



**UNIVERSIDAD DISTRITAL  
FRANCISCO JOSE DE CALDAS**



**RENAL MEDICAL MARKETING  
LTDA.**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO Y MAGNESIO POR  
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA EN CONCENTRADOS ÁCIDOS  
PARA HEMODIÁLISIS.**

*Informe de pasantía para optar al título de Licenciatura en Química*

**SANDRA MILENA SÁENZ PARRA**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL  
FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS  
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN**

**PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN QUÍMICA**

**BOGOTÁ D.C.  
2018**



**UNIVERSIDAD DISTRITAL  
FRANCISCO JOSE DE CALDAS**



**RENAL MEDICAL MARKETING  
LTDA.**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO Y MAGNESIO POR  
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA EN CONCENTRADOS ÁCIDOS  
PARA HEMODIÁLISIS.**

**SANDRA MILENA SÁENZ PARRA**

*Informe de pasantía para optar al título de Licenciatura en Química*

**DIRECTOR EXTERNO**

**DORIS ANDREA LOZANO**

**Directora de Aseguramiento y Control de Calidad  
Renal Medical Marketing Ltda.**

**DIRECTOR INTERNO**

**JOSUE ANSELMO GARCÍA**

**Profesor Titular Universidad Distrital Francisco José de Caldas  
Grupo de Síntesis Orgánica**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL  
FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS  
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN  
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN QUÍMICA**

**BOGOTÁ D.C.  
2018**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

**Moderador**

---

**Evaluador**  
**Doris Andrea Lozano**

---

**Evaluador**  
**Javier Andrés Matulevich Pelaez**

**2018**

## CONTENIDO

CONTENIDO.....	4
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	7
3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	8
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 General.....	8
4.2 Específicos.....	8
5. MARCO TEÓRICO.....	9
5.1 Insuficiencia renal crónica y terapia renal.....	9
5.2. Espectroscopía de absorción atómica de llama para la determinación de calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis.....	10
5.2.1. Fundamento del método espectroscópico.....	10
5.2.2. Absorción de radiación electromagnética.....	11
5.2.3. Ley de Lambert-Beer.....	13
5.2.4. Instrumentación de la espectrofotometría de absorción atómica.....	15
5.2.5 Interferencias.....	19
5.3 Validación del método analítico para determinar calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis.....	22
5.3.1 Concepto de validación en métodos analíticos.....	22
5.3.2 Características de fiabilidad.....	22
5.3.3 Criterios y características de desempeño analítico.....	22
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1 Validación del método analítico para la determinación de calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis.....	24
6.1.1 Instrumentación.....	25
6.1.2 Características de desempeño del método analítico.....	26
6.1.2.1 Preparación del placebo o matriz.....	26
6.1.2.2 Exactitud.....	27
6.1.2.3 Precisión.....	27
6.1.2.4 Especificidad.....	28
6.1.2.5 Linealidad.....	28
6.1.2.6 Intervalo.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29

7.1. Validación del método para la determinación de calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis .....	29
7.1.1 Calificación el equipo (EQ) .....	29
7.1.2 Características de desempeño del método analítico.....	32
7.1.3 Técnica de Control de Calidad para el Producto Sukes AP35X .....	45
8. CONCLUSIONES.....	46
9. BIBLIOGRAFÍA .....	47

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue validar método para la determinación de calcio y magnesio por espectroscopía de absorción atómica de llama en concentrados ácidos para hemodiálisis (Sukses AP 35X Ref. 205). Este método está basado en el propuesto por la United States Pharmacopeia Convention (USP 39) y se pretende implementar en el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Renal Medical Marketing Ltda., con el fin de incluir esta práctica y sus procedimientos dentro del Sistema de Gestión de Calidad.

El estudio comprendió la evaluación de la linealidad, intervalo, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y especificidad para los iones mencionados anteriormente. La linealidad del ion calcio se comprobó mediante una curva de calibración que comprendió el intervalo de concentraciones del 80%-120% (2,4 mg/L-3,6 mg/L) con un intercepto de 0,01885, una pendiente de 0,06788, un coeficiente de correlación de 0,9997 y un coeficiente de determinación 0,9995 además para verificar el modelo lineal, se realizó la prueba de t-Student, con  $n - 2$  grados de libertad obteniendo un valor de 89,42 y fue comparado con un valor  $t$  tabulado para un nivel de confianza requerido del 95% igual 2,78, comprobando la linealidad del sistema. Se determinó los límites de confianza de la pendiente en  $0,006788 \pm 0,001893$  y del intercepto en  $0,01885 \pm 0,005234$ .

La linealidad del ion magnesio se comprobó mediante una curva de calibración que comprendió el intervalo de concentraciones de 80%-120% (1,2 mg/L-1,8 mg/L) con un intercepto de 0,0003627, una pendiente de 0,3169, un coeficiente de correlación de 0,9999, un coeficiente de determinación 0,9998; además para verificar el modelo lineal, se realizó la prueba de t-Student, con  $n - 2$  grados de libertad obteniendo un valor de 184,6 y fue comparado con un valor  $t$  tabulado para un nivel de confianza requerido del 95% igual 2,78, comprobando la linealidad del sistema. Se determinó los límites de confianza de la pendiente en  $0,3169 \pm 0,004773$  y del intercepto en  $0,0003627 \pm 0,006688$ .

La precisión del método analítico tanto para el ion calcio y el ion magnesio se evaluó mediante estudios de repetibilidad de seis soluciones de muestra preparadas de manera independiente al 100% de la concentración (3,0 mg/L para ion Ca; 1,5 mg/L para ion Mg) donde se obtuvo un %CV= 1,3645 y 1,158 respectivamente. La precisión intermedia del método se determinó mediante el análisis de 6 soluciones al 100% de la concentración teniendo en cuenta algunas variables típicas como la preparación en días diferentes y por un diferente analista, obteniendo un %CV= 1,262 y 1,126 para el ion Ca y Mg respectivamente. La exactitud del método para el ion calcio se determinó para tres concentraciones diferentes del estándar de calcio (95%, 100%, 105%) obteniendo un porcentaje de recuperación de 101,0%, 100% y 98,93% para cada nivel de concentración. Así mismo, la exactitud del método para el ion magnesio se determinó para tres concentraciones diferentes del estándar de magnesio (95%, 100%, 105%) obteniendo un porcentaje de recuperación de 101%, 100,7% y 101,0 para cada nivel de concentración. La especificidad se demostró mediante el cumplimiento del requisito de la exactitud, para el ion calcio y del ion magnesio; lo que permite afirmar que este método es específico para dicho principio activo.

## 1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal crónica es un síndrome con manifestaciones clínicas variadas que afecta a la mayor parte de órganos y sistemas, como reflejo de la complejidad de las funciones fisiológicas que el riñón desempeña (1). Dicha insuficiencia es un proceso que se manifiesta en la pérdida progresiva, permanente e irreversible del número de nefronas y que conlleva a la incapacidad renal para llevar a cabo funciones depurativas, excretoras, reguladoras y endocrino-metabólicas (2). A pesar de que esta es prevenible, ha aumentado su incidencia en todo el mundo, principalmente en épocas de globalización, en la que han introducido factores de riesgo derivados de la producción y consumo; sumándose a los riesgos asociados a la inequidad social y sanitaria. En Colombia ha habido un aumento progresivo en la insuficiencia renal crónica, debido a su asociación con otras enfermedades precursoras como la hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo II y la uremia (3).

Así mismo, los tratamientos de la Insuficiencia renal crónica han evolucionado, optimizando la eficacia, para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Actualmente existen dos tipos de tratamiento: hemodiálisis y diálisis peritoneal. En ambos procedimientos se hace necesario el uso de una solución equilibrada de electrolitos que permite el intercambio de solutos con la sangre (4). Dentro de estas soluciones es preciso encontrar soluciones ácidas, de bicarbonato y bicarbonato-citrato. La empresa Renal Medical Marketing es una de las principales compañías que fabrica y comercializa productos para el sector médico-hospitalario en el área de la terapia renal bajo los más estrictos estándares de calidad; es por esto que implementación del método para la determinación de calcio y magnesio por espectroscopía de absorción atómica en concentrados destinados para hemodiálisis, es necesaria para brindarles a sus clientes las principales garantías de que la elaboración de productos son de alta calidad y cumplen los requisitos estipulados en las principales farmacopeas United States Pharmacopeia Convention (USP) y British Pharmacopoeia (BP).

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El calcio (Ca), el fósforo (P) y el magnesio (Mg) son elementos esenciales en muchos procesos biológicos, por lo que el mantenimiento de su homeostasis es esencial para la supervivencia (5). El riñón también juega un papel importante en los procesos biológicos al tener tres tipos de funciones: depuradora, de regulación hidroelectrolítica y del equilibrio ácido-base, así como también hormonales y metabólicas. Es así como la composición del organismo debe mantenerse dentro de los estrechos márgenes en cuanto a volumen, osmolaridad, concentración iónica y acidez de los espacios extra e intracelular para esto, el riñón ajusta el balance diario entre los aportes y la eliminación por la orina de agua,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , y  $\text{H}^+$  (1). La hemodiálisis tiene como propósito remover los productos de desechos del metabolismo proteicos, eliminar el exceso de agua del organismo, así como mantener el balance electrolítico y el equilibrio ácido-base; en resumen, controlar adecuadamente la composición y el volumen de los líquidos corporales, lo que contribuye a la homeostasis del medio interno (6). Es así como el líquido de diálisis es un líquido fundamental en dicho procedimiento, este líquido entra en contacto con la sangre a través de una membrana semipermeable del dializador durante una sesión de hemodiálisis, permitiendo el intercambio de sustancias con la sangre de forma bidireccional (7).

El tratamiento por hemodiálisis es un tratamiento que mantiene con vida a los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica, ya que la enfermedad no puede ser curada, y a la luz de los conocimientos actuales muy difícilmente prevenida. Tan solo es posible mitigarla mediante la realización del tratamiento de hemodiálisis durante muchos años o, en el mejor de los casos, mediante la realización del trasplante renal para los pacientes que tengan indicación o posibilidades de acceder al mismo, cuando resulta exitoso (6).

### **3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

En los laboratorios de elaboración de medicamentos es de gran importancia la entrega de resultados de excelente calidad, lo cual se logra mediante la estandarización de las técnicas empleadas en el laboratorio, por medio de procedimientos definidos y documentados. En el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Renal Medical Marketing Ltda., se llevan a cabo la determinación de electrolitos mediante el empleo de técnicas volumétricas, pero se ha decidido complementar esta técnica con una que brinde mayor precisión, exactitud y confiabilidad en cuanto a los resultados obtenidos. Para el cliente la calidad y pureza de la solución de hemodiálisis es de gran importancia, pues la presencia de algún contaminante en esta solución expone al paciente a un riesgo de acumular sustancias tóxicas, dando lugar a otras complicaciones; para la empresa Renal Medical Marketing Ltda., es trascendental garantizar que dichos parámetros en los concentrados ácidos destinados para la hemodiálisis se cumplan, con el fin de brindarles a sus clientes mayores confianza y seguridad en el momento de adquirir sus productos.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

- Validar el método para la determinación de calcio y magnesio por espectroscopía de absorción atómica de llama en concentrados ácidos para hemodiálisis.

#### **4.2 Específicos**

- Garantizar que las características de desempeño del método analítico de espectroscopía de absorción atómica para la determinación de calcio y magnesio, cumplan los criterios de aceptación propuestos por la USP 39.
- Realizar un instructivo para la determinación de Ca y Mg en concentrados para hemodiálisis mediante el método de espectroscopía de absorción atómica de llama, que pueda ser usado en el laboratorio de Control de calidad de la empresa Renal Medical Marketing.



## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Insuficiencia renal crónica y terapia renal

Los riñones están constituidos por unidades funcionales que se denominan nefronas, las cuales están formadas por el glomérulo y el túbulo; este primero es un conjunto de vasos sanguíneos a través del cual se filtran más de 150 litros de sangre al día. Este filtrado de plasma que contiene pequeñas moléculas de urea, creatinina, glucosa y iones, pasa al espacio capsular y posteriormente a los túbulos, allí se reabsorbe agua y sustancias químicas útiles como aminoácidos y iones. De esta manera los riñones realizan funciones importantes dentro del organismo, tales como:

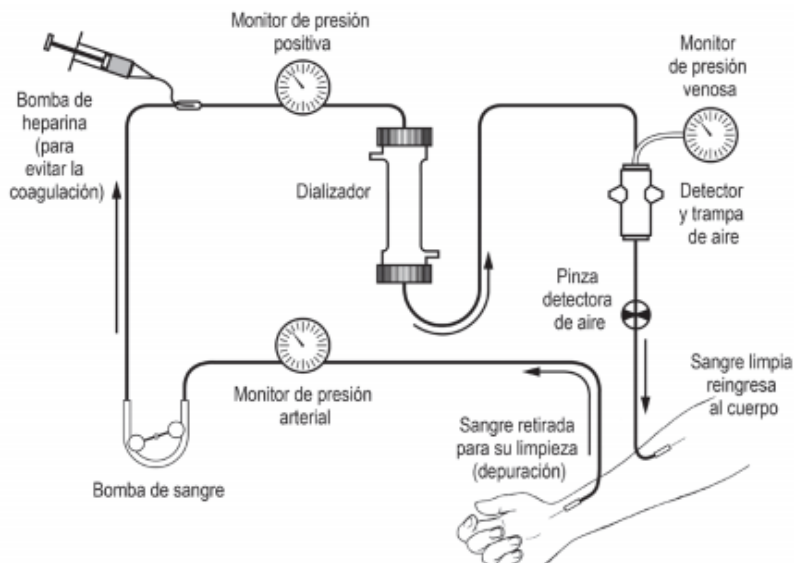
1. Filtran sangre y eliminan productos de desecho del metabolismo así como sustancias endógenas y exógenas.
2. Mantienen el balance electrolítico.
3. Regulan el equilibrio ácido-base.
4. Secretan hormonas como la eritropoyetina y la renina.
5. Modifican sustancias como la vitamina D, para la regulación del fósforo y el calcio.

Debido a la gran variedad de funciones que realiza el riñón, su falla ocasiona graves alteraciones en la función de todos los sistemas del organismo (8).

En el año 2002 la National Kidney Foundation de Estados Unidos en las guías K/DOQI definió la IRC (Insuficiencia renal crónica) como la presencia de daño renal con una duración igual o mayor a tres meses, que se caracteriza por anomalías estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) a menos de 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>. La IRC es clasificada como un proceso fisiopatológico multifactorial de carácter progresivo e irreversible que frecuentemente lleva a un estado en el que el paciente requiere terapia de remplazo renal, es decir diálisis o trasplante para poder vivir (9).

