

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Validación de Métodos para Cuantificar Cobre en Suero.

Informe de tesis

Presentado por:

Jenner Giovany Juárez Lacanal

**Para optar al título de:
Químico Farmacéutico**

Guatemala mayo de 2003

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL

06

T(14991

JUNTA DIRECTIVA

M. Sc. GERARDO LEONEL ARROLLO CATALAN

DECANO

Licda. JANNETTE SANDOVAL MADRID DE CARDONA

SECRETARIA

Licda. GLORIA ELIZABETH NAVAS ESCOBEDO

VOCAL I

Lic. JUAN FRANCISCO PEREZ SABINO

VOCAL II

Dr. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTINEZ

VOCAL III

Br. CARLOS ENRRIQUE SERRANO

VOCAL IV

Bra. CLAUDIA LUCIA ROCA BERREONDO

VOCAL V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

POR SU BONDAD Y MISERICORDIA
PERMITIENDOME REALIZARME COMO
PERSONA Y PROFECIONAL.

A MIS PADRES:

CARLOS ENRIQUE JUAREZ DOERING
ELIZA CONCEPCION LACANAL DE JUAREZ, POR
EL APOYO BRINDADO DURANTE MI VIDA.

A MIS HERMANOS:

JUAN CARLOS JUAREZ LACANAL
BILLI RENATO JUAREZ LACANAL

A MI ABUELA:

MARIA LUISA DOERING DE AVILES.

A MIS TIOS:

POR SU APOYO Y COLABORACION BRINDADA
DUERANTE MI CARRERA.

A MIS PRIMOS:

POR SU APOYO Y COLABORACION BRINDADA
DUERANTE MI CARRERA.

A MIS AMIGOS Y
COMPAÑEROS:

POR SU APOYO Y AYUDA BRINDADA DURANTE
EL DESARROLLO DE MI FORMACION
ACADEMICA.

AGRADECIMIENTOS

A LICDA. MARIA ANTONIA PARDO DE CHAVEZ POR SU VALIOSA COLABORACION Y ASESORIA EN EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

A LICDA. FABIOLA DE PRADO DE MICHEO POR SU VALIOSA COLABORACION Y ASESORIA EN EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

AL CIAT Y SU PERSONAL POR SU APOYO Y COLABORACION BRINDADA EN EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS.

A MI PATRIA: GUATEMALA

A LA UNIVERSIDAD: DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD: DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA Y LOS PROFESORES RESPONSABLES POR LA EDUCACION RECIBIDA EN EL RECINTO DE ESTUDIO PARA LA OBTENCION DE LA LICENCIATURA EN QUIMICA FARMACEUTICA.

INDICE:

TEMA	PAG.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES.....	5
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS.....	10
HIPÓTESIS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
REFERENCIAS.....	37
ANEXOS.....	41

1. RESUMEN:

El objetivo del presente trabajo fue validar el método colorimétrico de Eden y Green que usa dietilditiocarbamato de sodio para la determinación de cobre en suero. Se trabajó también para validar el método colorimétrico que usa oxalilhidrazida, sin alcanzar el objetivo por la imposibilidad de obtener lecturas en el espectrofotómetro.

Se buscó la validación de los métodos para asegurar la calidad de los resultados. En el caso particular del cobre, la exactitud de los mismos, permitirá asegurar el diagnóstico clínico y el seguimiento de la enfermedad de Wilson, la confirmación de la exposición laboral a cobre y la comprobación de la intoxicación.

Se realizó una primera fase, donde se establecieron las condiciones experimentales ideales del análisis (7).

Con la curva de calibración de cobre en medio acuoso a concentraciones de 10 a 500 $\mu\text{g } \%$, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.999601 y un coeficiente de variación de 0.17 a 6.00 % en las cinco réplicas de cada una.

Para la validación del método se tomaron en cuenta los niveles séricos normales de cobre y se procedió al ensayo en muestras de suero marcadas, con concentraciones por debajo de los niveles

normales (10, 15, 20, 30, y 40 ug %), cuatro dentro del rango normal de (70 a 160%), (70, 100, 120 y 160 ug %) y tres arriba del mismo (200, 300 y 500 ug %), analizándose cinco réplicas para cada punto. Se obtuvo una linealidad en el rango de 10 a 500 ug %, siendo el coeficiente de correlación de la curva de 0.9994568.

En el mismo rango, se estableció la exactitud y la precisión por medio del porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación, mostrando valores de 95 a 105.73 % y 0.33 a 5.44 %, respectivamente.

El límite de cuantificación se fijó en 20 ug %, concentraciones inferiores aunque detectadas (10 y 15 ug %), tuvieron valores de 114 y 70.78 de porcentaje de recuperación y de 25.42 y 14.82 % de coeficiente de variación respectivamente, siendo resultados erráticos, para estas concentraciones.

Por lo tanto el método de dietilditiocarbamato de sodio, es confiable para la determinación de cobre en suero.

2. INTRODUCCIÓN:

El cobre es necesario para la formación de hemoglobina pues promueve la absorción, movilización y utilización del hierro (12). El cobre es un metal esencial para la formación de tejido conectivo, la pigmentación y la producción energética. Forma parte de enzimas como ferroxidasa, citocromooxidasa, superóxido-dismutasa, aminooxidasas, uricasa, dopamina beta hidroxilasa, etc. Es muy tóxico para organismos inferiores y poco para los superiores. (5)

Existen dos alteraciones genéticas en el metabolismo del cobre, *la enfermedad de Wilson* y el *Síndrome de Menke*. La primera, por carencia de ceruloplasmina, causa degeneración hepatolenticular y cerebral por acúmulo del cobre, hay disminución del cobre sérico, aumento del cobre en la orina y en los órganos. La ceruloplasmina es la proteína a la cual se une el cobre para su transportación. El *Síndrome de Menke* se conoce también como síndrome de cabello ensortijado, por deficiencia de cobre a causa de alteraciones en la absorción del mismo; causa retardo en el crecimiento, cabello peculiar y degeneración cerebral. (17) (4).

La medición de las concentraciones de cobre en el organismo, es un medio para el diagnóstico de las alteraciones genéticas relacionadas con el metal, así como para el subsiguiente control.

Otra circunstancia donde se hace necesaria la cuantificación de cobre es en la exposición ocupacional en atmósferas que contengan más de 0.2 mg/metro cúbico de vapor de cobre, como en la industria de cerámica, pinturas, plaguicidas, etc. (2). También es importante medir el cobre en casos de intoxicación accidental, por ejemplo por empleo de utensilios de cobre en la preparación de alimentos y en intoxicaciones intencionales.

El propósito de este trabajo de investigación, es desarrollar la validación de dos métodos, el de dietilditiocarbamato de sodio y el de la oxalildihidrazida para cuantificar cobre y que faciliten las dosificaciones clínicas y toxicológicas del metal.

