

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

Validación del Método de Determinación de cobre en sangre por  
Espectrofotometría de Absorción Atómica en el Laboratorio del  
Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Informe de Tesis

Presentado por

Ana Karen Gómez Hernández

Química Farmacéutica

Guatemala, Mayo 2013

## ÍNDICE

1. RESUMEN ... ..	..pág 1
2. INTRODUCCIÓN ... ..	.pág 3
3. ANTECEDENTES... ..	.pág 5
4. JUSTIFICACIÓN ... ..	.pág 7
5. OBJETIVOS... ..	pág 8
6. HIPÓTESIS... ..	..pág 9
7. MATERIALES Y MÉTODOS... ..	pág 10
8. RESULTADOS.... ..	.pág 17
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS... ..	pág 35
10. CONCLUSIONES... ..	..pág 42
11. RECOMENDACIONES... ..	..pág 44
12. ANEXOS... ..	pág 45
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS... ..	pág 64

## JUNTA DIRECTIVA

Óscar Cobar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdoba Audon	Vocal V

## DEDICATORIA

A Dios, el motor y la inspiración de mi vida, por haberme permitido llegar hasta aquí y mostrarme su amor en cada paso que doy.

A mi padre por apoyarme y darme ánimos, por enseñarme a luchar, a perseverar y a dar lo mejor de mí en todo momento.

A mi mejor amiga, a mi madre, por sus consejos, por su amor y por ser el mejor regalo que la vida me ha dado.

A mis hermanas, por compartir tantos momentos conmigo, por su apoyo y su ejemplo para llegar ser una gran mujer.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater, la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A mi revisora Julia Amparo García y a mis asesoras Carolina Guzmán y Fabiola Prado de Micheo por darme la oportunidad, facilitarme y apoyarme en la realización de esta tesis, de la cual también nació una amistad que siempre llevaré conmigo.

A mis amigos. Todos los que forman o han formado parte de mi vida en algún momento, por ayudarme a ser mejor y llenar mi vida de alegría. Especialmente a mis amigos Allan Vásquez y Luis Pedro Herrera por estar para mí en los momentos más difíciles y ayudarme grandemente.

Al resto de la familia y a las personas que comparten conmigo este éxito, por sus muestras de cariño y apoyo y a mi fiel compañía Shaki.

A mis amigos QF's Mirna y Christy, Kevin, Fabiola, Andrea, Judith, Carlos, Noemí y Pablo, a Gerber por toda su ayuda y por llenar estos años de experiencias inolvidables, por acompañarme en el arduo camino para llegar hasta aquí, enseñándome diariamente que valía la pena.

## 1. RESUMEN

La determinación de cobre en suero es importante en el diagnóstico de la enfermedad de Wilson y el Síndrome de Menkes, ambos errores innatos del metabolismo del cobre. Concentraciones anormales de cobre en suero se detectan también en pacientes con artritis reumatoide, embarazos anormales y ciertos tipos de cáncer entre otras enfermedades (Lightman, A., Brandes, J.M., Binur, N., 1986). Los métodos espectrofotométricos son los de elección para la determinación de cobre ya que presentan alta sensibilidad, pueden ser aplicados directamente a la muestra sin sufrir interferencias o variaciones de estabilidad, y no se utilizan reactivos difíciles de adquirir (Abe, A., Yamashita, S., Noma, A., 1989).

En Guatemala, el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, realiza dichas determinaciones, colaborando así al diagnóstico diferencial para detectar distintas patologías o exposiciones en donde se presente alteración de los niveles de cobre en la sangre.

Se validó el método de determinación de cobre en suero sanguíneo a través de espectrofotometría de absorción atómica por técnica de llama, con el objetivo de evaluar y verificar los respectivos parámetros con que debe contar toda validación de métodos analíticos. Estos parámetros fueron linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y rango; y así asegurar que los resultados sean válidos y confiables según lo que su aplicación requiera.

Para esta validación se utilizó el equipo, el método y las condiciones propuestas por Perkin Elmer, utilizando estándares de cobre a distintas concentraciones, para luego evaluar muestras séricas contaminadas con cobre en rangos normales y por debajo y encima de estos.

Se encontraron resultados satisfactorios en todos los parámetros evaluados, pues el método expresó una adecuada linealidad en la curva de calibración, así como en la medición de las muestras séricas.

También presentó exactitud en los resultados obteniéndose porcentajes de recuperación de 98.51 a 100.75% para concentraciones a partir de 50 µg/dL.

Los datos se presentaron precisos en concentraciones a partir de 50 µg/dL con coeficientes de variación en un rango 0.4 a 3.0% encontrándose dentro del límite aceptado <5.0% al igual que para la repetibilidad en donde se encontró un coeficiente de variación de 3.64% para la muestra evaluada.

El límite de detección se estableció en 4.03 µg/dL y el límite de cuantificación en 12.22 µg/dL. Para el rango de determinaciones del método, se estableció que este puede realizar lecturas de hasta 600 µg/dL presentando datos exactos con porcentajes de recuperación de hasta 102.76%. Se encontró también precisión y linealidad hasta estas concentraciones con un coeficiente de determinación ideal de 1.

Por lo tanto se considera que este método es adecuado para su aplicación sin realizar ninguna modificación del mismo, en los casos necesarios y detectar así las alteraciones del metabolismo del cobre que pueden presentarse clínicamente.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cobre es un elemento indispensable en la nutrición humana, contribuye a la formación de glóbulos rojos y al mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunitario y huesos. Su deficiencia suele producir anemia, neutropenia y desmineralización ósea; se caracteriza por ser uno de los mejores conductores de electricidad (Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz MJ y Marra CA, 2010).

A la vez, este metal integra el grupo de los metales de interés toxicológico, cuando se encuentra en concentraciones elevadas. La inhalación de niveles altos puede producir irritación de las vías respiratorias; por ingestión puede producir náuseas, vómitos y diarrea. Un exceso de cobre en la sangre puede dañar el hígado y los riñones, e incluso causar la muerte (Bárany E, Bergdahl I, y Oskarsson A, 2010). Existen patologías como la enfermedad de Menkes, la enfermedad de Wilson, la esclerosis múltiple, hipotiroidismo y la insuficiencia suprarrenal, en donde se observan valores anormales de cobre en sangre, orina y en órganos como hígado, cerebro, etc. (Clarke, J. T, 1998).

Por lo anterior y como una prueba para el diagnóstico diferencial en los casos indicados, así como en las intoxicaciones agudas poco frecuentes por este metal, es importante la determinación de cobre en suero y otros fluidos biológicos. Es necesario por tanto, contar con metodologías analíticas estandarizadas que cumplan con parámetros de exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad. El proceso por el cual se evalúan estos atributos se conoce con el nombre de validación y es un aspecto clave en el aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos (Blanes, P. S., Benítez, M. E., Giménez, M. C., 2004)

De las metodologías existentes para la determinación de metales en muestras biológicas, la espectrofotometría de absorción atómica en llama es una técnica de fácil operación, sensible y selectiva, en donde la cantidad de energía absorbida en la llama a



una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración del analito en la muestra (Dawson, J.B., Ellis, D.J., y Newton, H.J, 1968) (Blanes, P. S., Benítez, M. E., Giménez, M.C., 2004).

En el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se ha implementado el método analítico de cobre en muestras de suero por medio de esta técnica ampliamente usada y siendo el cobre un nutriente esencial, su cuantificación se hace indispensable como prueba de diagnóstico diferencial. Por lo tanto, se consideró importante y necesaria la validación del método a fin de obtener resultados confiables y seguros.

Este proyecto se llevó a cabo mediante la determinación de cobre en muestras preparadas a partir de una mezcla de sueros provenientes de diferentes personas, fortificándolas con estándar de cobre a diferentes niveles de acuerdo al plan de trabajo, el suero tal cual se usó como control. Se siguió el método de espectrofotometría de absorción atómica por técnica de llama, con el equipo y el método de Perkin Elmer, de acuerdo al manual: Perkin Elmer 1964-2000 Life and Analytical Sciences; evaluando parámetros que permitieron verificar y validar el uso del método.

### 3. ANTECEDENTES

Se han realizado ya varios estudios, y establecido nuevos métodos o bien modificaciones del método tradicional por espectrofotometría visible para la determinación de cobre. Además del método utilizado en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, extraído del Manual de Perkin Elmer mencionado anteriormente, se encuentran algunos otros métodos con variaciones en cuanto a condiciones del equipo o manejo de las muestras biológicas u otras matrices, para determinar las concentraciones del analito requerido, en este caso el cobre.

Pereira, A.S., en el 2011, utiliza de igual manera el método de espectrometría por absorción atómica con la modificación de la fase sólida y las condiciones de la isoterma en el equipo, además de la pre concentración de la muestra antes de inyectarla en el equipo. (Pereira, A.S. 2011).

Se realizó un estudio en donde se utilizan técnicas de estabilización de la muestra en el año 2010, por Sardans, J., en este se pre concentran los analitos a fin de incrementar la sensibilidad y disminuir interferencias en el equipo de absorción atómica y por lo tanto aumentar la reproducibilidad de los resultados. (Sardans, J. 2010).

Juárez, J.G. realizó en el 2003 la validación de dos métodos espectrofotométricos para cuantificar cobre en suero, el de dietilditiocarbamato de sodio y el de la oxalidihidrazina, en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. (Juarez, J.G. 2003).

En el año 2001, Rahman, M. y Robert, A.K., implementaron el método basado en la extracción de acetato de cobre-pirrolidina y en la pulverización a la llama del extracto orgánico, no utiliza muestras biológicas, pero sí el método de espectrometría de absorción atómica y tratando las muestras de esta manera proporciona un aumento significativo de la sensibilidad del equipo. (Rahman, M., Robert, A.K. 2001).

Dawson, J.B., Ellis, D.J., y Newton, H.J., en 1968 implementaron una variante del método tradicional de determinación de cobre en el que la concentración del metal en la muestra original se determina a partir de una extrapolación de la absorbancia frente al analito añadido; en esta variante, la cantidad de cobre se determina por adiciones estándar de diferentes concentraciones de la muestra en investigación. (Dawson, J.B., Ellis, D.J., y Newton, H.J. 1968).

En 1967 se realizó la determinación de cobre por medio de soluciones estándar y distintas diluciones para luego utilizar el método de espectrometría de absorción atómica. (Parker, M.M., Humoller, F.L. y Mahler, D.J. 1967).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El análisis de laboratorio en los casos de intoxicaciones de origen accidental ambiental, accidental ocupacional o bien enfermedades asociadas a sustancias químicas como el cobre, permite al médico proporcionar el tratamiento adecuado al paciente que llega al servicio hospitalario.

Es fundamental contar con metodologías validadas, ya que es la única manera en que puede confirmarse mediante evidencia objetiva, que el método cumple con los requisitos para su utilización o aplicación específica prevista.

Por lo tanto, la principal finalidad de la validación que se llevó a cabo, fue verificar, confirmar y asegurar que los resultados obtenidos por el método evaluado, en este caso la determinación de cobre por espectrofotometría de absorción atómica, son confiables, exactos y precisos, información indispensable para el médico al emitir un diagnóstico diferencial en los casos en que se encuentren valores anormales de este elemento.

## 5. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL:

Validar el método de determinación de cobre en muestras de suero por medio de espectrofotometría de absorción atómica con técnica de llama.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.2.1 Evaluar las características de desempeño: linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y rango del método para medir cobre en suero por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

4.2.2 Definir las condiciones óptimas del método y del equipo para lograr resultados adecuados que cumplan con los parámetros requeridos.

## 6. HIPÓTESIS

El método para determinar cobre por espectrofotometría de absorción atómica utilizado en el Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad y precisión, para ser considerado como un método de análisis válido y confiable.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

Metodologías para medición de cobre en suero por espectrofotometría de absorción atómica en técnica de llama.

### 6.2 MUESTRA:

Muestras de suero fortificadas con estándar de cobre en los niveles establecidos.

### 6.3 MATERIALES Y EQUIPO

#### 6.3.1 MATERIALES

- Hojas
- Útiles de oficina
- Computadora
- Impresora
- Manual Perkin Elmer 1964-2000 Life and Analytical Sciences.

#### 6.3.2 CRISTALERÍA Y EQUIPO

- Espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer, Modelo Analyst 700 con técnica de llama.
- Balanza Analítica Shimadzu.
- Vasos de precipitar.
- Probetas.
- Balones aforados de 10, 50 y 100 mL.
- Pipetas volumétricas automáticas de 0.1-1 mL y 0.01-0.1 mL
- Puntas para pipetas automáticas.

- Pipetas serológicas.
- Bulbos para pipetas.
- Guantes de látex.
- Gradillas.
- Tubos de vidrio.
- Espátulas.
- Agitador eléctrico.
- Centrífuga.
- Campana de extracción.

### 6.3.3 REACTIVOS

- Agua destilada en vidrio.
- Estándar comercial de cobre: 1000 mg/L
- Solución Glicerol 10% v/v en agua.
- Gases: acetileno y aire comprimido.

