

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE TRINDER MODIFICADO  
POR BAUER, ACKERMANN Y TORO,  
PARA DETERMINACIÓN DE SALICILATOS EN SANGRE**

**INFORME DE TESIS**

**Presentado por**

**Nydia Nefertiti López García**

**Para Optar al Título de**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Guatemala, Junio del 2006**

## INDICE

1.	Resumen.....	2
2.	Introducción.....	4
3.	Antecedentes.....	6
4.	Justificaciones.....	9
5.	Objetivos.....	10
6.	Hipótesis.....	11
7.	Materiales y Métodos.....	12
8.	Resultados.....	18
9.	Discusión de Resultados.....	21
10.	Conclusiones.....	25
11.	Recomendaciones.....	26
12.	Referencias.....	27
13.	Anexos.....	30

## 1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue validar el método de Trinder modificado por Bauer, Ackermann y Toro, para la determinación de salicilatos en muestras séricas. Este se basa en la formación de un complejo de color púrpura por reacción de los salicilatos con nitrato férrico y la precipitación simultánea de las proteínas séricas en presencia de cloruro mercúrico en medio ácido. Posteriormente la solución coloreada es sometida a un análisis espectrofotométrico a 540 nm.

Los parámetros evaluados en la validación fueron linealidad, precisión, exactitud, rango, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.

Se realizó una prueba preliminar incluyendo concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 60.0 y 80.0 mg% de salicilatos en muestras acuosas (curva estándar) y séricas. Los niveles menores de 2.0 mg% mostraron porcentajes de recuperación y coeficientes de variación erráticos (51.84 a 292.2% y 25.11 a 69.10 respectivamente).

Un segundo ensayo consistió en la evaluación de muestras séricas como se indicó anteriormente, de 2.0 a 80.0 mg%.

Se estableció la linealidad del método en el rango de 2.0 a 80.0 mg% (nivel máximo analizado), con un coeficiente de correlación de  $r = 0.999766$ .

El límite de detección se fijó en 0.5 mg% y el límite de cuantificación en 2.0 mg%.

La exactitud y la precisión determinadas por el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación, presentaron valores de 92.83 a 109.55% y de 0.65 a 5.58% respectivamente.

Se comprobó que el método detecta la concentración de salicilatos presentes en muestras séricas en un rango de 2.0 - 80.0 mg%.

El método de Trinder se considera confiable, exacto y preciso para la determinación de salicilatos en muestras séricas, con la ventaja de la rapidez del análisis.

## 2. INTRODUCCION

Los salicilatos, especialmente el ácido acetilsalicílico, han sido ampliamente prescritos y utilizados como analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos de primera elección por millones de personas a nivel mundial. Su venta libre y fácil acceso a la población los convierte en un elemento común en los botiquines de primeros auxilios en la mayoría de los hogares, por este motivo a menudo son causantes de intoxicaciones de diferentes tipos, desde agudas en niños menores de 12 años hasta crónicas en pacientes de la tercera edad.

Algunos factores como la susceptibilidad del niño a los cambios hidroelectrolíticos y su escaso poder de desintoxicación, hacen que la administración de salicilatos adquiera especial importancia en la edad pediátrica (8). Algunos infantes pueden desarrollar el síndrome de Reye que consiste en una inflamación cerebral (encefalopatía) y hepática que se presenta en niños a los que se ha tratado con salicilatos (9).

El efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio producido por los salicilatos, ocurre predominantemente por inhibición de la ciclooxigenasa, con una subsecuente disminución en la producción de prostaglandinas y sus respectivos autacoides (9).

Entre los síntomas más comunes que presenta un paciente con intoxicación por salicilatos se pueden citar los siguientes: molestias gastrointestinales (vómito, irritación y hemorragia),hiperpnea, tinitus, alcalosis respiratoria y acidosis metabólica; en caso de una intoxicación grave pueden manifestarse convulsiones, coma, hipoglucemia (o en ocasiones hiperglucemia), hipertermia y edema pulmonar (16, 18).

Recientemente se han encontrado nuevas aplicaciones terapéuticas al ácido acetilsalicílico, incluyendo terapia profiláctica para migrañas y cáncer de colon, como un agente antiplaquetario para la prevención de isquemia coronaria y cerebro-vascular (9). Estos usos hacen que este fármaco adquiera mayor popularidad en la población que se ve afectada por los padecimientos anteriormente mencionados, convirtiendo a sus nuevos consumidores en un grupo expuesto a intoxicaciones.

Cuando se sospecha u ocurre una intoxicación por salicilatos, es necesario cuantificar y monitorear los niveles séricos del medicamento (presentes en el suero sanguíneo previamente extraído de sangre), para determinar el tratamiento de soporte y el pronóstico de la intoxicación.

El laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, realiza el análisis de salicilatos en sangre utilizando el método de Trinder. Con fines de acreditación de esta metodología se hace necesaria su validación (21).

### 3. ANTECEDENTES

El ion salicilato es la forma activa del ácido acetilsalicílico in vivo y la mayoría de procedimientos de análisis están diseñados para medir la concentración de este metabolito (1). En la actualidad se puede encontrar una amplia gama de métodos para analizar salicilatos en fluidos humanos desde el típico ensayo colorimétrico, hasta métodos alternos como procedimientos por cromatografía de gases diseñados para determinar concentraciones simultaneas de salicilatos y otros compuestos similares (6).

P. Trinder en 1954 desarrolló un método rápido para determinar la presencia de salicilatos en fluidos humanos empleando 1 ml (mililitro) de suero sanguíneo. El método se basó en la precipitación de las proteínas del suero al adicionar cloruro mercurico y luego nitrato férrico para crear un compuesto coloreado, midiendo posteriormente la absorbancia por espectrofotometría (2, 22).

Bauer, Ackermann y Toro en 1974 propusieron una modificación del método de Trinder utilizando 0.2 ml de suero o plasma, en lugar de 1 ml del método original (2, 22).

Chiringos y Udenfriend en 1959 propusieron un análisis para determinar la concentración de salicilatos en sangre por medio de espectrofotometría fluorescente. El método se basó en la extracción con éter de los salicilatos en medio acidificado y posterior extracción de los mismos con solución buffer a pH 10, analizados por fluorometría. El ensayo era apropiado para la medición de bajas concentraciones de salicilatos en muestras de 100 $\mu$ L (microlitros) de plasma, teniendo como ventaja adicional que los componentes normales del

plasma no interferían con el ensayo, así como tampoco lo hacían los metabolitos conjugados del ácido acetilsalicílico (7).

Un método de cromatografía de gases empleando detector de ionización de llama para la determinación simultánea de ácido acetilsalicílico, ácido salicílico y salicilamida en plasma fue diseñado. Los fármacos y un estándar interno (ácido m-toluico) contenidos en plasma acidificado, fueron extraídos con éter, éste último evaporado y el residuo sometido a una derivatización con solventes orgánicos (20).

Blair y colaboradores en 1978 plantearon un método rápido utilizando cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de ácido salicílico en suero, empleando 3 microlitros de muestra diluida con un estándar interno (ácido o-metoxibenzoico), mostrando tiempos de retención de 6 y 3.75 minutos respectivamente, utilizando una columna en fase inversa (Bondapack C18/Corasil) de 37-50 $\mu$ m (micrometros) (3).

