

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**“Validación del Método de Cuantificación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL colesterol) en el área de Bioquímica, realizado en el Laboratorio Quintanilla S.R.L.”**

**INFORME DE INTERNADO EN LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS**

**PARA OPTAR EL:**

**TÍTULO**

**DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:**

***Br. RICHARD WIDMAR CÁCEDA VIZCONDE***

**ASESOR:**

***Mg. PEDRO ALVA PLASENCIA***

**TRUJILLO – PERÚ**  
**2007**

## **JURADO DICTAMINADOR**

**Mg. Segundo Roncal Saldaña** **Presidente**

**Mg. Roger Rengifo Penadillos** **Miembro**

**Mg. Pedro Alva Plasencia** **Miembro**

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

# *Dedicatorias*

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

*Gracias a Nuestro Señor, por toda la ayuda y bendición que nos brinda, por ser la luz que guía nuestras vidas, encamínándonos siempre hacia el logro de nuestras metas, por ser el amigo que siempre comprende y que nunca falla, por la satisfacción de ser profesional y sobre todo por la fortaleza necesaria para cumplir uno de nuestros objetivos más anhelados....*

*Ser Químico Farmacéutico*

*A mí mamá:*

*Betty Vizconde*

*Gracias por su amor, amistad,  
confianza, sacrificio, comprensión,  
apoyo, fortaleza y por ser la madre  
más maravillosa.*

*Te Amo Mamita.*

*A mí padre:*

*William Cáceda*

*Gracias por su amor, amistad, por la  
confianza depositada, por su esfuerzo,  
sacrificio, gracias "Ñato".*

*Con Amor*

*A mí hermano:*

*Pedro Nielsen*

*Cáceda Vizconde*

*Gracias por ser ese estímulo que  
me ha impulsado siempre a hacer  
las cosas bien, para que te sientas  
orgulloso de mí; esto va para tí mí  
loquito, ahora te toca a tí.*

*Te Quiero Mucho Loquito*

BIBLIOTECA

*A mis abuelitos.*

*Ofelia Villacorta  
Alejandrina Quiroz  
Roque Cáceda*

*Gracias siempre por todo  
su apoyo incondicional, por  
todo el cariño que siempre nos  
brindan a mí hermano y a  
mí.*

*Los Amo*

*A mis tíos:*

*Ing. Bertha Vizconde  
Mg. Mblgo. Julio Cáceda*

*Gracias por su ejemplo y por su  
apoyo y comprensión, recuerden que  
siempre los tengo presente y les estaré  
eternamente agradecido.*

*Gracias por Todo*

# *Agradecimientos*

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



*A Fernando:*

*Un gran amigo con el que se puede contar,  
gracias por contribuir y apoyar en la  
realización de este informe, muchas  
gracias con mucha sinceridad.*

JA

*A mí maestro asesor Mg. Pedro Alva  
Plasencia, gracias por la amistad, por su  
comprensión, paciencia, confianza, por el  
interés y el valioso apoyo brindado, sin  
vuestra ayuda jamás hubiera concluido  
satisfactoriamente este informe, muchas  
gracias.*

BIBLI

DE FARMA

*Al Mg. Segundo Roncal Saldaña y  
al Mg. Roger Rengifo Penadillos,  
gracias por su comprensión, por el  
interés y el apoyo brindado, sin  
vuestra ayuda jamás hubiera  
realizado y satisfactoriamente este  
informe muchas gracias.*

*A la Dra. Judith castro Guzmán  
Plasencia, gracias por la amistad, por su  
confianza, por el interés y el valioso  
apoyo brindado, sin vuestra ayuda jamás  
hubiera realizado y concluido  
satisfactoriamente este informe, muchas  
gracias.*

*A la Dr. Ángel Quintanilla Lora,  
gracias, por su confianza, por el  
interés y el valioso apoyo brindado,  
sin vuestra ayuda jamás hubiera  
realizado y concluido  
satisfactoriamente este informe,  
muchas gracias.*

*Al personal del Laboratorio  
Quintanilla S.R.L. por su apoyo  
brindado, por el ambiente cálido  
encontrado en la época de  
internado, siempre los recordaré,  
en especial a los del área de  
sistema, contabilidad,  
microbiología y los de mi área,  
muchas gracias por todo.*

*A todos:*

*Gracias a mis amigos,  
compañeros, profesores,  
familiares y demás personas  
quienes de alguna manera  
colaboraron para la*

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIQUIMICA

## CARTA DE COMPROMISO

Yo, **Pedro Alva Plasencia**, Profesor Asociada D.E. de la Sección de Bioquímica y Nutrición, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica con código UNT 5023, me comprometo a asesorar el informe de internado intitulado: **“Validación del Método de Cuantificación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) en el área de Bioquímica, que realizado en el Laboratorio Quintanilla S.R.L.”**, elaborado por el **Br. Richard Widmar Cáceda Vizconde**.

---

Richard Widmar Cáceda Vizconde  
DNI: 41642801

---

Mg. Pedro Alva Plasencia  
Profesora Asociada D.E.

# INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCION	01
MATERIAL Y METODO	06
RESULTADOS	19
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
ANEXOS	33

## **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue efectuar la Validación del Método de Cuantificación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) utilizado en el área de Bioquímica, del Laboratorio Quintanilla S.R.L. El trabajo se realizó como parte del cumplimiento de los requisitos establecidos en la norma ISO/IEC/NTC 17025 que el laboratorio está en proceso de implementar y cumplir para ser reconocido por su competencia técnica para ejecutar análisis clínicos de confiabilidad y de acuerdo a estándares internacionales. En el proceso de validación de cada una de los procedimientos se determinaron los valores para los test de: Linealidad, Precisión, Exactitud, Límite de Detección, Límite de Cuantificación y Robustez, utilizando estándar de colesterol de 100 mg/dL, 80 mg/dL, 60 mg/dL, 40 mg/dL y 20 mg/dL. En términos generales para los parámetros ensayados, se encontró que el método es lineal con un  $r = 0.999540$  y t Student para el test de linealidad =  $118.885093 > 2.16_{(13; 0.05)}$ , tiene precisión con una repetibilidad con un C.V. < 2 % (1.27 %), precisión intermedia con un C.V. < 2 % (1.65 %), se encontró un Límite de Detección de 0.880 mg/dL y un Límite de Cuantificación de 2.923 mg/dL, siendo el método también robusto con respecto a las variables de analistas y tiempos de refrigeración y centrifugado. En conclusión, se aportó y registró la evidencia necesaria para demostrar que los métodos validados cumplen los niveles de rendimiento establecidos por las políticas de calidad del laboratorio y aseguran que los métodos son adecuados para su aplicación en el análisis de HDL, bajo las condiciones particulares y requerimientos del laboratorio del Laboratorio Quintanilla S.R.L.

