

50
2 ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**VALIDACION DEL METODO DE TRINDER
PARA LA DETERMINACION DE SALICILATOS
EN PLASMA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARIA CRISTINA OLIVARES HERNANDEZ

ASESOR: JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

258705



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

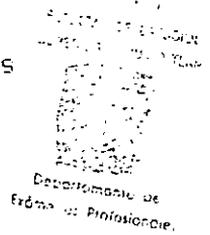


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .



ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Validación del método de Trinder para la determinación
de salicilatos en plasma.

que presenta la pasante: María Cristina Olivares Hernández
con numero de cuenta: 7953262-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 28 de Octubre de 1997

PRESIDENTE	QFB <u>Idalia Avila Mexicano</u>	
VOCAL	QFB <u>Elizabeth Toris Carrizosa</u>	
SECRETARIO	QFB <u>J. Antonio Garduño Rosas</u>	
PRIMER SUPLENTE M.en C.	<u>Luigi Martínez Aguilar</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB <u>Teresa Ramírez Silva</u>	

***La vida es aprendizaje, la vida es sueño y también un reto,
la vida fluye en mí y aprender quiero con mente abierta,
dispuesta siempre a ser mejor, con ansia infinita de
aprender eternidades, con anhelo de alcanzar sueños de
grandeza incorporando nuestros grandes talentos, por eso
mientras seamos peregrinos en esta tierra, el gran
compromiso será siempre aprender hasta el último respiro
de nuestra existencia***

A la memoria de mi padre

Gracias por sus ejemplos de responsabilidad, de no claudicar hasta ver coronadas las metas que se persiguen.

A mi madre

Gracias por la confianza que ha depositado en mí y por el apoyo que siempre me brinda cuando quiero cumplir mis anhelos.

A mis hermanos

Gracias por la fe, el apoyo y la compañía que incondicionalmente me han dado y por sus deseos de superación que siempre demuestran.

A mi hijo

Gracias por su amor, fe, cariño y ternura que siempre me hacen seguir adelante y por lo que siempre lucharé para darle lo mejor de mi vida

A mis sobrinos

Que siempre perseveren para alcanzar sus sueños de grandeza y puedan hacer un México mejor.

Al QFB. José Antonio Garduño Rosas

Muchas gracias por su valiosa colaboración en la dirección de éste trabajo ya que con su ayuda y experiencia lo hizo posible.

A mis profesores

Les agradezco que incondicionalmente y por amor a su profesión compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia.

A mis amigos

Gracias por aceptarme tal cual soy, por brindarme su amistad y estar cerca de mí en los buenos y difíciles momentos.

Gracias

A todos aquellos que no menciono y que de alguna forma al cruzarse en mi camino han influido en mi crecimiento y bienestar

INDICE GENERAL

OBJETIVO	2
CAPITULO 1 ANTECEDENTES	3
CAPITULO 2 MARCO TEORICO	7
1.- Linealidad del sistema de medición.....	7
2.- Precisión del sistema de medición.....	7
3.- Perfil de precisión del sistema de medición.....	7
4.- Exactitud del sistema de medición.....	7
5.- Linealidad del método.....	8
6.- Precisión del método.....	8
7.- Exactitud del método.....	8
8.- Límite mínimo de detección.....	9
9.- Estabilidad de la muestra.....	9
10.- Tolerancia del método.....	9
CAPITULO 3 FARMACOLOGIA	10
A) Propiedades farmacológicas.....	10
B) Farmacocinética.....	11
C) Toxicidad.....	13
CAPITULO 4 MATERIAL Y METODO	15
Material.....	15
Método.....	16
CAPITULO 5 DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
Preparación de reactivo y soluciones.....	17
Análisis de muestras en agua desionizada.....	19
Análisis de muestras en plasma.....	20

CAPITULO 6 RESULTADOS	24
Linealidad del sistema de medición.....	24
Precisión del sistema de medición.....	25
Perfil de precisión del sistema de medición.....	26
Exactitud del sistema de medición.....	27
Linealidad del método.....	28
Exactitud y precisión del método.....	29
Precisión del método expresada en términos de reproducibilidad para las concentraciones de 40 y 200 µg/ml.....	30
Precisión del método expresada en términos de reproducibilidad para las concentraciones de 400 y 520.....	31
Límite mínimo de detección.....	32
Límite mínimo de detección a concentraciones bajas en plasma.....	33
Límite mínimo de detección obtenido con los resultados de linealidad del sistema de medición.....	34
Límite mínimo de detección obtenido a partir de la curva de calibración en plasma.....	35
Estabilidad de la muestra para la concentración de 200 µg/ml.....	36
Estabilidad de la muestra para la concentración de 400 µg/ml.....	37
Tolerancia del sistema de acuerdo a la variación de la longitud de onda.....	38
Tolerancia del método de acuerdo a la variación de la concentración del ácido clorhídrico.....	39
Tolerancia del método de acuerdo a la estabilidad del producto colorido.....	39
CAPITULO 7 ANALISIS DE RESULTADOS	40
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXO 1	49
ANEXO 2	51

OBJETIVO

VALIDAR EL METODO DE TRINDER DE ACUERDO A LOS CRITERIOS DE LINEALIDAD, PRECISION, EXACTITUD, LIMITE MINIMO DE DETECCION ESTABILIDAD DE LA MUESTRA Y TOLERANCIA DEL METODO, CON EL FIN DE EVALUAR SU EFECTIVIDAD Y CONOCER SUS LIMITACIONES.

ANTECEDENTES

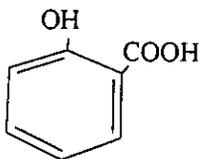
Reciben el nombre general de salicilatos todos los derivados del ácido salicílico; el ácido salicílico que antiguamente se extraía, después de una serie de transformaciones químicas, de la corteza del sauce o *Salix alba*, puede prepararse a partir de salicilato de metilo o esencia de Wintergreen, extraído a su vez de las hojas de la *Gaultheria procumbens* o de la corteza de la *Betula lenta*, arbustos y árbol respectivamente, que crecen sobre todo en América del norte y Gran Bretaña.

Pero en la actualidad el ácido salicílico y sus derivados se preparan por síntesis; el primero a partir del fenol y los otros por transformación química de aquél.

El ácido salicílico es un ácido carboxílico aromático que posee además un grupo fenólico en posición orto (ácido o-hidroxibenzoico). Ahora bien Tanto el ácido benzoico como el fenol son inactivos aisladamente para proporcionar la acción analgésica y antirreumática por tanto son necesarios ambos grupos el carboxilo y sobre todo la posición orto del oxhidrilo fenólico lo cual le da la propiedad de quelación que consiste en la formación de un anillo quelato por la unión del hidrógeno fenólico y el oxígeno del grupo carboxilo y esto se debe a la proximidad de ambos grupos y no en los ácidos meta y para-hidroxibenzoicos.

Los salicilatos se clasifican en tres grupos:

- Los salicilatos inorgánicos o sales simples del ácido salicílico: salicilato de sodio, sustancia fácilmente ionizable.
- Esteres salicílicos: ácido acetil salicílico, salicilato de metilo, salicilato de fenilo.
- Amida salicílica: salicilamida, sustancia que no es hidrolizada (23).



Acido salicílico

El ácido acetil salicílico es un agente analgésico, antipirético y antiinflamatorio muy utilizado pues es uno de los medicamentos con mayor demanda en el mundo, lo cual ha suscitado controversias debido a que se ha abusado en su consumo, siendo una de las causas más comunes de intoxicación accidental en los niños y es utilizado frecuentemente con fines de suicidio por adultos. Además, estudios recientes (18), han detectado un nuevo síndrome en niños debido a su uso inadecuado.

Otra causa de intoxicación es la intensa terapia con salicilatos, en el caso de artritis reumatoide y fiebre reumática, que requieren constantemente niveles elevados en plasma (300mg/dl a 400mg/dl), para lograr el efecto antiinflamatorio deseado (7, 29,34).

Por otro lado, al comparar los niveles plasmáticos con la edad del paciente, se encontró que en los lactantes menores de un año se presentó una intoxicación grave con dosis relativamente bajas de salicilatos, mientras que en niños mayores se presenta el mismo cuadro de intoxicación con dosis más altas. No hay una explicación clara de ésta mayor susceptibilidad del lactante, pero podría pensarse que los mecanismos deficientes de la conjugación hepática impida la unión de este fármaco con el ácido glucurónico, ya que la eliminación de los salicilatos se efectúa en un 50% en forma conjugada (2, 8, 13, 15, 32).

Los salicilatos se absorben rápidamente en la porción superior del aparato gastrointestinal y aparecen niveles máximos en sangre de 30 a 45 minutos después de la ingestión.

El ácido acetil salicílico y el metil salicilato se hidrolizan rápidamente, formando el ácido salicílico, la mayor parte del cual se une a la albúmina. El metabolismo se lleva a cabo en muchos tejidos, pero principalmente en el hígado. Los salicilatos libres y sus productos metabólicos, se excretan por el riñón y esta excreción depende del pH urinario (11,15, 20, 27).

Debido a la variabilidad de la dosis, metabolismo y excreción de los salicilatos entre pacientes, resulta esencial el seguimiento de las concentraciones plasmáticas de éstos, para construir regímenes racionales de terapia, evaluar su respuesta y sobre todo evitar la toxicidad. Por esta razón, las estimaciones frecuentes de los niveles plasmáticos de salicilatos demanda un método que cumpla con una serie de características que nos den confiabilidad y rapidez en la obtención de los resultados

Desde hace varios años, se han elaborado diferentes clases de métodos para la determinación de la concentración de salicilatos en tejidos y fluidos biológicos; algunos de estos métodos han sido modificados a través de los años y otros han surgido a la par con los avances tecnológicos (1, 6, 12, 20, 30).

Entre estos métodos tenemos a los de identificación y los de análisis cuantitativo. En estos últimos están incluidos los métodos colorimétricos, a los cuales nos enfocaremos en este trabajo.

El método de Bernal B. Brodie (4), se basa en separar el ácido salicílico del plasma por extracción con dicloruro de etileno; posteriormente se forma, en fase acuosa, un complejo colorido del ión salicilato con el fierro, el cual se determina colorimétricamente. La desventaja de este método es que requiere de un volumen de muestra de 1 a 2 ml; una pequeña cantidad de ácido salicílico en plasma (producto metabólico del ácido salicílico) afecta un poco la lectura y la gran cantidad de ácido salicílico en orina impide el uso de este procedimiento en dicho fluido porque altera mucho la lectura.