Otro método para cuantificar simultáneamente las concentraciones de acetaminofen y salicilato en plasma por cromatografía líquida fue propuesto. Se extrajeron el ácido salicílico y acetaminofén con cloroformo e isopropanol, utilizando 8-cloroteofilina como estándar interno y el extracto concentrado analizado por cromatografía líquida de alta resolución con detector UV a 248 nm (nanómetros) (19).

Una técnica para determinar la concentración de ácido acetyl salicílico, salicilatos y ácido salicílico en plasma por cromatografía líquida fue desarrollada, empleando una columna de fase inversa (Spherisorb ODS con tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, 4.6x250 mm) a 234 nm, con una sensibilidad de 50 microgramos/litro. Además el método incluía una modificación para



determinar metabolitos de ácido acetilsalicílico (ácido gentísico, ácido salicílico y ácido salicilúrico) en orina (4).

El laboratorio de análisis del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC, en la actualidad utiliza el método de Trinder modificado por Bauer, Ackermann y Toro, para la determinación de salicilatos en sangre. Este método se seleccionó por ser el más práctico, económico y confiable que los demás empleados en su momento.

Los parámetros para la validación de un método analítico son los siguientes: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango (26).

#### 4. JUSTIFICACIONES

- 3.1 En la norma ISO 17025 homologada por COGUANOR (Comisión Guatemalteca de Normas) se indica que todo método modificado con fines de acreditación, debe ser validado para asegurar resultados reproducibles y confiables.
- 3.2 La medición precisa y exacta de los niveles séricos de salicilatos es necesaria para la confirmación de estados de riesgo debidos a la intoxicación por los mismos, y ello puede permitir el tratamiento adecuado al paciente afectado por sobredosificación.

## 5. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general:

Validar el método de Trinder\* para determinación de la concentración de salicilatos en sangre.

### 4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Establecer los parámetros de exactitud, precisión, linealidad y especificidad del método de Trinder.

4.2.2 Determinar el límite de detección, límite de cuantificación y rango del método de Trinder.

\*Método de Trinder modificado por Bauer, Ackermann y Toro

## 6. HIPÓTESIS

La concentración de salicilatos en sangre puede ser medida espectrofotométricamente utilizando el método de Trinder con precisión, exactitud y linealidad, especificidad determinando al mismo tiempo el límite de detección, el límite de cuantificación y rango.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

Método de Trinder para análisis por espectrofotómetro para cuantificar salicilatos en sangre.

### 6.2 MEDIOS:

#### 6.2.1 Recursos Humanos:

Autora: Br. Nydia Nefertiti López García

Asesora: Licda. Fabiola Prado de Micheo

#### 6.2.2 Instalaciones:

Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en la 3ra. Calle 6-47 zona 1 en la Ciudad de Guatemala.

#### 6.2.3 Recursos Materiales:

##### 6.2.3.1 Equipo:

- Agitador eléctrico (VORTEX)
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Centrífuga
- Espectrofotómetro UV/Visible marca Thermospectronic modelo Génesis 10 uv
- Refrigerador
- Estufa

##### 6.2.3.2 Cristalería:

- Balones volumétricos
- Frascos Erlenmeyer
- Goteros
- Pipetas de Pasteur
- Pipetas volumétricas
- Probeta
- Espátula
- Vasos de precipitar
- Gradilla
- Bureta
- Tubos de ensayo para centrifuga con tapón esmerilado de 15 ml

#### 6.2.3.3 Reactivos:

- Agua destilada
- Cloruro mercúrico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Nitrato férrico
- Ácido acetil salicílico USP

### 6.3 METODOLOGIA:

#### 6.3.1 Método de Trinder, propuesto por Bauer, Ackermann y Toro (2, 22):

Este método colorimétrico se basa en la formación de un complejo de color violeta con los salicilatos por iones ferrosos, después de la precipitación de las proteínas por la sal de mercurio, midiendo la absorbancia a 540 nm.

### 6.3.2 Preparación de reactivos (2, 22):

6.3.2.1 Reactivo de Trinder: Se disolvieron por calentamiento 40 g de cloruro mercúrico químicamente puro en 900 ml de agua destilada, se enfrió y agrego 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 40 g de nitrato férrico, diluir a 1 litro. Se filtro la solución.

6.3.2.2 Solución concentrada de Ácido acetilsalicílico: Se disolvieron 0.29 g de salicilato de sodio en agua destilada y se aforo a 250 ml, esta solución contiene 1 mg de ácido salicílico por ml. Se guardo en refrigeración.

#### 6.3.2.3 Soluciones de trabajo:

Se prepararon las diluciones necesarias en agua destilada y se obtuvieron las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 mg% (curva de calibración en agua).

6.3.2.4 Se prepararon muestras séricas marcadas con las concentraciones mencionadas en el numeral anterior (curva de calibración en suero).

### 6.3.3 Procedimiento (2, 22):

6.3.3.1 Se transfirió a tubos de centrífuga 0.2 ml de las soluciones de trabajo (incluyéndose las diferentes concentraciones de todas las soluciones de trabajo), y 1.8 ml de agua destilada (curva de calibración en agua).

- 6.3.3.2 Se midió en tubos de centrifuga 0.2 ml de las muestras séricas marcadas y se agregó 1.8 ml de agua destilada (curva de calibración en suero).
- 6.3.3.3 En ambos casos se trabajó un blanco al cual se agregaron 2 ml de agua destilada y otro con suero libre de ácido acetilsalicílico.
- 6.3.3.4 Se agregaron 2 ml de reactivo de Trinder, se agitó por 30 segundos y centrifugó a 2000 revoluciones por minuto durante 5 minutos.
- 6.3.3.5 Se transfirió el sobrenadante a tubos de ensayo para espectrofotometría y se leyeron las absorbancias a 540 nm.

#### 6.4 DISEÑO ESTADÍSTICO:

6.4.1 Obtención de la curva de calibración de las soluciones de trabajo en medio acuoso:

Se analizaron tres concentraciones debajo de los niveles terapéuticos normales (2.0 a 30.0 mg/dl), 0.5, 1.0, 1.5 mg/dl, cinco dentro del rango: 2.0, 5.0, 10, 20, 30 mg/dl; y tres por arriba del rango de aceptación, 40, 60 y 80 mg/dl. Cada concentración se analizó tres veces.

6.4.2 Obtención de la curva de calibración de muestras séricas:

Se analizaron muestras séricas con las concentraciones de salicilatos mencionadas en el párrafo anterior, para determinar los parámetros requeridos para la validación de un método



(exactitud, linealidad, precisión, especificidad, rango, límite de detección y límite de cuantificación).

#### 6.4.3 Cálculos:

Se trazó una gráfica en la cual se determinó la linealidad. Se encontró para cada punto la desviación estándar, porcentaje de recuperación y coeficiente de variación de la siguiente manera:

Linealidad: Se calculó por medio de la gráfica aplicando regresión lineal a los valores de los puntos de la concentración versus la absorbancia en la ecuación correspondiente. Los datos obtenidos se evaluarán estadísticamente por el coeficiente de correlación lineal (5, 24).

Precisión: Se estableció utilizando cinco muestras de un mismo punto con su respectiva desviación estándar, y coeficiente de variación (5, 24).

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

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{valor encontrado} \times 100}{\text{valor original}}$$

Calculando además su desviación estándar.