**Palabras claves:** *Validación, HDL, Linealidad, Precisión, Robustez, Detección, Cuantificación*

## ***ABSTRACT***

The objective of this work was to carry out the Validation of the Method of Quantification of High Lipoproteins Densidad (HDL) used in the area of Biochemistry, made in the Quintanilla Laboratory S.R.L. The work was made like part of the fulfillment of the established requirements in the norm ISO/IEC/NTC 17025 that the laboratory is in process to implement and to fulfill for being recognized by its technical competition to execute clinical analyses of trustworthiness and according to international standards. In the process of validation of each one of the procedures the values for the test were determined of: Linearity, Precision, Exactitude, Limit of Detection, Limit of Quantification and Robustness, utilizing cholesterol standard of 100 mg/dL, 80 mg/dL, 60 mg/dL, 40 mg/dL and 20 mg/dL. In general terms for the tried parameters, one was that the method is linear with a  $r = 0,999540$  and  $t$  Student for the linearity test =  $118,885093 > 2,16_{(13; 0.05)}$ , has precision with a repeatability with a C.V.  $< 2\%$  (1.27 %), intermediate precision with C.V.  $< 2\%$  (1.65 %), one was a Limit of Detection of 0,880 mg/dL and a Limit of Quantification of 2,923 mg/dL, the method is robust with respect to the variables of analysts and times of refrigeration and centrifuged. In conclusion, the evidence necessary was contributed and registered to demonstrate that the validated methods fulfill the levels of yield established by the policies of quality of the laboratory and assure that the methods are adapted for their application in the HDL analysis, under the particular conditions and requirements of the Laboratory Quintanilla S.R.L.

**Key words:** *Validation, HDL, Linearity, Precision, Robustness, Detection, Quantification*



# INTRODUCCIÓN

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Una característica que es común para los lípidos plasmáticos, como el colesterol, fosfolípidos y triglicéridos, es su insolubilidad en el agua, propiedad que los conduce a la necesidad de tener que asociarse con un tipo especial de proteínas denominadas apolipoproteínas o apoproteínas, para ser transportados en un medio eminentemente acuoso, como es el plasma. Las apolipoproteínas son compuestos que poseen una singular propiedad intrínseca que les permite interactuar en interfase, es decir, por una parte de la molécula interacciona con los lípidos y por la otra con la fase acuosa, esta propiedad se manifiesta debido a que termodinámicamente son más estables cuando se sitúan en la superficie de una partícula, lo cual es muy importante para estabilizar la lipoproteína <sup>(3)</sup>.

El interés sobre el estudio de las lipoproteínas se tornó creciente cuando a mediados de la década del 50, se describieron técnicas electroforéticas que permitieron separar de una manera relativamente sencilla las lipoproteínas del plasma, cuyos niveles se vinculó con algunas enfermedades cardiovasculares, al mismo tiempo se sugirió que los lípidos que circulaban en la sangre eran transportados por estas lipoproteínas. Las lipoproteínas no solamente se encargan de transportar los lípidos del organismo, sino que participan activamente en los procesos de regulación metabólica, debido a que las diversas apoproteínas que la conforman interaccionan con receptores celulares de una manera específica, vinculándolas de esta manera con las transformaciones metabólicas que ocurren a nivel intracelular <sup>(6)</sup>; el descubrimiento de los receptores de apolipoproteínas permitió abordar de una forma integral los procesos de regulación lipídica en el ser humano, y conforme decía el Dr. Bruce Campell “Cada apoproteína es una verdadera llave designada a abrir una puerta específica” <sup>(3)(6)</sup>.

La diferente composición y estructura de las lipoproteínas se deben fundamentalmente a su origen y a la naturaleza de las apolipoproteínas que la integran, éstas en cierto modo, son las responsables de la movilidad electroforética de las lipoproteínas y lo mas importante es que el tipo de transformación metabólica de cada una de ellas depende fundamentalmente de la clase de apolipoproteína, por cuyo motivo, una modificación en su composición puede ser la causa de un metabolismo anormal y por consiguiente de ciertas patologías <sup>(11)</sup>.

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas. Entre estas lipoproteínas se encuentra la lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoprotein); esta lipoproteína, tiene diversos orígenes

secretándose en el hígado e intestino como partículas discoidales denominadas genéricamente HDL colesterol nacientes. Estas están constituidas por las apolipoproteínas A, lecitinas y en menor porcentaje colesterol y triglicéridos. Las HDL colesterol nacientes se dirigen a tejidos extrahepáticos donde captan el colesterol libre que se dispone en su superficie, lugar en que se encuentran también moléculas de lecitina y las apolipoproteínas antes mencionadas. Existe una enzima circulante activada por la apo A-1 denominada lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), que tiene la propiedad de esterificar el colesterol con un ácido graso del carbono 2 de la lecitina, la que al perder dicho ácido graso queda convertida en lisolecitina condición en que abandona la HDL colesterol para posteriormente esterificarse con un ácido graso no saturado. La función principal de las lipoproteínas de alta densidad o HDL colesterol en el metabolismo lipídico es la captación y transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado en un proceso conocido como transporte reverso de colesterol (mecanismo cardioprotector) <sup>(3)</sup><sup>(11)</sup>.

El HDL colesterol bajo, está asociado con un alto riesgo de enfermedad cardíaca. Por este motivo la determinación de HDL colesterol es una herramienta útil en la identificación de individuos de alto riesgo <sup>(11)</sup>.

Teóricamente, sabemos que, la finalidad de un laboratorio es producir información (resultados) relevantes y confiables para la toma de decisiones, estos datos deben ser obtenidos con técnicas analíticas confiables, precisas y adecuadas para su fin. Esto, no es tan fácil de lograr en la realidad, como se ha demostrado en múltiples estudios entre laboratorios, que muestran que laboratorios diferentes, utilizando una misma metodología analítica y personal experimentado, analizando una misma muestra, obtienen resultados con variabilidad <sup>(2)</sup><sup>(13)</sup>.

Para poder disminuir esta variabilidad, en el mundo se constituyeron asociaciones y agrupaciones con en el fin de poder estandarizar estos métodos, dando origen a los principios de las “Buenas Prácticas”, dentro de las cuales surgieron los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio, el cual contiene normatividades generales a seguir respecto a la calidad de los procedimientos. Dentro de esto, el personal que compone el laboratorio debe de ser proactivo y con responsabilidades bien definidas, quienes, así como los resultados obtenidos, están bajo un control riguroso mediante los controles de calidad, los programas de aseguramiento de la calidad y gestión de calidad <sup>(13)</sup><sup>(15)</sup>.

Ahora, para que los resultados obtenidos sean veraces, es necesario validar los métodos de análisis. Como inicio vale la pena mencionar que los procesos de validación son sistemas de aseguramiento de la calidad mediante los cuales se establecen evidencias documentadas para demostrar que un proceso conduce a resultados de calidad consistentes dentro de las especificaciones predeterminadas <sup>(13)</sup>. En otras palabras, proporcionar un alto grado de confianza de que un proceso o sistema específico producirá en forma consistente un resultado que cumpla con sus especificaciones predefinidas <sup>(13)</sup> <sup>(15)</sup>.