## 6.4 MÉTODO

### 6.4.1 Preparación de la muestra:

Diluir la muestra de suero con agua destilada en vidrio 1:1

### 6.4.2 Solución estándar de cobre en glicerol para curva de calibración: 100 mg/L

Transferir 1 mL de la solución estándar (1000 mg/L) a un balón volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con glicerol al 10% v/v.



### 6.4.3 Solución estándar de cobre en agua para fortificar las muestras de suero:

#### 100 mg/L:

Transferir 1 mL de la solución estándar (1000 mg/L) a un balón volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con agua destilada.

### 6.4.4 Blanco:

Utilizar como blanco una solución de glicerol 10% v/v en agua.

### 6.4.5 Preparación de la Curva de Calibración:

Transferir la cantidad en  $\mu\text{L}$  necesaria de la solución de cobre en glicerina 100 mg/L en balones de 10 mL y aforar con glicerol 10% v/v, según la tabla que se presenta a continuación:

Tabla No. 1 Niveles para Curva de Calibración

Nivel	Concentración	Dimensional	$\mu\text{L}$ de sol. de cobre 100 mg/L en glicerol al 10% v/v
1	10	$\mu\text{g/dL}$	10
2	25	$\mu\text{g/dL}$	25
3	50	$\mu\text{g/dL}$	50
4	100	$\mu\text{g/dL}$	100
5	150	$\mu\text{g/dL}$	150
6	200	$\mu\text{g/dL}$	200
7	250	$\mu\text{g/dL}$	250
8	300	$\mu\text{g/dL}$	300
9	400	$\mu\text{g/dL}$	400

Fuente: Datos Experimentales

#### 6.4.6 Preparación de las muestras fortificadas:

Se analizaron muestras séricas con concentraciones de cobre establecidas de los niveles señalados a continuación, a fin de determinar los parámetros necesarios para la validación.

Transferir 1 mL del suero a tubos de vidrio y fortificar con 1 mL de los estándares preparados en agua (solución estándar de cobre en agua 100 mg/L).

Tabla No. 2 Rango de concentraciones de cobre a evaluar.

Nivel Establecido	Concentración de cobre en la Muestra	Dimensional	$\mu$ L de sol. de cobre 100 mg/L en agua
Debajo de lo normal	10	$\mu$ g/dL	10
	25	$\mu$ g/dL	25
	50	$\mu$ g/dL	50
Rango normal	75	$\mu$ g/dL	75
	100	$\mu$ g/dL	100
	125	$\mu$ g/dL	125
	160	$\mu$ g/dL	160
Arriba de lo normal	200	$\mu$ g/dL	200
	250	$\mu$ g/dL	250
	300	$\mu$ g/dL	300

Fuente: Datos Experimentales

### 6.4.7 Condiciones para la Determinación de Cobre.

#### 6.4.7.1 Llama recomendada:

Aire-acetileno, oxidante (magra, azul).

Tabla No. 3 Condiciones para Determinación de cobre

Longitud de onda (nm)	Abertura (nm)	Ruido Relativo	Concentración Característica mg/L	Verificación de concentración característica mg/L	Rango lineal mg/L
324.8	0.7	1.0	0.077	4.0	5.0

Fuente: Manual Perkin Elmer 1964-2000 Life and Analytical Sciences

## 6.5 DISEÑO ESTADÍSTICO

### 6.5.1 Linealidad:

Se determinó a partir de la relación lineal entre la señal del equipo y la concentración de cobre encontrada, mediante la evaluación de 9 estándares (ver Tabla no. 1) realizando tres réplicas por cada uno de ellos. Los datos fueron sometidos a un análisis regresión lineal la cual se evaluó por medio del coeficiente de determinación  $r^2$  y análisis de varianza. (Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine, 2001). Además se graficaron los residuales de la regresión para observar si hubo posibilidad de encontrar sesgo y si los datos poseen una distribución normal.

### 6.5.2 Exactitud:

Se calculó mediante el porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras a 10 concentraciones diferentes, como se observa en la Tabla no.2 y 5 réplicas de cada una, aplicando la siguiente fórmula

$$\text{Cantidad encontrada } (\mu\text{g/dL}) * (100\%) / \text{Cantidad original } (\mu\text{g/dL}) = \% \text{ de recuperación}$$

Se evaluó mediante la prueba de hipótesis de la siguiente forma, aplicando a este análisis la Prueba de T de Student para una muestra, de dos colas con un nivel de confianza del 95%.

$H_0: \mu = 100\%$  (de recuperación)

$H_a: \mu \neq 100\%$  (de recuperación)

También se calcularon los intervalos de confianza del 95% de la media del porcentaje de recuperación.

### 6.5.3 Repetibilidad:

Se evaluó utilizando una sola muestra contaminada, evaluándola mediante 10 réplicas de la misma, bajo las mismas condiciones, sometiendo los resultados al cálculo de media, desviación estándar y coeficiente de variación el cual debió corresponder a un valor  $< 5.0\%$  (American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation, 1998).

### 6.5.4 Perfil de Precisión:

A partir de las muestras contaminadas con cobre señaladas en la Tabla no. 2 con 5 réplicas cada una, se calculó el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones evaluadas.

#### 6.5.5 Límite de Detección:

Se determinó a partir de la menor concentración de cobre que pudo detectarse pero no necesariamente cuantificarse mediante la siguiente fórmula:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Donde.

$\sigma$  = desviación estándar de la respuesta del blanco

S = La pendiente de la curva de calibración (Holcombe, H., Teddington, L.G., 1998.) (Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA, 2008).

#### 6.5.6 Límite de Cuantificación:

Se calculó a partir del valor menor del analito en la muestra, que puede ser determinado con aceptable precisión y exactitud.

$$LOD = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde.

$\sigma$  = desviación estándar de la respuesta del blanco

S = La pendiente de la curva de calibración

Criterio de precisión de un CV=10% en el límite de cuantificación. (Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA., 2008).

#### 6.5.7 Rango

Se determinó a partir de la menor a la concentración de cobre que el equipo pudo detectar (Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA., 2008).

## 8. RESULTADOS

Para la determinación de cobre en suero por espectrofotometría de absorción atómica con técnica de llama se realizó inicialmente una curva de calibración preparando estándares de cobre en solución de glicerol 10% v/v a concentraciones de 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 y 400 µg/dL, trabajando cada uno por triplicado.

Los siguientes datos se sometieron a un análisis de regresión lineal obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9999, un coeficiente de determinación de 0.999917324 y un valor de p correspondiente a 2.65E-51 según el análisis de varianza. También se realizó una gráfica de residuales de la regresión mostrados en la gráfica No. 2 donde se encontró que el error se distribuye simétricamente, la distribución es normal y no hay sesgo para el modelo de regresión.

TABLA No. 1 DATOS OBTENIDOS DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ESTÁNDARES DE COBRE LINEALIDAD

Concentración Teórica (µg/dL)	Absorbancia encontrada	S.D	C.V. %
Std. 10	0.0042	0.0006	14.29
Std. 25	0.0102	0.0002	1.96
Std. 50	0.0209	0.0002	0.95
Std. 100	0.0417	0.0001	0.24
Std. 150	0.0639	0.000252	0.39
Std. 200	0.0839	0.00006	0.07
Std. 250	0.1039	0.0003	0.29
Std. 300	0.1250	0.0006	0.48
Std. 400	0.1670	0.0004	0.24

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

S.D.: Desviación Estándar  
C.V.: Coeficiente de Variación

TABLA No. 2 ECUACIÓN DE LA RECTA

Coeficiente de correlación	$r: 0.999958661$
Coeficiente de determinación	$r^2: 0.999917324$
Modelo de regresión	$Y = 0.0001 + 0.0004X$
Valor p análisis de varianza de la regresión	2.65E-51

Fuente: Base de datos del estudio, análisis en Excel

A continuación se evaluaron muestras, con distintas concentraciones de cobre en suero, tomando en cuenta los valores normales de cobre en suero 70-160  $\mu\text{g/dL}$  (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006), realizando determinaciones de tres niveles por debajo y por arriba de lo normal con 5 réplicas de cada nivel.

En el cuadro siguiente se encuentran los cálculos de regresión lineal para evaluar linealidad de los resultados de las muestras de suero, encontrándose un coeficiente de correlación  $r$  de: 0.999928211 y un coeficiente de determinación de 0.999856428 con un valor de  $p$  de 2.58E-92. También se muestra el análisis de residuos en la gráfica No. 4, observándose una distribución normal y sin sesgo.

TABLA No. 3 DATOS OBTENIDOS DE MUESTRAS SÉRICAS DE COBRE LINEALIDAD

Muestra	Concentración Teórica ( $\mu\text{g/dL}$ )	Concentración Obtenida ( $\mu\text{g/dL}$ )	Absorbancia	S.D	C.V. %
1	10	4.50	0.032	1.36	30.0
2	25	20.15	0.036	1.44	7.0
3	50	49.91	0.043	1.69	3.0
4	75	75.03	0.049	1.58	2.0
5	100	98.51	0.054	2.14	2.0
6	125	123.99	0.060	1.25	1.0
7	160	160.07	0.069	2.40	1.5
8	200	200.23	0.078	1.39	0.7
9	250	251.87	0.091	3.62	1.4
10	300	299.27	0.102	1.12	0.4

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

S.D.: Desviación Estándar  
C.V.: Coeficiente de Variación

TABLA No. 4 ECUACIÓN DE LA RECTA

Coeficiente de correlación	R: 0.999928211
Coeficiente de determinación	R <sup>2</sup> : 0.999856428
Modelo de regresión	y = 0.0002x + 0.0313
Valor p análisis de varianza de la regresión	2.58E-92

Fuente: Fuente: Base de datos del estudio, análisis en Excel

Para evaluar la exactitud del método se calculó el porcentaje de recuperación de cada repetición de las muestras de suero, obteniéndose un rango de 44.96% a 100.75%. Se encontró que concentraciones de 10 y 25 µg/dL presentaron un porcentaje de recuperación de 44.96 y 80.59% respectivamente mientras que para concentraciones a partir de 50µg/dL el rango de porcentaje de recuperación es de 98.51 a 100.75%. También se observan desviaciones estándar de 0.37 a 13.60 o bien de 0.37 a 3.38 sin tomar en cuenta las concentraciones de 10 y 25 µg/dL y coeficientes de variación en un rango de 0.4% a 30% o de 0.4% a 3.0% sin tomar en cuenta las primeras dos concentraciones.



TABLA No.5 DATOS OBTENIDOS DE MUESTRAS SÉRICAS DE COBRE EXACTITUD

Muestra	Concentración Teórica (µg/dL)	Concentración Obtenida (µg/dL)	Absorbancia	% Recuperación
1	10	4.50	0.032	44.96% S.D.:13.60 C.V.:30.0
2	25	20.15	0.036	80.59% S.D.:5.75 C.V.:7.0
3	50	49.91	0.043	99.82% S.D.:3.38 C.V.:3.0
4	75	75.03	0.049	100.04% S.D.:2.11 C.V.:2.0
5	100	98.51	0.054	98.51% S.D.:2.14 C.V.:2.0
6	125	123.99	0.060	99.19% S.D.:1.00 C.V.:1.0
7	160	160.07	0.069	100.05% S.D.:1.50 C.V.:1.5
8	200	200.23	0.078	100.12% S.D.:0.70 C.V.:0.7
9	250	251.87	0.091	100.75% S.D.:1.45 C.V.:1.4
10	300	299.27	0.102	99.76% S.D.:0.37 C.V.:0.4

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

S.D.: Desviación Estándar  
C.V.: Coeficiente de Variación

Se aplicó además un análisis de varianza a fin de contrastar el porcentaje de recuperación a los diferentes niveles de concentración y su variación entre grupos encontrándose un valor de p de 5.8557E-21.

TABLA No. 6 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CONTRASTAR EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN A DIFERENTES NIVELES DE CONCENTRACIÓN, NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%

Análisis de varianza	Valor p
Variación entre grupos	5.8557E-21

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

Se aplicó también la prueba T para evaluar las distintas concentraciones y se obtuvo un valor de p de 0.001 evaluando concentraciones desde 10 a 300  $\mu\text{g/dL}$  y un valor de p de 0.127 evaluándose concentraciones únicamente a partir de 50 hasta 300  $\mu\text{g/dL}$ .

TABLA No. 7 VALORES P DE LAS PRUEBAS DE T DE UNA MUESTRA CONTRA UN VALOR CONOCIDO, PARA CONTRASTAR EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN ( $\mu = 100\%$ ), NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.

Rangos de concentración	Valores p
10 a 300 $\mu\text{g/dL}$ (n=50)	0.001
50 a 300 $\mu\text{g/dL}$ (n=40)	0.127

Fuente: base de datos, análisis en SPSS 19

TABLA No. 8 INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95% DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Rangos de concentración	IC %
10 a 300 $\mu\text{g/dL}$ (n = 50)	87.386 a 97.370
50 a 300 $\mu\text{g/dL}$ (n = 40)	99.214 a 100.344

Fuente: base de datos, análisis en EPIDAT 3.1

En cuanto al perfil de precisión de los datos se observa que los valores respectivos a todas las concentraciones evaluadas presentan resultados en un rango para el coeficiente de variación de 0.4% a 30% y de 0.4% a 3.0% sin tomar en cuenta las concentraciones de 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Estos datos presentan una desviación estándar de 1.12 a 3.62 tomando en cuenta todas las concentraciones evaluadas ya que no se presentó mayor diferencia en los valores de las concentraciones de 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{dL}$ .

