESTANDAR MIXTO						
Réplica	Na 2000 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	2090	2060	2040	2010	2000	2000
2	2060	2030	2100	2030	2010	2080
3	2070	2030	2100	2040	2000	2060
4	2050	2060	2100	2060	1990	2030
5	2040	2090	2080	2010	2020	2030
Réplica	K 100 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	102.8	104.2	114.6	100.4	100.4	100
2	102	105.6	111.2	100.8	100.4	100.2
3	102.2	104	112.4	100.4	100.4	100.6
4	103	103.6	110.6	100.8	100.2	100.8
5	103.6	106.4	110.4	101	100	101.2
Réplica	Ca 100 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	98.6	102.8	93.8	102.8	102	100.6
2	98.8	102.2	93.6	102.6	101.6	99.8
3	100.2	102.8	91.8	101.6	101.2	99.8
4	98.8	102.4	91.2	101.8	101.6	100.4
5	99.8	101.6	91.2	101.2	100.6	100.6
Réplica	Mg 50 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	48.4	48.8	50.6	49	50.2	51.2
2	49	48.6	51.8	48.8	50.4	50.2
3	48.8	47.8	51.8	49.4	50	50.4
4	48.2	48.4	51.6	48.6	50.2	50.2
5	48.6	48.6	51	49	50.2	50.4

Anexo b4.- Datos para análisis de Exactitud para estándar mixto (Na 4000, K 200, Ca 200 y Mg 100 ppm).

Réplica	Na 4000 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	4100	4100	4980	4010	4000	4010
2	4130	4070	4980	4060	4030	4020
3	4120	4100	4950	4030	4060	4000
4	4050	4160	4980	4020	4040	4030
5	4090	4120	4950	4020	4030	4020
Réplica	K 200 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	205.2	207.4	212.4	201.6	200.2	200.6
2	204.2	205.2	207	201.2	200.4	200.8
3	204.4	207.4	213	200.6	200.6	200.6
4	202.8	205.8	212	201.4	201.2	200.6
5	204.8	209.2	208.2	201.2	200.2	200.6
Réplica	Ca 200 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	204	203	183.2	203	200	200
2	204.6	202	183.6	202.2	199.8	200.6
3	204.4	203	183.6	202	199.6	201.2
4	205.2	202.4	183.6	201.8	200.2	201.4
5	204.6	205.2	183.2	201.6	200.6	200.4
Réplica	Mg 100 ppm					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	100.4	96.2	103.8	99.8	100.2	100.6
2	98.8	96.4	101.4	99.6	100.6	100.8
3	99.6	96	101.4	100.2	99.8	101.2
4	99.4	96.6	101.2	99.8	100.2	100.8
5	99.2	96.4	101.6	99.4	100	100.4

ANEXO C.- Datos para análisis de Repetibilidad para un estándar individual.

Anexo c1.- Datos para análisis de Repetibilidad para estándar individual de sodio.

	Na 0.50 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	0.52	0.50	0.50	0.51	0.50
2	0.50	0.49	0.51	0.50	0.51
3	0.50	0.50	0.50	0.49	0.50
4	0.50	0.49	0.49	0.52	0.50
	Na 1.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	0.97	0.98	1.00	1.02	1.01
2	1.00	1.00	1.01	1.03	1.00
3	0.97	0.98	1.00	1.00	0.99
4	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01
	Na 2.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	1.90	1.97	1.99	1.99	2.00
2	1.90	1.98	1.98	2.02	2.01
3	1.92	1.99	2.00	1.98	1.99
4	1.90	1.99	2.01	2.00	2.01

Anexo c2.- Datos para análisis de Repetibilidad para estándar individual de potasio.