Validación, también, es el establecimiento de evidencia documentada que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos <sup>(1)</sup> <sup>(4)</sup> <sup>(7)</sup>.

Actualmente, en el área de Bioquímica del Laboratorio Quintanilla S.R.L., para la cuantificación de HDL se utilizan kits de reactivos WIENER LAB los cuales son: Reactivo precipitante de HDL colesterol y reactivo de trabajo COLESTAT enzimático línea líquida, que se utilizan en dos etapas: precipitación y cuantificación mediante coloración por punto final; dentro de la técnica descrita, se ha realizado una modificación, disminuyendo en forma proporcional la cantidad de reactivo y muestra en la etapa de precipitación, esta modificación tiene como objetivo proporcionar al laboratorio un ahorro económico.

La Validación debe aplicarse cuando se requiere incorporar una técnica nueva al trabajo de rutina del laboratorio, también cuando se comparan dos metodologías o bien cuando se está desarrollando un método o técnica nuevos <sup>(2)</sup>, en este sentido se está realizando la incorporación de una técnica nueva al trabajo de rutina del laboratorio y es en este sentido que es necesario realizar el proceso de validación.

Dentro del complicado Sistema de Gestión de Calidad, el proceso de validación de métodos analíticos constituye una etapa fundamental, que aporta a la demostración de las competencias necesarias para llegar a generar resultados confiables y precisos, sin embargo el sistema de control de calidad debe ser aplicado a todo el proceso analítico incluyendo todas sus fases tanto pre analítica, analítica como post analítica, constituyendo la validación de los métodos sólo una parte de todo este complejo sistema proceso <sup>(1)</sup> <sup>(4)</sup> <sup>(13)</sup> <sup>(14)</sup>.

Conociendo la importancia del proceso de validación dentro del Sistema de Gestión de Calidad y conociendo también que valores erróneos traen como

consecuencia un mal diagnóstico es que se decidió realizar éste trabajo de investigación; para lo cual se planteó la siguiente interrogante:

¿Cumplirá con los criterios de validación del método para la cuantificación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL colesterol) utilizando el kit de reactivos WIENER LAB empleado en el área de Bioquímica del laboratorio Quintanilla S.R.L.?

Los objetivos a alcanzar fueron:

- ✓ Establecer la validación del método para la cuantificación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) utilizando el kit de reactivos WIENER LAB empleado en el área de Bioquímica del Laboratorio Quintanilla S.R.L .
- ✓ Determinar los parámetros de validación del método analítico para la cuantificación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL): linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, y robustez, utilizando el kit de reactivos WIENER LAB empleado en el área de Bioquímica del Laboratorio Quintanilla S.R.L.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

# MATERIALES Y MÉTODOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

## MATERIALES

### 1.1. Materiales de Laboratorio

- ✓ Fotocolorímetro “STAT FAX 3300”
- ✓ Centrifuga “KERT LAB”
- ✓ Baño maría “TOMOS”
- ✓ Micropipetas regulables Lab-Mate de 100  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L
- ✓ Refrigeradora “FRESH MASTER” marca LG
- ✓ Gradilla de plástico
- ✓ Timer “VWR”
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Puntas para micro pipetas de 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L
- ✓ Eppendorf de 2 mL
- ✓ Frascos color ámbar de 20 mL.

### 1.2. Reactivos

- ✓ 1,6 mL de Reactivo Precipitante HDL colesterol
- ✓ 70,00 mL de COLESTAT enzimático AA líquida
- ✓ 10 mL de agua destilada
- ✓ 5 mL de Estándar de COLESTAT de concentración 200 mg/dL

## 2. MÉTODO

Para determinar si el método empleado en la cuantificación de HDL cumple con los criterios de validación, se evaluaron los siguientes test: <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> <sup>(5)</sup> <sup>(7)</sup> <sup>(8)</sup> <sup>(9)</sup>

### 2.1. Linealidad

Para evaluar la linealidad se hará uso de un estándar de COLESTAT de concentración 200 mg/dL, del cual se realizará diluciones cuyas concentraciones serán de 100 mg/dL, 80 mg/dL, 60 mg/dL, 40 mg/dL y 20 mg/dL las cuales serán analizadas cada uno por triplicado y por un mismo analista.

### 2.2. Precisión

Para determinar la precisión del método, se evaluará su repetibilidad y su reproducibilidad de la manera que se describe a continuación:

#### 2.2.1. Repetibilidad:

Se realizarán un número de 10 determinaciones de la dilución de

80 mg/dL por un mismo analista, el mismo día, con los mismos reactivos y los mismos instrumentos.

#### 2.2.2. Precisión Intermedia:

Para su determinación se empleará estándar de 80 mg/dL, el cual se analizará en dos días diferentes, por dos analistas en un número de tres determinaciones; por analista y por día.

#### 2.3. Exactitud

Se la evaluará a través de un análisis repetitivo de 3 concentraciones 80 mg/dL, 60 mg/dL y 40 mg/dL. El análisis de cada uno de estos estándares se llevará a cabo por triplicado.

#### 2.4. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Se determinará mediante el análisis repetitivo de un blanco. El blanco utilizado será el reactivo de COLESTAT enzimático AA líquida y se llevarán a cabo 10 determinaciones.

#### 2.5. Robustez

La robustez se determinará de acuerdo al diseño de Youden & Steiner, siendo las variables evaluadas: Tiempo de refrigeración, analista (2 analistas) y tiempo de centrifugación.

Cada una de las determinaciones a realizar se efectuarán empleando la técnica descrita en el inserto del kit de reactivos de la marca provista por el fabricante WIENNER LAB, el cual se describe a continuación: <sup>(20)</sup>

##### Condiciones de Reacción:

- Longitud de onda: fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37 °C
- Tiempo de reacción: 45 minutos
- Volumen de muestra: 250 µL
- Volumen de Reactivo Precipitante: 25 µL
- Volumen de Sobrenadante: 50 µL
- Volumen de Reactivo de Trabajo de COLESTAT enzimático AA líquida: 1 mL.
- Volumen final de reacción: 1.05 mL.

##### Procedimiento: <sup>(20)</sup>

En un tubo de Kahn medir 0,25 mL (250 µL) de muestra, y agregar 25 µL de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20



segundos y dejar 15 minutos en el refrigerador (4-10 °C) en baño de agua a la misma temperatura. No colocar en congelador. Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m. Usar el sobrenadante límpido como muestra.

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de COLESTAT enzimático AA líquida. Retirar del baño y enfriar. Leer en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando a cero con el Blanco.

### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS <sup>(1) (2) (5) (7) (8) (9) (10) (12)</sup>

#### 3.1. Linealidad

##### 3.1.1. Cálculos para el test de Regresión

###### 3.1.1.1. Fórmula empleada para el cálculo de la Pendiente o Coeficiente de Regresión “b”

La pendiente b fue determinada empleando la fórmula siguiente:

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Donde:

x= Concentración de las muestras utilizadas.

y= Absorbancias obtenidas en las lecturas de las muestras

n= Número de determinaciones.

###### 3.1.1.2. Fórmula empleada para el Cálculo del Intercepto “a”

Su determinación se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

## 3.1.1.3. Ecuación de la Recta de Regresión

Con los datos obtenidos en este procedimiento se procedió a elaborar la recta de regresión, la cual tuvo la siguiente fórmula:

$$y = bx + a$$

Donde:

y = Absorbancias obtenidas a partir de las lecturas de los estándares y muestras utilizadas.

x = Concentración de las muestras utilizadas.

b = Pendiente de la recta de regresión.

a = Intercepto de la regresión lineal con el eje de ordenadas.

## 3.1.1.4. Cálculo del Coeficiente de Correlación “r”

Para su determinación se empleó la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right)\left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

3.1.1.5. Cálculo del Coeficiente de Determinación “r<sup>2</sup>”

Se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$r^2 = (r)^2$$

## 3.1.2. Cálculos efectuados en el Test de Linealidad de la Pendiente b

3.1.2.1. Cálculo del valor de la varianza residual “S<sup>2</sup><sub>y,x</sub>”

Se la halló a través de la siguiente fórmula:

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

Donde:

b = Pendiente de la recta de regresión.

a = Intercepto con el eje de ordenadas.

n = # de determinaciones.

### 3.1.2.2. Cálculo del valor de la varianza de la pendiente b “ $S_b^2$ ”

Se determinó empleando la fórmula siguiente:

$$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

### 3.1.2.3. Cálculo del valor de la desviación estándar de la pendiente b “ $S_b$ ”

Se obtuvo a partir del valor de la varianza de la pendiente b ( $S_b^2$ ) mediante la siguiente fórmula:

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

### 3.1.2.4. Fórmula empleada para determinar el Intervalo de Confianza de la Pendiente “b”

Se empleó la siguiente fórmula:

$$Int.Conf. = b \pm tS_b$$

Donde:

b = Pendiente.

t =  $t_{tab}$  para un nivel de significancia del 95% y n-2 grados de libertad.

$S_b$  = Desviación estándar de la pendiente.

## 3.1.3. Cálculos efectuados en el Test de Proporcionalidad

### 3.1.3.1. Cálculo de la Varianza del Término Independiente “ $S_a^2$ ”

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$S_a^2 = S_b^2 \cdot \frac{\sum x^2}{n}$$

### 3.1.3.2. Fórmula empleada para determinar la Desviación Estándar del Término Independiente “ $S_a$ ”

Para determinar la Desviación Estándar se utilizó la siguiente fórmula:

$$S_a = \sqrt{S_a^2}$$

### 3.1.3.3. Fórmula empleada para determinar el Intervalo de Confianza del Intercepto “ $a$ ”

Para determinarla se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Int.Conf.} = a \pm tS_a$$

Donde:

$a$  = Intercepto.

$t = t_{tab}$  para un nivel de significancia del 95% y  $n-2$  grados de libertad.

$S_a$  = Desviación estándar del intercepto

### 3.1.4. Cálculo del valor de $t_{exp}$

El valor de  $t_{exp}$  se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

Donde:

$b$  = Pendiente de la recta de regresión.

$S_b$  = Desviación estándar de la pendiente  $b$ .

***El método será lineal si  $t_{exp}$  es mayor al  $t_{tab}$  con el 95% de confianza y  $n-2$  grados de libertad y el coeficiente de correlación ( $r$ ) es igual o mayor que 0,990.***

## 3.2. Precisión

### 3.2.1. Repetibilidad

#### 3.2.1.1. Determinación de las Concentraciones Prácticas a partir de las absorbancias

Los valores de las concentraciones prácticas se obtuvieron al emplear la fórmula elaborada a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

Donde:

x = Concentración práctica

y = Absorbancia

b = Pendiente de la recta de regresión.

a = Intercepto de la regresión lineal con el eje de ordenadas.

#### 3.2.1.2. Determinación de la Media “ $\bar{x}$ ”

Se utilizó la fórmula siguiente:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Donde:

$\bar{x}$  = Media

n = Número de determinaciones

#### 3.2.1.3. Determinación de la Desviación Estándar “s”

Para hallarla se empleó la fórmula siguiente:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

## 3.2.1.4. Determinación del Coeficiente de Variación (CV)

Se hizo uso de la fórmula descrita a continuación:

$$CV = \frac{S * 100}{\bar{x}}$$

Donde:

s = Desviación Estándar

$\bar{x}$  = Media

## 3.2.1.5. Determinación de los Intervalos de Confianza Individual y de la Media

Se hicieron uso de las siguientes fórmulas:

## a) Intervalos de Confianza Individual

$$\bar{x} \pm t_{tab} * S$$

Donde:

$\bar{x}$  = Media

$t_{tab}$  = Valor de t tablas para un 95% de confianza y n-1 grados de libertad.

s = Desviación estándar

## b) Intervalo de Confianza de la Media

$$\bar{x} \pm t_{tab} * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$\bar{x}$  = Media

$t_{tab}$  = Valor de t tablas para un 95% de confianza y n-1 grados de libertad.

s = Desviación Estándar

n = Número de determinaciones.

### 3.2.2. Precisión Intermedia:

Los valores de concentraciones prácticas, de la media, de la desviación estándar, del coeficiente de variación y de los Intervalos de Confianza se obtuvieron de manera idéntica que en el test de repetibilidad.

***El método será preciso si en los procedimientos de Repetibilidad y Precisión Intermedia se obtiene un coeficiente de variación menor al 2%, y realizándole un tratamiento de ANOVA, debe de tener un  $p > 0.05$ .***

### 3.3. Exactitud

#### 3.3.1. Cálculo de las Concentraciones Prácticas a partir de las absorbancias

Las concentraciones fueron obtenidas mediante la siguiente fórmula, obtenida a partir de la curva de calibración:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

Donde:

x = Concentración práctica

y = Absorbancia

#### 3.3.2. Cálculo del Porcentaje de Recuperación

En la determinación de la exactitud del método los valores de las concentraciones se expresaron como porcentaje de recuperación de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{cc.Práctica}{cc.Teórica} \times 100$$

#### 3.3.3. Cálculos efectuados en la aplicación del Test G de Cochran

Para la aplicación del Test G de Cochran fue necesaria la obtención de las varianzas ( $S^2$ ) de las concentraciones prácticas, para determinar el  $G_{exp}$ .

a) Determinación de los valores de las Varianzas ( $S^2$ )

Fueron obtenidas mediante el empleo de la fórmula siguiente:

$$S^2 = \left( \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \right)^2$$

b) Determinación del valor de  $G_{exp}$ 

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}$$

Donde:

$S_{max}^2$  = Valor mayor de las varianzas obtenidas.