Especificidad: Se calculó comparando el valor obtenido en la medición a través del procedimiento, de la muestra de plasma sin marcar y el valor registrado por el blanco de agua (numeral 6.3.3.3). Ambos valores son similares.

Límite de detección: Se calculó a partir de la menor concentración que pudo ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

Límite de cuantificación: Se calculó con el valor menor del analito en la muestra que pudo ser determinado con una exactitud y precisión aceptables.

## 8. RESULTADOS

Con el objeto de validar el método de Trinder modificado por Bauer, Ackermann y Toro, para la determinación de salicilatos en muestras séricas, se realizaron dos ensayos. Tomando en cuenta los niveles terapéuticos, en el primero se incluyeron concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 mg%; y de 40.0, 60.0 y 80.0 mg% consideradas tóxicas. Se analizaron simultáneamente soluciones acuosas de salicilatos, (curva de calibración) y muestras séricas marcadas con los niveles indicados, haciendo 5 réplicas de cada una, asimismo, se analizaron blancos de reactivos y de muestra, usando agua destilada y el mismo suero sin salicilatos respectivamente.

Los resultados (Cuadro No.1), obtenidos a partir de la curva de calibración de estándares (Gráfica No. 1) mostraron mucha variación, especialmente las concentraciones menores de 2.0 mg%, donde se puede observar que los porcentajes de recuperación estuvieron muy distantes del 100% (51.84 a 292.9%), igualmente, los coeficientes de variación muy altos (25.11 a 69.10%), considerándose estos resultados inexactos e imprecisos, lo que permitió establecer que el límite de cuantificación es de 2 mg%.

En el segundo ensayo se procedió de igual manera, pero se evaluaron niveles séricos de salicilatos de 2.0 a 80.0 mg%, en quintuplicado. Simultáneamente se hizo una curva de calibración en solución acuosa con las mismas concentraciones, en triplicado. A partir de esta última se calcularon los niveles de las muestras séricas ensayadas.

En el Cuadro No.2 se presentan los valores de absorbancia de los estándares analizados y su respectiva curva de calibración se observa en la

Gráfica No.2, la cual obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.99969914.

Los datos correspondientes al segundo ensayo de salicilatos en muestras séricas, se encuentran en el cuadro No.3 (cuarta y quinta columna), y en la Gráfica No.3 la curva de regresión lineal a partir de estos datos, estableciéndose en esta forma, el parámetro de linealidad, se comprobó que el método es lineal en el rango ensayado (2.0 - 80.0 mg%), con un coeficiente de correlación lineal de 0.99976652.

En el Cuadro No.4 se encuentra reunido el valor de absorbancia de los blancos de muestras séricas y el promedio de los blancos de estándares. La diferencia encontrada se calculó por medio de la ecuación de la Gráfica No.2, obteniéndose la concentración aportada por la coloración de los componentes del suero (sin analito), la cual dio un valor promedio de 0.57 mg%. La especificidad, expresada como la habilidad del método analítico para determinar un compuesto sin interferencia de otras sustancias presentes en la matriz, se determinó por el valor anteriormente mencionado.

La exactitud y la precisión del método, se determinaron por el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación de las concentraciones de salicilatos en las cinco réplicas de las muestras séricas ensayadas (2.0 - 80.0 mg%). De acuerdo al análisis de los datos, se puede observar en el Cuadro No.5 (Gráfica No.4), un rango de variación de 92.83 a 109.54 para el primero y de 0.65 a 5.58 para el segundo (Gráfica No.5).

Siguiendo la respuesta instrumental del método, el límite de detección se estableció sumando 3 veces la desviación estándar (SD) a la respuesta promedio del blanco y el límite de cuantificación sumando 10 veces la SD de la

respuesta promedio del blanco (Cuadro No.6), en 0.26565814 mg% y 1.382824729 mg% respectivamente.

Considerando el límite de detección como la cantidad más pequeña de analito en una muestra, que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado, se determinó experimentalmente en 0.5 mg% (Cuadro No.1) y en 2.0 mg% el límite de cuantificación con adecuadas precisión y exactitud (Cuadro No.5).

Se establece como rango del método las concentraciones trabajadas en el segundo ensayo (2.0 a 80.0 mg%), pues se demostró un nivel aceptable de linealidad, precisión y exactitud, como se puede observar en los Cuadros No.3 y 5, y en las Gráficas No. 3, 4 y 5.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del primer ensayo de salicilatos en muestras séricas (0.5 a 80.0 mg%) Cuadro No.1, mostraron mucha variación, principalmente con relación al porcentaje de recuperación y al coeficiente de variación de los niveles inferiores a 2.0 mg%, 51.84 a 292.2% y 25.11 a 69.10% respectivamente, considerándose inexactos e imprecisos por lo que no son cuantificables concentraciones menores de 2.0 mg%.

A diferencia del anterior, en el segundo ensayo, la exactitud expresada por el porcentaje de recuperación, tuvo un rango de variación de 92.83 a 109.55 para las cinco réplicas de las muestras séricas en las concentraciones de salicilatos analizadas (2.0 a 80.0 mg%) Cuadro No.5. El método original de Trinder reporta valores de 99 a 100.5% en concentraciones de 10 a 50 mg% (27), casi con un 100% de exactitud; sin embargo otro autor indica una variación de 95 a 105% (25), dentro de este rango se encuentra la mayoría de los valores obtenidos en el segundo ensayo (Cuadro No. 3). Utilizando el método de Trinder modificado, la literatura revisada cita recuperaciones de 88.8 a 98.75% en concentraciones de 5 a 150 mg% (22).

El coeficiente de variación (CV) presentó valores de 0.65 a 5.58%, dentro de este rango se observó un aumento en los niveles de 2.0, 5.0 y 10.0 mg% (Cuadro No. 5). Se puede observar en la Gráfica No. 5, que a partir de 20.0 mg% el CV disminuyó gradualmente, sin embargo no se puede afirmar que valores inferiores a dicha concentración sean imprecisos ya que la precisión no es una característica absoluta, dependiendo de la experiencia del analista, del equipo de laboratorio, etc. (6). Normalmente tiende a disminuir conforme

aumenta la concentración del compuesto en la muestra, tal y como se menciona en la literatura (23).

Este parámetro no es fijo, aplicable a todos los métodos y debe ser establecido para cada uno y para cada sustancia (23). Burnett y Ayers han determinado que el CV para el análisis de rutina de una serie de medicamentos es aproximadamente de 10%, mayor al obtenido en el presente trabajo (0.65 a 5.58%). Asimismo, Recinos refiere CV superiores, de 1.3 a 10.59% en concentraciones de salicilatos de 5 a 150 mg% (22).

La especificidad es la capacidad de un método analítico para determinar un compuesto sin la interferencia de otras sustancias presentes en la matriz (23). En un método espectrofotométrico, la respuesta en una muestra libre del compuesto a analizar, debería ser igual a “ 0 ”, es decir, su absorbancia igual a la del blanco de reactivos. En la validación de salicilatos, la lectura de los blancos fue mayor, correspondiendo al calcularlos con la curva de calibración, a un valor promedio de 0.57 mg% (Cuadro No.4), esto se debe a las sustancias normales del suero de personas que no reciben salicilatos, que producen una ligera coloración con el reactivo de Trinder. La literatura indica en este caso, valores menores de 1 mg%, así como variaciones que raras veces sobrepasan de 1.5 mg%, sin importancia, si se toman en cuenta los niveles que deben alcanzarse y mantenerse durante un tratamiento con salicilatos (2.0 a 30.0 mg%) (17, 28).