A medida que disminuye la función renal, se presentan alteraciones del balance hidroelectrolítico que se traducen en retención de sal, disminución de la capacidad de concentrar la orina y posteriormente se ve afectada la capacidad de excretar agua en orina, disminuyendo el volumen urinario diario y reteniéndose agua, lo que conlleva a un aumento de peso e incluso insuficiencias cardíacas y pulmonares. En las etapas avanzadas de la enfermedad renal es común la acidosis debido a que disminuye la capacidad de excretar hidrogeniones en forma de amonio, causando un balance positivo de ácido en el organismo. En un inicio los pacientes presentan acidosis de brecha aniónica normal, sin embargo, a medida que progresa la enfermedad renal aumenta la brecha aniónica con una disminución recíproca del bicarbonato en sangre (10).

La diálisis es un tratamiento artificial que permite eliminar sustancias tóxicas y exceso de líquido. El aparato de diálisis tiene como funciones principales, bombear la sangre, filtrar los desechos y controlar la presión arterial y la velocidad de la eliminación de líquido del cuerpo (11). Además se compone de tres elementos principales, los cuales son: el dializador, el sistema de transporte y el líquido de diálisis (Figura 1). El dializador está conformado a su vez, por dos compartimentos, uno de ellos está formado por fibras semipermeables huecas microporosas, por donde se hace circular la sangre; mientras que en el otro compartimento se hace circular el líquido de diálisis. Estas fibras permiten el paso de agua y solutos de bajo peso molecular entre el líquido de diálisis y la sangre.



**Figura 1.**Equipo de Hemodiálisis (11)

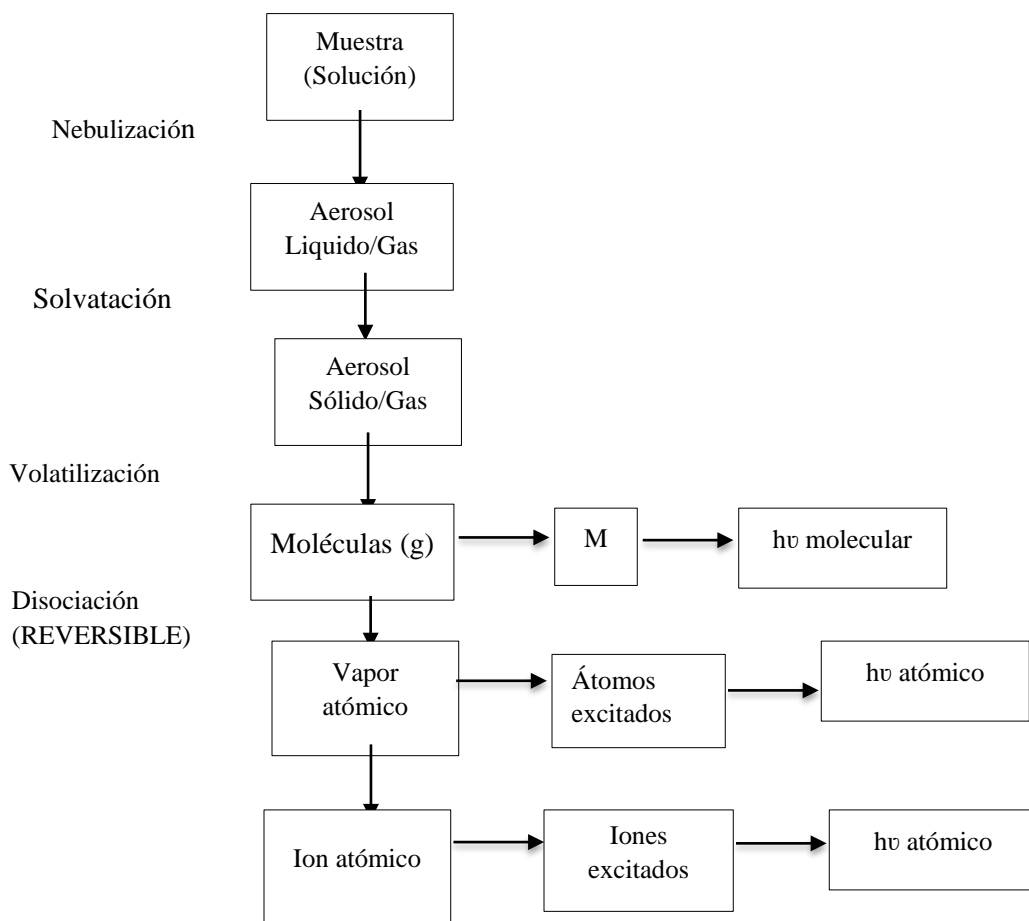
El líquido de diálisis es un medio líquido que se pone en contacto con la sangre a través de la membrana semipermeable del dializador y permite el intercambio de sustancias, fundamentalmente solutos, con la sangre de forma bidireccional. Esta es una solución electrolítica preparada partir de agua purificada y solutos proporcionados en forma de concentrados electrolíticos o sales no disueltas. La composición de este líquido es isotónica y tiene una composición electrolítica parecida al plasma. Las diferencias de sus concentraciones están en función de los gradientes necesarios para lograr los balances adecuados de cada sustancia, en función de las necesidades del paciente (12). La solución de diálisis está constituida en gran parte por agua purificada a la cual se le ha añadido una serie de productos químicos como: sodio, potasio, magnesio, calcio, cloro, dextrosa, acetato o bicarbonato (6).

## **5.2. Espectroscopía de absorción atómica de llama para la determinación de calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis**

### **5.2.1. Fundamento del método espectroscópico**

La espectroscopía de absorción atómica tiene como fundamento la absorción de la radiación a una longitud de onda determinada. Esta longitud se absorbe de una manera selectiva por átomos que tengan una diferencia de energética respecto a los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos está determinado por la ley de Beer (13).

Las etapas que deben seguir los átomos del analito desde la disolución inicial hasta llegar a transformarse en vapor atómico son comunes para todos los métodos que utilizan llama. En el diagrama 1, se muestra una serie compleja de procesos encadenados que tienen lugar en la llama (16).

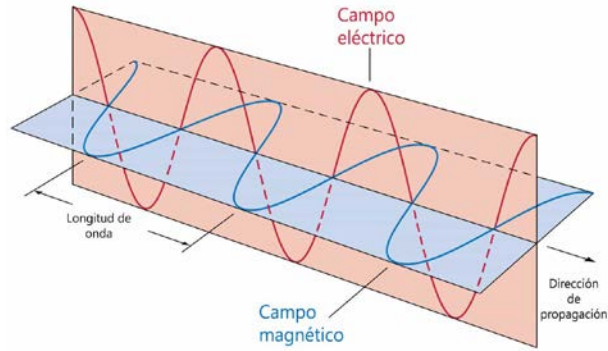


**Diagrama 1.** Etapas proceso de atomización del metal

En un atomizador de llama, la disolución de la muestra es nebulizada mediante un flujo de gas oxidante, mezclado con el gas combustible y se transporta a una llama donde se produce la atomización. El primero es la desolvatación, en el que se evapora el disolvente hasta producir un aerosol molecular sólido finamente dividido. Luego la disociación de la mayoría de estas moléculas produce un gas atómico (16). La mayoría de los átomos así formados se ionizan originando cationes y electrones. Indudablemente se producen también otras moléculas y átomos en la llama como resultado de las interacciones del gas combustible con el gas oxidante y con las distintas especies de la muestra (17).

### 5.2.2. Absorción de radiación electromagnética

La luz se puede explicar como un conjunto de radiaciones que se mueven por todo el espacio. Aquellas detectables por nuestro ojo corresponden a la luz visible, pero la mayoría son invisibles para nosotros. Estas radiaciones se pueden describir como partículas y ondas. Cuando se define como onda se basa en que consta de campos eléctricos y magnéticos que oscilan sinusoidalmente y en forma perpendicular a la dirección de traslación por el espacio (19).



**Figura 2.** Onda electromagnética (20)

En las ondas electromagnéticas, la distancia entre dos crestas (o valles) consecutivas es la longitud de onda, ( $\lambda$ ). El producto de la longitud de onda por frecuencia ( $\nu$ ), que hace referencia al número de ciclos por segundo en unidades Hertz, Hz, da como resultado la velocidad de la luz; relacionadas con la siguiente expresión:

$$c = \lambda \nu \quad (1)$$

La radiación sólo se absorbe o emite en unidades definidas llamadas fotones. La energía ( $E$ ) de los fotones es proporcional a la frecuencia de radiación, relacionadas mediante la constante de Planck ( $h$ ), en la siguiente expresión (21):

$$E = h\nu \quad (2)$$

La cantidad de energía que transporta un fotón determina el efecto que tendrá sobre las moléculas y los átomos. Las microondas excitan a las moléculas y las ponen a girar, la luz infrarroja origina vibraciones de los enlaces dentro de la molécula, la luz visible y la ultravioleta excitan a los electrones de los enlaces (22).

De esta manera, para que la materia pueda absorber radiación electromagnética es necesario que se cumplan dos condiciones: a) tiene que existir una interacción entre el campo eléctrico o magnético de la radiación y alguna carga eléctrica de la materia; b) y la energía del fotón incidente debe satisfacer exactamente los requerimientos de la energía cuantizada de la sustancia, es decir, la energía del fotón absorbido debe ser igual a la diferencia de energía entre los estados inicial y final de la sustancia (23).

Cuando la radiación electromagnética pasa a través de una colección de átomos o moléculas, parte de la radiación es absorbida y se usa para excitar los átomos o moléculas desde un nivel de energía más bajo a un nivel de energía más alto. El espectrómetro analiza la radiación transmitida relativa a la radiación incidente y se produce un espectro de absorción (24). Todo átomo situado en un nivel energético bajo es capaz de absorber unas determinadas radiaciones pasando a un nivel energético superior, o bien, situado en este nivel, es capaz de emitir la misma energía (25).



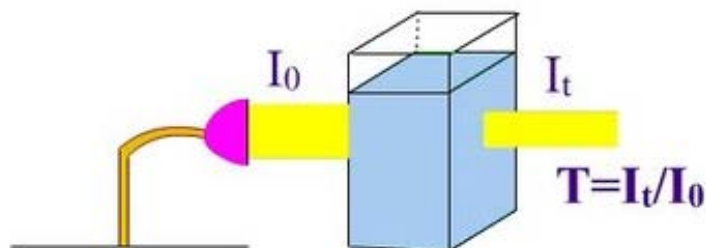
**Figura 3.** Proceso de absorción atómica (14)

Así, un átomo que se encuentra en "estado fundamental" absorbe la energía de la luz de una longitud de onda específica y entra en un "estado excitado". Como la cantidad de átomos en el camino de la luz aumenta, la cantidad de luz absorbida también aumenta. Midiendo la cantidad de luz absorbida, se puede realizar una

determinación cuantitativa de una determinada concentración de analito. La selección de una fuente y longitud de onda determinada permite la determinación específica de elementos individuales (14).

### 5.2.3. Ley de Lambert-Beer

Los métodos cuantitativos basados en la absorción requieren dos medidas de potencia: una antes de que el haz de luz haya pasado a través del medio que contiene el analito ( $I_0$ ) y la otra, después ( $I$ ) (17).



**Figura 4.** Atenuación de un haz de luz por una solución absorbente (26)

La figura muestra un haz de radiación paralela antes y después de que ha pasado a través de una capa de solución que tiene un espesor de  $b$  cm y una concentración  $c$  de una especie absorbente. Como consecuencia de interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes, la potencia del haz es atenuada (27). La transmitancia  $T$  de la solución es entonces la fracción de la radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

Que a menudo se expresa como porcentaje:

$$T = \frac{I_0}{I} \times 100 \quad (4)$$

Así, la absorbancia del medio está definida por la siguiente ecuación:

$$A = \log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (5)$$

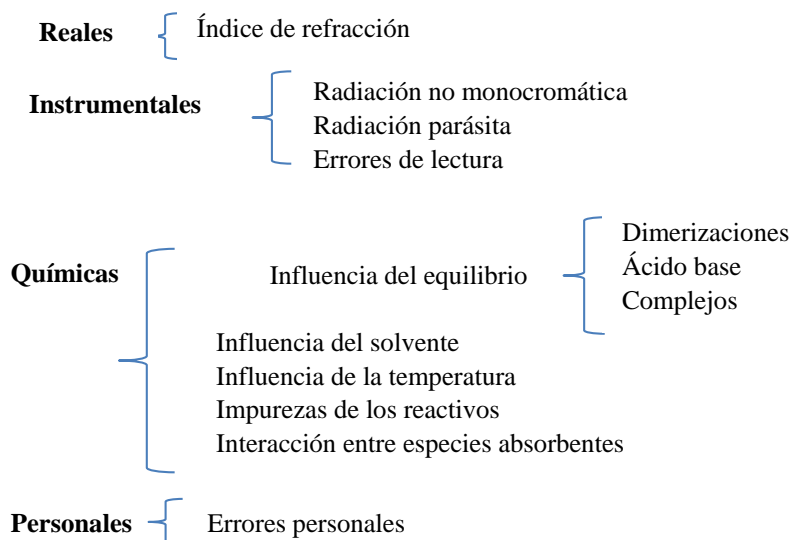
Las dos leyes fundamentales que rigen el comportamiento de la fracción de radiación absorbida al pasar a través de la materia son la ley de Lambert que se refiere al espesor de muestra y al efecto sobre la radiación que se absorbe, y la ley de Beer que está relacionada con el efecto de la concentración de la muestra sobre la absorción (28). De esta manera, para una radiación monocromática, la absorbancia es directamente proporcional al camino óptico ( $b$ ) a través del medio y la concentración ( $c$ ) de la especie absorbente. Esta relación se expresa en la siguiente ecuación:

$$A = abc \quad (6)$$

Donde  $a$ , es una constante de proporcionalidad que se denomina como absorptividad; con frecuencia para soluciones de una especie absorbente  $b$  se da en centímetros y  $c$  en gramos por litro, las unidades de absorptividad son  $L g^{-1} cm^{-1}$ . Cuando la concentración en la ecuación (6) se expresa en moles por litro y la longitud de la celda en centímetros, la absorptividad se denomina absorptividad molar (17).

### 5.2.3.1. Desviaciones de la ley de Lambert-Beer

La proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración únicamente se cumple para soluciones diluidas, es decir que la ley tiene ciertas limitaciones cuando la relación entre A y C dejan de ser lineal. Estas desviaciones, pueden ser positivas, si la absorbancia medida es mayor que la real o negativas si la absorbancia medida es menor que la real. Las desviaciones de la ley de Beer pueden clasificarse en cuatro categorías: reales, instrumentales, químicas y personales (29).



