

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE  
MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

NOMBRE DEL ALUMNO: MORAN BAUTISTA QUINATZIN JOSÉ.

NÚMERO DE CUENTA: 09821652-5.

AÑO EN QUE TERMINA LA CARRERA: 2008-2.

ORIENTACIÓN: FARMACIA.

TÍTULO DEL PROYECTO: ADECUACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO SÉRICO, UTILIZANDO EDTA Y CALCEÍNA COMO INDICADOR.

LUGAR DONDE SE DESARROLLARÁ EL PROYECTO: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

OPCIÓN DE TITULACIÓN: EXPERIENCIA LABORAL.

NOMBRE DEL DIRECTOR: DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA.

---

# ÍNDICE.

|   | <b>Página.</b> |
|---|----------------|
| <b>1. Resumen.</b>                                | 4              |
| <b>2. Introducción.</b>                           | 5              |
| <b>3. Marco teórico.</b>                          | 8              |
| 3.1. Definición de calcio.                        | 8              |
| 3.2. Distribución del calcio.                     | 8              |
| 3.3. Calcio esquelético.                          | 8              |
| 3.4. Calcio sérico.                               | 9              |
| <b>4. Metabolismo del calcio.</b>                 | 9              |
| 4.1. Absorción de calcio.                         | 10             |
| 4.2. Calcio intracelular.                         | 11             |
| 4.3. Transporte de calcio.                        | 11             |
| 4.4. Excreción del calcio.                        | 13             |
| 4.5. Homeostasis del calcio.                      | 14             |
| 4.6. Funciones biológicas del calcio.             | 15             |
| 4.7. Mineralización del hueso.                    | 15             |
| 4.8. Coagulación sanguínea.                       | 16             |
| 4.9. Contracción muscular.                        | 16             |
| 4.10. Funciones nucleares.                        | 18             |
| 4.11. Funciones mitocondriales.                   | 19             |
| 4.12. Funciones en el cerebro.                    | 19             |
| 4.13. Exocitosis.                                 | 19             |
| <b>5. Trastornos del metabolismo del calcio.</b>  | 20             |
| 5.1.1. Hipercalcemia.                             | 20             |
| 5.1.2. Patogenia hipercalcemia.                   | 20             |
| 5.1.3. Manifestaciones clínicas de hipercalcemia. | 20             |
| 5.1.4. Tratamiento de hipercalcemia.              | 22             |
| 5.2.1 Hipocalcemia.                               | 22             |
| 5.2.2 Patogenia de hipocalcemia.                  | 22             |
| 5.2.3 Manifestaciones clínicas.                   | 23             |
| 5.2.4 Tratamiento de hipocalcemia.                | 23             |
| 5.3. Calcinososis.                                | 24             |
| 5.4. Osteoporosis.                                | 24             |
| 5.5. Raquitismo.                                  | 25             |
| 5.6. Urolitiasis.                                 | 25             |
| 5.7. Diagnóstico de calcio.                       | 25             |
| 5.8. EDTA   | 26             |
| <b>6. Validación.</b>                             | 27             |
| 6.1. Definición.                                  | 27             |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 6.2.       | Validación de métodos analíticos.                               | 27        |
| 6.3.       | Marco legal para realizar la validación de un método analítico. | 27        |
| 6.3.1.     | Especificidad.  | 29        |
| 6.3.2.     | Exactitud.  | 30        |
| 6.3.3.     | Precisión.  | 30        |
| 6.3.4.     | Repetibilidad.  | 30        |
| 6.3.5.     | Reproducibilidad.   | 30        |
| 6.3.6.     | Límite de detección.  | 31        |
| 6.3.7.     | Límite de cuantificación.                                       | 31        |
| 6.3.8.     | Linealidad.   | 31        |
| 6.3.9.     | Robustez.   | 31        |
| <b>7.</b>  | <b>Planteamiento del problema.</b>                              | <b>32</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Justificación.</b>   | <b>34</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Objetivos.</b>   | <b>35</b> |
| <b>10.</b> | <b>Hipótesis.</b>   | <b>36</b> |
| <b>11.</b> | <b>Diseño experimental.</b>                                     | <b>37</b> |
| <b>12.</b> | <b>Desarrollo.</b>  | <b>39</b> |
| 12.1.      | Validación.   | 39        |
| 12.1.1.    | Linealidad del sistema.   | 40        |
| 12.1.2.    | Linealidad del método.  | 40        |
| <b>13.</b> | <b>Resultados y discusión.</b>                                  | <b>41</b> |
| 13.1.      | Cálculos de pH.   | 41        |
| 13.2.      | Constante de formación $K'$ para calcio y EDTA.                 | 42        |
| 13.3.      | Elección del indicador de negro de eriocromo T                  | 43        |
| 13.4.      | Cálculo de la concentración del EDTA.                           | 44        |
| 13.5.      | Estandarización del EDTA 0.004 N.                               | 44        |
| 13.6.      | Validación del sistema.   | 45        |
| 13.6.1.    | Linealidad del sistema.   | 45        |
| 13.6.2.    | Precisión del sistema.  | 46        |
| 13.7.      | Validación del método.  | 47        |
| 13.7.1.    | Linealidad del método   | 47        |
| 13.7.2.    | Precisión del método.   | 48        |
| 13.8.      | Exactitud y repetibilidad del método.                           | 48        |
| 13.9.      | Precisión intermedia (Reproducibilidad)                         | 50        |
| 13.10.     | Límite de cuantificación.                                       | 52        |
| 13.11.     | Límite de detección.  | 52        |
| <b>14.</b> | <b>Aplicabilidad del método.</b>                                | <b>54</b> |
| <b>15.</b> | <b>Conclusión.</b>  | <b>55</b> |
| <b>16.</b> | <b>Referencias.</b>   | <b>56</b> |

## **1. Resumen.**

La tendencia actual de implementar Sistemas de Gestión de Calidad en los laboratorios clínicos implica la gestión del proceso en su totalidad, incluyendo las fases preanalítica, analítica y postanalítica.

La fase analítica ha sido siempre la más controlada ya que en ésta se produce una gran parte de los errores del proceso.

Por este motivo, el propósito del presente trabajo es el de modificar un método analítico para la cuantificación de calcio sérico que se realiza dentro del Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual no cuenta con un registro de que este método haya sido validado. Debido a que esta implementado para técnica en microescala y el laboratorio no cuenta con el material adecuado.

Por lo que, al adecuar y modificar el método analítico actual, para su posterior validación, se transformara en un método más confiable, reproducible y repetible.

## 2. Introducción.

El análisis del calcio sérico representa un problema en muchos laboratorios, en parte debido a que las concentraciones de referencia de esta sustancia fluctúan en un intervalo muy estrecho (8.4-10.2 mg/dL), por lo que una pequeña variación en la concentración tiene significado clínico; por lo tanto es necesario utilizar métodos de alta precisión, exactitud y sensibilidad para su análisis.

Los procedimientos basados en absorción atómica muestran precisión y exactitud satisfactorias, por lo que son considerados métodos de referencia.

Sin embargo, estos no son de fácil acceso para la mayoría de los laboratorios, ya que la adquisición y el mantenimiento del equipo son costosos.

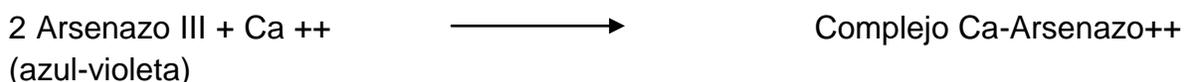
Existen actualmente otros métodos, los cuales son utilizados para la determinación de calcio tales como:

### **O-CRESOFTALEÍNA COMPLEXONA (Colorimétrico)**

El procedimiento se basa en la reacción del calcio con o-cresoftaleína complexona en solución alcalina para formar un compuesto de calcio y o-cresoftaleína, el cual se lee a una absorbancia a 575 nm contra un blanco de agua.

### **ARSENAZO III.**

Principio.



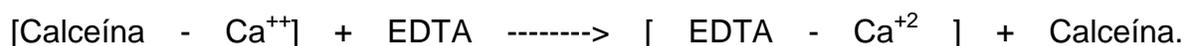
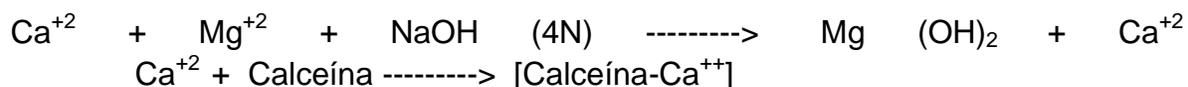
El Arsenazo III [ácido 2,2'-(1,8-dihidroxi-3,6-disulfonaftileno-2,7-bisazo) bisbenceno-arsónico] reacciona con el calcio en una solución ácida para formar un complejo azul-violeta. El color desarrollado tiene una absorbancia máxima a 650 nm y es proporcional a la concentración de calcio en la muestra.

### **COMPLEJOMETRICAS (FLUORESCENTE).**

En una titulación complejométrica, la reacción entre el analito y el titulante es la formación de un complejo, cuya constante de equilibrio,  $K_F$ , se llama constante de formación. Los ligandos quelantes (denominados polidentados debido a que se unen al ion metálico mediante más de un átomo donador), forman complejos más estables que los ligandos monodentados. Este efecto quelato se debe a que la

entropía de formación del complejo favorece más la unión con un ligando grande que con varios ligandos pequeños. Los valores de las constantes de formación de los complejos metálicos con los ácidos aminocarboxílicos polidentados sintéticos como el EDTA son grandes, por lo que estos últimos se utilizan ampliamente en química analítica.

En el análisis de calcio sérico la muestra es tratada con NaOH 0.4 N para obtener un pH aproximado de 12, esto para producir la precipitación del magnesio en forma de Mg(OH)<sub>2</sub>. Enseguida se agrega la calceína para formar un complejo de Calcio-Calceína para posteriormente titularlo con EDTA disódico.



### **CALCEINA.**

La calceína es un indicador muy utilizado en las reacciones complejométricas que también se le conoce como fluorexona, tiene una formula condensada de C<sub>30</sub> H<sub>26</sub> N<sub>2</sub> O<sub>13</sub>. Se utiliza para la titulación de iones calcio en el EDTA disódico, y para determinar fluorométricamente el calcio, incluso en la presencia de magnesio.

Calceína + Ca (medio alcalino) = complejo fluorescente.

Excitados a 490 nm, emisión a 925 y titulación a punto final con EDTA disódico.

### **ABSORCIÓN ATÓMICA**

Para la determinación de calcio y magnesio diluir el suero 1:50 con un diluyente 0,1% (w / v) de lantano (como cloruro).

La relación de dilución se puede ajustar para asegurar que las concentraciones entren dentro de un rango de absorbancia adecuado.

Una solución al 0,1% (w / v) de lantano (como cloro) debe ser utilizado como blanco.

Lámpara de Cátodo hueco. (422,7 nm)

Llama de aire acetileno

Estándar: Estróncio

Muestras diluidas con cloruro de lantano (reduce interferencias).

Actualmente, dentro del Instituto Mexicano del Seguro Social en el departamento de Unidad Metabólica, se cuenta con un método de análisis para la determinación de calcio sérico, por medio de una titulación con comparación de un estándar utilizando como indicador calceína. El cual tiene más de dos décadas de su implementación. Al estar trabajando directamente con el método se ha observado que lo descrito en el manual de procedimientos varía mucho con lo que en la realidad se hace en el laboratorio.

Investigando a fondo no se ha encontrado ninguna evidencia de que este método estuviese validado por lo cual los resultados obtenidos en el laboratorio no son confiables y mucho menos cuenta con una reproducibilidad, precisión y exactitud. Por tales motivos, existe la necesidad de modificar y validar este método.

Al realizar las adecuaciones y validando el método para la determinación de calcio con EDTA disódico y calceína como indicador, será posible obtener resultados confiables para la determinación de calcio sérico en el laboratorio de la Unidad Metabólica del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **3. MARCO TEÓRICO.**

#### **3.1. DEFINICION DE CALCIO.**

El calcio deriva del latín calsis, calx, es un metal alcalinotérreo, su número atómico es 20, su peso atómico es 40 g.

En su forma metálica es sólido inflamable, de color blanco, no se encuentra en su estado nativo, solo formando compuestos de gran interés industrial como el carbonato y sulfato de calcio.<sup>1</sup>

En nuestro organismo el calcio es el mineral y el catión más prevalente, siendo el cuarto componente después del agua, proteínas y grasas.

#### **3.2. DISTRIBUCIÓN DE CALCIO.**

El calcio en un individuo sano se encuentra, entre 1 kg – 1.3 kg del cual en un porcentaje del 99 % se localiza en el esqueleto en forma de hidroxapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$  y el 1 % restante está en el líquido extracelular y los tejidos blandos.

#### **3.3. CALCIO ESQUELÉTICO.**

Se denomina calcio esquelético, al calcio almacenado en los huesos, se encuentra bajo forma de hidroxapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ , una estructura cristalina que consiste en fosfato de calcio, encontrándose alrededor de una matriz orgánica de proteína colagenosa para proporcionar fuerza y rigidez, se distribuye en un espacio relativamente no intercambiable estable y en un espacio intercambiable, que participa en las actividades metabólicas.

El componente intercambiable se considera una reserva, que se acumula cuando la dieta proporciona una ingesta adecuada de calcio; se almacena principalmente en los extremos de los huesos largos y se moviliza para satisfacer el aumento de las necesidades de crecimiento, embarazo y de la lactancia.

En ausencia de una ingesta inadecuada, el calcio es sustraído de la reserva ósea.

Los mismos tipos de cristales se encuentran en el esmalte y la dentina de los dientes, sólo que allí existe poco intercambio de minerales y el calcio no está disponible con facilidad para los periodos de deficiencia.