En la práctica, se puede efectuar la corrección debida a esta coloración, restando de la absorbancia de los estándares y de las muestras, la lectura de los blancos correspondientes, (promedio de los blancos de muestras libres de

salicilatos) o sumando la diferencia de absorbancia de los mismos a la lectura de los estándares (28).

De acuerdo a las concentraciones de salicilatos analizadas en muestras séricas, se comprobó que el método es lineal en el rango ensayado (2.0 a 80.0 mg%, Gráfica No.3), con un coeficiente de correlación lineal de 0.99976652. En la literatura consultada, no se indica rango de linealidad, por lo que tendría que determinarse experimentalmente, si fuera de interés, un rango que incluyera concentraciones arriba de 80 mg%.

Se considera como coeficiente de correlación lineal ideal, un valor de 1, pues este indica una perfecta asociación positiva aumentando “y” (absorbancia) al aumentar “x” (concentración de salicilatos mg%) (5).

El rango del método sujeto a variaciones de los CV y de los porcentajes de recuperación, demostró niveles de precisión, linealidad y exactitud aceptables en las concentraciones analizadas, por lo que el rango se definió experimentalmente como el intervalo entre 2.0 y 80.0 mg% (incluyendo estos valores).

Por medio de análisis estadístico de los datos obtenidos y la respuesta instrumental (23), el límite de detección igual al triple de la desviación estándar sumado a la media del blanco, se estableció en 0.26565814 mg% y el límite de cuantificación sumando 10 veces la desviación estándar a la media del blanco, en 1.382824729 mg% (Cuadro No.6). Sin embargo experimentalmente niveles de salicilatos inferiores a 2 mg% (0.5, 1.0 y 1.5 mg%), no pueden ser cuantificados. Considerando el límite de cuantificación como la menor cantidad del analito que puede medirse con adecuada precisión y exactitud (26), el valor establecido por la respuesta instrumental, no sería confiable. Por lo expuesto



anteriormente, se estableció en 0.5 mg% el límite de detección y en 2.0 mg%, el límite de cuantificación. La literatura consultada no menciona valores para estos límites.

## 10. CONCLUSIONES

El método de Trinder cumple con el parámetro de linealidad pues tiene un coeficiente de correlación lineal de 0.99976652.

En la presente investigación se determinó que el rango al cual el método de Trinder\* es lineal, exacto y preciso corresponde a las concentraciones de 2.0 a 80.0 mg%.

El método de Trinder\* es confiable, rápido y económico para determinar la concentración de salicilatos en sangre.

Por la cantidad de muestra requerida para llevar a cabo este análisis, se considera de primera elección para usarse en infantes.

Las concentraciones menores de 2.0 mg% de salicilatos contenidos en muestras séricas no pueden ser cuantificadas utilizando el método de Trinder\*.

\*Método de Trinder modificado por Bauer, Ackerman y Toro.

## 11.RECOMENDACIONES

Para estudiar más a fondo la especificidad del método es conveniente que se realicen análisis en muestras que estén contaminadas con diferentes sustancias (medicamentos de uso frecuente, medicamentos para enfermedades crónicas, etc...), para evaluar la influencia de estas sobre los resultados.

Es aconsejable realizar un estudio sobre la robustez del método de Trinder, es decir comprobar la precisión del método por medio de la reproducibilidad, evaluando el grado de variación que se obtiene cuando el procedimiento es aplicado por diferentes analistas, bajo diversas condiciones de análisis.

Elaborar un estudio comparativo del método de Trinder y de otros análisis cuantitativos de referencia para establecer el grado de concordancia de los mismos.

## 12. REFERENCIAS

1. Baselt, R. 1980. Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology. USA. Biomedical Publications. pp. 258-259.
2. Bauer, J. D., et. al. 1974. Clinical Laboratory Methods. 8<sup>a</sup>. ed. USA. The C.V. Mosby Company. pp. 803-804
3. Blair, D., B.H. Rumack y R. G. Peterson. 1978. Analysis for salicylic acid in serum by high-performance liquid chromatography. Clin. Chem. (USA). 24: 1543-1544.
4. Buskin, J. N., R. A. Upton y R. L. Williams. 1982. Improved liquid-chromatography of aspirin, salicylate, and salicylic acid in plasma, with a modification for determining aspirin metabolites in urine. Clin. Chem. (USA). 28: 1200 -1203.
5. Caballero, W. 1975. Introducción a la Estadística. Costa Rica. Ed. IICA. pp. 88-101. (Libros y Materiales Educativos No.28).
6. Chamberlain, J. 1987. Analysis of drugs in biological fluids. USA. CRC Press Inc. pp. 51-60,147-160.
7. Chiringos, M. A. y S. Udenfriend. 1959. A simple fluorimetric procedure for determining salicylic acid in biologic tissues. J. Lab. Clin. Med. (USA) 54: 769-772.
8. Córdoba, D. 2001. Toxicología. 4<sup>a</sup>. ed. Colombia. El Manual Moderno. pp. 325-329.
9. Donovan, J. y J. Akhtar. 2001. Salicylates. In Ford, M., et. al. Clinical Toxicology. Pennsylvania, USA. W. B. Saunders Company. pp. 275-280.
10. Dreisbach, H. R. y Robertson, W. 1988. Manual de Toxicología Clínica "Prevención, diagnóstico y tratamiento". Trad. Q.B.F. María del Rosario Carsolio 12<sup>a</sup>. ed. México. El Manual Moderno S.A. de C.V. pp. 267-271.
11. Eaton, A., et. al. 1995. Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater. 19<sup>a</sup>. ed. U.S.A. American Public Health Association Publication Office. pp. 3, 13-14.
12. Ford, M., et. al. 2001. Clinical Toxicology. USA. W. B. Saunders Company. pp. 1052.

13. Franco Flores, A. 2002. Guía para validar Métodos Analíticos Nuevos o Modificados para Productos Farmacéuticos. 80p. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
14. Insel, P. 1996. Analgésicos-Antipiréticos y Antiinflamatorios, y Fármacos Antigotosos. In Molinoff, P., et. al. Goodman & Gilman "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" Trad. de 9ª. ed. por Joel Hardman, Lee Limbird y Alfred Goodman Gilman. 9ª. ed. México. McGraw-Hill Interamericana. pp.661-705.
15. Juarez, J. 2003. Validación de Métodos para Cuantificar Cobre en Suero. 44p. Tesis de Licenciado en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
16. Ling, L., et. al. 2002. Secretos de la Toxicología. Trad. Martha Arriaza. México. Editorial McGraw Hill. pp.33-36.
17. Lynch, M., et. al. 1965. Métodos de Laboratorio. Trad. Dr. Roberto Folch. México. Ed. Interamericana S.A. pp.165.
18. Mencías, E. y Mayero, L. 2000. Manual de Toxicología Básica. España. Ediciones Díaz de Santos S.A. pp.129-131.
19. Micelli, J. N., M. K. Aravind, S. N. Cohen y A. K. Done. 1979. Simultaneous measurements of acetaminophen and salicylate in plasma by liquid chromatography. Clin. Chem. (USA). 25:1002-1004.
20. Rance, M. J., B. J. Jordan y J. D. Nichols. 1975. A simultaneous determination of acetylsalicylic acid, salicylic acid, and salicylamide in plasma by gas liquid chromatography. J. Pharm. Pharmacol. (USA) 27: 425-429.
21. Recinos de Barrera, A. N. 1996. Sistemas de Documentación para Laboratorios Farmacéuticos. Guatemala. Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. pp.78. (Colección Manuales Vol. No. 1).
22. Recinos, E. 1978. Determinación de Salicilatos en Sangre. 65p. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
23. Repetto M. 1995. Toxicología Avanzada. España. Ediciones Díaz de Santos S.A. pp.44, 61.
24. Reyes Castañeda, P. 1981. Diseños de Experimentos Aplicados. 2ª. ed. México. Editorial Trillas. pp. 82-127.