**Desviaciones reales:** La absorptividad ( $a$ ) y la absorptividad molar ( $\epsilon$ ) se ven afectadas por cambios en el índice de refracción, la ley de Beer sólo se cumple para bajas concentraciones es decir concentraciones entre  $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  M, en donde dicho índice es constante. Se puede producir una desviación del comportamiento lineal, para disoluciones muy concentradas, más de  $10^{-2}$  M la recta tendría una curvatura (29).

#### **Desviaciones instrumentales:**

- Radiación no monocromática:** la ley está definida para radiaciones con una sola longitud de onda, sin embargo, si la calidad del equipo no es buena, se obtienen bandas de radiaciones con un estrecho intervalo de longitudes de onda. También puede provocar desviaciones la presencia de radiación dispersa; para esto se debe aislar una banda de longitudes de onda cercana a la longitud de onda donde A sea máx. y  $\epsilon$  varíe muy poco (28).
- Radiación parásita:** El haz de radiación que sale de un monocromador puede estar contaminado con pequeñas cantidades de radiación parásita o dispersada originada por reflexión de los distintos componentes ópticos, dispersión por partículas de polvo atmosférico, etc. Así mismo, la propia muestra puede originar dispersiones. Con frecuencia, la radiación dispersada tiene una longitud de onda diferente respecto a la radiación principal, que puede llegar al detector sin haber atravesado la muestra (30).
- Errores de Lectura:** En ocasiones, pequeños errores en la lectura de la transmitancia o de la absorbancia pueden ocasionar errores grandes en la concentración cuando se opera en los extremos de la escala. Por ejemplo, el error absoluto cometido en la determinación de la concentración, para un

cierto error de lectura de transmitancia, es pequeño, pero al ser pequeña la concentración, el error relativo puede ser grande (30).

### Desviaciones químicas

- a. *Influencia del equilibrio:* Alteraciones del equilibrio de las reacciones que provocan una alteración de la concentración del absorbente, pueden ser debidas al cambio de temperatura, fuerza iónica, etc. La existencia de otros equilibrios químicos, reacciones ácido-base, reacciones de precipitación, formación de complejos; modifican la absorbancia del absorbente. Las reacciones de formación de complejos pueden producir la dispersión de la radiación, también pueden modificar el color del absorbente. Las impurezas de los reactivos se pueden comprobar realizando un análisis en blanco (31).
- b. *Influencia del solvente:* Como consecuencia de las interacciones soluto- disolvente se originan con frecuencia desplazamientos espectrales, ensanchamientos de bandas y otros fenómenos que pueden provocar desviaciones en la ley de Beer.
- c. *Influencia de la temperatura:* La temperatura puede influir modificando el equilibrio químico de algunos sistemas, así como, en ocasiones, dar lugar a desplazamientos batocrómicos.
- d. *Impureza de los reactivos:* muchos métodos espectrofotométricos son lo suficientemente sensibles como para detectar cantidades a nivel de trazas, por lo que la presencia de impurezas absorbentes en los mismos reactivos pueden originar errores considerables
- e. *Interacción entre especies absorbentes:* Cuando en una disolución existen varias especies absorbentes, la ley de Beer se cumple para cada una de ellas, si todas actúan independientemente. Sin embargo, la interacción entre ellas puede producir alteraciones en la distribución de cargas, como consecuencia de lo cual puede modificarse la energía requerida para la absorción y, en consecuencia, variaciones en la posición, forma y altura de las bandas de absorción. Por otra parte, estas alteraciones en la distribución de cargas también pueden ser originadas por la presencia de sales inertes, con el consiguiente aumento de la fuerza iónica de la disolución (30).

*Desviaciones personales:* Deben evitarse los ácidos concentrados que pueden atacarlos, y se debe comprobar antes y después de la medida que no tengan burbujas ni partículas no disueltas que puedan producir dispersión de la luz. El orden de adición de los reactivos puede influir también en la obtención de la absorbancia (31).

### 5.2.4. Instrumentación de la espectrofotometría de absorción atómica

El instrumento de absorción atómica tiene cinco componentes básicos:

1. La fuente de luz que emite el espectro del elemento de interés.
2. Una celda de absorción en la que se produce la atomización de la muestra.
3. Un monocromador que permite la dispersión de la luz.
4. Un detector, que mide la intensidad de la luz y amplifica la señal
5. Una pantalla que muestra la lectura

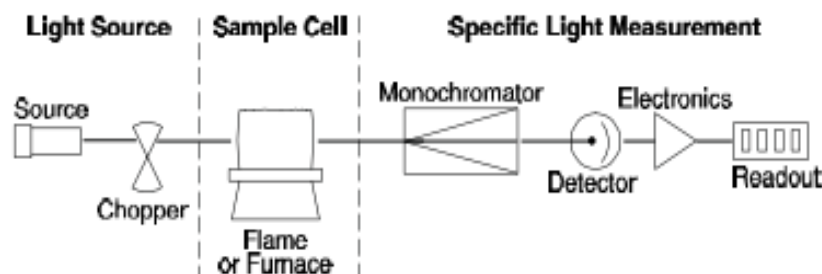


Figura 5. Componentes básicos del equipo de absorción atómica (14)

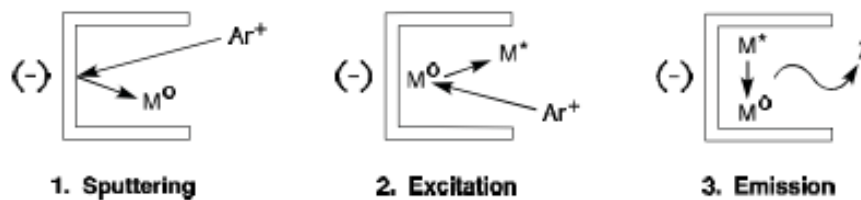
La muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducido a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido. Las gotas formadas son conducidas a una flama, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos. Estos átomos absorben cualitativamente una radiación específica emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración (15).

La señal de la lámpara una vez que pasa por la flama llega a un monocromador, que tiene como finalidad discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura (15).

#### 5.2.4.1. Fuente de radiación

Una vez que han sido formados los átomos, la flama tiene la misma función que una celda en espectroscopia visible o Ultravioleta. Los átomos de la flama absorben radiación de acuerdo a la Ley de Beer si esta corresponde a la diferencia en energía entre los niveles energéticos de algunos de los átomos presentes, de lo contrario, la radiación pasa por la flama sin disminuir la potencia de haz como efecto de los átomos contenidos en ella (32).

Dado que cada átomo en condiciones adecuadas es capaz de absorber sus propias radiaciones, se han desarrollado lámparas de descarga sin electrodos y de cátodo hueco. Estas últimas, consisten en un tubo de vidrio que contiene neón a baja presión y dos electrodos; cuando un potencial eléctrico es aplicado entre el ánodo y el cátodo, se produce la ionización del gas y los cationes gaseosos son conducidos hacia el cátodo, adquiriendo la energía cinética suficiente para arrancar algunos átomos metálicos del material catódico, este proceso es conocido como “sputtering o chisporroteo”. Estos átomos metálicos son excitados al chocar con iones gaseosos y al retornar a su estado fundamental emiten radiación característica (30).

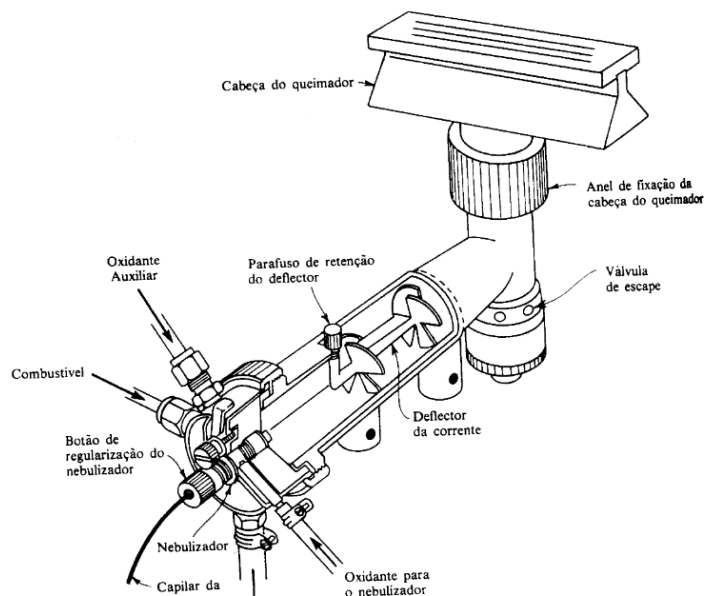


**Figura 6.** Proceso de emisión de una lámpara de cátodo hueco (14)

#### 5.2.4.2. Nebulizador

La muestra es introducida en el atomizador a una velocidad constante, produciendo también una señal espectral constante con el tiempo, esta que se encuentra en estado líquido (en la cual están disueltos los componentes en forma de iones positivos y negativos) es conducida al quemador por medio del efecto “Venturi”. Este efecto se crea cuando el oxidante (por ejemplo aire) se introduce a través de un tubo que genera un vacío lo cual produce la succión de la muestra líquida a través del tubo capilar. Este mismo efecto favorece la formación de pequeñas gotas en forma de rocío (17).





**Figura 7.** Quemador-Nebulizador de flujo laminar (33)

El combustible necesario, (generalmente acetileno) se introduce directamente a la cámara del nebulizador por medio de un conducto adicional. Debido a que el oxidante que se introduce a través del nebulizador para el efecto Venturi no es suficiente para una adecuada combustión, el resto requerido se introduce también a la cámara del nebulizador por medio de un conducto adicional. El resultado es que el quemador lleva finalmente una mezcla oxidante (aire) y combustible (acetileno) que transportan pequeñas gotas de rocío de la muestra aspirada (34).

Las pequeñas gotas formadas, son arrastradas por el flujo de gases (oxidante- combustible) que también entran a la cámara de mezclado del nebulizador y que sustentan la reacción de combustión en el quemador. Únicamente las partículas que tienen un tamaño menor de 10 mm, lo que representa solo una pequeña fracción de volumen de muestra aspirada llega finalmente al quemador, más del 90% de la solución es desechada a través de un tubo de drenaje en que el nebulizador tiene para este fin (34).

Las etapas implicadas en la atomización de los analitos son comunes a todos los métodos de llama, y se pueden resumir en las siguientes (35):



Diagrama 2. Etapas y proceso de la atomización (36)

- a) **Transporte de la disolución que contiene el analito:** Esta etapa implica el movimiento de la disolución desde el recipiente que la contiene hasta el nebulizador a través de un estrecho tubo de plástico.
- b) **Nebulización:** Implica la conversión de la disolución en un fino aerosol (suspensión de partículas ultramicroscópicas de sólidos o líquidos en el aire u otro gas).
- c) **Transporte del aerosol:** En esta etapa el aerosol es transportado hasta la llama a través de la cámara de mezcla. Esta cámara tiene una serie de componentes—bola de impacto, deflectores—que aseguran que sólo las partículas más pequeñas lleguen a la llama.
- d) **Desolvatación:** este proceso implica, la conversión del aerosol en partículas de sal. La velocidad de desolvatación depende de factores tales como el tamaño de las gotas, disolvente, velocidad de aspiración, temperatura de la llama, etc.
- e) **Vaporización:** Se trata de la conversión en la llama de las partículas de sal en vapor. Esta es una etapa crítica en los métodos de llama y en ella pueden presentarse serias interferencias que comentaremos más adelante. Entre las variables que afectan a esta etapa podemos citar el tamaño de la partícula, la composición de la misma, la temperatura de la llama y el tiempo (altura) en la llama.
- f) **Equilibrio de las especies vaporizadas:** este equilibrio se produce entre las especies moleculares (óxidos e hidróxidos), átomos neutros e iones. En general, en los métodos de llama se prefiere los átomos neutros-especies primarias para absorción y fluorescencia, y átomos neutros excitados para emisión.

#### 5.2.4.3 Quemador

Con las gotas de solución que alcanzan a llegar al quemador ocurren los siguientes eventos (34):

1. El solvente es vaporizado y se forman los cristales de las sales metálicas que originalmente se encontraban en solución como iones positivos y negativos. La naturaleza de las sales formadas dependen principalmente de la constante de producto de solubilidad del compuesto que cristaliza
2. Una vez formadas las sales, estas son descompuestas por efecto de la temperatura. Y el elemento es reducido al estado metálico sólido.

3. Posteriormente el metal pasa del estado líquido al estado gaseoso y finalmente se tiene en un vapor atómico que es capaz de absorber radiación de longitudes de onda bien definidas.
4. Si la temperatura es lo suficientemente alta y/o el elemento metálico es de bajo potencial de ionización, parte de los átomos del elemento pierden uno o más de sus electrones y se ioniza parcialmente. Esto no es conveniente ya que la ionización es una interferencia en espectroscopía de absorción atómica.

#### 5.2.4.4 Llama

Una llama es el resultado de una reacción exotérmica entre un gas combustible y un agente oxidante gaseoso. (30). En la tabla 1 se observan los combustibles y oxidantes más utilizados en espectroscopia de llama y los intervalos de temperatura alcanzados con cada una de estas mezclas. Es importante considerar la velocidad de combustión, puesto que las llamas solo son estables en ciertos intervalos de caudal; si el caudal no sobrepasa la velocidad de combustión, la llama se propaga hacia el quemador dando un fogonazo. Cuando el caudal aumenta, la llama sube hasta alcanzar un punto por encima del quemador donde el caudal y la velocidad de combustión son iguales y en esta región la llama es estable (17).

**Tabla 1.** Propiedades de la llama

Combustible	Oxidante	Temperaturas (°C)	Velocidad de combustión máxima (cm s <sup>-1</sup> )
Gas natural	Aire	1700-1900	39-49
Gas natural	Oxígeno	2700-2800	370-390
Hidrógeno	Aire	2000-2100	300-440
Hidrógeno	Oxígeno	2550-2700	900-1400
Acetileno	Aire	2100-2400	158-266
Acetileno	Oxígeno	3050-3150	1100-2480
Acetileno	Óxido nitroso	2600-2800	285

#### 5.2.4.5 Monocromador

En general, dispone de una rendija o ranura de entrada que limita la radiación lumínica producida por la fuente y la confina en un área determinada, un conjunto de espejos para pasar la luz a través del sistema óptico, un elemento para separar las longitudes de onda de la radiación lumínica, que puede ser un prisma o una rejilla de difracción, y una rendija de salida para seleccionar la longitud de onda con la cual se desea iluminar la muestra. Parte de la radiación no absorbida es dirigida hacia el detector (37).