### 3.4. CALCIO SÉRICO.

Es aquel que se encuentra en sangre y existe en tres formas distintas:

- a) **Libre o ionizado** Es la forma fisiológicamente activa y corresponde a un 50 % del calcio sérico.
- b) **Unido a aniones** Como el bicarbonato, lactato, fosfato o citrato, se encuentra aproximadamente en un 10 %.
- c) **Unido a proteínas plasmáticas** Principalmente a la albumina o globulinas en un 40 %.

Tanto el calcio ionizado como el unido a otras moléculas son dializables.<sup>2</sup>

### 4. METABOLISMO DEL CALCIO.

El metabolismo del calcio puede resumirse en la figura1, en la que estan esquematizados los proceso más importantes.

GI: Gastrointestinales.

LEC: liquido extracelular.

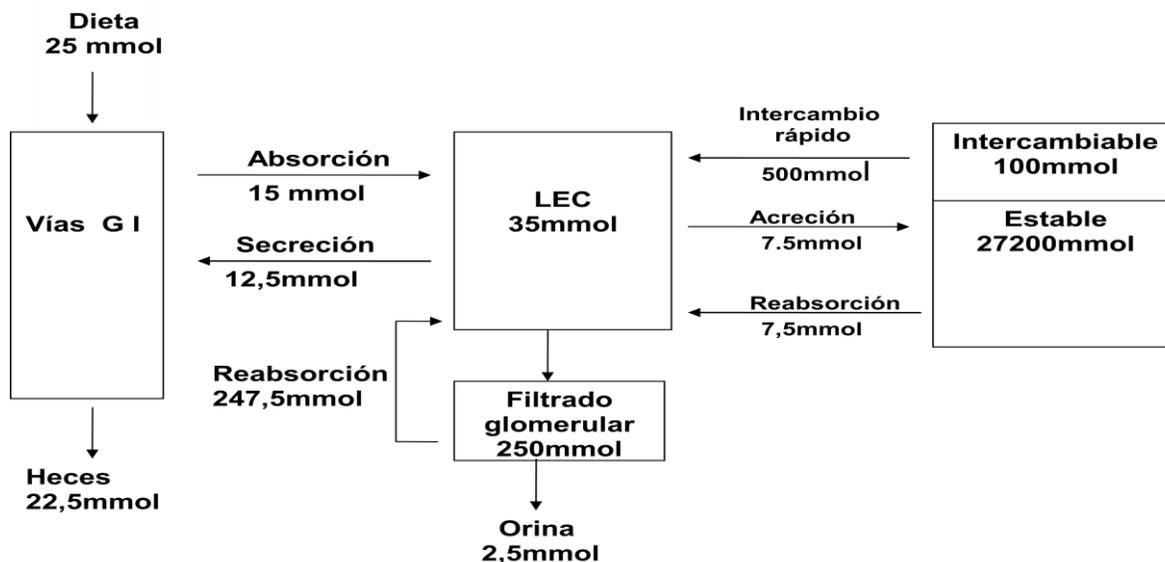


Figura 1. Metabolismo del calcio<sup>1</sup>.

#### 4.1. ABSORCIÓN DE CALCIO.

El calcio es aportado por la alimentación, su absorción en la vía gastrointestinal está dada por dos mecanismos:

- Transporte Activo: Ocurre principalmente en la porción superior del intestino delgado en el duodeno y el yeyuno proximal, es controlado por la acción de la vitamina D<sub>3</sub> o 1,25 – dihidroxicolecalciferol, metabolito producido en los riñones, facilita el transporte al inducir en las células de la mucosa la síntesis de dos variantes de una proteína fijadora de calcio y de varias Ca<sup>2+</sup> - H<sup>+</sup> ATPasa, así llegando a aumentar la captación del calcio en el borde en cepillo de la célula mucosa.<sup>3</sup>
- Transporte Pasivo ocurre a nivel de todo el intestino, es no saturable e independiente de la vitamina D<sub>3</sub>, es por difusión pasiva.

El calcio se absorbe solo si esta en forma hidrosoluble y no si precipita por otro componente de la dieta como los oxalatos, la falta o el exceso de el fósforo puede afectar su absorción.<sup>4</sup>

Factores que favorecen la absorción:

- a) La hormona de crecimiento.
- b) El medio ácido en el intestino.
- c) El aumento de dieta proteínica donde las proteínas unen al calcio.
- d) El bajo consumo de calcio en la ingesta aumenta su absorción.

Factores que impiden la absorción:

- a) El ejercicio vigoroso.
- b) El ácido fítico derivado de varios granos de cereales, pueden formar compuestos insolubles con el calcio.
- c) Los oxalatos, fosfatos y ácidos grasos que también forman sales insolubles con el calcio.
- d) Por un medio alcalino en el intestino favoreciendo la formación de jabones insolubles con el calcio.
- e) Medicamentos como el cortisol.
- f) El alcohol porque inhibe la síntesis de la vitamina D<sub>3</sub>.
- g) El café y azúcares ayudan a eliminar el calcio.

Una vez absorbido el calcio es transportado por la vía porta, llegando así a muchos tejidos corporales y líquidos corporales.

## 4.2. CALCIO INTRACELULAR.

La concentración de calcio libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el citoplasma se conserva en 100 nmol/L aproximadamente. En cambio la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el líquido intersticial es aproximadamente 12000 veces superior a la concentración citoplasmática; de manera que existe un notable gradiente de concentración en dirección al interior celular así como un gradiente eléctrico en la misma dirección.

Mucho calcio intracelular esta enlazado en el retículo endoplasmático, mitocondria y otros organelos, los cuales proporcionan un almacén del cual se puede movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre al citoplasma.

## 4.3. TRANSPORTE DE CALCIO.

El calcio para atravesar la membrana celular, que es una capa hidrofóbica lipídica, debe ser transportado a través de:

- a) Poros hidrofílicos denominados canales iónicos.
- b) Proteínas transportadoras.
- c) Bombas iónicas, que son proteínas que facilitan el transporte iónico activo contra gradientes de concentración.

Los dos primeros mecanismos son pasivos y no gastan energía, mientras que el transporte activo consume energía.<sup>5</sup>

El calcio puede entrar en el citoplasma desde el exterior por los canales iónicos de la membrana celular, o bien ser liberado desde organelos o depósitos intracelulares.

Diferentes neurotransmisores y neuromoduladores inducen la lisis enzimática del fosfolípido de membrana para formar dos segundos mensajeros intracelulares: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El fosfatidil inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) constituye el segundo mensajero que da lugar a la liberación del calcio, el  $\text{IP}_3$  a nivel del retículo endoplasmático se une a un canal de calcio, abre el canal un poco, pero el propio calcio, por un mecanismo de retroalimentación positiva, abre el canal al máximo, dejando pasar avalanchas del ión hacia el citoplasma, aumentando su concentración y se une a diversas proteínas, como la calmodulina, miosina para cumplir diferentes funciones.<sup>6</sup>

Por otro lado, el diacilglicerol activa la proteincinasa C, que fosforila proteínas de canales de membrana aumentando la permeabilidad para el paso de iones de calcio.

Existen diferentes tipos de canales de calcio en la membrana celular: canales de calcio dependientes de receptor y canales de calcio dependientes de voltaje que se abren como consecuencia de cambios en el potencial de membrana.

### **CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR LIGANDO**

La activación de estos canales depende de la unión de un ligando al dominio extracelular del canal receptor y generalmente son activados por neurotransmisores. No son altamente selectivos para el calcio, conducen también otros iones para controlar la excitabilidad de la membrana plasmática. Hay dos tipos de canales activados por ligando, los canales selectivos para cationes excitatorios, estimulados por acetilcolina, glutamato, ATP y 5-hidroxitriptamina, y los canales selectivos para aniones inhibitorios, estimulados por GABA y glicina.<sup>5</sup>

### **CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE.**

Son canales altamente selectivos para el calcio y se abren cuando se produce una disminución en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, denominada despolarización. Estos canales permanecen cerrados cuando la célula está en reposo, bloqueando la entrada de calcio desde el exterior. La dirección del flujo de calcio a través del canal está determinada por el gradiente electroquímico de calcio, que en condiciones normales conduce calcio desde el medio extracelular hacia el citosol. Hay dos grandes grupos de canales de calcio activados por voltaje, que se diferencian en la sensibilidad a los cambios en el potencial eléctrico de la membrana. El primer grupo se denomina LVA (*low-voltage activated Ca<sup>2+</sup> channels*) y requieren una despolarización débil para activarse. El segundo grupo se denomina HVA (*high-voltage activated Ca<sup>2+</sup> channels*) porque necesitan mayor cambio en el potencial eléctrico de la membrana para abrir el poro del canal. Dentro de este segundo gran grupo se encuentran los canales de calcio más estudiados, los canales tipo L, tipo N y tipo P, clasificados de esta forma en función a su dependencia del voltaje y de su sensibilidad a diversas toxinas.<sup>7</sup> Ver figura 2.

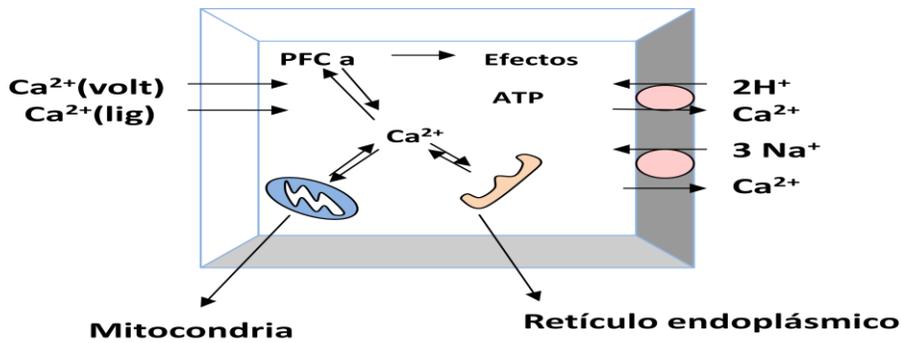


Figura 2. Transporte de calcio en la célula<sup>7</sup>.

El calcio se bombea al exterior de la célula con un intercambio por dos  $\text{H}^+$  mediante la proteína  $\text{Ca}^{2+} - \text{H}^+$  ATPasa y también por una antiportadora conducida por el gradiente de sodio ( $\text{Na}$ ), la cual intercambia tres moléculas de sodio por cada molécula de calcio.<sup>8</sup>

### PROTEÍNAS FIJADORAS DE CALCIO

Para realizar sus funciones el calcio se une a diferentes proteínas como la calmodulina, tropina, miosina, entre otras. Las más importantes son:

- Tropina constituye la proteína fijadora de calcio involucrada en la contracción del músculo esquelético.
- Calmodulina proteína que contiene 148 residuos de aminoácidos y posee cuatro dominios para el enlace del calcio con un peso molecular de 17000, unidos regulan importantes procesos metabólicos.
- La miosina es una proteína fibrosa, y está implicada en la contracción muscular, además de ser la proteína más abundante del músculo esquelético. La miosina necesita como cofactor al calcio, y para que este se active necesita de la calmodulina para llevar a cabo la contracción del músculo esquelético.

### 4.4. EXCRECIÓN DEL CALCIO.

Normalmente la mayor parte del calcio que se ingiere se excreta por la orina, las heces y el sudor.

La cantidad de calcio que sale del organismo por la vía urinaria (calcio urinario.  $\text{CaU}$ ) es el resultado de dos diferentes mecanismos:

- a) La filtración del calcio sanguíneo a través de las membranas especiales (glomérulos) de cada unidad funcional del riñón (filtrado glomerular de calcio FGCa), que asciende aproximadamente a 10.000 mg/dL, valor casi fijo debido a que depende, del calcio sanguíneo y de la presión sanguínea, ambas variables bien controladas por el organismo.
- b) La reabsorción de calcio filtrado, a cargo de los túbulos renales (reabsorción tubular de calcio, PTCa), que reingresa al medio interno el 99 % de la FGCa, o sea, aproximadamente, 9.900 mg/dL. Este valor porcentual puede fluctuar algo (de 97 a 99,5 %) a causa de la acción de hormonas reguladoras cuya actividad depende, de la absorción intestinal, de la necesidad de calcio del organismo. En consecuencia, el CaU aproxima los 100 mg/dL<sup>9</sup>

La reabsorción en el túbulo distal se regula por la hormona paratiroidea.

La mayor pérdida de calcio es por orina y varía entre 2.5 mmol/día y 10 mmol/día (100 mg/día a 200 mg/día), en forma de cristales, uratos amorfos y fosfatos amorfos cálcicos.

Por las heces se elimina aproximadamente 125 mg/día.

La pérdida de calcio por el sudor varía sensiblemente desde 15 mg/día a más de 100 mg/día, se puede sobrepasar este rango en condiciones ambientales extremas.<sup>1</sup>

#### **4.5. HOMEOSTASIS DEL CALCIO.**

Es el mecanismo por el cual el organismo mantiene adecuadamente los niveles de calcio en sangre.

La homeostasis mineral se mantiene para fines prácticos, por la interacción de dos grandes sistemas, a saber: un sistema hormonal que puede considerarse como el componente modulador y en el que la hormona paratiroidea y la vitamina D tienden a conservar minerales y a elevar su concentración en plasma y la calcitonina tiende a disminuir la concentración de los minerales en plasma; un grupo de órganos blanco o componente efector, cuyas principales funciones son: la adquisición de minerales a partir de la dieta, su remoción o almacenamiento en las reservas corporales y su eliminación o conservación en los líquidos corporales.