TABLA No. 9 DATOS OBTENIDOS DE MUESTRAS SÉRICAS DE COBRE PRECISIÓN

Muestra	Concentración Teórica ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )	Concentración Obtenida ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )	Absorbancia	S.D	C.V. %
1	10	4.50	0.032	1.36	30.0
2	25	20.15	0.036	1.44	7.0
3	50	49.91	0.043	1.69	3.0
4	75	75.03	0.049	1.58	2.0
5	100	98.51	0.054	2.14	2.0
6	125	123.99	0.060	1.25	1.0
7	160	160.07	0.069	2.40	1.5
8	200	200.23	0.078	1.39	0.7
9	250	251.87	0.091	3.62	1.4
10	300	299.27	0.102	1.12	0.4

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

S.D.: Desviación Estándar  
C.V.: Coeficiente de Variación

La precisión también se expresa en términos de repetibilidad para lo cual se realizaron 10 réplicas de una misma muestra, con tres lecturas de cada una a fin de determinar la media y la desviación estándar de éstas, las cuales fueron de 103.14  $\mu\text{g}/\text{dL}$  y 3.76 respectivamente.

TABLA No. 10 DATOS OBTENIDOS DE VARIAS RÉPLICAS DE UNA SOLA MUESTRA PARA EVALUAR REPETIBILIDAD

Repetición	Concentración Evaluada $\mu\text{g/dL}$	Concentración Obtenida $\mu\text{g/dL}$	Absorbancia
1	100	104.1	0.0491
2	100	104.2	0.0491
3	100	99.18	0.0468
4	100	98.82	0.0466
5	100	98.99	0.0467
6	100	99.20	0.0468
7	100	105.6	0.0498
8	100	105.0	0.0495
9	100	108.8	0.0513
10	100	106.8	0.0504
		<b>X: 103.14</b>	<b>X: 0.049</b>
		<b>S.D.: 3.76</b>	
		<b>C.V.: 3.64</b>	

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

S.D.: Desviación Estándar  
C.V.: Coeficiente de Variación

En la tabla que se presenta a continuación, a fin de establecer el límite de detección, se detallan los datos utilizados para realizar los cálculos de este, a partir de las muestras séricas evaluadas, utilizando la desviación estándar residual de la línea de regresión y la pendiente de la curva; obteniéndose así un límite de detección a una concentración de  $4.03426645 \mu\text{g/dL}$ .

TABLA No. 11 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

Desviación Estándar Residual	Desviación estándar *3.3 residuos de la regresión	Pendiente de la curva	Límite de detección
0.00028794	0.000950204	0.000235533	<b>4.03426645 <math>\mu\text{g/dL}</math></b>

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

Utilizando de igual forma la curva de calibración para las muestras séricas, y análisis residual se determinó el límite de cuantificación en una concentración de 12.22  $\mu\text{g/dL}$  que por definición se indica que a partir de esta concentración los datos obtenidos serán precisos y exactos.

TABLA No. 12 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

Desviación Estándar residual	Desviación estándar *10 según fórmula	Pendiente de la curva	Límite de detección
0.00028794	0.000950204	0.000235533	12.22504985 $\mu\text{g/dL}$

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

Además de evaluar tres niveles por encima de los valores normales para cobre en suero se procedió a determinar la precisión y exactitud para valores mayores a 300  $\mu\text{g/dL}$  llegando hasta valores de 600  $\mu\text{g/dL}$  y así determinar el rango de concentraciones de cobre que pueden cuantificarse en el equipo.

Al evaluar concentraciones de hasta 600  $\mu\text{g/dL}$  se encontró exactitud para el método como se observa en la siguiente tabla:

TABLA No.13 CONTRASTE DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE MUESTRAS CON CONCENTRACIÓN DE HASTA 600  $\mu\text{g/dL}$ , POR MEDIO DE UNA PRUEBA DE T DE STUDENT CON NIVEL DE CONFIANZA DE 95%

Exactitud	valor p
Prueba T 2 colas	0.599

Fuente: base de datos, análisis de datos en SPSS 19

Se determinó la precisión para estas concentraciones según lo que se indica en la tabla siguiente.

TABLA No. 14 DATOS OBTENIDOS DE CONCENTRACIONES EVALUADAS POR ENCIMA DE VALORES NORMALES DE COBRE ESTABLECIDOS RANGO

Muestra	Concentración Teórica $\mu\text{g/dL}$	Concentración Obtenida $\mu\text{g/dL}$	Absorbancia	% Recuperación
7	320	299.90	0.0859	93.72% S.D.:1.35 C.V.:1.4%
8	400	466.58	0.1064	X: 99.64% S.D.:8.45 C.V.:8.4%
9	500	513.82	0.1305	X: 102.76% S.D.:1.27 C.V.:1.0%
10	600	608.02	0.1501	X: 101.34% S.D.:0.76 C.V.:0.7%

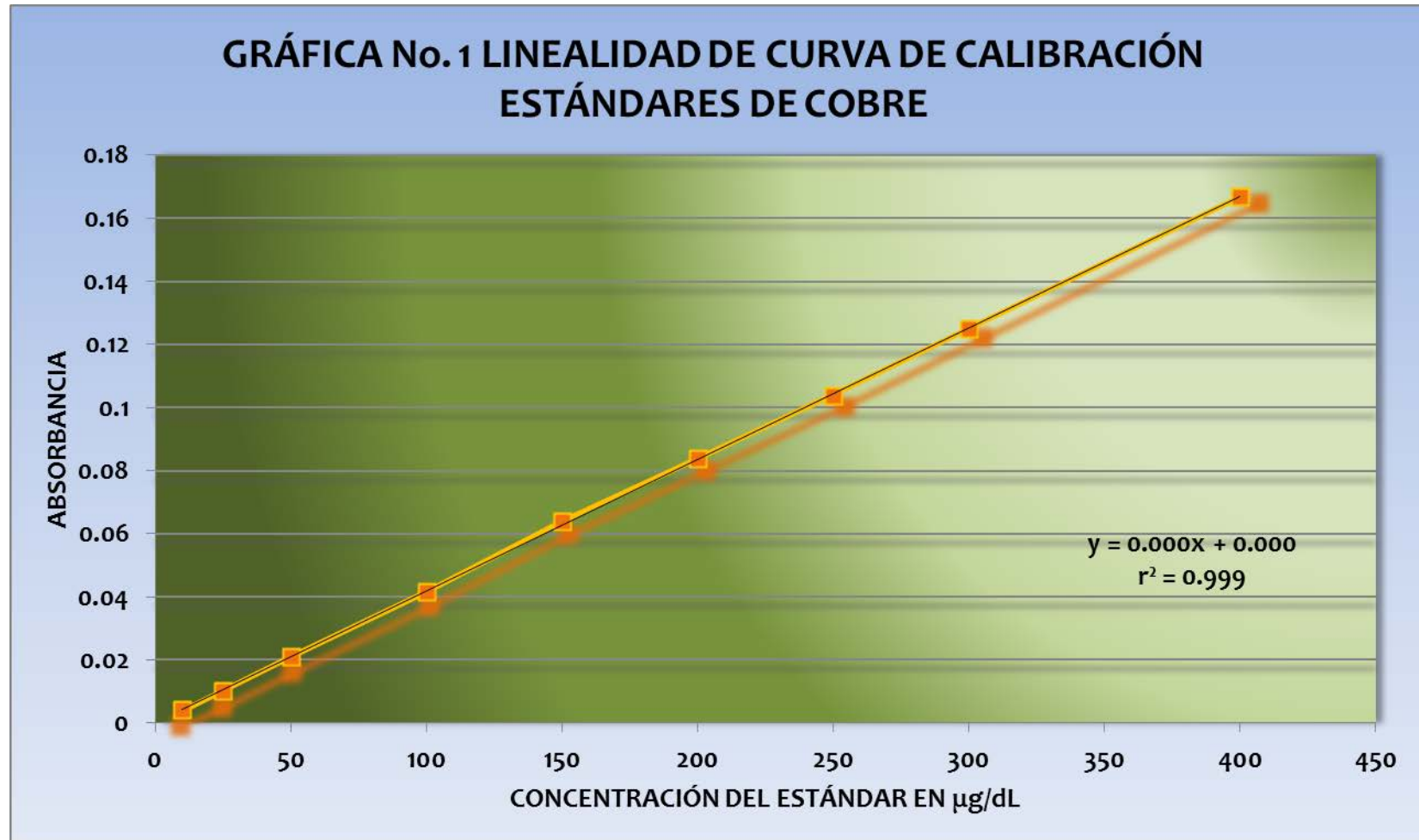
Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel

S.D.: Desviación Estándar  
C.V.: Coeficiente de Variación

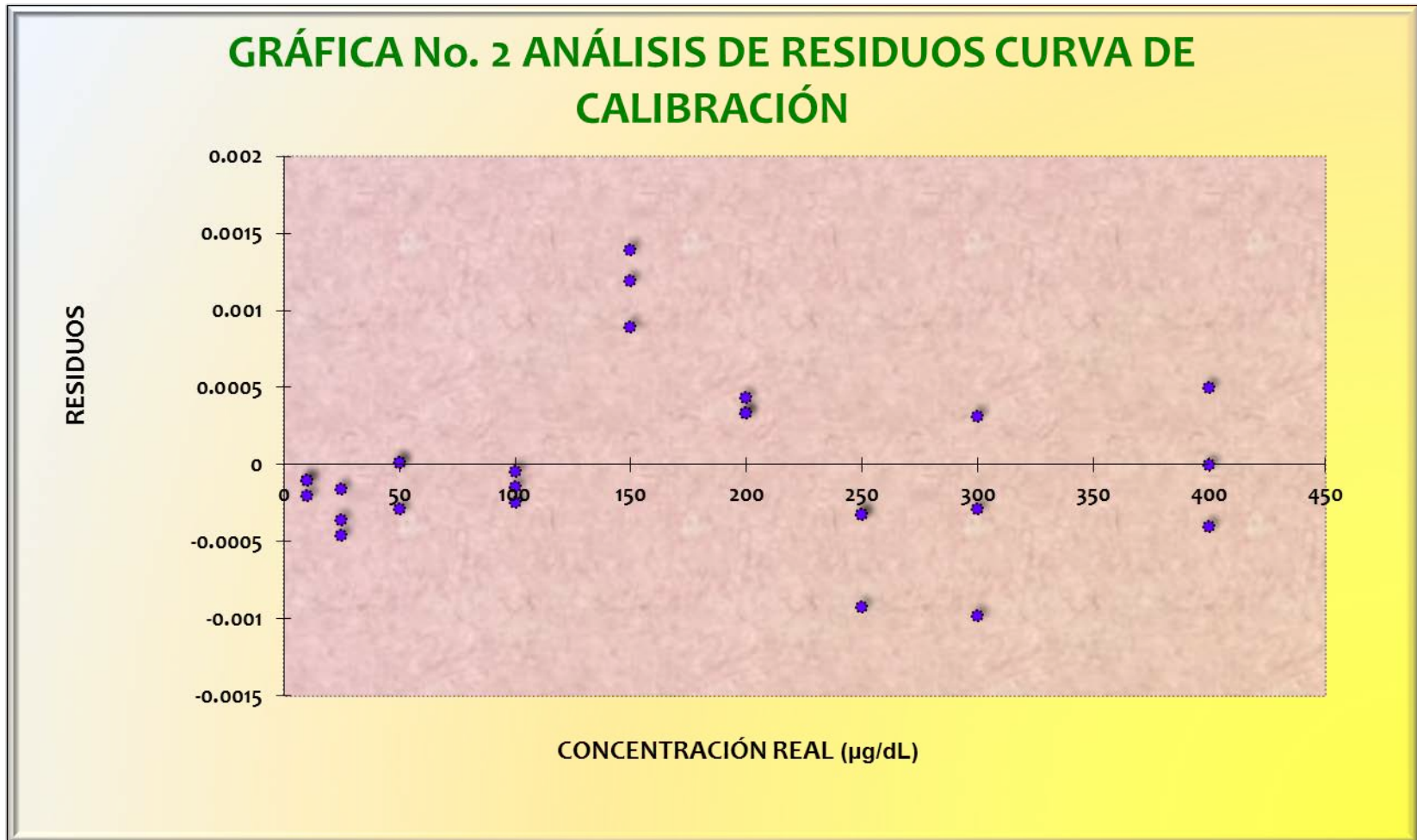
Se presenta a continuación la expresión de la linealidad de los datos mediante el modelo de regresión:

Coeficiente de correlación	$r: 1$
Coeficiente de determinación	$r^2: 1$
Modelo de regresión	$y = 0.0002x + 0.0233$