25. Sunshine, I. 1978. Methodology for Analytical Toxicology. USA. CRC Press Inc. pp. 342,343.
26. The United States Pharmacopeia. The Nacional Formulary. 1,994. XXVIII ed. USA. United States Pharmacopeia Convention. pp. 2149-2152.
27. Trinder, P. 1954. Rapid Determination of Salicylate in Biological Fluids. Biochem J. USA. 57: 301-303.
28. Varley, H. 1961. Métodos de Análisis Clínicos, y su Interpretación Bioquímica. Trad. J. Villar y V. Villar. España. Editorial Tecnos S.A. pp. 670-672.

### 13.ANEXOS

1. Cuadros De Resultados.....	31
2. Gráficas.....	38
3. Información adicional: Salicilatos.....	41
4. Información adicional: Validación.....	43

**Cuadro No. 1**  
**Resultados obtenidos de muestras séricas en el primer ensayo general**  
**(análisis estadísticos)**

Conc. teórica mg%	Muestra No.	Concentración detectada mg%	Datos estadísticos (conc.)	Porcentaje de recuperación	Datos estadísticos (% de recup.)
0.5	1	0.4308		86.16	Media=134.24
	2	0.6026	Media=0.67	120.52	
	3	1.4610	SD=0.46	<b>292.20</b>	
	4	0.2592	<b>CV=69.10</b>	<b>51.84</b>	
	5	0.6026		120.52	
1.0	1	2.6628		266.28	Media=132.36
	2	0.9459	Media=1.32	94.59	
	3	1.1176	SD=0.76	111.76	
	4	1.1176	CV=57.57	111.76	
	5	0.7743		77.43	
1.5	1	2.4912		166.08	Media=118.00
	2	1.8044	Media=1.77	120.29	
	3	1.6327	SD=0.44	108.85	
	4	1.2893	<b>CV=25.11</b>	85.95	
	5	1.6327		108.85	
2.0	1	1.9761		98.81	Media=103.96
	2	2.4912	Media=2.08	124.56	
	3	1.9761	SD=0.23	98.81	
	4	1.9761	CV=11.08	98.81	
	5	1.9761		98.81	
5.0	1	4.7321		94.46	Media=104.08
	2	5.4099	Media=5.20	108.20	
	3	5.0665	SD=0.31	101.33	
	4	5.4099	CV=5.90	108.20	
	5	5.4099		108.20	
10	1	10.0456		100.46	Media=97.02
	2	9.7022	Media=9.70	97.02	
	3	9.7022	SD=0.21	97.02	
	4	9.5305	CV=2.17	95.31	
	5	9.5305		95.31	
20	1	19.3169		96.58	Media=97.78
	2	19.4886	Media=19.56	97.44	
	3	19.8319	SD=0.26	99.16	
	4	19.8319	CV=1.33	99.16	
	5	19.3169		96.58	
30	1	28.9315		96.44	Media=95.52
	2	28.9315	Media=28.66	96.44	
	3	28.5882	SD=0.26	95.29	
	4	28.4165	CV=0.91	94.72	
	5	28.4165		94.72	



Continuación Cuadro #1.....

Conc. teórica mg%	Muestra No.	Concentración detectada mg%	Datos estadísticos (conc.)	Porcentaje de recuperación	Datos estadísticos (% de recup.)
40	1	37.1727		92.93	Media=93.88
	2	37.6878	Media=37.55	94.22	
	3	37.5161	SD=0.22	93.79	
	4	37.6878	CV=0.59	94.22	
	5	37.6878		94.22	
60	1	57.6039		96.01	Media=96.01
	2	57.7756	Media=57.60	96.29	
	3	57.4322	SD=0.12	95.72	
	4	57.6039	CV=0.21	96.01	
	5	57.6039		96.01	
80	1	76.3182		95.40	Media=95.79
	2	76.6616	Media=76.63	95.83	
	3	77.0050	SD=0.25	96.26	
	4	76.4899	CV=0.33	95.61	
	5	76.6616		95.83	

Precisión : coeficiente de variación (CV)

Exactitud : porcentaje de recuperación

**Cuadro No. 2**  
**Resultados obtenidos de muestras acuosas (estándares) en el segundo ensayo general**

Concentración en mg %	Absorbancia	Absorbancia sin el valor del blanco
0	0.051	0
	0.051	0
	0.051	0
	0.051	0
2	0.063	0.012
	0.063	0.012
	0.063	0.012
5	0.081	0.030
	0.081	0.030
	0.081	0.030
10	0.109	0.058
	0.108	0.057
	0.108	0.057
20	0.168	0.117
	0.162	0.111
	0.164	0.113
30	0.222	0.171
	0.220	0.169
	0.219	0.168
40	0.286	0.235
	0.279	0.228
	0.278	0.227
60	0.388	0.337
	0.382	0.331
	0.379	0.328
80	0.510	0.459
	0.500	0.449
	0.497	0.446

**Cuadro No. 3 : Resultados obtenidos de muestras séricas en el segundo ensayo general**

Concentración mg%	Muestra No.	Absorbancia total	Absorbancia sin blanco	Concentración detectada mg%
0	1	0.055	-0.0004	-0.284190752
	2	0.055	-0.0004	-0.284190752
	3	0.057	0.0016	0.072608686
	4	0.055	-0.0004	-0.284190752
	5	0.055	-0.0004	-0.284190752
2	1	0.068	0.0126	2.035005593
	2	0.068	0.0126	2.035005593
	3	0.068	0.0126	2.035005593
	4	0.068	0.0126	2.035005593
	5	0.067	0.0116	1.856605874
5	1	0.086	0.0306	5.246200532
	2	0.085	0.0296	5.067800813
	3	0.083	0.0276	4.711001375
	4	0.085	0.0296	5.067800813
	5	0.083	0.0276	4.711001375
10	1	0.116	0.0606	10.5981921
	2	0.113	0.0576	10.06299294
	3	0.11	0.0546	9.527793784
	4	0.112	0.0566	9.884593222
	5	0.118	0.0626	10.95499153
20	1	0.173	0.1176	20.76697607
	2	0.167	0.1116	19.69657776
	3	0.169	0.1136	20.0533772
	4	0.166	0.1106	19.51817804
	5	0.167	0.1116	19.69657776
30	1	0.227	0.1716	30.40056089
	2	0.223	0.1676	29.68696201
	3	0.221	0.1656	29.33016258
	4	0.23	0.1746	30.93576005
	5	0.221	0.1656	29.33016258
40	1	0.282	0.2266	40.21254543
	2	0.285	0.2296	40.74774458
	3	0.283	0.2276	40.39094514
	4	0.281	0.2256	40.03414571
	5	0.279	0.2236	39.67734627
60	1	0.396	0.3406	60.55011337
	2	0.398	0.3426	60.90691281
	3	0.392	0.3366	59.8365145
	4	0.394	0.3386	60.19331394
	5	0.392	0.3366	59.8365145
80	1	0.502	0.4466	79.46048357
	2	0.495	0.4396	78.21168554
	3	0.497	0.4416	78.56848498
	4	0.495	0.4396	78.21168554
	5	0.498	0.4426	78.74688469