El componente modulador estimula o inhibe la actividad del componente efector, mediante la secreción o no de sus hormonas; la actividad secretora de este componente hormonal determina la concentración intra y extracelular de minerales y por la concentración de las mismas hormonas.<sup>1</sup>

La concentración ionizada de calcio en el líquido extracelular se mantiene constante dentro de un estrecho margen en torno a 1,25  $\mu\text{mol}$ . Esto se consigue fundamentalmente por las acciones de la hormona paratiroidea (PTH), la vitamina D<sub>3</sub> y la hormona calcitonina. Los principales tejidos de estas hormonas son el hueso, riñón, y el intestino.

Cuando la concentración de calcio ionizado desciende, la glándula paratiroidea nota el cambio por medio de un sensor en la membrana para el calcio y secreta la hormona paratiroidea inmediatamente, esta actúa en el hueso y libera calcio al líquido extracelular. Al mismo tiempo actúa en el riñón incrementando la secreción de fosfato, reduce la excreción renal de calcio aumentando así su reabsorción en el túbulo distal.

En el intestino esta hormona aumenta la absorción de calcio, mediante la formación de vitamina D<sub>3</sub> o calcitriol, volviendo así la concentración de calcio a la normalidad.<sup>2</sup>

El calcitriol regula el nivel de calcio en el intestino, aumenta su absorción, en el hueso, tiene una acción más compleja, cuando un hueso está raquítrico permite la mineralización del hueso, en un hueso no raquítrico, libera el calcio al líquido extracelular.<sup>6</sup>

La calcitonina actúa cuando existen niveles elevados de calcio en sangre, a nivel del hueso, logrando que el calcio se almacene en el hueso.<sup>10</sup>

En la actualidad, esta hormona se emplea en el tratamiento de la osteoporosis, en los accesos evolutivos de la enfermedad de Paget y en ciertas enfermedades endocrinas y óseas.

#### **4.6. FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL CALCIO.**

Además de la importancia en la mineralización del hueso, el calcio tiene un papel importante en procesos fisiológicos básicos como la coagulación sanguínea, la transmisión neuronal, la actividad enzimática, el mantenimiento del músculo esquelético y el miocardio. El calcio también se encuentra implicado en la síntesis glandular y la regulación de las glándulas exocrinas y endocrinas, así también en la preservación de la membrana en integridad y permeabilidad, particularmente en el intercambio de sodio y potasio.<sup>2</sup>

#### **4.7. MINERALIZACIÓN DEL HUESO.**

La formación de hueso es un proceso donde el depósito de las sustancias minerales está regulado por la matriz orgánica. La fase mineral se compone de

calcio y fósforo, y la concentración de estos iones en el plasma y líquido extracelular (LEC) condiciona la tasa de formación de la porción mineralizada del hueso. *In vitro*, se produce mineralización ósea y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita cuando las concentraciones de calcio y fósforo equivalen a las de un ultrafiltrado del plasma. Sin embargo, se desconoce la concentración que alcanzan estos iones en los puntos de mineralización y las células que intervienen en el proceso son los osteoblastos, osteocitos que pueden influir en la concentración local de los iones de calcio.<sup>11</sup>

Al comienzo de la formación de la mineralización del hueso, en la fase sólida de fosfato cálcico, se le conoce como es brushita ( $\text{CaH PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Conforme avanza la mineralización la fase sólida está compuesta por la hidroxiapatita poco cristalizada, con un cociente molar calcio/fosfato bastante bajo.<sup>12</sup>

#### **4.8. COAGULACIÓN SANGUÍNEA.**

El calcio se encuentra acumulado en la zona denominada sistema tubular denso de las plaquetas y es utilizado en el proceso de contracción de éstas. Cuando se lesionan la paredes vasculares, las plaquetas entran en contacto con las estructuras subendoteliales adhiriéndose a ellas y desencadenando la liberación de todo el contenido de sus gránulos plaquetarios, produciendo una agregación de cationes divalentes entre ellos el calcio y otros componentes de la coagulación como fibrinógeno.

La coagulación es una cascada de reacciones enzimáticas y donde cada factor de coagulación es la enzima del inmediatamente inferior y sustrato del inmediatamente superior, y donde el calcio actúa como activador de varios de estos factores, para llegar a formar la fibrina y concluir con la cicatrización de la herida.

Los iones de calcio, son necesarios en todas las etapas de la coagulación sanguínea, a excepción de la fase de contacto y activación del factor XIII por la fibrina.

La concentración de calcio necesaria para una coagulación normal es de 5 – 20 mg/dL.

#### **4.9. CONTRACCIÓN MUSCULAR.**

La contracción en el músculo liso vascular (MLV) depende de la formación de los puentes cruzados entre la actina y la miosina. Para comprender la relajación y contracción del músculo liso vascular es necesario conocer el mecanismo que determina la fosforilación y desfosforilación de las cadenas de miosina. La

fosforilación de las cadenas de miosina es el paso principal en la regulación de la contracción en el músculo liso vascular. La forma fosforilada de las cadenas de miosina interaccionan con la actina para formar los puentes cruzados y generar la contracción.<sup>13</sup>

La actividad de la cinasa de las cadenas de miosina está regulada principalmente por el complejo calcio-calmodulina. La adaptación de la actividad de la fosfatasa de cadenas de miosina puede ser uno de los mecanismos responsables de la sensibilización al calcio inducida por antagonistas en el músculo liso vascular.

El calcio se combina con la calmodulina para formar el complejo calcio-calmodulina (Ca-calmodulina). Esto activa la cinasa de las cadenas de miosina convirtiéndola de la forma inactiva en activa. La actividad de Ca-calmodulina se determina por la concentración intracelular de calcio  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentración del calcio citosólico en reposo es 0.1 mmol/L, pero se aumenta 100 veces durante la contracción.

La concentración de calcio citosólico puede aumentar ya sea por entrada a través del sarcolema o por liberación del retículo sarcoplásmico (RS). En general la contribución del calcio extracelular y del retículo sarcoplásmico para aumentar la concentración de calcio intracelular en el músculo liso vascular puede variar dependiendo del estímulo específico y del antagonista que active la contracción en el músculo liso vascular.

La despolarización de la membrana de las células del músculo liso vascular produce entrada de calcio, que activa y abre los canales tipo L que persisten abiertos durante toda la fase 2 del potencial de acción cardíaca y vascular, produciendo la contracción. La densidad de los canales tipo L aumenta en diversas situaciones fisiológicas (con la edad) y patológicas (hipertensión arterial, cardiomiopatías) y tras la ingesta de sal. Por el contrario, su densidad disminuye con la administración de bloqueadores de los canales de calcio y durante la isquemia miocárdica. Y por el contrario la hiperpolarización disminuye la entrada de calcio inhibiendo la contracción y causa relajación (Figura 3)<sup>13</sup>.

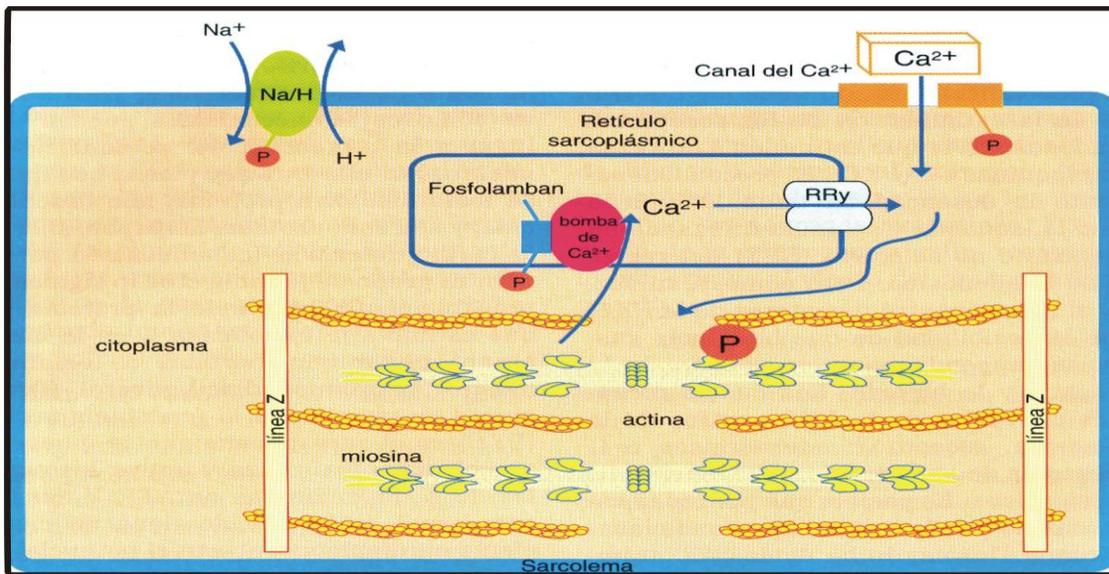


Figura 3. Contracción del músculo<sup>13</sup>.

## FERTILIZACIÓN, DESARROLLO Y APOPTOSIS

Durante la fertilización, el espermatozoide interactúa con el óvulo para inducir oscilaciones de calcio. Estas oscilaciones duran varias horas, y son críticas para activar las enzimas implicadas en el ciclo de división celular. Este tipo de señalización prolongada de calcio también es una importante señal de crecimiento en muchos tipos de células, como células normales del sistema inmune y células cancerígenas que exhiben un crecimiento ilimitado. Durante el desarrollo, el incremento de calcio intracelular contribuye a la formación del eje del cuerpo, al desarrollo de los órganos, a la migración celular y a la formación de circuitos neuronales.

En los procesos de necrosis y apoptosis se observa comúnmente alteraciones en la homeostasis intracelular del calcio, consistente con el hecho de que concentraciones elevadas de calcio intracelular durante periodos prolongados son citotóxicas.<sup>5</sup>

### 4.10. FUNCIONES NUCLEARES.

La actividad transcripcional de varios genes está controlada por la concentración intracelular de calcio, que puede actuar directamente o a través de proteínas individuales sensibles al calcio. Por ejemplo, sobre el gen c-fos exhibe acciones estimuladoras o inhibitoras dependiendo de su concentración intracelular. Parece que la amplitud de la respuesta de calcio es la señal para la acción dual

sobre la actividad transcripcional. Además, genes diferentes necesitan diferentes concentraciones de calcio para desencadenar su activación.<sup>5</sup>

#### **4.11. FUNCIONES MITOCONDRIALES.**

Las mitocondrias, además de ejercer de reservorios intracelulares de calcio, también necesitan de él para su funcionamiento. El calcio regula varias enzimas tales como, las deshidrogenasas mitocondriales implicadas en la síntesis oxidativa de ATP. Además, un incremento o disminución en la concentración de calcio citosólico se traduce en un cambio paralelo en la concentración de calcio mitocondrial, lo que modifica la actividad de las enzimas mitocondriales sensibles al calcio.<sup>5</sup>

#### **4.12. FUNCIONES EN EL CEREBRO.**

En las neuronas existen señales de calcio locales y globales que controlan diferentes funciones, localizadas en regiones morfológicas y funcionales de la célula (cuerpo celular, dendritas, axones). El acoplamiento entre la excitabilidad neuronal y la movilización de calcio es necesario para la propagación de la señal dentro de la célula, y es responsable de la complejidad de las funciones neuronales.

#### **4.13 EXOCITOSIS.**

Tanto en las células endocrinas como en las neuronas, la exocitosis está inducida por una elevación de la concentración intracelular de calcio. Éste aumento provoca la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática. En las neuronas la velocidad de secreción presenta una dependencia no lineal del nivel intracelular de calcio y los microdominios de calcio son críticos para la neurotransmisión. Sin embargo, en las células endocrinas el acoplamiento de los canales de calcio y la maquinaria secretora está menos integrado.

La relación entre el patrón de la señal de calcio y la extensión de la secreción hormonal es muy compleja. La naturaleza oscilatoria o no-oscilatoria de la señal influye en la secreción. Por ejemplo, en los gonadotropos, la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH), induce respuestas oscilatorias de calcio a bajas o intermedias concentraciones, pero cuando estimula a altas concentraciones induce una respuesta bifásica.

## **5. TRASTORNOS DEL METABOLISMO DEL CALCIO.**

### **5.1.1. HIPERCALCEMIA.**

Esta alteración se define como el aumento anormal de la concentración sérica de calcio ionizado.

La hipercalcemia puede depender de muchas enfermedades, de ellas, las más comunes son el hiperparatiroidismo primario (en particular en personas sin síntomas) y afecciones malignas (en especial en personas hospitalizadas).<sup>2</sup>

### **5.1.2. PATOGENIA HIPERCALCEMIA.**

La hipercalcemia resulta de un exceso de calcio en el líquido extracelular, proveniente del hueso y de una disminución de su eliminación renal a través de la orina.

La salida de calcio del hueso es mediada por activadores de la resorción ósea que incluyen factores sistémicos como la paratohormona, 1,25-hidroxicolecalciferol y de acción local como diversas linfocinas.

La hipercalcemia se presenta cuando la entrada de calcio a la sangre es mayor que su velocidad de salida. La absorción de calcio del intestino y más frecuentemente, la movilización de calcio del hueso hacia la sangre, son tan grandes, que exceden la capacidad del riñón para eliminarlo o del esqueleto para depositarlo en la fase mineral ósea. En otras ocasiones, la entrada normal de calcio a la sangre conduce a hipercalcemia, debido a que está limitada la capacidad de mineralización del hueso, la excreción renal de calcio o ambas. En la práctica, la combinación de aumento en la resorción ósea, incremento en la absorción intestinal e incapacidad para depurar el calcio, son las causas principales que conducen a hipercalcemia.<sup>14</sup>

### **5.1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE HIPERCALCEMIA.**

Las manifestaciones de hipercalcemia incluyen síntomas que afectan a diversos órganos y sistemas de la economía. La gravedad de los síntomas en cada paciente refleja el nivel del calcio sérico, la velocidad de su incremento y el estado general del enfermo. Para una función neuromuscular normal se necesita una concentración de calcio sérico óptima, por lo que los síntomas neuromusculares predominan durante episodios de hipercalcemia. Estos síntomas se caracterizan por trastornos neuropsiquiátricos como depresión, confusión, irritabilidad, dificultad para concentrarse, pérdida de memoria, paranoia, alucinaciones, somnolencia,

letargia y coma. Hay además, debilidad muscular, ataxia, disartria, trastornos visuales e hiperreflexia osteotendinosa.