Fuente: base de datos, manejo de datos en Excel



Fuente Datos Experimentales



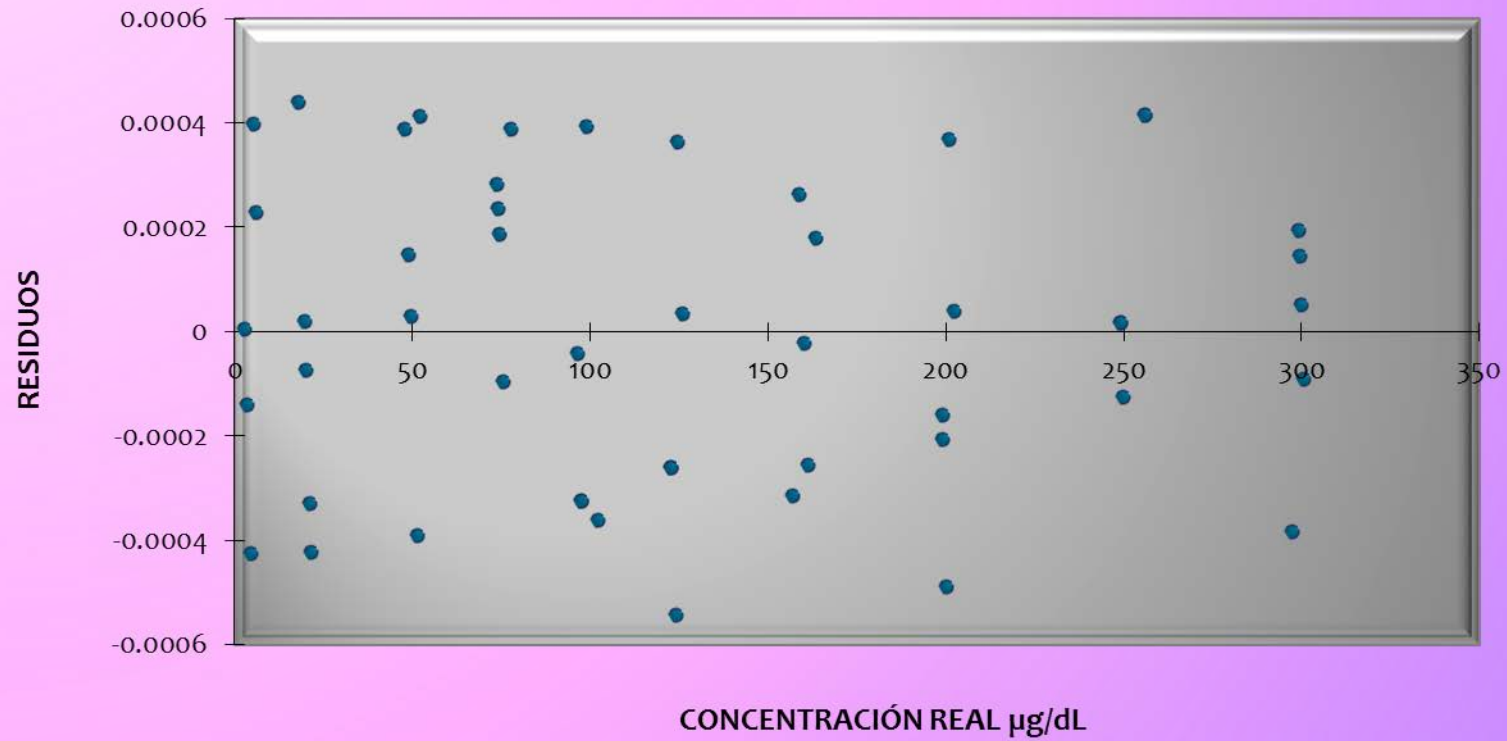
Fuente Datos Experimentales





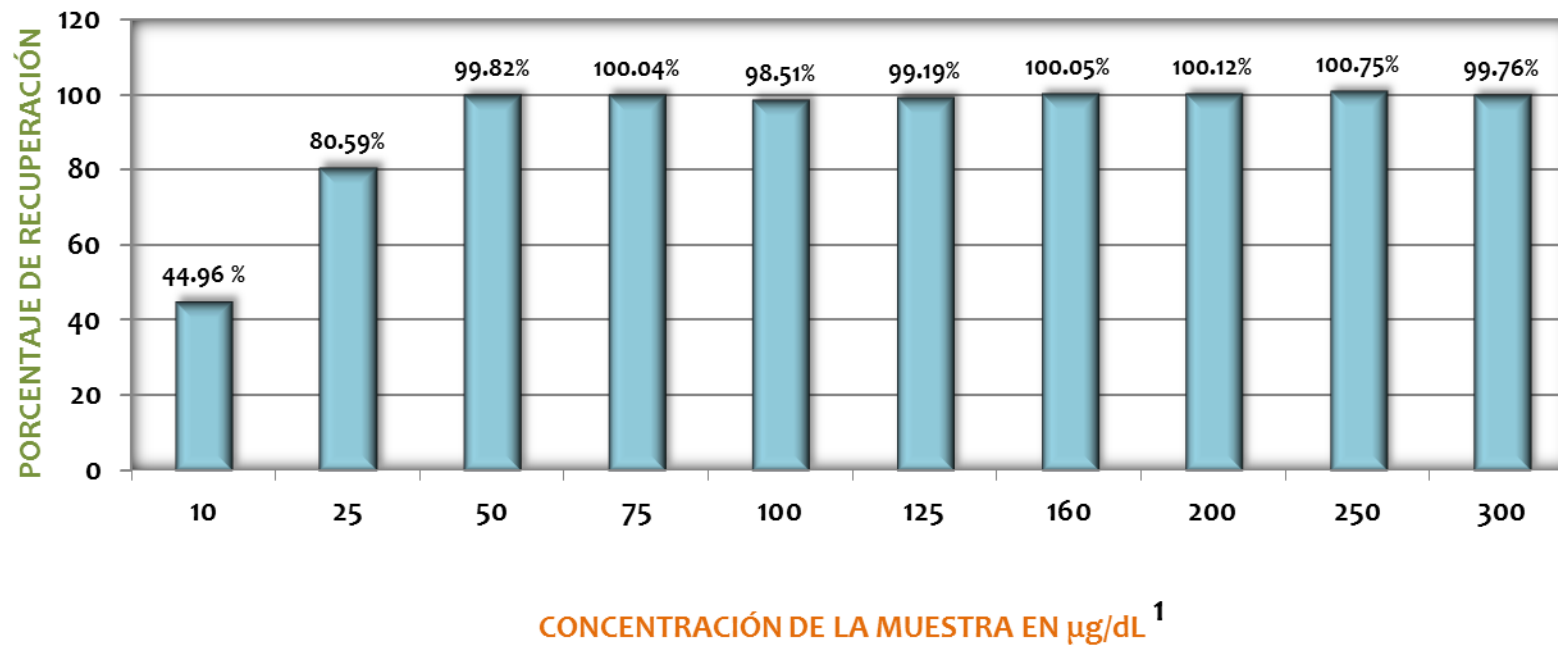
Fuente Datos Experimentales

### GRÁFICA No. 4 ANÁLISIS DE RESIDUOS MUESTRAS SÉRICAS CONTAMINADAS CON COBRE

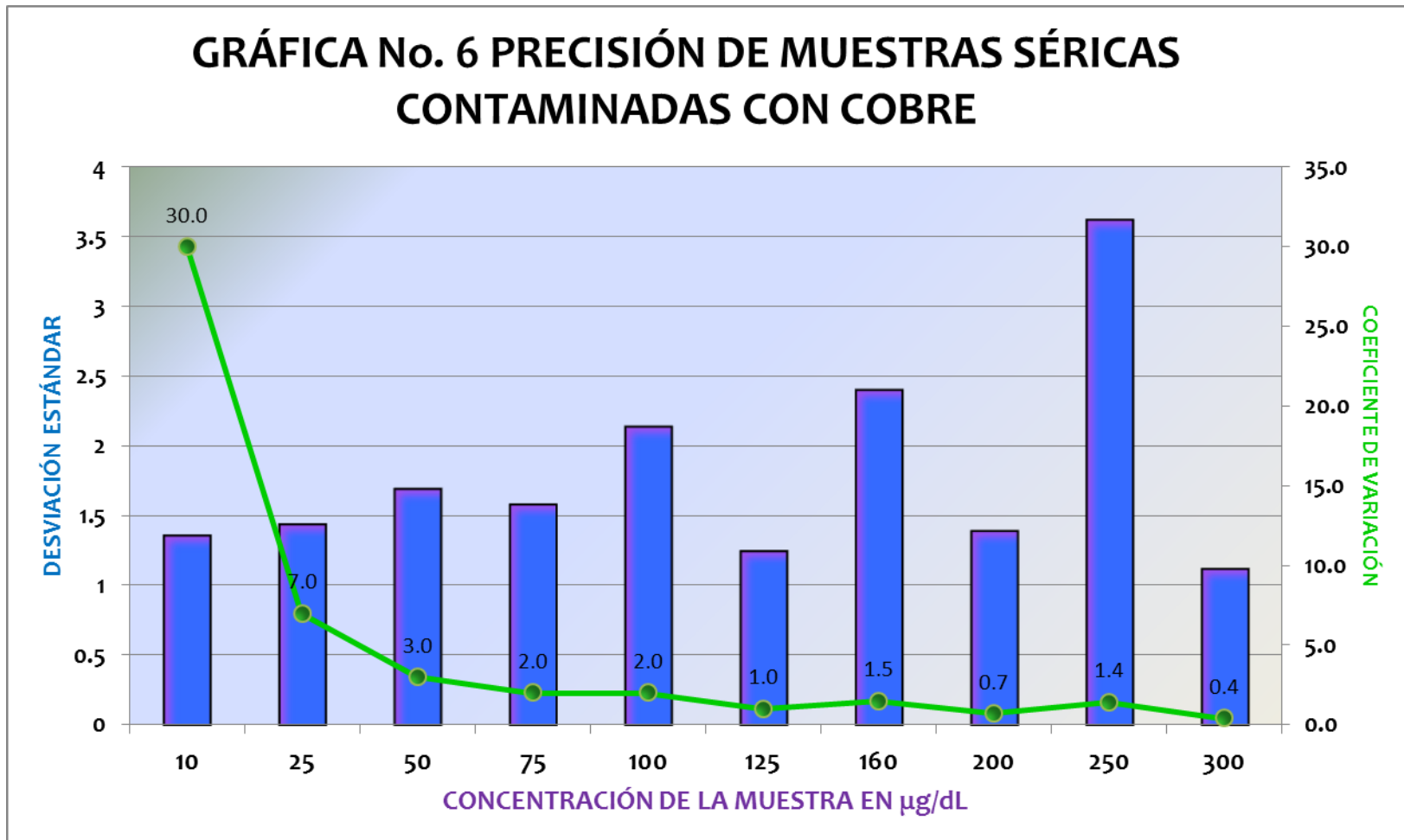


Fuente Datos Experimentales

### GRÁFICA No. 5 PROMEDIO DE PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE MUESTRAS SÉRICAS CONTAMINADAS CON COBRE. EXACTITUD



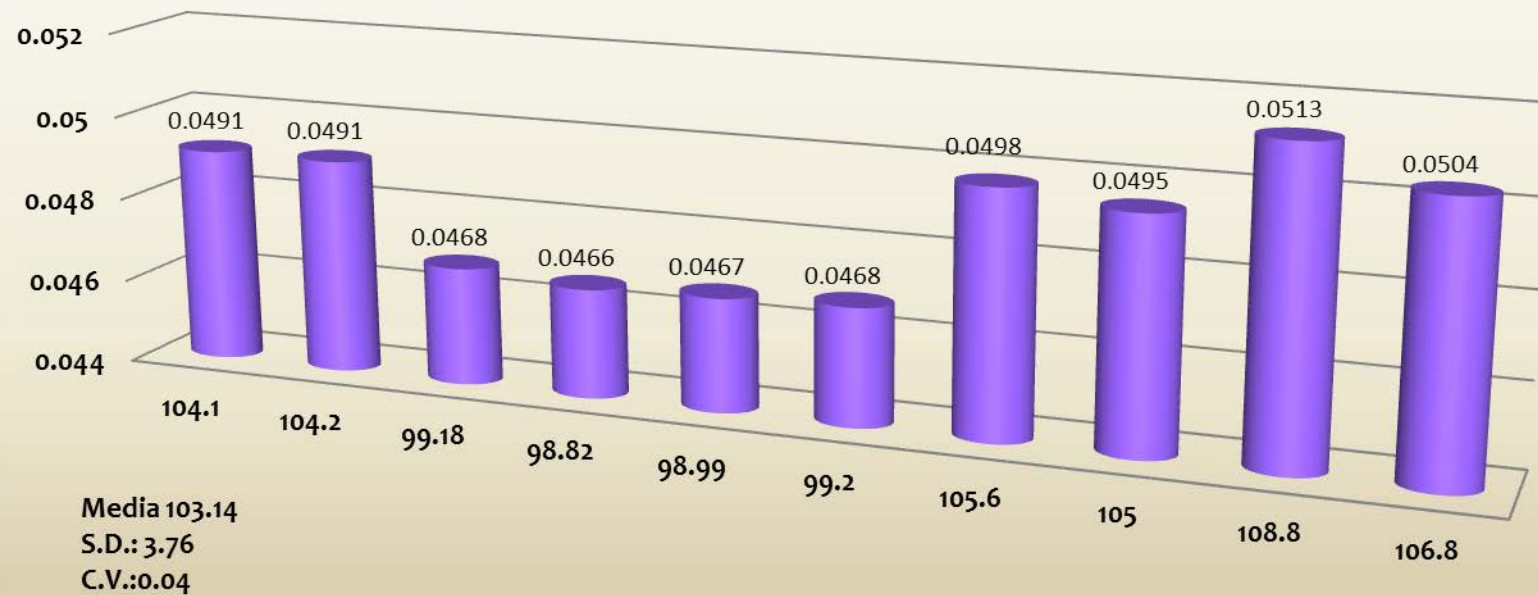
Fuente Datos Experimentales



Fuente Datos Experimentales

1: Se evaluaron muestras a 3 concentraciones por debajo de 4 dentro del rango y 3 por encima de los valores normales de cobre en suero sanguíneo