#### 5.2.4.6 Detectores

El sistema de detección puede estar diseñado con fotoceldas, fototubos, fotodiodos o fotomultiplicadores. Esto depende de los rangos de longitud de onda, de la sensibilidad y de la velocidad de respuesta requeridas. El sistema de detección recibe la energía lumínica proveniente de la muestra y la convierte en una señal eléctrica proporcional a la energía recibida. La señal eléctrica puede ser procesada y amplificada, para que pueda interpretarse a través del sistema de lectura que una vez procesada es presentada al analista de diferentes maneras (por ejemplo, unidades de absorbancia) (37).

#### 5.2.5 Interferencias

A continuación se considera la influencia de diversos factores sobre la absorbancia atómica del elemento a determinar y la forma de evitar dichos efectos.

### 5.2.5.1 Interferencias de ionización

Un átomo neutro en su estado fundamental puede ser ionizado a temperaturas elevadas. Estos iones exhiben propiedades espectroscópicas diferentes a un átomo neutro y no pueden ser determinados por espectroscopia de absorción atómica. Así, el número total de átomos disponibles para la absorción de la radiación por unidad de volumen disminuye, lo que produce una pérdida de sensibilidad. Esta interferencia depende tanto de la temperatura de la llama como del potencial de ionización del elemento en estudio. La ionización puede ser detectada notando que la curva de calibración tiene una desviación positiva a concentraciones altas, dado que la fracción de átomos ionizados es menor a concentraciones mayores. Estas interferencias se pueden eliminar agregando a todas las soluciones estándar y a la muestra un exceso del elemento que sea fácilmente ionizable en la llama, por ejemplo: el sodio, potasio, litio o cesio, o mediante el empleo de una llama de menor temperatura (36).

### 5.2.5.2 Interferencias físicas

Este tipo de interferencias se debe a cambios en las propiedades físicas, tales como viscosidad, densidad, tensión superficial, etc. en la solución del analito y en los patrones, los cuales pueden afectar al proceso de nebulización y, en consecuencia, el número de átomos presentes en la llama. En ocasiones se utilizan disolventes orgánicos para aumentar la eficacia de la nebulización y también la temperatura de la llama (30).

### 5.2.5.2 Interferencias químicas

Las interferencias químicas son aquellas en las cuales algún tipo de compuesto químico está presente, o se forma en la llama, produciendo la disminución de la población de átomos libres. Las interferencias más comunes se presentan a continuación:

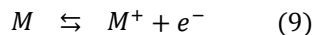
- **Formación de compuestos de baja volatilidad:** El tipo más común de interferencia es el producido por aniones que forman compuestos de baja volatilidad con el analito y que reducen su velocidad de ionización. Por ejemplo, para una determinada concentración de calcio, la absorbancia disminuye de forma casi lineal con el aumento de las concentraciones de sulfato o fosfato hasta que la relación anión/calcio es de aproximadamente 0,5. También se han encontrado ejemplos de interferencias por cationes; el aluminio por ejemplo, hace disminuir los resultados en la determinación de magnesio, por la formación de un compuesto termoestable de aluminio y magnesio (17). En muchas ocasiones pueden eliminarse o atenuarse estas interferencias aumentando la temperatura. También pueden emplearse agentes liberadores, que son cationes que reaccionan preferentemente con el interferente e impiden su interacción con el analito (17).
- **Equilibrios de disociación:** En medio gaseoso y caliente de la llama o de un horno, las reacciones de disociación y asociación que ocurren provocan la conversión de los constituyentes metálicos a su estado elemental, que podría expresarse de la siguiente manera:



Donde M representa los átomos del analito.

Las reacciones de disociación en las que intervienen óxidos e hidróxidos metálicos juegan un papel importante en la determinación de los espectros de absorción o emisión de un elemento. Por ejemplo, los óxidos de los elementos alcalinotérreos son relativamente estables, con energías de disociación mayor a 5 eV. Las bandas moleculares que se producen por la presencia de estos compuestos en la llama constituyen una característica importante de sus espectros. Excepto a temperaturas muy altas, estas bandas son más intensas que las líneas de lo átomo o iones. A diferencia de los óxidos e hidróxidos de los metales alcalinos, se disocian más fácilmente, por lo que las intensidades de las bandas moleculares de estos elementos son elevadas, incluso a temperaturas muy bajas (17).

- **Equilibrios de ionización:** en las mezclas de combustión que contienen aire como oxidante, la ionización de los átomos y moléculas es pequeña y puede despreciarse. Sin embargo, donde las llamas de temperaturas más elevadas en las que el oxidante es el oxígeno u óxido nítrico, la ionización es más significativa, y hay una concentración notable de electrones libres como consecuencia del equilibrio.



Donde M representa a un átomo o molécula neutra y  $M^+$  a su ion. Considerando fundamentalmente los equilibrios en los que M es un átomo metálico. La presencia de equilibrios entre iones y átomos en la llama tiene algunas consecuencias importantes en la espectroscopia de llama. Por ejemplo, la intensidad de las líneas de absorción o emisión atómica de los metales alcalinos, en particular del potasio, rubidio y cesio, está afectada de forma compleja por la temperatura. Un aumento en la temperatura implica un aumento de la población de átomos excitados, de acuerdo con la ecuación de Boltzman. Sin embargo contrarrestando este efecto, hay una disminución de la concentración de átomo como resultado de la ionización. De tal manera, en llamas más caloríficas se puede observar una disminución de la absorción o emisión. Los efectos de los desplazamientos de los equilibrios de ionización pueden eliminarse con la adición de un supresor de ionización, el cual proporciona una concentración relativamente alta de electrones en la llama suprimiendo la ionización del analito (17).

### 5.2.5.3 Interferencias espectrales

Se presentan bien cuando partículas procedentes de la atomización dispersan la radiación incidente de la fuente, o bien cuando la absorción o emisión de una especie interferente se solapa o está tan cerca de la  $\lambda$  de medida del analito que no puede separarlas el monocromador. Las interferencias más comunes se describen a continuación:

- **Interferencias espectrales de línea:** ocurren cuando hay superposición de dos líneas atómicas o cuando éstas no son resueltas por el monocromador. Por ejemplo, en la determinación de trazas de zinc en una matriz de hierro, debido a que la línea de absorción del hierro (213.86 nm) se superpone a la línea de resonancia del zinc (213.86 nm). El empleo de lámparas multielemento fabricadas con una combinación inadecuada de elementos puede producir interferencias del segundo tipo, si dentro de la banda espectral del monocromador se encuentra una línea de resonancia de otro elemento junto a la del elemento a determinar. En general este tipo de interferencias no son frecuentes debido a la naturaleza muy específica de la longitud de onda que se usa en espectroscopia de absorción atómica. Si se llegan a presentar se pueden eliminar seleccionando una segunda línea de resonancia del elemento de interés (probablemente se obtenga mayor sensibilidad) o empleando una ranura del monocromador más angosta (36).
- **Interferencia espectrales de banda:** se producen debido a la absorción de la radiación por moléculas o radicales, y por dispersión de la radiación por sólidos. Para ambos efectos, que en principio son distintos, se emplea el término absorción de fondo. Aquí existe una pérdida de radiación no específica que lleva a absorbancias mayores que la absorbancia obtenida por el analito. La señal está compuesta por la absorción del elemento a determinar más la absorción no específica. La absorción molecular ocurre cuando una especie molecular en el atomizador posee un perfil de absorción que se superpone al del elemento de interés. Por ejemplo, el espectro molecular del hidróxido de calcio muestra un máximo de absorción en la línea de resonancia del bario. Este problema es más serio en la región espectral bajo los 250 nm, donde concentraciones altas de metales alcalinos y de otras sales muestran una alta absorción molecular. La dispersión de la luz ocurre cuando partículas de sólidos causan una deflexión de parte de la radiación de la fuente fuera del eje del sistema monocromador-detector. Estos problemas son relevantes con muestras conteniendo altas concentraciones de elementos refractarios. (36). Los métodos más empleados en la corrección de la absorción de fondo (BG) son:

- **Método de corrección de doble línea:** en este método se realiza la medición de una línea de emisión no absorbida por el analito, cuyo valor se resta al valor de la medición obtenida a la longitud de onda de resonancia del analito. El método tiene la desventaja que a veces no es fácil disponer de una línea de no resonancia cercana a la línea de resonancia del analito (36).
- **Método de corrección continua de fondo:** la forma más eficaz para medir la absorción de fondo es realizar la medición empleando una lámpara de deuterio o de hidrógeno que emite un espectro continuo bajo los 320 nm. En estos instrumentos ambas fuentes radiantes (lámpara de cátodo hueco (LCH) y de deuterio (LD) son moduladas a la misma frecuencia, pero desfasadas, recorriendo el mismo camino óptico a través de la muestra en el monocromador para llegar al detector. Este observa alternadamente en el tiempo las dos fuentes radiantes. La absorción de fondo disminuye la intensidad de ambas fuentes, mientras que la absorción proveniente de la lámpara de cátodo hueco. La electrónica del instrumento separa ambas señales y compara la absorción de ambas fuentes entregando una señal corregida con respecto a la absorción de fondo (36).

### 5.3 Validación del método analítico para determinar calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis

#### 5.3.1 Concepto de validación en métodos analíticos

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Ésta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Para el desarrollo de un nuevo producto es necesario la utilización de métodos analíticos que permitan cuantificar el producto en forma de materia prima o como principio activo de la formulación con un alto grado de confiabilidad (38). En la actualidad los laboratorios de control de la calidad de la Industria Farmacéutica no sólo se ocupan de analizar si un producto cumple o no con sus requisitos de calidad mediante la utilización de métodos analíticos establecidos para cada uno de ellos, sino también se esfuerzan para validar cada método analítico utilizado en el control de la calidad de sus productos. Basado en este criterio, el laboratorio de control de calidad de la empresa Renal Medical Marketing Ltda. realizó la validación del método analítico para determinar calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis (38).

#### 5.3.2 Características de fiabilidad

Las características de fiabilidad son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo “criterios de desempeño en la validación”. Las características comprenden los parámetros de validación (18):

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Linealidad
- Intervalo

#### 5.3.3 Criterios y características de desempeño analítico

Ésta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Así, los diferentes procedimientos de prueba requieren diferentes esquemas de validación. Básicamente la validación de un método nuevo, requiere un mínimo de valoraciones de las características de desempeño, en tabla 3 se puede evidenciar dichos requerimientos de desempeño. Algunas de las categorías de prueba más habituales para los que se exigen datos de validación se resumen en la tabla 2 (18).

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (E: disolución, liberación de fármacos)
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación.

**Tabla 2.** Datos requeridos para la validación para las diferentes categorías. (18)

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

\* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de procedimientos analíticos farmacopeicos se indican a continuación:

#### 5.3.3.1 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo (18).

El valor aceptado como verdadero puede ser obtenido de diferentes formas. Una es comparando los resultados con un método que se ha establecido como referencia; en esta aproximación se asume que la incertidumbre del método de referencia es conocida. La forma más usual de evaluar la exactitud del método de análisis es a través del porcentaje de recuperación, haciendo adición conocida de analito en la muestra (39).

#### 5.3.3.2 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo, en días diferentes, con diferentes analistas o equipos diferentes. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo (18).

#### 5.3.3.3 Especificidad

La especificidad puede definirse como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes de la matriz (18). Aunque la especificidad y la selectividad pueden considerarse términos equivalentes, algunos autores lo diferencian, considerando la selectividad como la capacidad de detectar

simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto (40).

#### 5.3.3.4 Linealidad

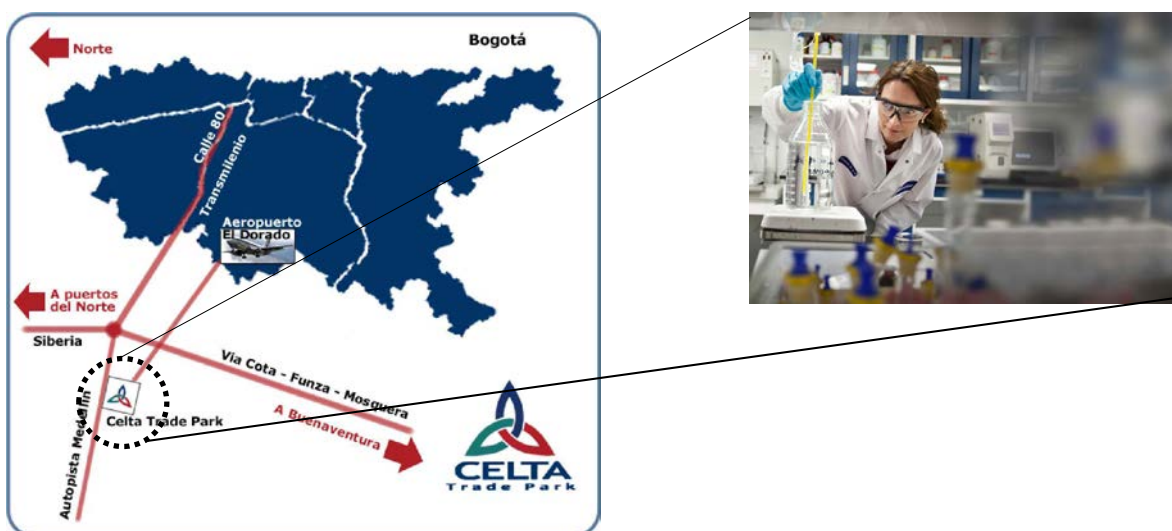
La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales, ya sea por medio directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado (18). La linealidad se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta, ya sea lineal o no (41).

#### 5.3.3.5 Intervalo

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad (18).

## 6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Renal Medical Marketing Ltda., ubicada en la Autopista Medellín Km 7.8 Bodega 146, Celta Trade Park, Funza, Cundinamarca, Colombia.



**Figura 8.** Ubicación de la empresa Renal Medical Marketing en el municipio de Funza, Cundinamarca.

La metodología para el desarrollo del presente tiene como finalidad la validación del método analítico para la determinación de calcio y magnesio, teniendo en cuenta la farmacopea United States Pharmacopoeial Convention (USP), capítulo 852: Espectroscopia de Absorción Atómica.

### 6.1 Validación del método analítico para la determinación de calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis.

La validación consideró los criterios propuestos en la norma USP 39; capítulo 852: Espectroscopia de Absorción Atómica y tuvo en cuenta los documentos de la ICH para la determinación cuantitativa del componente principal de un fármaco (Categoría I); dicha validación además comprendió la calificación del



equipo; características de desempeño del método y criterios de aceptación y la documentación del procedimiento dentro del Sistema de Gestión de Calidad.

### 6.1.1 Instrumentación

El espectrómetro utilizado para esta técnica es el AA iCE™ 3300 de Thermo Scientific™, el cual consta un monocromador tipo Elbert de 0.27m, un intervalo de longitud de onda estándar de 185 nm a 760 nm, un intervalo de longitud de onda amplia de 195 a 900 nm, un quemador de Ti de 50 mm, un corrector de fondo de D<sub>2</sub>, y un Software SOLAAR de fácil manejo.