3. ANTECEDENTES:

Henry D.C. Cannon. J.W. Winkelman en 1980, permitieron desarrollar un grupo de métodos para la determinación de cobre en los líquidos biológicos basado en la medida fotométrica del color producido con el dietilditiocarbamato. En alguno de estos métodos, se somete la muestra a digestión húmeda, en otro se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético, seguido en ambos por desarrollo de color con dietilditiocarbamato y extracción del complejo coloreado con alcohol amílico o isoamílico. Existe otro procedimiento en el que se recurre a la extracción del carbamato de cobre directamente del suero con alcohol isoamílico. Este último método no puede utilizarse con suero icterico por cuanto la bilirrubina y posiblemente, otros pigmentos del suero, son también extraídos mediante el solvente orgánico.

Los mismos autores mencionan que hay otros métodos que emplean como reactivo de color la bisciclohexanona oxalildihidrazona, propuestos por Ressler y zak, usando como reactivo de color la neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) y su derivado hidrosoluble sulfonatado. Otros reactivos, empleados asimismo tanto para las determinaciones en suero como en orina, son la difenil carbazona, la oxalildihidrazida, el dibenzil-ditiocarbamato de zinc, la difenilcarbocida en benzol, y la 1,5-difenilcarbohidrazida. Este último es el más sensible de todos los métodos colorimétricos utilizados para la determinación de cobre. Adecuado para trabajar muestras pediátricas, ya que solo utiliza 0.2 ml de suero. (8)

Natelson, en 1977, publicó el método colorimétrico con la bis ciclohexanona oxalil dihidrazona para la determinación de cobre en suero, basado en la separación del cobre de sus uniones proteicas en medio ácido, formando un complejo con el reactivo de color a pH 7.5-9.0 y medida su absorbancia a 600 nm. (21)

Eden y Green en 1940; Ventura y King, en 1951 realizaron la determinación de cobre en suero, con el método del dietilditiocarbamato, donde se libera el cobre de sus uniones proteicas mediante el ácido clorhídrico y precipitadas las proteínas con ácido tricloroacético, el complejo de cobre formado con el dietilditiocarbamato sódico, es extraído con una mezcla de éter-alcohol amílico y medida su absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro. Para prevenir la interferencia por el hierro se agrega pirofosfato sódico. (7)

Zak Bennie en 1976, determinó cobre en suero precipitando las proteínas con ácido tricloroacético, utilizando como reactivo de color sulfonato de batocupreina y el complejo coloreado leído a 484 nm. (24)

John D. Bauer/ Philip G. Ackermann/ Gelson Toro, en 1974 determinaron cobre en suero por el "Método del oxalildihidrazida" el cual da un complejo de color rosado para su medición colorimétrica. (3)

Hugh Y. Yee y Jesse F. Goodwin, en 1974, realizaron la determinación de cobre y hierro en muestras de suero. Utilizando como reactivo de color para el cobre, la bis(1-piperidylthiocarbonil)disulfuro y medida su absorbancia 420 nm en un espectrofotómetro. (9)

Ramon Stone y Waldemar Dasler en 1963, determinaron cuantitativamente cobre en material biológico, para un laboratorio de equipamiento convencional; método con una sensibilidad de 0.5% a 2.0% microgramos, usando como reactivo de extracción de cobre benceno y el reactivo de color 1,5-diphenyl-carbohydrazine, obteniéndose un color estable leído a 540 nm. (20)

Nathaniel C. Johnson en 1962, realizó la titulación potenciométrica de cobre y zinc con material biológico determinando el punto final con la mínima lectura cercana a cero. (15)

Ademas de los métodos colorimétricos, también hay descripción de métodos para la valoración de cobre por fluorometría, activación de neutrones, polarografía, fluorescencia de rayos X, espectroscopia de absorción y emisión atómica en muestras biológicas. (7)

Mary M. Paeker, Fred L. Humoller and Delmar J. Mahler en 1967, determinaron cobre y zinc en material biológico, en espectrofotometria de absorción atómica. (13)

Meret S. y Henkin R.I., en 1971, determinaron por espectrofotometría de absorción atómica la estimación simultánea directa de cobre y zinc en suero, orina y fluido cerebroespinal. El artículo presenta reproducibilidad del método, precisión, especificidad, sensibilidad y parámetros de desviación estándar y coeficiente de varianza para cada prueba. (14).

Baselt C. Randall, en 1980, publicó un método para determinar cobre en suero y orina por medio de la espectrofotometría de absorción atómica. (2)

Stahr H.M. en 1991, publicó un método para cuantificar cobre en sangre por medio de la espectrofotometría de absorción atómica. (19)

4. JUSTIFICACIONES:

- 4.1 La medición de cobre sérico sirve para evaluar el desarrollo de la enfermedad de Wilson y su tratamiento. Sirve también para la confirmación del síndrome de Menke.
- 4.2 La medición de los niveles séricos de cobre hace posible la confirmación de estados de riesgo por la intoxicación con el mismo.
- 4.3 Es importante contar en el Centro de Información y Asesoría Toxicológica de la Facultad de CCQQ y Farmacia, con un método validado, para la medición de cobre en suero y ponerlo al servicio de la Clínica y de la Toxicología.
- 4.4 Con frecuencia el Centro de Información y Asesoría Toxicológica recibe solicitudes de análisis de cobre de las instituciones de servicio clínico.

5. OBJETIVOS:

5.1 OBJETIVO GENERAL:

5.1.1 Facilitar a la comunidad métodos para establecer la concentración sérica de cobre.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

5.2.1 Implementar y validar métodos colorimétricos para medir cobre en suero.

5.2.2 Seleccionar el método espectrofotométrico que por medio de su validación asegure la mejor calidad de los resultados para la determinación de cobre en suero.

6. HIPOTESIS:

La concentración de cobre sérico puede ser medida, con precisión y exactitud, con los métodos espectrofotométricos usando dietilditiocarbamato u oxalilhidrazida.

7. MATERIALES Y METODOS:

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

Métodos de análisis por colorimetría para cuantificar cobre en suero.

7.2 MEDIOS:

7.2.1 Recursos Humanos:

Autor. Br. Jenner Giovany Juárez Lacanal

Asesoras: Licda. María Antonia Pardo de Chávez

Licda. Fabiola Prado de Micheo.

7.2.2 Instalaciones:

Instalaciones del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en 3a calle 6-47 Zona 1 en ciudad de Guatemala.

7.2.3 Recursos Materiales:

7.2.3.1 Equipo:

- Agitador eléctrico Vortex
- Balanza Analítica
- Campana de extracción
- Centrífuga

- Espectrofotómetro Uv/Visible marca Baush & Long,
Spectronic
- Estufa
- Refrigerador

7.2.3.2 Cristalería:

- Balones volumétricos de 25, 100, 500 ml.
- Erlenmeyer de 500 ml.
- Tubos de 15 y 20 ml. con tapón de rosca y empaque de teflón.
- Goteros
- Pipetas de Pasteur
- Tubos de 50ml. con tapón esmerilado.
- Probeta de 50ml.
- Espátula
- Beakers de 25, 100 ml.
- Gradilla
- Papel de aluminio

7.2.3.3 Reactivos: Método del dietilditiocarbamato sódico.

- Agua Destilada, desionizada y redestilada en vidrio.
- Solución concentrada de cobre de 100mcg/ml.
- Ácido Clorhídrico 6 N
- Ácido Clorhídrico 0.1 N
- Ácido tricloroacético en solución acuosa al 20 %.
- Ácido tricloroacético en solución acuosa 5 %.
- Hidróxido de amonio, densidad 0.88

- Dietilditiocarbamato sódico, en solución acuosa al 0.4 %.
 - Mezcla de alcohol amílico-éter (50:50)
 - Solución concentrada de Cobre "Stock" (100 ug/ml):
Disolver 0.393 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua, agregar 0.1 ml de ácido sulfúrico concentrado y completar a un litro.
 - Solución de trabajo (ug/ml) "Estándar": Diluir 1 ml de la solución concentrada en 100 ml de agua.
- Método de la oxalilhidrazida. Reactivos adicionales.
- Hidróxido de amonio al 90%.
 - Solución de ácido clorhídrico-oxalildihidrazida.
 - Solución acuosa de acetaldehído al 50%.
 - EDTA, sal sódica.
 - Ácido cítrico (cristales)

7.3 METODOLOGIA:

7.3.1 PROCEDIMIENTO:

7.3.1.4 Determinación de cobre en suero. Metodo del dietilditiocarbamato sódico ó de Eden y Green.

Técnica:

Medir 1 ml. de suero, 1 ml de agua destilada (blanco) y 1ml de la solución estándar de cobre en tubos con tapón de rosca y empaque de teflón.

A cada tubo agregar 1 ml de ácido clorhídrico 0.1 N. y mezclar en vortex.

Calentar en un baño de agua tibia, agitando los tubos constantemente hasta que la mezcla comience a enturbiarse. Enfriar, añadir 1.5 ml de ácido clorhídrico 6 N, mezclar en agitador eléctrico y dejar reposar durante 10 minutos.

Agregar 3 ml de ácido tricloroacético al 20%, mezclar en el agitador eléctrico, dejar reposar unos minutos y centrifugar.

Transferir el líquido sobrenadante a tubos de rosca y empaque de teflón.

Lavar el precipitado con 3 ml de ácido tricloroacético al 5%, mezclar en el agitador eléctrico y centrifugar, unir el líquido sobrenadante al primero.

Agregar 1 ml de pirofosfato sódico al 6% y 2 ml de amoníaco.

Agregar 1 ml del reactivo de dietilditiocarbamato sódico al 0.4% y agitar fuertemente durante 2 minutos con 5 ml de la mezcla de alcohol amílico-éter, para extraer el cobre.

Separar la capa de alcohol amílico y desecar agregando un poco de sulfato sódico anhidro en polvo.

Hacer la lectura en el espectrofotómetro visible a 440 milimicras. Tratar igual al patrón y al blanco. (7)

7.3.1.5 Determinación de cobre en suero. "Método de oxalildihidrazida":

Técnica:

Medir 1 ml. de suero, 1 ml de agua destilada (2 blancos) y 1ml de la solución estándar de cobre en tubos con tapón de rosca y empaque de teflón.

Agregar 1 ml. De solución de ácido clorhídrico-oxalildihidrazida y mezclar.

Dejar reposar por 10 minutos. Añadir 1 ml de ácido tricloroacético al 20% y agitar.

Cubrir con papel parafilm y dejar reposar por 5 minutos, luego centrifugar por 15 minutos.

Transferir 2 ml del sobrenadante de la muestra, estándar y blancos, a tubos limpios conteniendo una pizca de ácido cítrico cristalizado.

A uno de los blancos añadir una pizca de EDTA disódico.

A cada tubo agregar 0.5 ml. de hidróxido de amonio al 90% y mezclar.

Añadir a cada tubo 0.5 ml. de la solución de acetaldehído y mezclar. Leer todos los tubos a 542 nm. con el blanco de EDTA. (3).

Este método no permitió lecturas en el espectrofotómetro, por lo que no se continuó su validación.



7.4 DISEÑO ESTADÍSTICO:

7.4.1 Obtención de la curva de Calibración de estándares en medio acuoso:

Se analizaron tres puntos debajo del rango de la concentración normal (70 a 160 ug/%), 10, 30, 40 ug/%, cuatro puntos dentro del rango normal, 70, 100, 120, 160ug/%; y por ultimo tres puntos por arriba del rango de aceptación, 200, 300, 500 ug/%. Cada punto se realizó 5 veces con su respectivo blanco y estándar.

7.4.2 Obtención de la curva de Calibración de muestras séricas:

Se analizaron muestras séricas con concentraciones de cobre establecidas por debajo de los niveles normales de suero (10, 15, 20, 30 y 40 ug%), 4 dentro (70, 100, 120, 160 ug%) y tres arriba de los mismos (200, 300 y 500 ug%); haciendo 5 réplicas de cada una y así poder determinar los parámetros requeridos para la validación de un método, aplicables en el presente trabajo, como son la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación.

Cálculos:

Se trazó una gráfica donde se determinó la linealidad; y para cada punto, desviación estándar, porcentaje de recuperación y coeficiente de variación de la siguiente manera (11):

Linealidad: Se calculó la linealidad por medio de la gráfica usando regresión lineal con los puntos de la concentración versus la absorbancia en la ecuación correspondiente. Los datos obtenidos se evalúan estadísticamente por el coeficiente de determinación y análisis de varianza.

Precisión: Se estableció utilizando 5 muestras de un mismo punto con su respectiva desviación estándar, varianza y coeficiente de variación.

Exactitud: Se calculó mediante el porcentaje de recuperación de cada punto con la siguiente formula:

$$\frac{\text{cantidad encontrada (100)}}{\text{cantidad original}} = \%$$

Calculándole su desviación estándar y varianza.

Medidas adicionales de especificidad y exactitud con base en la ecuación de regresión; se probarán las siguientes hipótesis:

Ho: $b=1$

Ho: $a=0$

Limite de detección: Se calculó con la menor concentración que pueda ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

Limite de cuantificación: Se calculó con el valor menor del analito en la muestra, que pueda ser determinado con aceptable precisión y exactitud.(10)(16)(21)

8. RESULTADOS:

Inicialmente se planificó llevar a cabo la determinación cuantitativa de cobre en suero por dos procedimientos espectrofotométricos, el método de la oxalildihidracida y el del dietilditiocarbamato de sodio, sin embargo el extracto del complejo formado por el cobre y la oxalildihidracida en acetaldehído presentó turbidez, lo que impidió su validación.

Para la determinación del cobre por el método del dietilditiocarbamato, se preparó una curva de calibración en medio acuoso en concentraciones de 10, 30, 40, 70, 100, 120, 160, 200, 300 y 500ug %, trabajando cada una en quintuplicado. Con los datos sujetos a un análisis de regresión lineal, se obtuvo un $r =$ coeficiente de correlación de 0.999601, $r^2 =$ coeficiente de determinación de 0.99891, $p =$ significancia estadística de $8.3229 \cdot 10^{-73}$ $p < 0.0001$ ver (Cuadro No.1), lo que indicó que la respuesta fue lineal en el rango ensayado, comprobándose en la curva correspondiente presentada en la Gráfica No 1. En las concentraciones ensayadas a lo largo de todas, se observó un coeficiente de variación de 0.17 a 6.0 %.

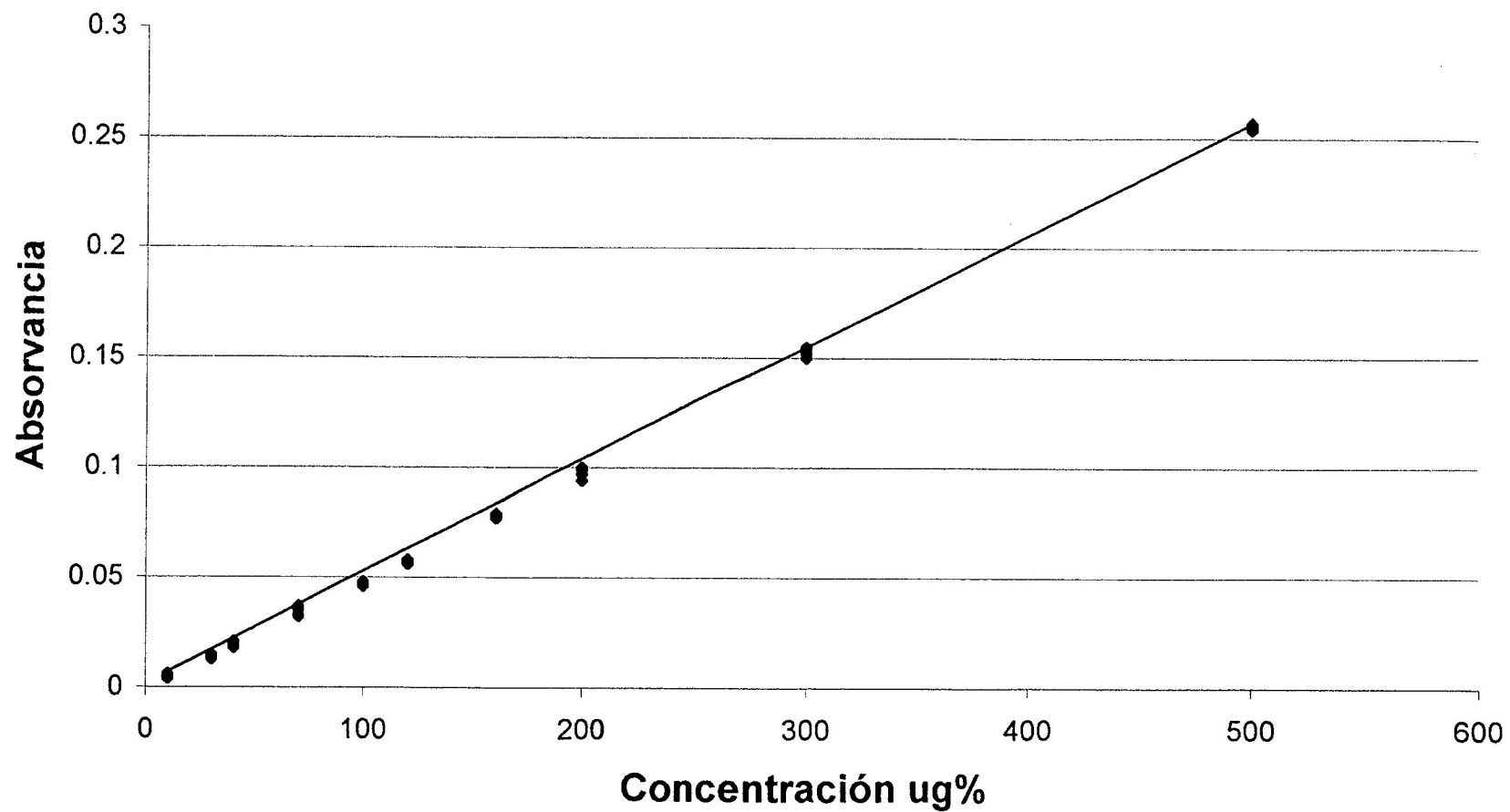
CUADRO No. 1
 TRATAMIENTO ESTADISTICO
 DATOS DE LA MEDICION DE COBRE EN SOLUSION ACUOSA
 EN EL METODO DE DIETILDITIOCARBAMATO
 LINEALIDAD

Concentración real Ug%	Absorbancia	Promedio
Std. 10 ug./ml.	0.006	Promedio=0.0048
Std. 10 ug./ml.	0.004	DS= 0.000836
Std. 10 ug./ml.	0.005	C.V.= 0.17
Std. 10 ug./ml.	0.005	
Std. 10 ug./ml.	0.004	
Std. 30 ug./ml.	0.015	Promedio=0.014
Std. 30 ug./ml.	0.014	DS= 0.000836
Std. 30 ug./ml.	0.013	C.V.= 5.97
Std. 30 ug./ml.	0.015	
Std. 30 ug./ml.	0.014	
Std. 40 ug./ml.	0.019	Promedio=0.019
Std. 40 ug./ml.	0.019	DS=0.00114
Std. 40 ug./ml.	0.020	C.V.= 6.00
Std. 40 ug./ml.	0.018	
Std. 40 ug./ml.	0.021	
Std. 70 ug./ml.	0.035	Promedio=0.034
Std. 70 ug./ml.	0.037	DS= 0.0019
Std. 70 ug./ml.	0.033	C.V.= 5.73
Std. 70 ug./ml.	0.035	
Std. 70 ug./ml.	0.032	
Std. 100 ug./ml.	0.048	Promedio=0.047
Std. 100 ug./ml.	0.047	DS= 0.001
Std. 100 ug./ml.	0.046	C.V.= 2.12
Std. 100 ug./ml.	0.046	
Std. 100 ug./ml.	0.048	