### GRÁFICA No. 7 REPETIBILIDAD DE UNA SOLA MUESTRA CONTAMINADA CON COBRE

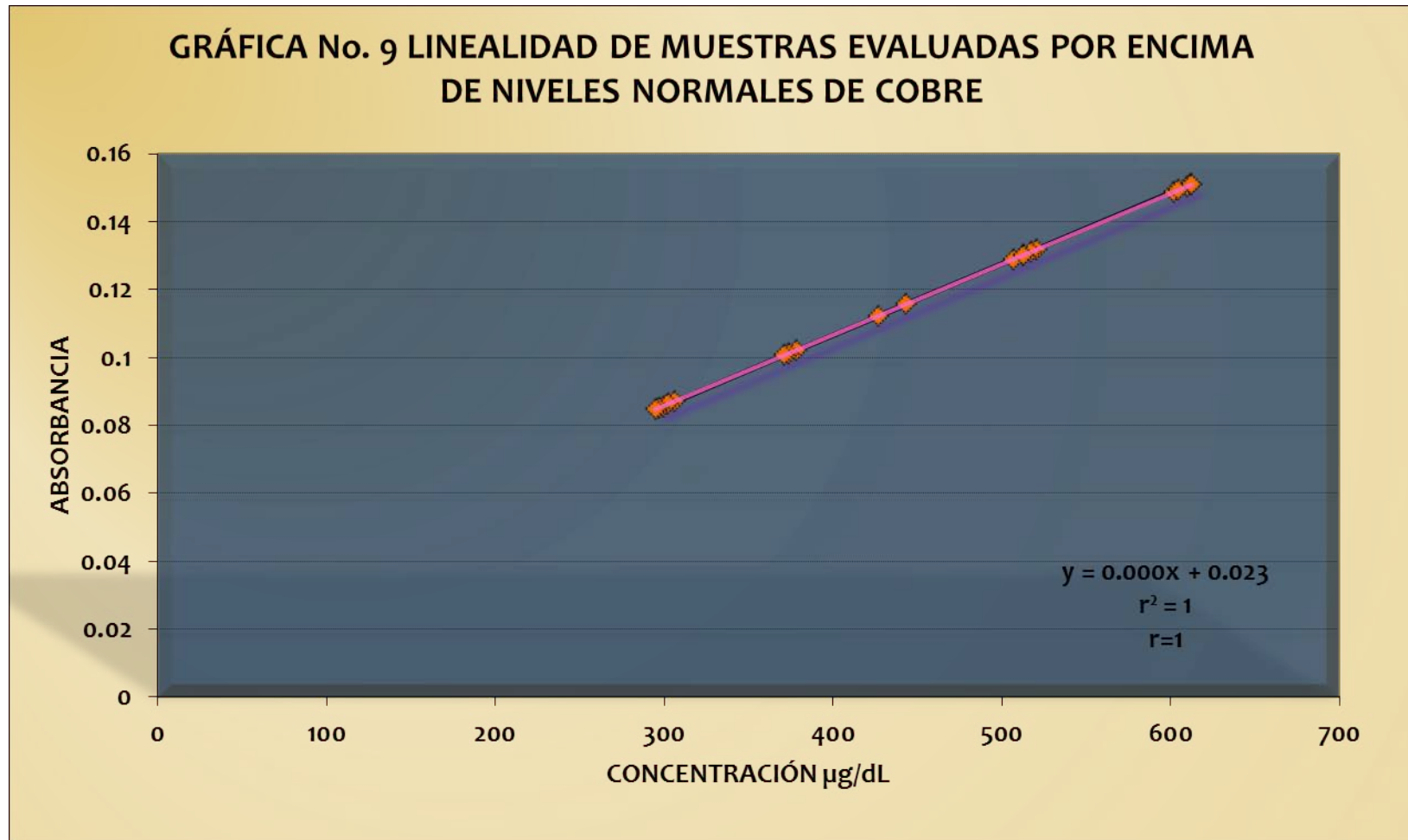


Fuente Datos Experimentales

**GRÁFICA No. 8 PROMEDIO DE PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE CONCENTRACIONES EVALUADAS POR ENCIMA DE VALORES NORMALES DE COBRE EN SUERO**



Fuente Datos Experimentales



Fuente Datos Experimentales

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para llevar a cabo la validación de este método se evaluaron parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión y se establecieron el límite de detección, límite de cuantificación y rango a fin de cumplir con los objetivos y la finalidad de esta investigación.

Para evaluar la **linealidad**, se preparó una curva de calibración con estándares de cobre a distintas concentraciones en un rango de 10 a 400 µg/dL cubriendo así el intervalo de concentraciones a evaluar posteriormente en muestras de suero sanguíneo.

Se trabajaron estos estándares en soluciones de glicerol 10%v/v a fin de igualar la viscosidad del suero trabajado posteriormente y reducir variaciones en las lecturas del equipo.

Luego del análisis de correlación y de regresión lineales se obtuvo un  $r$  de 0.9999 y un  $r^2$ : 0.9999 como se observa en la gráfica no. 1. La asociación entre la concentración teórica y la respuesta del instrumento (absorbancia), fue muy fuerte en la muestra analizada y aceptable según los parámetros establecidos para la validación de los métodos de análisis (el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.998) (Willard, H. et.al, 1991). En otros estudios se han encontrado coeficientes de correlación de 0.985 (Jiménez M., Schosinsky, K., 2002) y de 0.998 para determinaciones de cobre en agua, por medio de espectrofotometría de absorción atómica como se utiliza en esta investigación. (Blanes, P. S., Benítez, M. E., Giménez, M. C., 2004).

El coeficiente de determinación, por su parte indica que el modelo matemático de regresión lineal, representado por la ecuación  $Y = 0.0001 + 0.0004X$  que se observa en la tabla no. 2, se ajusta muy bien a los datos experimentales pues este modelo explica más del 99.8 del error y también es un valor aceptable para la validación de métodos analíticos (el coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.995) (Willard, H. et.al,



1991). De igual manera se encontró un coeficiente de determinación de 0.997 según un estudio de validación para extracción y determinación de cobre por este mismo método en aguas naturales subterráneas. (Blanes, P. S., Benítez, M. E., Giménez, M. C. 2004).

Finalmente, al realizar un análisis de varianza para la regresión, según el valor  $p$  encontrado, que fue de  $2.65E-51$ , se observa que el modelo de regresión planteado tiene una asociación estadísticamente significativa con los datos experimentales (valor  $p <$  nivel de significancia), es decir, que en la población de la que se extrajo la muestra, la asociación entre la absorbancia y la concentración de la muestra se representan significativamente por medio de la ecuación correspondiente.

En la gráfica no. 2 se observa el análisis residual en donde el error de los datos se distribuye simétricamente, se puede decir que existen variaciones constantes a través de la combinación de todos los factores, la distribución es normal y no hay sesgo para el modelo de regresión. Por ello, para el análisis de estos datos, se justifica la utilización de métodos paramétricos.

Por lo anterior se consideró, que el método presentó condiciones adecuadas a partir de las cuales se realizaron las determinaciones necesarias para las muestras séricas.

Para las determinaciones en suero sanguíneo se realizaron lecturas tomando en cuenta valores normales de cobre en suero, evaluando 4 niveles dentro de este rango además de 3 niveles por debajo y 3 por arriba de estos valores, a fin de obtener un rango amplio de concentraciones y determinar los parámetros necesarios. En la gráfica no. 3 se observa la tendencia lineal que presentan estos resultados en donde se encontró un  $r$  de: 0.9999 y un  $r^2$  de: 0.9998 además de un valor  $p$  de  $2.58E-92$  indicado en la tabla no. 4; por lo que, el método presentó linealidad a la concentración de trabajo, con un coeficiente de correlación y de determinación muy buenos, y una asociación

estadísticamente significativa entre el modelo y la variación de los datos ( $p < 0.05$ ). En cuanto al análisis de residuos realizado se observa en la gráfica no. 4 que el error se distribuye simétricamente, de igual manera que en la curva de calibración realizada anteriormente.

Por lo tanto se considera que la linealidad es adecuada para este conjunto de datos y por lo tanto para el método, ya que tanto la curva de calibración en donde se evaluaron concentraciones de 10 a 400  $\mu\text{g/dL}$ , como las determinaciones en muestras séricas cumplen con los requisitos necesarios para alcanzar una adecuada linealidad. Según indica Jiménez M. y Schosinsky, K., en el 2002, en la validación de la determinación de cobre en suero empleando el ácido bicinónico se comprobó la linealidad del método analizando diluciones de un calibrador de cobre, al igual que en este método y la curva de calibración mostró una respuesta lineal entre 8 y 300  $\mu\text{g/dL}$  (Jiménez M., Schosinsky, K., 2002).

La **exactitud** se determinó a partir del porcentaje de recuperación obtenido en cada muestra sérica contaminada con cobre. Se observa claramente en la gráfica no. 5 como éste, es mucho menor para concentraciones de 10 y 25  $\mu\text{g/dL}$  con 44.96 y 80.59% respectivamente, obteniéndose resultados insatisfactorios para concentraciones bajas ya que se esperan valores cercanos al 100%, según el intervalo de confianza indicado posteriormente. Sin embargo para concentraciones desde 50  $\mu\text{g/dL}$  se observan porcentajes de 98.51 a 100.75%, según los promedios reportados para las distintas concentraciones. Al comparar estos valores con otros estudios se encontró que Weinstock, N. y Uhlemann, M. mediante la determinación de cobre en suero por esta misma técnica obtuvieron porcentajes de recuperación 98.5 a 103.0%. (Weinstock, N. Uhlemann, M., 1981). Según indica Blanes, Benítez y Giménez, en el año 2004 en su investigación de cobre en aguas naturales subterráneas, en todos los casos evaluados los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de 85 a 115 %.

Para otras técnicas se informan porcentajes de recuperación similares. García y Schosinsky informan un 102% de recuperación promedio (García M, Holst I, Schosinsky K, Rodríguez R., 1993), Williams y colaboradores un 95% (Williams, H.L., Johnson D.J., Haut, M.J., 1977) y Makino e Itoh un 101,7% (Makino, T. Itoh, J.I. 1981).

Como se supone que el porcentaje de recuperación no debería variar a los diferentes niveles de concentración, se evaluó si había una diferencia estadísticamente significativa pues en la tabla no. 5 se observaron diferencias en las muestras menos concentradas.

Se realizó un análisis de varianza para contrastar el porcentaje de recuperación a diferentes niveles de concentración, con un nivel de confianza del 95% encontrándose un valor de p de  $5.8557E^{-21}$  como se observa en la tabla no. 6. Con este análisis se observa que sí hay diferencia significativa entre los porcentajes de rendimiento a diferentes concentraciones, por lo que se presentan las pruebas de T para contrastar la los porcentajes de rendimiento contra el valor fijo de 100% usando dos rangos, uno de los cuales incluía las dos concentraciones más bajas.

Como se observa en la tabla no. 7, a un nivel de significancia del 5% se rechaza la hipótesis nula en donde el porcentaje de rendimiento poblacional es igual al 100% para el rango de concentración de 10 a 300  $\mu\text{g/dL}$ , mientras que para el rango de 50 a 300  $\mu\text{g/dL}$ , no puede rechazarse la hipótesis nula, lo cual indica que en la población, no se puede afirmar que el porcentaje de rendimiento promedio sea diferente de 100%.

Al realizar el análisis de exactitud usando intervalos de confianza (ver tabla no.8) se observa que como el rango de 10 a 300  $\mu\text{g/dL}$ , no incluye al 100%, entonces este método no es exacto en este rango pero sí en el que va de 50 a 300  $\mu\text{g/dL}$  cuyo intervalo estimado sí incluye al 100% de rendimiento.

También se evaluó la **repetibilidad** del método, siendo esta una medida de la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, por lo que se realizaron las mediciones en el mismo día, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo obteniéndose los resultados observados en la gráfica no. 7 con una media de 103.4  $\mu\text{g/dL}$ , una desviación estándar de 3.76 y un coeficiente de variación de 3.64% encontrándose este valor dentro del límite estimado  $< 5.0\%$ . Estos datos pueden observarse en la tabla no. 10. En el estudio de determinación de cobre en aguas naturales subterráneas por espectrometría de absorción atómica, la precisión expresada como repetitividad se fijó a partir de la desviación estándar de seis réplicas de 0,25  $\text{mg.L}^{-1}$  de concentración, arrojando un valor de desviación estándar de de 3,2 % (Blanes, P. S., Benítez, M. E., Giménez, M. C. 2004).