$S_x^2$  = Varianzas obtenidas con los resultados de las 3 concentraciones analizadas.

## 3.3.4. Cálculos efectuados en la aplicación de la Prueba t Student

Para la aplicación de esta prueba fue necesaria la determinación del valor de  $t_{exp}$  mediante la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \%R| \sqrt{n}}{CV}$$

Donde:

$\% R$  = Valor del promedio de los  $\%$  de Recuperación.

$n$  = N° de determinaciones.

$CV$  = Coeficiente de variación.

***El método será exacto si el valor de  $t_{tab}$  es mayor que el  $t_{exp}$ , al 95% de confianza y  $n-1$  grados de libertad en la aplicación de la t Student.***



### 3.4. Limite de Cuantificación y Detección

Se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$C_{LD} = \frac{K \times S_{bl}}{b} \quad C_{LQ} = \frac{K \times S_{bl}}{b}$$

Donde:

$C_{LD}$  = Límite de detección.

$C_{LQ}$  = Límite de cuantificación.

K = Constante (3 para el límite de detección y 10 para el límite de cuantificación).

b = Pendiente obtenida en el test de linealidad.

### 3.5. Robustez

Se empleó el diseño de Youden & Steiner, el cual se muestra en el siguiente esquema:

Factor / Prueba	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Siendo:

- A: Tiempo de centrifugación: 11 minutos.
- a: Tiempo de centrifugación: 20 minutos.
- B: analista 1
- b: ana lista 2
- C: Tiempo de refrigeración: 11 minutos.
- c: Tiempo de refrigeración: 20 minutos.
- s, t, u, v, w, x, y, z: concentraciones de HDL colesterol determinadas en cada prueba.

A continuación se procedió a determinar las diferencias para cada factor, empleando la fórmula siguiente:

$$VA = 1/4 (s+t+u+v) - (w+x+y+z)$$

$$VB = 1/4 (s+t+w+x) - (u+v+y+z)$$

$$VC = 1/4 (s+u+w+y) - (t+v+x+z)$$

$$|V_x| < S\sqrt{2}$$

Donde:

$V_A, V_B, V_C$  = Valor de las diferencias existentes entre las variables estudiadas.

***Si  $|V_x| < S\sqrt{2}$  diferencia no es significativa y el método será robusto para esa variable.***

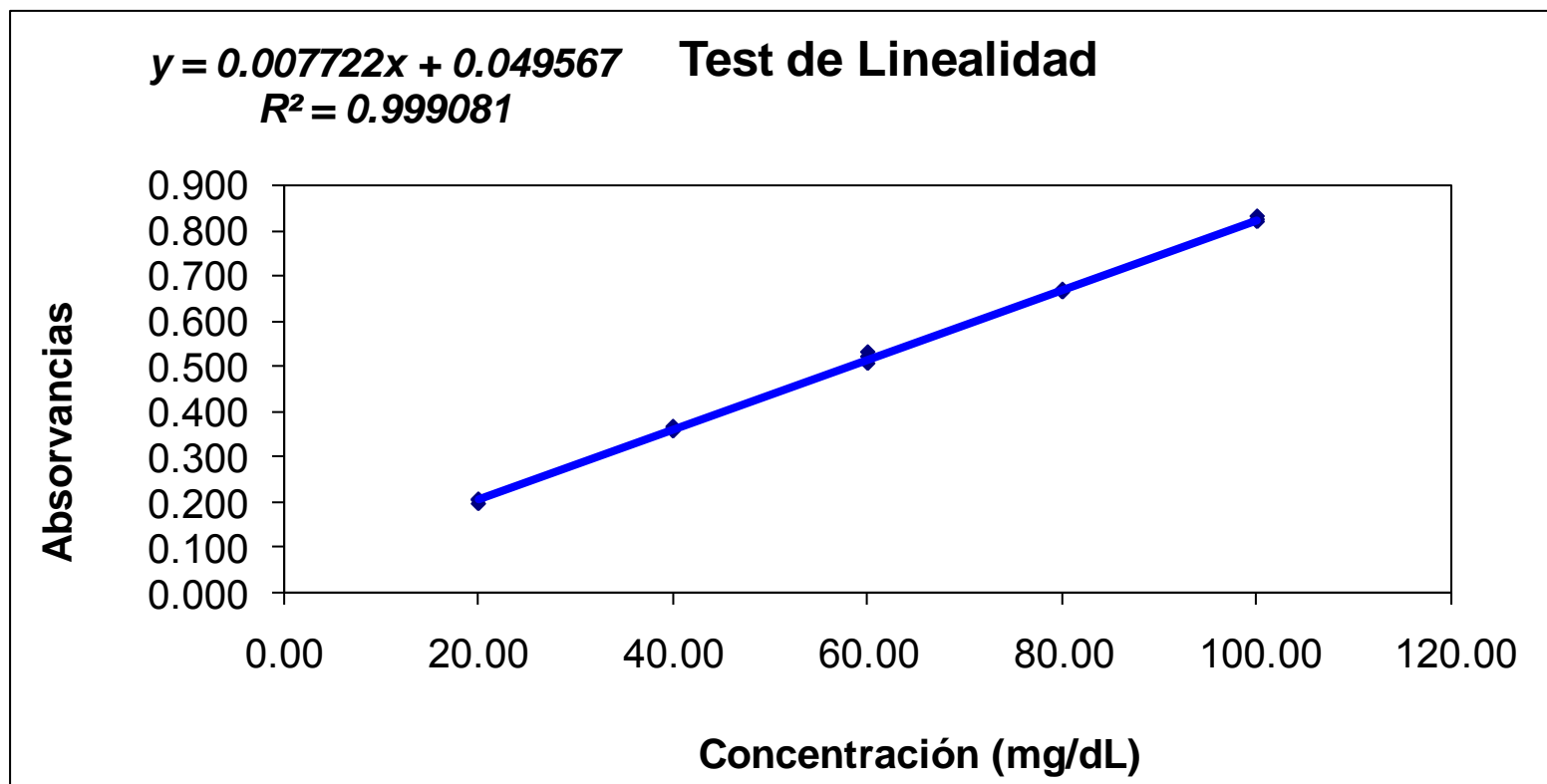
***(S = desviación estándar hallada en el test de repetibilidad).***

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

# RESULTADOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y QUIMICA

Gráfico 1: Recta de regresión obtenida en el test de Linealidad, empleado en la cuantificación de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).