El método de Tarnoky y Brews (33), también se basa en la determinación colorimétrica del complejo colorido formado por el ión salicilato con sales férricas, pero este método tiene varias desventajas como son: a) No puede utilizarse plasma oxalatoado ni orina porque se obtiene una solución colorida turbia. b) La determinación no es rápida, ya que requiere de un tiempo aproximado de 45 minutos. c) Los porcentajes de recobro son del 91 al 96%.

El método de Smith y Talbot (22), se basa en la reacción de salicilato con una solución acuosa del reactivo fenólico de Folin Ciocalteu e hidróxido de sodio para dar un complejo colorido, el cual se determina colorimétricamente. Este método tiene la ventaja de que sólo requiere de 0.2ml de muestra; la determinación ocupa sólo 15 minutos y cualquier suero o plasma oxalatoado puede ser utilizado. Por otro lado, tiene la desventaja de que da valores elevados para el blanco y no es específico porque interfieren compuestos fenólicos.

Finalmente el método de Trinder (28), trata de combinar todas las ventajas de los métodos anteriores y para esto utiliza el color púrpura dado por los salicilatos con sales férricas. Para eliminar alguna inhibición de este color por oxalatos o fosfatos se prepara un reactivo con una elevada concentración de nitrato férrico. En la precipitación de las proteínas séricas o plasmáticas se utiliza el cloruro mercúrico y el ácido clorhídrico.

Las ventajas que el método presenta son las siguientes: se requiere una cantidad de muestra de 0.2 a 0.5 ml, el porcentaje de recuperación es alto, el proceso es rápido pues se requieren aproximadamente 15 minutos para la obtención de los resultados, además es de muy bajo costo y de fácil aplicación.

Por otro lado, debe aclararse que la primera etapa en la resolución de problemas analíticos es precisamente su identificación y una vez que este haya sido claramente identificado puede seleccionarse un camino para hallar su solución (31). La elección del método que proporcione la mejor solución del problema es una importante tarea del químico, y debe estar basada en los criterios de practicabilidad y confiabilidad (5). Los aspectos de practicabilidad incluyen la educación, el entrenamiento requerido, la disponibilidad de reactivos, los requerimientos instrumentales, el tiempo de ejecución, el costo y la seguridad.

Los criterios de confiabilidad describen la ejecución analítica del método e identifica donde ocurren más frecuentemente los errores y cuáles son los que conciernen al experimento. Para esto definiremos dos tipos de error (14):

a) Error sistemático: es aquel que se debe a la falta de control de calidad de la técnica analítica, y da lugar a medidas incorrectas.

b) Error aleatorio: es el que permanece aún cuando se han hecho todos los esfuerzos por eliminar el error sistemático y da lugar a medidas imprecisas.

Por lo tanto, el error sistemático puede disminuirse a su mínimo valor con un control de calidad adecuado. El error aleatorio de un método analítico debe validarse.

La validación se define como el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio que el método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación de un método analítico consiste en determinar cuantitativamente el error sistemático y el aleatorio, por lo tanto tiene como objetivo evaluar la exactitud y establecer la variabilidad del método.

Los aspectos que se consideran necesarios para validar un método analítico son: linealidad, precisión, perfil de precisión y exactitud del sistema de medición; y por otro lado la linealidad, precisión, exactitud, límite mínimo de detección; estabilidad de la muestra y tolerancia del método (3, 5, 10, 14, 16, 19, 24, 25, 26,35).

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

MARCO TEORICO.

1.-Linealidad del sistema de medición.

Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad física, química o biológica con la concentración del analito . Se determina construyendo una curva de calibración de una solución estándar, utilizando cuando menos cinco concentraciones y haciendo análisis por duplicado para cada una. Las concentraciones a analizar dependerán del propósito del método, pero en el caso de fármacos en fluidos biológicos deben cubrir el intervalo de valores clínicamente útiles y donde además se demuestre que existe precisión, exactitud y linealidad, entre más concentraciones se utilicen, mejor será la evaluación de la linearidad. Para evaluaciones de la estabilidad de un fármaco y el seguimiento del mismo en un fluido biológico, deberá estar incluido el 100% de la dosis, el cual se define como la concentración máxima terapéutica en el plasma, a partir de la cual también comienzan a observarse efectos tóxicos (5, 14, 16).

2.- Precisión del sistema de medición.

Es expresada en términos de repetibilidad y se define como la concordancia relativa obtenida entre una serie de mediciones repetidas realizadas por un solo analista, utilizando los mismos aparatos y las mismas condiciones del sistema de medición. Se determina por el análisis quintuplicado de una solución estándar correspondiente al 100% de la dosis, la desviación estándar y el coeficiente de variación definen el grado de imprecisión del sistema (5, 14, 24, 25, 35).

No se puede tener exactitud si no se tiene precisión.

3.- Perfil de precisión del sistema de medición.

Sirve para evaluar en que niveles de concentración existe mayor imprecisión.

Se obtiene graficando en el eje de las "Ys" el coeficiente de variación (CV) de cada uno de los puntos de la curva de calibración en agua contra su respectiva concentración en el eje de las "Xs". Observándose cuales puntos de la curva son los que presentan mayor imprecisión (24).

4.-Exactitud del sistema de medición.

Es el grado de concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (cifra verdadera). Se determina con la diferencia numérica entre la media de una serie de mediciones replicadas y el valor real (se puede expresar como el porcentaje del valor verdadero)(5, 14, 16, 24, 25, 35).

5.-Linealidad del método.

Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la misma (cantidad de fármaco adicionado). La linealidad del método se determina adicionando al plasma diferentes cantidades conocidas de la sustancia en estudio, cada una de manera independiente. Estas cantidades se establecen en base a las concentraciones plasmáticas encontradas más comúnmente, incluyendo el 100% de la dosis y en donde se demuestre que el método es preciso exacto y lineal.

Los resultados obtenidos se grafican como porcentajes adicionados contra porcentajes recuperados. El valor de la pendiente y la ordenada al origen con sus respectivos intervalos de confianza nos indicarán si difieren significativamente del valor de la pendiente $m=1$ (con un ángulo de 45°) y del valor del intercepto $b=0$ (ordenada al origen). El cálculo del error estándar de regresión nos da una idea cuantitativa del grado de desviación existente por estimación de la recta de regresión (5, 14, 24, 25).

6.- Precisión del método.

Se define como el grado de concordancia relativa entre resultados analíticos individuales o independientes de un procedimiento. La precisión mide el grado de repetibilidad y/o reproducibilidad del método (5,14, 24, 25, 35).

a) Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones individuales realizadas por un solo analista, utilizando el mismo equipo y técnicas. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación, el cual expresa el porciento de desviación del método.

b) Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes tiempos, en el mismo y/o diferente equipo, ambiente físico, etc. Para evaluar la reproducibilidad se utiliza el análisis de varianza.

7.- Exactitud del método.

Una técnica analítica es más exacta cuando existe mayor concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia. La estimación de la exactitud de un método está asociada con el error total, el cual es la suma del error sistemático y aleatorio. La medida de la exactitud de un método analítico queda perfectamente definida por la media de las observaciones realizadas y el intervalo de confianza al 95% de probabilidad.

Si nosotros conocemos el valor real podemos conocer la exactitud del método. Por lo tanto, la mejor aproximación que podemos hacer es medir cantidades conocidas del compuesto. La exactitud del método puede variar dependiendo de la concentración y por lo cual no sería satisfactorio evaluar una sola concentración; el procedimiento a seguir será comenzar con "n" ensayos de cuando menos tres concentraciones diferentes. Si la media y los límites de confianza nos dan información que nos hagan desconfiar de la exactitud del método, podemos hacer dos ensayos más; si la inexactitud persiste, el método no es exacto (5, 14, 24, 25, 35).

8.- Límite mínimo de detección.

Es la menor cantidad detectable del compuesto en análisis. También puede definirse como la mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Es diferente de los valores obtenidos por un blanco (3, 5, 14, 32, 35).

9.- Estabilidad de la muestra.

En algunas ocasiones es conveniente conocer la estabilidad del fármaco y los componentes de la muestra, cuyos productos de degradación interfieren con el análisis; lo que en muchos casos puede ser la causa de una falta de exactitud y/o precisión de la técnica. Esto es necesario si las muestras van a ser almacenada un tiempo relativamente largo (por ejemplo: fármacos en fluidos biológicos). En cada caso lo recomendable es efectuar ensayos a intervalos preestablecidos y almacenando las muestras en las condiciones más adecuadas (14).

10.- Tolerancia del método.

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de las mismas muestras, bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, condiciones ambientales, longitudes de onda, pH, tiempos de reacción, etc. (14, 16, 35).

CAPITULO 3

FARMACOLOGIA

FARMACOLOGIA

A) PROPIEDADES FARMACOLOGICAS (23).

I) Propiedad antiinflamatoria.

Es la más importante acción de los salicilatos y se ejerce sobre los tejidos inflamados, disminuyendo la vasodilatación y permeabilidad capilar y por lo tanto la inflamación.

En los últimos años se ha descubierto que los salicilatos inhiben de forma competitiva la biotransformación de los ácidos grasos insaturados precursores de las prostaglandinas PGE, PGE-2 y PGF-2; las cuales producen una acción directa en la vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, que son los factores esenciales para producir la inflamación. Por otro lado se cree que las prostaglandinas tienen una acción indirecta sobre el aumento de la acción de las quininas que también provocan vasodilatación y permeabilidad capilar.

II) Propiedad analgésica.

La acción analgésica se ejerce especialmente en el dolor inflamatorio de estructuras somáticas como músculo, articulaciones, nervios, dolor dentario y cefalea. Dicha acción no es muy potente ya que produce un ascenso máximo del umbral para el dolor del 35% con dosis de 30 a 180 mg/ml por vía oral, lo cual indica que disminuye el dolor pero no lo desaparece.

La acción analgésica de los salicilatos se lleva a cabo de la siguiente manera:

1) Acción periférica:

a) Mecanismo directo: Impide la sensibilización de los receptores periféricos del dolor (quimiorreceptivos) por antagonismo con la bradiquinina que es la que lo produce.

b) Mecanismo indirecto: Se debe a la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas PGE, PGE-2 y PGF-2, que aumentan la acción de la bradiquinina.