Las condiciones de trabajo se muestran a continuación:

**Tabla 3.** Condiciones de Trabajo en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica de llama para la detección de Calcio y Magnesio

Parámetro	Condiciones de trabajo ion Ca	Condiciones de trabajo ion Mg
Longitud de onda	422.7 nm	285.2 nm
Gas	Aire-acetileno	Aire-acetileno
Lámpara de deuterio	Apagado	Encendida
Corriente de la lámpara	100%	75%
Llama	Aire-acetileno	Aire-acetileno
Ajuste Patrón chequeo	3.0 ppm ~ 0.250 A	1.5 ppm ~ 0.450 A
Flujo de Combustible	0.8-1.2 L/min	0.7-1.2 L/min
Ángulo quemador	180°	20°
Rendija	0.5 nm	0.5 nm

#### 6.1.1.1 Calificación el equipo

La calificación del equipo es la verificación del rendimiento del equipo para el método en desarrollo, por tanto se comprueba el funcionamiento del software y el hardware del mismo, y se realiza por los siguientes parámetros: la calificación de instalación (IQ), calificación operacional (OQ) y calificación de desempeño (PQ).

#### 6.1.1.2 Calificación de instalación

Se establece a partir de la verificación documentada de los aspectos claves de la instalación de acuerdo con las especificaciones del proveedor *Innovatek S.A.S.* Asegurando que el equipo se encuentra instalado correctamente. En este punto se reúne la información básica de identificación del equipo que comprenden:

1. Revisión de documentos, manuales, incluidos en la compra del equipo
2. Revisión de las características del software y hardware y condiciones ambientales eléctricas, entre otras, incluidos en el manual de usuario
3. Comparar los requisitos del operador con las especificaciones del equipo y verificar que cumplan con dichas exigencias

#### 6.1.1.3 Calificación operacional

El propósito de la calificación operativa es demostrar que el desempeño del instrumento es el adecuado. Para esto, se establece de manera documentada el desempeño del instrumento usando estándares con propiedades espectrales conocidas con el fin de verificar que el sistema opera dentro de las especificaciones esperadas. Esta calificación fue realizada por un técnico calificado.

#### 6.1.1.4 Calificación de desempeño

La calificación de desempeño determina que el instrumento es capaz de cumplir con los requisitos del usuario, para esto se estableció de manera documentada que las pruebas de aptitud del sistema demostraban el desempeño estable del instrumento.

Para esto, se realizaron tres curvas de calibración con un patrón de Ca en un rango de concentración de 2,4 a 3,6 mg/L Ca, con el fin de comprobar el correcto funcionamiento del equipo. A partir de estas lecturas se halló el promedio (X) de las absorbancias, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV). Tomando como criterio de aceptación un  $CV \leq 5\%$  de las respuestas del equipo generadas.

#### 6.1.2 Características de desempeño del método analítico

Para establecer las características analíticas para la validación del método, se tienen en cuenta las reportadas en la USP 39 (18); de esta manera los concentrados ácidos destinados para hemodiálisis se clasifican en la categoría I que hace referencia a los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados. Las características de desempeño analítico para esta categoría muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Características de desempeño analítico

Características de Desempeño analítico	Categoría I
Exactitud	Si
Precisión	Si
Especificidad	Si
Linealidad	Si
Intervalo	Si

Los análisis estadísticos para las características de desempeño del método analítico se realizaron utilizando Microsoft Office Excel 2013, para los análisis de datos de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, precisión y exactitud.

#### 6.1.2.1 Preparación del placebo o matriz

Para establecer cada una de las características mencionadas anteriormente se tiene en cuenta la composición del producto a validar denominado Sukses AP 35X Ref. 205, la adición del placebo o matriz para la validación de los iones calcio y magnesio se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Matriz o Placebo para la validación del ion Ca y Mg

Componente	Validación Ca	Validación Mg
	Peso (g)	Peso (g)
Ácido acético glacial	0,63	0,63
Cloruro de magnesio	0,535	---
Cloruro de potasio	0,523	0,523
Cloruro de calcio	---	0,773
Cloruro de sodio	21,48	21,48
Dextrosa anhidra	3,50	3,50
Agua purificada c.s.p	100 mL	100 mL

### 6.1.2.2 Exactitud

Para valoraciones de la Categoría 1 (componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados, la exactitud se puede determinar realizando estudios de recuperación con concentraciones conocidas del elemento a analizar. El porcentaje de recuperación media debe encontrarse entre el 95%-105% de recuperación media para la valoración de dicho fármaco.

- **Calcio:** Se prepararon tres muestras de concentración de 95%, 100%, y 105% de AP 35X Ref 205 cada una por triplicado, y se realizó la lectura de absorbancia.

**Tabla 6.** Volumen de solución Ca para evaluar la exactitud

Concentración %	Volumen solución 1000 ppm Ca (µL)	Matriz (µL) vf=20 mL	Óxido de lantano (µL)
95	57	28,5	1000
100	60		
105	63		

- **Magnesio:** Se prepararon tres muestras de concentración de 95%, 100%, y 105% de AP 35X Ref 205 cada una por triplicado, y realizar la lectura de absorbancia.

**Tabla 7.** Volumen de solución Mg para evaluar la exactitud

Concentración %	Volumen solución 1000 ppm Mg (µL)	Matriz (µL) vf=20 mL	Óxido de lantano (µL)
95	25.5	47	500
100	30		
105	31.5		

### 6.1.2.3 Precisión

#### 6.1.2.3.1 Repetibilidad

El procedimiento analítico debe evaluarse midiendo las concentraciones de seis soluciones muestra preparadas de manera independiente al 100% de la concentración de la prueba de valoración. También podría prepararse tres soluciones de muestra a diferentes concentraciones y realizar la lectura por triplicado. La desviación estándar relativa para este no más del 5% para la valoración del fármaco.

- **Calcio:** Se analizaron 6 muestras de Sukses AP 35X Ref. 205 preparadas a partir del patrón de 1000 ppm Na al 100 % de la concentración.

**Tabla 8.** Volumen de solución para evaluar la precisión Ca

Concentración %	Volumen solución 1000 ppm (µL)	Matriz (µL) vf=20 mL	Óxido de lantano (µL)
100	60	28.5	1000

- **Magnesio:** Se analizaron 6 muestras de Sukses AP 35X Ref. 205 preparadas a partir del patrón de 1000 ppm Na al 100 % de la concentración.

**Tabla 9.** Volumen de solución para evaluar la precisión Mg

Concentración %	Volumen solución 1000 ppm (μL)	Matriz (μL) vf=25 mL	Óxido de lantano (μL)
100	600	47	500

#### 6.1.2.3.2 Precisión intermedia

Las variables analíticas incluyen realizar el análisis en días diferentes, con diferentes instrumentos y diferente analista. El procedimiento analítico debe evaluarse realizando la prueba de repetibilidad en cualquiera de las condiciones mencionadas anteriormente, con un mínimo de 12 mediciones. La desviación estándar relativa no debe ser mayor al 8%.

- **Calcio:** se evalúa teniendo en cuenta días de análisis diferentes y diferentes analistas, realizando 6 mediciones de una solución de Sukses AP 35x Ref. 205 al 100%.
- **Magnesio:** se evalúa teniendo en cuenta días de análisis diferentes y diferentes analistas, realizando 6 mediciones de una solución de Sukses AP 35x Ref. 205 al 100%

#### 6.1.2.4 Especificidad

El procedimiento debe ser capaz de evaluar cada analito elemental en presencia de cualquier componente de la matriz. La especificidad puede demostrarse mediante el cumplimiento del requisito de exactitud.

#### 6.1.2.5 Linealidad

Se prepara una curva de respuesta entre la concentración del analito y la absorbancia, a partir de no menos de 5 soluciones estándar que abarquen la concentración de la solución de prueba. El coeficiente de correlación (R) debe ser de 0.995 para valoraciones de categoría I.

- **Calcio:** Se prepararon tres curvas de calibración cada una con cinco concentraciones, a partir de una solución estándar de Ca como se encuentra indicado en la siguiente tabla.

**Tabla 10.** Curva de calibración ion Ca

Concentración mg/mL	Volumen solución 1000 ppm (μL)	Matriz (μL) vf=20 mL	Oxido de lantano (μL)
2,4	48	28,5	1000
2,7	54		
3,0	60		
3,3	66		
3,6	72		

- **Magnesio:** Se prepararon tres curvas de calibración cada una con cinco concentraciones, a partir de una solución estándar de Mg como se encuentra indicado en la siguiente tabla.

**Tabla 11.** Curva de calibración ion Mg

Concentración mg/mL	Volumen solución 1000 ppm Mg (μL)	Matriz (μL) vf=25 mL	Oxido de lantano (μL)
1,2	30	59	500
1,4	35		
1,5	37,5		
1,7	42,5		
1,8	45		

Como criterio de aceptabilidad de la linealidad, se realiza un análisis de regresión por el modelo matemático de mínimos cuadrados, calculando el intercepto (a), la pendiente (m) y coeficiente de regresión (r) 15-, el coeficiente de determinación (r2), cómo se muestra a continuación:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (10)$$

$$m = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (11)$$

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2] [\sum (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (12)$$

#### 6.1.2.6 Intervalo

El intervalo se demuestra cumpliendo con los requisitos de linealidad, exactitud y precisión. Para las pruebas de categoría I, el intervalo de validación para un fármaco o producto terminado es de 80%-120% de la concentración de prueba.

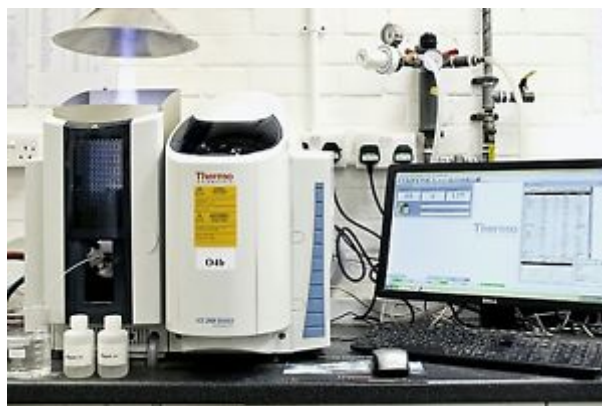
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de acuerdo con la metodología descrita anteriormente, están relacionados con la validación del método para la determinación de calcio y magnesio y la cuantificación de estos electrolitos en el concentrado ácido denominado Sukes AP 35x Ref. 205. Estos resultados se muestran a continuación:

### 7.1. Validación del método para la determinación de calcio y magnesio en concentrados ácidos para hemodiálisis

#### 7.1.1 Calificación el equipo (EQ)

La calificación del equipo (EQ), se llevó a cabo teniendo en cuenta la comprobación y calificación de instalación (IQ), calificación operacional (OQ) y calificación de desempeño (PQ). El espectrómetro usado para determinar los iones calcio y magnesio en concentrado ácidos destinados a hemodiálisis fue el AA iCE™ 3300 de Thermo Scientific (figura 9) de la casa comercial *Innovatek S.A.S.*



**Figura 9.** Equipo de Absorción atómica AA iCE™ 3300 de Thermo Scientific

#### 7.1.1.1 Calificación de instalación (IQ)

Las instalaciones cumplen con las condiciones óptimas para el adecuado funcionamiento del equipo, como son la conexión del cable de datos, redes eléctricas, nivelación del suelo, lugar aislado de interferencias como vibraciones y corrientes de aire. Además, la instalación se hizo bajo la supervisión de un profesional contratado por Innovatek S.A.S. En la tabla 12 se detalla el cumplimiento de dichas condiciones.

**Tabla 12.** Especificaciones aprobadas en la instalación del espectrómetro de absorción atómica..

DOCUMENTACIÓN	
Nombre del equipo	AA iCE™ 3300 de Thermo Scientific
Nombre del fabricante	Innovatek S.A.S
Condiciones de entrega	Equipo en estado nuevo
Localización en el laboratorio	Nororiental
Instructivo de operación	El equipo cuenta con un manual de operación.
Instructivo de mantenimiento	El equipo cuenta con un instructivo de mantenimiento.
Garantía	1 año
UBICACIÓN	
El equipo debe estar nivelado	El equipo se encuentra nivelado
La superficie sobre la que descansa el equipo es lo suficientemente rígida para evitar vibraciones	El equipo se encuentra sobre un mesón de concreto firme.
El equipo debe estar alejado de líquidos que por derrame puedan ingresar a su interior	No existen recipientes con líquidos cercanos al instrumento.
REQUERIMIENTOS ELÉCTRICOS	
El equipo requiere una tensión eléctrica de 240 V	La tensión eléctrica del equipo es de 240 V
Cada toma de corriente tiene una conexión a tierra	El equipo cuenta con una toma de corriente que tiene una conexión a tierra.

Varias instalaciones requerirán de alimentación eléctrica por separado	El equipo del laboratorio cuenta con su propia toma corriente.
<b>REQUERIMIENTOS DE GAS</b>	
El equipo requiere de acetileno como combustible y óxido nitroso o aire como oxidante	El equipo solo utiliza acetileno como combustible y aire como comburente.
Los cilindros de gas se deben guardar y utilizar en una posición vertical en medio de un ambiente libre de chispas	Los cilindros de gas se guardan de forma vertical y cuenta con una cadena de seguridad para evitar su caída. Se encuentra almacenado en un lugar externo al laboratorio.
Suministrar acetileno con manguera a una presión de 9 psi en el punto de trabajo	El acetileno es transportado por tuberías de cobre desde su depósito hasta el equipo, con una presión de 10 psi.
El aire debe ser alimentado por un compresor a una presión de 30 psi.	El compresor de aire utilizado es: Compresor marca DEWALT 12 de hasta 120 psi, Cuenta con una unidad de filtro reguladora y manómetros y reguladores de presión. La presión es de 33 psi.
<b>SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE HUMOS</b>	
El espectrómetro debe tener un sistema de extracción de humos instalado por encima del compartimento de la muestra	El sistema de extracción de gases está situado sobre el compartimento del quemador, este es encendido cuando el equipo entra en funcionamiento.
Se recomienda que la campana del sistema de extracción y conductos deben ser de acero inoxidable	El equipo cuenta con ductos de acero inoxidable

#### 7.1.1.2 Calificación operacional (OQ)

El técnico calificado en hacer entrega del equipo verificó que el instrumento y el software funcionan correctamente. Para ello, realizó la calificación del instrumento siguiendo los procedimientos establecidos por la USP y las especificaciones del fabricante. Se realizó exactitud y precisión fotométrica filtros de densidad neutra B0177 trazables a NIST, filtros utilizados 0-3-4-6, las lecturas se realizaron con la lámpara de Ni a una longitud de onda de 540.1 nm a 1.0 nm de ancho de banda. La exactitud de longitud de onda se verificó mediante la configuración del sistema óptico empleando una lámpara de Ca/Mg a una corriente del 75% y un ancho de banda de 0.2 nm en las líneas espectrales de 285,2-347,2-603,0 y 743,9; cumpliendo satisfactoriamente cada una de las pruebas.