En cuanto a la **precisión**, la cual fue evaluada por medio del coeficiente de variación de cada concentración, se observa que para las concentraciones de 10 y 25  $\mu\text{g/dL}$ , este no cumplió por estar por arriba de los límites permitidos ( $< 5.0\%$ ), siendo este valor de 30.0 y 7.0% respectivamente, a diferencia de las concentraciones a partir de 50  $\mu\text{g/dL}$  que se presentan en un rango de 0.4 a 3.0%; como se observa en la gráfica no. 6, valores que si representan precisión entre sus resultados. De igual manera en otros estudios se han encontrado valores imprecisos a concentraciones bajas según menciona Jiménez M. y Schosinsky, K. en el 2002 en su validación de la determinación de cobre en suero empleando el ácido bicinónico.

Para establecer el **límite de detección**, se realizaron los cálculos utilizando datos de desviación estándar y la pendiente con respecto a la curva de calibración, la cual debe realizarse utilizando muestras que contengan en analito dentro del rango del límite de detección y cuantificación (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH, 1994). Se realizó utilizando el valor de la desviación estándar de los residuales de la regresión:

cabe resaltar que los residuales son la resta de cada valor observado de los valores pronosticados por la recta de regresión. Así se obtuvo el límite de detección a una concentración de  $4.03 \mu\text{g/dL}$ , como se especifica en la tabla no. 11, lo cual indica que en el método utilizado, el equipo detecta hasta esta concentración de cobre en una muestra. Smeyers-Verbeke et al. en 1973, compararon el análisis de activación neutrónica con la espectrometría de absorción atómica en el análisis de las muestras biológicas, indicando este límite en  $5 \mu\text{g/dL}$  (Smeyers, J., Massart, D. L., Versiek, J., Speecke, A. 1973). Este valor es de  $8 \mu\text{g/dL}$  en el estudio reportado por Jiménez para la determinación de cobre en suero utilizando ácido bicinónico. (Jiménez M., Schosinsky, K. 2002).

Para el **límite de cuantificación** se determinó haciendo uso también de la medida promedio de la señal del blanco y la desviación estándar de los residuales de la regresión, obteniéndose una concentración de  $12.22 \mu\text{g/dL}$  como se observa en la tabla no. 12. Se ha establecido este límite en un valor de  $20 \mu\text{g/dL}$  para el estudio realizado por Juárez, J.G. en el 2003 mediante su validación de métodos para cuantificar cobre en suero. Sin embargo, en esta investigación, para concentraciones más altas de este valor ( $12.22 \mu\text{g/dL}$ ), como la de  $25 \mu\text{g/dL}$  evaluada, no se obtuvo el porcentaje de recuperación esperado siendo este de  $80.59\%$  y una desviación estándar de  $5.75$  la cual es relativamente alta comparada con los valores obtenidos a partir de  $50 \mu\text{g/dL}$  en donde se obtienen porcentajes de recuperación de  $99.82\%$  a  $100.04\%$  como se observa en la tabla no. 5, por lo que a concentraciones bajas de  $10$  y  $25 \mu\text{g/dL}$  no se puede dar certeza de resultados precisos y exactos.

Con el objetivo de determinar el alcance del método y por lo tanto el **rango** de concentraciones de cobre que pueden detectarse a través de él, se realizaron determinaciones de muestras contaminadas con cobre a concentraciones mayores a las establecidas dentro de la metodología de trabajo llegando a concentraciones de hasta

600  $\mu\text{g/dL}$  encontrándose porcentajes de recuperación de 93.72 hasta 102.76% como se observa en la gráfica no. 8.

Se evaluó la exactitud por medio del contraste del porcentaje de recuperación de las muestras por una prueba de T de student con un nivel de confianza de 95% encontrándose un valor de p de 0.599 observado en la tabla no. 13 por lo que puede decirse que si se encontró exactitud a estas concentraciones al igual que precisión, la cual fue evaluada mediante el coeficiente de variación de los datos presentados en la tabla no. 14

También se encontró linealidad como se observa en la gráfica no.9, en donde puede observarse claramente un coeficiente de determinación ideal (igual a 1) y donde la pendiente presentada es igual a la pendiente del método.

Por todo lo anterior, dado que el método se demostró adecuado en cuanto al funcionamiento del equipo, siguiendo las condiciones y lineamientos establecidos y sin realizar modificaciones de él, además de que los resultados cumplen satisfactoriamente de acuerdo a los parámetros evaluados desde 50  $\mu\text{g/dL}$  hasta concentraciones de 600  $\mu\text{g/dL}$ , se considera que el método es apto para su aplicación en la determinación de cobre en muestras de suero, presentando datos válidos y confiables.

## 10. CONCLUSIONES

10.1 El método evaluado presentó una adecuada linealidad tanto en la curva de calibración como en las lecturas de las muestras séricas obteniéndose un  $r$  de 0.9999 en ambos casos y un  $r^2$  de 0.9999 y 0.9998 respectivamente, representando una excelente asociación entre la concentración evaluada y la absorbancia proporcionada por el instrumento.

10.2 La exactitud de las muestras determinada mediante el porcentaje de recuperación se estableció a partir de concentraciones de 50  $\mu\text{g/dL}$  en donde se obtienen valores de 98.51% a 100.75% en concentraciones evaluadas hasta 300  $\mu\text{g/dL}$ , además de contrastar estos resultados mediante análisis de varianza y la prueba de T de student en donde se encontró que a un nivel de significancia del 5% se rechaza la hipótesis nula para concentraciones de 10 a 300  $\mu\text{g/dL}$  mientras que se acepta para concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{g/dL}$ , por lo que puede decirse que el método es exacto para estas últimas concentraciones.

10.3 El método evaluado cumple con el parámetro de repetibilidad, ya que se encontraron resultados con una media de 103.4  $\mu\text{g/dL}$ , una desviación estándar de 3.76 y un coeficiente de variación de 3.64% encontrándose este valor dentro del límite estimado  $< 5.0\%$ .

10.4 Se demostró que el método evaluado cumple con el parámetro de precisión a partir de concentraciones de 50  $\mu\text{g/dL}$  en donde se obtuvieron coeficientes de variación en un rango de 0.4 a 3.0%; valores menores al límite establecido de 5.0%.

10.5 El límite de detección encontrado fue de 4.03  $\mu\text{g/dL}$  y el límite de cuantificación de 12.22  $\mu\text{g/dL}$ ; sin embargo, es a partir de concentraciones de 50  $\mu\text{g/dL}$  donde se puede dar certeza de resultados exactos y precisos para la metodología empleada.

10.6 El rango del método se estableció en concentraciones 10 a 600  $\mu\text{g/dL}$ , desde la mínima concentración detectada por el equipo, hasta donde se presenta adecuada linealidad, exactitud y precisión.

10.7 El método cumplió efectivamente con los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad y precisión, para ser considerado como un método de análisis válido y confiable.

10.8 El método evaluado funcionó adecuadamente en las condiciones establecidas, a una longitud de onda de 324.8 nm, con una llama de aire-acetileno, una alineación del equipo en 0.216 y una energía de la lámpara de 67 amperios como se estableció dentro de la metodología de trabajo.

10.9 Ya que el método cumplió satisfactoriamente con todos los parámetros evaluados se considera adecuado para utilizarlo y contribuir al análisis de los niveles de cobre en el suero sanguíneo en las patologías o casos en que se necesite.



## 11. RECOMENDACIONES

11.1 Implementar nuevos métodos para evaluar otros fluidos biológicos como la orina o tejido y establecer clínicamente que metodología es más adecuada para determinar los niveles de cobre en el cuerpo humano en algún caso patológico.

11.2 Realizar una validación completa del método, es decir, a nivel interinstitucional, en los distintos laboratorios, con diferentes equipos y operarios, a fin de comparar los resultados y establecer la robustez del método.

## 12. ANEXOS

### 9.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL COBRE

- Es un metal pesado
- Símbolo: Cu
- Número Atómico: 29
- Densidad de 8.96 g/cm<sup>3</sup> a 20°C
- Punto de fusión : 1083.0 (+/-) 0.1°C (1981.4 +/- 0.2°F).
- Punto de ebullición: 2595°C (4703°F).
- Calor de vaporización: 1160 cal/g.
- Resistividad: 1.673
- Material: no magnético
- Color: Rojizo, brillante
- Solubilidad: soluble en agua
- Consistencia: maleable, se enfrentan a la estructura cúbica centrada, disponible comercialmente en forma de lingotes, láminas, alambres o en polvo
- Conductividad térmica y eléctrica son muy altas.
- Se debilita cuando se expone al aire.

Se encuentra en la naturaleza en su estado natal, también en forma combinada en varios minerales como la calcopirita. Se produce en los complejos biológicos, tales como feofitina, hemocianina, la tirosinasa y ceruloplasmina (Maryadele, J., O'Neil, 2006).

## 9.2 GENERALIDADES COBRE

El cobre es un oligoelemento necesario para el organismo. Se combina con ciertas proteínas que actúan como catalizadores para ayudar a un gran número de funciones. Participa en la transformación de la melanina para la pigmentación de la piel, genera la formación de enlaces cruzados en el colágeno y la elastina para mantener y regenerar los tejidos, sirve para el funcionamiento correcto del corazón y las arterias, y nos llega a través de la alimentación (Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz MJ y Marra CA, 2010). Los alimentos naturales como cereales, carne y pescado contienen el suficiente para proveer los requerimientos con una dieta equilibrada. Hay algunos más ricos en cobre como son: nueces, semillas de girasol, garbanzos, mariscos, yema de huevo, chocolate, pasas. El requisito de cobre diario para adultos es de aproximadamente 1-3 mg (Crubellato, D., DiRuso, C., 2009).

El cobre se transporta en sangre unido a la proteína ceruloplasmina. Las cifras normales en sangre, oscilan entre 70 -140  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (Bárany E, Bergdahl I, y Oskarsson A, 2010). La EPA requiere que el agua potable no contenga más de 1.3 miligramos de cobre por litro de agua (1.3 mg/L). El Ministerio de Agricultura de EE. UU., recomienda una dosis diaria de 900 microgramos de cobre (900  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) para personas mayores de 80 años de edad (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades., 2004).

**Tabla no. 5 Valores normales de cobre en sangre**

Sexo	Valor normal	Dimensional
Hombre	70-140	$\mu\text{g}/100\text{ mL}$
Mujeres	80-155	$\mu\text{g}/100\text{ mL}$
Niños	Niveles superiores	

Fuente : (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006)

### 9.2.1 COBRE METÁLICO

El cobre se utiliza tanto con un gran nivel de pureza, cercano al 100%, como aleado con otros elementos como el estaño para producir bronce, con cinc para producir latón y con cinc, níquel y cobre para producción de Alpacas (William, N., 2007). El cobre puro se emplea principalmente en la fabricación de cables eléctricos, hilos conductores y bobinado de motores (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU, 2004).

### 9.2.2 COBRE NO METÁLICO

El sulfato de cobre (II) también conocido como sulfato cúprico es el compuesto de cobre de mayor importancia industrial y se emplea como abono y plaguicida en agricultura, alguicida en la depuración del agua y como conservante de la madera (Martí, J.A., Mercadal, H.D, 2002).

## 9.3 TOXICOLOGÍA DEL COBRE

El cobre en concentraciones elevadas puede llegar a ser dañino para el ser humano. Un envenenamiento de cobre agudo suele ser una consecuencia de la contaminación de los alimentos en los utensilios de cobre, o de la ingestión accidental o intencional de sales de cobre (Martí, J.A., Mercadal, H.D, 2002).

Las concentraciones del cobre que se encuentran en el aire, son usualmente bastante bajas, así que la exposición al cobre por respiración es descartable. Pero poblaciones que viven cerca de fundiciones que procesan el mineral cobre en metal pueden experimentar esta clase de exposición, así como las que se encuentran cerca de suelos cerca de fundiciones de cobre, cañerías de cobre que transportan agua y de lagos y ríos tratados con compuestos de cobre para controlar algas (Martí, J.A., Mercadal, H.D, 2002).

La mayoría de los compuestos de cobre se depositarán y se enlazarán tanto a los sedimentos de agua como a las partículas del suelo. Compuestos solubles de cobre forman la mayor amenaza para la salud humana. Usualmente compuestos de cobre solubles en agua ocurren en el ambiente después de liberarse a través de aplicaciones en la agricultura (Arnal N, Cristalli DO, de Alaniz M J y Marra CA, 2010).

La exposición profesional a cobre ocurre a menudo. En el ambiente de trabajo el contacto con cobre puede llevar a adquirir gripe conocida como la fiebre del metal. Esta fiebre pasará después de dos días y es causada por una sobre sensibilidad (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU, 2004).

La exposición industrial es generalmente por la inhalación de vapores o polvos de cobre, al cual se han asignado valores umbrales de 0,2 y 1,0 mg / m<sup>3</sup>, respectivamente (Randall, C. Baselt, 2000). Si el Cobre es cancerígeno no ha sido determinado aún (Clarke, J. T, 1998).