	K 1.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	0.98	1.02	1.01	1.02	1.00
2	1.01	1.00	1.01	1.02	1.00
3	1.01	0.99	1.02	1.01	1.01
4	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99
	K 2.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	2.00	2.02	1.99	1.99	1.99
2	2.00	2.00	1.99	1.98	2.01
3	2.00	1.99	2.02	2.01	1.99
4	1.99	1.98	1.98	2.02	2.01
	K 5.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	5.02	5.01	5.02	5.00	4.99
2	5.03	5.03	5.01	4.99	5.00
3	5.09	5.02	5.00	5.01	5.01
4	5.09	4.97	5.00	5.02	5.02

Anexo c3.- Datos para análisis de Repetibilidad para estándar individual de calcio.

	Ca 1.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	0.96	1.05	1.00	0.98	0.99
2	0.97	1.05	1.00	0.99	0.98
3	0.97	1.05	1.01	1.00	1.00
4	0.96	1.05	1.02	1.02	1.02
	Ca 2.00 ppm				
Réplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	1.96	2.03	2.03	2.02	2.00
2	1.97	2.03	2.02	2.03	2.01
3	2.00	2.04	2.02	2.00	1.99
4	2.00	2.04	2.00	2.00	1.98
	Ca 5.00 ppm				
Ráplica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	5.01	4.98	4.98	5.02	4.99
2	5.01	4.97	4.97	5.01	5.01
3	4.99	5.01	5.00	5.03	4.98
4	4.97	4.97	5.01	5.01	4.97

Anexo c4.- Datos para análisis de Repetibilidad para estándar individual de magnesio.

	Mg 0.50 ppm				
Réplica	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
1	0.50	0.51	0.51	0.49	0.50
2	0.50	0.50	0.50	0.48	0.50
3	0.49	0.50	0.51	0.50	0.51
4	0.49	0.51	0.50	0.52	0.48
	Mg 1.00 ppm				
Réplica	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
1	1.00	1.01	1.01	1.02	1.00
2	0.99	0.99	1.01	1.00	1.01
3	1.00	1.01	1.02	1.00	0.99
4	0.99	1.00	1.00	1.01	0.99
	Mg 2.00 ppm				
Réplica	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
1	1.99	2.01	2.00	1.99	1.98
2	1.99	2.01	2.00	2.01	2.01
3	1.98	2.00	1.98	2.01	2.00
4	2.00	2.01	2.00	2.00	2.00

ANEXO D.- Datos para análisis de Repetibilidad para un estándar mixto.

Anexo d1.- Datos para análisis de Repetibilidad para estándar mixto (Na 500, K 25, Ca 50 y Mg 10 ppm).

Réplica	Na 500 ppm				
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	500	500	500	500	500
2	500	500	510	510	500
3	510	500	500	500	500
4	500	510	500	500	490
Réplica	K 25 ppm				
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	25	25	25	25	25
2	25	25	25	25	25
3	24.4	25	25	25	25
4	24.2	25	25	25	25
Réplica	Ca 25 ppm				
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	25	25	25	25	25
2	25	25	25	25	25
3	25	25	25	25	25
4	25	25	25	25	25
Réplica	Mg 10 ppm				
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
1	10	10	10	10	10
2	10	10	10	10	10
3	10	10	10	10	10
4	10	10	10	10	10

ANEXO E.- Datos para calcular la Linealidad y el Límite de Detección

Anexo e1.- Datos para calcular la Linealidad y el Límite de Detección para Na, K, Ca y Mg a diferentes concentraciones.

Réplica	[Std Na] ppm	A1	A2	A3
1	0.25	0.092	0.068	0.097
2	0.5	0.188	0.176	0.188
3	1	0.354	0.305	0.354
4	2	0.742	0.638	0.675
5	4	1.472	1.187	1.245
Réplica	[Std K] ppm	A1	A2	A3
1	0.5	0.086	0.048	0.063
2	1	0.180	0.116	0.110
3	2	0.350	0.220	0.210
4	5	0.858	0.512	0.450
5	10	1.723	1.129	0.889
Réplica	[Std Ca] ppm	A1	A2	A3
1	0.5	0.022	0.023	0.012
2	1	0.048	0.053	0.051
3	2	0.091	0.103	0.100
4	5	0.221	0.241	0.240
5	10	0.445	0.445	0.512
Réplica	[Std Mg] ppm	A1	A2	A3
1	0.25	0.107	0.138	0.121
2	0.5	0.230	0.286	0.230
3	1	0.410	0.539	0.420
4	2	0.870	0.900	0.700
5	4	1.725	1.777	1.520

ANEXO F.- Datos para calcular la concentración de los metales (ppm) a partir de suero sanguíneo humano.