El calcio es también un regulador importante del acoplamiento de la excitación-contracción del corazón y de la tensión del músculo liso de la vasculatura periférica. El ión  $\text{Ca}^{++}$  ejerce un efecto inotrópico sobre el músculo cardíaco y reduce la frecuencia del corazón, un efecto similar a los glucósidos cardíacos. La hipercalcemia acorta el intervalo Q-T (Despolarización y repolarización ventricular), en el electrocardiograma; la administración de  $\text{Ca}^{++}$  a pacientes que reciben digitálicos debe hacerse con sumo cuidado ya que puede precipitar arritmias graves.

La hipercalcemia también aumenta las resistencias periféricas y por ende la presión arterial. El 30 por ciento de los pacientes con hiperparatiroidismo primario presentan hipertensión arterial. La hipertensión arterial también la puede favorecer la infusión aguda de sales de calcio. La calcificación de las válvulas aórticas y de las arterias coronarias se asocia a la presencia de hipercalcemia crónica.

El deterioro de la función renal, puede resultar de la presencia de hipercalcemia aguda o crónica. Se ha demostrado una reducción en el coeficiente de ultrafiltración glomerular (Kf) con sales de Calcio, sobre todo en presencia de la paratohormona (PTH), elevada.

El calcio bloquea la bomba Na-K ATPasa en la rama ascendente de Henle y en los tubos distales. Además, aumenta la depuración de agua libre al limitar la capacidad de concentración urinaria.

La calciuria resultante en estas condiciones favorece la formación de cálculos renales y de nefrocalcinosis. Hay además magnesuria e hipomagnesemia durante la hipercalcemia aguda que debe ser documentada y vigilada.

La hipercalcemia asociada con niveles bajos de PTH y contracción de volumen, aumenta la reabsorción de bicarbonato. Hay además pérdida de potasio que favorece aun más la aparición de alcalosis metabólica. En presencia de PTH elevada, hay inhibición de la secreción de  $\text{H}^+$  e incremento en la pérdida de bicarbonato, que conduce a acidosis metabólica. Por lo que, la hipercalcemia, puede cursar con alcalosis o acidosis metabólica o con pH normal.

Otras manifestaciones de hipercalcemia incluyen nefritis intersticial crónica y nefrocalcinosis. Puede cursar además con diabetes insípida nefrogénica, nefritis con pérdida de sal y acidosis tubular renal distal o tipo I. También se ha descrito en el síndrome de Fanconi (glucosuria, aminoaciduria y fosfaturia) cuando se asocian nefrocalcinosis y PTH elevada.

La constipación, la náusea y el vómito, es una triada clásica en presencia de hipercalcemia. La deshidratación y el efecto del calcio sobre el músculo liso intestinal y la conducción nerviosa, afectan la motilidad gastrointestinal y conducen a constipación.

La hipercalcemia puede condicionar gran morbilidad y hasta mortalidad, si no se le trata pronta y adecuadamente. El tratamiento está dirigido a reducir los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  ionizado en el suero por medio de: aumento en la calciuresis, reducción en la resorción ósea, bloqueo de la absorción intestinal o formación de complejos de Ca que reduzcan la fracción ionizada.<sup>14</sup>

#### **5.1.4. TRATAMIENTO DE HIPERCALCEMIA.**

- Sobre hidratación más furosemida u otro diurético.
- Solución salina isotónica (1-2 L); furosemida 80 a 100 mg c/4h y evitar la depleción.
- Mitramicina antibiótico antitumoral 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso infundida en solución de dextrosa al 5 % en un período de 4 a 8 horas x 2 a 7 días; es nefro y hepato-tóxica.
- Calcitonina (inhibe la actividad osteoclástica) 100 a 200 unidades por vía nasal o endovenosa c/12 h.
- Glucocorticoides usados en: tumores malignos, sarcoidosis o intoxicación por Vitamina  $\text{D}_3$ .
- Sales de fósforo y bifosfonatos.
- Diálisis en insuficiencia renal.
- Inhibidores de la síntesis de prostaglandina (indometacina).<sup>15</sup>

#### **5.2.1. HIPOCALCEMIA.**

Se considera hipocalcemia cuando existe una reducción anormal de la concentración sérica de calcio ionizado. También puede ocurrir como consecuencia de disminución de la fracción del calcio ionizado

#### **5.2.2. PATOGENIA DE HIPOCALCEMIA.**

Los trastornos hipocalcémicos pueden clasificarse según su patogénesis en dos categorías:

- 1) Hipoparatiroidismo primario, en el que la hipocalcemia se debe a deficiencia en secreción, acción o ambas de paratohormona.
- 2) Hipocalcemia por función inadecuada de los órganos blancos, como en insuficiencia renal, mal absorción intestinal, carencia de vitamina D.<sup>16</sup>

### **5.2.3. MANIFESTACIONES CLINICAS DE HIPOCALCEMIA.**

La hiperexcitabilidad neuromuscular es la causa de la mayoría de los síntomas de la hipocalcemia.

La hipocalcemia aguda se manifiesta por parestesias (hormigueo y adormecimiento de los dedos y de la región perioral), reflejos hiperactivos, espasmo carpo pedal, irritabilidad, signo de Chvostek (espasmo facial, especialmente de la comisura labial al percutir el nervio facial por delante de la oreja) y signo de Trousseau (espasmo muy doloroso del carpo al aumentar la presión del manguito de tensión arterial por encima de las cifras sistólicas durante 3 minutos). En los casos graves se observan opistótonos, tetania y convulsiones generales o focales.

### **5.2.4. TRATAMIENTO DE HIPOCALCEMIA.**

En general la hipocalcemia de por sí es indicación de tratamiento, aún la asintomática por el peligro de la aparición de síntomas que pueden poner en peligro la vida del paciente.

El tratamiento está orientado a corregir la causa de la hipocalcemia. La reposición del calcio puede hacerse por vía oral o intravenosa. En los casos de hipocalcemia sintomática severa es necesario utilizar la vía IV.

Se administran 10 a 20 mL de gluconato de calcio al 10 % IV a una velocidad menor a 2 mL/1000 bajo vigilancia electrocardiográfica (especialmente en los pacientes que reciben digitálicos) y después 15 a 20 mg de calcio elemental por kg de peso corporal en 1000 mL de dextrosa al 5% en un período de 8-12 horas. Cada ampolla de 10 ml de gluconato de calcio al 10 % tiene 90 mg de calcio elemental. Se deben tomar determinaciones séricas cuando menos cada seis horas para vigilar la respuesta al tratamiento y decidir el momento en que se puede cambiar a una preparación oral (carbonatos de calcio).

La infiltración de una solución parenteral produce necrosis de los tejidos. Por ello se debe tener máximo cuidado en la colocación de la infusión y en su control permanente. No se debe añadir calcio a soluciones intravenosas que contengan bicarbonato o fosfato por el fenómeno de precipitación.

Se debe tener precaución en los casos de hipoalbuminemia donde se aprecia una hipocalcemia ficticia, puesto que el nivel de calcio ionizado es normal. El ajuste se realiza considerando que por cada g/100 ml de disminución de la albúmina sérica (a partir de 4 g/100 mL) disminuye el calcio sérico 0.75 mg/100 mL.

Para que se produzca una repleción adecuada de calcio, los niveles séricos de Mg deben ser normales.<sup>17</sup>

### **5.3. CALCINOSIS.**

Es el depósito de sales de calcio en tejidos blandos del organismo.

No es considerada una enfermedad, sino un hallazgo radiológico, quirúrgico o anatómico-patológico. La calcinosis puede ser patológica o senil (fisiológica en los ancianos). Las calcificaciones se producen por una elevada concentración de iones de calcio en el medio interno que facilita la precipitación en los tejidos o por alguna condición patológica de las zonas afectadas que hace retener calcio a pesar de ser normal la concentración de éste en el medio.

Típicamente aparecen en riñones, articulaciones, tendones, paredes arteriales, válvula aórtica, paredes bronquiales, páncreas, pericardio, piel y en algunas formaciones patológicas (quiste hidatídico, craneofaringioma).<sup>4</sup>

### **5.4. OSTEOPOROSIS.**

Es una enfermedad que afecta al hueso, caracterizada por una disminución de la masa ósea; los huesos afectados son más porosos y se fracturan con más facilidad que el hueso normal. Son frecuentes las fracturas de muñeca (radio), vértebras y cadera, aunque puede aparecer en cualquier hueso. Las mujeres de raza blanca son las más susceptibles de padecer la enfermedad. Otros factores de riesgo pueden ser la inadecuada ingestión de calcio, actividad física insuficiente, ciertos medicamentos (como los corticoides), o antecedentes familiares de osteoporosis. La forma más frecuente de la enfermedad es la osteoporosis primaria; se refiere a la osteoporosis posmenopáusica, o por déficit de estrógenos (Tipo I) que se observa en mujeres cuyos ovarios han dejado de producir hormonas (estrógenos). Otros tipos pueden ser osteoporosis relacionada con la edad (Tipo II), que afecta a las personas mayores de 70 años, y la osteoporosis idiopática, enfermedad poco frecuente, de causa desconocida, que afecta a las mujeres premenopáusicas y a los hombres jóvenes o de mediana edad. La osteoporosis secundaria puede estar causada por inactividad debida a parálisis u otras causas como la ingravidez espacial; enfermedades endocrinas y nutricionales, tales como la anorexia nerviosa; enfermedades específicas y ciertos medicamentos. La prevención y el tratamiento de la osteoporosis incluyen la

administración de estrógenos, progesterona o ambos, en mujeres posmenopáusicas, suplementos de calcio y otros nutrientes, ejercicio y nuevos fármacos como la calcitonina.<sup>4</sup>

### **5.5. RAQUITISMO.**

Es una enfermedad producida por el déficit nutricional, caracterizada por deformidades esqueléticas. El raquitismo está causado por un descenso de la mineralización de los huesos y cartílagos debido a niveles bajos de calcio y fósforo en la sangre. La vitamina D es esencial para el mantenimiento de unos niveles normales de calcio y fósforo. El raquitismo clásico, enfermedad carencial de la infancia caracterizada por desarrollo inadecuado o fragilización de los huesos, está producido por una cantidad insuficiente de vitamina D en la dieta, o por ciertas enfermedades que impiden la asimilación de las sales de calcio por la eliminación excesiva en el riñón de calcio y fósforo o por radiación ultravioleta solar insuficiente, lo que bloquea la conversión en la piel de 7-dehidroesteroles, tales como ergosterol y 7-dehidrocolesterol, que originan las vitaminas D<sub>2</sub> (ergocalciferol) y D<sub>3</sub> (colecalciferol) respectivamente.<sup>11</sup>

### **5.6. UROLITIASIS.**

Es el proceso que se da por la elevada eliminación de calcio por la orina, se excreta un exceso de iones calcio en la orina, por alteraciones dietéticas o metabólicas, acumulándose en los riñones y formando depósitos de calcio 'piedras'.<sup>2</sup>

### **5.7. DIAGNÓSTICO DE CALCIO.**

Las técnicas analíticas vía húmeda y/o instrumentales habitualmente empleadas para la determinación de calcio son:

- 1) Análisis colorimétrico con indicadores metalocrómicos.
- 2) Marcado de calcio fluorescente en unión a EDTA.
- 3) La absorción atómica espectrofotométricamente (AAE).

El calcio total se mide habitualmente con espectrofotometría, al determinar los compuestos coloreados cuando varios indicadores metalocrómicos o tinciones se unen al calcio. El complejo ortocresoltaleina (CPC) y arsenato III son los más empleados.

El CPC se une al calcio para formar un color rojo en una solución alcalina, que se mide a 580 nm. El arsenato III reacciona con el calcio para formar un complejo calcio-indicador, medido cerca de 650 nm.

La calceína forma un complejo fluorescente con el calcio en una solución alcalina, la cual es excitada a 490 nm y emite a 520 nm. La titulación de los complejos fluorescentes con EDTA disódico hasta un punto final permita la determinación de la concentración de calcio.<sup>18</sup>

## 5.8. EDTA.

El EDTA es un reactivo excepcional no sólo porque forma quelatos con todos los cationes, también porque la mayoría de estos quelatos son lo suficientemente estables como para formar las bases de un método de titulación.

Sin duda, esta gran estabilidad proviene de los distintos sitios complejantes dentro de la molécula, los cuales le confieren una estructura en forma de jaula en la que el catión se encierra y se aísla de manera efectiva de las moléculas del disolvente.

El tetra anión del EDTA  $(\text{OOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO})_2$  es un agente complejante especialmente efectivo que puede formar cinco ciclos de quelatos de cinco miembros con un solo ion metálico por coordinación mediante los pares de electrones de los cuatro (o a veces tres) grupos carboxilato y de los átomos de nitrógeno.