2) Acción central.

Se piensa que los salicilatos actúan deprimiendo el tálamo óptico el cuál es uno de los centros fundamentales de las sensaciones dolorosas, pero el mecanismo como lo hace no se conoce.

III) Propiedad antipirética.

La acción antipirética de los salicilatos, se debe a que actúa descendiendo el nivel del centro térmico hipotalámico a un nivel inferior normal, produciendo un transporte de agua desde los tejidos a la sangre, con aumento del volumen plasmático y disminución de los elementos sólidos, lo que favorece la pérdida de calor por vasodilatación cutánea y la sudoración.

a) Mecanismo de acción directa.

Se realiza por inhibición competitiva con el pirógeno endógeno liberado por los leucocitos polimorfonucleares, que actúan sobre el centro termorregulador del hipotálamo para provocar el ascenso de la temperatura.

b) Mecanismo de acción indirecta.

Se debe a la inhibición competitiva de la biosíntesis de las prostaglandinas PGE, PGE-2, PGF-2, que son unos agentes pirogénicos potentes.

B) FARMACOCINETICA.

1.-ABSORCION (23)

a)Gastrointestinal

Por vía oral los salicilatos se absorben rápidamente en el estómago y sobre todo en la porción superior del intestino delgado

El salicilato de sodio se transforma a ácido salicílico ($pK_a=3.0$) en el medio ácido del jugo gástrico ($pH=1.4$); el ácido acetyl salicílico ($pK_a=3.5$) se absorbe como tal; dichos ácidos se encuentran poco disociados y esta ionización depende del pH del medio por lo que se absorben fácilmente en el estómago y en el duodeno ($pH=5.3$) por transporte pasivo.

En el hombre después de la ingestión de 1 a 6 gramos de salicilato de sodio se detecta una salicilemia (niveles de salicilato en sangre) alta a los 30 minutos después de la ingestión y se alcanza el máximo a las 2 o 3 horas para luego descender encontrándose concentraciones registrables a las 24 horas.

A nivel del intestino delgado los ésteres del ácido acetyl salicílico se hidrolizan parcialmente y la aspirina se absorbe como tal y como salicilato; si se administra una dosis de 1 a 2 gramos se observa una salicilemia importante a los 30 minutos (debida al ión salicilato liberado de hidrólisis del ácido acetyl salicílico y al salicilato total), alcanzando su máximo a las 2 horas encontrándose aún niveles registrables a las 24 horas.

b) Rectal.

La absorción es más lenta que cuando se administra por vía oral y no se puede confiar que por esta vía se obtengan acciones útiles sobre todo cuando se requieren de dosis altas como en la fiebre reumática.

c) Parenteral.

Por las vías subcutáneas e intramuscular los salicilatos se absorben, pero debido a la acción irritante no se utiliza por dichas vías.

2.-DISTRIBUCION.

Una vez absorbidos los salicilatos, pasan a la sangre donde se unen a las proteínas plasmáticas, el 85% está unido a la albúmina mientras que el resto se adhiere a las globulinas alfa y beta. La fracción del salicilato unido a la proteína incluye primariamente al grupo carboxílico libre, pero el grupo orto-fenólico aumenta marcadamente la atracción de las proteínas. La aspirina como tal experimenta poca o ninguna fijación, por tal motivo es evidente que este medicamento sea completamente hidrolizada a salicilato en la sangre o de otro modo no causaría el efecto farmacológico deseado (15, 11, 21).

La concentración de salicilato usualmente es mayor en el suero que en la sangre total. Se cree que la membrana del eritrocito es fácilmente permeable al fármaco pero éste no es fijado por las proteínas de los eritrocitos.

Desde la sangre los salicilatos pasan a los tejidos distribuyéndose en todos los órganos y líquidos corporales como la saliva, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial en concentraciones variables e inferiores a las de la sangre.

En algunos casos se ha medido la concentración de salicilatos en líquido articular, aunque las concentraciones no ligadas en el plasma y el líquido sinovial son esencialmente iguales, la concentración total del líquido articular es solamente la mitad de la concentración plasmática máxima, puesto que el líquido articular contiene menos proteína y por lo mismo menos medicamento ligado a las mismas.

Los salicilatos se distribuyen a través de un volumen de agua corporal mucho mayor que el del líquido extracelular. Estudios en ratas mostraron que las concentraciones en hígado, pulmón y riñones eran similares a las del suero. Cuando se calcula la concentración de salicilatos sobre la base del contenido acuoso el hígado contiene aproximadamente dos tercios de lo que contiene el suero y el músculo alrededor de un quinto.

El paso a través de la barrera meníngea es relativamente incompleto. Después de la administración de la aspirina o de salicilato se encuentra salicilato en agua del cerebro en ratas y alcanza un máximo de un 10% de la concentración plasmática.

Es de interés mencionar que la insulina aumenta notablemente la acción analgésica y su concentración en el cerebro y en otros tejidos tanto en animales normales como en animales diabéticos.

Aparentemente los salicilatos cruzan la barrera placentaria. Cuando se dan grandes dosis de salicilato de sodio a conejas embarazadas la concentración de salicilato en suero fetal es aproximadamente dos tercios de la concentración en el suero materno. Los salicilatos también se encuentran en la leche.

3.-CONJUGACION Y DEGRADACION.

En el organismo, los ésteres hidrolizados parcialmente en el intestino del ácido salicílico así como los del ácido acetil salicílico, son totalmente hidrolizados por esterasas plasmáticas y tisulares.

El ión salicílico circulante en sangre se conjuga con la glicina para dar ácido salicílico y con el ácido glucurónico forma aproximadamente en partes iguales un glucurónico estérico y otro etérico.

La oxidación de salicilato a ácido genticónico ocurre en pequeño grado y se forma el ácido 2,5-dihidroxibenzoico y el ácido 2,3,5-trihidroxibenzoico

4.-EXCRECION

El salicilato administrado es excretado primariamente en la orina y si es absorbido por frotación en la piel, comienza a excretarse en menos de 15 minutos después de la aplicación, la excreción renal se realiza por filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular, y esto depende del pH urinario, ya que cuando la orina es ácida el salicilato está poco ionizado y se produce una intensa reabsorción tubular por lo que se eliminaría lentamente; en cambio cuando el pH es alcalino el fármaco está muy ionizado (es hidrosoluble) y no se reabsorbe en los túbulos renales, eliminándose rápidamente. Por otra parte al pH normal de la orina la eliminación es lenta con una vida media de 5.5 horas.

Las proporciones relativas de salicilato excretado en orina son las siguientes: Para el salicilato de sodio y la aspirina, se excreta como promedio 61% de ácido salicílico libre; 22% como glucurónico éter; 5% como glucurónico éster; 8% como ácido salicílico y un 1% como ácido genticónico (15, 11, 21).

C) TOXICIDAD.

A pesar de su toxicidad relativamente baja los salicilatos son causantes de un gran número de intoxicaciones desde leves, graves e incluso mortales.

En general la aparición de los síntomas tóxicos está en relación con la concentración plasmática con un nivel de 30 a 40 mg/100 ml.

Existen varias formas de intoxicación con salicilatos, las cuales se mencionan a continuación:

a) Sensibilización alérgica.

Se observa especialmente con la aspirina aún con dosis pequeñas y se manifiesta con erupción cutánea; edema angioneurótico, afectando la cara, lengua, laringe; acceso asmático y puede ser mortal.

b) Intoxicación leve o salicilismo.

Se presenta con niveles plasmáticos por arriba de los 30 mg/100 ml provocando trastornos nerviosos, gastrointestinales, respiratorios, metabólicos y hematológicos.

c) Intoxicación grave

Se presenta con concentraciones elevadas en plasma de aproximadamente 70 a 100 mg/100 ml y el cuadro es semejante al del coma diabético, presentando manifestaciones nerviosas, metabólicas y circulatorias.

d) Intoxicación mortal .

La dosis mortal usual en adultos con excepción de las personas hipersensibles a los salicilatos se encuentra entre los 20 a 30 gramos, pero algunos pacientes han sobrevivido a 130 g de aspirina.

CAPITULO 4

MATERIAL Y METODO

MATERIAL

Reactivos, equipo y material de laboratorio.

a)Material biológico:

-Plasma humano

b)Reactivos:

-Salicilato de sodio (Merck)

-Cloruro mercúrico (Merck)

-Nitrato Férrico nonahidratado (Merck)

-Acido clorhídrico concentrado (J.T. Baker)

-Cloroformo (Merck)

-Agua desionizada (Resistencia = 1.2 ohms a 22°C)

c)Equipo:

-Espectrofotómetro digital de CARL ZEISS Modelo PM6

-Celdas de vidrio de 1cm. de longitud de paso óptico

-Microbalanza o balanza analítica

-Balanza granataria

-Conductímetro

-Parrilla eléctrica

-Agitador en vortex

-Bomba de vacío

-Campana extractora

d)Material de laboratorio

-1 vaso de precipitados de 5 ml

-10 vasos de precipitados de 100 ml

-3 vasos de precipitados de 250 ml

-1 vaso de precipitados de 600 ml

-2 vasos de precipitados de 1000 ml

-10 matraces volumétricos de 5 ml

-10 matraces volumétricos de 10 ml

-10 matraces volumétricos de 100 ml

-2 matraces volumétricos de 250 ml

-2 matraces volumétricos de 1000 ml

-1 matraz Kitazato para vacío de 1000 ml

-2 probetas graduadas de 100 ml

-1 pipeta automática (Ependorf) de 500 ml

-Puntas para pipeta Ependorf

-2 pipetas graduadas de 1 ml

- 3 pipetas graduadas de 5 ml
- 4 pipetas graduadas de 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1,2,3,5,10 y 20 ml
- 2 agitadores de vidrio
- 1 embudo Buckner para filtración al vacío
- 6 frascos con tapón esmerilado de color ámbar de 1 litro
- 4 frascos con tapón esmerilado de color ámbar de 100 ml
- 50 frascos viales con tapón de hule de color ámbar de 20 ml
- 60 tubos de ensayo de 13X100 mm
- 3 gradillas de 72 espacios
- 1 espátula
- Papel filtro Whatman del No. 4 y 5
- Etiquetas
- papel parafilm

METODO

Se utiliza la absorbancia dada por el complejo formado con salicilato y sales férricas. Para eliminar cualquier inhibición en la formación del complejo colorido por fosfatos u oxalatos, se prepara un reactivo que contiene una elevada concentración de nitrato férrico. Para la precipitación de proteínas en el plasma, se incorpora cloruro mercuríco y ácido clorhídrico en la solución.