Anexo f1.- Datos para calcular la concentración de Na en suero sanguíneo humano.

Compósito y Réplicas	Absorbancia para Na	Factor de Dilución	Resultado (ppm)
I1	1.7	2000	3400
I2	1.7	2000	3400
I3	1.7	2000	3400
II1	1.8	2000	3600
II2	1.7	2000	3400
II3	1.6	2000	3200
III1	1.7	2000	3400
III2	1.8	2000	3600
III3	1.7	2000	3400
		Promedio \pm DE*	3422 \pm 120

(*) = Desviación Estándar.

Anexo f2.- Datos para calcular la concentración de K en suero sanguíneo humano.

Compósito y Réplicas	Absorbancia para K	Factor de Dilución	Resultado (ppm)
I1	0.18	1000	180
I2	0.17	1000	170
I3	0.19	1000	190
II1	0.17	1000	170
II2	0.18	1000	180
II3	0.17	1000	170
III1	0.17	1000	170
III2	0.17	1000	170
III3	0.17	1000	170
		Promedio \pm DE	175 \pm 7

(*) = Desviación Estándar.

Anexo f3.- Datos para calcular la concentración de Ca en suero sanguíneo humano.

Compósito y	Absorbancia	Factor de	Resultado
--------------------	--------------------	------------------	------------------

Réplicas	para Ca	Dilución	(ppm)
I1	0.12	1000	120
I2	0.11	1000	110
I3	0.10	1000	100
II1	0.11	1000	110
II2	0.09	1000	90
II3	0.09	1000	90
III1	0.08	1000	80
III2	0.08	1000	80
III3	0.09	1000	90
		Promedio ± DE	96 ± 14

(*) = Desviación Estándar.

Anexo f4.- Datos para calcular la concentración de Mg en suero sanguíneo humano.

Compósito y Réplicas	Absorbancia para Mg	Factor de dilución	Resultado (ppm)
I1	0.02	1000	20
I2	0.02	1000	20
I3	0.02	1000	20
II1	0.02	1000	20
II2	0.02	1000	20
II3	0.02	1000	20
III1	0.02	1000	20
III2	0.02	1000	20
III3	0.02	1000	20
		Promedio ± DE	20 ± 0.0

(*) = Desviación Estándar.

ANEXO G.- Datos para calcular la concentración de los metales (ppm) a partir de un estándar certificado de orina NIST 2670a.

Anexo g1.- Datos para determinar la concentración de Na en un estándar certificado de orina NIST 2670^a

Metal	Réplica	Lectura	Factor de Dilución (5:100 + 2:100)	Resultado (ppm)	Recuperación %
Concentración de Na: 942 ± 20 ppm [922 - 962 ppm]	1	0.93	1000	930	98.72
	2	0.93	1000	930	98.72
	3	0.93	1000	930	98.72
	4	0.91	1000	910	96.60
	5	0.92	1000	920	97.66
					X = 924*

* Promedio

Anexo g2.- Datos para determinar la concentración de K en un estándar certificado de orina NIST 2670a.

Metal	Réplica	Lectura	Factor De Dilución (5:100 + 5:100)	Resultado (Ppm)	Recuperación %
Concentración de K: 415 ± 10 ppm [405 - 425]	1	1.04	400	416	100.24
	2	1.05	400	420	101.20
	3	1.05	400	420	101.20
	4	1.01	400	404	97.35
	5	1.02	400	408	98.31
					X = 413.6*

* Promedio

Anexo g3.- Datos para determinar la concentración de Ca en un estándar certificado de orina NIST 2670a.