### **9.3.1 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA TOXICIDAD DEL COBRE**

Debido a la deficiencia o exceso de cobre en el organismo, existen distintas enfermedades como la enfermedad de Menkes, la cual es una enfermedad genética del metabolismo del cobre de comienzo prenatal (antes del nacimiento). El cobre se acumula en cantidades excesivas en el hígado, pero existe un déficit de cobre en la mayoría de los restantes tejidos del organismo. Los cambios estructurales afectan al pelo, cerebro, huesos, hígado y arterias (Clarke, J. T, 1998) (Aicardi J., 1998).

Cuando el cobre se produce en forma excesiva ocasiona una enfermedad hepática conocida como enfermedad de Wilson. El origen de esta enfermedad es hereditario y aparte del trastorno hepático que ocasiona

también daña al sistema nervioso. Se encuentran niveles elevados de cobre en la orina y bajos en la sangre.

Puede producirse deficiencia de cobre en niños con una dieta pobre en calcio, especialmente si presentan diarreas o desnutrición. También hay enfermedades que disminuyen la absorción de cobre, como la enfermedad celíaca, la fibrosis quística o al llevar dietas restrictivas (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU, 2004).

### **9.3.2 MECANISMO DE ACCIÓN TÓXICA**

El cobre es un cofactor para el ácido ascórbico oxidasa, catalasa, peroxidasa, la lactasa y la tirosinasa, se fija a estas proteínas formando compuestos de capacidad antigénica por enlace con la histamina (Dreisbach, H., Rober, M. 1999). El cobre puede inducir hemólisis a través de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de hemoglobina, lo que aumenta la permeabilidad de los eritrocitos. Actúa como irritante de mucosas. El cobre también inhibe los restos sulfhidrilo de G6PD y el glutatión, lo que reduce sus actividades libres de radicales libres (Jerrold, B.L., Frank, P.P, 2002).

### **9.3.3 TOXICIDAD CRÓNICA:**

Generalmente no se produce en sujetos normales, que son capaces de mantener un equilibrio de cobre neutro en un amplio intervalo de la ingesta dietética y ambientales. En las personas con la enfermedad de Wilson, sin embargo, la toxicidad progresiva de cobre se desarrolla debido a una alteración metabólica hereditaria (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006).

### 9.3.3.1 Signos y Síntomas

- Anorexia
- Náuseas
- Vómitos
- Calcosis
- Manifestaciones nerviosas
- Hepatomegalia
- Fiebre del metal
- Perforación del tabique nasal
- Congestión nasal
- Niveles séricos de ceruloplasmina reducidos.
- Depósitos de exceso de cobre en los tejidos del parénquima
- Enfermedad pulmonar intersticial
- Formación de granulomas y cicatrices en la piel
- Adenocarcinoma pulmonar
- Exceema papulovesicular (sarna del cobre)
- Muerte (Dreisbach, H., Rober, M., 1999) (Millan, A., Ruiz, M., 2008).

### 9.3.3.2 Diagnóstico:

#### 9.3.3.2.1 Exámenes de gabinete:

- Radiografía de tórax: infiltración micronodular y reticulonodular campos pulmonares inferiores (Dreisbach, H., Rober, M., 1999).

### 9.3.3.2 Tratamiento en casos de intoxicación aguda por cobre:

- Lavado gástrico con ferrocianuro de potasio al 1:1000 de la primera dentro de la primera hora de cautelo. No provocar vómito
- Tratamiento sintomático del shock.
- Lavado completo con agua y jabón de las zonas afectadas.
- Sacar de la exposición, dar oxígeno suplementario y tratar sibilancias.
- Irrigación con abundante agua tibia o solución salina.
- D-penicilamina:
  - Adultos 500 mg c/12 hrs x 10 días.
  - Niños: 25 mg/Kg/día
- Hacer controles de función hepática, renal y hematológica.
- Descansar una semana y repetir el tratamiento 10 días más si persisten niveles altos.
- Trientina: 500 mg c/12 horas por 10 días.
- Acetato de zinc: 50 µg/ 8 horas
- Tetratiomolibdato (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006).

### 9.3.3.3 Pronóstico del paciente :

- Variable
- Puede evolucionar a cáncer de hígado o pulmón (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006).



#### 9.3.3.4 Medidas de Seguridad:

- Ropa de protección adecuada para evitar el contacto repetido o prolongado con la piel.
- Instalaciones sanitarias adecuadas.
- Prohibido fumar, comer y beber en el lugar de trabajo.
- Prevención de la fiebre por humos metálicos:
  - Evitar o reducir al mínimo la exposición a vapores de metales.
  - El lugar de trabajo debe ser evaluado con respecto a la ventilación, protección respiratoria y las prácticas de trabajo individuales.
  - Sistemas de extracción de aire local (Robert, R. Lauwerys, S., 1994).

#### 9.3.4 TOXICIDAD AGUDA:

Cuando se ingiere sulfato de cobre, también conocido como piedra azul o azul vitriolo, se observa toxicidad aguda por cobre.

- **Dosis letal en Humanos:** 50-500 mg / kg de peso corporal.
- **Dosis > 5 mg/mL:** Acompañadas de signos de toxicidad (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006).

Tabla No.6 LD50 del Cobre:

Tipo de Toxicidad	Sujeto Expuesto	Valor
Toxicidad Oral Aguda	Oral aguda LD50-rata:	1980 mg/Kg
Toxicidad Dermal Aguda	Dermal aguda LD50-rata :	>2000 mg/Kg
Toxicidad Inhalatoria Aguda	Inhalatoria aguda LC50 rata	>240 mg/L

Fuente: (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006).

Tabla No.7 Concentraciones de cobre en casos fatales (mg/L o mg/Kg)

	Sangre	Cerebro	Hígado	Riñón
Promedio	3.6	6.8	28.5	39
Rango	2.55-66	2-11	8.3-1410	10-61

Fuente: (Randall, C. Baselt., 2000).

#### 9.3.4.1 Signos y Síntomas

Los síntomas potenciales de sobreexposición a los polvos y las nieblas son:

- Irritación de los ojos, nariz, faringe
- Sabor metálico
- Irritación de las mucosas
- Úlceras y quemaduras gastrointestinales
- Pelo verde
- Náuseas
- Vómito azul-verde
- Diarrea

- Decoloración corneal y ulceración
- Decoloración del cabello
- Úlceras nasales
- Dermatitis alérgica de contacto oral
- Urticaria
- Decoloración de las heces
- Necrosis tubular aguda
- Insuficiencia renal
- Hepatomegalia y hepatitis con necrosis centrolobulillar y estasis biliar
- Ictericia
- Edema pulmonar
- Hipotensión
- Fibrosis
- Shock
- Convulsiones
- Colapso cardiovascular (Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D., 2006)
- La metahemoglobinemia es un hallazgo poco frecuente, que ocurre sólo en casos graves. (Jerrold, B.L., Frank, P.P., 2002).

Se produce malestar gastrointestinal moderado por la ingestión de una sal de cobre, y los síntomas agudos de envenenamiento de cobre se han observado en personas que utilizan utensilios oxidados de cobre para la preparación de alimentos. El aumento de 15-100% en la concentración de cobre en el suero de 6 niños fueron medidos después de la administración de 250 mg de sulfato

de cobre, como durante la intoxicación accidental por sulfato de cobre se aplica a la piel quemada, y las concentraciones séricas de 13 y 27 mg / L se observó en 2 pacientes envenenados durante la hemodiálisis con una unidad que contiene una bobina de calentamiento de cobre (Randall, C. Baselt, 2000).

La muerte generalmente ocurre dentro de 1-7 días de la ingesta de 10-20 g de una sal de cobre soluble.

#### **9.3.4.2 Diagnóstico**

En la intoxicación aguda con cobre, el diagnóstico presuntivo se puede realizar con la historia clínica y los hallazgos de necropsia (Dreisbach, H., Rober, M., 1999).

Los estudios complementarios que permiten ratificar el diagnóstico final incluyen:

- La medición de enzimas hepáticas
- Estudio histopatológico del hígado

##### **9.3.4.2.1 Diagnóstico Diferencial**

Debe realizarse el diagnóstico diferencial con todas aquellas afecciones que producen intoxicaciones hepáticas agudas.

#### **9.3.4.3 Tratamiento**

El tratamiento consiste en vigilar los signos vitales del paciente, incluyendo la temperatura, el pulso, la frecuencia respiratoria y la presión arterial. Los síntomas se tratarán en la forma apropiada. El paciente puede recibir:

- Carbón activado
- Una sonda nasogástrica (NG) a través de la nariz hasta el estómago para vaciar este último (lavado gástrico)
- Diálisis

Medicamento (dimercaprol o penicilamina) para neutralizar el efecto del tóxico (Dreisbach, H., Rober, M., 1999).

#### 9.3.4.4 Antídotos para casos de intoxicación aguda

- Dimercaprol
- Dopamina
- Edetato de calcio disódico
- Norepinefrina
- Penicilamina
- Trientina (Jerrold, B.L., Frank, P.P, 2002)

## 9.4 DETERMINACIÓN DE COBRE POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

### 9.4.1 FUNDAMENTO:

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la absorción de radiación electromagnética por las partículas atómicas; ya que parte de la luz que pasa a través de esas partículas atómicas es absorbida por los átomos, y es utilizada para pasar a su nivel excitado, disminuyendo así la intensidad de la misma (Dawson, J.B., Ellis, D.J., y Newton, H.J, 1968)

Cada átomo absorbe a una longitud de onda determinada porque cada uno tiene una diferencia de energía distinta entre sus niveles normal y excitado por ello este método es característico para cada átomo.

Debido a su alta sensibilidad (porque el espectro de absorción de un elemento atomizado está constituido por una cantidad limitada de líneas discretas o longitudes de onda características para cada elemento) y la facilidad con la que se pueden analizar muchas muestras se trata de una de las principales herramientas de la química analítica (Dawson, J.B., Ellis, D.J., y Newton, H.J, 1968).

Los métodos atómicos están entre los procedimientos analíticos más selectivos y presentan también las ventajas de la rapidez y comodidad.

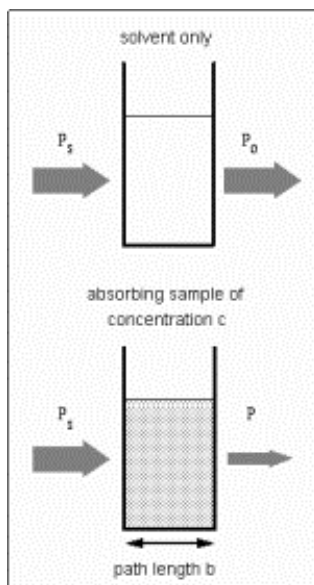
La sensibilidad de método se define como la concentración necesaria de un elemento para producir el 99% de transmitancia, lo que se corresponde con el 0,0044 de absorbancia.

Directamente relacionado con la sensibilidad se encuentra el límite de detección, que corresponde a la concentración necesaria de un elemento para producir una señal con una intensidad triple del ruido de fondo. Por ruido de fondo se entiende toda señal observable cuando el elemento a analizar se encuentra ausente de la llama y es debido a la absorción molecular y a la dispersión de las partículas en llama (Parker, M.M., Humoller, F.L. y Mahler, D.J, 1967).

En cuanto a la exactitud en condiciones normales, el error relativo asociado con el análisis en absorción con llama es del orden de un 1 a un 2%. Tomando precauciones puede reducirse esta cifra mínimamente.

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica puede utilizarse además del análisis cualitativo, para el análisis cuantitativo ya que la

medida de absorción de energía radiante por átomos libres en su estado fundamental de energía y estando en fase gaseosa permite obtener una señal analítica que puede relacionarse, mediante la Ley de Beer, con la concentración del elemento en la muestra analizada (Parker, M.M., Humoller, F.L. y Mahler, D.J,1967).



Fuente: [http://grupos.emagister.com/documento/absorcion\\_atomica/106](http://grupos.emagister.com/documento/absorcion_atomica/106).

#### 9.4.2 DETERMINACIÓN DE COBRE

Para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  en una muestra de concentración desconocida utilizando la espectrofotometría de absorción atómica, técnica de llama, se requiere un calibrado previo del equipo para luego, con una extrapolación poder hallar la concentración que se pide, ya que la Ley de Beer establece un relación lineal entre la absorbancia y la concentración del elemento (Reynolds, R.J., Aldous, K., 1970).

Para llevar a cabo la espectrofotometría de absorción atómica, es necesario atomizar la materia, es decir, convertir las moléculas de la muestra a analizar en partículas gaseosas elementales, para conseguirlo se vaporizan

a temperaturas muy elevadas y la concentración de los átomos del elemento de interés se determina midiendo la absorbancia a sus longitudes de onda características (Rahman, M., Robert, A.K, 2001).

La conversión de la mezcla disuelta en átomos libres se lleva a cabo aspirando la disolución que mediante un nebulizador se transforma en un fino spray (este proceso es el mayor inconveniente que tiene actualmente la absorción atómica, porque a la llama solo llegan un 7 u 8% de los átomos aspirados por el nebulizador. Es decir, se produce una muy importante pérdida de muestra) y se introduce luego en el interior de la llama producida por un mechero que le aporta la energía necesaria para atomizar dicha muestra y una vez atomizada, si se hace pasar un haz de radiación electromagnética sobre ella este haz ve disminuida su energía en una determinada longitud de onda, que será la línea de resonancia del elemento que se quiere analizar (Reynolds, R.J., Aldous, K., 1970).