CAPITULO 5

DESARROLLO EXPERIMENTAL

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Preparación del reactivo y soluciones

a) Reactivo de Trinder:

Con la ayuda del calor, 40 g de cloruro mercuríco se disuelven en 650 ml de agua desionizada; la solución se deja que alcance la temperatura ambiente y se adicionan 120 ml de ácido clorhídrico (1 N). Finalmente se agregan 40 g de nitrato férrico nonahidratado, disueltos previamente en agua desionizada. Cuando todos los reactivos se hayan mezclado, el volumen de la solución se lleva a un litro con agua.

b) Solución Stock de salicilato de sodio en agua desionizada:

Se pesan 290 mg de salicilato de sodio y se disuelven en agua y se aforan a un volumen de 250 ml para tener una concentración final equivalente a 1000 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico. Antes de almacenar esta solución, se adicionan unas cuantas gotas de cloroformo como conservador.

c) Solución estándar de salicilato de sodio en agua desionizada:

A partir de la solución Stock anterior, se preparan soluciones estándar de salicilato de sodio conteniendo el equivalente a 10,30,50,70,100,200,300,400 y 500 $\mu\text{g/ml}$.

d) Solución Stock de salicilato de sodio en plasma:

Se pesan 57 mg de salicilato de sodio y se disuelven en plasma para obtener un aforo final de 50 ml. Esta solución tiene una concentración final de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de salicilato de sodio.

e) Solución estándar de salicilato de sodio en plasma:

-A partir de la solución Stock en plasma, se preparan soluciones estándar de salicilato de sodio con concentraciones equivalentes a 40,80,160,200,360,400,440,480 y 520 $\mu\text{g/ml}$.

f) Preparación del complejo colorido de salicilato de sodio en agua:

Colocar en un tubo de ensaye 2.5 ml de reactivo de Trinder y adicionar 0.5 ml de solución estándar de salicilato de sodio en agua, agitar el tubo durante la adición por 30 segundos. Posteriormente esta solución se transfiere a una celda de vidrio para ser leída en el espectrofotómetro a 540 nm. El blanco para ajustar a cero, es una mezcla de 2.5 ml de reactivo de Trinder y 0.5 ml de agua desionizada.

g) Preparación del complejo colorido de salicilato de sodio en plasma:

Colocar en un tubo de ensaye 2.5 ml de reactivo de Trinder y adicionar 0.5 ml de solución estándar de salicilato de sodio en plasma, agitar el tubo durante la adición por 30 segundos para asegurar que la proteína precipitada sea finamente dispersada, posteriormente se centrifuga a 2300 r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante se filtra y el filtrado se transfiere a una celda de vidrio para ser leído a 540 nm. El blanco para ajustar a cero, es una mezcla de 2.5 ml de reactivo de Trinder y 0.5 ml de plasma sin salicilato.

Análisis de muestras en agua.

1) Linealidad de sistema de medición:

Se realizan análisis por triplicado de soluciones estándar de salicilato de sodio en agua en concentraciones de 10,30,50,70,100,200,300,400 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se obtienen los promedios de absorbancia de cada concentración los cuales se grafican relacionando la concentración contra la absorbancia. Esto es con el fin de verificar si dicha relación presenta un comportamiento lineal. La linealidad del sistema de medición se verifica gráficamente y además se corrobora con el análisis de regresión lineal.

Todo el proceso que se sigue para la determinación de la linealidad del sistema se realiza en dos días diferentes, por lo que se obtiene una curva por día y a las cuales se les hace la prueba de t-Student (anexo 2), para verificar si existe diferencia significativa entre las pendientes de las dos rectas y si ambas tienen como intercepto el cero, obteniéndose como resultado de la prueba estadística que no existe diferencia significativa entre las dos pendientes y además ambas tienen como origen al cero. De acuerdo al resultado de la prueba t-Student se procede a la elaboración de una sola curva de linealidad del sistema de medición, la cual es construida a partir de la relación entre la concentración y el promedio de las seis lecturas de absorbancia obtenidas en los dos días (ver fig.1).

2) Precisión del sistema de medición:

Se determina por el análisis de cinco réplicas de una solución estándar de concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$, que corresponde al 100% de la dosis. Dicho análisis se realiza en dos días diferentes. El criterio de precisión del sistema se define con el promedio de los coeficientes de variación de los dos días (cuadro 1).

3) Perfil de precisión del sistema de medición.

Se prepararon concentraciones baja y altas de silicato de sodio en agua y se determinó la absorbancia promedio a 540 nanómetros la cual proviene de un análisis por triplicado de cada nivel de concentración, obteniéndose también los respectivos coeficientes de variación los cuales se grafican contra la concentración y así determinar las concentraciones que presentan mayor imprecisión (ver fig. 2).

4) Exactitud del sistema de medición.

La exactitud del sistema de medición del ácido salicílico en agua se valora comparando la concentración teórica de cada uno de los puntos de la curva (como el 100%) y la concentración experimental, calculándose el porcentaje de recuperación para cada nivel. Los diferentes porcentajes obtenidos se suman y se dividen entre el número de estándares para obtener la recuperación promedio, la cual entre más cercana sea a 100 indicará una mayor exactitud (cuadro 2).

Análisis de muestras en plasma.

5) Linealidad del método.

La elaboración de la curva estándar de salicilatos en plasma se establece relacionando la concentración y sus respectivos promedios de absorbancia (proviene de 6 réplicas) los cuales se interpolan en la gráfica de linealidad del sistema con el fin de obtener los porcentajes de fármaco recuperado y conocer la relación existente entre los microgramos adicionados contra los microgramos recuperados. A estos resultados también se les hace el análisis de regresión (ver fig. 3).

6) Exactitud del método:

Debido a que la exactitud puede variar dependiendo de la concentración, es necesario seleccionar por lo menos tres concentraciones diferentes. En este estudio se evaluó la exactitud de todas las concentraciones con las que se elaboró la linealidad del método (40, 80, 160, 200, 240, 360, 400, 440 y 520 $\mu\text{g/ml}$ plasma). Se hicieron análisis de 6 réplicas para cada concentración, a los resultados obtenidos se les determinó la absorbancia promedio, el coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación para cada nivel.

La exactitud del método queda definida con el promedio del porcentaje de recuperación total y sus respectivos intervalos de confianza (cuadro 3).

7) Precisión del método.

a) Precisión expresada en términos de repetibilidad.

Donde se establece que las evaluaciones se hacen con un mismo analista, mismo equipo, mismo día y bajo un estricto control de calidad. Se obtiene a partir de los resultados de la figura 6 sólo que los parámetros que determinan el grado de repetibilidad son el coeficiente de variación.

b) Precisión expresada en términos de reproducibilidad.

Cuando introducimos más de una variación en las condiciones de operación, la precisión se evalúa con el análisis de varianza ya que las determinaciones se realizan con diferentes analistas, diferentes concentraciones y diferentes días.

La forma como se evalúa es realizando respectivamente análisis por quintuplicado de soluciones plasmáticas con concentraciones de 40, 200, 400 y 520 $\mu\text{g/ml}$. Esto se hizo en dos días diferentes y con dos analistas diferentes, cuadros (4, 5, 6 y 7).

8.-Límite mínimo de detección.

Para la determinación de este se utilizaron dos métodos de evaluación:

a) Método gráfico.

Cuando se trabaja con fluidos biológicos la concentración mínima detectable se debe establecer experimentalmente. Para esto se eligió la concentración correspondiente al 40 $\mu\text{g/ml}$, la cual cumple con los requisitos de precisión y exactitud. A partir de aquí la concentración se va disminuyendo en intervalos pequeños manejándose de esta manera concentraciones, equivalentes a 2,6,10,20,30 y 40 $\mu\text{g/ml}$.

Para la determinación de dichos límites se realizan análisis por quintuplicado de soluciones plasmáticas que contienen cada una las concentraciones de salicilatos antes mencionados. posteriormente se hace una gráfica de la concentración de salicilatos contra los promedios de absorbancia.

La evaluación del límite mínimo de detección a partir de lo anterior se hizo gráficamente utilizando intervalos de confianza y el ruido del aparato (ver fig. 4)

b) Método estadístico.

A partir de este método el límite mínimo de detección se obtuvo de diferentes formas. Primero se utilizaron los resultados obtenidos para la evaluación por el método gráfico (fig. 4) y a partir de dichos valores se obtuvieron los resultados del cuadro 8 el cual contiene los parámetros que evalúan el límite mínimo de detección por el método estadístico (19).

Por otro lado se obtuvieron los límites mínimos de detección por este método a concentraciones altas, utilizando los resultados obtenidos en la linealidad del sistema de medición (fig. 1) y los de la curva de calibración en plasma y de ahí se derivaron los cuadros 9 y 10. los cuales también contienen los parámetros que evalúan el límite mínimo de detección por el método estadístico.

9.-Estabilidad de la muestra.

Para su evaluación lo primero que se hizo es preparar 25 ml de solución estándar de salicilato en plasma con las concentraciones de 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$ cada una, estas soluciones son las que se analizan durante este estudio.

Por otro lado cada solución se divide en alícuotas de 5 ml y se almacenan a 4°C y en la obscuridad junto con una solución de plasma sin salicilato para la preparación del blanco. El mismo día que se prepararon las soluciones se hace el análisis por sextuplicado y se obtienen los resultados del día 1, posteriormente las alícuotas que se encuentran almacenadas se extraen de esas condiciones y se dejan que alcance la temperatura ambiente para poder así ser analizadas. Este último proceso se repite tres veces más pero con la diferencia de que las soluciones que se están analizando corresponden a soluciones que tienen diferencias en el tiempo de almacenamiento de 7, 15 y 30 días respectivamente cuadro 11 y 12.

La evaluación de la estabilidad de la muestra se hizo utilizando el método de Dunnet.