**Cuadro No. 4**  
**Diferencia de la absorbancia entre el blanco de estándares y el blanco de muestras séricas**

Absorbancia de blancos de muestras séricas	Promedio de la absorbancia de blancos de estándares	Diferencia entre blancos	Concentración de analito obtenida de la diferencia entre blancos mg%
0.055	0.051	0.004	0.5
0.055	0.051	0.004	0.5
0.057	0.051	0.006	0.85
0.055	0.051	0.004	0.5
0.055	0.051	0.004	0.5

Ecuación de la curva de calibración de estándares (gráfica No. 2)

$$y = 0.0056x + 0.0012$$

$$x = \frac{y - 0.0012}{0.0056}$$

Por lo tanto:

$$\begin{array}{ll} y = 0.004 & y = 0.006 \\ x = 0.5 \text{ mg\%} & x = 0.857 \text{ mg\%} \end{array}$$

Valor promedio:

$$x = 0.57 \text{ mg\%}$$

**Cuadro No. 5**  
**Resultados obtenidos de muestras séricas en el segundo ensayo general**  
**(análisis estadísticos)**

Concentración teórica mg%	Concentración detectada mg%	Datos estadísticos conc. detectada	Porcentaje de recuperación	Datos estadísticos % de recup.
2	2.035005593		101.75028	Media=99.96
	2.035005593	Media=1.99	101.75028	
	2.035005593	SD=0.08	101.75028	
	2.035005593	CV=3.99	101.75028	
	1.856605874		<b>92.8302937</b>	
5	5.246200532		104.924011	Media=99.21
	5.067800813	Media=4.96	101.356016	
	4.711001375	SD=0.24	94.2200275	
	5.067800813	CV=4.82	101.356016	
	4.711001375		94.2200275	
10	10.5981921		105.981921	Media=102.06
	10.06299294	Media=10.21	100.629929	
	9.527793784	SD=0.56	95.2779378	
	9.884593222	<b>CV=5.58</b>	98.8459322	
	10.95499153		<b>109.549915</b>	
20	20.76697607		103.83488	Media=99.73
	19.69657776	Media=19.94	98.4828888	
	20.0533772	SD=0.49	100.266886	
	19.51817804	CV=2.49	97.5908902	
	19.69657776		98.4828888	
30	30.40056089		101.335203	Media=99.79
	29.68696201	Media=29.93	98.95654	
	29.33016258	SD=0.71	97.7672086	
	30.93576005	CV=2.37	103.1192	
	29.33016258		97.7672086	
40	40.21254543		100.531364	Media=100.53
	40.74774458	Media=40.21	101.869361	
	40.39094514	SD=0.39	100.977363	
	40.03414571	CV=0.99	100.085364	
	39.67734627		99.1933657	
60	60.55011337		100.916856	Media=100.44
	60.90691281	Media=60.26	101.511521	
	59.8365145	SD=0.46	99.7275242	
	60.19331394	CV=0.77	100.32219	
	59.8365145		99.7275242	
80	79.46048357		99.3256045	Media=98.30
	78.21168554	Media=78.64	97.7646069	
	78.56848498	SD=0.51	98.2106062	
	78.21168554	<b>CV=0.65</b>	97.7646069	
	78.74688469		98.4336059	

Precisión : coeficiente de variación (CV)

Exactitud : porcentaje de recuperación

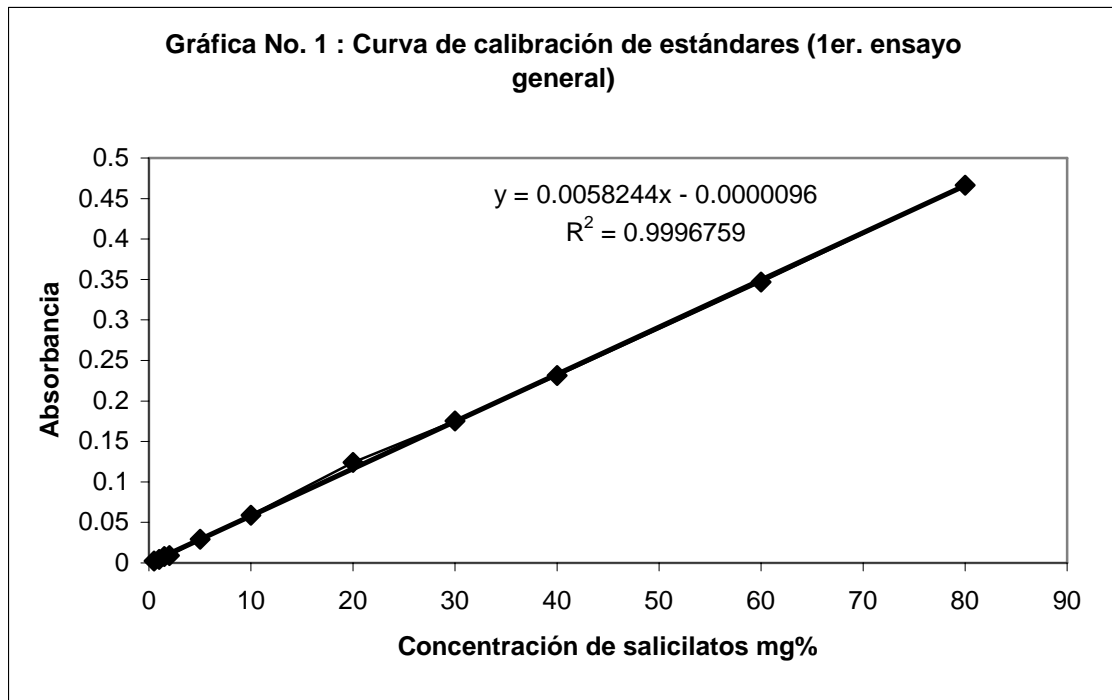
**Cuadro No. 6 :**  
**Resultados obtenidos de blancos de muestras séricas (análisis estadístico), limite de detección y cuantificación**

Concentración teórica mg%	Absorbancia	Concentración detectada
0	-0.0004	-0.284190752
0	-0.0004	-0.284190752
0	0.0016	0.072608686
0	-0.0004	-0.284190752
0	-0.0004	-0.284190752