Se corre el test PQ con std de Ni 10 ppm, empleando una lámpara multielemento de Cr/Cu/Ni/Mn obteniendo resultados satisfactorios. Ni: 0,588 UA con un RSD inferior 1%.

El equipo se encuentra operando según parámetros de fábrica, con reproducibilidad y sensibilidad optimas en las lecturas. El instrumento opera correctamente finalizada la calificación.

#### 7.1.1.3 Calificación de desempeño (PQ)

Se realizaron tres curvas de calibración con un patrón de Ca en un rango de concentración de 2,4 a 3,6 mg/L Ca, con el fin de comprobar el correcto funcionamiento del equipo. Para esto se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

- El computador y el instrumento encienden de manera correcta
- El software SOLAAR funciona correctamente
- Las lámparas se instalaron con su correspondiente número de serie y encienden de manera correcta.
- Al abrir los cilindros del gas (acetileno) la presión de trabajo se encuentra en 9 psi, y la presión del cilindro se encuentra por encima de los 100 psi
- Chequeo nivel de desechos
- Configuración óptica
- Alineación quemador (profundidad y ángulo)
- Al encender el compresor la presión del aire es 30 psi.
- La llama se configura correctamente
- El autocero se realiza de forma correcta
- La absorbancia del patrón de chequeo se ajusta correctamente

A partir de estas lecturas se halló el promedio (X) de las absorbancias (13), la desviación estándar (S) - y el coeficiente de variación (CV). Tomando como criterio de aceptación un  $CV \leq 5\%$  de las respuestas del equipo generadas.

$$X = \frac{\sum x_i}{n} \quad (13)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - X)^2}{n-1}} \quad (14)$$

$$\%CV = \frac{S}{X} * 100 \quad (15)$$

**Tabla 13.** Respuestas generadas del equipo de Absorción atómica AA iCE™ 3300 de Thermo Scientific en diferentes concentraciones.

Conc. mg/L	A1	A2	A3	X	SD	%CV
2,4	0,2127	0,2104	0,2155	0,2129	0,002554	2,000
2,7	0,2351	0,2282	0,2377	0,2337	0,004910	2,101
3,0	0,2534	0,2484	0,2515	0,2511	0,002524	1,005
3,3	0,2797	0,2736	0,2789	0,2774	0,003315	1,195
3,6	0,2989	0,2919	0,3027	0,2978	0,005478	1,839

Las respuestas generadas por el equipo a diferentes concentraciones y en días distintos demuestran la reproducibilidad, ya que ambas se encuentran dentro del criterio de aceptación ( $CV \leq 5\%$ ). En la tabla 13 se presenta los datos obtenidos del estándar de Ca. Con los resultados anteriores se confirmó que el equipo se encuentra en buenas condiciones, y por ende, es efectivo y reproducible con los resultados, además opera satisfactoriamente en el rango de trabajo para dicho ion.

### 7. 1.2 Características de desempeño del método analítico

De acuerdo con las características de desempeño para la determinación cuantitativa de un ingrediente activo descrita en la USP 39, se evaluaron características específicas tales como la exactitud, precisión, especificidad, linealidad e intervalo; cada uno de los resultados obtenidos se muestra a continuación:



### 7.1.2.1 Linealidad

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilice un mínimo de cinco concentraciones en un intervalo de 80%- 120% para la valoración de un fármaco. A partir de esto se prepararon tres curvas de calibración de placebo enriquecidos con los principios activos, cada una en el intervalo de trabajo descrito anteriormente.

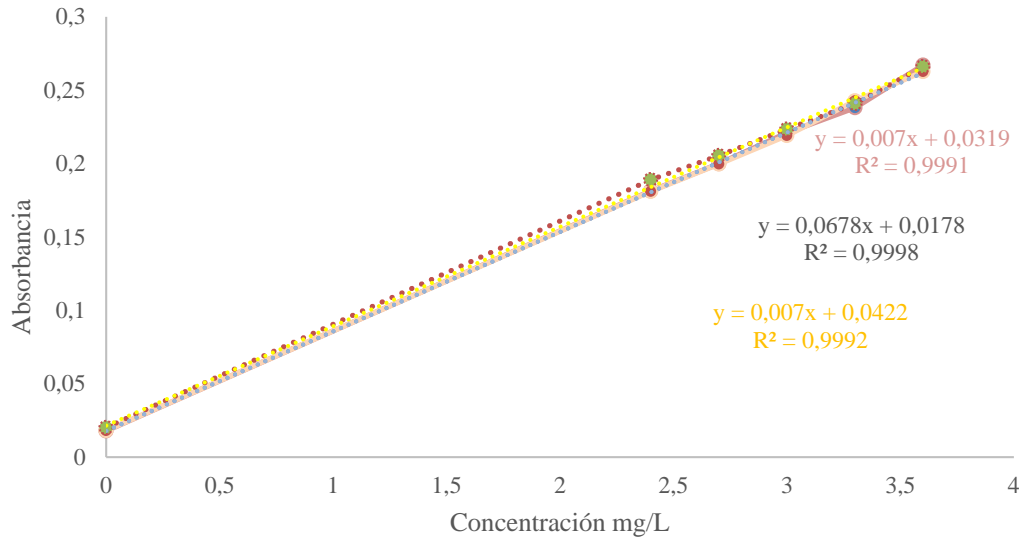
- **Curva de calibración**

Establecido el rango de trabajo, se construyeron tres curvas de calibración de 2,4 a 3,6 mg/L de Ca. Se comprobó que los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para las curvas de calibración no son menores al 0.995 según los criterios establecidos. Con los puntos promedios para cada nivel de concentración de las cuatro curvas, se construyó la curva de calibración del método y con base en ésta se efectuó el análisis de linealidad. Los datos obtenidos para las curvas de calibración se presentan en la tabla 14 y gráfica 1.

**Tabla 14.** Curva de calibración ion Ca

Curva	Concentración mg/L	Absorbancia
1	0	0,0178
	2,4	0,1814
	2,7	0,1999
	3	0,221
	3,3	0,2381
	3,6	0,2671
2	0	0,0181
	2,4	0,1811
	2,7	0,1997
	3	0,2191
	3,3	0,2428
	3,6	0,2627
3	0	0,0201
	2,4	0,1890
	2,7	0,2055
	3	0,2235
	3,3	0,2409
	3,6	0,2661

**Gráfica 1.** Curva de calibración ion Ca

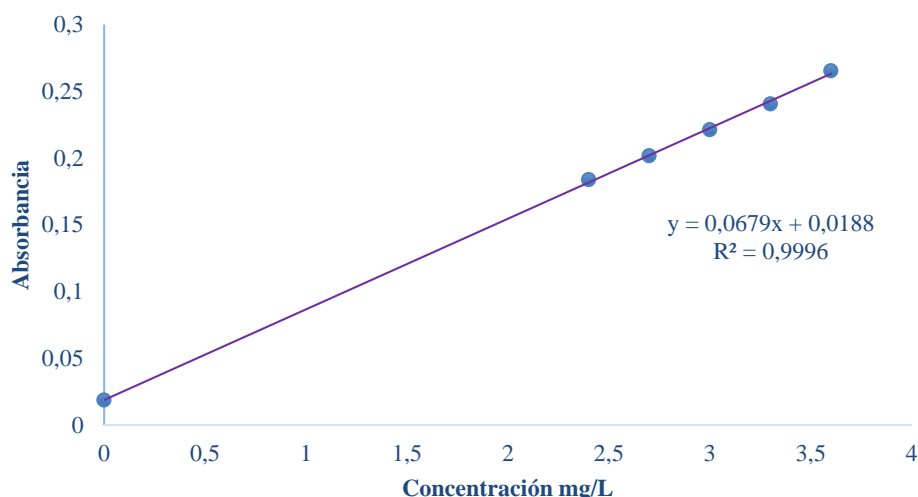


Las tres curvas de calibración presentadas en la gráfica 1 obedecen a la Ley de Lambert Beer y presentan coeficientes de correlación mayores a 0.995, cumpliendo el criterio de validación propuesto por la USP.

Con la curva de calibración promedio del método (gráfica 1) se determinó los valores por mínimos cuadrados del intercepto (a), la pendiente (m), el coeficiente de regresión lineal (r) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Además, fue realizada una evaluación estadística (prueba de significancia) de t-Student como un indicador del modelo lineal, se calculó un valor de  $t_r$  con  $n - 2$  grados de libertad (ecuación 16) y fue comparado con un valor  $t$  tabulado para un nivel de confianza requerido ( $\alpha = 0,05$ ) del 95%. En el test se probó si existe una correlación significativa entre X e Y mediante hipótesis, de la siguiente forma: la hipótesis nula  $H_0$  es que no existe correlación entre X e Y. Al ser el valor de  $t_r$  calculado (89.4247) significativamente mayor que  $t_{tabla}$  (2,78) se rechazó la hipótesis nula  $H_0$  y por tanto se confirma la correlación lineal. En la tabla 15 se reportan los resultados obtenidos.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (16)$$

**Gráfica 2.** Curva de calibración promedio ion Ca



**Tabla 15.** Resultados de la linealidad de la curva del método para la determinación de Ca

Puntos	Conc mg/L	Abs Y1	Abs Y2	Abs Y3	Abs Y	Desviación estándar S	CV%	Varianza S <sup>2</sup>
1	0	0,0178	0,01810	0,02010	0,01866	0,001250	6,6982	0,000002
2	2,4	0,1814	0,1811	0,189	0,1838	0,004477	2,4353	0,000020
3	2,7	0,1999	0,1997	0,2055	0,2017	0,003292	1,6323	0,000011
4	3,0	0,2210	0,2191	0,2235	0,2212	0,002206	0,9976	0,000005
5	3,3	0,2381	0,2428	0,2409	0,2406	0,002364	0,9826	0,000006
6	3,6	0,2671	0,2627	0,2661	0,2653	0,002306	0,8693	0,000005
Modelo regresión lineal $y=mx+b$								
Parámetro	Resultado					Estadístico T		
Intercepto	0,01885					89,42		
Pendiente	0,06788							
Coefficiente de correlación	0,9997							
Coefficiente de determinación	0,9995							

• **Evaluación de la recta**

En la prueba de proporcionalidad para la determinación de los límites de confianza de la pendiente y el intercepto de la curva de calibración para el ion magnesio, se calcularon las diferencias de cada concentración y absorbancia con el punto medio de la curva ( $x_i - \bar{x}$ ;  $y_i - \bar{y}$ ) y sus respectivos cuadrados  $(x_i - \bar{x})^2$ ,  $(y_i - \bar{y})^2$ , así como los residuos de la absorbancia  $[y_i - \hat{y}]$  y su cuadrado  $(y_i - \hat{y})^2$ . Los resultados de los cálculos se pueden observar en la tabla 16.

Se calculó el estadístico  $S_y/x$ , mediante la ecuación 17, que estima los errores aleatorios de  $y$  o la desviación estándar de la recta. En la ecuación se utilizó los residuos de la absorbancia  $(y_i - \hat{y})^2$  donde  $\hat{y}$  son los puntos sobre la recta interpolando los valores de  $x$ . Con el valor del estadístico  $S_y/x$  se determinó la desviación de la pendiente  $S_b$  (ecuación 18) y del intercepto  $S_a$  (ecuación 19).

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (17)$$

**Tabla 16.** Cálculos para la determinación de la desviación estándar y los límites de confianza para la pendiente e intercepto de la curva de calibración.

Puntos	Xi	Yi	Xi <sup>2</sup>	Xi - X̄	(Xi - X̄) <sup>2</sup>	(Yi - Ȳ)	(Yi - Ȳ) <sup>2</sup>	Ŷi	Yi - Ŷi	(Yi - Ŷi) <sup>2</sup>
1	0	0,01866	0	-2,5	6,25	-0,1698	0,02886	0,01884	-0,0001809	3,274E-08
2	2,4	0,1838	576	-0,1	0,01	-0,004716	2,224E-05	0,18176	0,002071	4,290E-06
3	2,7	0,2017	729	0,2	0,04	0,01315	0,0001729	0,2021	0,0004261	1,8168E-07
4	3,0	0,2212	900	0,5	0,25	0,03265	0,001066	0,2224	0,02180	0,0004756
5	3,3	0,2406	1089	0,8	0,64	0,05205	0,002709	0,2428	0,002254	5,083E-06
6	3,6	0,2653	1296	1,1	1,21	0,07675	0,005890	0,2632	0,002080	4,3306E-06

Para demostrar que existe una pendiente y un intercepto significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t Student, para esto se utilizaron los valores de t para el grupo de datos (puntos de la curva). Como la curva construida cuenta con 6 puntos, quiere decir que el valor t para (n-2) es 4 grados de libertad y un nivel de confianza del 95% es 2,78.

$$S_b = \frac{S_{x/y}}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2}} \quad (18)$$

$$S_a = S_{x/y} \sqrt{\frac{\sum (X_i)^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}} \quad (19)$$

$$T_{\text{exp } b} = \frac{|b|}{S_b} \quad (20)$$

$$T_{\text{exp } a} = \frac{|a|}{S_a} \quad (21)$$

Los límites de confianza para la pendiente se calcularon según la ecuación 23, y para el intercepto de determinó como se establece en la ecuación 22. Ambos valores se tabularon en la tabla 16.

$$IC_m = m \pm t * S_m \quad (22)$$

$$IC_a = a \pm t * S_a \quad (23)$$

**Tabla 17.** Análisis estadístico para el intercepto y la pendiente

Análisis estadístico	Resultado
Sx/y	0,01106
Sa	0,01883
Sb	0,0006810
T <sub>exp a</sub>	1,001
T <sub>exp b</sub>	99,68
LCa	0,01885 ± 0,005234
LCb	0,006788 ± 0,001893

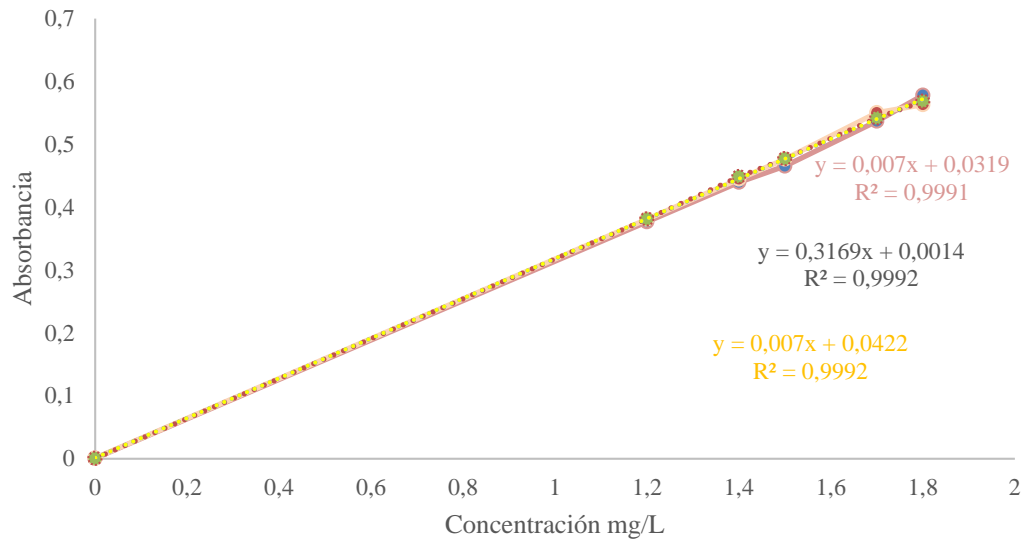
Se determinó con una confiabilidad del 95% que el intercepto “a” no es estadísticamente diferente de cero, teniendo en cuenta el siguiente criterio de aceptación, Si T<sub>exp</sub> es menor que T<sub>Tabla</sub>, existe una correlación lineal significativa. Al ser el valor de T<sub>exp</sub> (1,001) significativamente menor que t<sub>tabla</sub> (2,78) se comprueba el cumplimiento de dicho criterio.

Así mismo, se realizó el test estadístico para la pendiente “b” mediante una prueba de hipótesis, de la siguiente forma: la hipótesis nula H<sub>0</sub> es que b=0. Al ser el valor de T<sub>exp</sub> (99,68) significativamente mayor que t<sub>tabla</sub> (2,78) existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

**Tabla 18.** Curva de calibración ion Mg

Curva	Concentración mg/L	Absorbancia
1	0	0,0008
	1,2	0,3768
	1,4	0,4398
	1,5	0,4654
	1,7	0,5370
	1,8	0,5782
2	0	0,0012
	1,2	0,3810
	1,4	0,4448
	1,5	0,4765
	1,7	0,5503
	1,8	0,563
3	0	0,0006
	1,2	0,3813
	1,4	0,4487
	1,5	0,4770
	1,7	0,5419
	1,8	0,5685

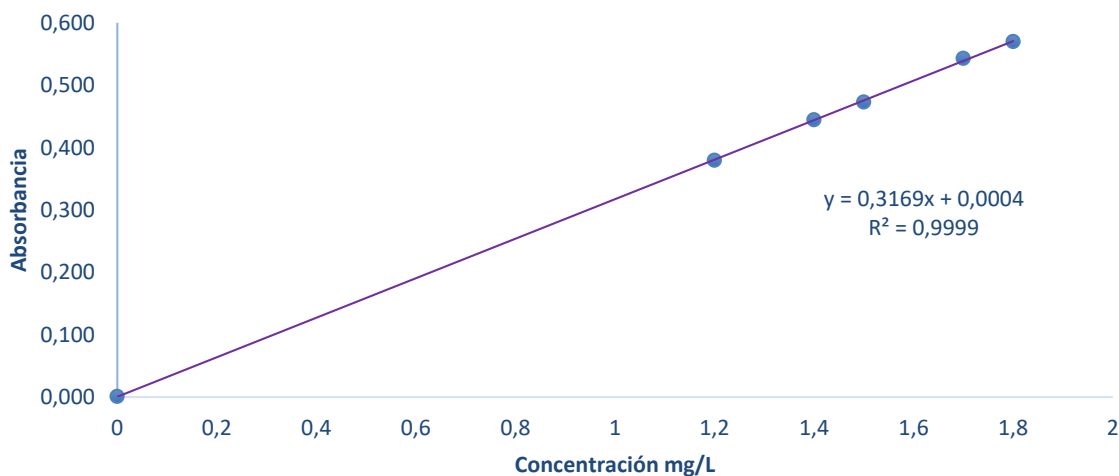
**Grafica 3.** Curva calibración ion Mg



Los resultados obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (absorbancia) a partir del uso de la variable concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 1,2 mg/L a 1,8 mg/L, se satisfacen las condiciones de linealidad del método analítico, ya que, se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal ( $r$ ) mayor que 0,995 propuesto por la USP.

Con la curva de calibración promedio del método (gráfica 4) se determinó los valores por mínimos cuadrados del intercepto ( $a$ ), la pendiente ( $m$ ), el coeficiente de regresión lineal ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Además, fue realizada una evaluación estadística (prueba de significancia) de t-Student como un indicador del modelo lineal, se calculó un valor de  $t_r$  con  $n - 2$  grados de libertad (ecuación 16) y fue comparado con un valor  $t$  tabulado para un nivel de confianza requerido ( $\alpha = 0,05$ ) del 95%. En el test se probó si existe una correlación significativa entre X e Y mediante hipótesis, de la siguiente forma: la hipótesis nula  $H_0$  es que no existe correlación entre dichas variables. Al ser el valor de  $t_r$  calculado (184,55) significativamente mayor que  $t_{tabla}$  (2,78) se rechazó la hipótesis nula  $H_0$  y por tanto se confirma la correlación lineal. En la tabla 19 se reportan los resultados obtenidos.

**Gráfica 4.** Curva de calibración promedio ion Mg



**Tabla 19.** Resultados de la linealidad de la curva del método para la determinación de Mg

Puntos	Conc (mg/L)	Abs Y1	Abs Y2	Abs Y3	Abs Y	Desviación estándar S	CV%	Varianza S <sup>2</sup>
1	0,0	0,0008	0,0012	0,0006	0,0008666	0,000306	35,25	0,000000
2	1,2	0,3768	0,381	0,3813	0,3797	0,002516	0,6626	0,000006
3	1,4	0,4398	0,4448	0,4487	0,4444	0,004461	1,003	0,000020
4	1,5	0,4654	0,4765	0,477	0,4730	0,006557	1,386	0,000043
5	1,7	0,537	0,5503	0,5419	0,5431	0,006726	1,238	0,000045
6	1,8	0,5782	0,563	0,5685	0,5699	0,007696	1,350	0,000059
Modelo regresión lineal $y=mx+b$								
Parámetro	Resultado					Estadístico T		
Intercepto	0,0003627					184,6		
Pendiente	0,3169							
Coefficiente de correlación	0,9999							
Coefficiente de determinación	0,9998							

• **Evaluación de la recta**

En la prueba de proporcionalidad para la determinación de los límites de confianza de la pendiente y el intercepto de la curva de calibración para el ion magnesio, se calcularon las diferencias de cada concentración y absorbancia con el punto medio de la curva ( $x_i - \bar{x}$ ;  $y_i - \bar{y}$ ) y sus respectivos cuadrados  $(x_i - \bar{x})^2$ ,  $(y_i - \bar{y})^2$ , así como los residuos de la absorbancia  $[y_i - \hat{y}]$  y su cuadrado  $(y_i - \hat{y})^2$ . Los resultados de los cálculos se pueden observar en la tabla 20.

Se calculó el estadístico  $S_y/x$ , mediante la ecuación 17, que estima los errores aleatorios de y o la desviación estándar de la recta. En la ecuación se utilizó los residuos de la absorbancia  $(y_i - \hat{y})^2$  donde  $\hat{y}$  son los puntos sobre la recta interpolando los valores de x. Con el valor del estadístico  $S_y/x$  se determinó la desviación de la pendiente  $S_b$  (ecuación 18) y del intercepto  $S_a$  (ecuación 19).

**Tabla 20.** Cálculos para la determinación de la desviación estándar y los límites de confianza para la pendiente e intercepto de la curva de calibración.

Puntos	$X_i$	$Y_i$	$X_i^2$	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$(Y_i - \bar{Y})$	$(Y_i - \bar{Y})^2$	$\hat{Y}_i$	$ Y_i - \hat{Y}_i $	$(Y_i - \hat{Y}_i)^2$
1	0	0,0008667	0	-1,2666	1,6044	-0,4009	0,1607	0,0003627	0,000504	2,5393E-07
2	1,2	0,3797	1,44	-0,06666	0,004444	-0,02212	0,0004894	0,3806	0,1783	0,03182
3	1,4	0,4444	1,96	0,1333	0,01777	0,04261	0,001815	0,4440	0,2204	0,04861
4	1,5	0,4730	2,25	0,2333	0,05444	0,071144	0,005061	0,4757	0,2314	0,05358
5	1,7	0,5431	2,89	0,4333	0,1877	0,1412	0,01995	0,5391	0,2734	0,07478
6	1,8	0,5699	3,24	0,5333	0,28444	0,1680	0,02825	0,5708	0,2847	0,08108

Para estimar los límites de confianza de la pendiente y el intercepto se utilizaron los valores de t para el grupo de datos (puntos de la curva). Como la curva construida cuenta con 6 puntos, quiere decir que el valor t para (n-2) es 4 grados de libertad y un nivel de confianza del 95% es 2,78. Los límites de confianza para la pendiente se calcularon según la ecuación 20, y para el intercepto se determinó como se establece en la ecuación 21. Ambos valores se tabularon en la tabla 21.

**Tabla 21.** Análisis estadístico para el intercepto y la pendiente

Análisis estadístico	Resultado
$S_{x/y}$	0,2692
$S_a$	0,002406
$S_b$	0,001717
$T_{exp} a$	0,1507
$T_{exp} b$	184,6
Lca	$0,0003627 \pm 0,006688$
Lcb	$0,3169 \pm 0,004773$

Se determinó con una confiabilidad del 95% que el intercepto “a” no es estadísticamente diferente de cero”, teniendo en cuenta el siguiente criterio de aceptación, Si  $T_{exp}$  es menor que  $T_{tabla}$ , existe una correlación lineal significativa. Al ser el valor de  $T_{exp}$  (0,1507) significativamente menor que  $t_{tabla}$  (2,78) se comprueba el cumplimiento de dicho criterio.

Así mismo, se realizó el test estadístico para la pendiente “b” mediante una prueba de hipótesis, de la siguiente forma: la hipótesis nula  $H_0$  es que  $b=0$ . Al ser el valor de  $T_{exp}$  (184,6) significativamente mayor que  $t_{tabla}$  (2,78) existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

### 7.1.2.2 Exactitud

Para determinar la exactitud del método se prepararon soluciones de placebos al 95%, 100%, 105 % con la cantidad del ingrediente activo correspondiente para su determinación. Para cada porcentaje se determinó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación. Los datos obtenidos para los iones Ca y Mg se observan en la tabla 22 y 23 respectivamente.



**Tabla 22.** Exactitud del método para la determinación de Ca

Exactitud						
Adición	95%		100%		105%	
	Concentración (ppm)	%Recuperación	Concentración (ppm)	%Recuperación	Concentración (ppm)	%Recuperación
Resultados análisis	2,863	95,45	3,014	100,5	3,098	103,3
	2,871	95,71	2,998	99,92	3,108	103,6
	2,900	96,68	2,992	99,74	3,143	104,8
N° datos	3		3		3	
Promedio	95,95		100,0		103,9	
Desviación estándar	0,6483		0,3739		0,7850	
% Coeficiente de variación	0,6756		0,3738		0,7557	
%Recuperación	101,0		100,0		98,93	

Los resultados de la tabla 22 permiten afirmar que el método es exacto porque se obtuvieron porcentajes de recuperación dentro del rango establecido para cada principio activo (%R= 95-105%). Así, para tres concentraciones diferentes del estándar de calcio (95%, 100%, 105%) se obtuvo un porcentaje de recuperación de 101,0%, 100,0% y 98,93% para cada nivel de concentración.

**Tabla 23.** Exactitud del método para la determinación de Mg

Exactitud						
Adición	95%		100%		105%	
	%Recuperación	Concentración (ppm)	%Recuperación	Concentración (ppm)	%Recuperación	Concentración (ppm)
Resultados análisis	96,00	1,440	100,42	1,5063	106,24	1,5936
	95,63	1,434	100,35	1,5052	105,72	1,5858
	96,33	1,445	101,37	1,5206	106,273	1,5941
N° datos	3		3		3	
Promedio	95,99		100,7		106,0	
Desviación estándar	0,3535		0,5728		0,3103	
% Coeficiente de variación	0,3683		0,5687		0,2925	
%Recuperación	101,0		100,7		101,0	

Los resultados de la tabla 23 permiten afirmar que el método es exacto porque se obtuvieron porcentajes de recuperación dentro del rango establecido para cada principio activo (%R= 95-105%). Así, para tres concentraciones diferentes del estándar de magnesio (95%, 100%, 105%) se obtuvo un porcentaje de recuperación de 101,0%, 100,7% y 101,0% para cada nivel de concentración.

### 7.1.2.3. Precisión

Para determinar la precisión del método analítico se evaluaron seis soluciones de muestra preparadas de manera independiente al 100% de la concentración de prueba. Los datos obtenidos se muestran a continuación:

### Precisión del método: Repetibilidad

**Tabla 24.** Precisión del método para la determinación de ion Ca

Precisión del método			
Solución	Absorbancia	Concentración (ppm)	% Recuperación
1	0,2196	2,994	99,79
2	0,2204	3,007	100,2
3	0,2175	2,962	98,75
4	0,224	3,059	102,0
5	0,2157	3,025	100,8
6	0,2216	2,948	98,26
Nº Datos		6	
$\bar{X}$		99,97	
S		1,364	
% CV		1,365	

El método analítico para la determinación de ion Ca cumple con el criterio de aceptación correspondiente, puesto que para el nivel de concentración al 100% del principio activo de seis muestras, se obtuvo una desviación estándar (S) de 1,364 y el coeficiente de variación (CV)= 1,365 %, siendo inferior al criterio de aceptabilidad propuesto por la USP 39 ( $CV \leq 5\%$ ).

**Tabla 25.** Precisión del método para la determinación de ion Mg

Precisión del método			
Solución	Absorbancia	Concentración (ppm)	% Recuperación
1	0,4791	1,513	100,8
2	0,4730	1,4931	99,54
3	0,4777	1,5082	100,5
4	0,4671	1,4746	98,31
5	0,4756	1,5016	100,1
6	0,4830	1,5251	101,7
Nº Datos		6	
$\bar{X}$		100,2	
S		1,160	
%CV		1,158	

El método analítico para la determinación de ion Mg cumple con el criterio de aceptación correspondiente, puesto que para el nivel de concentración al 100% del principio activo de seis muestras, se obtuvo una desviación estándar (S) de 1,160 y el coeficiente de variación (CV)= 1,158 %, siendo inferior al criterio de aceptabilidad propuesto por la USP 39 ( $CV \leq 5\%$ ).