10.-Tolerancia del método

La aplicación de variaciones ajenas al método, nos sirve para conocer hasta donde podemos variar las condiciones de trabajo sin que los resultados obtenidos difieran significativamente con respecto a los obtenidos en el procedimiento original.

A partir de esto, para determinar la tolerancia del método en nuestro experimento se eligieron las siguientes variaciones:

a) Variación de la longitud de onda.

Se hizo el espectro de absorción de una solución de salicilato de sodio en agua con una concentración de 214.00 µg/ml.

La longitud de onda fue variada con el fin de precisar la longitud de onda de máxima absorción. Los resultados obtenidos son mostrados en el cuadro 13, en donde se puede ver que la máxima absorción se encuentra dentro del intervalo de longitudes de onda de 520 a 540 nanómetros, ya que las variaciones de absorbancia obtenidas en dicho intervalo son muy pequeñas y pueden deberse a variaciones incluso del ruido del aparato.

b) Variación de la concentración de ácido clorhídrico utilizado en la preparación del reactivo de Trinder.

Se quiso verificar el efecto que tenía la disminución de la concentración de ácido clorhídrico, para esto se prepararon varias soluciones de ácido clorhídrico con concentraciones de 0.04, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 Normal, cuadro 14

El reactivo de Trinder fué preparado bajo las mismas condiciones que el procedimiento original, a excepción de que la concentración de ácido clorhídrico utilizado cambio, es importante mencionar que no se midió el pH.

Por otro lado se prepararon soluciones de salicilato de sodio en agua desionizada de la concentración de 10,20,30,40, y 50 $\mu\text{g/ml}$. y a partir de estas concentraciones se prepararon soluciones de producto colorido por duplicado.

Los resultados obtenidos son representados en el cuadro 14.

c) Estabilidad del producto colorido.

Se prepararon tres soluciones de salicilato de plasma de una concentración de 10,200 y 400 $\mu\text{g/ml}$, a partir de estas soluciones se prepararon 14 ml del producto colorido, utilizando una porción diferente de esta solución en cada determinación las cuales fueron leídas en diferentes intervalos de tiempo (15,30,60,90 y 120 minutos cada una). Los resultados son mostrados en el cuadro 15.

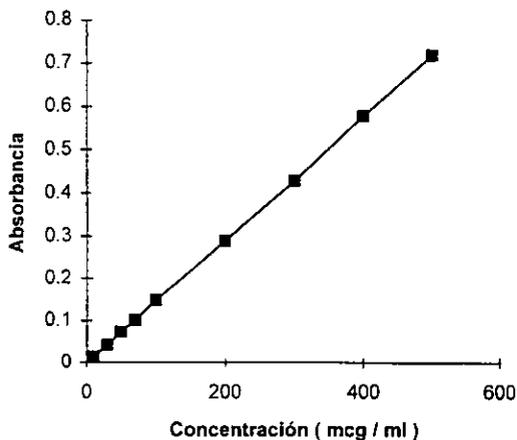
CAPITULO 6

RESULTADOS

RESULTADOS

GRAFICAS Y TABLAS

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION



mcg / ml	Abs (540)
10	0.014
30	0.041
50	0.0723
70	0.0995
100	0.147
200	0.288
300	0.427
400	0.5767
500	0.7172

$$r^2 = 0.999934$$

$$m = 1.436 \times 10^{-3}$$

$$b = -7.285 \times 10^{-5}$$

$$t_{\text{exp}} = 0.0755$$

$$t_{0.95,8} = 2.31$$

Figura 1.-Linealidad del sistema de medición.

Las lecturas de absorbancias son obtenidas a 540 nm y provienen del promedio de 6 réplicas para cada concentración la cual es expresada en μg de ac. salicílico/ml de agua.

PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

Absorbancia (día 1)	Absorbancia (día 2)
0.561	0.568
0.559	0.573
0.560	0.562
0.560	0.576
0.565	0.572

$$\bar{X}_{DIA1} = 0.561$$

$$\bar{X}_{DIA2} = 0.570$$

$$s_{DIA1} = 2.35 \times 10^{-3}$$

$$s_{DIA2} = 5.40 \times 10^{-3}$$

$$CV_{DIA1} = 0.48\%$$

$$CV_{DIA2} = 0.95\%$$

$$\bar{X}_{TOTAL} = 0.566$$

$$s_{TOTAL} = 6.24 \times 10^{-3}$$

$$CV_{TOTAL} = 1.10\%$$

Cuadro 1-Precisión del sistema de medición.

Se realiza el análisis de cinco réplicas de la concentración de 400 µg/ml en dos días diferentes, obteniéndose la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación de cada día y el total de los dos días. Las lecturas de absorbancia son obtenidas a 540 nm. Los coeficientes de variación de cada día y el coeficiente de variación total de los dos días nos indican que el sistema es preciso

PERFIL DE PRECISION DEL SISTEMA DE MEDION

C($\mu\text{g/ml}$)	CV(%)
0.43	33
0.86	36
1.29	32
1.71	0
2.15	10
3.43	14
5.14	11
6.86	7.7
8.57	6.3
10	2.8
18	3.4
26	1.4
35	4.2
43	0.7
52	2.0
60	2.0
69	1.0
77	1.3
86	0.4
171	0.35
257	0.36
343	1.0
429	0.21

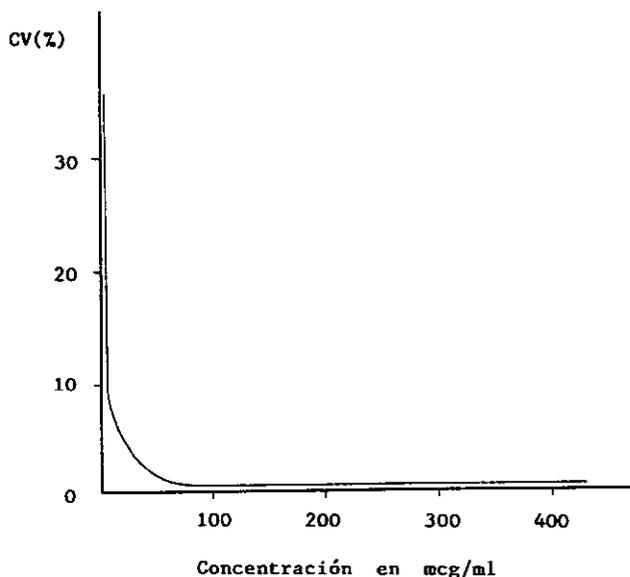


Figura 2.- Perfil de precisión del sistema de medición

Se prepararon concentraciones bajas y altas de salicilato de sodio en agua y se determinó la absorbancia a 540 nm de un análisis por triplicado de cada nivel de concentración, obteniéndose los coeficientes de variación los cuales van a ser graficados contra la concentración. Como se puede observar en el rango de concentraciones de 10 a 420 $\mu\text{g/ml}$ los coeficientes de variación son menores del 5% lo cual nos indica que los resultados son precisos, sin embargo en las concentraciones por abajo de este intervalo se obtienen coeficientes de variación mayores del 5% lo que nos indica la imprecisión de las determinaciones.

EXACTITUD DEL SISTEMA DE MEDICION

$C_{teorico}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$C_{experimental}$ ($\mu\text{g/ml}$)	%RECUPERACION
10	9.71	97.10
30	28.52	95.07
50	50.33	100.66
70	69.29	98.99
100	102.39	102.39
200	100.30	100.30
300	99.17	99.17
400	100.46	100.46
500	99.95	99.95

$$\bar{x} = 99.34$$

$$s = 2.15$$

$$CV = 2.16\%$$

$$LCI_{95\%} (95 - -104)$$

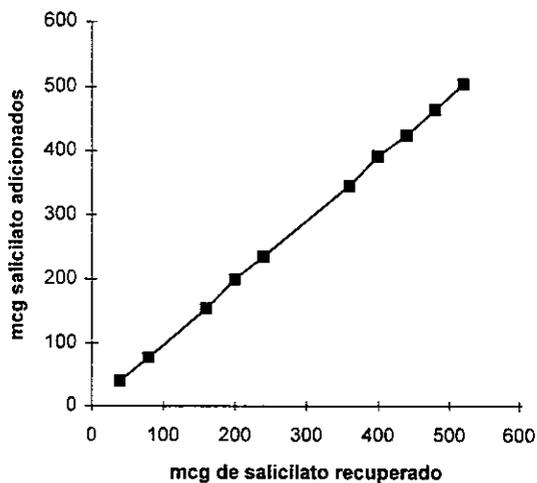
Cuadro 2.-Exactitud del sistema de medición.

Debido a que la exactitud puede variar dependiendo de la concentración, se muestra su evaluación en todo el intervalo de concentraciones de la curva de calibración, determinando los porcentaje de recuperación de cada nivel y finalmente obtener la recuperación promedio, la cual mientras más cercana sea a 100 indicará una mayor exactitud. La concentración está expresada en μg de ác. salicilico/ml de agua. De acuerdo a los resultados se observa que el sistema de medición es exacto en ese intervalo de concentraciones.

LINEALIDAD DEL METODO

Adiciona Recuperados
mcg / ml mcg / ml

40	38.94
80	76.08
160	153.16
200	199.01
240	233.6
360	344.34
400	390.66
440	423.28
480	463.32
520	503.84



$$r^2 = 0.9998$$

$$m = 0.9664$$

$$b = 0.4001$$

$$t_{\text{exp}} = 0.257$$

$$t_{0.95,9} = 2.26$$

Figura 5.- Linealidad del método

Las lecturas de absorbancia son obtenidas a 540 nm y provienen del promedio de réplicas para cada concentración, la cual es expresada en μg de salicilato/ml plasma

EXACTITUD Y PRECISION DEL METODO

C(µg/ml)	Absorbancia	CV(%)	%Recuperación
40	0.055	2.55	98
80	0.109	2.11	97
160	0.221	1.80	99
200	0.286	2.38	102
240	0.334	0.51	99
360	0.501	1.34	99
40	0.566	1.08	101
440	0.611	0.72	99
480	0.663	1.66	99
520	0.727	0.98	100

$$\% \text{Rec}_{\text{promedio}} = 99$$

$$s = 1.42$$

$$CV = 1.43\%$$

$$IC_{95\%} (96 - 102)$$

Cuadro 3.-Exactitud y precisión del método.