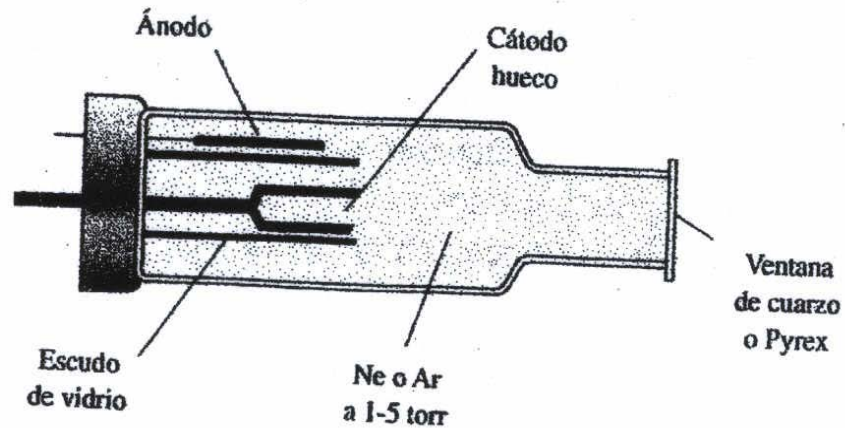
#### 9.4.3 INSTRUMENTACIÓN:

Espectrómetro de absorción atómica: Un espectrómetro de absorción se compone fundamentalmente de cinco partes:

- Fuente de radiación, es por lo general una lámpara de cátodo hueco, que emite las líneas atómicas características del elemento a analizar, este tipo de lámpara consiste en un ánodo de tungsteno y en un cátodo cilíndrico, cerrados herméticamente en un tubo lleno de Neón o Argón a una presión de 1 a 5 Torr. El cátodo está constituido con el metal cuyo espectro se desea obtener. Al aplicar un potencial lo suficientemente grande, los cationes gaseosos adquieren una energía cinética suficiente para arrancar algunos átomos metálicos de la superficie del cátodo y producir una nube atómica, a este fenómeno se le llama chisporroteo. Una parte de los átomos metálicos desprendidos se encuentran excitados, con lo que al volver a su estado



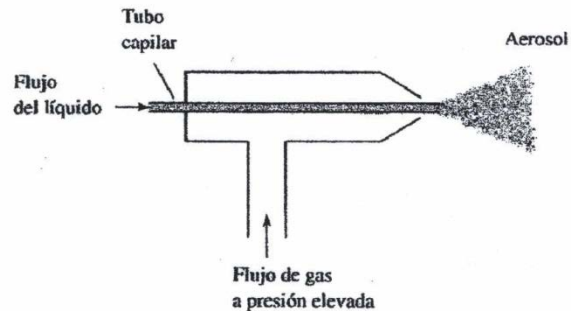
fundamental emiten una radiación característica de diferentes metales, pudiendo emitir así, sus espectros característicos (Reynolds, R.J., Aldous, K., 1970).



Fuente: [http://grupos.emagister.com/documento/absorcion\\_atomica/1067-58425](http://grupos.emagister.com/documento/absorcion_atomica/1067-58425).

- Sistema para vaporizar y atomizar la muestra, se parte de la muestra en disolución y mediante un sistema de nebulización se consigue formar un fino aerosol (de rendimiento 10%). En este caso el sistema de nebulización es un tubo concéntrico que por el efecto Venturi absorbe la disolución transformándola en un fino aerosol dentro de la cámara de mezcla. En la cámara de mezcla se junta con el aire, que es el oxidante, y con el acetileno, que es el gas de combustión, y se conducen al cabezal del mechero donde ocurre la combustión (2400-2700 K) que proporciona la temperatura adecuada para la atomización de la muestra. Para que se produzca correctamente la combustión ha de llegar una relación adecuada de gases al quemador; ya que si la relación no es buena se puede producir el

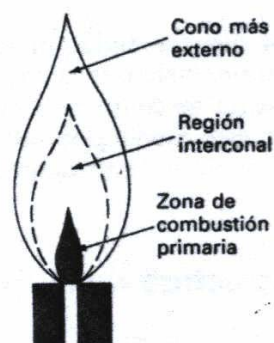
retroceso de la llama y podría llegarse a producir la combustión en la cámara de mezcla (Reynolds, R.J., Aldous, K., 1970).



Fuente: [http://grupos.emagister.com/documento/absorcion\\_atomica/1067-58425](http://grupos.emagister.com/documento/absorcion_atomica/1067-58425).

La llama se divide en tres regiones de tamaño y aspecto variable según la reacción de flujos existente entre los gases combustible y reductor. Estas zonas son:

- Zona de combustión primaria: se reconoce por su luminiscencia azul, aquí no se alcanza el equilibrio térmico, no se produce la espectroscopía de llama.
- Zona interconal: región rica en átomos libres. Es la zona más utilizada en espectroscopía.
- Cono exterior: zona de reacciones secundarias donde los productos formados en la región interior se convierten en óxidos moleculares estables.



Fuente: [http://grupos.emagister.com/documento/absorcion\\_atomica/1067-58425](http://grupos.emagister.com/documento/absorcion_atomica/1067-58425).

- Monocromador que dispersa las distintas longitudes de onda de la radiación emitida por la fuente y separa la línea particular que se desea medir, en el caso de  $\text{Cu} = 324.8 \text{ nm}$ .
- Detector de radiación y amplificador de la señal casi siempre se utiliza un fotomultiplicador que transforma la intensidad de radiación en una corriente eléctrica fácilmente amplificable y medible. Consiste en una célula fotoeléctrica; es decir, la transducción de la intensidad luminosa en intensidad fotoeléctrica se consigue mediante el efecto fotoeléctrico
- Registrador de la señal analítica, es un dispositivo que procesa la corriente resultante proporcionando la señal analítica que se relaciona con la intensidad de la radiación absorbida digitalmente. Como la intensidad absorbida depende linealmente del número de átomos de la especie absorbente presentes en la llama, se puede relacionar con la concentración de la muestra (Sardans. J, 2010).

Según el esquema básico que se presentará más adelante, la radiación que proviene de la lámpara se hace pasar por la llama del mechero y se mide su intensidad. Se vaporiza el elemento en la llama, el vapor atómico del

elemento absorbe gran parte de la radiación con lo que medimos la reducción de la intensidad de la radiación producida por dicho vapor de esta forma se consigue medir la reducción de la intensidad de la radiación producida por la lámpara, al atravesar el vapor atómico del Cu. Esta reducción es la absorbancia del elemento atomizado:

$$A = \text{Log } I_0 / I = -\text{Log } T \quad T = I/I_0$$

Donde A es la absorbancia,  $I_0$  es la intensidad de la radiación cuando sale de la lámpara, I la intensidad de la radiación tras atravesar la muestra y T es la transmitancia que expresa el porcentaje de radiación que atraviesa la muestra.

Esta reducción de la intensidad de la radiación se ve afectada por:

- La temperatura
- Caudal del gas de combustión y del gas oxidante. Para que la llama no sufra un retroceso la velocidad de combustión debe ser inferior al caudal.
- Estructura de la llama.

La absorbancia medida presenta una dependencia lineal con el número de átomos de la especie absorbente que hay en el seno de la llama, así como con la concentración de dicha especie en la disolución aspirada (Reynolds, R.J., Aldous, K., 1970).

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, A., Yamashita, S., Noma, A. (1989). Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum. *Clinical Chemistry*, 35:552-554.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2004). *Reseña Toxicológica del Cobre*: Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.E. U.U., Servicio de Salud Pública.

American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (20va Ed). E.E. U.U.,

Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA. (2008). *Guía para la Validación de Métodos de Ensayo*. Versión 2.

Arnal, N., Cristalli, D.O., De Alaniz, M.J. y Marra CA. (2010). Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res*, 1130: 118-130.

Bárany, E., Bergdahl, I. y Oskarsson, A. (2010). Relationships between trace elements concentrations in human blood and serum: *Toxicol Lett*, 134: 177-184.

- Blanes, P. S., Benítez, M. E., Giménez, M. C. (2004). Validación de una metodología para la extracción y determinación de cobre en aguas naturales subterráneas por espectrometría de absorción atómica. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- Clarke, J.T. (1998). Early treatment of Menkes disease with parental copper (sic)-histidine: longterm follow-up of four treated patients: *Am. J. Med. Genet*, 76:154-164.
- Crubellato, D., Di Ruso, C. (2009). Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas. Argentina: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED.
- Dawson, J.B., Ellis, D.J., y Newton, H.J. (1968). Direct Estimation of Copper in Serum and Urine by Atomic Absorption. *Clinical Chemistry*, 21-33
- De la Vega, A. (2008). Enfermedad de Wilson. Tratamiento de gastroenterología hepatología y nutrición pediátrica (2a Ed.). Madrid. (s.n.)
- Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine. (2001). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S.

García M , Holst I, Schosinsky K, Rodríguez R. (1993). Optimización de un método colorimétrico para la cuantificación de cobre en suero. Revista Costarricense de Ciencias Médicas . 14: 33-42.

Holcombe, H., Teddington, L.G.(1998).The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: EURACHEM .

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH. (1994). Harmonised Tripartite Guideline Q2A Text on Validation of Analytical Procedures.

Jerrold, B.L., Frank, P.P. (2002). Poisoning and Toxicology Handbook. (3a Ed.). Ohio: Lexi.

Jiménez M ., Schosinsky, K. (2002). Validación de la determinación de cobre en suero empleando el ácido bicinónico: relación cobre/ceruloplasmina en pacientes con enfermedad de Wilson y pacientes sin la enfermedad. Revista Costarricense de Ciencias Médicas. Vol. 23 no.1 Costa Rica

Juárez, J.G. (2003). Validación de Métodos para Cuantificar Cobre en Suero. (Tesis de Licenciatura) . Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

Lightman, A., Brandes, J.M., Binur, N. (1986). Use of the serum copper/zinc ratio in the different diagnosis of ovarian malignancy. *Clinical Chemistry*. 32:101-103.

Makino, T. Itoh, J.I. (1981). A highly sensitive colorimetric determination of serum copper using,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -tetrakis (4N-trimethylaminophenyl)-porphine. *Clinical Chemistry Acta* 1981; 111:1-8.

Marti, J.A., Mercadal, H.D. (2002). *Medicina del Trabajo* (2a Ed.): Masson.

Maryadele, J. (2006). *The Merck Index. An encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals* (14va ed.): Merck Research Laboratories.

Mejía, O.R., Ruiz, M., Clavijo, D. (2006). (vol 47). *Bases biológicas y patobiológicas humanas del metabolismo del cobre*. España: Universidad Médica.

Méndez, M. (1987). *Toxicología del cobre*. (s.n.). *Toxicología*, 4: 101-120.

Millan, A., Ruiz, M. (2008). *Enfermedad de Wilson*. Sevilla: Universidad Autónoma de Madrid. Hospital Universitario de Valme. Fundación Jiménez Díaz.



- Parker, M.M., Humoller, F.L. y Mahler, D.J. (1967). Determination of Copper and Zinc in Biological Material. *Clinical Chemistry*, 13-40.
- Pereira, A.S. (2011). (Cap. 31). Preconcentration and determination of Cu in a fresh water sample using modified silica gel as a solid-phase extraction adsorbent: *Tecnología Química*.
- Rahman, M., Robert, A.K. (2001). Determination of Copper in sea Water by Atomic Absorption Spectroscopy. Belfast: The Queen University, 9-13.
- Randall, C. Baselt, (2000). Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man (5a Ed.). California: Chemical Toxicology Institute.
- Reynolds, R.J., Aldous, K. (1970). Atomic Absorption Spectroscopy. New York: Barnes and Noble.
- Robert, R. Lauwerys, S. (1994). Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales (2a Ed.): Masson.
- Sardans, J. (2010). Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in Biological Samples by Modern Electrothermal Atomic Spectroscopy. *Spectrochimica Part B*, 65 :2

Smeyers, J., Massart, D. L., Versiek, J., Speecke, A. (1973). The determination of copper and zinc in biological materials. A comparison of atomic absorption with spectrophotometry and neutron activation. *Clinical Chemistry. Acta* 44, 243.

United States Pharmacopeia 28 and National Formulary 23. (2005). United States Pharmacopeial Convention. USA.

Weinstock, N. Uhlemann, M. (1981). Automated Determination of Copper in Undiluted Serum by Atomic Absorption Spectroscopy. Department of Clinical Chemistry. Medical University Clinic. *Clinical Chemistry*. 27/8, 1438-1440.

Willard, H. et.al. (1991). Métodos Instrumentales de Análisis. (7 a ed.) México. Editorial Iberoamericana. 581-599.

Williams, H.L., Johnson D.J., Haut, M.J. (1977). Simultaneous spectrophotometry of Fe<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup>, in serum denatured with guanidine hydrochloride. *Clinical Chemistry* 23:237-240.

William, N. (2007). Environmental and Occupational Medicine (4a ed.). Lippincott: Williams & Wilkins.