Std. 120 ug./ml.	0.057	Promedio=0.057
Std. 120 ug./ml.	0.056	DS= 0.00070
Std. 120 ug./ml.	0.057	C.V.= 1.24
Std. 120 ug./ml.	0.058	
Std. 120 ug./ml.	0.057	
Std. 160 ug./ml.	0.079	Promedio=0.078
Std. 160 ug./ml.	0.078	DS= 0.00083
Std. 160 ug./ml.	0.077	C.V.= 1.07
Std. 160 ug./ml.	0.078	
Std. 160 ug./ml.	0.079	
Std. 200 ug./ml.	0.100	Promedio=0.098
Std. 200 ug./ml.	0.094	DS= 0.0025
Std. 200 ug./ml.	0.100	C.V.= 2.60
Std. 200 ug./ml.	0.099	
Std. 200 ug./ml.	0.097	
Std. 300 ug./ml.	0.154	Promedio=0.152
Std. 300 ug./ml.	0.152	DS= 0.0019
Std. 300 ug./ml.	0.155	C.V.= 1.28
Std. 300 ug./ml.	0.150	
Std. 300 ug./ml.	0.152	
Std. 500 ug./ml.	0.256	Promedio=0.255
Std. 500 ug./ml.	0.255	DS= 0.0011
Std. 500 ug./ml.	0.255	C.V.=0.44
Std. 500 ug./ml.	0.257	
Std. 500 ug./ml.	0.254	

A= - 0.002037854218	B= 0.0005118288288	R = 0.999601
$r^2 = 0.99891$	P = 8.3229E ⁻⁷³	

Grafico No.1
Curva de calibración de cobre en solución acuosa.
Método del dietilditiocarbamato.



Tomando en cuenta los niveles normales de cobre en suero (70 a 160 ug %), se prepararon muestras séricas conteniendo concentraciones establecidas por debajo de los niveles normales (10, 15, 20, 30 y 40 ug%), 4 dentro (70, 100, 120, 160 ug%) y tres arriba de los mismos (200, 300 y 500 ug%); haciendo 5 réplicas de cada una y así poder determinar los parámetros requeridos para la validación de un método, aplicables en el presente trabajo, como son la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación.

Se puede observar en la tabla N° 2 y gráfica N° 2, que el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9994568, coeficiente de determinación r^2 de 0.99891 y la significancia estadística $p=8.3229E^{-73}$ en un rango de 10 a 500 ug%, comprobándose la linealidad del método dentro de estas concentraciones.

TABLA No. 2
 TRATAMIENTO ESTADISTICO
 DATOS DE LA MEDICION DE COBRE EN MUESTRAS DE SUERO
 EN EL METODO DE DIETILDITIOCARBAMATO
 LINEALIDAD.

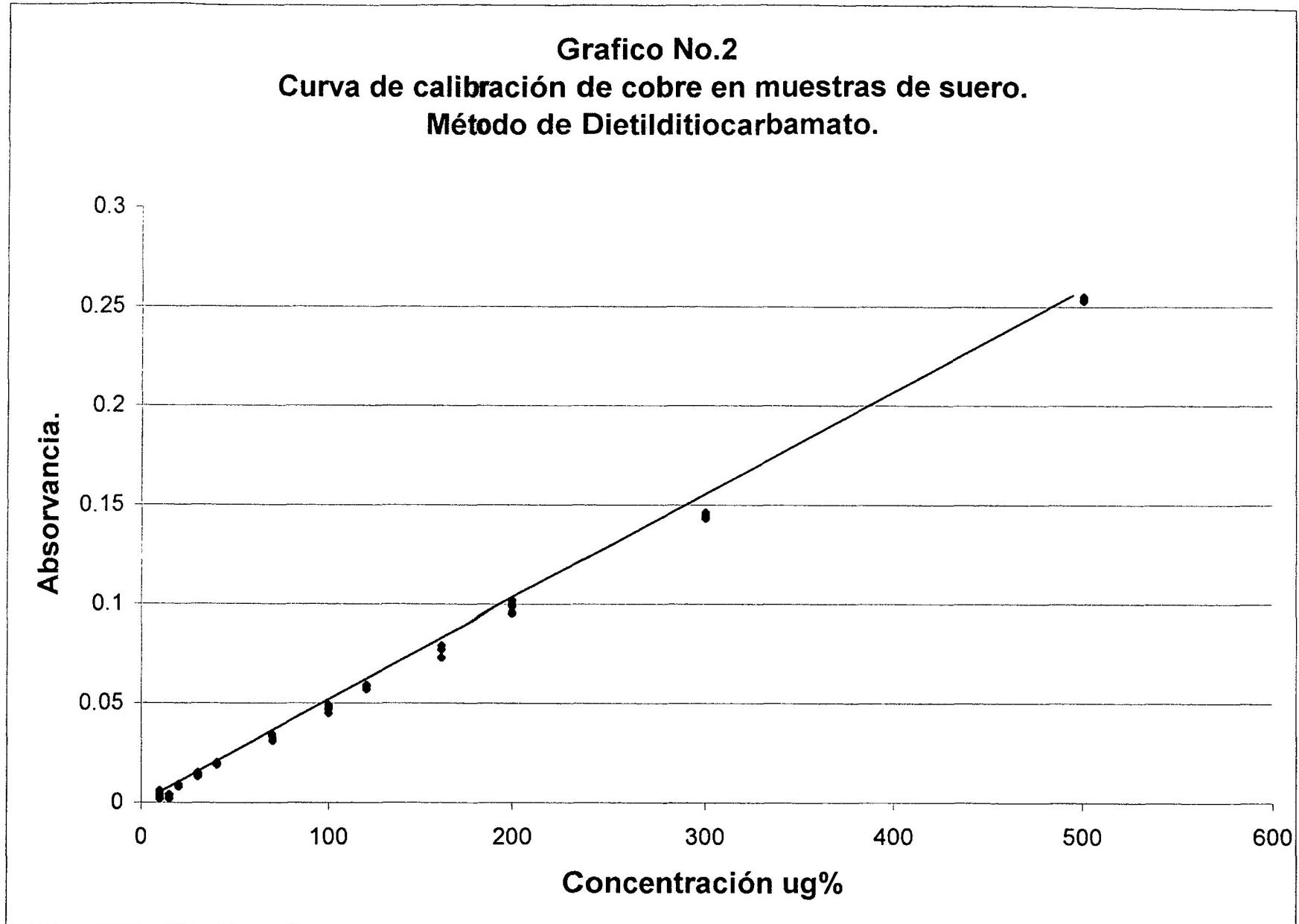
Concentración real Ug%		Absorbancia	
Mx1	10ug.	0.002	D.S=28.99
Mx2	10ug.	0.004	C.V.= 25.42
Mx3	10ug.	0.006	Promedio=0.0038
Mx4	10ug.	0.004	
Mx5	10ug.	0.003	
Mx1	15ug	0.004	D.S=11.65
Mx2	15ug	0.002	C.V.= 14.82
Mx3	15ug	0.004	Promedio=0.0034
Mx4	15ug	0.003	
Mx5	15ug	0.004	
Mx1	20ug	0.008	D.S=5.34
Mx2	20ug	0.009	C.V.= 5.44
Mx3	20ug	0.009	Promedio=0.0084
Mx4	20ug	0.008	
Mx5	20ug	0.008	
Mx1	30ug.	0.014	D.S=5.43
Mx2	30ug.	0.015	C.V.= 5.14
Mx3	30ug.	0.013	Promedio=0.0138
Mx4	30ug.	0.015	
Mx5	30ug.	0.014	
Mx1	40ug.	0.019	D.S=2.66
Mx2	40ug.	0.020	C.V.= 2.47
Mx3	40ug.	0.019	Promedio=0.0194
Mx4	40ug.	0.019	
Mx5	40ug.	0.020	
Mx1	70ug.	0.031	D.S=3.94
Mx2	70ug.	0.031	C.V.=4.14
Mx3	70ug.	0.034	Promedio=0.032
Mx4	70ug.	0.031	
Mx5	70ug.	0.033	
Mx1	100ug.	0.049	D.S=2.89
Mx2	100ug.	0.048	C.V.=3.00
Mx3	100ug.	0.047	Promedio=0.0472
Mx4	100ug.	0.045	
Mx5	100ug.	0.047	