Se obtuvieron los promedios de absorbancia (a partir de 6 réplicas), los coeficientes de variación y los porcentajes de recuperación para cada nivel de concentración, y finalmente se obtiene el % de recuperación promedio el cual nos indica el grado de exactitud del método. La concentración está expresada en µg. de salicilato/ml plasma y las lecturas de absorbancia se obtuvieron a 540 nm. Los resultados nos indican que el método es preciso y exacto en ese intervalo de concentraciones

PRECISION DEL METODO EXPRESA EN TERMINOS DE REPRODUCIBILIDAD PARA LAS CONCENTRACIONES DE 40 Y 200 $\mu\text{g/ml}$

Fuente de variacion	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	F tablas
Analista	1	629.88	629.88	22.46	F1=18.5 F2=98.5
Día	2	56.08	28.04	3.46	F1=3.63 F2=6.23
Error	16	123.27	7.70		

Cuadro 4.-Precisión del método en términos de reproducibilidad.

Análisis de varianza para la concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ aplicando el diseño factorial 2 x 2 con el día anidado en el analista. F1 y F2 son obtenidos de tablas al 95 y 99% respectivamente.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	F tablas
Analista	1	5.53	5.53	1.23	F1=18.5 F2=98.5
Día	2	9.03	4.52	8.14	F1=3.63 F2=6.23
Error	16	8.88	0.55		

Cuadro 5.-Precisión del método en términos de reproducibilidad.

Análisis de varianza para la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ aplicando el modelo factorial 2 x 2 con el día anidado en el analista. F1 y F2 son obtenidas de tablas al 95 y 99% respectivamente.

PRECISION EL METODO EXPRESADA EN TERMINOS DE REPRODUCIBILIDAD PARA LAS CONCENTRACIONES DE 400 Y 520 $\mu\text{g/ml}$.

Fuente De variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	F de tablas
Analista	1	25.33	25.33	5.27	F1=18.5 F2=98.5
Día	2	9.61	4.81	7.68	F1=3.63 F2=6.23
Error	16	10.02	0.63		

Cuadro 6.-Precisión del método en términos de reproducibilidad.

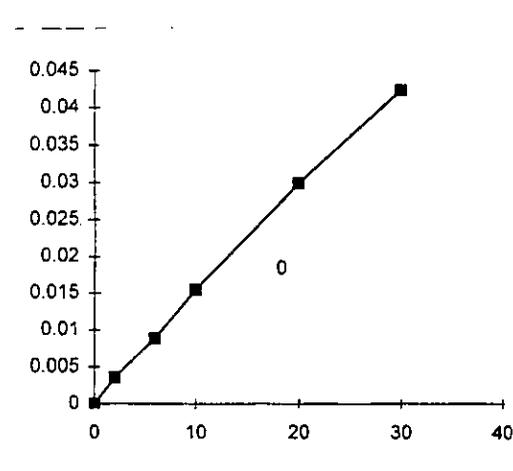
Análisis de varianza para la concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$, aplicando el diseño factorial 2 x 2 con el día anidado en el analista. F1 y F2 son obtenidos de tablas al 95 y el 99% respectivamente.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcalc.	Ftab.
Analista	1	22.17	22.17	0.78	F1=18.5 F2=98.5
Día	2	56.34	28.17	42.23	F1=3.63 F2=6.23
Error	16	10.67	0.66		

Cuadro 7.-Precisión del sistema en términos de reproducibilidad

Análisis de varianza para la concentración de 520 $\mu\text{g/ml}$, aplicando el diseño factorial 2 x 2 con el día anidado en el analista; F1 y F2 son obtenidas de la tablas de Fisher al 95 y al 99 % respectivamente.

LIMITE MINIMO DE DETECCION



mcg / ml	Absorbancia
0	0
2	0.0036
6	0.0088
10	0.0154
20	0.0298
30	0.04227

$$r^2 = 0.9997$$

$$m = 1.42 \times 10^{-3}$$

$$b = 6.37 \times 10^{-4}$$

$$S_{x/y} = 6.52 \times 10^{-4}$$

$$ICI_{\bar{y}} = 0.0212$$

$$\bar{x} = 15.43$$

$$ICI_h = -6.4 \times 10^{-4}$$

$$Y_{nido} = 0.003$$

$$LID_{gra/ncv} = 2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Figura 11.- Limite mínimo de detección.

Se realizan análisis de cinco réplicas de soluciones plasmáticas a concentraciones bajas la línea paralela al eje de las "y" proviene de la absorbancia que da el ruido del equipo la cual corta con la recta de regresión y justo en ese punto se interpola en el eje "x" para obtener la concentración la cual correspondería al límite mínimo de detección.

LIMITE MINIMO DE DETECCION A CONCENTRACIONES BAJAS EN PLASMA

xi ($\mu\text{g/ml}$)	yi (absorbancia)	Yi
2	0.0036	0.0037408
6	0.0088	0.0093597
10	0.0154	0.0149787
20	0.0298	0.0290262
30	0.0427	0.0430736
40	0.0570	0.0571210

$$Y_c = 0.0023621873$$

$$Y_D = 0.0037623895$$

$$X_D = 2.0$$

Cuadro 8.-Límite mínimo de detección por el método estadístico en el intervalo de concentraciones bajas en plasma.

La concentración es expresada en μg de salicilato/ml plasma y las lecturas de absorbancia son obtenidas a 540 nm.

LIMITE MINIMO DE DETECCION OBTENIDO CON LOS RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.

xi ($\mu\text{g/ml}$)	yi (absorbancia)	Yi
10	0.0140	0.014267
30	0.0410	0.042985
50	0.0723	0.071702
70	0.0995	0.100419
100	0.1470	0.143495
200	0.2880	0.287080
300	0.4270	0.430665
400	0.5767	0.574251
500	0.7172	0.717836

$$Y_c = 0.0048627$$

$$Y_D = 0.0097965$$

$$X_D = 6.886$$

Cuadro 9.-Límite mínimo de detección por el método estadístico utilizando los resultados de linealidad del sistema.

La concentración es expresada en μg de ac. salicílico/ml agua y la absorbancia es obtenida a 540 nm.

LIMITE MÍNIMO DE DETECCIÓN OBTENIDOS A PARTIR DE LA CURVA DE CALIBRACION EN PLASMA

xi (µg/ml)	yi (absorbancia)	Yi
40	0.055833	0.0562175
80	0.109166	0.1116935
160	0.219833	0.2226455
200	0.285666	0.2781215
240	0.335333	0.3335975
360	0.494333	0.5000255
400	0.560833	0.5555015
440	0.607666	0.6109775
480	0.665167	0.6664535
520	0.723333	0.7219295

$$Y_c = 0.0103525$$

$$Y_D = 0.0198581$$

$$X_D = 13.78$$

Cuadro 10.-Límite mínimo de detección por el método estadístico, utilizando los resultados de la curva de calibración en plasma.

La concentración es expresada en µg de salicilato/ml plasma y la absorbancia es obtenida a 540 nm.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA LA CONCENTRACION DE 200 µg/ml.

Muestra	Cero días	7 días	15 días	30 días
1	100	97	96	98
2	100	100	98	101
3	100	100	99	101
4	100	99	98	100
5	100	100	98	102
6	100	100	97	100

$$t_{Dunnet (7 \text{ días})} = -1.8282886$$

$$t_{Dunnet (15 \text{ días})} = -4.30179$$

$$t_{Dunnet (30 \text{ días})} = 0.7800957$$

$$t_{Dunnet (tablas)} = 2.4$$

Cuadro 11.-Estabilidad de la muestra.

Para la concentración de 200 µg/ml, aplicando el método de Dunnet. Los resultados son dados en % de recuperación; considerando como 100 % a los resultados obtenidos en el primer día del análisis, el cual se hizo por sextuplicado.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA LA CONCENTRACION DE 400 µg/ml.

MUESTRA	CERO DIAS	7 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
1	100	98	98	100
2	100	100	101	102
3	100	100	98	103
4	100	101	100	103
5	100	101	101	102
6	100	101	100	102

$$t_{Dunnet (7 \text{ dias})} = -0.059$$

$$t_{Dunnet (15 \text{ dias})} = -1.188$$

$$t_{Dunnet (30 \text{ dias})} = 4.336$$

$$t_{Dunnet (tablas)} = 2.4$$

Cuadro 12.-Estabilidad de la muestra.

Para la concentración de 400 µg/ml aplicando el método de Dunnet. Los resultados son dados en porcentajes de recuperación considerando como el 100% a los resultados obtenidos en el primer día del análisis el cual se hizo por sextuplicado.

TOLERANCIA DEL SISTEMA DE ACUERDO A LA VARIACION DE LA LONGITUD DE ONDA

LONGITUD DE ONDA (nm)	ABSORBANCIA
475	0.292
480	0.306
485	0.320
490	0.332
495	0.344
500	0.354
505	0.362
510	0.368
515	0.373
520	0.377
525	0.379
530	0.380
535	0.379
540	0.377
545	0.375
550	0.369
555	0.365
560	0.356
565	0.347
570	0.338

Cuadro 13.-Tolerancia del sistema: Variación de la longitud de onda.
Espectro de absorción del ácido salicílico en agua desionizada.
Lecturas de absorbancia obtenidas con cambios de longitud de onda de 5 nanómetros.

TOLERANCIA DEL METODO DE ACUERDO A LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO CLORHIDRICO.

Ac.salicílico μ/ml	Concentración Normal de ácido clorhídrico				
	0.04N	0.2N	0.4N	0.6N	0.8N
10	0.021	0.017	0.019	0.018	0.016
20	0.039	0.035	0.036	0.034	0.032
30	0.057	0.052	0.054	0.050	0.048
40	0.073	0.071	0.069	0.066	0.064
50	0.098	0.088	0.089	0.084	0.080

Cuadro 14.-Tolerancia del método. Variación de la concentración del ácido clorhídrico utilizado en la preparación del reactivo de Trinder.

Se muestran los promedios de absorbancia obtenidos a concentraciones bajas del ácido salicílico en agua desionizada, utilizando reactivo de Trinder preparado con diferentes concentraciones de ácido clorhídrico. Cada promedio proviene de dos réplicas.