### Precisión del método: Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia se evaluaron seis soluciones de muestra preparadas de manera independiente al 100% de la concentración de prueba, bajo las siguientes variables: análisis en días diferentes y con un diferente analista. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

**Tabla 26.** Precisión intermedia del método para la determinación ion Ca

Precisión del método			
Solución	Absorbancia	Concentración (ppm)	% Recuperación
1	0,2196	2,994	99,79
2	0,2204	3,007	100,2
3	0,2175	2,962	98,75
4	0,224	3,059	102,0
5	0,2157	3,025	100,8
6	0,2216	2,948	98,26
7	0,2044	2,960	98,68
8	0,2052	2,973	99,10
9	0,2077	3,010	100,3
10	0,205	2,970	98,99
11	0,2046	2,964	98,78
12	0,2044	2,962	98,72
13	0,2165	2,948	98,26
14	0,2169	2,953	98,44
15	0,216	2,940	98,00
16	0,2151	2,927	97,58
17	0,2227	3,041	101,4
18	0,2158	2,938	97,93
<b>N° Datos</b>		18	
<b><math>\bar{X}</math></b>		99,22	
<b>S</b>		1,253	
<b>% CV</b>		1,262	

Los resultados obtenidos demuestran que el método es preciso, independientemente del día en que se realice el análisis y de la experiencia del analista que lo ejecute; porque se obtuvo un coeficiente de variación total para el principio activo %CV=1,262, dicha desviación es menor a la propuesta por la USP 39 ( $CV \leq 8\%$ ).

**Tabla 27.** Precisión intermedia para la determinación de ion Mg

<b>Precisión del método</b>			
<b>Solución</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración</b>	<b>% Recuperación</b>
1	0,4791	1,513	100,8
2	0,4730	1,493	99,54
3	0,4777	1,508	100,6
4	0,4671	1,475	98,30
5	0,4756	1,502	100,2
6	0,4830	1,525	101,7
7	0,4606	1,489	99,24
8	0,4651	1,503	100,2
9	0,4562	1,475	98,31
10	0,4626	1,495	99,68
11	0,4622	1,494	99,59
12	0,4661	1,506	100,4
13	0,4702	1,484	98,95
14	0,4738	1,496	99,71
15	0,4871	1,538	102,5
16	0,4743	1,497	99,82
17	0,4828	1,524	101,6
18	0,4716	1,489	99,26
<b>N° Datos</b>		18	
<b><math>\bar{X}</math></b>		100,0	
<b>S</b>		1,126	
<b>% CV</b>		1,126	


Los resultados demuestran que el método es preciso, independientemente del día en que se realice el análisis y de la experiencia del analista que lo ejecute; porque se obtuvo un coeficiente de variación total para el principio activo %CV=1,126, dicha desviación es menor a la propuesta por la USP 39 (CV≤ 8%).

#### **7.1.2.4 Especificidad**

Los resultados en la evaluación de la especificidad pueden demostrarse mediante el cumplimiento del requisito de la exactitud, así dichos resultados para la determinación de ion calcio (Tabla 21) y el ion magnesio (Tabla 22) permiten afirmar que el método es específico para cada principio activo, Por lo tanto, puede emplearse para la valoración del producto Sukes AP 35x Ref. 205.

### 7.1.3 Técnica de Control de Calidad para el Producto Sukes AP35X

Se elaboró el instructivo para realizar las pruebas de control de calidad correspondientes para el producto Sukes AP35X Ref 205. El esquema del instructivo realizado se muestra a continuación:

	TC-PT-015	Página 45 de 49
	SUKSES AP 35X REF.205	Fecha de Emisión:07-02-14
		Fecha de Versión:23-01-18
Versión: 2		
<p><b>1. Descripción</b></p> <p><b>1.1. Aspecto</b></p> <p><b>1.2. Identificación</b></p> <p><b>1.3. Reconstitución</b></p> <p><b>1.4. pH de reconstitución</b></p> <p><b>1.5. Conductividad de reconstitución</b></p> <p><b>1.6. Densidad</b></p> <p><b>1.7. Cuantificación</b></p> <p><b>1.7.1 Cloruros totales por volumetría</b></p> <p><b>1.7.2 Método de valoración de dextrosa por polarimetría</b></p> <p><b>1.7.3 Determinación de ácido acético</b></p> <p><b>1.7.4 Iones</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Valoración sodio</li><li>• Valoración potasio</li><li>• Valoración calcio</li><li>• Valoración magnesio</li></ul> <p><b>1.7.4.1 Mezclas de electrolitos Sukes Ap 35x Ref 205</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Potasio</li><li>• Calcio</li><li>• Magnesio</li></ul> <p><b>1.8 Endotoxinas bacterianas</b></p> <p><b>2. Documentos referentes</b></p>		

## 8. CONCLUSIONES

1. Se logró desarrollar el método analítico propuesto para la determinación de los iones calcio y magnesio en el concentrado ácido Sukes AP 35x Ref. 205, utilizando una longitud de onda de 422.7 nm y 285 nm, el ángulo del quemador de 180° y 20° respectivamente, una rendija de 9,5 nm y una relación de llama aire-acetileno.
2. El método para la determinación de calcio es lineal en el intervalo de concentración del 80% hasta el 120%, obteniendo un coeficiente de correlación (r) 0,9997 y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) 0,9995. Para la determinación de magnesio se obtuvo un coeficiente de correlación (r) 0,9999 y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) 0,9998. Además el intervalo de la pendiente y del intercepto para ambos iones. Además el intervalo de la pendiente y del intercepto demostraron una correlación lineal significativa.
3. El método para la determinación de calcio y magnesio es exacto pues se obtuvieron porcentajes de recuperación dentro del rango establecido (%R= 95-105%), con un coeficiente de variación ( $CV \leq 5\%$ ).
4. El método para la determinación de calcio y magnesio es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas de repetibilidad realizadas al 100% de la concentración permite obtener resultados repetitivos, obteniendo coeficientes de variación ( $CV \leq 5\%$ ), además el método es reproducible pues en los resultados de precisión intermedia el coeficiente de variación ( $CV \leq 8\%$ ).
5. El método desarrollado es específico ya que no se detectó interferencias con la matriz.
6. Se elaboró el instructivo TC-PT-015 que contempla las pruebas de control de calidad para el producto Sukes AP 35x Ref. 205, el cual se incluyó dentro del Sistema de Gestión de Calidad de la empresa Renal Medical Marketing Ltda.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ribes, Enrique Andrés. Fisiopatología de la insuficiencia renal crónica. 1, Barcelona : s.n., 2004, Anales de Cirugía Cardíaca y Vasculat , Vol. 10, págs. 8-76.
2. Carracedo, Ana Gómez y Muñana, Estefanía Arias. Insuficiencia renal crónica. págs. 637-646.
3. Lopera-Medina, Mónica María. La enfermedad renal crónica en Colombia: necesidades en salud y respuesta del Sistema General de Seguridad Social en Salud. 30, 2016, Revista Gerencia y Políticas de Salud, Vol. 15, págs. 212-233.
4. Piaskowski, pat. Hemodiálisis y diálisis peritoneal. Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC, 2011, p. 289.1.
5. Portillo, Mariano Rodríguez; RAMÓN, Marta Albalate; DE SEQUERA ORTIZ, Patricia. Trastornos del calcio, el fósforo y el magnesio. Nefrología, 2012, vol. 6, no 1, p. 0.
6. Perez-Oliva Díaz, J. F., et al. Guías de buenas prácticas en hemodiálisis. La Habana: Instituto Nacional de Nefrología, 2003, p. 11-4.
7. Pérez-García, Rafael, et al. Guía de gestión de calidad del líquido de diálisis (LD)(segunda edición, 2015). nefrología, 2016, vol. 36, no 3, p. e1-e52.
8. Skorecki K, G. J. Chronic Renal Failure. En K. D. Fauci AS, Harrison´s Principles of internal medicine. s.l. : McGraw-Hill., 2001. págs. 1551-1562.
9. K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. 2002. págs. 1-266.
10. Estrada, Dra. Aida Venado y López, Dr. José Andrés Moreno. Insuficiencia renal crónica. México : Universidad nacional autónoma de México.
11. NIDDK. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Métodos de tratamiento para la insuficiencia renal.
12. Análisis e investigación del principio y funcionamiento de la máquina de diálisis. [Citado el 23 Julio de 2017] Disponible en <http://www.dalcame.com/wdescarga/dialisis.pdf>
13. Espectroscopia de absorción atómica. [citado el 23 de julio de 2017] disponible: [http://www.ancap.com.uy/docs\\_concursos/archivos/2%20llamados%20finalizados/2011/ref%2022\\_2011%20tecnico%20laboratorio%20lubricantes/material%20de%20estudio/espectrometria.pdf](http://www.ancap.com.uy/docs_concursos/archivos/2%20llamados%20finalizados/2011/ref%2022_2011%20tecnico%20laboratorio%20lubricantes/material%20de%20estudio/espectrometria.pdf).
14. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. [Citado el 30 Julio 2017] Disponible en: [http://www1.lasalle.edu/~prushan/Instrumental%20Analysis\\_files/AA-Perkin%20Elmer%20guide%20to%20all!.pdf](http://www1.lasalle.edu/~prushan/Instrumental%20Analysis_files/AA-Perkin%20Elmer%20guide%20to%20all!.pdf)
15. Méndez Alvarez, Juana Monserrath; GUAMBAÑA, Gordillo; GOVANNY, Burgos. Validación del método para la determinación de plomo y cadmio por espectrofotometría de absorción atómica para el centro de servicio de análisis de minerales Cesemin. 2008. Tesis de Licenciatura.
16. Vascones, M. Validación del método de espectrofotometría de absorción Atómica electrotermica para la determinación de cobre y Vanadio en aguas limpias y residuales. Universidad central del Ecuador, Facultad deficiencias químicas, 2012.
17. Douglas, Skoog; Stanley, Crouch; James, Hooler. Principios de análisis instrumental. Cengage learning/Thompson Internacional, 2008.
18. USP, US Pharmacopeia. 38, NF 29. En The United States pharmacopeia and the National formulary. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. 2011. p. 700-702.

19. SOSA, Iván Arenas; SÁNCHEZ, José Luis López. Instituto de Biotecnología.
20. Adaptado de: ¿Qué es una onda electromagnética?. [Citado 10 Enero 2018] Disponible en: <https://curiosoando.com/que-es-una-onda-electromagnetica>.
21. DÍAZ, Alfonso Clavijo. Fundamentos de química analítica: equilibrio iónico y análisis químico. Univ. Nacional de Colombia, 2002.
22. MORANTE GARCÍA, Gonzalo, et al. Identificación de gases de interés ambiental en estado plasma por espectroscopia. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.
23. Hernández LH, Pérez CG. Introducción al análisis instrumental. ilustrada ed. Ciencia A, editor. Barcelona, España: Ariel; 2002. 15-71 p.
24. Atomic Absorption Spectroscopy. [Citado 11 de Febrero 2018]. Disponible en: <https://lincolnparkhs.org/ourpages/auto/2010/9/26/37121222/Chapter%2006%20-%20Atomic%20Absorption%20Spectroscopy.pdf>
25. SALVAT, JOSE OBIOLS. Espectrofotometría de absorción atómica, su aplicación en la industria del vidrio.
26. Espectrofotometría. Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas [Citado 18 Febrero 2018] Disponible en: <http://adela9613.blogspot.com.co/2015/04/espectrofotometria-de-absorcion.html>
27. Brunatti C. Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano. [Citado 11 de Febrero 2018]. Disponible en: <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>
28. Serrano M. DEL TERRENO, Y.; QUÍMICO, MÉTODOS DE ANÁLISIS; ABSORCIÓN, ELECTROMAGNÉTICO.
29. Desviaciones de la ley de Bourguer Lmabert Beer. [Citado 24 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.academia.edu/8735370/Espectrofotometr%C3%ADa>
30. González Pérez C. Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible. [Citado 24 Febrero 2018]. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf)
31. Fuentes. A. Ley de Lambert Beer. 2008.
32. ROCHA Castro E.; PRINCIPIOS BÁSICOS DE ESP'ECTROSCOPÍA; Editorial UCh, México (2000), pág 123-203.
33. Espectrometria de absorção atômica. [Citado 03 Marzo 2018]. Disponible en: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAboMAF/relatorio-espectrometria-absorcao-atomica?part=2#>
34. Espectroscopía de absorción atómica. [Citado 04 Marzo 2018]. Disponible en: <http://fcq.uach.mx/index.php/docencia/columna-2/material.../15-analisis-instrumental?>
35. Espectroscopía atómica. [Citado 04 Marzo 2018]. Disponible en: [www.ugr.es/~clinares/webexp/fundamentos/espectroscopia%20atomica.doc](http://www.ugr.es/~clinares/webexp/fundamentos/espectroscopia%20atomica.doc)
36. Espectroscopía de absorción atómica. [Citado 04 Marzo 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S04.htm>.
37. Espectroscopía de absorción atómica. [Citado 04 Marzo 2018]. Disponible en: <http://absorcion-atomica.blogspot.com.co/2009/07/componentes-de-un-espectrometro-de.html>



- 38.** Díaz de Armas M, Hernández Oramas I, Martínez de Santelices Cuervo M, Licea Tornés MV, Gómez Bañobre L, Louro González G, et al. Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Revista Cubana de Farmacia*. 1998;32:106-12.
- 39.** Londoño Posso, Diana Maria. Validación del método de determinación de calcio y magnesio por espectroscopia de absorción atómica de llama para el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la universidad tecnológica de pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Química Industrial, 2013.
- 40.** CASTILLO, A.; GONZÁLEZ, H. Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Fármacos.[Artículo de Revisión]. *Revista Cubana de Farmacia*. [Revista en línea]. ISSN, p. 1561-2988.
- 41.** ROBLEDO, M. Validación de la Metodología para el Análisis de los Metales Cadmio y Plomo en Agua Tratada por Absorción Atómica con Horno de Grafito. Bogotá, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira, 2012.
- 42.** SAMANIEGO JOAQUÍN, Jhonnell; ARIAS ARROYO, Gladys. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en tabletas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2016, vol. 82, no 2, p. 196-207.
- 43.** MARTÍNEZ ÁLVAREZ, Luis Octavio, et al. Validación del método analítico para tabletas de dicloroisocianurato de sodio para desinfección de agua potable. *Revista Cubana de Farmacia*, 2014, vol. 48, no 2, p. 191-198.