Cuadro 1: Resultados del test de Linealidad en la cuantificación de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>Coefficiente de Correlación (r)</b>	0,99954	$\geq 0,990$
<b>Prueba t Student</b>	$118,885093 > 2,16_{(13; 0.05)}$	$t_{exp} > t_{tab}$

Cuadro 2: Resultados del test de Repetibilidad de las concentraciones de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>C.V.</b>	1,27 %	$\leq 2 \%$

Cuadro 3: Resultados del test de Precisión Intermedia de las concentraciones de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>C.V.</b>	1,65%	$\leq 2 \%$

Cuadro 4: ANOVA realizado para la prueba de Precisión Intermedia

Fuentes de Variación	Nivel de Significancia	Criterio de aceptación
<b>Días</b>	0,3632	$p > 0,05$
<b>Analista</b>	0,3632	

Cuadro 5: Resultados del test de Exactitud de las concentraciones de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Concentración (mg/dL)	% de Recuperación Promedio	t Student	Criterio de aceptación
80 60 40	101,17	$2,11 < 2,306_{(0.05;8)}$	$t_{exp} < t_{tab}$

Cuadro 6: Resultados de los test de Límite de Detección y Límite Cuantificación para la cuantificación de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

<b>Límite de Detección</b>	0,880 mg / dL
<b>Límite de Cuantificación</b>	2,923 mg / dL

Cuadro 7: Valores para la determinación de la robustez para la cuantificación de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Factores	Resultado	Criterio de aceptación
Tiempo de Centrifugado Analista Puntas nuevas y usadas	$0,022 < 1,47$ $0,022 < 1,47$ $0,014 < 1,47$	$ V_x  < S \sqrt{2}$

# DISCUSION

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOTECNOLÓGICA

Los test a evaluar en un estudio de validación de un método dependerán de la naturaleza del mismo.

Para el test de Linealidad, en el gráfico N° 01 se observa en la ecuación resultante del test de Linealidad para hallar las concentraciones, La pendiente “b” está relacionada con la sensibilidad del método, de forma que a mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito), de modo que, en este caso, puede diferenciar concentraciones al encontrar lecturas cercanas <sup>(1)</sup>.

El término “a” independiente u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático si es que no pasa cerca del origen de coordenadas; en éste caso existe un error sistemático por exceso <sup>(4)</sup>. En el test de proporcionalidad vemos que los límites de confianza no incluyen al cero, lo que significa que el método analítico presenta sesgo; como ya lo mencionamos, éste es por exceso <sup>(1)</sup>.

Además, en el gráfico N° 01 se presenta el coeficiente de determinación ( $r^2 = 0.999081$ ), del que se deriva el coeficiente de correlación “r” = 0,99954 (cuadro N° 1) que nos indica el grado de relación entre la concentración (x) y la respuesta (y), el cual su valor máximo es cercano a 1. Según AEFI, Bioanalytical Methods Validation y ICH establecen para el test de Linealidad, que el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual  $r \geq 0,990$ . Los valores obtenidos suponen una correlación aceptable con una probabilidad superior al 99,90% <sup>(1) (5) (9) (17) (18)</sup>.

Sin embargo, un valor del coeficiente de correlación muy cercano a la unidad no puede tomarse como indicador absoluto de linealidad, sino que además se tiene que demostrar mediante el empleo de una prueba para la linealidad, siendo uno de los más confiables la prueba de t Student, la cual aplicada al test, tal como se muestra en la cuadro N° 1, para que cumpla con los criterios de aceptabilidad según los organismos internacionales:  $t_{exp} > t_{tab}$ , y valor del  $t_{exp}$  (118,885) obtenido es mucho mayor al  $t_{tab}$  (2,16) (n-2= 13 grados de libertad) con un nivel de confianza del 95 %, con esto nos demuestra que el método cumple con el test de linealidad.

En lo que respecta al test de precisión, que es el grado de dispersión de los datos analíticos respecto a su valor medio, se evaluó la repetibilidad como una medida de ésta, la cual se define como el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de procedimientos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea por un mismo analista bajo las mismas condiciones, es decir es la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente en una muestra. La precisión



se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación, AEFI establece que el coeficiente de variación sea menor que 2 %. En el caso de la determinación de la repetibilidad, tal como se muestra en el cuadro N° 2 se obtuvo un coeficiente de variación igual a 1,27 %, siendo menor al valor máximo del criterio de aceptación <sup>(1)</sup>(7) <sup>(19)</sup>.

Referente a la precisión intermedia, el cual se realizó en diferentes días, en el cuadro N° 3, se presenta un C.V.= 1.65 % y lo establecido por la AEFI que sea menor al 2%, la precisión intermedia se obtiene cuando dentro del mismo laboratorio se varían uno o más factores entre cada uno de los procedimientos <sup>(1)</sup>(17).

En el cuadro N° 4 se observa que al aplicar ANOVA bifactorial al test de precisión intermedia se obtuvo  $p = 0,3632$  para ambas variables, teniendo como criterio de aceptación  $p > 0.05$ , con esto se determinó que los factores: analistas y días, presenta diferencia no significativa, por tal motivo el método cumple con el test de precisión <sup>(1)</sup> <sup>(8)</sup> <sup>(10)</sup>.

La precisión esta relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que están del valor verdadero. <sup>(1)</sup> <sup>(10)</sup>.

La exactitud es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico, la falta de exactitud puede ser por defecto o por exceso. Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada, los resultados finales son superiores a los verdaderos. En éste caso debería modificarse el método para hacerlo más selectivo. Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos, con varias fases, extracciones, purificaciones, etc., que se traducen inevitablemente en una disminución de la recuperación <sup>(1)</sup> <sup>(5)</sup> <sup>(8)</sup>.

En el cuadro N° 5 se observa que se obtuvo un porcentaje de recuperación media de 101,17 %, no existiendo diferencia significativa con el 100 %, también se observa que se obtuvo un  $t_{exp} = 2,11$  que es menor al  $t_{tablas} = 2,306$ , teniendo como criterio de aceptación que el  $t_{tablas}$  debe de ser mayor al  $t_{exp}$ , con esto método cumple con el test de exactitud <sup>(1)</sup>.

El Límite de Detección es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantifica un valor exacto, y el Límite de cuantificación es la mínima concentración de un analito que podemos determinar con una precisión y exactitud adecuadas, se expresan en como concentración del analito. En el cuadro N° 6 se observa el Límite de Detección 0.88

mg/dL y el Límite de cuantificación de 2.93 mg/dL, siendo resultados óptimos y muy aceptados, estos test son favorables en los procedimientos de rutina debido a que se ha podido evidenciar de niveles de HDL de hasta 8 mg/dL <sup>(1)(7)</sup>.