Metal	Réplica	Lectura	Factor De Dilución (2:50)	Resultado (Ppm)	Recuperación %
Concentración de Ca: 30 ± 2 [28 - 32]	1	1.26	25	31.50	105.00
	2	1.25	25	31.25	104.16
	3	1.26	25	31.50	105.00
	4	1.19	25	29.75	99.16
	5	1.20	25	30.00	100.00
					X = 30.80*

* Promedio

Anexo g4.- Datos para determinar la concentración de Mg en un estándar certificado de orina NIST 2670a.

Metal	Réplica	Lectura	Factor De Dilución (2:50)	Resultado (Ppm)	Recuperación %
Concentración de Mg: 21.2 ± 0.2 [21.0—21.4]	1	0.86	25	21.50	101.41
	2	0.84	25	21.00	99.05
	3	0.86	25	21.50	101.41
	4	0.79	25	19.75	93.16
	5	0.80	25	20.00	94.34
					X = 20.75*

* Promedio

ANEXO H.- Datos para la calibración del material volumétrico mediante gravimetría y para calibración de balanza analítica.

Anexo h1.- Datos para la calibración de micropipetas, pipetas y matraz volumétrico.

Réplica 1	Micropipeta Automática		Pipetas Volumétrica			Matraz Volumétrico
	0.5 mL en g	1.0 mL en g	1.0 mL en g	2.0 mL en g	5.0 mL en g	100 mL en g
1	0.4950	0.9850	0.9823	1.9476	4.9857	99.7473
2	0.4930	0.9841	0.9921	1.9681	5.0139	99.2629
3	0.4940	0.9856	0.9897	1.9489	4.9764	99.2968
4	0.4965	0.9859	1.0138	1.9754	4.9775	99.3649
5	0.4940	0.9896	0.9987	1.9462	4.9844	99.4772
6	0.4935	0.9882	1.0007	1.9368	5.0280	99.375
7	0.4915	0.9877	0.9939	1.9671	4.9771	99.4223
8	0.4930	0.9908	1.0072	1.9407	5.0548	99.5879
9	0.4954	0.9921	1.0002	1.9490	5.0064	99.7886
10	0.4938	0.991	1.0044	1.9613	5.0032	99.8975
Réplica 2	0.5 mL en g	1.0 mL en g	1.0 mL en g	2.0 mL en g	5.0 mL en g	100 mL en g
1	0.4952	0.9916	0.9996	1.9518	4.9814	99.7612
2	0.4953	0.9918	0.9994	1.9601	4.9902	99.8116
3	0.4953	0.9916	0.9997	1.9546	4.9921	99.8214
4	0.4952	0.9917	1.0004	1.9523	4.9919	99.812
5	0.4953	0.9918	1.0012	1.9524	4.9876	99.8201
6	0.4954	0.9916	0.9996	1.9518	4.9881	99.8176
7	0.4954	0.9917	0.9991	1.9521	4.9912	99.8215
8	0.4954	0.9918	1.0016	1.9533	4.9902	99.8168
9	0.4953	0.9920	1.0018	1.9538	4.9879	99.8221
10	0.4953	0.9918	1.0020	1.9602	4.9901	99.8214
Réplica 3	0.5 mL en g	1.0 mL en g	1.0 mL en g	2.0 mL en g	5.0 mL en g	100 mL en g
1	0.4954	0.9920	0.9991	1.9614	4.9914	99.8214
2	0.4958	0.9922	0.9996	1.9586	4.9923	99.831
3	0.4961	0.9919	0.9997	1.9591	4.9996	99.8256
4	0.4959	0.9921	1.0012	1.9612	4.9891	99.8276
5	0.4976	0.9919	1.0019	1.9609	4.9914	99.8301
6	0.4912	0.9914	1.0019	1.9582	4.9916	99.8266
7	0.4891	0.9922	0.9998	1.9595	4.9918	99.8314
8	0.4992	0.9922	0.9997	1.9601	4.9896	99.8296
9	0.4991	0.9923	1.0004	1.9623	4.9921	99.8301
10	0.4990	0.9919	1.0003	1.9613	4.9919	99.8279

Anexo h2.- Datos para calibración de balanza analítica.