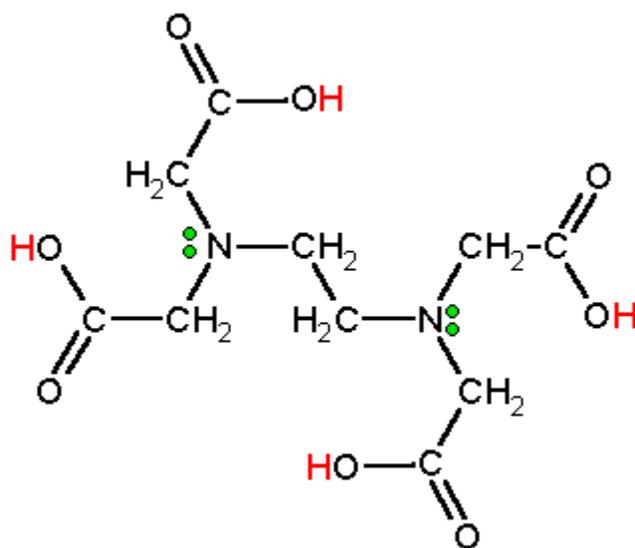


Figura 4. Estructura del EDTA

## **6. VALIDACIÓN.**

### **6.1. DEFINICIÓN.**

Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.<sup>19</sup>

### **6.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.**

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar lo conveniente que es para el propósito considerado.<sup>20</sup>

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.<sup>21</sup>

En la validación de métodos se suele hacer una división de los mismos en dos grandes categorías: Aquellos métodos que son solamente cualitativos y los que son, además, cuantitativos. La diferencia entre ambas categorías estriba en el nivel de análisis de los datos, lo cual implica un tratamiento más exhaustivo de los resultados (en el caso de los métodos cuantitativos) o un nivel menos extenso de los mismos (en el caso del método cualitativo).<sup>22</sup>

La parte medular de la validación es, sin duda, la aplicación de toda una serie de fórmulas y criterios para el manejo de los datos que se obtiene en el laboratorio al hacer un análisis o un experimento de manera repetida. Finalmente, se obtiene una serie de números y datos que, vistos de golpe, no nos dicen nada. Sin embargo, el agrupamiento, manejo y evaluación de los mismos arroja resultados que, a lo largo de los años y con el desarrollo de la validación se han convertido en lenguaje común y se han venido uniformizando para poder establecer, con unos cuantos resultados, si un método es válido o no.

### **6.3. MARCO LEGAL PARA LA REALIZAR LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.**

Un método analítico es identificado como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad, ya que tiene repercusión directa en el producto. La contaste de las empresas por alcanzar una mayor productividad a menores costos, está determinada entre otros factores, al dictamen del producto y de sus materias primas en corto tiempo, utilizando métodos de prueba de menor costo y menor tiempo. Por lo que el profesional farmacéutico es el responsable de la calidad de los procesos, por lo que todo producto debe satisfacer los requisitos mediante la validación de los métodos analíticos.

El reglamento de insumos para la salud hace referencia a los establecimientos que se dediquen a la fabricación de insumos (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos), y establece que: los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos llevara el control analítico de estos. Dicho control deberá incluir, la validación de las técnicas empleadas.

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. Buenas prácticas de fabricación para fármacos que establece: que los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir: validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no farmacopéicos o farmacopéicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria Química Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos; establece que;

- Se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
- Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo a lo establecido en el apartado de "control del laboratorio analítico".

Procedimientos analíticos a ser validados.

La discusión de la validación de procedimientos analíticos está dirigida a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos.

- Pruebas de identificación.<sup>20</sup>
- Pruebas cuantitativas para el contenido de impurezas.<sup>20</sup>
- Pruebas límite para el control de impurezas.<sup>20</sup>
- Pruebas cuantitativas del activo en muestras de sustancia o del producto terminado o de otros componentes seleccionados en el producto.<sup>20</sup>

Las pruebas de identificación están destinadas a asegurar la presencia de un analito en una muestra. Esto se logra normalmente mediante la comparación de una propiedad de la muestra (por ejemplo, espectro, comportamiento cromatografico, reactividad química, etc.), con la sustancia de referencia.<sup>20</sup>

El análisis de impurezas puede ser, ya sea una prueba cuantitativa o una prueba límite para la impureza en una muestra. Cualquiera que sea, se pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra.<sup>20</sup>

Los procedimientos de valoración pretenden medir el analito presente en una muestra dada. En este contexto, la valoración representa una medición cuantitativa del o de los componentes principales en una sustancia.<sup>20</sup>

### Parámetros de desempeño en la validación de un método analítico.

Tabla 1. Parámetros de desempeño a estudiar en validación.

| Característica           | Identificación | Pruebas de impurezas |        | Contenido/<br>Potencia/<br>valoración |
|--------------------------|----------------|----------------------|--------|---------------------------------------|
|                          |                | Cuantitativo         | Límite |                                       |
| Exactitud                | No             | Sí                   | No     | Sí                                    |
| Precisión                |                |                      |        |                                       |
| Repetibilidad            | No             | Sí                   | No     | Sí                                    |
| Reproducibilidad         | No             | Sí                   | No     | Sí                                    |
| Especificidad            | Sí             | Sí                   | Sí     | Sí                                    |
| Límite de detección      | No             | No                   | Si     | NO                                    |
| Límite de cuantificación | No             | Sí                   | No     | NO                                    |
| Linealidad               | No             | Sí                   | No     | Sí                                    |
| Rango                    | No             | Sí                   | No     | Sí                                    |

#### 6.3.1. ESPECIFICIDAD.

La especificidad es la habilidad de evaluar el analito inequívocamente en la presencia de componentes que puede esperarse que esté presente. Típicamente estos pueden ser impurezas, degradantes, la matriz, etc.<sup>20</sup>

La carencia de especificidad de un procedimiento analítico individual puede ser compensada por otro procedimiento (s) analítico de apoyo.<sup>20</sup>

Esta definición tiene las implicaciones siguientes:

Identificación: asegura la identidad de un analito.<sup>20</sup>

Pruebas de Pureza: asegura que todos los procedimientos analíticos realizados permitan una afirmación exacta del contenido de las impurezas de una analito, p. ej., prueba de sustancias relacionada, metales pesados, contenido de residuos de solvente, etc.

### **6.3.2. EXACTITUD.**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía existente entre el valor verdadero que es aceptado como un valor convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado.<sup>20</sup>

### **6.3.3. PRECISIÓN.**

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de los valores (grado de concordancia), entre una serie de medidas obtenidas de varias pruebas de la misma muestra homogénea en las condiciones preestablecidas.<sup>20</sup>

La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.<sup>20</sup>

La precisión debe analizarse utilizando muestras homogéneas, puras. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea que pueda ser analizada se puede realizar preparando muestras simuladas o una solución de la muestra.<sup>20</sup>

La precisión de un procedimiento analítico por lo general es expresada como la variación, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de medidas.<sup>20</sup>

### **6.3.4. REPETIBILIDAD.**

La repetibilidad expresa la precisión del funcionamiento en un periodo corto de tiempo bajo las mismas condiciones. La repetibilidad también es llamada intramétodo.<sup>20</sup>

**Precisión intermedia.** La precisión intermedia expresa las variaciones que existen dentro del laboratorio en diferentes días, con diferentes analistas, equipo diferente, etc.<sup>20</sup>

### **6.3.5. REPRODUCIBILIDAD.**

La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (por lo general en la colaboración de estudios aplicados a la estandarización de la metodología).<sup>20</sup>

### **6.3.6. LÍMITE DE DETECCIÓN.**

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.<sup>20</sup>

### **6.3.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.**

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que cuantitativamente puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptables.

El límite de cuantificación es un parámetro cuantitativo para las pruebas de los niveles más bajos de compuestos en la muestra original, y es usado en lo particular para determinar impurezas y/o productos de degradación.<sup>20</sup>

### **6.3.8. LINEALIDAD.**

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un rango dado), a obtener de la prueba resultados que son directamente proporcionales a la concentración (la cantidad), de analito en la muestra.<sup>20</sup>

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre los niveles superior y más bajo de concentración (cantidad), de analito en la muestra (incluyendo éstos), para los que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel aceptable de precisión, exactitud y linealidad.<sup>20</sup>

### **6.3.9. ROBUSTEZ.**

La robustez de un procedimiento analítico es la medida de su capacidad de permanecer normal por las variaciones pequeñas, pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.<sup>20</sup>

## 7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El calcio es esencial para la preservación de la estructura ósea, la activación de ciertas enzimas, la coagulación sanguínea, la contracción muscular y la transmisión de impulsos nerviosos. El calcio se encuentra implicado en la síntesis glandular y la regulación de las glándulas exocrinas y endocrinas, así también en la preservación de la membrana en integridad y permeabilidad, particularmente en el intercambio de sodio y potasio.

El aumento anormal de la concentración sérica de calcio es conocido como hipercalcemia, por el contrario, la disminución de la concentración de calcio es conocido como hipocalcemia. La alteración de las cifras de calcio nos conduce a un desequilibrio fisiológico del cuerpo humano.

La unidad metabólica del IMSS realiza determinaciones de calcio sérico mediante un método volumétrico, este método se encuentra escrito en un manual elaborado hace poco más de dos décadas al cual hasta la fecha no se le ha realizado modificación alguna. Al examinar los resultados obtenidos por dicha metodología no existe reproducibilidad alguna en estos, además de obtener valores poco congruentes con los diagnósticos emitidos por los médicos. Una vez detectado este problema, se encontró que se estaba llevando a cabo la titulación a un pH al cual el complejo Ca-EDTA es poco estable. Asimismo, una cantidad del ion calcio a cuantificar se precipita bajo estas condiciones, reflejando así resultados erróneos. Del mismo modo, el material empleado no es apropiado para llevar a cabo la titulación, ya que al tener concentraciones pequeñas de calcio en las muestras, el volumen de EDTA empleado es pequeño, requiriendo así de ciertas especificaciones al momento de llevar a cabo la titulación para disminuir el rango de error en la cuantificación de este ión.

Se requiere del control de las variables encontradas en la metodología, de la adecuación para disminuir el rango de error en los resultados garantizando así una mayor reproducibilidad en los resultados, lo cual es muy importante pues en dicha institución no se cuenta actualmente con un equipo automatizado.

El método actualmente empleado tiene como ventajas el ser poco costoso y capaz de ser implementado en cualquier laboratorio.

La cuantificación de este ión es importante para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes que a diario son atendidos en esta unidad.

Por lo tanto, se pretende adecuar y validar el método analítico para obtener resultados confiables y aplicarlo en muestra de pacientes que acuden a esta unidad del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## 8. JUSTIFICACIÓN.

El método analítico utilizado actualmente dentro del Instituto Mexicano del Seguro Social, tiene la problemática de no contar con un sustento matemático y bibliográfico. Además, de no contar con un procedimiento descrito y detallado para realizar el análisis de las muestras correspondientes. Lo cual ocasiona una incertidumbre en los resultados obtenidos.

Modificando el método y adecuándolo se pretende mejorar la reproducibilidad y la repetibilidad con la finalidad de hacer un método analítico validado, para la obtención de las concentraciones de calcio sérico, y de esta forma ser aplicado como un procedimiento de uso común en la detección de patologías asociadas.

Tabla2. Modificaciones al método analítico para la cuantificación de calcio sérico.

| <b>PARÁMETRO.</b>                       | <b>MÉTODO ACTUAL.</b> | <b>MÉTODO PROPUESTO.</b>    |
|---|-----------------------|-----------------------------|
| pH                                      | 14                    | 12                          |
| Concentración de EDTA disódico.         | sin                   | 0.004 N                     |
| Gasto de EDTA disódico.                 | 130 – 140 $\mu$ L     | 3 - 10 $\mu$ L              |
| Muestra.                                | Sin diluir            | Diluir con agua bidestilada |
| Instrumento utilizado en la titulación. | Pipeta graduada.      | Bureta.                     |

## 9. OBJETIVOS.

### Generales

\*Adecuar y validar un método complejométrico para la determinación de calcio sérico.

### Específicos

\*En base a las necesidades de trabajo, adecuaremos químicamente el método para evitar pérdida de calcio en el tratamiento de la muestra.

\*Validar el método de acuerdo a los siguientes parámetros:

\*Realizar la linealidad del sistema.

\*Realizar la linealidad del método.

\*Realizar la exactitud del método.

\*Determinar el límite de detección y cuantificación con base en los resultados anteriores.

\*Completar parámetros adicionales de reproducibilidad y exactitud.

.

## **10. HIPÓTESIS.**

A través de una determinación complejométrica con EDTA disódico y empleando un indicador metalocrómico (calceína y/o negro de eriocromo T) en el cual su color en forma libre es diferente a su forma acomplejada con calcio; es posible determinar a pH de 12 el catión metálico en muestras de origen biológico en sueros de pacientes con patologías diversas.