TOLERANCIA DEL METODO DE ACUERDO A LA ESTABILIDAD DEL PRODUCTO COLORIDO

TIEMPO (min)	10μg/ml	200μg/ml	400μ/ml
15	0.010	0.285	0.579
30	0.009	0.0285	0.579
60	0.010	0.0284	0.578
90	0.010	0.0284	0.578
120	0.011	0.0283	0.576

Cuadro 15.-Tolerancia del método: Estabilidad del producto colorido.

Lecturas de absorbancia de salicilatos en plasma obtenidas a diferentes concentraciones e intervalos de tiempo.

CAPITULO 7

ANALISIS DE RESULTADOS

ANALISIS DE RESULTADOS

Como se puede observar en la figura 1, el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones de 10 a 500 $\mu\text{g. ac. salicilico/ml}$, ya que el 99.99% de las desviaciones quedan explicadas por la regresión lineal, y esto significa que existe una asociación lineal o proporcionalidad directa entre la concentración y la absorbancia. Además existe un 95% de confianza de que la recta pasa por el origen de acuerdo a la prueba del intercepto (anexo 1)

La precisión del sistema que se evalúa con los resultados de la figura 2 nos muestra que el sistema es preciso en términos de repetibilidad y lo cual se explica con los coeficientes de variación del día 1 y día 2 que deben ser menores del 5%.

Por otro lado en términos de reproducibilidad también se puede ver que el sistema es preciso y lo cual queda explicado en el coeficiente de variación total menor al 5%.

El Perfil de precisión del sistema de medición que se obtiene en la figura 2 al graficar el coeficiente de variación contra la concentración nos indica que los puntos que presentan mayor imprecisión son los que se encuentran por abajo de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Debido a que la exactitud del sistema de medición puede variar dependiendo de la concentración, se muestra en el cuadro 2 que es más confiable su evaluación en todo el intervalo de concentración de la curva de calibración y donde se observa que el porcentaje de recuperación promedio es muy cercano al 100% lo que nos indica una buena exactitud.

De acuerdo a los resultados de la figura 3 podemos ver que el método es lineal en el intervalo de concentraciones de 40 a 520 $\mu\text{g. ac.salicilico/ml plasma}$, donde el 99.97% de las desviaciones quedan explicadas por la regresión lineal, esto significa que existe una asociación lineal o proporcionalidad directa entre el porcentaje adicionado y el porcentaje recuperado. Además existe un 95% de confianza de que la recta pasa por el origen de acuerdo a la prueba del intercepto (Anexo 2.).

En la determinación de la exactitud del método que se muestra en los resultados del cuadro 3 se obtiene una recuperación de 97-102%, lo que nos indica que el método es exacto en el intervalo de concentraciones de 40 a 520 $\mu\text{g ac. salicilico/ml}$.

La precisión del método expresada en términos de repetibilidad se evalúa con el coeficiente de variación y podemos referirnos también a los resultados del (cuadro 3) para observar que los coeficientes de variación indican que el método es preciso en ese intervalo de concentraciones.

Por otro lado para la evaluación de la precisión en términos de reproducibilidad se utiliza el análisis de varianza el cual se muestra en los cuadros (4, 5, 6 y 7), donde se puede observar que existe reproducibilidad entre analistas para las concentraciones de 200, 400 y 520 $\mu\text{g/ml}$ con un 95% de confianza.

Con un 99% de confianza podemos ver que para todas las concentraciones (40, 200, 400 y 520 $\mu\text{g/ml}$) existe reproducibilidad entre analistas, en cambio para un mismo analista en días diferentes sólo existe para la concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$.

De acuerdo a lo anterior podemos apreciar que el análisis de varianza no siempre puede ser confiable ya que nos puede confundir y provocar que tomemos decisiones equivocadas; pues la reproducibilidad del método no queda definida adecuadamente debido a que la variación entre los resultados es tan pequeña que provoca que nuestro rango de tolerancia sea muy cerrado y que una ligera desviación de ese rango nos indique un incremento significativo en el error experimental.

Por otro lado cabe mencionar que para efectos de estudio en muestra biológicas existe una mayor cantidad de variables que afectan directamente nuestro sistema, lo cual nos permite hacer la observación de que el intervalo de variación en muestras de éste tipo debe ser más amplio para no condenar de antemano la reproducibilidad del método. Por tanto se puede decir que la reproducibilidad va a ser establecida de acuerdo a la aplicación del método y al criterio del analista tomando en cuenta que para nuestro caso se propone capacitar al analista y de ser posible el analista correrá estándares para hacer su ajuste y de ésta manera obtener resultados más confiables.

En la evaluación del límite mínimo de detección se utilizó un método gráfico y uno estadístico.

En el método gráfico el límite mínimo de detección se obtuvo al graficar concentraciones menores del 40 $\mu\text{g/ml}$ contra su respectiva absorbancia y en dicha gráfica se interpola el valor del ruido del aparato y así conocer la concentración mínima detectable, la cual es de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, (fig. 4).

En la evaluación estadística del límite mínimo de detección se utilizaron los resultados obtenidos experimentalmente a concentraciones por abajo de 40 $\mu\text{g/ml}$; los de linealidad del sistema y del método los cuales incluye concentraciones altas, cuadros (8, 9 y 10), en estas dos últimas evaluaciones se puede observar que al cambiar las características del medio acuoso y plasmático el límite mínimo de detección es diferente, casi al doble en el calculado en la linealidad del método, pero además no hay que olvidar que los resultados obtenidos a bajas concentraciones en linealidad del sistema y del método son calculados estadísticamente.

Por otro lado al evaluar el límite mínimo de detección estadísticamente utilizando los resultados obtenidos experimentalmente a bajas concentraciones nos damos cuenta que su valor de 2.0 $\mu\text{g/ml}$ no es muy diferente del límite mínimo de detección obtenido gráficamente el cual es de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Lo anterior nos permite decidir que es necesario determinar experimentalmente dicho límite ya que en ese evento se involucran todas las posibles variantes que interfieren en su detección.

Al analizar la estabilidad de la muestra en el cuadro 11, observamos que para la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ la muestra se comportaría estable a los 7 y 30 días e inestable a los 15 días y en el caso de los resultados del cuadro 12 para la concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ se indica que la muestra es estable a solo a los 30 días. Como podemos ver de lo anterior resulta difícil definir un criterio adecuado acerca de la estabilidad de la muestra sobre todo para la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$.

En éste estudio se puede tomar en cuenta dos factores importantes los cuales pudieran tener una influencia directa sobre la interpretación de los resultados.

Lo primero que debemos hacer notar es que el error experimental es incrementado significativamente debido a la pequeña variación entre las lecturas lo cual nos hace difícil definir la estabilidad por el método estadístico de Dunnet.

Por otro lado también cabe mencionar que aún cuando no se realizaron estudios de especificidad de la muestra, se menciona en la bibliografía (28) que el método no es específico lo cual nos hace pensar que la muestra pudo haber sufrido alguna alteración por las condiciones a las que fue expuesta y es probable que esto no podamos detectarlo y por tanto tampoco asegurar que los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad se deban específicamente a los salicilatos presentes.

En el estudio de la tolerancia del método se evaluaron tres variables las cuales se analizan a continuación:

En la variación de la longitud de onda que se muestra en el cuadro 13 nos indica que existe un intervalo de longitud de onda de 520 a 540 nm donde se puede decir que la señal es la misma.

La variación de la concentración de ácido clorhídrico utilizado en la preparación del reactivo de Trinder (reactivo de color) que se muestra en el cuadro 14 nos permite observar que el efecto del aumento de la concentración del ácido clorhídrico provoca un decremento en las lecturas de absorbancia lo que nos indica que el efecto del pH influye directamente sobre la concentración del complejo formado entre el hierro y el salicilato, aunque es importante mencionar que no se midió el pH.

La estabilidad del producto colorido que muestra el cuadro 15 nos indica que las lecturas de absorbancia del complejo colorido no se ven afectadas dentro de un intervalo de tiempo de 90 minutos aún cuando se trabaje con concentraciones bajas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El método de Trinder fue adaptado satisfactoriamente a nuestras condiciones de trabajo.

De los resultados obtenidos se llevó a cabo la validación del método encontrándose que el método es lineal en el intervalo de concentraciones de 40 a 520 μg salicilato/ml plasma, también es exacto y preciso en ese intervalo de concentraciones.

Por otro lado la precisión del método expresada en términos de reproducibilidad no queda definida adecuadamente debido a que la variación entre los resultados es tan pequeña que provoca que el error experimental se incremente significativamente.

El límite mínimo de detección obtenido experimentalmente a bajas concentraciones por el método gráfico y estadístico es más confiable que el obtenido estadísticamente a partir de los resultados de linealidad del método.

La estabilidad del método no queda definida adecuadamente porque no se puede asegurar que los resultados sean específicos.

En la tolerancia del método se determinó que la señal obtenida en el intervalo de longitud de onda de 520-540 nm. es la misma; que el producto colorido es estable por lo menos 90 minutos en condiciones ambientales. Por otro lado la concentración del ácido clorhídrico utilizado en la preparación del reactivo de color tiene una influencia evidente en los resultados y aunque no se define específicamente su causa considero importante conocer las condiciones de pH del producto colorido ya que esto nos puede dar una visión clara de lo que químicamente está sucediendo y de ésta forma poder optimizar o evitar los factores que pueden afectar directamente la reacción y por lo tanto la validación del método.

Finalmente se debe mencionar que es muy importante validar un método analítico para conocer si el mismo satisface los requisitos de las aplicaciones analíticas que deseamos al evaluar la confiabilidad y establecer su variabilidad.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1.-ABRAHAM SALTZMAN.

Fluorophotometric method for the estimation of salicylate in blood, *J. Biol. Chem.*, 174, Jan., 399-404, 1948.

2.-ALAN K. DONE, M. D.

Salicylate intoxication. *Pediatrics*, Noviembre, 1960 (800-807)

3.-ANDRE HUBAUX AND GILBERT VOS.

Decision and detection limits for linear calibration curves, *Anal. Chem.*, 42 (8), July, 849-855, 1970.

4.-BERNARD B. BRODIE, SIDNEY UNDEFRIEND.

The determination of salicylic acid in plasma, *J. Pharmacol.*, 80, 114-117, 1944.

5.-CONFEDERACION LATINOAMERICANA DE BIOQUIMICA CLINICA.

Mejora continua de la calidad

Guía para los laboratorios de América Latina

Editorial Médica Panamericana

Año 1996.