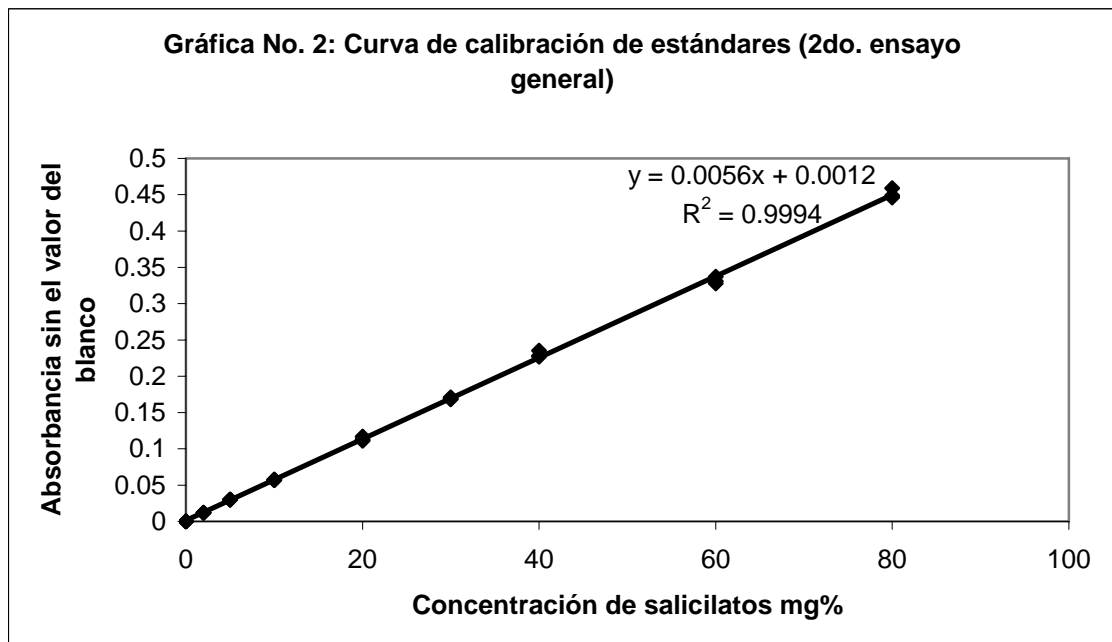
Concentración	
Media	-0.21283086
Desviación estándar	0.15956556
Varianza de la muestra	0.02546117

**LIMITE DE DETECCION:** 0.265865814 mg%

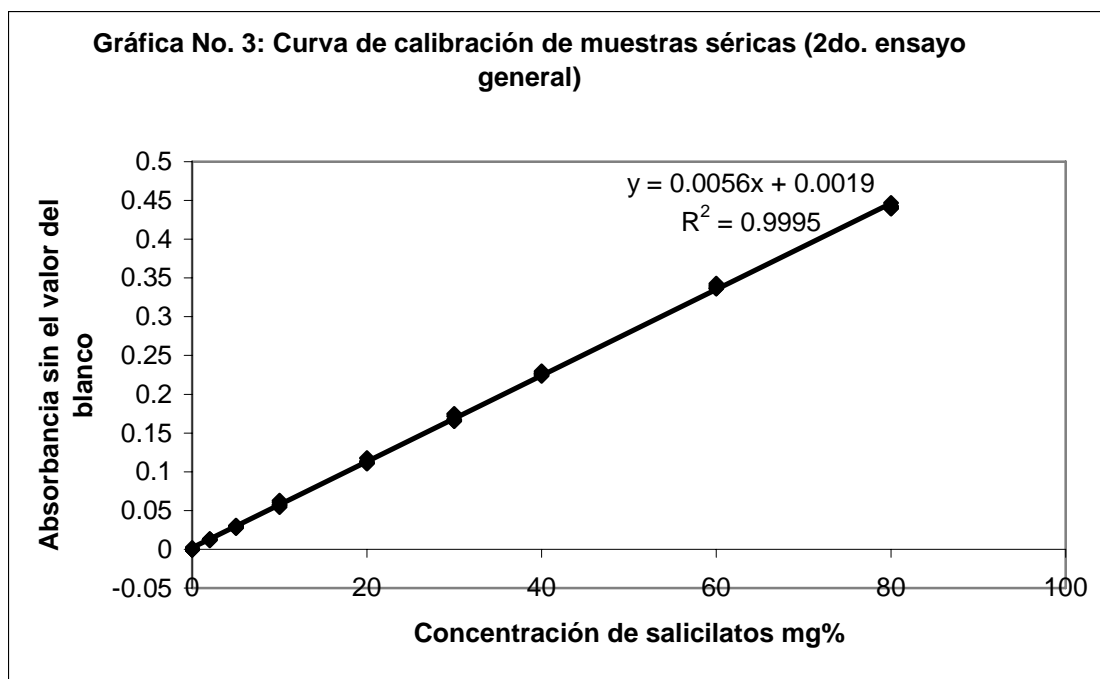
**LIMITE DE CUANTIFICACION:** 1.382824729 mg%



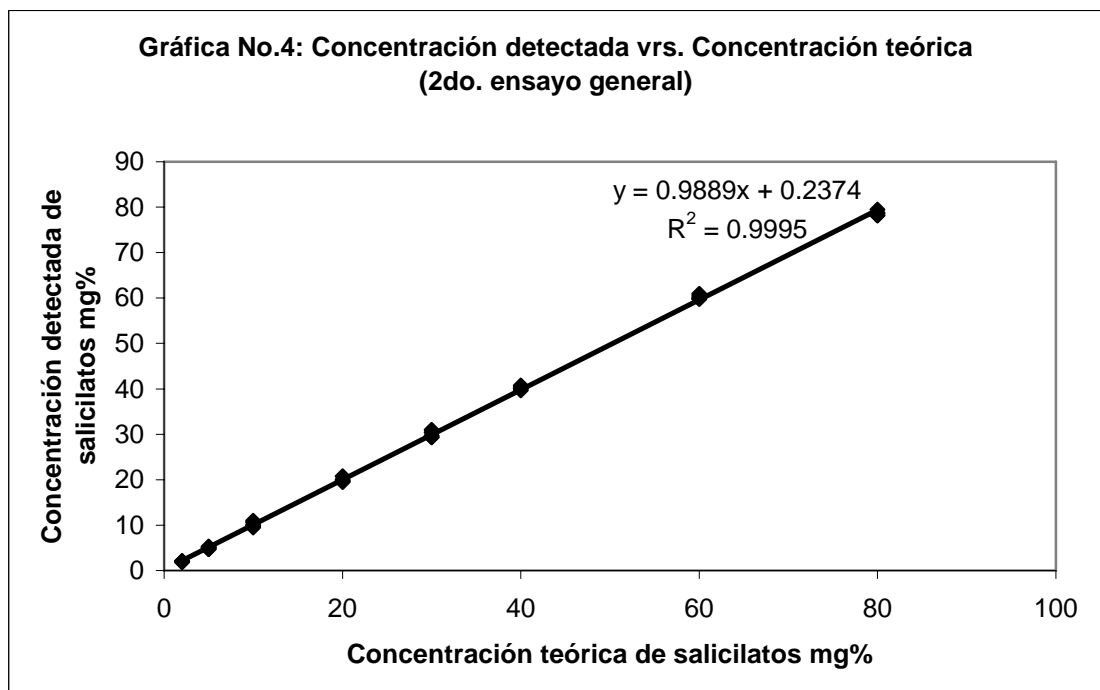
Ecuación $y=0.005824434x-0.0000096466017$ $r = 0.999837942$	$a = -0.000009646601738$ $b = 0.00582442445$ $R^2 = 0.9996759$
---	--



Ecuación $y=0.00560539x+0.001193$ $r = 0.99969914$	$a = 0.001193$ $b = 0.00560539$ $R^2 = 0.99939838$
--	--