## 11. DISEÑO EXPERIMENTAL.

### MATERIALES Y REACTIVOS.

Tabla 3. Lista de reactivos, marca y lote.

| Nombre del reactivo    | Marca                   | Lote           |
|------------------------|-------------------------|----------------|
| Ácido clorhídrico      | Grupo internacional ICR | ICR-AC07101110 |
| Agua bidestilada       | THEISSIER               | -              |
| Azul de hidroxí naftol | Baker                   | 63085          |
| Carbonato de calcio    | MONTERREY               | 006440         |
| EDTA disódico          | Baker                   | 30358          |
| Hidróxido de sodio     | Omnichem                | 230271         |
| Negro de eriocromo T   | Baker                   | 98904          |
| Tiras de pH            | METRIX                  | M-220 V-80     |

Tabla 4. Lista de materiales características y volúmenes.

| Material              | Características  | Marca      | Volumen            |
|-----------------------|------------------|------------|--------------------|
| Agitador magnético    | Plástico         | -          | -                  |
| Aguja para vacutainer | Acero inoxidable | Vacutainer | -                  |
| Microbureta           | Vidrio           | Kimax      | 10 mL              |
| Desecador             | Vidrio           | -          | -                  |
| Espátula              | Acero inoxidable | -          | -                  |
| Matraz aforado        | Vidrio           | Kimax      | 10, 1000 y 2000 mL |
| Matraz Erlenmeyer     | Vidrio           | Pirex      | 50 mL              |
| Perilla de seguridad  | Plástico         | -          | -                  |
| Pinzas para bureta    | Acero inoxidable | Felisa     | -                  |
| Pipeta                | Vidrio           | Kimax      | 5 y 10 mL          |
| Pizeta                | Plástico         |            |                    |
| Soporte universal     | Acero inoxidable | -          | -                  |

|                                |          |            |                   |
|--------------------------------|----------|------------|-------------------|
| Tubos para vacutainer con EDTA | Plástico | Vacutainer | 3 mL              |
| Vaso de precipitados           | Vidrio   | kimax      | 100, 250 y 500 mL |
| Vidrio de reloj                | Vidrio   | -          | -                 |

Tabla 5. Equipos e instrumentos.

| <b>Equipo e instrumentos</b>            | <b>Marca</b>                         | <b>Modelo</b>                |
|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Balanza analítica                       | ADAM                                 | PW                           |
| Estufa de secado                        | FELISA                               | Hecho en México              |
| Micropipetas automáticas autoajustables | SEALPETTE, MICROLIT, CTR SCIENTIFIC. | 100, 200, 500 y 1000 $\mu$ L |
| Parilla de agitación y calentamiento.   | CIMAREC                              | SP131325                     |

## **12. DESARROLLO.**

Preparación del estándar de calcio de 1 mg/mL

Se pesó 250 mg de carbonato de calcio (previamente secado en una estufa por 2 h. a 110°C), en una balanza analítica, se pasó a un vaso de precipitados de 100 mL y agregó 10 mL de ácido clorhídrico al 10 %, y se agregó 50 mL de agua bidestilada y calentó hasta ebullición. Se pasó esta solución a un matraz aforado de 100 mL y aforar con agua bidestilada.

Preparación de la solución de EDTA disódico 0.004 N.

Se pesó 2.9899 g de EDTA disódico (previamente secado en una estufa por 2 horas a 110°C) en una balanza analítica, se pasó a un matraz de 2 Litros y se agregó agua bidestilada y se disolvió hasta la claridad. Se aforó con agua bidestilada y se guardó en refrigeración.

Preparación de la solución de NaOH 0.4 N

Se pesó 16 g de hidróxido de sodio en una balanza analítica y se pasó a un matraz aforado de 1 litro. Se disolvió con agua bidestilada y se ajustó el pH a 12 y se aforo.

Preparación del suero libre de calcio.

Se tomó sangre periférica por punción venosa en tubos con EDTA sódico. Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. Se separó el suero y se hizo un pool, se guardó en refrigeración.

Estandarización del EDTA disódico 0.004 N

Se tomó 1 mL de una solución estándar de carbonato de calcio de 1 mg/mL y pasó a un matraz aforado de 10 mL, se agregó 7 mL de agua bidestilada, se ajustó el pH a 12 con la solución de NaOH 0.4 N. se aforo con agua bidestilada. Se agregó 80 mg de azul de hidroxí naftol y se tituló con la solución de EDTA disódico 0.004 N (el vire es de roja rojiza a azul).

### **12.1. VALIDACIÓN.**

Se prepararon soluciones de 6, 9, 12, 15, y 18 mg/dL a partir de una solución estándar de carbonato de calcio de 1 mg/mL, como se muestra en la tabla (12.1.1).

### 12.1.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Tabla 6. Preparación de la soluciones de trabajo para la validación del sistema.

| <i>Concentración</i> | <i>Volumen de Estándar.</i> | <i>Volumen de Agua</i> | <i>Volumen de NaOH para pH 12</i> | <i>Aforo final</i> |
|----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 6 mg/dL              | 0.6 mL                      | 7 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 9 mg/dL              | 0.9 mL                      | 7 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 12 mg/dL             | 1.2 mL                      | 7 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 15 mg/dL             | 1.5 mL                      | 7 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 18 mg/dL             | 1.8 mL                      | 7 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |

Se pasó esta solución a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se agregó 70 mg de indicador de negro de eriocromo T. Se tituló con la solución de EDTA disódico 0.004 N hasta el vire de rojo a azul.

### 12.1.2. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Se prepararon soluciones con suero libre de calcio en concentraciones de 6, 9, 12, 15, y 18 mg/dL a partir de una solución estándar de carbonato de calcio de 1 mg/mL, como se muestra en la tabla.

Tabla 7. Preparación de la soluciones de trabajo para la validación del método.

| <i>Concen- tración</i> | <i>Suero libre de <math>Ca^{2+}</math></i> | <i>Vol. Están- dar de <math>Ca^{2+}</math></i> | <i>Volumen de Agua</i> | <i>Volumen de NaOH para pH 12</i> | <i>Aforo final</i> |
|------------------------|--|--|------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 6 mg/dL                | 1 mL                                       | 0.6 mL   | 5 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 9 mg/dL                | 1 mL                                       | 0.9 mL   | 5 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 12 mg/dL               | 1 mL                                       | 1.2 mL   | 5 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 15 mg/dL               | 1 mL                                       | 1.5 mL   | 5 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |
| 18 mg/dL               | 1 mL                                       | 1.8 mL   | 5 mL                   | 1300-1500 $\mu$ L                 | 10 mL              |

Se pasó esta solución a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se agregó 70mg de indicador de negro de eriocromo T. Se tituló con la solución de EDTA disódico 0.004 N hasta el vire de rojo a azul.

### 13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este proyecto lo primero que se llevó a cabo fue la modificación de la metodología empleada en el método anterior.

#### 13.1. CÁLCULOS DE pH.

En primer lugar, se realizaron cálculos con base en el equilibrio químico para calcular el pH óptimo de cuantificación de calcio sérico, ya que en el método anterior no se describe pero experimentalmente se obtuvo dando un pH de 14.

Posteriormente, se procedió a calcular el pH

CÁLCULOS PARA DETERMINAR EL pH ADECUADO EN LA DETERMINACIÓN DE CALCIO.



$$K_{PS} = [\text{Ca}^{2+}] [\text{OH}^-]^2$$

$$8 \times 10^{-6} = [\text{Ca}^{2+}] [\text{OH}^-]^2$$

$$\text{pH} = 14 - \text{pOH}$$

Calculo Para 6mg/dl

$$8 \times 10^{-6} = [\text{Ca}^{2+}] [\text{OH}^-]^2$$

$$[0.015] [\text{OH}^-]^2 = 8 \times 10^{-6}$$

$$\text{OH} = \sqrt{\frac{8 \times 10^{-6}}{0.015}} = \sqrt{5.33 \times 10^{-4}} = -\log(2.3 \times 10^{-2}) = 1.6$$

$$\text{pH} = 14 - 1.6 = \mathbf{12.4}$$

Cálculos Para 12 mg/dl

$$[0.03] \quad [\text{OH}^-]^2 = 8 \times 10^{-6}$$

$$\text{OH} = \sqrt{\frac{8 \times 10^{-6}}{0.03}} = \sqrt{2.66 \times 10^{-4}} = -\log(1.633 \times 10^{-2}) = 1.79$$

$$\text{pH} = 14 - 1.79 = \mathbf{12.20}$$

Con base en lo anterior, se concluyó que el pH anterior precipitaba en forma de hidróxido de calcio y que el nuevo pH óptimo de extracción será de 12.

### **13.2 CONSTANTE DE FORMACIÓN CONDICIONAL (K') PARA LA REACCIÓN DE CALCIO Y EDTA.**

$$K' \text{ Ca} = K \text{ Ca EDTA} / (\alpha \text{ Ca} (\text{OH}) * \alpha \text{ y} (\text{H}))$$

$$K' \text{ Ca} = 10^{10.7} / (10^0 * 10^0) = 10^{10.7}$$

Si la K' Ca EDTA la concentración del Ca es mayor a  $10^5$  es cuantitativo.

$$M \text{ eq Ca}^{2+} = \text{mmol Ca}^{2+}$$

$$(10^{10.7})(10^{-2.39}) = 10^{8.31}$$

$$10^{8.31} > 10^5$$

Por lo tanto, es cuantitativo.

Calculando la cuantitatividad de la reacción en el punto de equivalencia.

$$\% \varepsilon = (1 - \varepsilon) 100 \%$$

$$\text{Ca}^{+2} + \text{y}^{-4} = \text{Ca y}^{-2} = K' \text{ Cay}^{-2}$$

$$\varepsilon \text{C0} \quad \varepsilon \text{C0} \quad \text{C0}$$

$$K' \text{ Cay}^{-2} = |\text{Cay}^{-2}| / |\text{Ca}^{+2}| |\text{y}^{-4}|$$

$$K'Ca\gamma^{-2} = C_0 / \varepsilon C_0 \quad \varepsilon C_0$$

$$10^{10.7} = C_0 / \varepsilon^2 C_0^2$$

$$\varepsilon = \sqrt{1 / K'Ca\gamma^{-2} C_0} = \sqrt{1 / 10^{10.7} * 10^{-2.39}} = \sqrt{1 / 10^{8.31}} = \sqrt{10^{-8.31}}$$

$$\varepsilon = 10^{-4.15}$$

$$\% \varepsilon = (1 - 10^{-4.5}) * 100 = 99.99 \%$$

Por lo tanto es cuantitativo en 99.99 % y el complejo formado es muy estable.

### 13.3. ELECCIÓN DEL INDICADOR NEGRO DE ERIOCROMO T.

Anteriormente, se utilizaba una mezcla de calceína, nitrato de potasio y timoftaleína como indicador, pero dada la fluorescencia de la calceína resultaba difícil para observar el punto final de la titulación. Por lo cual, el negro de eriocromo T fue elegido como un mejor indicador debido a que forma un complejo estable con el calcio a pH 12 (rojo), con lo cual, al llegar al punto de equivalencia la constante de formación calcio EDTA es más grande y desplaza a la constante de formación calcio indicador y se obtiene el vire de color azul, como indicador libre.

En general, estos indicadores son colorantes orgánicos que forman quelatos coloreados con iones metálicos en un intervalo de peso molecular característico del catión y del colorante. Con frecuencia, los complejos son tan intensamente coloreados que permiten la detección visual en el intervalo de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M.

El negro de eriocromo T es un típico indicador de iones metálicos ampliamente utilizado en las titulaciones de varios cationes comunes. Este compuesto tiene un grupo ácido sulfónico que se disocia completamente en agua, así como dos grupos fenólicos que se disocian parcialmente.

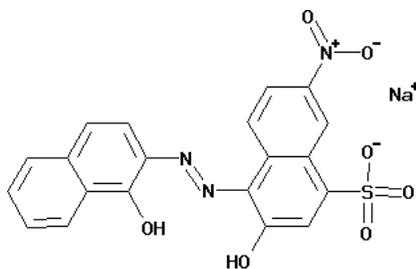
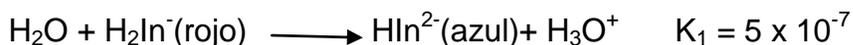


Figura 5. Negro de eriocromo T

Su comportamiento como ácido débil se puede describir con las ecuaciones siguientes:



En el intervalo de pH de 9 a 11, en el que el propio indicador es de color azul, forma complejos con muchos iones metálicos, que son de color rojo y que poseen la estequiometría 1:1

Se ve que los ácidos y bases conjugadas tienen distintos colores. Por tanto, el negro de eriocromo T se comporta como indicador ácido / base tanto como un indicador de iones metálicos.

### 13.4. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EDTA.

Se calcula la concentración del titulante (EDTA) ya que no se especificaba en el método a modificar la concentración del titulante y por lo tanto se realizaron los siguientes cálculos.

Para 8 mg/dL

$$(8 \text{ mg}/100 \text{ mL})(1 \text{ mL}) = 8/100 = 0.08 \text{ mg Ca}^{+2}$$

$$0.08 \text{ mg Ca}^{+2} / 20 \text{ mg/meq} = 4 \times 10^{-3}$$

$$\text{Meq EDTA} = \text{meq Ca}^{+2}$$

$$N \text{ EDTA} \times 10 \text{ mL} = 4 \times 10^{-3} \text{ meq}$$

$$4 \times 10^{-4} \times 10 \text{ mL} = 4 \times 10^{-3} \text{ meq}$$

$$N \text{ EDTA} = 4 \times 10^{-4} \text{ eq/L}$$

### 13.5. ESTANDARIZACIÓN DEL EDTA 0.004 N.

Se tomó 1 mL de la solución estándar de calcio de 1mg/mL y se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, se agregó 6 mL de agua bidestilada, se ajustó el pH a 12 con la solución de hidróxido de sodio 0.4 N (1500 μL). Se aforo con agua bidestilada y se agregó 70 mg de negro de eriocromo T y se tituló con la solución de EDTA 0.004 N (El vire es de rojo a azul).