BIBLIOTECA CENTRAL

Mx1	120ug.	0.057	D.S=1.36
Mx2	120ug.	0.059	C.V.=1.39
Mx3	120ug.	0.058	Promedio=0.0578
Mx4	120ug.	0.058	
Mx5	120ug.	0.057	
Mx1	160ug.	0.077	D.S= 2.67
Mx2	160ug.	0.077	C.V. =2.78
Mx3	160ug.	0.079	Promedio= 0.0766
Mx4	160ug.	0.077	
Mx5	160ug.	0.073	
Mx1	200ug.	0.095	D.S=2.80
Mx2	200ug.	0.099	C.V.= 2.85
Mx3	200ug.	0.096	Promedio=0.0984
Mx4	200ug.	0.100	
Mx5	200ug.	0.102	
Mx1	300ug.	0.145	D.S=0.74
Mx2	300ug.	0.144	C.V.=0.76
Mx3	300ug.	0.143	Promedio=144.8
Mx4	300ug.	0.146	
Mx5	300ug.	0.146	
Mx1	500ug.	0.255	D.S=0.326
Mx2	500ug.	0.255	C.V.= 0.325
Mx3	500ug.	0.254	Promedio=0.2542
Mx4	500ug.	0.253	
Mx5	500ug.	0.254	

A= -1.329499	B=0.99153137	r = 0.9994568
$r^2 = 0.99891389$	P = 8.3229E ⁻⁷³	

Grafico No.2
Curva de calibración de cobre en muestras de suero.
Método de Dietilditiocarbamato.



La exactitud se determinó de acuerdo al porcentaje de recuperación de las concentraciones de cobre en las muestras séricas procesadas en quintuplicado. Se obtuvo una variación de 95 a 105.73 % en el rango de 20 a 500 ug %, con un coeficiente de variación de 0.33 a 5.44 %, similar al observado en el ensayo con estándares en agua (0.17 a 6.00 %) (Tabla No 3).

En el mismo cuadro puede observarse mucha dispersión en los resultados correspondientes a los niveles de 10 y 15 ug%, el porcentaje de recuperación del promedio de las cinco réplicas fue de 114 y 70.78% respectivamente; y los coeficientes de variación de 25.42 y 14.82%, por lo que las concentraciones se alejaron mucho de los valores reales.

TABLA No.3
TRATAMIENTO ESTADISTICO
DATOS DE LA MEDICION DE COBRE EN MUESTRAS DE SUERO
EN EL METODO DE DIETILDITIOCARBAMATO
EXACTITUD.

Concentración real ug%.	Absorbancia	Concentración medida ug%	%rec.	
Mx1 10ug.	0.002	7.88	78.80	C.V.= 25.42
Mx2 10ug.	0.004	11.79	117.90	D.S.=28.99
Mx3 10ug.	0.006	15.70	157.00	Promedio=114.0
Mx4 10ug.	0.004	11.79	117.90	
Mx5 10ug.	0.003	9.84	98.40	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 15ug	0.004	11.79	78.6	D.S.=11.65
Mx2 15ug	0.002	7.88	52.53	C.V.= 14.82
Mx3 15ug	0.004	11.79	78.60	Promedio=70.77
Mx4 15ug	0.003	9.84	65.60	
Mx5 15ug	0.004	11.79	78.60	

No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 20ug	0.008	19.61	98.05	D.S=5.34
Mx2 20ug	0.009	21.56	107.80	C.V.= 5.44
Mx3 20ug	0.009	21.56	107.80	Promedio=101.95
Mx4 20ug	0.008	19.61	98.05	
Mx5 20ug	0.008	19.61	98.05	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 30ug.	0.014	31.33	104.43	D.S=5.43
Mx2 30ug.	0.015	33.28	110.93	C.V.= 5.14
Mx3 30ug.	0.013	29.38	97.93	Promedio=105.73
Mx4 30ug.	0.015	33.28	110.93	
Mx5 30ug.	0.014	31.33	104.43	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 40ug.	0.019	41.10	102.75	D.S=2.66
Mx2 40ug.	0.020	43.05	107.62	C.V.= 2.47
Mx3 40ug.	0.019	41.10	102.75	Promedio=104.69
Mx4 40ug.	0.019	41.10	102.75	
Mx5 40ug.	0.020	43.05	107.62	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 70ug.	0.031	64.55	92.21	D.S=3.94
Mx2 70ug.	0.031	64.55	92.21	C.V.=4.14
Mx3 70ug.	0.034	70.41	100.58	Promedio=95.00
Mx4 70ug.	0.031	64.55	92.21	
Mx5 70ug.	0.033	68.46	97.8	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 100ug.	0.049	99.71	99.71	D.S=2.89
Mx2 100ug.	0.048	97.76	97.76	C.V.=3.00
Mx3 100ug.	0.047	95.80	95.80	Promedio=96.19
Mx4 100ug.	0.045	91.90	91.90	
Mx5 100ug.	0.047	95.80	98.80	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 120ug.	0.057	115.35	96.12	D.S=1.36
Mx2 120ug.	0.059	119.25	99.37	C.V.=1.39
Mx3 120ug.	0.058	117.30	97.75	Promedio=97.42
Mx4 120ug.	0.058	117.30	97.75	
Mx5 120ug.	0.057	115.35	96.12	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	
Mx1 160ug.	0.077	154.42	96.51	D.S= 2.67
Mx2 160ug.	0.077	154.42	96.51	C.V. =2.78
Mx3 160ug.	0.079	158.32	98.95	Promedio=153.63
Mx4 160ug.	0.077	154.42	96.51	
Mx5 160ug.	0.073	146.60	91.62	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.	