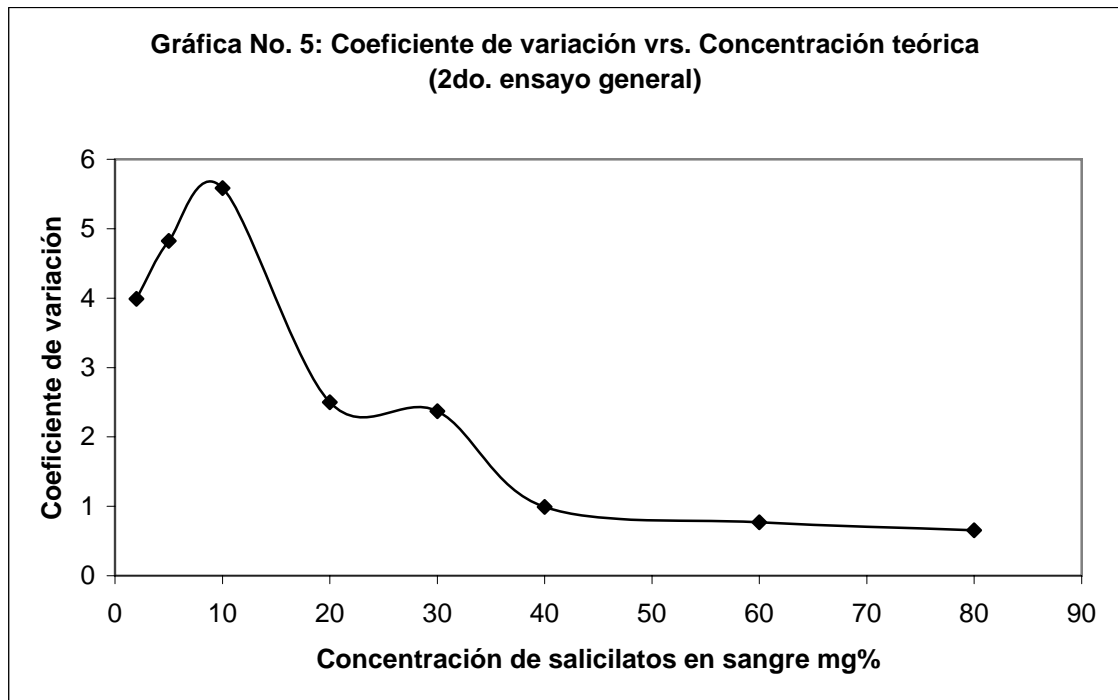


Ecuación $y=0.00555444x+0.00193924$	$a = 0.00193924$ $b = 0.00555444$
$r = 0.99976652$	$R^2 = 0.9995331$



Ecuación $y=0.9889x+0.2374$	$a = 0.2374$ $b = 0.9889$
$R = 0.999745491$	$R^2 = 0.999491047$





## SALICILATOS

A pesar de la introducción de nuevos fármacos, el ácido acetilsalicílico es el antiinflamatorio, analgésico y antipirético más recetado y constituye el compuesto estándar en la comparación y evaluación de otros productos (14).

El tipo de dolor que alivian usualmente los salicilatos es de poca intensidad, nacido de estructuras integumentarias y no de vísceras y, en particular, cefalalgia, mialgia y artralgia (14).

La facilidad con que se adquieren estos medicamentos provoca una alta incidencia de intoxicaciones por consumo excesivo de los mismos. La dosis letal de salicilatos es de 0.4 a 0.5 gramos/Kilo en niños y 20 a 30 g en adultos (8).

Según reporta la literatura, para los salicilatos un nivel sanguíneo de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  corresponde a una concentración terapéutica normal, si se llega a tener más de 300  $\mu\text{g/mL}$  se trata entonces de un nivel tóxico el cual se manifiesta principalmente por hiperventilación. Cuando se evalúa un paciente bajo tratamiento de salicilatos por enfermedades reumáticas, un nivel sanguíneo de 150-300  $\mu\text{g/mL}$  muestra una concentración terapéutica normal (12).

Los salicilatos tienen un efecto directo sobre el sistema nervioso central que da lugar a hiperpnea por estimulación bulbar, vómitos y alteraciones neurosensoriales. Producen además una alteración metabólica fundamental, el desdoblamiento de la fosforilación oxidativa, debido a la cual hay una disminución de la producción de ATP y un aumento del consumo de  $\text{O}_2$  y de la producción de  $\text{CO}_2$  con generación de ácidos orgánicos. La consecuencia más

importante es la aparición de alteraciones respiratorias y del equilibrio ácido-base, perturbaciones iónicas, deshidratación e hipertermia (10,18).

Las medidas generales para tratar un caso de intoxicación causada por salicilatos indican como primer paso la extracción de la sustancia mediante emesis o lavado gástrico y utilizar líquidos alcalinos intravenosos para combatir la acidosis metabólica, alcalinizar la orina y acelerar la eliminación del tóxico. Debe vigilarse la respiración y oxigenación del paciente así como sus signos vitales. Controlar las convulsiones teniendo en cuenta no administrar depresores del sistema nervioso central como barbitúricos de acción prolongada, hidrato de cloral, o morfina. Administrar vitamina K en caso de coagulopatía. Es necesario rehidratar a los pacientes en forma adecuada, es decir vigilando si llega a presentarse edema pulmonar y cerebral. La hemodiálisis es un procedimiento útil pero sofisticado, el cual solo es posible realizar en centros hospitalarios y el volumen requerido hace difícil su aplicación en niños (8, 10, 16).

## VALIDACIÓN

Se hace necesaria la validación de métodos analíticos, para determinar la efectividad y las limitaciones de los mismos. Cualquier proceso de validación es único para cada método analítico, y se diseña específicamente de acuerdo al objetivo de la validación y la aplicabilidad (13, 21).

La validación se define como la obtención de pruebas documentadas que demuestran que un método o proceso es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (13).

Los parámetros evaluados dentro de una validación son: precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango (26).

Exactitud: es la similitud entre los resultados de las pruebas obtenidos por ese método, y los valores verdaderos (11, 26). Se puede decir que es la diferencia entre el valor medio hallado y el valor verdadero (13, 26).

Precisión: es el grado de concordancia entre los resultados individuales de las pruebas cuando el método es aplicado repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea (26). Usualmente es expresada por la desviación estándar (11).

Especificidad: también se conoce como selectividad, es la capacidad de un método para identificar o determinar inequívocamente el analito, sin interferencia de sustancias que se supone estarán presentes dentro de una muestra, tales como impurezas, productos de degradación, excipientes, etc...(13, 26)

Límite de detección: es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones establecidas experimentalmente (26).

Límite de cuantificación: es la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser determinada, con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas experimentalmente (26).

Linealidad: es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado (13, 26).

Rango: es la diferencia entre la mayor y menor concentración de analito que puede determinarse satisfactoriamente con adecuada linealidad, exactitud y precisión (26).

---

Nydia Nefertiti López García  
Estudiante de Química Farmacéutica

---

Licda. Fabiola de Micheo  
Asesora

---

Licda. Irving Antillón  
Directora de la  
Escuela de Química Farmacéutica

---

Lic. Gerardo Arroyo  
Decano de la Facultad de Ciencias  
Químicas y Farmacia