### 13.6. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

Tabla 8. Resultados del sistema.

| X<br>mg/Dl | Y<br>mL<br>Gastados | X <sup>2</sup> | y <sup>2</sup> | XY      | Conc. mg/dL | %<br>RECUPERA<br>CION | COEF.<br>VARIACIÓN |          |
|------------|---------------------|----------------|----------------|---------|-------------|-----------------------|--------------------|----------|
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               | 1.2395             |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 6          | 3.35                | 36             | 11.2225        | 20.1    | 5.8960      | 98.2667               |                    |          |
| 6          | 3.3                 | 36             | 10.89          | 19.8    | 5.8080      | 96.8000               |                    |          |
| 9          | 5.1                 | 81             | 26.01          | 45.9    | 8.9760      | 99.7333               |                    |          |
| 9          | 5.05                | 81             | 25.5025        | 45.45   | 8.8880      | 98.7556               |                    |          |
| 9          | 5.1                 | 81             | 26.01          | 45.9    | 8.9760      | 99.7333               | 0.8243             |          |
| 9          | 5.1                 | 81             | 26.01          | 45.9    | 8.9760      | 99.7333               |                    |          |
| 9          | 5.1                 | 81             | 26.01          | 45.9    | 8.9760      | 99.7333               |                    |          |
| 9          | 5                   | 81             | 25             | 45      | 8.8000      | 97.7778               |                    |          |
| 12         | 6.8                 | 144            | 46.24          | 81.6    | 11.9680     | 99.7333               |                    |          |
| 12         | 6.8                 | 144            | 46.24          | 81.6    | 11.9680     | 99.7333               |                    |          |
| 12         | 6.8                 | 144            | 46.24          | 81.6    | 11.9680     | 99.7333               | 0.7631             |          |
| 12         | 6.7                 | 144            | 44.89          | 80.4    | 11.7920     | 98.2667               |                    |          |
| 12         | 6.7                 | 144            | 44.89          | 80.4    | 11.7920     | 98.2667               |                    |          |
| 12         | 6.8                 | 144            | 46.24          | 81.6    | 11.9680     | 99.7333               |                    |          |
| 15         | 8.5                 | 225            | 72.25          | 127.5   | 14.9600     | 99.7333               |                    |          |
| 15         | 8.4                 | 225            | 70.56          | 126     | 14.7840     | 98.5600               |                    |          |
| 15         | 8.5                 | 225            | 72.25          | 127.5   | 14.9600     | 99.7333               | 0.5812             |          |
| 15         | 8.45                | 225            | 71.4025        | 126.75  | 14.8720     | 99.1467               |                    |          |
| 15         | 8.5                 | 225            | 72.25          | 127.5   | 14.9600     | 99.7333               |                    |          |
| 15         | 8.4                 | 225            | 70.56          | 126     | 14.7840     | 98.5600               |                    |          |
| 18         | 10.1                | 324            | 102.01         | 181.8   | 17.7760     | 98.7556               |                    |          |
| 18         | 10.1                | 324            | 102.01         | 181.8   | 17.7760     | 98.7556               |                    |          |
| 18         | 10.05               | 324            | 101.0025       | 180.9   | 17.6880     | 98.2667               | 0.5104             |          |
| 18         | 10.2                | 324            | 104.04         | 183.6   | 17.9520     | 99.7333               |                    |          |
| 18         | 10.1                | 324            | 102.01         | 181.8   | 17.7760     | 98.7556               |                    |          |
| 18         | 10.15               | 324            | 103.0225       | 182.7   | 17.8640     | 99.2444               |                    |          |
| 360.00     | 202.75              | 4860.00        | 1541.00        | 2736.60 | 356.84      | 2973.91               | 3.92               | Σ        |
| 12.00      | 6.76                | 162.00         | 51.37          | 91.22   | 11.89       | 99.13                 | 0.78               | PROMEDIO |
| 4.32       | 2.43                | 104.69         | 33.09          | 58.86   | 4.27        | 0.77                  | 0.29               | DESVEST  |
| 18.62      | 5.89                | 10960.14       | 1095.19        | 3464.19 | 18.24       | 0.60                  | 0.08               | DESVEST2 |

#### 13.6.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Pendiente.  $B_1$  0.9895

Ordenada al origen.  $B_0$  0.0205

Coefficiente de determinación.  $r^2$  0.9996

Intervalo de confianza para la pendiente.  $B_1$

Límite inferior. 0.9823

Límite superior. 0.9966

Intervalo de confianza para la ordenada al origen  $B_0$

Límite inferior. -0.0706

Límite superior. 0.1117

### Criterios de aceptación

$$r^2 \geq 0.98$$

Intervalo de confianza para  $B_1$  no debe incluir el cero <sup>23</sup>

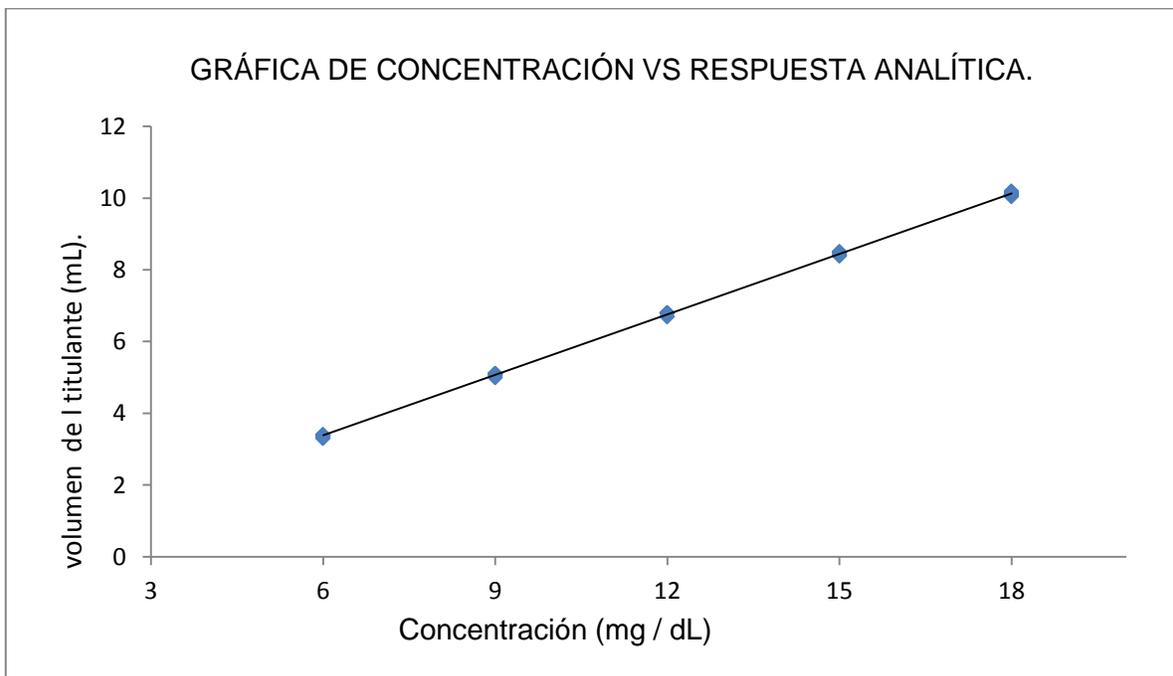
Dado que cumple con los criterios de aceptación especificados el sistema se considera lineal.

### 13.6.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

% Coeficiente de variación. **0.7788**

### Criterios de aceptación

Coeficiente de variación  $\leq 1.5\%$  para métodos físico – químicos, por lo que el sistema es preciso al tener los criterios de aceptación favorables. <sup>23</sup>



Coeficiente de determinación.  $r^2$  0.9996

Ecuación de la recta.  $Y = 0.0205 + 0.98951 X$

### 13.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Tabla 9. Resultados del método.

| X<br>mg/Dl | Y<br>mL<br>Gastados | X <sup>2</sup> | y <sup>2</sup> | XY      | Conc. mg/dL | %<br>RECUPERAC<br>ION | COEF.<br>VARIACIÓN |          |
|------------|---------------------|----------------|----------------|---------|-------------|-----------------------|--------------------|----------|
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               | 0.6018             |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 6          | 3.35                | 36             | 11.2225        | 20.1    | 5.8960      | 98.2667               |                    |          |
| 6          | 3.4                 | 36             | 11.56          | 20.4    | 5.9840      | 99.7333               |                    |          |
| 9          | 5                   | 81             | 25             | 45      | 8.8000      | 97.7778               |                    |          |
| 9          | 5                   | 81             | 25             | 45      | 8.8000      | 97.7778               |                    |          |
| 9          | 5.02                | 81             | 25.2004        | 45.18   | 8.8352      | 98.1689               | 0.2187             |          |
| 9          | 5.02                | 81             | 25.2004        | 45.18   | 8.8352      | 98.1689               |                    |          |
| 9          | 5                   | 81             | 25             | 45      | 8.8000      | 97.7778               |                    |          |
| 9          | 5.02                | 81             | 25.2004        | 45.18   | 8.8352      | 98.1689               |                    |          |
| 12         | 6.7                 | 144            | 44.89          | 80.4    | 11.7920     | 98.2667               |                    |          |
| 12         | 6.7                 | 144            | 44.89          | 80.4    | 11.7920     | 98.2667               |                    |          |
| 12         | 6.7                 | 144            | 44.89          | 80.4    | 11.7920     | 98.2667               | 0.2309             |          |
| 12         | 6.73                | 144            | 45.2929        | 80.76   | 11.8448     | 98.7067               |                    |          |
| 12         | 6.73                | 144            | 45.2929        | 80.76   | 11.8448     | 98.7067               |                    |          |
| 12         | 6.7                 | 144            | 44.89          | 80.4    | 11.7920     | 98.2667               |                    |          |
| 15         | 8.38                | 225            | 70.2244        | 125.7   | 14.7488     | 98.3253               |                    |          |
| 15         | 8.38                | 225            | 70.2244        | 125.7   | 14.7488     | 98.3253               |                    |          |
| 15         | 8.4                 | 225            | 70.56          | 126     | 14.7840     | 98.5600               | 0.1306             |          |
| 15         | 8.4                 | 225            | 70.56          | 126     | 14.7840     | 98.5600               |                    |          |
| 15         | 8.4                 | 225            | 70.56          | 126     | 14.7840     | 98.5600               |                    |          |
| 15         | 8.38                | 225            | 70.2244        | 125.7   | 14.7488     | 98.3253               |                    |          |
| 18         | 10.1                | 324            | 102.01         | 181.8   | 17.7760     | 98.7556               |                    |          |
| 18         | 10.08               | 324            | 101.6064       | 181.44  | 17.7408     | 98.5600               |                    |          |
| 18         | 10.06               | 324            | 101.2036       | 181.08  | 17.7056     | 98.3644               | 0.1589             |          |
| 18         | 10.1                | 324            | 102.01         | 181.8   | 17.7760     | 98.7556               |                    |          |
| 18         | 10.07               | 324            | 101.4049       | 181.26  | 17.7232     | 98.4622               |                    |          |
| 18         | 10.08               | 324            | 101.6064       | 181.44  | 17.7408     | 98.5600               |                    |          |
| 360.00     | 201.50              | 4860.00        | 1521.96        | 2719.68 | 354.64      | 2957.37               | 1.34               | Σ        |
| 12.00      | 6.72                | 162.00         | 50.73          | 90.66   | 11.82       | 98.58                 | 0.27               | PROMEDIO |
| 4.32       | 2.41                | 104.69         | 32.82          | 58.62   | 4.24        | 0.59                  | 0.19               | DESVEST  |
| 18.62      | 5.81                | 10960.14       | 1077.26        | 3436.11 | 18.00       | 0.34                  | 0.04               | DESVEST2 |

#### 13.7.1. LÍNEALIDAD DEL MÉTODO.

Pendiente B<sub>1</sub>. 0.9832

Ordenada al origen. B<sub>0</sub>. 0.0222

Coeficiente de determinación r<sup>2</sup>. 0.9998

Intervalo de confianza para la pendiente B<sub>1</sub>

Límite inferior. 0.9794

Límite superior. 0.9870

Intervalo de confianza para la ordenada al origen  $B_0$ .

Límite inferior. -0.0265

Límite superior. 0.0711

Coefficiente de variación de regresión. 0.5935

### **Criterios de aceptación.**

$$r^2 \geq 0.98$$

Intervalo de confianza para  $B_1$  debe incluir la unidad.

Intervalo de confianza para  $B_0$  debe incluir el cero.

El coeficiente de variación (CV), del porcentaje de recobro no debe ser mayor al 2 %<sup>23</sup>.

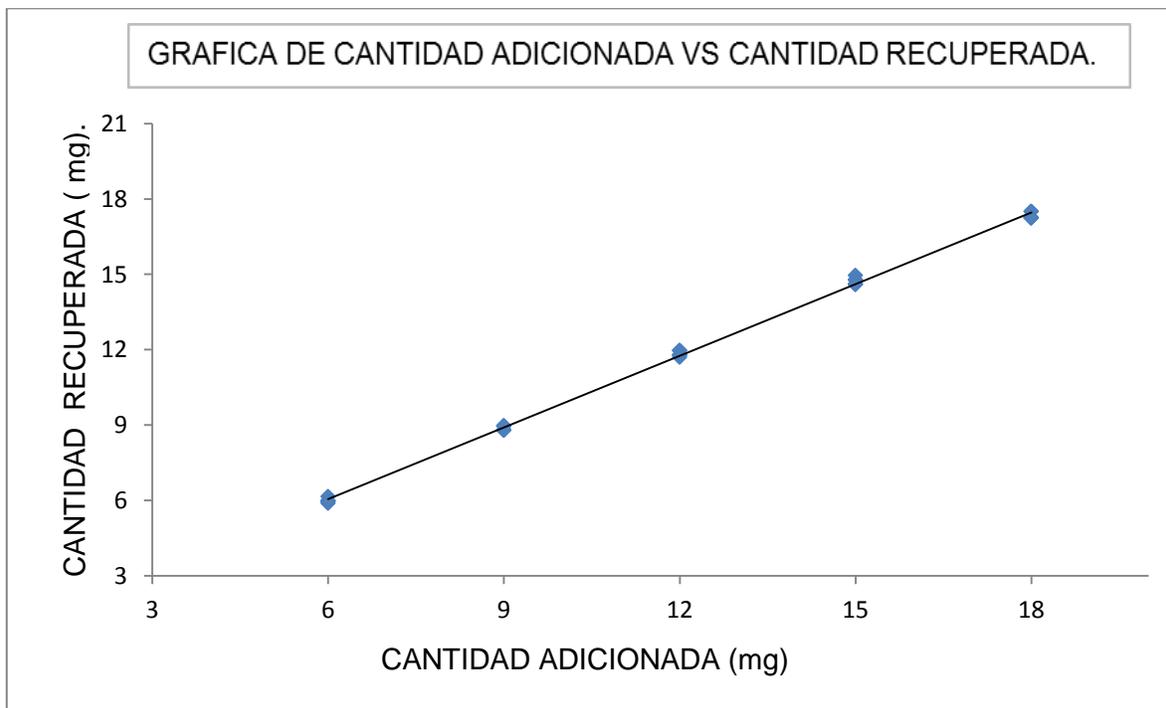
Dado que cumple con los criterios de aceptación especificados el método se considera lineal.