6.-DAVID SCHACHTER AND JAMES G. MANIS

Salicylate and salicyl conjugates: Fluorometric estimation, biosynthesis and renal excretion in man, Received for publication January, 30, 800-807, 1958.

7.-EDWARD MORGAN, MD, PETER KELLY

Tinnitus as an indication of therapeutic serum salicylate levels, *JAMA*, 226 (2)

8.-FERNANDO MONCKERBERG, JACOBO JIMENEZ.

Intoxicación salicílica en el niño. Cátedra de pediatría Prof. Julio Menegello, Laboratorio de investigación, 105-117.

9.-F. GHEZZO, P TRINCHERO.

Effects of aspirin treatment upon fibrinolytic activity of peripheral bloo granulocytes, Acta haematology, 65, 229-232, 1981.

10.-F. J. LINNING AND JOHN MANDEL

Which measure of precision?, Anal. Chem., 36 (13), December, 25A-32A, 1964.

11.-GERHARD LEVY.

Pharmacikinetik of salicylate elimination in man, Journal of pharmaceutical sciences, 54 (7), July, (959-967), 1965.

12.-GILBERT D. POTTER AND JAMES L. GUY.

A micrometod for analysis of plasma salicylate, Received march, 16, 658-660, 1964

13.-HELEN KLUSEK HAMILTON

Diagnóstico Clínico.

Ed. Interamericana

Año 1989 (1080-1083)

14.-J. LUIS ALFREDO MORA, ALEJANDRO ALCANTARA

Material de apoyo del curso de validación de métodos analíticos

Camara Nacional de la Industria Farmacéutica (CANIFARM)

Julio 1989.

15.-JOSEPH R. DI PALMA, M. D.

Farmacología Médica Drill

De. La prensa médica mexicana

1978 (373-399)

16.-KELLY D. MUTCHIE, GEORGE H. SAUNDERS.

Interlaboratory salicylate variability, The journal of rheumatology, 7 (5), 737-740,1980.

17.-KLAUS FLOREY.

Analytical profiles of drug substances (Aspirina), 8, 3-47

18.-LEE-JH, HUNG-HY

Kawasaki disease with Reye Syndrome. Acta-Paediatr-Sin, 33(1), 67-71,1992

19.-LOYD A. CURIE.

30.-Limits for qualitative detection and quantitative determination, Anal. Chem., 40 (3), March, 587-592, 1968.

20.-MALCOLM ROWLAND AND SIDNEY RIEGELMAN.

Determination of acetylsalicylate acid and salicylic acid in plasma, Journal of pharmaceutical sciences, 56 (6), June, 7717-720, 1967.

21.-MALCOLM ROWLAND AND SIDNEY RIEGELMAN

Pharmacokinetics of acetylsalicylic acid and salicylic acid intravenous administration in man, Journal of pharmaceutical sciences, 57 (8), August, 1313-1319, 1968.

22.-M. J. H. SMITH AND J. M. TALBOT.

The estimation of plasma salicylate levels, J. Exp. Path., 31, 65-69, 1950.
Journal experimental pathology

23.-MANUEL LITTER

Farmacologia

Editorial "El Ateneo"

Año 1966 (1263-1274)

24.-MARIA EUGENIA FONSECA, MACRINA MASON.

Evaluation of an immunoenzymometric assay (IEMA) using automated system for determination of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone, Archives of medical research, 28 (1), 73-77, 1997.

25.-MARIA EUGENIA FONSECA YERENA.

Material de apoyo suministrado en el curso de validación de instrumentos automatizados en el laboratorio clínico.

Unidad de investigación médica en endocrinología

Siglo XXI IMSS.

Agosto 1997.

26.-MARTIN J. FINKELSON.

Validation analytical methods by FDA laboratories, Pharm. Tech., March, 79-82, 1986.

27.- PAUL K. SMITH, HELEN L. GLEASON.

Studies on the pharmacology of salicylates, Received for publication march, 27, 237-247, 1946.

28.- P. TRINDER.

Rapid determination of salicylate in biological fluids, Biochemistry journal, 57, 301-303, 1954.

29.- REID J.

Does sodium salicylate cure rheumatic fever?, Journal medical, 17 (139), 1948.

30.- REYNOLD SPECTOR, DENISE T. KORKIN.

A rapid method for the determination of salicylate binding by the use ultrafilters Journal pharmaceutical pharmacology, 24, 786-789, 1972.

31.- R. M. ARCHIBAL.

Criteria of analytical methods for clinical chemistry, Anal. Chem. 22, 5, May, 639-642, 1950.

32.- STANLEY S. BROWN, JEAN C. CAMERON.

Plasma salicylate levels in acute poisoning in adults. British medical, 17 June, 738-739, 1967.

33.- TARNOKY, A. L. BREWS.

Tarnoky, A. L. Brews
J. Clin. Path., 9, 289, 1950.

34.-TIMOTHY E. POE, KELLY D. MUTCHIE

Total and free salicylate concentrations in Juvenil Rheumatoid Arthritis. The journal of Rheumatology, 7 (717-723), 1980.

35.-T. P. WHINTEHEAD

Principios de control de calidad (lab/76.1), Quimica clinica, 3 (1), 53-78, 1984.

Anexo 1.-

1.- Prueba de paralelismo :

Indica si dos rectas difieren significativamente .

$$t_{calc} = \frac{m_1 - m_2}{S_{YIX} \sqrt{\frac{1}{SSx_1} + \frac{1}{SSx_2}}}$$

2.- Prueba del intercepto :

Indica si una recta tiene como origen el cero .

$$t_{exp} = \frac{b - \beta}{S_b}$$

$$S_b = \frac{S_{YIX} \sum X^2}{nSSX}$$

3.- Modelo de analisis de varianza para reproducibilidad del metodo .

Diseño factorial 2x2 con el dia anidado en el analista .

Fuente de variacion	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)
Analista (A)	(a-1)	$\sum_{i=1}^{(a-1)} Y^2 i. - \sum Y^2 \dots$	$\frac{SC_A}{gl_A}$
Dia (D)	a(d-1)	$\sum_{j=1}^{(d-1)} Y^2 .j - \sum Y^2 \dots$	$\frac{SC_D}{gl_D}$
Error (E)	ad(r-1)	$\sum_{i=1}^{a-1} \sum_{j=1}^{d-1} \sum_{k=1}^{r-1} Y^2 ijk - \sum_{i=1}^{a-1} \sum_{j=1}^{d-1} Y_{ij}.$	$\frac{SC_E}{gl_E}$

4.- Límite mínimo de detección (método estadístico)

$$Y_i = \bar{y} + m(x_i - \bar{x})$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N - 2}}$$

$$P = t_{1-\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$y_c = y_o + PS$$

$$Q = \sqrt{t_{1-\beta}^2 \left(1 + \frac{1}{N} + \frac{(x_D - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}\right)}$$

$$y_D = mx_D + y_o \dots \dots \dots A$$

$$y_D = y_c + SQ \dots \dots \dots B$$

Igualando A y B:

$$mx_D - y_o = y_c + SQ$$

Despejando x_D :

$$x_D = \frac{y_c - y_o - SQ}{m}$$

$$x_D = \frac{y_c - y_o}{m} + \frac{S}{M} \sqrt{t_{1-\beta}^2 \left(1 + \frac{1}{N} + \frac{(x_D - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}\right)}$$

5.- Estabilidad de la muestra .

$$t_D = \frac{x_n - x_c}{\sqrt{2 MC_E / r}}$$

$$MC_E = \frac{SC_E}{t(r-1)}$$

$$SC_E = \sum \sum y^2_{ij} - \sum Y^2_i$$

ANEXO 2

1.-Prueba de paralelismo.

$$t_{cal} = 0.007151$$

$$t_{tablas} = 2.11$$

2.-Prueba del intercepto.

$$t_{exp(recta 1)} = 0.44$$

$$t_{exp(recta 2)} = -0.67$$

$$t_{tablas} = 2.31$$

3.-Definición de términos empleados en el ANEXO 1.

A).-Prueba de paralelismo.

$$t_{cal} = "t" \text{ calculada}$$

$$m_1 = \text{pendiente de la recta 1}$$

$$m_2 = \text{pendiente de la recta 2}$$

$$S_{y/x_1} = \text{error estándar de regresión}$$

$$S_{y/x_2} = \text{error estándar de regresión de la recta 2}$$

$$SS_{x_1} = \text{suma de cuadrados de la desviación de "x" en la recta 1}$$

$$SS_{x_2} = \text{suma de cuadrados de la desviación de "x" en la recta 2}$$

B).-Prueba del intercepto.

$$t_{exp} = "t" \text{ experimental}$$

$$b = \text{intercepto de la recta}$$

$$\beta = \text{intercepto en el origen}$$

$$S_b = \text{variación de los valores de "y" en el intercepto}$$

C.-Análisis de varianza para reproducibilidad del método.

$$A = \text{Analista}$$

$$D = \text{Día}$$

$$E = \text{Error}$$

$$a = \text{Número de analistas}$$

$$d = \text{Número de días}$$

$$r = \text{Número de replicas}$$

D.-Limite minimo de deteccion (metodo estadistico).

y_i = Señal observada de una linea caracteristica del elemento de interes medido en el iesimo estandar.

Y_i = Señal calculada correspondiente a x_i ,

x_i = Concentracion del elemento de interes en el iesimo estandar

\bar{x} = media de las concentraciones

\bar{y} = media de la señal observada

m = pendiente de la linea de regresion

N = Numero de concentraciones

S = Estimador residual de la desviacion estandar

P = Factor de (S) con nivel de confianza $1 - \alpha$

Y_c = Nivel de señal neta, o sea respuesta del aparato arriba de la cual una señal observada es reconocida confiabilmente

Y_0 = Intercepto de la linea de calibracion

Q = Factor de (S) con nivel de confianza $1 - \beta$

x'_D = Contenido minimo

x_D = Contenido minimo que podemos distinguir de cero

y_D = Señal correspondiente a x_D en la linea de calibracion

E.- Estabilidad de la muestra.

t_D = "t" de Dunnet

x_N = Promedio de farmaco recuperado, a determinado intervalo de tiempo

x_C = Promedio de farmaco utilizado como control

SC_E = Suma de cuadrados del error

MC_E = Medida de cuadrados del error

r = Numero de replicas

t = Numero de tratamientos.