Mx1	200ug.	0.095	189.59	94.79	D.S=2.80
Mx2	200ug.	0.099	197.40	98.70	C.V.= 2.85
Mx3	200ug.	0.096	192.54	95.77	Promedio=98.11
Mx4	200ug.	0.100	199.35	99.67	
Mx5	200ug.	0.102	203.26	101.61	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.		
Mx1	300ug.	0.145	287.27	95.75	D.S=0.74
Mx2	300ug.	0.144	285.32	95.10	C.V.=0.76
Mx3	300ug.	0.143	291.18	97.06	Promedio=96.14
Mx4	300ug.	0.146	289.23	96.41	
Mx5	300ug.	0.146	289.23	96.41	
No. Muestras	Absorbancia	Ug/ml.	%rec.		
Mx1	500ug.	0.255	502.19	100.43	D.S=0.326
Mx2	500ug.	0.255	502.19	100.43	C.V.= 0.325
Mx3	500ug.	0.254	500.24	100.04	Promedio=100.11
Mx4	500ug.	0.253	498.29	99.65	
Mx5	500ug.	0.254	500.24	100.04	

	Promedio	D.S.	C.V.
No incluye 10,15,20 ug.	98.89	4.56	4.61
No incluye ,10,15 ug.	100.33	10.60	10.57
Incluye todos	98.06	13.04	13.29

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se aplicó el mismo criterio para la precisión, la cual expresada en general como el coeficiente de variación, quedó establecida como en el caso de la exactitud, entre las concentraciones de 20 a 500 ug %, ya que el coeficiente de variación obtenido en el rango mencionado fue de 0.33 a 5.44 % (Tabla N° 4).

TABLA No. 4
 TRATAMIENTO ESTADISTICO
 DATOS DE LA MEDICION DE COBRE EN MUESTRAS DE SUERO
 EN EL METODO DE DIETILDITIOCARBAMATO
 PRECISION.

Concentración real Ug%	Absorbancia	Concentración medida.ug%	
Mx1 10ug.	0.002	7.88	D.S=2.89
Mx2 10ug.	0.004	11.79	C.V.=25.35
Mx3 10ug.	0.006	15.70	Promedio=11.4
Mx4 10ug.	0.004	11.79	
Mx5 10ug.	0.003	9.84	
Mx1 15ug	0.004	11.79	D.S=11.65
Mx2 15ug	0.002	7.88	C.V.= 14.82
Mx3 15ug	0.004	11.79	Promedio=10.62
Mx4 15ug	0.003	9.84	
Mx5 15ug	0.004	11.79	
Mx1 20ug	0.008	19.61	D.S=5.34
Mx2 20ug	0.009	21.56	C.V.= 5.44
Mx3 20ug	0.009	21.56	Promedio=20.39
Mx4 20ug	0.008	19.61	
Mx5 20ug	0.008	19.61	
Mx1 30ug.	0.014	31.33	D.S=1.63
Mx2 30ug.	0.015	33.28	C.V.=5.14
Mx3 30ug.	0.013	29.38	Promedio=31.72
Mx4 30ug.	0.015	33.28	
Mx5 30ug.	0.014	31.33	
Mx1 40ug.	0.019	41.10	D.S=1.06
Mx2 40ug.	0.020	43.05	C.V.=2.53
Mx3 40ug.	0.019	41.10	Promedio=41.88
Mx4 40ug.	0.019	41.10	
Mx5 40ug.	0.020	43.05	
Mx1 70ug.	0.031	64.55	D.S=2.76
Mx2 70ug.	0.031	64.55	C.V.=4.15
Mx3 70ug.	0.034	70.41	Promedio=66.51
Mx4 70ug.	0.031	64.55	
Mx5 70ug.	0.033	68.46	
Mx1 100ug.	0.049	99.71	D.S=2.89
Mx2 100ug.	0.048	97.76	C.V.=3.00
Mx3 100ug.	0.047	95.80	Promedio=96.19
Mx4 100ug.	0.045	91.90	
Mx5 100ug.	0.047	95.80	

Mx1	120ug.	0.057	115.35	D.S=1.63
Mx2	120ug.	0.059	119.25	C.V.=1.39
Mx3	120ug.	0.058	117.30	Promedio=116.91
Mx4	120ug.	0.058	117.30	
Mx5	120ug.	0.057	115.35	
Mx1	160ug.	0.077	154.42	D.S=4.28
Mx2	160ug.	0.077	154.42	C.V.=2.78
Mx3	160ug.	0.079	158.32	Promedio=153.63
Mx4	160ug.	0.077	154.42	
Mx5	160ug.	0.073	146.60	
Mx1	200ug.	0.095	189.59	D.S=5.43
Mx2	200ug.	0.099	197.40	C.V.=2.76
Mx3	200ug.	0.096	192.54	Promedio=196.43
Mx4	200ug.	0.100	199.35	
Mx5	200ug.	0.102	203.26	
Mx1	300ug.	0.145	287.27	D.S=2.22
Mx2	300ug.	0.144	285.32	C.V.=0.769
Mx3	300ug.	0.143	291.18	Promedio=288.44
Mx4	300ug.	0.146	289.23	
Mx5	300ug.	0.146	289.23	
Mx1	500ug.	0.255	502.19	D.S=1.63
Mx2	500ug.	0.255	502.19	C.V.=0.325
Mx3	500ug.	0.254	500.24	Promedio=500.63
Mx4	500ug.	0.253	498.29	
Mx5	500ug.	0.254	500.24	
A= -1.32949963	B=0.99153137	R ₂ = 0.99891389	P= 8.3229E-73	

Basándose en los resultados anteriores, el límite de cuantificación se fijó en 20 ug%, ya que 15 y 10 ug% presentan un coeficiente de variación de 14.82 y 25.42 respectivamente, el cual se aleja del coeficiente aceptado de 6%.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La validación del método de la oxalildihidrazida para la medición de cobre en suero, no se pudo realizar debido a la turbidez que presentó el complejo formado por esta sustancia y el cobre en acetaldehído(3).

Con el método del dietilditiocarbamato sódico, se formó un complejo estable con el cobre y extraído con la mezcla de éter-alcohol amílico, permitió llevar a cabo su validación. Para el análisis se empleó 1 ml de suero y no 3 ml como indica el método original (7), con la ventaja de usar menos muestra sin dejar de tener un margen de exactitud y precisión aceptables.

Con el análisis de los resultados obtenidos a partir de las muestras de suero contaminadas con cobre, la linealidad se determinó en un rango de 10 a 500 ug %, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9994568 coeficiente de determinación r^2 de 0.99891 y la significancia estadística $p = 8.3229E^{-73}$ (tabla N° 2 y gráfica N°2), la literatura indica un valor de 1 para el coeficiente ideal.(23) Concentraciones de 2 a 300 ug % han sido reportadas para la linealidad, en la determinación de cobre por absorción atómica (1).

En el mismo rango se observó una variación en el porcentaje de recuperación de 95 a 105.73 % con un coeficiente de variación de 0.33 a 5.44 %, estableciendo en esta forma la exactitud y la precisión del método (Cuadro No 2). Baselt y Stahr mencionan valores de 85 a 110% y de 91 a 104 % y coeficiente de variación de 3 y 12.5 % respectivamente, empleando para la medición del cobre, absorción atómica (1, 19).

Esto indica que la precisión se establece para cada método validado y sugiere que en la práctica, los resultados estarán sujetos a estas variaciones tanto en precisión como en exactitud.

Los niveles de 10 y 15 ug % presentaron un porcentaje de recuperación de 114 y 78.78 % con un coeficiente de variación de 25.42 y 14.82 % respectivamente (Cuadro No 3), se observó mucha dispersión en los resultados y muy alejados de los valores normales, por lo que el limite cuantificación se estableció en 20 ug%.

10. CONCLUSIONES:

- 10.1 Se seleccionó el método de dietilditiocarbamato de sodio ya que asegura la mejor calidad de los resultados para la determinación de cobre en suero.
- 10.2 El método del dietilditiocarbamato de sodio logró validarse comprobándose su confiabilidad para la determinación de cobre en muestras séricas, a través de la aceptación de los parámetros evaluados como lo son linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación.

11. RECOMENDACION:

11.1 El método se validó en su linealidad, exactitud, precisión, en los parámetros que muestran los resultados, útil para laboratorios que poseen solo con equipo convencional, y no cuentan con espectrofotometría de absorción atómica.

11.2 Con la aplicación del método estudiado se logran hacer determinaciones de cobre en suero confiables que son útiles para la clínica y la toxicología.

12.) REFERENCIAS :

- 12.1) Baselt C. Randall. Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology. Ed. Biomedica Publications, 1980. California pp. 92-93.
- 12.2) Baselt Randall C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Chemical Toxicology Institute. Fifth Ed. Foster City California. 2000. pp 216-218.
- 12.3) Baver John D. / Ackermann Philip G. / Gelson Toro Clínica Laboratory Methods. Eighth edition. The C.N. Mosby company Saint Louis 1974 pp. 419,420.
- 12.4) Berman E., Toxic Metals and their Análisis. Hieden international topics in science. Ed. L.C. Tomas. Pp. 95-97.
- 12.5) Goldfrank's Lewis R. Toxicologic Emergencies. Sexta Edición. Applenton & Lange. Stanford Connecticut 1998. Pp.1339
- 12.6) Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and doagnosis. Edited by: San Frankel. Eat. Volumen 1, A textbook on laboratory procedures an their interpretation. Seventh Edition. Saint Louis The C.V. Mosby Company 1970. pp. 448-449.

orden de 200 ug/100ml. o superiores. El cobre sérico total, el cobre de reacción directa y la concentración de ceruloplasmina aumentan notablemente durante el tercer trimestre de la gestación, en el que se encuentran valores medios, respectivamente, de 239 ug/100ml., 29 ug/100ml. y 84mg/100ml. Casi todos los autores coinciden en la existencia de una cierta variación diurna en la concentración de cobre en suero, aunque no está bien definida la intensidad y la forma que tiene tal variación.(8).

. **Repetto. M.** describe que el cobre una vez absorbido, es unido a la albúmina y lentamente intercambiado a ceruloplasmina, que lo transporta y favorece su excreción por la orina; cuando hay déficit de ceruloplasmina el cobre se retiene en el hígado, donde se almacena como complejo con metalotioneína (MT-Cu.)

En el hombre hay dos desórdenes genéticos íntimamente ligados al cobre, enfermedad de Wilson y enfermedad de Menke.

La primera se caracteriza por excesiva acumulación de cobre en el hígado, cerebro, riñón y cornea. La enfermedad de Wilson se denomina también degeneración hepatolenticular y tiene un curso progresivo y fatal, con afectaciones hepáticas, biliares y del sistema nervioso, con cambios neuróticos y de la conducta. Se debe a insuficiente síntesis de ceruloplasmina, por trastorno genético; se diagnostica por el déficit de esta proteína transportadora en la sangre, y bajo nivel de cobre en este medio, pero muy alto en orina.

La segunda presenta bajos niveles de cobre en cerebro e hígado y muy altos en otros órganos, lo que se debe, al parecer, a una alteración en la síntesis de metalotioneína.

La intoxicación por cobre se manifiesta por efectos gastrointestinales, respiratorio, hemático y nerviosos. Su estrecha relación con proteínas como ceruloplasmina, citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, tirosina, catalasa, peroxidasa, amino oxidasa, uricasa y metalotioneína hace que su deficiencia también sea causa de patologías relacionadas con estas proteínas. (17)


El cobre después de 24 horas de ser absorbido, el 93% esta unido a la ceruloplasmina; el 7% esta en la albumina.

Hay variaciones de los niveles de cobre en suero:


Hipercupremia: El cobre y la ceruloplasmina están incrementados en infecciones crónicas y agudas, cirrosis, esquizofrenias, epilepsia, hipertiroidismo, tumores malignos, leucemias, anemia perniciosa y esclerosis múltiple, en las dos últimas la ceruloplasmina decrece.

Hipocupreina: El cobre y la ceruloplasmina están fisiológicamente disminuidos en enfermedad de Wilson, nefrosis, enfermedad ciliar, y disproteinemia de infantes. (6)

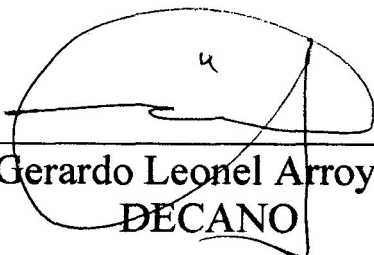

Jenner Giovany Juárez Lacanal
AUTOR


Licda. Fabiola Prado de Micheo
ASESORA


Licda. María Antonia Pardo de Chávez
ASESORA


Licda. Lillian Irving Antillón, M.A.
REVISORA


Licda. Lillian Irving Antillón, M.A.
DIRECTORA


M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
DECANO