### **13.7.2. PRECISIÓN DEL MÉTODO.**

Coefficiente de variación. 0.5935

### **Criterios de aceptación**

$CV \leq 2\%$  métodos físico – químicos, por lo que el método es preciso al tener los criterios de aceptación favorables.<sup>23</sup>



Coeficiente de determinación  $r^2$  0.9998

Ecuación de la recta  $Y = 0.0222 + 0.9832 X$

### 13.8. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

$H_0 : \mu = 100 \%$

$H_1 : \mu \neq 100 \%$

$t = (\bar{Y} - 100\%) / (S / \sqrt{n})$

$t = (98.58 - 100 \%) / (0.59 / \sqrt{30}) = -13.3016$

Con  $\alpha$  0.025

Sí  $|t| < 2.045$  se acepta la hipótesis.

Por lo tanto, el método es exacto y como 98.58 % está dentro del intervalo 98 – 102 % el método está dentro lo especificado.

CV = 0.5935 como el CV < 2 % el método se considera repetible.

#### **Criterios de aceptación.**

98 – 102 %

CV  $\leq$  2 %<sup>23</sup>

13.9. PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCIBILIDAD).

|           | A1    | A2    |            | 6 mg/dL           |
|-----------|-------|-------|------------|-------------------|
| <b>D1</b> | 5.984 | 5.984 | n=         | 24                |
|           | 5.984 | 5.984 | media=     | 5.94366667        |
|           | 5.984 | 6.16  | s=         | 0.0777592         |
|           | 5.984 | 5.984 | <b>CV=</b> | <b>1.30826982</b> |
|           | 5.896 | 5.896 |            |                   |
|           | 5.984 | 5.984 |            |                   |
| <b>D2</b> | 5.896 | 5.896 |            |                   |
|           | 5.896 | 5.896 |            |                   |
|           | 5.984 | 5.984 |            |                   |
|           | 5.984 | 5.984 |            |                   |
|           | 5.808 | 5.896 |            |                   |
|           | 5.808 | 5.808 |            |                   |

|           | A1     | A2     |            | 9 mg/dl           |
|-----------|--------|--------|------------|-------------------|
| <b>D1</b> | 8.8000 | 8.8    | n=         | 24                |
|           | 8.8000 | 8.8    | media=     | 8.8638            |
|           | 8.8352 | 8.976  | s=         | 0.07499667        |
|           | 8.8352 | 8.976  | <b>CV=</b> | <b>0.84610068</b> |
|           | 8.8000 | 8.8    |            |                   |
|           | 8.8352 | 8.976  |            |                   |
| <b>D2</b> | 8.8352 | 8.8    |            |                   |
|           | 8.976  | 8.976  |            |                   |
|           | 8.976  | 8.8176 |            |                   |
|           | 8.8352 | 8.8352 |            |                   |
|           | 8.8    | 8.976  |            |                   |
|           | 8.8352 | 8.8352 |            |                   |
|           | A1     | A2     |            |                   |

**D1**

|         |        |
|---------|--------|
| 11.792  | 11.704 |
| 11.792  | 11.792 |
| 11.792  | 11.792 |
| 11.8448 | 11.968 |
| 11.8448 | 11.968 |
| 11.792  | 11.792 |

**12 mg/dl**  
n= 24  
media= 11.7890667  
s= 0.08347069  
**CV= 0.7080347**

**D2**

|        |        |
|--------|--------|
| 11.88  | 11.616 |
| 11.792 | 11.792 |
| 11.704 | 11.616 |
| 11.792 | 11.792 |
| 11.792 | 11.704 |
| 11.792 | 11.792 |

**A1**

**A2**

**D1**

|         |        |
|---------|--------|
| 14.7488 | 14.608 |
| 14.7488 | 14.608 |
| 14.7840 | 14.784 |
| 14.7840 | 14.96  |
| 14.7840 | 14.784 |
| 14.7488 | 14.608 |

**15 mg/dl**  
n= 24  
media= 14.7062667  
s= 0.12137363  
**CV= 0.82531909**

**D2**

|        |        |
|--------|--------|
| 14.608 | 14.608 |
| 14.608 | 14.608 |
| 14.784 | 14.608 |
| 14.96  | 14.784 |
| 14.784 | 14.608 |
| 14.52  | 14.52  |

# A1

# A2

## D1

|         |        |
|---------|--------|
| 17.776  | 17.512 |
| 17.7408 | 17.512 |
| 17.7056 | 17.248 |
| 17.776  | 17.248 |
| 17.7232 | 17.248 |
| 17.7408 | 17.248 |

## D2

|        |        |
|--------|--------|
| 17.424 | 17.336 |
| 17.248 | 17.248 |
| 17.248 | 17.248 |
| 17.248 | 17.336 |
| 17.248 | 17.248 |
| 17.248 | 17.248 |

**18 mg/dl**

n= 24  
media= 17.4086  
s= 0.21318739  
**CV= 1.22460961**

Nota: **A** se refiere al analista y **D** se refiere al día

### Criterios de aceptación.

$$CV \leq 2 \%^{23}$$

### 13.10. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordena al origen.

$$LC = (10 \cdot S_{b0}) / B_1$$

$$LC = (10 \cdot 0.0781) / 0.9504 = \mathbf{0.8222 \text{ mg/dL}}^{23}$$

### 13.11. LÍMITE DE DETECCIÓN.

Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordena al origen.

$$LD = (10 \cdot S_{y/x}) / B_1$$

$$LD = (10 \cdot 0.0781) / 0.9504 = 0.2713 = \mathbf{0.2713 \text{ mg/dL}}^{23}$$

La comparación de los métodos se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 10. Comparación de métodos analíticos.

| <b>Anterior.</b>  | <b>Parámetro.</b>       | <b>Nuevo.</b>        |
|-------------------|-------------------------|----------------------|
| 14                | pH                      | 12                   |
| Sin controlar     | Concentración de EDTA   | 0.004N               |
| Calceína          | Indicador               | Negro de eriocromo T |
| Pipeta 1MI        | Instrumento de medición | Microbureta 10 mL    |
| 130 – 140 $\mu$ L | Vol. Gastado            | 3 – 10 mL            |
| Sin validar       | Validación              | validado             |

El análisis de las muestras correcto y apegado a lo descrito en la metodología es fundamental para los resultados, ya que el calcio es un ión muy difícil de analizar debido a la presencia de otros iones y de otros compuestos derivados del suero.

De acuerdo a los resultados obtenidos y sus graficas podemos observar que tanto para la validación del sistema como la del método, el porcentaje de recuperación de muestra está por encima del 97 % en la mayoría de los casos y que sus coeficientes de variación son menores al 2 % en todas las muestras analizadas, por lo tanto cumple con los requisitos de validación.

Por lo tanto el método analítico final es:

Tomar 1 mL de suero de una muestra problema y pasarlos a un matraz aforado de 10 mL agregar 6 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 12 con la solución de NaOH 0.4N. Aforar con agua bidestilada. Pasar esta solución a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y agregar 70 mg de indicador de negro de eriocromo T. Titular con la solución de EDTA disódico 0.004 N hasta el vire de rojo a azul.

## 14. APLICABILIDAD DEL MÉTODO.

Dado que todos los parámetros de validación cumplen con los criterios de aceptación, el método fue aplicado a pacientes del IMSS del departamento de unidad metabólica encontrándose los siguientes resultados:

| <b>Muestra.</b> | <b>Resultado mg / dL</b> | <b>Probable diagnóstico.</b>          |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 1               | 10.56                    | Normal.                               |
| 2               | 9.1                      | Normal.                               |
| 3               | 9.1                      | Normal.                               |
| 4               | 9.5                      | Normal.                               |
| 5               | 9.86                     | Normal.                               |
| 6               | 9.5                      | Normal.                               |
| 7               | 9.68                     | Normal.                               |
| 8               | 10                       | Normal.                               |
| 9               | 6.16                     | Osteoporosis.                         |
| 10              | 12.67                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 11              | 17.78                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 12              | 11.44                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 13              | 7.9                      | Osteoporosis.                         |
| 14              | 9.33                     | Normal.                               |
| 15              | 9.68                     | Normal.                               |
| 16              | 9.68                     | Normal.                               |
| 17              | 12.3                     | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 18              | 16.01                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 19              | 17.36                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 20              | 10.03                    | Normal.                               |
| 21              | 8.27                     | Normal.                               |
| 22              | 10.74                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 23              | 11.97                    | Hiperparatiroidismo ó hipertiroidismo |
| 24              | 9.68                     | Normal.                               |
| 25              | 9.86                     | Normal.                               |

Con base a los resultados obtenidos es posible diferenciar entre pacientes sanos y pacientes con algún trastorno del calcio; Y en conjunto con otras pruebas de laboratorio como: fosforo, parathormona, perfil tiroideo, etc; es posible efectuar el diagnóstico preciso del paciente y un mejor tratamiento.

## 15. CONCLUSIONES.

Se adecuó, desarrolló y validó un método analítico complejométrico para la determinación de calcio sérico cumpliendo con los parámetros de validación.

El método analítico puede ser aplicado con un límite de detección de 0.2713 mg/dL y de cuantificación de 0.8222 mg/dL

Por lo tanto, el método modificado y validado consiste en: tomar 1 mL de suero de una muestra problema y pasarlos a un matraz aforado de 10 mL agregar 6 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 12 con la solución de NaOH 0.4 N. Aforar con agua bidestilada. Pasar esta solución a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y agregar 70 mg de indicador de negro de eriocromo. Titular con la solución de EDTA disódico 0.004 N hasta el vire de rojo a azul.

## 17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Housay, Bernardo. Fisiología Humana. 13ª Ed Buenos Aires-Argentina: Interamericana; 1993. Pág. 625, 633 y 635.
2. Henry Bernard John. Laboratorio en el diagnostico clínico. Madrid: Marbán libros; 2005; Vol. I. Pág. 193,195, 200 y 645.
3. Center for Young Women's Health  
<http://www.youngwomenshealth.org/spcalciuminfo.html>. Acceso 5 de octubre de 2011
4. Farreras P. Valenty, Rozman C. Medicina Interna. Tomo 13ª Ed. Harcourt Brace; 1997. Pág.454-550
5. Fisionet. Portal Interactivo Para la Enseñanza de Fisiologia.  
<http://www.fisionet.org/lecciones/uni/fc-fichas-didacticas/sinapsis.html>. Acceso 6 de octubre de 2011.
6. Cardella R.L. Bioquímica Medica. Habana-Cuba: Ciencias Medicas; 1999.Pág. 110,235.430.
7. Murray Robert K. Bioquímica de Harper. 14ª Ed. D.F: Manual Moderno; 2000. Pág.584.
8. Ganong f. William. El laboratorio en el Diagnostico Clínico. 17ª Ed. Bogotá: Manual Moderno; Pág. 44.
9. Centro Interdisciplinario de Neurociencia. <http://www.cnv.cl/inf/cach2fig.jpg>. Acceso 15 de octubre de 2011
10. March of Dimes. Centro de Enseñanza del Embarazo.  
[http://www.nacersano.org/centro/9246\\_10037.asp](http://www.nacersano.org/centro/9246_10037.asp). Acceso 20 de octubre de 2011
11. Madrid Mac Granhill, Fauci, Braunwald Isselbalcher, Kasper Hauser Longo. Principios de Medicina Interna. 14ª Ed. Interamericana; 1998. Pág. 2521.

12. Vives Lluís Joan, Aguilar Lluís Josep. Manual de Técnicas de Laboratorio de hematología. 2ª Ed. Barcelona: Masson; 2001. Pág. 509.
13. Colegio Mexicano de Anestesiología, A.C. [http://www.comexan.com.mx/img/fig\\_19\\_small.gif](http://www.comexan.com.mx/img/fig_19_small.gif). Acceso 23 de octubre de 2011.
14. James Wiyrgaarden, Lloyd H. Simth, J. Claude Bennett. Tratado de Medicina Interna, 19ª Ed. D.F: Interamericana; 1994. Pág. 1646 y 1647.
15. Velazco, Alfonso. Farmacología. 16ª Ed. Madrid: Interamericana; Mc Graw-H.1995.pag 107-112.
16. Sánchez David Carlos. Hipocalcemia. <http://www.aibarra.org/Guias/4-9.htm>. Acceso 27 de octubre de 2011.
17. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. <http://tratado.uninet.edu/c050401.html>. Acceso 20 de octubre de 2011.
18. Ballces, Alfonso y Jesús Prieto. La Clínica y el Laboratorio. 20ª Ed. Madrid: Masson; 2006.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Capítulos “validación” y “control del laboratorio analítico”; incisos 9.11.1 a 9.11.7 y 9.12.3.
20. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Text on validation of Analytical Procedures Q2A. October 1994.
21. The United States Pharmacopeial Convention, The national Formulary 20, United States Pharmacopeial, Validation of Compedial Methods. 23 Ed. Printed by Mack Printing Company, 1995. Pág. 1982,1983.
22. Asociación Farmacéutica Mexicana. Validación de Métodos analíticos. Informacéutico. México; Julio 2001. Vol. 8. Pág. 45-51