	Balanza Analítica
--	--------------------------

Réplica 1	0.2 g	0.5 g	1.0 g	100 g
1	0.1997	0.499	0.9978	99.9724
2	0.1996	0.4987	0.9978	99.9723

Primera Semana

3	0.1995	0.4989	0.9979	99.972
4	0.1996	0.4989	0.9978	99.9721
5	0.1995	0.4989	0.9977	99.972
6	0.1996	0.4989	0.9975	99.9721
7	0.1996	0.499	0.9977	99.9723
8	0.1997	0.4989	0.9977	99.9721
9	0.196	0.4989	0.9976	99.9719
10	0.1996	0.499	0.9978	99.972
Réplica 2	0.2 g	0.5 g	1.0 g	100 g
1	0.1998	0.499	0.9979	99.9726
2	0.1997	0.4991	0.9982	99.9726
3	0.1998	0.4992	0.9982	99.9725
4	0.1997	0.499	0.9983	99.9726
5	0.1997	0.4988	0.9981	99.9725
6	0.1998	0.499	0.998	99.9724
7	0.1996	0.4991	0.9981	99.9723
8	0.1997	0.4992	0.9982	99.9725
9	0.1998	0.499	0.9981	99.9725
10	0.1998	0.499	0.9981	99.9725
Réplica 3	0.2 g	0.5 g	1.0 g	100 g
1	0.1998	0.4991	0.9981	99.9728
2	0.1997	0.4993	0.9982	99.9731
3	0.1996	0.4992	0.9982	99.9728
4	0.1996	0.4993	0.9982	99.9731
5	0.1997	0.4992	0.9982	99.9732
6	0.1998	0.4993	0.9983	99.9731
7	0.1995	0.4992	0.9983	99.9731
8	0.1997	0.4991	0.9984	99.9733
9	0.1997	0.4991	0.9982	99.9734
10	0.1996	0.4991	0.9981	99.9733

ANEXO I.- Datos para estimar la repetibilidad en base al valor de los blancos.

Metal	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Na	0.08	0.1	0.11	0.06	0.08
K	0.07	0.1	0.06	0.07	0.06
Ca	0.04	0.06	0.07	0.06	0.05
Mg	0.07	0.08	0.06	0.07	0.08
Cuarta Semana					
Metal	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Na	0.06	0.02	0.08	0.06	0.06
K	0.08	0.14	0.08	0.07	0.08
Ca	0.05	0.04	0.07	0.07	0.07
Mg	0	0	0	0	0
Séptima Semana					
Metal	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Na	0.07	0.09	0.07	0.08	0.09
K	0.08	0.07	0.08	0.07	0.07
Ca	0.02	0.01	0	0	0
Mg	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
Décima Semana					
Metal	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Na	nd	nd	0.02	0.01	nd
K	nd	nd	nd	0.01	nd
Ca	0.03	0.04	0.02	0.03	0.02
Mg	nd	nd	0.03	0.03	nd
Décima Tercera Semana					
Metal	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Na	0.04	0.07	0.08	0.04	0.06
K	0.03	0.06	0.09	0.03	0.04
Ca	0.07	0.08	0.06	0.05	0.05
Mg	0.06	0.07	0.03	0.02	0.03
Décima Sexta Semana					
Metal	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Na	0.06	0.04	nd	0.03	0.04
K	nd	nd	0.03	0.01	0.02
Ca	0.06	0.04	0.06	0.05	0.03
Mg	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03