En el caso del parámetro robustez, según AEFI, es definida como el grado de influencia que cambios en las condiciones analíticas ejercen sobre la fiabilidad del método analítico. Es importante evaluarla porque permite localizar factores que originan fluctuaciones y los que necesitan una atención especial por cuanto son origen de variaciones significativas en los resultados. En el estudio, los cambios a los que fue sometido el método analítico, en concentración de 80 mg/dL fueron: la variación de analistas, tiempo de centrifugación (11 minutos y 20 minutos) y tiempo de refrigeración (11 minutos y 20 minutos). Se consideran como aceptables aquellos valores absolutos de las diferencias obtenidas de acuerdo al diseño de Youden & Steiner que sean menores o iguales al valor del producto de su desviación estándar multiplicado por 2, en el cuadro N° 7 se observa que el valor del producto de su desviación estándar multiplicado por 2 es 1,47, y los resultados obtenidos en cada operación son de 0,022, 0,022 y 0,014, siendo estos valores menores a 1,47. Tomando en cuenta esto, se aprecia en los resultados que el método es robusto a las variaciones que surgen por tiempo de centrifugación, de analistas y por el tiempo de refrigeración. Al haberse comprobado experimentalmente que no hay influencia de los factores estudiados recomienda la realización de este test dentro de los límites de temperatura establecidos <sup>(1)(7)(19)</sup>.

# CONCLUSION

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

El método de Validación para cuantificación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el área de Bioquímica, del Laboratorio Quintanilla S.R.L.; es lineal con un “r” = 0,99954 con valor del  $t_{exp} = 118,885$  obtenido con un nivel de confianza del 95 %; es preciso con coeficiente de variación igual a 1,27 % para repetibilidad y con coeficiente de variación igual a 1,65 % para precisión intermedia; es exacto con un porcentaje de recuperación media de 101,17 % y  $t_{exp} = 2,11$ ; tiene un límite de detección de 0.88 mg/dL; un límite de cuantificación de 2.93 mg/dL, y al emplear diferentes analistas, diferentes tiempos de refrigeración de 11 minutos y 20 minutos y tiempo de centrifugación de 11 minutos y 20 minutos, tiene robustez.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

1. Castro, M. et al: Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Sección Catalana.. Ed Farma Internacional. España.2001. pp.: 13-55.
2. D'Ocon, C.: Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico: Principios de Análisis instrumental 2<sup>da</sup> ed. ED. Thomson. 2003 Madrid. Pp. 1 – 10, 233 – 257.
3. Chapman, M.: Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. J'Lipid Res. 1980; 21:789-799. Disponible en : <http://www.jlr.org/cgi/reprint/21/7/789>  
Consultado: 12 de Enero del 2007.
4. Escalona, M.: Validación de Métodos de Laboratorio Clínico. Sitio-Web Labnutricion. Chile. 2006. Disponible en: <http://www.labnutricion.cl/validacion.htm>  
Consultado: 20 de Enero del 2007.
5. EURACHEM: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1ra ed. Diciembre, 1998. Pág.: 3-54. Disponible en: <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>  
Consultado: 20 de Enero del 2007.
6. Green, P., et al.: Intestinal lipoprotein metabolism. J Lipid Res. 1980; 21:942948. Disponible en: <http://www.jlr.org/cgi/reprint/22/8/1153.pdf>  
Consultado: 25 de Febrero del 2007.
7. Guía de validación de métodos analíticos. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>  
Consultado: 07 de Octubre del 2006.
8. ICH: Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Noviembre, 1996. Pág.: 1-10. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1320fnl.pdf>  
Consultado: 13 de Diciembre del 2006.
9. IUPAC: Compendium of Chemical Terminology. 2da ed. 1997. Disponible en: <http://www.iupac.org/goldbook/L03540.pdf>  
Consultado: 26 de Setiembre del 2006.

10. Martínez, M: “Validación de la Metodología Analítica para la Cuantificación de Sodio y Potasio por Fonometría de Llama, en Soluciones Parenterales de Gran Volumen” Informe de práctica prolongada para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas Farmacéuticas. Santiago, Chile. 2004. Disponible en: [http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2004/martinez\\_m/sources/martinez\\_m.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2004/martinez_m/sources/martinez_m.pdf)  
Consultado: 15 de Octubre del 2006.
11. Montgomery, R.: Bioquímica. 6º ed. ED. Hacourt - Brace. 1998 España; pp: 295-355.
12. Prand, M., et al: “Validación Interna del Método de Digestibilidad In Vitro de la Materia Orgánica (DIVMO) y Control Interno de la Calidad”, Universidad Nacional de Entre Ríos. XVII Jornadas IRAM-Universidades. Octubre, 2002. Panamá. Disponible en: <http://www.uniram.com.ar/Jornadas/XVII/Ponencias/foro-labora>  
Consultado: 13 de Enero del 2007.
13. Rodríguez, G.: “Aseguramiento de la calidad analítica y norma ISO 17025 en laboratorios clínicos y químicos”. Rev. Costarricense de Ciencias Médicas. San José, Costa Rica. Vol (22)1-2. Junio, 2001. disponible en: <http://www.ia.csic.es/sea/revista/VOL36-34/03.pdf#search=%22protocolo%20de%20validacion%22>  
Consultado: 24 de Octubre del 2007.
14. Reglamento técnico Centroamericano (RTCA): Productos Farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos. RTCA 11.01.35:06. Disponible en: [http://www.reglatec.go.cr/descargas/RTCA\\_11\\_01\\_35\\_06\\_ValidacionMetodosAnaliticos.pdf](http://www.reglatec.go.cr/descargas/RTCA_11_01_35_06_ValidacionMetodosAnaliticos.pdf)  
Consultado: 19 de Diciembre del 2007.
15. Sabater, J.: Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Garantía de Calidad (Quality assurance): Principios básicos. 1<sup>era</sup> ed. ED. Díaz de Santos.1988 Madrid pp 1 – 104.
16. Toraño, G., et al: “Validación de un ensayo tipo ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Haemophilus influenzae tipo b”. Rev Cubana Med Trop. La Habana, Cuba. Vol (57). Septiembre, 2005. Disponible en:

[http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol157\\_3\\_05/mtr04305.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol157_3_05/mtr04305.htm)

Consultado: 17 de Febrero del 2007.

17. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research: Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. Mayo, 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/Guidance/4252fnl.pdf#search=%22guidance%20for%20industry%20bioanalytical%20methods%20validation%20for%20human%20studies%22>

Consultado: 17 de Octubre del 2007.

18. US Department of Health and Human Services: Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: Methodology. Julio, 1999. Pág.: 7-13. Disponible en: <http://www.fda.gov/cvm/Guidance/guida64.pdf>

Consultado: 13 de Enero del 2006.

19. Validación de Procesos. Sitio Web Infodynamics. Mayo, 2006. Disponible en: <http://www.infodynamics.com.uy/validacionp.asp>

Consultado: 25 de Enero del 2007.

20. Wiener Lab Vademécum 2000: Reactivos para laboratorio clínico. 2000 Argentina. Disponible en: [http://www.wiener-lab.com.ar/pe/index\\_pe.html](http://www.wiener-lab.com.ar/pe/index_pe.html)

Consultado: 23 de Febrero del 2007.



# ANEXOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y QUIMICA

## Anexo N° 1: Información sobre reactivos usados en el ensayo de Validación

<b>COLESTAT enzimático AA líquida</b>	
Lote	611705
Exp. /Venc.	30/05/2008

<b>HDL</b>	
<b>Reactivo Magnesio</b>	
Lote	603493
Exp. /Venc.	30/03/2009
<b>Reactivo Dextrán</b>	
Lote	603492
Exp. /Venc.	30/03/2009

<b>Estándar</b>	
Lote	509565
Exp. /Venc.	30/03/2008

## Anexo N° 2: Datos experimentales obtenidos en el test de Linealidad

	N° Repeticiones	mg/dL (X)	Absorbancia (Y)	XY	X <sup>2</sup>
<b>Muestra 1</b>	1	100.00	0.821	82.10	10000
	2	100.00	0.828	82.80	10000
	3	100.00	0.816	81.60	10000
<b>Muestra 2</b>	1	80.00	0.663	53.04	6400
	2	80.00	0.667	53.36	6400
	3	80.00	0.661	52.88	6400
<b>Muestra 3</b>	1	60.00	0.529	31.74	3600
	2	60.00	0.519	31.14	3600
	3	60.00	0.504	30.24	3600
<b>Muestra 4</b>	1	40.00	0.365	14.60	1600
	2	40.00	0.362	14.48	1600
	3	40.00	0.355	14.20	1600
<b>Muestra 5</b>	1	20.00	0.203	4.06	400
	2	20.00	0.205	4.10	400
	3	20.00	0.195	3.90	400

Anexo N° 3: Datos experimentales de regresión lineal obtenidos en el test de Linealidad, para la determinación cuantitativa de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Parámetros de Regresión	Resultado
<b>Pendiente b</b>	0.007722
<b>Intercepto a</b>	0.049567
<b>Ecuación de la Recta</b>	$y = 0.007722x + 0.049567$
<b>Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)</b>	0.999081

Anexo N° 4: Datos experimentales para Linealidad de la Pendiente (b), obtenidos en el test de Linealidad, para la determinación cuantitativa de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

<b>Parámetros del Test de Linealidad de la Pendiente</b>	<b>Resultado</b>
Varianza Residual ( $s_{y,x}^2$ )	0.000051
Varianza de la Pendiente ( $S_b^2$ )	4.21859E-09
Desviación Estándar de la Pendiente ( $S_b$ )	0.000065
Intervalo de Confianza de la Pendiente	Superior → 0.007862 Inferior → 0.007581

Anexo N° 5: Datos experimentales del Test de Proporcionalidad, obtenidos en ensayo de Linealidad, para la determinación cuantitativa de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

<b>Parámetros del Test de Proporcionalidad</b>	<b>Resultado</b>
Varianza del Intercepto ( $S_a^2$ )	0.0000185618
Desviación Estándar del Intercepto ( $S_a$ )	0.004308
Intervalo de Confianza del Intercepto	Superior → 0.058873 Inferior → 0.040261

## Anexo N° 6: Datos experimentales obtenidos en el test de Repetibilidad

Muestra	Absorbancias	Concentración Teórica	Concentración Práctica
1	0.679	80.0000	81.52
2	0.684	80.0000	82.16
3	0.692	80.0000	83.20
4	0.683	80.0000	82.03
5	0.674	80.0000	80.87
6	0.699	80.0000	84.11
7	0.679	80.0000	81.52
8	0.685	80.0000	82.29
9	0.677	80.0000	81.26
10	0.670	80.0000	80.39

Cuadro 7: Datos experimentales obtenidos en el test de Repetibilidad de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL) obtenidas.

N° de análisis	10
Media	81.93
Desviación Estándar	1.04
Intervalos de confianza individual	Superior → 84.28 Inferior → 81.21
Intervalos de confianza de la media	Superior → 82.64 Inferior → 79.57

## Anexo N° 8: Datos experimentales obtenidos en el test de Precisión Intermedia

	Muestra	Absorbancias	Concentración Teórica	Concentración Práctica
Analista 1	1	0.671	80.0000	80.35
	2	0.690	80.0000	82.80
	3	0.686	80.0000	82.29
Analista 2	1	0.673	80.0000	80.61
	2	0.675	80.0000	80.87
	3	0.700	80.0000	84.10
Analista 1	1	0.677	80.0000	81.12
	2	0.680	80.0000	81.51
	3	0.691	80.0000	82.93
Analista 2	1	0.679	80.0000	81.38
	2	0.660	80.0000	78.93
	3	0.671	80.0000	80.35

## Anexo N° 9: Datos experimentales obtenidos en el test de Exactitud

	Muestra	Absorbancias	Concentración Teórica	Concentración Práctica
Analista 1	1	0.671	80.0000	80.35
	2	0.690	80.0000	82.80
	3	0.686	80.0000	82.29
Analista 2	1	0.673	80.0000	80.61
	2	0.675	80.0000	80.87
	3	0.700	80.0000	84.10
Analista 1	1	0.677	80.0000	81.12
	2	0.680	80.0000	81.51
	3	0.691	80.0000	82.93
Analista 2	1	0.679	80.0000	81.38
	2	0.660	80.0000	78.93
	3	0.671	80.0000	80.35

Anexo N° 10: Datos experimentales obtenidos en los test de Límite de detección y  
Límite de cuantificación

	<b>Concentración</b>	<b>Absorbancia</b>
1	0.0000	0.002
2	0.0000	0.005
3	0.0000	0.005
4	0.0000	0.002
5	0.0000	0.005
6	0.0000	0.007
7	0.0000	0.002
8	0.0000	0.002
9	0.0000	0.006
10	0.0000	0.008

Anexo N° 11: Datos experimentales obtenidos en el test de Robustez

<b>Factor / Ensayo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Tiempo de Centrifugación</b>	11 Minutos	11 Minutos	11 Minutos	11 Minutos	20 Minutos	20 Minutos	20 Minutos	20 Minutos
<b>Analista</b>	Int. Richard Cáceda	Int. Richard Cáceda	Técnico Mirtha Rodríguez	Técnico Mirtha Rodríguez	Int. Richard Cáceda	Int. Richard Cáceda	Técnico Mirtha Rodríguez	Técnico Mirtha Rodríguez
<b>Tiempo de Refrigeración</b>	11 Minutos	20 Minutos	11 Minutos	20 Minutos	11 Minutos	20 Minutos	11 Minutos	20 Minutos
<b>Absorbancia</b>	0.658	0.685	0.716	0.668	0.718	0.755	0.651	0.692

Anexo N° 12: Variables utilizadas en el test de Robustez

Tiempo de Centrifugación 1	11 Minutos
Tiempo de Centrifugación 2	20 Minutos
Analista 1	Int. Richard Cáceda
Analista 2	Técnico Mirtha Rodríguez
Tiempo de Refrigeración 1	11 Minutos
Tiempo de Refrigeración 2	20 Minutos

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA