

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica

**ANALISIS SEMIAUTOMATIZADO DE YODO EN ORINA Y EN MUESTRAS DE
SAL. ADAPTACION DE METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS AL ANALISIS
CINETICO EN MICROPLACA**

DORA INES MAZARIEGOS CORDERO

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Guatemala
Octubre 1994**

**ANALISIS SEMIAUTOMATIZADO DE YODO EN ORINA Y EN MUESTRAS DE
SAL. ADAPTACION DE METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS AL ANALISIS
CINETICO EN MICROPLACA**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

**ANALISIS SEMIAUTOMATIZADO DE YODO EN ORINA Y EN MUESTRAS DE
SAL. ADAPTACION DE METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS AL ANALISIS
CINETICO EN MICROPLACA**

DORA INES MAZARIEGOS CORDERO

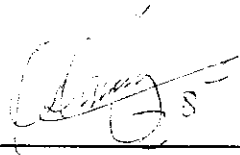
Trabajo de graduación presentado para optar al grado académico de:

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

Guatemala, Octubre de 1994

Vo. Bo.:

(f)

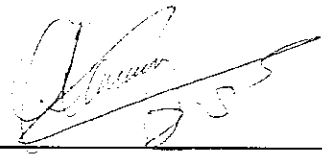


Omar Dary Mansilla, Ph.D.

Asesor

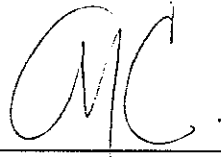
Tribunal

(f)



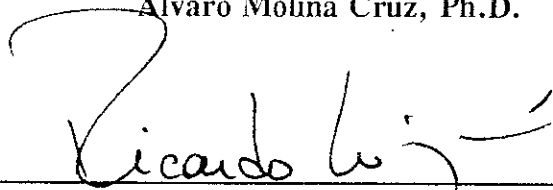
Omar Dary Mansilla, Ph.D.

(f)



Alvaro Molina Cruz, Ph.D.

(f)



Ricardo Luján, Ph.D.

Fecha de aprobación: Octubre de 1994

DEDICATORIA

A Dios, Padre Todopoderoso y Misericordioso.

A mis padres, Fernando y Dora Thelma, pilares fundamentales para la realización de todas mis metas, con mi agradecimiento, amor y cariño.

A mi abuelita Rebeca, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Omar Dary por su asesoría en la realización de este trabajo, y sobre todo por el ejemplo humano y profesional; a mis compañeros del Laboratorio Especializado de Química y Bioquímica del INCAP, Carolina Martínez, Mónica Guamuch, María Burgos y en particular a Magda de Hernández, ya que su apoyo, ayuda y amistad fueron indispensables para la culminación de esta investigación. Debo agradecer especialmente el gran trabajo secretarial de Ingrid Cabrera, pero sobre todo por su amistad.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad Del Valle y su claustro de profesores, en especial a las licenciadas Margarita Mata y Margarita Selle, y al Dr. Ricardo Luján, por su contribución con mi formación; al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, por facilitar sus instalaciones, equipo y reactivos para la realización del trabajo de laboratorio.

Agradezco a mis amigos Renata, Lucky y Carla, Karla y Carlos, Tito y Julio, con quienes he compartido momentos inolvidables en los años universitarios, que han servido para consolidar nuestra amistad, aun cuando ahora nuestros caminos sean diferentes; a mi querida amiga Nancy, con quien vivimos la agonía de terminar a tiempo nuestros trabajos de graduación.

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo por objeto el desarrollo de un método de análisis de yodo en orina y en sal que permitiera el procesamiento más efectivo de un número elevado de muestras. Para la cuantificación de yodo, se aplicó una adaptación cinética en microplaca con base en la reacción de Sandell-Kolthoff, en la cual el yodo actúa como catalizador de la reacción de reducción de Ce^{4+} a Ce^{3+} , acoplada a la oxidación de As^{3+} a As^{5+} . El método cinético desarrollado cumple con los requerimientos de velocidad de procesamiento requerido, además de reducir el error humano en el análisis. El método de análisis de yodo también es válido para muestras de sal fortificada con yoduro o yodato. Los métodos desarrollados son exactos y precisos para el propósito que servirán, es decir la evaluación de la deficiencia poblacional de yodo y la supervisión de la fortificación de la sal con este nutriente. Esta metodología ya fue puesta en práctica en los laboratorios de INCAP, en donde se ha realizado el análisis de más de 3000 muestras de orina y muestras de sal, como apoyo analítico a las Encuestas Nutricionales de República Dominicana, Honduras y Belice.

Para evaluar el valor analítico de los métodos se usó un protocolo de validación y caracterización de métodos, que se escribió paralelamente al desarrollo de los métodos (Anexo G). El propósito del manual fue resumir y presentar los parámetros que se deben evaluar en un método para garantizar en forma objetiva la calidad de los resultados producidos por métodos analíticos desarrollados individualmente.

Un producto lateral de este trabajo fue el desarrollo de un micrométodo cinético para la determinación de creatinina urinaria. Este método sirvió para conocer el uso del equipo, validar el protocolo de caracterización de métodos analíticos y probar el ajuste de métodos espectrofotométricos a una versión en microplaca. Aunque el Comité Internacional para la corrección de Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD) recomendó (Dunn *et al*, 1993) que se expresen los resultados de yodo urinario en $\mu\text{g/dL}$, en algunos casos se hace necesaria la corrección de este valor por concentración o dilución de la orina. Para estos casos se puede usar el valor de creatinina como corrección. Los tres métodos desarrollados resultaron ser de una confiabilidad semejante a la de los métodos tradicionales, con la ventaja que son más rápidos y requieren menos reactivos. Los protocolos completos de estos métodos pueden encontrarse en los Anexos B, D y F.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
A. GENERALIDADES	3
B. BIOQUIMICA Y METABOLISMO DEL YODO	5
1. Metabolismo del yodo en el organismo	6
a. Absorción y excreción de yodo	6
b. Distribución y metabolismo del yodo en el cuerpo	7
2. Hormonas tiroideas	10
a. Anatomía de la Tiroides	10
b. Síntesis, Secreción y Transporte de las Hormonas Tiroideas	11
c. Metabolismo de las hormonas tiroideas	15
d. Efectos Metabólicos y Fisiológicos de la Hormona Tiroidea	16
e. Control y Regulación de la Función Tiroidea	19
C. REQUERIMIENTOS MINIMOS DE YODO Y FUENTES DIETETICAS	20
1. Requerimientos	20
2. Fuentes dietéticas de yodo	21
D. CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE YODO	21
1. Etiología del Cretinismo y Bocio endémicos	22
2. Hipotiroidismo	24
3. Efecto de la carencia de Yodo por edades	26
4. Consecuencias Socioeconómicas de la deficiencia de yodo	28
E. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCION DE LA DEFICIENCIA	29
1. Sal Yodada	30
2. Aceite Yodado	31
3. Yodación del agua	32
4. Otras vías de suministro	32
F. DIAGNOSTICO DE LA DEFICIENCIA DE YODO Y METODOS ANALITICOS	33
1. EVALUACIONES EPIDEMIOLOGICAS	33
a. Prevalencia de Bocio y Cretinismo	34
b. Estimación de la ingesta o disponibilidad de yodo	36
c. Yodo urinario	37
d. Otras pruebas	41
2. METODOS GENERALES DE ANALISIS DE YODO EN MATERIAL BIOLÓGICO O ALIMENTOS	43
a. Análisis volumétrico de yodo (para sal fortificada)	43
b. Métodos de análisis de yodo en matrices biológicas	44
III. JUSTIFICACION	49
IV. OBJETIVOS	51

V. MATERIALES Y METODOS	53
A. MATERIALES Y EQUIPO	53
B. DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO DE CREATININA URINARIA	54
C. DESARROLLO Y VALIDACION DE LOS METODOS PARA ANALISIS DE YODO	56
1. Desarrollo y validación del método de yodo urinario	56
2. Desarrollo y validación del método de yodo en sal	58
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	59
A. CREATININA URINARIA	59
B. YODO URINARIO Y YODO EN SAL	68
D. CUADROS Y FIGURAS	76
VII. CONCLUSIONES	101
VII. RECOMENDACIONES	103
IX. REFERENCIAS	105
ANEXOS	111
ANEXO A METODOS COMERCIALES PARA LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE CREATININA	
ANEXO B DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE CREATININA EN ORINA. ANALISIS CINETICO EN MICROPLACA	
ANEXO C DETERMINACION DE YODATO EN SAL POR TITULACION REDOX CON TIOSULFATO DE SODIO	
ANEXO D DETERMINACION DE YODO EN SAL. ANALISIS CINETICO EN MICROPLACA	
ANEXO E DETERMINACION DE YODO URINARIO	
ANEXO F DETERMINACION DE YODO URINARIO. ANALISIS CINETICO EN MICROPLACA	
ANEXO G MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA VALIDACION, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE METODOS ANALITICOS DE QUIMICA Y BIOQUIMICA	

LISTA DE FIGURAS

Figura #	Título	Página
1	Vías metabólicas del yodo en un período de 24 horas	7
2	Metabolismo del yodo en el organismo	9
3	Estructura Química de las Hormonas Tiroideas y los Precursores Yodados	11
4	Síntesis, Almacenamiento y Transporte de las Hormonas Tiroideas	13
5	Vías metabólicas de las hormonas tiroideas	16
6	Regulación del Sistema Tiroideo	19
7	Consecuencias económicas de la Deficiencia de Yodo	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro #	Título	Página
1	Efectos fisiológicos básicos de la tiroides y consecuencias de la disfunción tiroidea	18
2	Espectro de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo	28
3	Criterios para clasificación de los Severidad de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo, con base en la prevalencia de Bocio	35
4	Clasificación del tamaño de bocio	35
5	Concentraciones medias de yodo urinario en recolecciones de 24 horas y en 50 o 100 muestras casuales de individuos de Bruselas, Bajo Zaire, Kivu y Ubangi.	39
6	Comparación de los valores de yodo, creatinina y el radio de ambos en dos regiones de Zaire (Kivu y Ubangi) y en Bruselas	40
7	Criterios Epidemiológicos Propuestos como Indicadores de la Severidad de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo	41

I. INTRODUCCION

El papel del yodo como nutriente traza, esencial para el hombre, se reconoce desde hace tiempo. La función fisiológica del yodo es como componente de las hormonas tiroideas. Estas hormonas tienen efectos variados en el metabolismo, influyen en el crecimiento y madurez de los tejidos, regulan la producción de proteínas y modulan la utilización de un gran número de sustancias (Wellby, 1990).

La participación del yodo en el sistema tiroideo explica las alteraciones funcionales que produce la deficiencia de este elemento. Estas alteraciones se conocen como **Desórdenes por Deficiencia de Yodo** (Hetzel, 1986). Estos incluyen: bocio a cualquier edad; cretinismo endémico (las principales características son deficiencia mental severa e irreversible, sordomudez, displegia espástica); defectos neurológicos, relacionados a la deficiencia fetal de yodo; función mental reducida en niños y adultos; frecuencia incrementada de nacimientos prematuros y mortalidad infantil. Todos estos efectos limitan el desarrollo social y económico de los países afectados (Dunn y Van der Haar, 1992; y Hetzel, 1993). La deficiencia de yodo es reconocida como un problema mayor de Salud Pública, debido a la magnitud de población en riesgo y a sus graves consecuencias.

Dado que la deficiencia de yodo se puede corregir con facilidad mediante suplementación o por la fortificación de alimentos, es vital el establecimiento de programas de monitoreo de la deficiencia y control del proceso de fortificación. En poblaciones el indicador bioquímico más utilizado para estimar la magnitud de la deficiencia es el análisis de yodo urinario (Bourdoux *et al.*, 1986). Este es un indicador epidemiológico práctico, ya que la toma de una muestra casual de orina es sencilla, igualmente fácil es el análisis de la muestra.

El análisis de yodo urinario se basa en la determinación espectrofotométrica del yoduro, por medio de su actividad catalítica en la reacción de reducción del cerio Ce^{4+} a Ce^{3+} , con oxidación acoplada del ácido arsenioso, de As^{3+} a As^{5+} . La transformación del Ce^{4+} (amarillo, absorbe en 405 nm) en Ce^{3+} (incoloro), es proporcional a la cantidad de yodo presente. La mayoría de análisis clínicos actuales (Dunn *et al.*, 1993a) y los métodos oficiales de análisis (Fisher y L'Abbé, 1981; y Fisher *et al.*, 1986) cuantifican el yodo con

base en esta reacción, con un paso previo de digestión de la muestra para eliminar sustancias interferentes.

En los Laboratorios del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) se realiza, en apoyo a programas para la erradicación de la deficiencia de yodo y otros micronutrientes, el análisis de un gran número de muestras de orina provenientes de encuestas nutricionales. El método que estaba en uso anteriormente era laborioso, pues además de la digestión manual, la lectura espectrofotométrica debía realizarse en tandas de 3-4 tubos, debido a los intervalos fijos de lectura. Se pensó en desarrollar un método que se aplicara a la lectura en microplaca, con el objeto de realizar la lecturas de 96 (12 x 8) soluciones simultáneamente. El uso del lector de microplacas del laboratorio demostró su aplicabilidad a virtualmente cualquier método espectrofotométrico, con la ventaja de que éste tiene opción cinética y es posible la programación del equipo para obtener los resultados directamente de la computadora. La medición cinética ya se ha evaluado como método de análisis de yodo (Knapp, 1974; Lauber, 1975; y Mahesh *et al.*, 1992), obteniendo resultados adecuados, particularmente con los niveles más bajos de concentración. La innovación del método en microplaca es la conjunción del análisis cinético con el uso de microplacas, de modo que el número de muestras que se pueden procesar diariamente es mucho mayor.

Paralelamente al desarrollo del método cinético de yodo urinario, se adaptaron los métodos de yodo en sal y de creatinina urinaria para ser realizados en microplaca. Otro objetivo del trabajo fue demostrar la calidad analítica de los métodos desarrollados, por lo que se preparó una guía de los criterios que deben considerarse en la evaluación de un método analítico de laboratorio. Se presenta además el sistema de control de calidad que se implementó para los métodos ya desarrollados, con el objeto de asegurar la confiabilidad de los resultados generados por tales métodos.

II. REVISION DE LITERATURA

A. GENERALIDADES

El yodo es reconocido desde hace mucho tiempo como un nutriente esencial para el hombre y ha sido el elemento traza más intensamente estudiado (Vidor, 1978).

Desde hace tiempo los chinos, egipcios y los incas usaban fuentes ricas en yodo (algas y polvo de esponjas, e.g.) para el tratamiento contra el bocio. La asociación entre la deficiencia de yodo y el bocio fue el primer paso para establecer la función del yodo en el sistema tiroideo. El primer estudio conclusivo sobre la importancia del yodo fue el de Marine y Kimball en 1917-18, quienes demostraron que la suplementación con yodo prevenía el bocio endémico en escolares en Ohio (Cavalieri, 1980). Hoy en día, el metabolismo del yodo como componente de las hormonas tiroideas está bien establecido, y se ha acuñado el término **Desórdenes por Deficiencia de Yodo (DDY)**, para referirse a los variados efectos de la deficiencia de yodo en crecimiento y desarrollo, como consecuencia de una síntesis defectuosa de hormonas tiroideas (Hetzel, 1993).

El elemento yodo (I), del grupo VII de los halógenos, ocupa el lugar 61 en orden de abundancia en la corteza terrestre, lo cual representa un 0.4% de la masa de la tierra. Es uno de los elementos no metálicos más escasos y con la distribución más dispareja. Se le encuentra sólo ocasionalmente en su forma libre en vientos marinos o ciertos depósitos minerales, y no existe nunca en depósitos o vetas ricas, a no ser por los depósitos de nitratos en la parte norte de Chile (Cavalieri, 1980), donde la concentración de yodato es de 0.5-2.0 g/kg, posiblemente originada a partir de sedimentos provenientes de algas (Matovinovic *et al.*, 1974). Se encuentran relativamente altas concentraciones de yodo en ciertas algas y animales marinos como corales y esponjas, en la glándula tiroidea de los vertebrados, en combustibles fósiles y en algunas aguas minerales naturales.

La evolución geológica de la corteza terrestre explica la existencia de grandes áreas con suelos pobres en yodo, y por ende en donde la deficiencia de yodo es prevalente. El período glacial reemplazó el humus rico en yodo por rocas cristalinas pobres en yodo. Este

fenómeno, junto con el lavado por la lluvia y la erosión explican las vastas áreas pobres en yodo en zonas montañosas como los Himalayas, los Alpes y los Andes (Dunn y Van der Haar, 1992; y Phillips, 1989). En general la prevalencia de yodo es menor en las áreas ecuatoriales que fueron las primeras en iniciar la desglaciación, y mayor en las áreas más cercanas a los polos.

Otras áreas deficientes son aquellas expuestas a inundaciones y en los deltas de grandes ríos tales como el Ganges, Río Amarillo y Rhin (Dunn y Van der Haar, 1992). Las rocas sedimentaria y metamórfica deberían contener más yodo que la roca ígnea por su origen, pero suelos derivados de esta última son más ricos en yodo, probablemente debido a una menor erosión (Cavaliere, 1980). Esto posiblemente explica la deficiencia en grandes extensiones de Africa Central, Asia Central y Europa (Dunn y Van der Haar, 1992). Otras grandes áreas pobres en yodo son las planicies centrales de los Estados Unidos, las tierras bajas de Africa Central y las planicies del Sur en los Himalayas (Terai indio) (Matovinovic *et al.*, 1974).

Aparte del contenido natural de yodo en los suelos, éstos se enriquecen progresivamente porque las plantas captan yodo de las capas internas, y éste se deposita en la superficie al morir las mismas. El yodo también se agrega a la atmósfera por fotooxidación del yoduro marino, que es transportado en vientos marinos y se incorpora de nuevo a la tierra a través de las lluvias.

Se estima que mil millones de personas están expuestas al riesgo de deficiencia de yodo: 710 millones en Asia, 60 millones en Latinoamérica, 227 millones en Africa y entre 20 y 30 millones en Europa (Dunn y Van der Haar, 1992). De éstos, 200 a 300 millones presentan bocio, unos 20 millones tienen daño cerebral prevenible (Hetzl, 1993) y por lo menos 6 millones son cretinos (Dunn y Van der Haar, 1992). Los desórdenes por deficiencia de yodo (DDY) son ahora reconocidos como un problema mayor de Salud Pública, debido a la magnitud de la población en riesgo y por las graves consecuencias de la deficiencia. Los efectos incluyen bocio a cualquier edad; cretinismo endémico (las principales características son deficiencia mental severa e irreversible, sordomudez, displegia espástica); defectos neurológicos, relacionados a la deficiencia fetal de yodo; función mental reducida en niños y adultos, relacionada con bajos niveles de tiroxina circulante; frecuencia incrementada de

nacimientos prematuros y mortalidad infantil. Todos estos efectos limitan el desarrollo social y económico de los países afectados (Dunn y Van der Haar, 1992; y Hetzel, 1993). Dado que la deficiencia de yodo se puede corregir con facilidad mediante la suplementación o por medio de la fortificación de alimentos, es vital el establecimiento de programas de monitoreo de la deficiencia y control del proceso de fortificación. Es en estos puntos que juegan un papel importante las determinaciones analíticas.

En esta revisión se incluyen primero aspectos básicos de la fisiología del yodo en el organismo, tanto como elemento libre como en su función de componente de las hormonas tiroideas. Se continúa con una sección sobre los requerimientos y fuentes de yodo. En la tercera parte se amplía sobre los efectos de la deficiencia de yodo, incluyendo las posibles estrategias de la prevención. La penúltima sección describe los indicadores bioquímicos de la deficiencia de yodo, con énfasis en el análisis de yodo urinario. En la última sección se incluye una discusión sobre varios métodos de análisis de yodo en diferentes matrices (suero, orina y alimentos, en particular sal).

B. BIOQUIMICA Y METABOLISMO DEL YODO

El yodo está presente en el organismo en pequeñas cantidades. La mayor parte se concentra en la tiroides, glándula productora de las hormonas tiroideas, tiroxina (T_4) y 3,5,3'-triyodotironina (T_3). El papel nutricional del yodo proviene de la importancia de las hormonas tiroideas en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de un estado metabólico normal, tanto en humanos como en animales (Cavalieri, 1980; y Hetzel, 1990). La deficiencia de este elemento en la dieta provoca desórdenes causados por la alteración de la función de estas hormonas en el organismo. En esta sección se describirá primero el metabolismo del yodo en el organismo, y luego las funciones de las hormonas tiroideas, lo cual explica las alteraciones funcionales que ocasiona la deficiencia de este elemento. Las consecuencias de la deficiencia de yodo se describirán en la sección D.

1. METABOLISMO DEL YODO EN EL ORGANISMO

a. Absorción y excreción de yodo

El yodo puede entrar al organismo por tres vías: pulmonar, dérmica y por el tracto gastrointestinal. La ingesta de yodo es la única vía que aporta la cantidad necesaria de yodo, pero las otras dos vías pueden llegar a tener importancia en determinadas condiciones.

Los yoduros y el yodo se absorben rápidamente en el pulmón al ser inhalados. Además hay una absorción significativa de yodo por la piel cuando se aplican tinturas de yodo, yodóforos (desinfectantes a base de yodo) y compuestos orgánicos de yodo (Vidor, 1978).

La absorción del yodo de la dieta es rápida y completa, y ocurre a nivel del intestino delgado y una pequeña parte en el estómago. El yodato es reducido a yoduro en el intestino, o éste es reducido en las células intestinales inmediatamente después de la absorción. La mayor parte del yodo de complejos orgánicos es reducido y absorbido como yoduro. Algunos colorantes yodados se absorben sin cambio, igual que la tiroxina y la triyodotironina (Cavalieri, 1980). También se puede absorber el yodo por medio de aminoácidos yodados formados en el intestino (Vidor, 1978).

No se ha reportado la existencia de síndromes de malabsorción de yodo, debido a su rápida traslocación a través de la membrana intestinal (Cavalieri, 1980).

Un 60 a 80% del yodo ingerido es excretado por los riñones. Sólo una pequeña cantidad (2%) lo hace por las heces, proveniente principalmente de hormonas degradadas por el hígado y excretadas al tracto gastrointestinal por la bilis. El resto del yodo se distribuye en el compartimiento extracelular y la tiroides (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

La ruta metabólica del yodo es por tres vías: la captación por glándulas exocrinas (glándulas salivares, mucosa gástrica y glándulas mamarias); la eliminación por los riñones; y la captación por la tiroides (Silva, 1985; y Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989). La mucosa gástrica y las glándulas salivares concentran el yodo sin organificarlo, y lo excretan

hacia el tracto gastrointestinal, donde es reabsorbido. Durante la lactancia, hasta un 10 a 15% del yodo ingerido puede excretarse en la leche (Silva, 1985).

La excreción de yodo ocurre por aclaramiento renal de la orina. La tasa de aclaramiento renal de yodo es relativamente fija (alrededor de 25 mL de plasma por minuto en mujeres y 37 mL en hombres) y es resultado de la filtración glomerular y la reabsorción tubular, ambos procesos pasivos. No hay un mecanismo a nivel de riñón que contribuya a la adaptación del cuerpo a la deficiencia o exceso de yodo en la dieta, ya que el aclaramiento renal no está determinado por la necesidad o el suministro de yodo al cuerpo

(Cavaliere, 1980). Por esta razón, cuando hay un balance adecuado de yodo la medición de la excreción urinaria de yodo refleja la ingesta de este elemento (Gibson, 1990). La Figura 1 resume el movimiento global de yodo en el cuerpo.

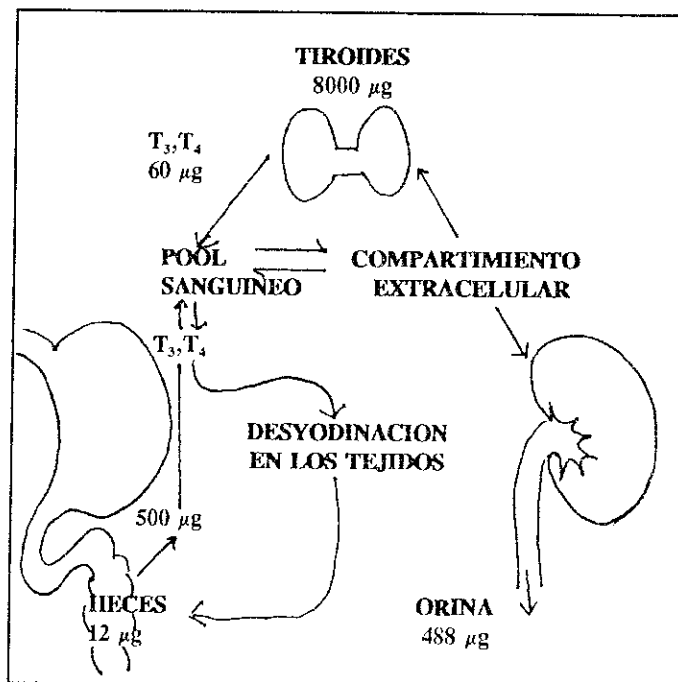


Figura 1.
Vías metabólicas del yodo en un período de 24 horas
(Tomado de Fernández-Ulloa y Maxon, 1989)

b. Distribución y metabolismo del yodo en el cuerpo

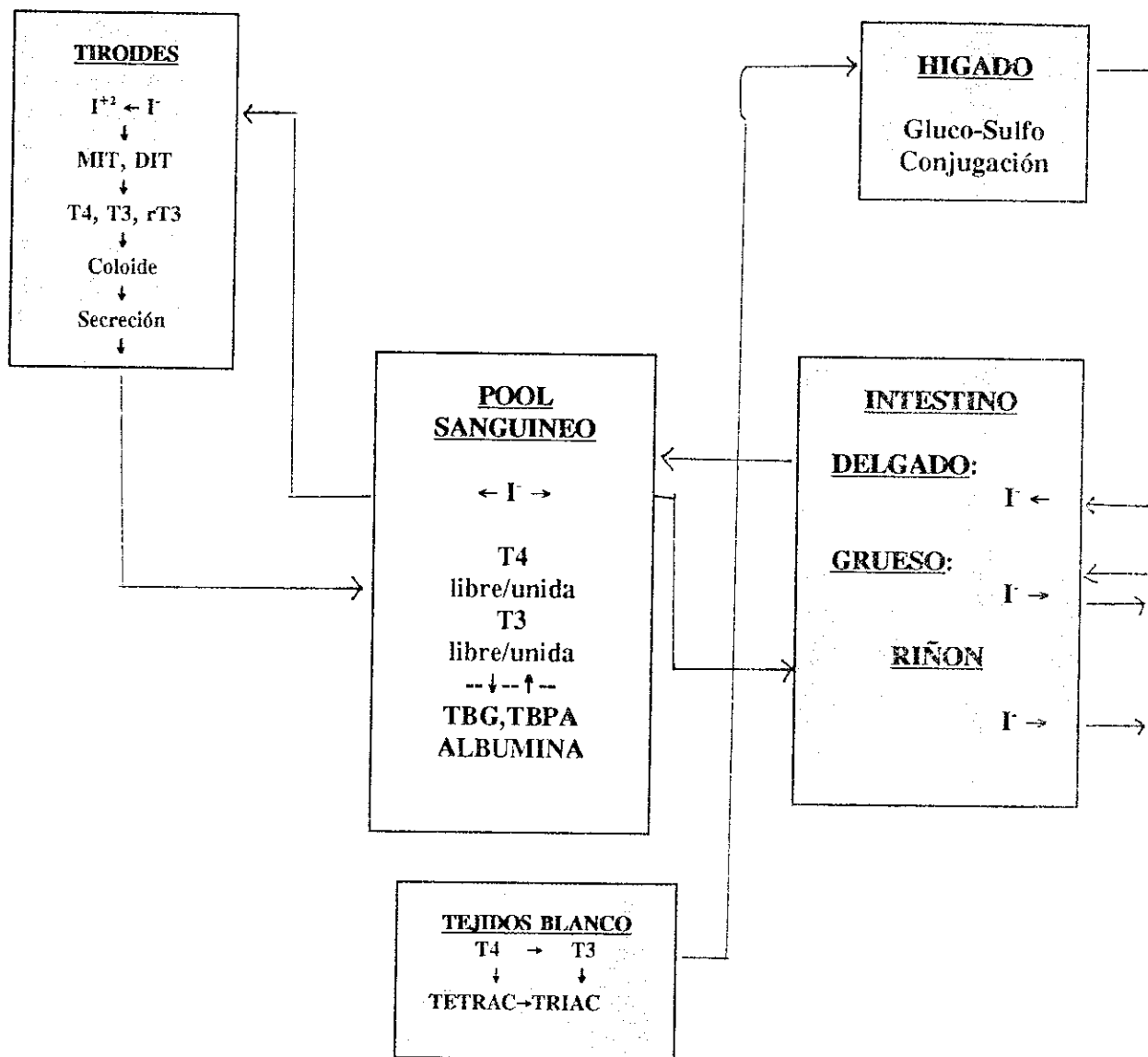
La cantidad total de yodo en el organismo es de sólo 15 a 20 mg. El 80 al 90% (o entre 6 y 12 mg) se concentra en la glándula tiroidea. Todos los tejidos que captan yodo lo hacen en contra del gradiente electroquímico, usando transporte activo a través de la membrana (Adenilato ciclase unida a membrana; Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989). El resto de las células, con excepción de los eritrocitos son impermeables al yodo libre

(Cavalieri, 1980; y Vidor, 1978). El resto del yodo se distribuye en el compartimiento extracelular, a excepción de una pequeña pero importante cantidad dentro de las células.

En los tejidos, el yodo se encuentra enlazado covalentemente a proteínas y a las hormonas tiroideas. En esta forma se conoce por yodo orgánico. El yodo libre o inorgánico se encuentra en el plasma en concentraciones muy bajas, de 0.5 a 1.5 $\mu\text{g/dL}$. La vida media del yoduro en el plasma es de alrededor de 7 horas (Cavalieri, 1980; y Gibson, 1990).

El yodo circula ya sea unido a las hormonas o como yoduro (I^-). Otros estados de oxidación se encuentran sólo en la tiroides. Una vez incorporado en la glándula, el yoduro es oxidado a I^0 ó I^+ por la yoduro peroxidasa de las células foliculares. Esta forma activa de yodo reacciona con residuos de tirosina en la proteína tiroglobulina para formar mono y diyodotirosinas. Estos residuos se condensan posteriormente para formar las hormonas T_3 y T_4 . Con la liberación de las hormonas por la yodotirosina deiodinasa, se libera también yodo libre dentro de las células foliculares. El yodo liberado queda disponible para ser reutilizado en la síntesis de más hormonas. Este mecanismo intratiroideal de reciclamiento del yodo cumple una función importante para conservar yodo cuando los niveles de ingesta son bajos (Cavalieri, 1980). La mayor parte del yodo circulante es componente de las hormonas, que en su mayoría viajan unidas a proteína (proteína unidora de tiroxina, albúmina y prealbúmina). Anteriormente se medía el yodo unido a proteína (PBI por las siglas en inglés Protein-Bound Iodine) como una medida del nivel de hormonas tiroideas circulantes.

La desyodización de las hormonas produce diyodo y monoyodo tironinas, sin actividad biológica. El yodo liberado regresa al "pool" de yodo inorgánico circulante. Otra ruta de degradación es la desaminación oxidativa de la cadena lateral de alanina, para producir derivados de ácido acético, con débil acción biológica. La inactivación de las hormonas en el hígado se produce por formación de conjugados glucuronidados o sulfonados que pasan al tracto gastrointestinal a través de la bilis. Parte de estos conjugados pueden reabsorberse; el resto es excretado en su forma orgánica en las heces (10 a 15 $\mu\text{g I/día}$). Una cantidad despreciable de yodo puede eliminarse en el sudor o por los pulmones (Cavalieri, 1980; y Vidor, 1978). Un esquema del circuito metabólico del yodo se ilustra en la Figura 2.



ABREVIATURAS: TBG, Globulina transportadora de tiroxina; TBPA, Prealbúmina unidora de tiroxina; ALB, Albúmina; MIT/DIT, mono y diyodotirosinas; T4 y T3, Tiroxina y triyodotironina; TETRAC/TRIAC, ácidos tetra y tri yodotiroacéticos

Figura 2.

Metabolismo del yodo en el organismo

(Tomado de Cavalieri, 1980)

2. HORMONAS TIROIDEAS

a. Anatomía de la Tiroides

La glándula tiroides es una estructura con forma de mariposa, integrada por dos lóbulos, uno a cada lado de la tráquea en la parte frontal del cuello. Los lóbulos están conectados por un puente angosto llamado istmo.

La tiroides consta de dos tipos de células, las foliculares y las parafoliculares. Las células foliculares están dispuestas alrededor de un material llamado coloide, rico en Tiroglobulina (Tg). La parte apical mira hacia el centro del folículo y la parte basal está dirigida hacia el intersticio, donde hay irrigación sanguínea abundante, de donde es extraído el yodo circulante. Las células foliculares producen las hormonas tiroideas, que son almacenadas en el coloide. Las células parafoliculares o células C producen calcitonina.

La función principal de la tiroides es la producción y secreción de T_3 y T_4 , que son las hormonas metabólicamente activas, esenciales en la regulación de funciones metabólicas variadas. La secreción de las hormonas se produce en respuesta a la estimulación de la tiroides por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) liberada por la pituitaria.

b. Síntesis, Secreción y Transporte de las Hormonas Tiroideas

Las tres formas sintetizadas en la tiroides son la 3,5,3',5'-tetrayodotironina, T_4 o Tiroxina; la 3,5,3'-triyodotironina (T_3) y la 3,3,5'-triyodotironina (rT_3) (Figura 3) (Wellby, 1990). T_4 y T_3 tienen acción biológica significativa, rT_3 es inactiva.

El proceso de síntesis y secreción se divide en 7 etapas: (1) Captación del yodo de los capilares hacia las células foliculares; (2) conversión del yodo a una forma activada; (3) yodinación de tirosinas de la tiroglobulina (Organificación); (4) Acoplamiento de las monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT) resultantes para formar T_3 y T_4 ; (5) Almacenamiento; (6) Secreción y (7) Transporte (Fernández-Llloa y Maxon III, 1989; y Wellby, 1990).

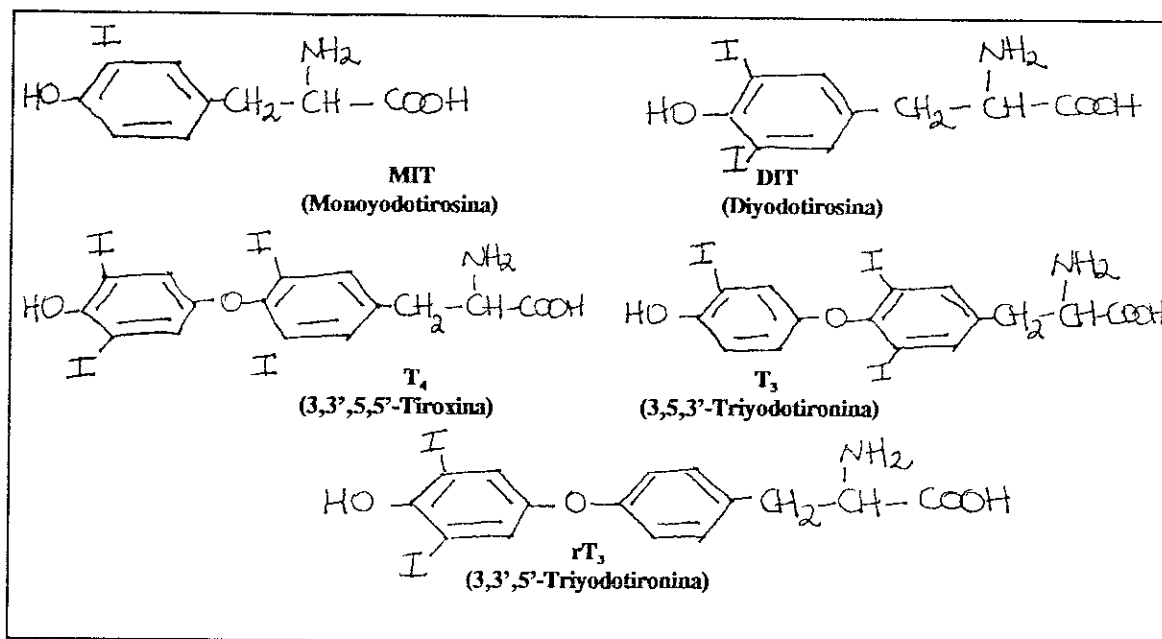


Figura 3
Estructura Química de las hormonas tiroideas y de los precursores yodados
 (Tomado de Fernández-Ulloa y Maxon, 1989)

(1) Captación del yodo

El mecanismo de concentración de yodo por la tiroides es muy efectivo y ha sido usado como indicador de la función tiroidea. La tasa de captación del yodo por la tiroides es determinado por la disponibilidad presente y pasada de yodo y por la necesidad de yodo de la glándula (Cavaliere, 1980). La avidéz de la tiroides por el yodo aumenta cuando la ingesta es insuficiente y se refleja por una alta captación de ¹³¹I. Otro factor que estimula la captación de yodo es TSH (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989). Aparentemente, el "pool" de yodo captado es diferente y distinguible del yodo proveniente de la desyodinación intratiroidea, por lo menos hasta la etapa de organificación (Wellby, 1990).

La tiroides también concentra algunos otros aniones, incluyendo bromuro, perclorato, pertechnetato (^{99m}TcO₄) y tiocianato, pero con menor efectividad que el yodo. En cantidades excesivas estos aniones pueden evitar la captación tiroidea del yodo (Dunn, 1974).

(2) Conversión a una forma activada

El yoduro captado es rápidamente oxidado a una valencia mayor (I^0 o I^+) por la yoduro peroxidasa en la superficie luminal de las células foliculares en la tiroides. El H_2O_2 requerido es generado por un sistema oxidativo NADH-dependiente (Wellby, 1990).

(3) Organificación del yodo activado

El yodo para esta etapa proviene de la captación del yodo ingerido y del yodo de la desyodinización intratiroidea. La forma activada del yodo se combina con residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg), por desplazamiento de un protón en las posiciones 3 y 5 de los residuos tirosil (Cavalieri, 1980). Se requiere también la intervención de una peroxidasa.

La tiroglobulina es una proteína de alrededor de 660,000 Da y contiene cerca de 115 residuos de tirosina en su estructura y sirve como matriz para la unión del yodo para formar los residuos de MIT y DIT (Véase la Fig. 3) (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989). La síntesis de la proteína ocurre en polirribosomas unidos al retículo endoplasmático, en donde también ocurre cierto grado de glicosilación con residuos de ácido siálico, entre otros. La glicosilación termina en el aparato de Golgi, probablemente bajo el estímulo de la TSH. La Tg es luego trasladada hacia el lumen. La exocitosis de Tg y la peroxidasa hacia el lumen ocurre por estimulación de la TSH. El yodo oxidado se une en el lumen a la Tg recién sintetizada o a Tg previamente almacenada allí (Wellby, 1990).

(4) Acoplamiento de las mono y diyodotirosinas (MIT y DIT)

Después de su formación MIT y DIT reaccionan por condensación oxidativa para formar T_3 y T_4 , y pequeñas cantidades de rT_3 . Dos residuos de DIT forman la T_4 , mientras que la T_3 se forma por condensación de un residuo de MIT con uno de DIT (Dunn, 1974). La formación de un residuo de yodotironina se hace por un enlace de oxígeno, con la producción simultánea de una alanina. Bajo condiciones normales, la relación de DIT a MIT es alrededor de 2, y el de T_4 a T_3 es de 5 (Refetoff, 1986). Cuando hay deficiencia de yodo el equilibrio se desplaza hacia formas menos yodadas, con mayor producción de la forma fisiológicamente más activa, T_3 (Cavalieri, 1980).

(5) Almacenamiento de las hormonas tiroideas

Las hormonas formadas se almacenan como yodotironinas unidas a Tg en el coloide

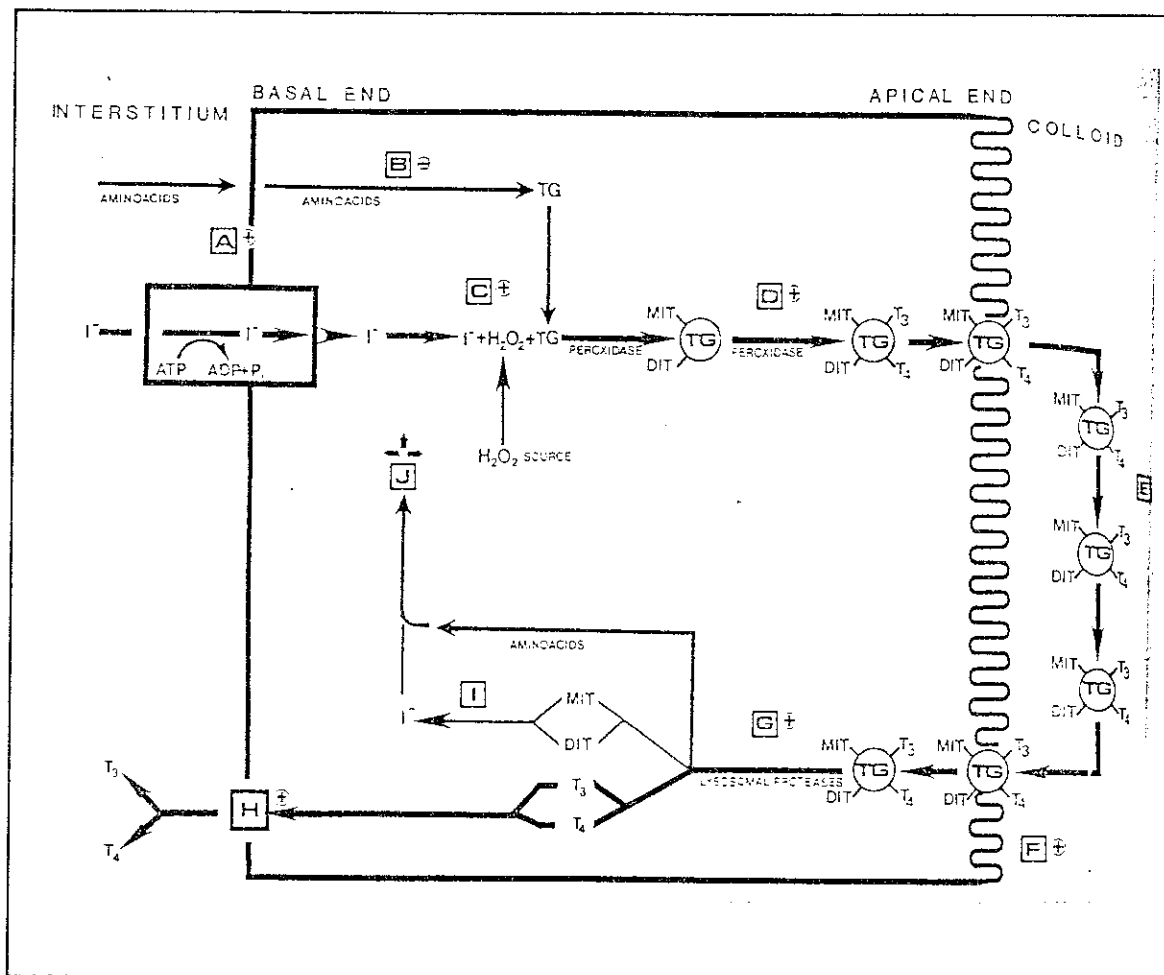


Figura 4

Síntesis, almacenamiento y transporte de las hormonas tiroideas

(Tomado de Dunn, 1974 y Fernández-Ulloa y Maxon, 1989)

de los folículos tiroideos (Figura 4). La función de almacenamiento de la Tg provee un nivel constante de hormonas tiroideas (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

(6) Secreción de las hormonas

Tanto la síntesis como la secreción de las hormonas es consecuencia de la estimulación de TSH sobre las células foliculares de la tiroides. La liberación de las hormonas empieza por una pinocitosis de coloide (resorción hacia la célula folicular) para formar vesículas endocíticas (gotas de coloide), que se funden con lisosomas para formar fagolisosomas y permitir la digestión enzimática de la tiroglobulina. La digestión la realiza una tior endopeptidasa, bajo influencia de la TSH. Esta libera T_3 y T_4 , DIT y MIT de la matriz de Tg. MIT y DIT liberados en la célula son inmediatamente desyodinados por la yodotirosina desyodinasas, y el yodo liberado es reusado en la síntesis posterior de más hormonas. T_3 y T_4 son resistentes a la desyodinación intratiroidea y son secretadas como hormonas activas. Incluso las enzimas que catalizan la conversión de T_4 a T_3 y a rT_3 tienen poca actividad en la célula tiroidea en estado basal (Wellby, 1990). Una pequeña cantidad de rT_3 también es secretada por la tiroides (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

(7) Transporte en la sangre

T_3 y T_4 son liberadas por la tiroides por difusión facilitada. Una vez en el torrente circulatorio, las hormonas son acarreadas por las proteínas acarreadoras Globulina Unidora de Tiroxina (Thyroxine-Binding Globulin, TBG), Prealbúmina Unidora de Tiroxina (Thyroxine-Binding Prealbumin TBPA), o albúmina. Sólo el 0.03% de T_4 y el 0.5% de T_3 se encuentran en la sangre en su forma libre. Aunque la albúmina tiene gran capacidad para transportar T_4 , la mayor parte de la hormona es transportada por TBG debido a la alta especificidad de la proteína por la hormona. La constante de disociación de T_3 y T_4 de TBG es relativamente alta, por lo que la disponibilidad para los tejidos es grande. El "pool" de hormona unido a proteína puede considerarse como un depósito del cual se pueden movilizar rápidamente las hormonas en caso de necesitarse. T_4 se distribuye así: un 70 a 75% unido a TBG, un 15-20% unido a TBPA, y un 10% unido a albúmina. La afinidad de TBG por T_3 es menor, y muy poca T_3 se encuentra unida a TBPA, por lo que la mayor parte se une a la albúmina (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

c. Metabolismo de las hormonas tiroideas

Todo el T_4 circulante viene de la tiroides, que secreta de 80 a 100 mg de T_4 por día. El 80% de T_3 se origina por desyodinación periférica de T_4 y el resto por producción directa por la tiroides. T_3 es la hormona con mayor actividad en los tejidos, y se producen entre 22 y 47 μg diarios. Tanto T_4 como T_3 se unen a los receptores celulares específicos (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

La desyodinación de las hormonas tiroideas tiene dos funciones en el organismo. T_4 es desyodinado a T_3 pues la hormona activa es T_3 . En este caso la desyodinación tiene por efecto el control y modulación del efecto del sistema tiroidea en el resto del organismo. T_4 es desyodinado a T_3 y rT_3 en muchos tejidos, particularmente hígado y riñón. Los efectos biológicos de T_4 se atribuyen exclusivamente a la T_3 derivada de ella, rT_3 no tiene efecto en el metabolismo.

La segunda función de la desyodinación es degradar las hormonas una vez que han cumplido su función. Sin embargo esta desyodinación puede producir derivados débilmente activos. Tanto T_3 como rT_3 son desyodinadas posteriormente a tironinas menos yodadas y tironina. La degradación hepática produce ácidos yodotiroacéticos, conjugados glucuronidados o sulfonados, o tironina totalmente desyodinada (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989). El ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) y ácido triyodotiroacético (TETRAC) se forman por transaminación, descarboxilación oxidativa y desyodinación en el hígado. TRIAC tiene actividad metabólica medible y se une fácilmente a los receptores nucleares (Wellby, 1990). Las vías metabólicas descritas se presentan en la Figura 5.

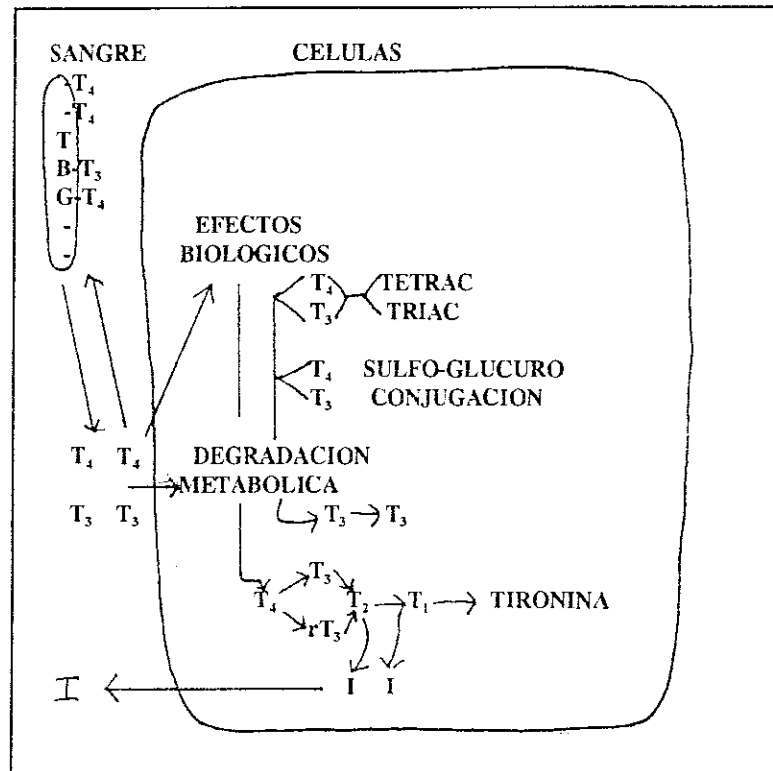


Figura 5
Vías metabólicas de las Hormonas Tiroideas
 (Tomado de Fernández-Ulloa y Maxon, 1989)

d. Efectos Metabólicos y Fisiológicos de la Hormona Tiroidea

Las hormonas tiroideas influyen en general en el crecimiento y la madurez de todos los tejidos, regulan la producción de proteínas, en particular de ciertas enzimas, y modulan la utilización de un gran número de sustancias, incluyendo vitaminas y minerales. T₃ y T₄ incrementan la sensibilidad y la rapidez de las respuestas del organismo, estimulando el metabolismo general (Wellby, 1990).

Se postulan varios mecanismos de acción a nivel celular. La hormona tiroidea puede unirse a los receptores en la membrana celular y también cruzarla por difusión directa. Una vez dentro de la célula, la hormona se une a sitios receptores en el citosol y en el

núcleo. La unión a receptores nucleares estimula la formación de ARN mensajero que a su vez dirige la síntesis de proteínas y enzimas responsables de funciones metabólicas. Otros mecanismos postulados son (1) activación mitocondrial; (2) estimulación de la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ adenosin trifosfatasa (ATP-asa); (3) estimulación de las funciones de la membrana celular, probablemente a través de un receptor específico; y (4) interacción con el sistema adrenérgico (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

T_3 estimula la termogénesis a través de un incremento en el metabolismo oxidativo y desacoplamiento de la cadena respiratoria en las mitocondrias. Los efectos de T_3 en el metabolismo de lípidos incluyen un incremento en la actividad de la enzima málica, lo cual lleva a un incremento de la necesidad de NADH y consecuentemente aumenta la oxidación de ácidos grasos y la movilización de los mismos a partir de las reservas de grasa (Wellby, 1990).

Estos son sólo algunos ejemplos del efecto de las hormonas en el metabolismo. El cuadro 1 resume los principales efectos fisiológicos de la tiroides, en condiciones normales y con patologías de hipo o hiper funcionamiento de la glándula.

Cuadro 1. Efectos fisiológicos básicos de la tiroides y consecuencias de la disfunción tiroidea

Sistema	Efectos de la Tiroides	Síntomas usuales	
		Hipertiroidismo	Hipotiroidismo
Metabólico	Aumento de: -Calorigénesis y consumo de O ₂ -Disipación de calor -Catabolismo de proteínas -Absorción y uso de glucosa	Intolerancia al calor Piel sonrojada Perspiración abundante Incremento del apetito y la ingesta alimenticia Gasto muscular y debilidad Pérdida de peso	Intolerancia al frío Piel seca y pálida Reducción del apetito y la ingesta alimenticia Debilidad generalizada Ganancia de peso
Cardiovascular	Aumento de: -Actividad adrenergética y sensibilidad -Tasa cardíaca -Contractilidad del miocardio -Salida cardíaca -Volumen sanguíneo	Palpitaciones y taquicardia Aumento de la presión sanguínea	Bradicardia Baja presión cardíaca Falla cardíaca Agrandamiento del corazón
Nervioso Central	Aumento de la actividad adrenergética y la sensibilidad	Hipermotilidad Nerviosidad Labilidad emocional Fatiga Reflejos exagerados	Apatía Inactividad mental Reflejos deprimidos Retardo mental
Gastrointestinal	Motilidad aumentada	Hiperdefecación	Constipación

Fuente: Fernández-Ulloa y Maxon, 1989.

e. Control y Regulación de la Función Tiroidea

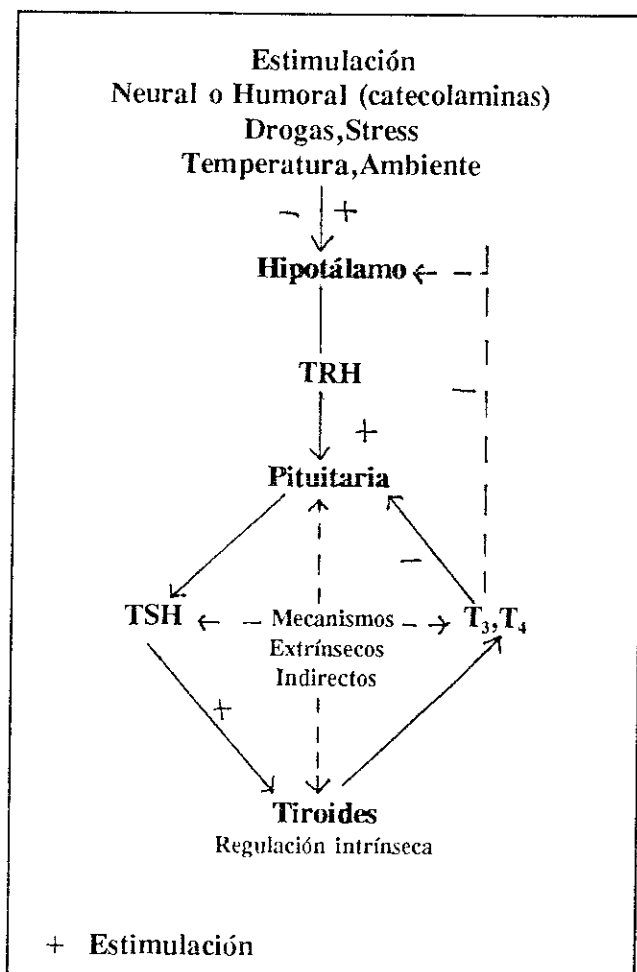


Figura 6
Regulación del Sistema Tiroideo
 (Tomado de Fernández-Ulloa y Maxon, 1989 y Scriba, 1974)

Eje Hipotálamico-Pituitario-Tiroideo (Fig.6)

Este eje es el responsable de la regulación de la producción y secreción de tiroxina y triyodotironina (T_4 y T_3). La hormona liberadora de tiotropina (Thyrotropin-Releasing Hormone, TRH) es un tripéptido producido por el hipotálamo y secretado al sistema venoso. Este se une a receptores en la pituitaria, donde causa la producción y secreción de la tiotropina o TSH, que es secretada hacia el torrente sanguíneo. En la tiroides, la TSH se une a receptores específicos y ejerce dos acciones principales. Una acción trófica es la estimulación de la reproducción celular e hipertrofia, la otra es la estimulación de la producción/secreción de las hormonas tiroideas (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

El incremento en los niveles de hormonas tiroideas en la sangre inhibe la secreción de TSH (Efecto de "Feedback" o retroalimentación negativa). Inversamente, la disminución de los niveles de hormonas tiroideas provocan un aumento en la secreción de TRH y TSH (Fernández-Ulloa y Maxon III, 1989).

Autorregulación de la secreción tiroideal

Se ha postulado que exceso de T_3 y T_4 en el plasma inhiben la respuesta de la tiroides a TSH, pero esto no se ha demostrado. El contenido orgánico de yodo es un factor primordial en el control del transporte tiroideal de yoduro. Un exceso inhibe el transporte y vuelve a la glándula insensible a TSH (Wellby, 1990).

C. REQUERIMIENTOS MINIMOS DE YODO Y FUENTES DIETETICAS

1. Requerimientos

Dado que el yodo tiene su función fisiológica en el sistema tiroideo, se han establecido los requerimientos mínimos de yodo usando el sistema tiroideo como indicador del estado nutricional de yodo (Cavaliere, 1980). Se ha establecido que se requieren 50 μg de I al día para evitar la aparición de bocio. Esto se concluye con base en la excreción urinaria de yodo. Cuando el promedio de la excreción urinaria en una población es menor a 50 μg por día, se observa una prevalencia de bocio (agrandamiento anormal de la tiroides) de 10% o más. Los 50 μg se estiman suponiendo que el balance de yodo está en equilibrio, es decir que la excreción es aproximadamente igual a la ingesta. Sin embargo la presencia de factores bociógenos en la dieta puede hacer insuficiente el valor de 50 μg diarios.

La ingesta mínima recomendada en 1989, (Recommended Dietary Allowance, RDA) por el National Research Council de Washington, es para adultos sanos de 1-2 μg I/kg de peso corporal, o 150 μg por día a partir de los diez años. Para mujeres embarazadas o en período de lactancia se recomienda de 25 a 50 μg adicionales. Para niños menores de 10 años se recomiendan de 40 a 120 μg diarios. Se considera segura una ingesta de 50 a 1000 μg diarios (Hetzel, 1990).

2. Fuentes dietéticas de yodo

La comida derivada del mar (mariscos y aceites de pescado) es la principal fuente de yodo. Le siguen huevos y leche. El contenido en carnes, frutas y vegetales depende de la concentración de yodo del suelo de donde provienen los alimentos vegetales. Se sabe sin embargo que el contenido de yodo en la espinaca es más alto que en cualquier otro vegetal (201 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Matovinovic *et al.*, 1974).

El contenido de yodo en los alimentos puede variar grandemente, de acuerdo al tipo de suelo, fertilizantes utilizados y según el método de procesamiento. El pan puede ser fuente importante de yodo, ahora que el proceso utiliza yodato como acondicionador de la masa (pues como agente oxidante acelera la formación de enlaces disulfuro) (Cavalieri, 1980; y Matovinovic *et al.*, 1974).

El contenido de yodo en la sal común es bajo, porque el suelo no contiene mucho yodo o porque éste se pierde en forma de moléculas volátiles (HI , I_2) durante la refinación de la sal. Para muchos países, la principal fuente alimenticia de yodo es la sal yodada (Matovinovic *et al.*, 1974). Según el consumo, se pueden ingerir hasta 600 μg diarios de I proveniente de sal yodada. Un consumo promedio adecuado es de 150 μg de yodo provenientes de 4-8 gramos de sal.

D. CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE YODO

Cuando el individuo no cubre sus requerimientos mínimos diarios por un período largo, la tiroides depleta sus reservas de yodo.

Los indicadores más graves y evidentes de la carencia de yodo son un aumento de la prevalencia de bocio y cretinismo en las poblaciones. El problema es complejo: La prevalencia de bocio y cretinismo endémicos tiene por etiología la deficiencia de yodo, pero también la presencia en la dieta de factores bociógenos, que impiden la utilización tiroidea del yodo disponible. Por otro lado el cretinismo, además de presentar dos manifestaciones clínicas diferentes (cretinismos neurológico y mixedematoso, ver más adelante) no es el único

efecto de la deficiencia de yodo, sino que se presenta una escala de deficiencias intelectuales y físicas, que pueden ser difíciles de cuantificar objetivamente (Delange, 1986).

Además, se ha propuesto que los mecanismos patogénicos del cretinismo son hipotiroidismo fetal o maternal, o un efecto directo de la carencia de yodo. El hipotiroidismo no es consecuencia única de la deficiencia de yodo, ya que el hipotiroidismo puede provenir de una disfunción tiroidea primaria (daño parenquimal, defectos congénitos o adquiridos de síntesis de hormonas, defecto en el metabolismo de tiroglobulina, y otros). Existe el hipotiroidismo de origen pituitario o hipotalámico; y también puede haber hipotiroidismo por respuesta periférica disminuida. A continuación se presenta la etiología del bocio y cretinismo endémicos, y los otros efectos posibles de la deficiencia de yodo.

1. Etiología del Cretinismo y Bocio endémicos

Como se mencionó anteriormente los indicadores más graves y evidentes de la carencia de yodo son el bocio y el cretinismo. El bocio es un mecanismo fisiológico de compensación de la deficiencia, donde la tiroides se agranda a causa de una estimulación crónica por la TSH, para aumentar la producción de hormonas tiroideas. La pituitaria secreta a la TSH debido a la disminución de hormonas tiroideas circulantes. La hipertrofia y/o hiperplasia de las células foliculares de la glándula puede ser de tal magnitud que es visible en el cuello, esto es el bocio (Cavaliere, 1980; y Phillips, 1989).

El cretinismo es la consecuencia de un severo hipotiroidismo en el período fetal o neonatal. Esta afección se encuentra en general asociada con bocio endémico severo y se reconoce por anormalidades de diferente magnitud (Phillips, 1989). En su forma más común se caracteriza por deficiencia mental severa e irreversible, diferentes grados de sordomudez y displegia espástica; este es el cretinismo neurológico o nervioso. El cretinismo mixedematoso o hipotiroideo, menos común, se caracteriza principalmente por hipotiroidismo, estatura reducida y retardo en el desarrollo del sistema músculo-esquelético (Hetzl y Dunn, 1989). Se encuentran los dos tipos de cretinismo y mezclas de los dos en muchas regiones del planeta.

La deficiencia de yodo es la etiología fundamental en el cretinismo endémico, pues se ha relacionado la severidad de la deficiencia de yodo y la prevalencia de bocio y cretinismo. Además se ha establecido la acción profiláctica del yodo en la incidencia de cretinismo endémico (Delange, 1986). Sin embargo hay situaciones en que, a pesar de la suplementación con yodo, se mantiene un cierto grado de bocio y aparecen nuevos casos lo cual sugirió la existencia de otros factores causantes de bocio (Gaitán *et al.*, 1986).

Tiocianatos y compuestos relacionados

El ión tiocianato (SCN^-) compete con el yoduro en el transporte hacia la célula folicular, ya que tiene un volumen y carga moleculares semejantes al ión yoduro (I^-). El efecto bociogénico se debe a la inhibición del mecanismo de concentración de yodo por la tiroides. Los compuestos sulfurados con similar efecto categoría son principalmente glicósidos cianogénéticos, tioglicósidos, tiocianatos e isotiocianatos. Los glicósidos cianogénéticos producen tiocianato por degradación enzimática que evita la formación de cianuro. Se encuentran glicósidos cianogénéticos en alimentos como yuca (ya se identificó el glicósido cianogénico responsable, la linamarina), maíz, brotes de bambú, papas dulces y ciertas variedades de leguminosas (frijoles tipo "lima beans"), que son común y extensamente consumidos en países en vías de desarrollo. Los tioglicósidos son comunes en las crucíferas. También se han encontrado niveles altos de tiocianato urinario en fumadores, como consecuencia del metabolismo del cianuro de hidrógeno inhalado. La acción de estos bociógenos se puede contrarrestar con suplementación con yodo (Gaitán *et al.*, 1986).

Tiourea y compuestos relacionados a tionamida

El mecanismo de acción de estas sustancias es la interferencia con la organificación del yoduro y el acoplamiento de yodotirosinas para formar las hormonas tiroideas, por inhibición de la oxidación y unión del yoduro a la tiroglobulina. El tioglicósido, goitrina (L-5-vinil-2-tiooxazolidona), aislado de semillas del género *Brassica*, pertenece a esta categoría. En este grupo se incluyen también polifenoles con estructura $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ (Bioflavonoides). Estos últimos se encuentran en grandes cantidades en alimentos básicos como sorgo y nueces, en forma oligomérica (pigmentos flavonoides) o polimérica (taninos). Otros fenoles en esta categoría son resorcinol, floroglucinol, pirogalol, orcinol y derivados

de ácido dihidrobenzoico. Estos productos laterales de la reducción, oxidación y degradación microbiana de materia orgánica formadora de humus. Estos son los bociógenos del suelo y el agua. Otro tipo de bociógenos son los disulfuros alifáticos. Estos pueden ser naturales (componentes volátiles del ajo o la cebolla) o contaminantes industriales (plantas de tratamiento de carbón). No siempre es posible revertir los efectos de estos compuestos con yodo (Gaitán *et al.*, 1986).

Agentes interferentes en la proteólisis y liberación de hormonas tiroideas

El más importante de estos es el exceso de yodo (más de 2 mg diarios), y el litio (Gaitán *et al.*, 1986).

Estado Nutricional

La desnutrición proteico-calórica y el bocio coexisten frecuentemente. Se ha encontrado que una nutrición pobre aumenta el riesgo de desarrollo de bocio en grupos susceptibles (infantes, niños y mujeres embarazadas). En ratas una dieta pobre en proteínas reduce el transporte tiroideal de yodo, disminuye su concentración en la glándula y aumenta el efecto bociogénico de agentes antitiroideos (Gaitán *et al.*, 1986).

2. Hipotiroidismo

El hipotiroidismo es un estado clínico y bioquímico causado por un malfuncionamiento de la tiroides, en el que se reduce la producción de hormonas tiroideas. Se denomina hipotiroidismo primario cuando la falla se origina en la tiroides y secundario cuando la falla se encuentra a nivel de pituitaria o hipotálamo (Wellby, 1990). El hipotiroidismo se detecta por niveles bajos de hormonas circulantes (T_3 y T_4) y porque produce cansancio, insomnio, piel seca, intolerancia al frío y estreñimiento (Refiérase al cuadro 1, sección A). En niños de corta edad en adición a estos síntomas, el hipotiroidismo provoca retraso mental y del crecimiento, debido al papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo del cerebro y el sistema nervioso. Dependiendo de la etapa de madurez y la

severidad de la deficiencia, estos síntomas pueden ser irreversibles (Dunn y Van der Haar, 1992).

Hipotiroidismo fetal o neonatal

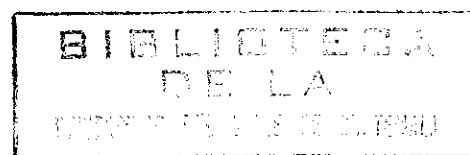
Estudios de Thilly y colaboradores (1978) en Zaire, donde el cretinismo mixedematoso era endémico, evidenciaron que este tipo de cretinismo era resultado de un hipotiroidismo fetal o neonatal severo (valores de T4 muy bajos y TSH muy altos). Según Delange (1986) una prueba conclusiva es la demostración que una inyección con aceite yodado a las madres embarazadas corrige las deficiencias bioquímicas y radiológicas (maduración ósea). No hubo nacimientos de niños cretinos en las madres tratadas con aceite yodado por lo menos un mes antes del parto. En Zaire, el alto consumo de yuca (*Cassava*) por las madres agrava la acción antitiroidea del tiocianato en la tiroides del feto. Los resultados son consistentes con un muy bajo contenido de yodo en la tiroides de los cretinos en Ubangi (Zaire). En estos cretinos mixedematosos se observó una involución del tejido tiroideo, causada por una estimulación intensa por TSH ("atrofia por agotamiento") (Delange, 1986).

La tiroides de estos niños cretinos responde a la suplementación con yodo, normalizando su funcionamiento en ciertos casos. La respuesta disminuye con la edad a la que se realiza la profilaxis, y es casi nula en niños mayores a 3 años. Si la corrección se realiza en el último período del desarrollo cerebral, el hipotiroidismo se revierte pero no la deficiencia mental.

En contraste, en lugares donde predomina el hipotiroidismo neurológico (Argelia en Africa del Norte, los Andes) no se ha encontrado hipotiroidismo en cretinos recién nacidos. La hipótesis es que además del hipotiroidismo fetal o neonatal, el hipotiroidismo maternal es el mecanismo que produce este tipo de cretinismo (Delange, 1986).

Hipotiroidismo maternal

A pesar que los sistemas de regulación de la función tiroidea (eje hipotálamo-pituitaria-tiroides) de la madre y el niño son independientes se ha postulado el efecto del funcionamiento tiroideo maternal en el desarrollo de la función tiroidea fetal. Nacen más



cretinos y hay mayor mortalidad infantil en madres con valores bajos de T_4 y altos de TSH durante el embarazo. Esto también puede deberse a que tanto la glándula fetal como maternal están expuestas independiente pero simultáneamente a los factores ambientales que dañan la función tiroidea (Delange, 1986).

3. Efecto de la carencia de Yodo por edades

Desarrollo fetal

La deficiencia de yodo en el feto es provocada por la deficiencia de este nutriente en la madre. Esta condición se asocia con una mayor incidencia de partos prematuros, abortos espontáneos y anomalías congénitas (Hetzel y Dunn, 1989). Los efectos son revertibles por terapia oportuna de hormonas o suplementación con yodo a la madre (Hetzel, 1990).

El neonato

La importancia de la deficiencia en el niño radica en que el cerebro en el momento del nacimiento sólo ha alcanzado un tercio de su desarrollo y sigue creciendo hasta el segundo año de vida. Las hormonas tiroideas son indispensables para un desarrollo adecuado. Si no se corrige el hipotiroidismo por deficiencia de yodo, éste se mantiene en la niñez y provoca retardo o degeneración del desarrollo físico y mental (Hetzel, 1990; y Hetzel y Dunn, 1989).

El niño

Si la deficiencia de yodo ocurre en la niñez, ésta se asocia con la existencia de bocio. La prevalencia es mayor en las niñas que en los niños. Otros síntomas de la deficiencia son más difíciles de evaluar pues se relacionan con el desenvolvimiento intelectual. Se ha encontrado en pruebas con grupos control adecuados que la deficiencia provoca menor rendimiento escolar y menores cocientes intelectuales. También las pruebas de desarrollo sicomotor están sujetas a adaptación de patrones desarrollados a comunidades pobres y aisladas, y pueden cuantificar efecto de otros factores ajenos al yodo. Sin embargo hay

evidencia de menor coordinación motora en niños deficientes (Hetzel, 1990; y Hetzel y Dunn, 1989).

El adulto

Se ha demostrado que la suplementación con yodo reduce la prevalencia de bocio y aumenta los niveles de T_4 . Además las comunidades deficientes tienen individuos apáticos, con capacidad reducida de iniciativa y toma de decisiones. Esto coloca la deficiencia de yodo como un bloqueo al desarrollo social y económico de estas comunidades. En ejemplo más ilustrativo de lo que puede hacer la introducción de programas de control de la deficiencia es el estudio de Li y Wang (Citado en Hetzel, 1990) en el poblado de Jixian en el norte de la China. Después de la introducción de sal yodada la prevalencia de bocio cayó de 65 a 4%, no hubo nacimiento de cretinos y la actitud de la gente cambió positivamente. Esto último se reflejó en un aumento del ingreso *per capita* de 43 a 223 yenes de 1981 a 1982, mejores empleos, adquisición de bienes de consumo (Hetzel, 1990; y Hetzel y Dunn, 1989).

El cuadro 2 resume los efectos de la deficiencia de yodo, por grupos etarios.

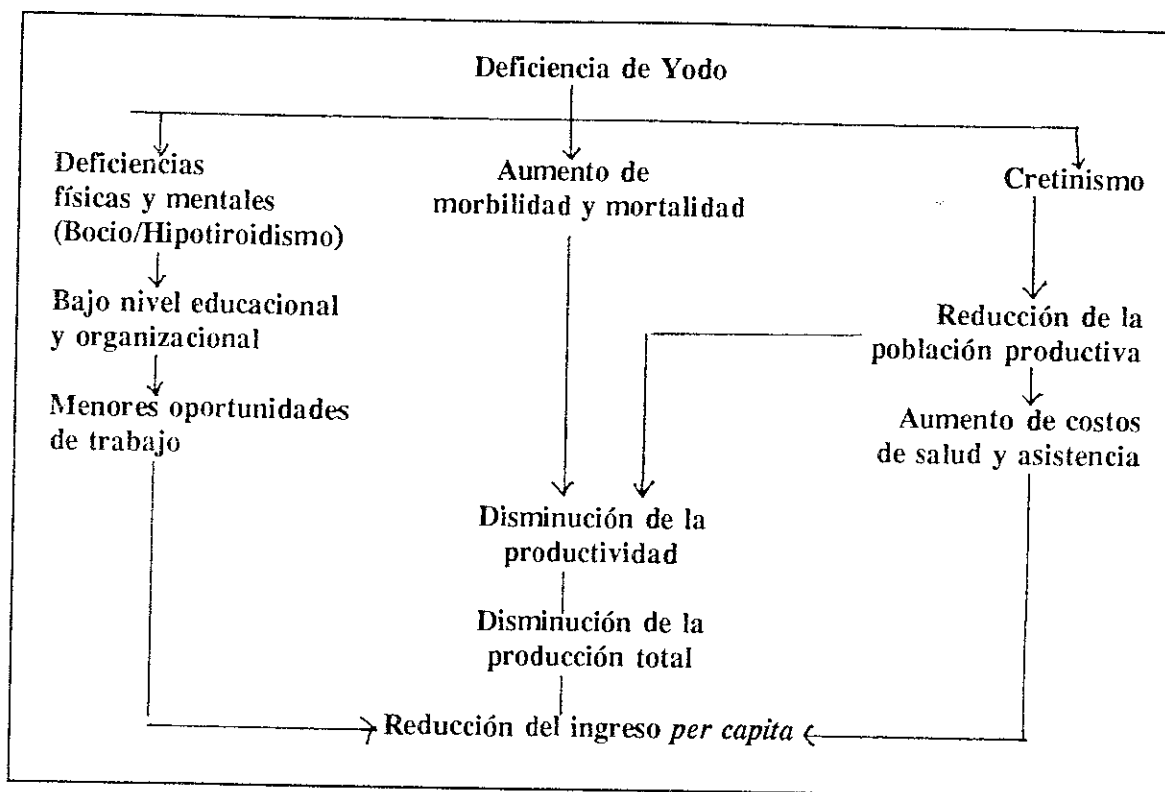


Figura 7

Consecuencias económicas de la deficiencia de yodo

(Adaptación de Hernández y Contreras, 1992; y Hershman et al., 1986)

pequeños, con menor producción de carne, huevos o lana. También aumenta la incidencia de abortos y esterilidad (Dunn y Van der Haar, 1992). El conjunto de la relación entre deficiencia de yodo y efectos socioeconómicos se resume en la Figura 7.

E. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCION DE LA DEFICIENCIA

En principio, la deficiencia de yodo es fácil de corregir. Las poblaciones afectadas pueden recibir el yodo como un aditivo a la comida o el agua (fortificación) o por administración directa (suplementación). Los programas de fortificación son más prácticos a gran escala, particularmente si el vehículo alimentario es fácilmente controlable. Sin embargo el establecimiento de estos programas puede involucrar cambios en los patrones de

mercadeo y distribución, y puede tardar años en establecerse. Aun así, puede no llegar a ciertos grupos de alto riesgo. La alternativa es entonces la suplementación (Hetzel y Dunn, 1989).

La elección del tipo de programa depende de la extensión y severidad de la deficiencia de yodo; de la existencia de factores bociógenos en la dieta; de la asociación con fuerte desnutrición proteico-calórica y otras deficiencias nutricionales; y finalmente de las posibilidades y condiciones nacionales y regionales (Dunn y Van der Haar, 1992). A continuación se describen las posibles alternativas de programas de intervención.

1. Sal Yodada

La sal es un excelente vehículo para fortificación con yodo. Toda persona necesita sal, en cantidades relativamente constantes. Por otro lado, las técnicas de yodización son sencillas y no muy costosas. Además, el yodo no afecta las propiedades organolépticas y la sal fortificada es bien aceptada por los consumidores. La desventaja principal de la sal yodada es que requiere que se tenga un buen control de las fuentes de sal, así como de su patrón de producción y distribución (Dunn y Van der Haar, 1992; y Hetzel y Dunn, 1989).

Los compuestos de yodo más usados para fortificación de la sal son el yoduro de potasio (KI) y el yodato de potasio (KIO_3). El yoduro es más barato, pero menos estable, ya que se oxida rápido cuando se expone a altas temperaturas y humedad. Se recomienda el yodato de potasio cuando la sal a fortificarse tiene cierto grado de impurezas, se almacena y transporta en excesivo luz, calor y humedad, o no se consume de inmediato. El tiosulfato o carbonato de sodio se usan como estabilizadores (Hernández y Contreras, 1992; Hetzel y Dunn, 1989). Arroyave y colaboradores (1955) mostraron la estabilidad del yodato de potasio en la sal de uso común en Guatemala.

El nivel de fortificación debe ajustarse para llenar los requerimientos diarios (100 a 150 μg), según el consumo estimado de sal. Este último varía de 2 a 20 g. En general la cantidad de yodo agregada es de 20 a 100 ppm (μg I/g sal). La legislación guatemalteca exige un nivel de 60 a 100 ppm de yodo añadido como yodato de potasio, usando carbonato de potasio como estabilizador. Los datos de Scrimshaw y colaboradores (1966) mostraron

claramente el efecto en reducción de la prevalencia de bocio en escolares, de 38 a 5.2%, después del establecimiento del programa nacional de yodización de la sal. Al descuidarse el control de la fortificación los datos de prevalencia de bocio volvieron a subir a un 20.4% en 1987 (Hernández y Contreras, 1992).

2. Aceite Yodado

El aceite yodado se usa principalmente en áreas donde la rápida corrección de la deficiencia es urgente y donde no está disponible la sal yodada. La mayor limitación de estos programas consiste en que es preciso hacer contacto con cada una de las personas afectadas.

Las preparaciones usuales son a base de aceites yodados (enlaces covalentes con el yodo) que pueden tener hasta 38% de yodo (p/p). El aceite yodado puede ser introducido por vía oral o intramuscular. El material inyectado se libera lentamente del depósito muscular, es desyodinado en el músculo o la circulación y presentado a la tiroides como yoduro. Por vía oral los ácidos grasos yodados pueden perder el yodo en el intestino o en la circulación y la tiroides capta el yodo como yoduro. Además una fracción puede almacenarse como ácidos grasos yodados, con lenta liberación del yodo a la circulación. La duración del efecto de una inyección de aceite yodado es de por lo menos tres años. La duración del efecto del aceite yodado por vía oral es menor, debido a que no existe almacenamiento muscular, pero es efectiva por lo menos para cubrir un año.

Aunque se requiere la intervención directa de personal, la administración de aceite yodado no presenta problemas de logística asociados con la fortificación de sal. Es recomendada su aplicación cuando los programas de fortificación de la sal no pueden ser implementados a corto plazo y la deficiencia de yodo es severa. Sin embargo debe tenerse en cuenta que existen riesgos por el uso inapropiado de jeringas y por toxicidad por exceso de yodo (Dunn y Van der Haar, 1992; y Hetzel y Dunn, 1989).

3. Yodación del agua

En algunos casos se ha usado con efectividad la yodación del agua potable. Esto se hace añadiendo yodo a la fuente de agua, sea en forma de cristales o como soluciones de KI, KIO₃, o I₂. Esta técnica se puede usar en pequeña escala a nivel del hogar o en las escuelas, o bien a gran escala, yodando los depósitos o represas. La ventaja es que la población recibe dosis fisiológicas de yodo en forma constante, en vez de una sola dosis excesiva (Dunn y Van der Haar, 1992; y Hetzel y Dunn, 1989). Este método cubre actualmente a 8 millones de personas en el norte de Tailandia (Dunn y Van der Haar, 1992), así como a poblaciones de Malasia y Troina, Sicilia (Hetzel y Dunn, 1989).

4. Otras vías de suministro

Lugol: Esta es una preparación ampliamente conocida aún en pequeños centros de salud rurales, pues es usada como antiséptico. El lugol está hecho a base de I₂ y KI. El efecto es de menor duración que el del aceite yodado, pues no hay almacenamiento. La ventaja es que puede suplementarse a la población en dosis cercanas a las necesidades fisiológicas, pero requiere personal responsable para su distribución frecuente. En Bolivia se ha usado con éxito, después de la capacitación de maestros de escuela (Dunn y Van der Haar, 1992).

Otros vehículos: En Holanda y Australia se ha usado el pan como vehículo, pero sólo en comunidades pequeñas y bien controladas. Otra posibilidad son las tabletas de vitaminas, como las usadas en Tasmania en un intento de llegar a niños escolares y mujeres embarazadas a través de clínicas materno infantiles. En México se ensayó la fortificación de dulces, y en Bangkok se han desarrollado salsas de pescado y de soya. Esto se encuentra todavía a nivel de experimento local (ejemplos citados en Hernández y Contreras, 1992).

F. DIAGNOSTICO DE LA DEFICIENCIA DE YODO Y METODOS ANALITICOS

1. EVALUACIONES EPIDEMIOLOGICAS

Se discutió en el capítulo anterior la importancia de los desórdenes causados por la deficiencia de yodo. Además del detrimento en crecimiento y desarrollo físico e intelectual, se proporcionó evidencia del impacto desfavorable de la deficiencia de yodo en el desarrollo socioeconómico de las poblaciones afectadas. Para establecer la existencia de la deficiencia de yodo y tomar las medidas correctivas necesarias, es por lo tanto indispensable realizar un diagnóstico de la deficiencia. Para hacer inferencias sobre el estado nutricional de yodo de una población se evalúan indicadores, que como su nombre lo indica deben llamar la atención y dar información sobre determinada condición de la población. De acuerdo a los objetivos del programa de vigilancia se puede medir el estado de la deficiencia o bien la evolución de un programa de control de la deficiencia.

Los indicadores empleados para evaluar el estado nutricional en yodo se refieren a la exposición (como el yodo urinario, que refleja la ingesta de este elemento) o al impacto en morfología (tamaño de la tiroides) o en función (hormonas tiroideas). Los indicadores de la severidad de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo en poblaciones pueden dividirse en indicadores clínicos y bioquímicos. Los indicadores clínicos son evaluación del tamaño de la tiroides (prevalencia de bocio) y la prevalencia de cretinismo (u otras anomalías en el desarrollo neurológico). Se consideran indicadores bioquímicos de la deficiencia de yodo la medición del yodo urinario y el análisis de hormonas tiroideas. Otro estimador del estado nutricional de la población en cuanto a yodo es la medición de la disponibilidad dietética de yodo.

Para medir la deficiencia de yodo en una población los medios más sencillos y valiosos son las encuestas de bocio y las determinaciones de yodo urinario. Algunas veces es posible obtener información adicional derivada de la prevalencia de cretinismo y frecuencia de retardo mental. Las otras pruebas de laboratorio sirven para investigaciones más específicas, o en asociación con otras evaluaciones, pues son más costosas y difíciles (Dunn y Van der Haar, 1992).

a. Prevalencia de Bocio y Cretinismo

Palpación de tiroides

Frecuentemente la deficiencia de yodo en una población puede predecirse con base en el conocimiento de su situación geográfica. Un indicador objetivo es el diagnóstico de bocio. Como ya se discutió anteriormente, éste se acompaña de daño cerebral, retardo mental, abortos y mortalidad infantil. Por lo tanto es importante documentar la prevalencia de bocio para determinar si estas consecuencias más graves se encuentran presentes. En casi todas las áreas, si se encuentra bocio en una proporción grande (más del 10%) de la población, suele ser el resultado de deficiencia de yodo y no de otra causa (Dunn y Van der Haar, 1992). El tamaño de la glándula tiroides, cuando es una adaptación fisiológica a la deficiencia de yodo, varía inversamente a la ingesta de yodo (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993). El método tradicional para determinar el tamaño de la tiroides es la palpación, aunque la ultrasonografía es un método más objetivo y preciso (aunque requiere equipo especializado).

Basándose en que la prevalencia de bocio en una población sin deficiencia de yodo, es inferior al 1%, el panel de expertos de WHO/UNICEF/ICCIDD recomendó, en 1993, que se considere un problema de salud pública una prevalencia de más de 5% de bocio en escolares de 8 a 10 años. Los criterios epidemiológicos propuestos para evaluar la severidad de la deficiencia de yodo con base en la prevalencia de bocio en escolares se resumen en el cuadro siguiente.

Cuadro 3. Criterios para clasificación de la Severidad de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (DDY), con base en la prevalencia de bocio

Grado de Severidad de los (DDY)	Prevalencia de Bocio
Leve	5.0-19.9%
Moderado	20.0-29.9%
Severo	≥ 30%

Fuente: WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993.

El mismo comité recomendó también un nuevo sistema de clasificación del grado de bocio, agrupando en tres los cinco grados que se utilizaban anteriormente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación del tamaño de bocio

Clasificación		Descripción
Anterior	Actual	
0	0	No hay bocio visible ni palpable
1A	1	Es posible palpar la tiroides (cada lóbulo es más grande que la falange terminal del pulgar), pero no es visible con la cabeza hacia adelante. Pueden existir nódulos. Los grados 1A y 1B se diferenciaban porque en el grado 1B sí se ve la tiroides con la cabeza hacia atrás.
1B		
2	2	La tiroides es visible con el cuello del individuo en posición normal. Grado 3 era cuando el agrandamiento es tal, que es visible a 10 metros de distancia.
3		

Fuentes: WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993; y Dunn y Van der Haar, 1992.

La ultrasonografía es una opción más confiable que la palpación manual de la tiroides, por ser más precisa. El equipo es portátil pero requiere fuente de energía. Con frecuencia no es práctico para uso de rutina en encuestas (Dunn y Van der Haar, 1992; y WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993).

Cretinismo

La determinación de cretinismo debe realizarse en áreas de bocio endémico donde la deficiencia severa de yodo está casi confirmada. Como el cretinismo resulta de una deficiencia muy severa durante la etapa intrauterina o la infancia temprana, la presencia de cretinos en una población es muy indicativa, aún cuando la prevalencia no sea muy alta. Deben investigarse también las diferentes formas de deficiencia mental y estados patológicos asociados. En la mayor parte de los casos se encuentran formas mixtas de cretinismo y no las formas clásicas (cretinismo neurológico e hipotiroideo). La tasa de prevalencia de cretinos, subcretinos o cretinoides puede ser muy difícil de evaluar, pues el diagnóstico clínico tiene múltiples expresiones y requiere exámenes neurológicos y psicológicos a conciencia (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993).

b. Estimación de la ingesta o disponibilidad de yodo

La concentración de yodo en el agua potable en las comunidades generalmente refleja la concentración de yodo en la tierra, y por lo tanto es un indicador de la disponibilidad de yodo a partir de los alimentos producidos localmente (Hernández y Contreras, 1992). Este es un análisis sencillo, aunque con la apertura de mercados comerciales pierde un poco de sentido.

Cuando se establecen programas de control de la deficiencia de yodo, es necesario establecer mecanismos de evaluación del progreso del programa, así como indicadores del impacto de estos programas en la comunidad. La intervención utilizada con mayor frecuencia es la yodización de la sal. Como una medida de control de la calidad del proceso, es necesario medir el nivel de yodización en las diferentes etapas producción y comercialización del producto hasta la mesa del consumidor. Si lo que interesa es la evaluación de impacto, es necesario realizar el análisis de la sal a nivel intradomiciliar, o agrupando en centros comunitarios como escuelas o centros de salud (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993).

En áreas donde la epidemia de bocio y cretinismo no se explica totalmente por una deficiencia de yodo, debe investigarse también la presencia de bociógenos. El ión tiocianato, derivado metabólico de tioglicósidos y glicósidos cianogénicos, está asociado con la presencia de bocio endémico. Por lo tanto deben evaluarse el balance entre la ingesta de yodo y la de compuestos productores de SCN^- , y los niveles de tiocianato sérico y urinario. Concentraciones de SCN^- mayores de 0.5 mg/dL en suero y 1.0 mg/dL en orina sugieren un nivel peligroso de ingesta de sustancias bociógenas.

c. Yodo urinario

La excreción diaria de yodo urinario sigue siendo el mejor índice del estado nutricional de yodo para poblaciones (Bourdoux, *et al.*, 1986). La concentración de yodo en la orina es el marcador bioquímico más usado para la detección de la deficiencia de yodo por varias razones. Desde el punto de vista fisiológico, la excreción del yodo ingerido es, en su mayoría (más del 90%), a través de la filtración renal. La excreción urinaria no varía con la necesidad de yodo que tenga el organismo, pues la regulación se lleva a cabo en la tiroides. Así, la excreción urinaria es reflejo de la ingesta de yodo en un período corto anterior a la toma de la muestra. La prueba más directa de una ingesta deficiente de yodo es un bajo nivel de yodo urinario. Vought y London (1963) demostraron la existencia de correlación directa entre la ingesta de yodo y la excreción urinaria. La captación de yodo por la tiroides, que en definitiva expresa la necesidad y el estado nutricional de yodo en el organismo correlacionó inversamente con la excreción urinaria de yodo (Follis *et al.*, 1962).

Por otro lado, desde el punto de vista epidemiológico, la toma de una muestra de orina es fácil por no ser un procedimiento invasivo, como podría ser la toma de muestra de sangre. El tratamiento de la muestra es sencillo, por la relativa estabilidad del yodo en la orina (Dunn *et al.*, 1993; y WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993). Finalmente, el análisis de yodo es técnicamente más simple y menos costoso que otras técnicas bioquímicas (medición de hormonas o captación de ^{131}I) (Dunn *et al.*, 1993).

Debe tenerse sumo cuidado con la interpretación del resultado del análisis de yodo urinario a nivel individual, porque la información que brinda este parámetro es sobre la ingesta reciente de yodo y no sobre el estado de reservas del elemento en la tiroides. La variabilidad del aporte diario de yodo en la dieta es muy alta, así que una muestra casual no aporta información completa acerca del estado nutricional del individuo. Además de la variación intraindividual, la variación entre individuos también es elevada. Sin embargo, el yodo urinario como indicador poblacional es significativo: valores bajos de excreción urinaria simultáneamente en muchos individuos en una población son característicos de deficiencia de yodo (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993).

La muestra más confiable para la prueba es la recolección de orina de 24 horas. Aun en muestras de 24 horas hay una variación diaria considerable, pero los niveles son más consistentes en poblaciones deficientes que en aquellas con adecuado abastecimiento de yodo (Dunn *et al.*, 1993). Esto no es práctico en encuestas a gran escala, así que en estos casos se usan muestras casuales. Las muestras pueden inducir un error debido a su dilución o concentración según el estado de hidratación al momento de la recolección. Este problema se reduce usando un número estadísticamente aceptable de muestras (en general el mínimo posible son 40 a 50 muestras), con lo cual se anulan entre sí las diferencias debidas a la concentración de la orina. Datos de Bourdoux y colaboradores (1986) muestran que con un número suficiente de muestras, los resultados de muestras casuales son semejantes a los de recolecciones de 24 horas en las mismas poblaciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentraciones medias de yodo urinario en recolecciones de 24 horas y en 50 o 100 muestras casuales de individuos de Bruselas, Bajo Zaire, Kivu y Ubangi.

Area	Concentración ⁺ de yodo urinario en muestras de 24 horas ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración ⁺ de yodo urinario en 50 muestras casuales ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración ⁺ de yodo urinario en 100 muestras casuales ($\mu\text{g/dL}$)
Bruselas	5.3 \pm 4.3	5.3 \pm 4.3	5.3 \pm 4.3
Bajo Zaire	4.0 \pm 1.9	4.1 \pm 2.1	4.6 \pm 2.2
Kivu	2.7 \pm 1.3	2.5 \pm 1.5	2.5 \pm 1.4
Ubangi	2.3 \pm 1.6	2.4 \pm 2.2	2.4 \pm 2.1

⁺ Media \pm D.S.

Fuente: Bourdoux, *et al.*, 1986.

Se ha sugerido también la recolección de la primera micción, para reducir el efecto de ingesta previa de comida (Gibson, 1990). Otras opciones son la recolección de orina durante determinado período de tiempo, igual para todas las muestras. A la fecha no se ha uniformizado el criterio de recolección.

La expresión de los resultados del análisis de yodo urinario también ha sido objeto de bastante discusión. Los resultados expresados como concentración, microgramos de orina por decilitro de orina están sujetos a los errores discutidos anteriormente. Para corregir estos errores se había usado el valor de creatinina urinaria, que es supuestamente constante. Frey y colaboradores (1973) encontraron buena correlación entre valores de yodo por gramo de creatinina en muestras casuales de orina, tomadas en la tarde, y el yodo excretado en 24 horas. Sin embargo el valor de creatinina excretada depende de la masa muscular, y por tanto varía con el sexo y el tamaño. Bourdoux y colaboradores (1986) encontraron que en poblaciones donde hay desnutrición proteico-calórica asociada con la deficiencia de yodo el indicador yodo por gramo de creatinina no es adecuado, pues da valores falsamente normales debido a una excreción muy baja de creatinina. El caso fue demostrado en dos regiones africanas en comparación con Bruselas. En Kivu se encontró una fuerte desnutrición proteico-calórica y una prevalencia de bocio de 12.5%. Aunque la excreción diaria de yodo era similar en los dos poblados, los resultados expresados como μg de yodo

por gramo de creatinina, en el caso de Kivu, son incluso mayores a los de Bruselas. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de los valores de yodo, creatinina y el radio de ambos en dos regiones de Zaire (Kivu y Ubangi) y en Bruselas

Parámetro medido	Area		
	Kivu	Ubangi	Bruselas
Yodo urinario ($\mu\text{g}/\text{día}$)	14.7	15.5	51.2
Creatinina ($\text{g}/\text{día}$)	0.40	0.61	0.80
Radio I/creat. ($\mu\text{g}/\text{g}$)	60	29	54

Fuente: Bourdoux, *et al.*, 1986.

La última recomendación del Comité Internacional para la Corrección de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (Dunn *et al.*, 1993) es que se expresen los resultados de las encuestas sólo como una concentración, en μg de yodo por decilitro de orina. Esta decisión se tomó para simplificar el trabajo de análisis, con el criterio que en una encuesta es mejor asesorar un número grande de muestras semicuantitativamente, en vez de unas pocas muestras muy exactamente. En este caso se entiende por exactitud la determinación de un valor de yodo urinario que refleje la condición nutricional real de la población bajo estudio, no la exactitud para medir el yodo presente en la muestra que se toma (Dunn *et al.*, 1993). Con base en la recomendación de expresar yodo en $\mu\text{g}/\text{dL}$ de orina, se establecieron los siguientes criterios epidemiológicos para determinar la gravedad de la deficiencia y la urgencia de su corrección (Cuadro 7).

Cuadro 7. Criterios Epidemiológicos Propuestos como Indicadores de la Severidad de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo

Estadío	Manifestaciones Clínicas ¹			Mediana Yodo urinario ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Necesidad de Corrección
	Bocio%	Hipotiroidismo	Cretinismo		
Leve	5-19.9	0	0	5.0-9.9	Importante
Moderado	20-29.9	+	0	2.0-4.9	Urgente
Severo	> 30	+++	++	< 2.0	Crítica

¹ 0 = Ausente; +, ++, +++ = presente, en orden ascendente

Fuente: WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993.

d. Otras pruebas

Medición de hormonas tiroideas y TSH

Los niveles de TSH en sangre total o suero reflejan la disponibilidad de hormona tiroidea para los tejidos. El cuadro típico en presencia de hormonas es un aumento marcado en el nivel sérico de TSH y niveles muy bajos de T_4 total y T_4 libre, y un nivel normal o ligeramente alto de T_3 (Gibson, 1990). El nivel de TSH es el mejor indicador de hipotiroidismo. Un nivel elevado de TSH en el neonato o infante es preocupante porque indica que el nivel de hormona tiroidea es inadecuado durante una época crítica del desarrollo del cerebro (Dunn y Van der Haar, 1992). El análisis de TSH, T_3 y T_4 se ha abaratado con el desarrollo de métodos para medir las hormonas en sangre seca adsorbida a papel filtro (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993).

En áreas sin deficiencia de yodo, la proporción de recién nacidos hipotiroideos es de 1 en 4,000. Esto se debe a alguna falla en el desarrollo de la glándula tiroidea durante el período fetal. La medición de TSH o tiroxina (T_4) en muestra de sangre de cordón umbilical

es rutina en programas nacionales de control de hipotiroidismo en Europa, Japón y Norte América. La documentación de la prevalencia de hipotiroidismo neonatal (que en áreas con deficiencia de yodo puede ser superior al 10%) es una ayuda para la demostración de la severidad de los DDY (Dunn y Van der Haar, 1992).

Tiroglobulina

Cuando hay una ingesta insuficiente de yodo, las células de la tiroides proliferan y se vuelven hiperplásicas. Este elevado recambio de células produce la liberación de tiroglobulina (Tg) hacia la sangre. Los cambios en Tg sérica son inversamente proporcionales a la ingesta de yodo. Cuando existe depleción de yodo se evidencia elevación de Tg antes de que TSH se eleve y mucho antes de que se desarrolle bocio. En poblaciones normales la mediana de Tg sérica es de 10 ng/mL. El límite superior normal es de 20 ng/mL (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1993).

Captación de yodo radioactivo

Esta prueba es sofisticada y costosa, pero provee información directa sobre la disponibilidad de yodo para la tiroides. Cuando no hay suficiente disponibilidad la avidéz de la tiroides por el yodo es muy alta, y esto se puede medir utilizando el isótopo radioactivo ¹³¹I y su concentración en la tiroides después de una dosis oral de yodo marcado (Dunn y Van der Haar, 1992; y Hernández y Contreras, 1992).

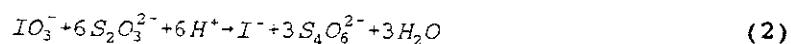
2. METODOS GENERALES DE ANALISIS DE YODO EN MATERIAL BIOLÓGICO O ALIMENTOS

a. Análisis volumétrico de yodo (para sal fortificada)

En análisis químico, los compuestos de yodo usualmente determinados son el yodo, I_2 , el ión yodato, IO_3^- , y el ión yoduro, I^- . El yodo es poco soluble en agua, pero su solubilidad aumenta en presencia de yoduros, por formación del triyoduro (I_3^-). Esta especie se reduce fácilmente a I^- , pero por el potencial normal de la reacción



hace que la oxidación de yoduro a triyoduro también sea posible, usando oxidantes fuertes. Por esta razón el yodo es ampliamente usado en volumetría. Los métodos directos usan yodo para cuantificar al agente reductor, mientras que en los métodos indirectos, los oxidantes se analizan haciéndolos reaccionar con exceso de yoduro, y el yodo liberado se cuantifica con un reductor patrón (tiosulfato o arsenito de sodio) (Ayres, 1970). Este es el principio de la determinación de yodato en la sal fortificada con yodato de potasio (Mazariegos y Dary, 1992). La ecuación global es la siguiente:



El método permite detectar hasta $5 \mu\text{g/g}$ sal (ppm), pero la cantidad neta detectable de yodo es de alrededor de $250 \mu\text{g}$, pues se requieren 50 g de sal para el análisis. Esto impide el uso de este método a muestras biológicas, donde la concentración de yodo es de unos $10 \mu\text{g/dL}$ ($0.1 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo el método es rápido y sencillo para analizar sal, pues no requiere más equipo que una bureta y un agitador magnético. Para determinar yodo total en la muestra, debe incluirse un paso previo de oxidación de todo el yoduro presente a yodato, por adición de agua de bromo.

b. Métodos de análisis de yodo en matrices biológicas

En muestras biológicas o en alimentos compuestos, el yodo se encuentra a niveles traza, en el orden de los nanogramos. Por otro lado antes del análisis se hace necesaria la destrucción de materia orgánica compleja (Mahesh *et al.*, 1992), que de otro modo dificulta el análisis, por lo que se hace necesario una digestión previa de la muestra.

Hay métodos muy precisos y exactos para medir yodo. Una técnica muy sensible para el análisis es el método de activación de neutrones. El método se basa en la irradiación de la muestra y la separación radioquímica del ^{125}I . Johansen y Steinnes (1976) analizaron material vegetal de referencia y encontraron una precisión del 4.3% a nivel de 0.05 ppm (5 $\mu\text{g}/100\text{g}$) y de 10% para un nivel de 0.005 ppm (0.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$). El análisis está sujeto a errores en la extracción química del yodo, pero presenta excelente recuperación. Sin embargo se requiere de un reactor para irradiar la muestra con un flujo termal de neutrones, lo cual hace prácticamente imposible su utilización como método de rutina.

La espectrometría por fluorescencia de rayos X también requiere instrumentación (fuente de excitación isotópica) y preparación de la muestra especiales. Para el análisis en leche tiene un límite de detección de alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (Crecelius, 1975). El método de electrodo selectivo es aplicable al análisis de yodo, usando la técnica de adición conocida de estándar (Crecelius, 1975; y Miles, 1978). El método fue comparado con los resultados obtenidos por activación de neutrones (Miles, 1978) y por fluorescencia de rayos X (Crecelius, 1975). El rango de variación fue de 0.4 a 8.4%, y los resultados correlacionaron bien con los que se obtuvieron con activación de neutrones (Miles, 1978). El método es más sencillo que los dos anteriores. Sin embargo el tiempo de análisis es alto para cada muestra, porque se necesita un tiempo de equilibrio para cada muestra, a temperatura constante. Por otro lado el electrodo responde sólo a yoduro libre y no es totalmente selectivo, pues responde también a los iones bromuro y cloruro, o compuestos sulfhidrilo. Puede haber problemas de cambios de respuesta del electrodo en matrices con sustancias que obstruyen la membrana semipermeable del electrodo (Thompson *et al.*, 1983).

Otra opción con equipo especializado es el análisis de yodo por cromatografía de gases, por conversión del yodo a yodobutanona y cuantificación con detector de captura

electrónica (Bakker, 1977). El método desarrollado por Bakker se aplica a yodo inorgánico en leche y elimina la digestión previa de la muestra. La recuperación es de 94-96%, con un límite de detección de 0.8 $\mu\text{g/dL}$. Pueden procesarse unas quince muestras diarias. Según Thompson y colaboradores (1983) el método puede tener errores debidos a una derivatización incompleta del yodo a la yodocetona y a niveles cambiantes de proteína y lípidos en la muestra.

En el análisis polarográfico de yodo, también importa la forma iónica del yodo, y tiene interferencias por metales, pero es posible agregar reactivos que enmascaren el efecto de compuestos electroactivos (Fosfato de calcio dibásico para eliminar la interferencia del zinc, por ejemplo) y conviertan el yodo presente a una sólo forma iónica (adicción de agua de bromo para oxidar el yoduro a yodato) (Thompson *et al.*, 1983). Estos autores lograron un límite de detección de 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, con un coeficiente de variación de 7.7%, y recuperaciones de 89 a 108%. Esta es una opción favorable para el análisis de yodo en alimentos. Otra opción es la amperometría, aplicando un voltaje constante y determinando el punto final de la titulación yodo-tiosulfato mediante un cambio abrupto de la corriente. Este método fue usado por Barkley y Thompson (1960) para el análisis de agua de mar, con concentraciones de 6 $\mu\text{g/dL}$.

Para el análisis de yodo urinario y últimamente para análisis de alimentos, se ha utilizado el método espectrofotométrico, debido a que éste sólo necesita equipo sencillo de laboratorio y porque se presta fácilmente a la automatización. Aunque se ha usado la reacción de Feigl, que consiste en la formación temporal de un color azul (lectura a 600 nm), por reacción del yodo con tetrabase y cloramina T (Joerin, 1975), la reacción más ampliamente usada para cuantificar yodo en muestras biológicas es la reacción caracterizada por Sandell y Kolthoff (1937), que lleva su nombre. Se basa en que el yoduro actúa como catalizador de la reducción del ión cérico Ce^{4+} a ión ceroso Ce^{3+} acoplado a la oxidación del arsenito As^{3+} , a As^{5+} . La reacción neta es:



El Ce^{4+} es amarillo, mientras que el Ce^{3+} es incoloro. Esto permite, manteniendo las demás condiciones constantes, cuantificar el yodo mediante la desaparición del color amarillo. La reacción catalítica tiene efecto amplificador y es sensible a muy pequeños cambios en la concentración del catalizador.

Rodríguez y Pardue (1969a, 1969b) estudiaron en detalle las condiciones de reacción en un medio fuertemente ácido. De ese estudio se desprenden conclusiones interesantes sobre el análisis. Se ha observado que la reacción es de primer orden con respecto de la concentración de cerio $Ce(IV)$ para un amplio rango de concentraciones de cerio. En exceso de cerio sobre arsénico $As(III)$, la reacción se vuelve de orden cero para el cerio. El arsénico tiene el mismo comportamiento. La reacción es de primer orden para el yodo, para concentraciones bajas de yodo, siempre que se mantenga un radio $[I^-]/[As(III)]$ muy bajo. La especie catalíticamente activa es el ión yoduro, el yodato IO_3^- y el I_2 son inactivos. El cerio y el arsénico están en cierto grado de competencia por reaccionar con los diferentes estados intermediarios de oxidación del yodo en la reacción, por lo que se debe tener un exceso de $As(III)$ sobre $Ce(IV)$, para evitar la oxidación de la forma catalíticamente activa, I^- . El papel del yodo es altamente específico, pues el yodato, cloruro y bromuro tienen muy baja actividad catalítica. Otros factores afectan la reacción: Esta es definitivamente dependiente de la temperatura; el ión cloruro actúa estabilizando la actividad catalítica del yodo; y el ácido sulfúrico aumenta la velocidad de reacción, aunque sin un orden de reacción específico (Dunn *et al.*, 1993; y Rodríguez y Pardue, 1969). Truesdale y Smith (1975) también evaluaron las condiciones de análisis, para la adaptación de la reacción a diferentes matrices y concentraciones. En resumen, es posible la aplicación de este método al análisis de yodo en diversas matrices biológicas, estableciendo las condiciones de análisis óptimas.

En matrices complejas, es necesario la digestión de materia interferente antes del análisis. Los alimentos y los tejidos por su composición, generalmente requieren condiciones más fuertes. En orina se hace necesaria la digestión para eliminar iones complejos, como el tiocianato (May *et al.*, 1990) o el ácido ascórbico (Ford y Johnson, 1991), que interfieren en la reacción. Sin embargo, no hay necesidad de las condiciones drásticas de reacción que se requieren para alimentos y tejidos. En muestras biológicas, los métodos de digestión comúnmente utilizados derivan de los que se usaron para el análisis de yodo unido a

proteína, que fue el método utilizado como estimación indirecta del nivel de hormonas tiroideas en el suero (Benotti y Benotti, 1963). Este usa una digestión húmeda con ácido clórico. En alimentos se ha usado de preferencia la digestión seca (Belling, 1983; Lauber, K., 1975; Mahesh, *et al.*, 1992; y Moxon y Dixon, 1980) con resultados satisfactorios. La digestión ácida ha dado resultados adecuados para muestras de orina y es la técnica de digestión más utilizada (Dunn *et al.*, 1993). Debido a la posible presencia de interferentes (tiocianato, ácido ascórbico y posiblemente metabolitos de medicamentos) en la orina, no se recomienda el método automatizado de Garry *et al.* (1973) que sustituye la digestión ácida por una diálisis. Las condiciones para el análisis final de yodo presentadas en este artículo no son muy diferentes a las de métodos oficiales (Fisher y L'Abbé, 1981; y Fisher *et al.*, 1986), en donde se utiliza un autoanalizador (Technicon AutoAnalyzer) para registrar los picos de transmitancia de la muestra al reaccionar con los reactivos de sulfato cérico amónico y ácido arsenioso.

La mayoría de los métodos de rutina son métodos espectrofotométricos de punto final, es decir que se registra la absorbancia o transmitancia de la muestra a un intervalo de tiempo fijo después de la adición de los reactivos. Cuando no se usa el autoanalizador, el punto crítico en estas determinaciones es la replicabilidad del intervalo de tiempo de medición de los estándares y de las muestras. En el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá se ha usado un método espectrofotométrico de punto final (Dary y Licht, 1991) y se ha visto que el análisis requiere bastante habilidad técnica y se pueden procesar no más de 40 muestras diarias.

Algunos autores (Knapp, 1974; Lauber, 1975; y Mahesh *et al.*, 1992) han utilizado la reacción de Sandell-Kolthoff para el análisis cinético de yodo, siguiendo la disminución de absorbancia de la muestra en el tiempo. En estos casos la curva de calibración se hace con base en el cambio de Absorbancia por unidad de tiempo contra concentración de yodo. Esta modificación hace aún más sensible el análisis, pero hasta el momento no se ha automatizado el análisis, de modo que el número de muestras que pueden procesarse diariamente no es muy grande.

III. JUSTIFICACION

Uno de los requerimientos más importantes en los programas de control y monitoreo de la deficiencia de yodo es el análisis de laboratorio. A nivel de control de calidad de la fortificación, el análisis de la concentración de yodo en el alimento (sal en el caso de Guatemala) permite evaluar el cumplimiento y eficiencia del proceso de yodación. Para evaluar el impacto (eficacia) de una intervención y seguir el progreso de la corrección de la deficiencia se hace necesario el análisis de muestras biológicas de las poblaciones.

El trabajo de los laboratorios en INCAP requiere el procesamiento rápido de un número elevado de muestras. Además el laboratorio requiere exactitud y precisión aceptables en las metodologías analíticas.

El método anteriormente usado para yodo urinario requería un alto grado de competencia técnica, debido a que las muestras son procesadas en serie y las mediciones deben hacerse a intervalos de tiempo exactos. Esto limita el número de muestras que se pueden procesar a la vez y también puede inducir un "error de cola", ya que se puede ir acumulando el tiempo de lectura en las muestras al final. En la experiencia de los laboratorios de INCAP, se pueden procesar cerca de 40 muestras diarias con este método. El rango de concentraciones medibles va de 2 a 16 μg yodo por decilitro de orina. Las ventajas de un análisis cinético en microplaca se consideraron en términos de tiempo, reducción del error humano, costos y seguridad. Estos factores hicieron que se desarrollara la metodología analítica utilizando un recurso disponible en el laboratorio, un lector de microplacas con capacidad cinética.

Durante la caracterización y análisis del nuevo método se identificaron divergencias en cuanto a los principios generales para la validación de métodos analíticos (Carey y Garber, 1989; Copeland, 1989; Garber y Carey, 1989; Garfield, 1993; y Hearn, 1992). Por lo tanto, fue necesario establecer una guía que describiera procedimientos sistemáticos y sencillos para la validación, caracterización y control de

calidad de los métodos desarrollados. Esto asegura la calidad del laboratorio y la confiabilidad en los resultados analíticos generados por el mismo.

La adaptación del método para determinación de yodo urinario al análisis de yodo en sal se consideró como una opción para facilitar el trabajo del laboratorio. La titulación oxidorreductiva con tiosulfato de sodio es un método adecuado para determinar yodo en la forma de yodato. Esta es la forma usual en la que el yodo se encuentra en la sal fortificada en Guatemala. Sin embargo, hay sales fortificadas con yoduro de potasio. Estas son sales provenientes de México o Estados Unidos. Para analizar yoduros la titulación oxidoreductiva es menos sensible e involucra el uso de agua de bromo, reactivo que no es recomendable por su toxicidad. El método cinético desarrollado en este trabajo de tesis permite determinar yodo total, lo cual simplifica el análisis de muestras en las que se desconoce el compuesto de yodo usado para fortificación.

Finalmente la adaptación del método de creatinina urinaria a una versión cinética en microplaca, demostró la aplicabilidad del equipo usado para casi cualquier análisis espectrofotométrico. Se considera que los métodos en microplaca proveen una opción adecuada en cuanto a seguridad, por la reducción del volumen de desechos tóxicos; en cuanto a costos, por disminución de la cantidad de reactivos y el tiempo personal; en cuanto a procesamiento de los datos obtenidos, por la posibilidad de análisis directo de los datos. La exactitud y precisión de los métodos por microplaca es igual o mejor que los métodos anteriormente usados.

IV. OBJETIVOS

- A. Implementar el uso del lector de microplacas para adaptar métodos espectrofotométricos de análisis a cinéticos, aumentando así la capacidad y confiabilidad de los análisis del laboratorio.
- B. Determinar las condiciones de análisis para el ensayo microcinético de la catálisis del yodo en la reacción de oxidorreducción entre As(III)/Ce(IV), que permitan la máxima sensibilidad en la detección en las muestras de orina con bajo contenido de yodo.
- C. Desarrollar el método de análisis de creatinina urinaria en microplaca por medición cinética del cambio de absorbancia del complejo formado por la creatinina y el picrato de sodio (Complejo de Janowski).
- D. Montar un método de análisis microcinético de yodo en sal, determinando la aplicabilidad del método a compuestos diferentes de yodo (sales de yoduro y yodato).
- E. Dejar establecida una guía de los procedimientos necesarios para la validación de métodos espectrofotométricos que se implementen en el Laboratorio Especializado de Química y Bioquímica del INCAP.
- F. Presentar un estudio de evaluación de los métodos desarrollados, en relación a los métodos usados como punto de partida, incluyendo la comparación del "rendimiento" analítico de los métodos (linealidad, límite de detección, sensibilidad, resolución y otros parámetros) y un estudio de costos.

V. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES Y EQUIPO

Los materiales y reactivos utilizados se describen en los protocolos de las metodologías analíticas desarrolladas, Anexos A-F.

El equipo utilizado para la adaptación de los métodos espectrofotométricos fue un lector de microplacas de la compañía Molecular Devices, modelo UVmax. El aparato utiliza placas de 96 pozos en un arreglo de 12 x 8 pozos. Esto permite la lectura simultánea de 96 soluciones. En adición el equipo tiene opción cinética, así que se pueden seguir cambios de absorbancia en el tiempo de los en 96 pozos simultáneamente, repitiendo la lectura de toda la placa a intervalos de tiempo que se pueden fijar a partir de 5 segundos. Cada pozo tiene capacidad máxima de 0.300 mL. Las especificaciones del equipo son las siguientes:

Especificaciones del Lector cinético de microplacas, Uvmax Kinetic Microplate Reader de Molecular Devices, Menlo Park, California.

Lámpara	Tungsteno halógeno (25 Watts)
Calibración y Alineamiento óptico	Automático
Rango de medición	0.000-4.000 Absorbancia (A 405,450,490 y 650 nm)
Tiempos de lectura	Punto final: 5 segundos (para los 96 pozos de la placa) Cinética: Intervalos mínimos de 5 s entre cada lectura
Resolución	0.001 OD
Reproducibilidad (Alrededor de 405 nm)	Exactitud: Variación $\leq 2.0\%$ y ± 0.010 OD Precisión: Variación $\leq 2.0\%$ y ± 0.005 OD
Software asociado para manejo del equipo a través de una computadora personal: Softmax 2.02	

Para los análisis espectrofotométricos usuales se usó un espectrofotómetro UV-Visible, modelo Varian 635.

B. DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO DE CREATININA URINARIA

1. Desarrollo del método

Experimento 1. Condiciones óptimas de análisis en microplaca

Se prepararon reactivos en las concentraciones indicadas en el método Merck con premezcla (Anexo A) y se probó el método con estándares de 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 25.0 mg creatinina/dL (en HCl-0.02M). Las lecturas en el método de Merck se realizan a los minutos 1 y 6, por lo que se probó un tiempo de lectura de 10 minutos a partir de la adición del picrato alcalino, con lecturas cada 5 segundos. La concentración final en el pozo se conservó idéntica a la del método Merck, con una reducción proporcional de volumen a 0.3 mL. Se usaron 50 μ L de estándar y 250 μ L de picrato alcalino, en vez de 200 y 1000 μ L del método original, respectivamente.

El equipo permite seleccionar un parámetro llamado OD Limit. Este es un valor de absorbancia que se puede fijar antes o después de las lecturas y sólo afecta el cálculo de la velocidad, no los datos brutos. El programa calcula automáticamente la velocidad para cada pozo cuando el cambio de absorbancia en los pozos llega al valor de OD limit, aunque este tiempo sea menor al tiempo seleccionado para el análisis. Esto evita que la velocidad promedio sea calculada en un intervalo de tiempo donde ya se observa desviación significativa de la linealidad. Se analizó el efecto de variar el límite de absorbancia en la sensibilidad de las curvas obtenidas.

Se probaron otros tiempos de lectura: 6, 5, 4 y 3 min.

Finalmente se variaron las concentraciones finales de análisis, cambiando el volumen de picrato alcalino agregado, de 250 a 100 μ L. Se analizó el efecto del tiempo de preparación del reactivo en la sensibilidad de las curvas obtenidas. Al obtener las condiciones óptimas se pasó al Experimento 2, utilizando muestras de orina.

2. Validación y Caracterización del método

En general se siguieron los pasos listados en el manual de Validación y Caracterización de métodos adjunta en el Anexo G.

Experimento 2. Prueba de interferencias-Recuperación de analito

Se tomaron 10 mL de 5 muestras diferentes de orina y se les agregó 1.0 mL de solución estándar de creatinina, 250 mg/dL. La concentración añadida fue por lo tanto:

$$250 \frac{mg}{dL} * \frac{1mL}{11mL} = 22.73 \frac{mg}{dL}$$

Experimento 3. Método de adición de estándar

Se tomaron cinco alícuotas (10 mL) de la misma muestra. Se les agregó 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mL, respectivamente, de estándar de creatinina, 1250 mg/dL, respectivamente. El volumen agregado a cada alícuota se ajustó agregando la cantidad necesaria de HCl 0.02M para completar el volumen final a 0.4 mL. La cantidad de creatinina añadida fue entonces 0.00, 12.02, 24.04, 36.06 y 48.08 mg creatinina/dL. Se analizó cada alícuota en triplicado.

Experimento 4. Rango analítico y rango de trabajo

Se probaron concentraciones crecientes de creatinina, de 0 a 100 mg/dL y se calcularon las rectas de regresión generadas. En base a diferentes corridas, se establecieron también los límites de detección y de cuantificación, según el manual de Validación y Caracterización de métodos, Anexo G. También se calcularon intervalos de confianza para los estándares, con el objeto de estimar la resolución del método.

Experimento 5. Variación Intra y Entre ensayos

Se analizaron tres muestras, A, B y C 10. La variación entre ensayos se calculó analizando esas mismas muestras A, B y C en duplicado, en 7 corridas diferentes (con curva de calibración diferente cada vez y dilución nueva de cada muestra).

Experimento 6. Comparación con el método de referencia

Se analizaron en duplicado 20 muestras por el método en microplaca. Las muestras también se analizaron con el método de la casa comercial Sigma, cuyo procedimiento se describe en el Anexo A. Los datos se graficaron usando el eje x para los valores obtenidos por el método Sigma (macrométodo) y el eje y para el método en microplaca (micrométodo). El análisis estadístico fue el cálculo de la recta de regresión lineal, bondad de ajuste, e intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto.

C. DESARROLLO Y VALIDACION DE LOS METODOS PARA ANALISIS DE YODO

1. Desarrollo y validación del método de yodo urinario

El punto de partida para el desarrollo del método fueron las condiciones que se establecieron previamente en el laboratorio¹. Estas a su vez derivan del método "macro" de análisis de yodo urinario que se usaban anteriormente (Anexo C). El método usa los reactivos del método macro: ácido clórico para la digestión de la orina, ácido arsenioso y sulfato cérico amónico en la reacción básica de reducción del Ce (IV) por As (III). La concentración de los reactivos se mantuvo, excepto por el sulfato cérico, que se usó en una dilución 1:4 de la concentración original.

Las condiciones iniciales de análisis fueron colocar en cada pozo 50 μL de muestra o estándar digeridos, agregar 100 μL de ácido arsenioso a todos los pozos, dejar reposar por 15 minutos y agregar 100 μL de sulfato cérico amónico. Se registra la reducción de absorbancia a 405 nm, durante los dos minutos siguientes a la adición del sulfato cérico. Se analizó el efecto del cloruro de sodio en la reacción, la proporción de reactivos que diera la mayor sensibilidad de análisis y finalmente la proporción de muestra y ácido clórico en la digestión inicial de la orina. Una vez optimizadas las condiciones de análisis, se estudió el efecto de la forma química del estándar utilizado, corriendo paralelamente estándares de yodo preparados con yodato de potasio o yoduro de potasio. Se detallan estos experimentos a continuación. Salvo indicación de lo contrario, las concentraciones que se indiquen para los estándares son las de las soluciones antes de digerir, de modo que no importando las condiciones posteriores de análisis, los resultados de las muestras, analizadas con la curva de calibración con las unidades indicadas, expresan la concentración original de la orina antes del proceso.

Experimento 1. Efecto del cloruro de sodio en la reacción

La solución de ácido arsenioso (véase Anexo C) contiene 25 g/L de NaCl. Se probó el efecto del cloruro en la reacción, preparando una solución de ácido arsenioso, idéntica a la del método original, excepto por el cloruro de sodio que se omitió. Se corrieron curvas

¹ Dary 1993, Datos no publicados

con estándares de 0 a 28 $\mu\text{g/dL}$, previamente digeridos con ácido clórico. En la primera curva se añadió a los estándares 100 μL de ácido arsenioso con cloruro de sodio. La segunda curva se corrió con las mismas cantidades de reactivos, pero con una solución de ácido arsenioso sin cloruro de sodio. Cada estándar se analizó en duplicado.

Experimento 2. Optimización de la concentración de sulfato cérico

El reactivo de sulfato cérico amónico (SCA) del método "INCAP" tiene una concentración de 24 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disuelto en H_2SO_4 1.75M (Ce^{4+} 38.5 mM). En el micrométodo cinético se estaba usando una dilución 1:4 de este reactivo en ácido sulfúrico 1.75M. Se probaron soluciones diluidas en ácido sulfúrico 1.75 M, en las proporciones 1:2; 1:4; 1:8 y 1:10.

Experimento 3. Diferentes concentraciones de ácido arsenioso

Se corrieron curvas con dos reactivos de ácido arsenioso (AA) de composición diferente: El ácido arsenioso del método "INCAP" tiene 9.8 g de trióxido de arsénico (As_2O_3) por litro de solución y éste se disuelve previamente en 7.0 gramos de hidróxido de sodio. La solución se acidifica posteriormente con 32.0 mL de ácido sulfúrico concentrado por cada litro de solución preparada. El método de un laboratorio de referencia para el análisis de yodo en orina, del Programa contra la Desnutrición por Micronutrientes ("PAMM", por sus siglas en inglés) del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, utiliza una solución que contiene 5.0 g de trióxido de arsénico, no utiliza hidróxido de sodio para la disolución del arsénico y agrega 28.0 mL de ácido sulfúrico concentrado por cada litro de solución preparada. Las concentraciones de arsénico son entonces 99.1 y 50.5 mM, respectivamente. Se probaron ambos reactivos, corriendo curvas con estándares de yodo de 0 a 28 $\mu\text{g/dL}$. Además se varió la cantidad de ácido arsenioso agregado en la placa, probando con 50 o con 100 μL de ácido arsenioso y manteniendo los otros elementos de la reacción sin variación.

Experimento 4. Proporción de ácido clórico y muestra para la digestión

Para aumentar la sensibilidad del método en las concentraciones bajas, se aumentó la concentración de muestra en los digeridos. Primero se cambió la proporción de ácido clórico y muestra. Originalmente se digerían 250 μL de orina con 750 μL de ácido clórico. Se probó digerir 500 μL de muestra con 500 μL de ácido; y 750 μL de muestra con 250 μL

de ácido clórico. También se aumentó el volumen final de digerido, usando el doble de muestra y ácido clórico. Para probar que la digestión eliminaba los posibles interferentes aunque se redujera la proporción de ácido clórico agregado, se analizaron 3 muestras control enviadas por el laboratorio del PAMM, en las corridas en que se cambió la proporción de ácido clórico.

Experimento 5. Forma química del estándar utilizado

Se trató de analizar el efecto de la forma química utilizada en la preparación de los estándares antes de optimizar el método, pero existía demasiada variación entre duplicados, por lo que se optó dejar este paso para el final. Se corrieron curvas con el mismo rango de concentraciones de yodo, provenientes de yodato de potasio o de yoduro de potasio. Ambos reactivos son de grado analítico y fueron secados en horno a 105°C durante 3 horas y guardados en desecadora, antes de la preparación de las soluciones estándar o patrón. Las sales se disolvieron en agua desionizada.

La validación y caracterización del método se realizaron de acuerdo a los principios generales del anexo G.

2. Desarrollo y validación del método de yodo en sal

Como el método se basa en el mismo principio que el de yodo urinario, no se repitieron los experimentos anteriores. La posible interferencia por cloruro se descartó con base en el experimento 1. Sólo se probó la respuesta obtenida con soluciones estándar sin digerir, corriéndolas directamente en la microplaca. La validación y caracterización del método siguió los mismos pasos que los dos métodos anteriores.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

A. CREATININA URINARIA

Experimento 1. La gráfica de concentración de creatinina versus respuesta (mOD/min) se observa en la Figura 1, junto con los valores para cada estándar. La recta de regresión de los datos muestra una correlación adecuada ($r = 0.999$) entre la velocidad de reacción y la concentración de creatinina, que demuestra que el análisis cinético de creatinina en microplaca es factible. La variación entre duplicados de los estándares, excepto para el blanco (C.V. 33.63%), es muy pequeña, con variaciones entre 0.017 y 3.4%. Se deduce que la sensibilidad del lector de microplacas es buena ya que la reducción de volumen no afecta la precisión. Esto se atribuye al hecho que se está monitoreando la velocidad de reacción y no un valor neto de absorbancia. Por esta razón los errores por diferente absorbancia de fondo se corrigen en cada pozo, porque no se lee la absorbancia neta, sino el cambio de absorbancia.

La Figura 2 muestra, para cada pozo, la curva de absorbancia contra tiempo. El eje x de cada pozo representa los 10 minutos en que se analizaron los estándares; el eje y es absorbancia y representa el valor que se haya tomado como OD limit (En la gráfica se escogió 0.4).

Las filas A a F son los estándares de concentraciones 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 25.0 mg creatinina/dL. Los duplicados de una misma concentración están en las columnas 1 y 2 de una misma fila. Los pozos G01 y G02 tienen un control de 3 mg/dL; los pozos H01 y H02 un control de 15 mg/dL. Puede verse cierto grado de curvatura en la absorbancia a partir de los cinco minutos (300 s) o antes (Fig. 3); este comportamiento es lo esperado pues la velocidad de reacción disminuye cuando uno se acerca al máximo desarrollo de color, por reacción completa de la creatinina en solución. Este comportamiento es más pronunciado con las concentraciones más altas. Variando OD limit es posible calcular la velocidad inicial de reacción, descartando para el cálculo los puntos altos con curvatura. Este análisis se realizó con los datos del cuadro 2. Los resultados muestran que a medida que se escoge un límite más pequeño, aumenta la pendiente y disminuye el intercepto, lo cual significa mejor

sensibilidad (Figura 4). La curvatura observada cuando han pasado más de 4 ó 5 minutos del inicio de la reacción es la responsable de que, cuando se estima la velocidad de reacción en intervalos más largos de tiempo, se obtengan valores más bajos. La velocidad de reacción es lineal en los primeros minutos de reacción, cuando la reacción tiene un comportamiento de primer orden respecto de creatinina. Por eso en vez de hacer manipulaciones matemáticas con el valor de límite de absorbancia, se escogió un tiempo de lectura menor. Se estudiaron diferentes tiempos y con un análisis semejante al del cuadro 1 se escogió 3 minutos, tiempo que maximiza la pendiente y minimiza el intercepto.

Por facilidad de adición de reactivos, se probó agregar 100 μL de picrato alcalino, en vez de los 250 μL originales. La curva obtenida tiene un intercepto mucho más bajo (-0.253) y una pendiente similar a las obtenidas con 250 μL (8.49, comparada con 9.97), por lo que se fijó el volumen de picrato en 100 μL .

Curvas con picrato alcalino preparado 7 y 4 días antes del análisis dieron pendientes más bajas, 3.25 y 6.19, comparadas con 8.76, obtenida con picrato recién preparado. Se recomendó por lo tanto no guardar por más de 4 días el picrato alcalino. En términos de seguridad, esto es más conveniente pues el picrato es explosivo cuando se seca, mientras que la reactividad del ácido pícrico es menor. A lo largo de los días se observó que se obtenían valores de regresión más reproducibles cuando se usa picrato alcalino preparado 20 minutos antes del ensayo.

Para el método de creatinina urinaria no se probó el efecto de interferentes ya que el principal problema del análisis en suero es la bilirrubina y éste no es problema en orina. Por otro lado, la concentración baja o nula de α -cetoácidos y proteína en orina hacen que no haya interferencia significativa en el análisis (Ver cita 1 del Anexo B). Interferencias no específicas se evaluaron con los experimentos 2 y 3.

Experimento 2. Las muestras de orina se diluyen en NaCl al 0.9%. Esperando valores de creatinina entre 40 y 200 mg/dL de orina, se estimó que una dilución 1:10 sería conveniente para que la mayoría de las muestras cayeran en el rango de 4 a 20 mg/dL. Por facilidad de equipo (Pipeta manual 0-1000 μL y Pipeta Eppendorf repetidora), se escogió la dilución 1:11, tomando 500 μL de orina y agregándolos a 5 mL de solución salina. Esta dilución ha funcionado para todas las muestras analizadas hasta el momento. El análisis de

recuperación de creatinina en muestras reales fue de $98.6 \pm 2.7\%$ (Cuadro 3). El procesamiento de la muestra es muy sencillo, lo cual explica que no haya pérdida significativa de creatinina. Además no se encontró diferencia de recuperación entre las orinas, lo cual es indicativo de la ausencia de efecto de matriz. Esto se comprobó en el experimento de adición de estándares (Exp. 3).

Experimento 3. La Figura 5 muestra el comportamiento de la muestra al añadir concentraciones crecientes de creatinina. No se observa desviación de la linealidad ($r = 0.9943$). El intervalo de confianza al 95% ($\alpha/2 = 0.025$) para la pendiente es [0.93 - 1.08]. Este intervalo contiene el valor de 1. Esto es equivalente a la prueba de hipótesis para la pendiente (Ecuaciones 6, 7 y 8 del Anexo G, con t_{crit} (95%, 5-2 = 3 grados de libertad) = 3.182. El valor encontrado para $t_{exp.}$ fue -1.683. Como este valor cae dentro de la región de aceptación de la hipótesis nula, se concluye que la pendiente es significativamente igual a 1. Esto quiere decir, en nuestro caso, que la recuperación es 100%, pues la pendiente de la recta es $\Delta y/\Delta x$ y equivale a Conc. obtenida/Conc. agregada. El valor de recuperación obtenido por este método (92.7%) es un poco más bajo que haciendo cálculos de recuperación, pero se encuentra dentro del intervalo de ± 3 D.S. del valor original de recuperación (98.6%). Concluimos que las orinas no presentan interferencia proporcional, es decir que no hay componentes de la orina que reaccionen lateralmente con la creatinina o el ácido pícrico, que pudieran impedir la obtención de la respuesta esperada en función de la concentración de la muestra: las diferencias con los valores teóricos esperados pueden atribuirse al error aleatorio en el método.

Experimento 4. El método de creatinina mostró linealidad hasta 100 mg/dL, en concentración de estándar que se coloca directamente en la microplaca (Fig. 6). Tomando en cuenta la dilución de las muestras, esta concentración es equivalente a una concentración de 1100 mg creatinina/dL de orina. La máxima concentración esperada en muestras está alrededor de 300 mg/dL. Por esta razón se escogió como límite superior de concentración el valor más "fisiológico" de 25 mg/dL. Las ventajas de la amplitud del rango lineal logrado con las condiciones de análisis utilizadas es que se puede escoger un intervalo de concentraciones de estándar con buena sensibilidad. Se escogieron 8 concentraciones, porque pueden colocarse en la microplaca en una sola columna, poniendo en filas adyacentes

los duplicados. Las concentraciones escogidas son 0.00, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 15.0, 20.0 y 25.0 mg/dL.

Con base en una curva con esos puntos (Figura 7 y cuadro 5), se estimó el límite de detección según lo descrito en el Anexo G. La respuesta del límite de detección (Ecuaciones 12 y 13 del Anexo G) es $-0.53 + 3 * 0.159 = 0.424$ mOD/min. El límite de detección teórico es pues $(0.424 - (-0.314)) / 6.08 = 0.11$ mg/dL; el límite de cuantificación es (respuesta 10 veces más alta que la del blanco = 1.537 mOD/min) $(1.537 - (-0.314)) / 6.08 = 0.30$ mg/dL. En el cuadro 6 se muestran los intervalos de confianza para la concentración de cada estándar, calculados con base en la variación de la respuesta. Abajo de 5 mg/dL el límite de confianza promedio es 0.043 mg/dL, por lo que las concentraciones se pueden reportar con dos decimales, en ese rango. Tomando en cuenta la dilución, este valor equivale a reportar valores de creatinina urinaria con incertidumbre de 0.2 mg/dL. En el rango de 10 a 20 mg/dL, el promedio de $IC_{95\%}$ es 0.65, por lo que se aconseja reportar con un decimal. Arriba de 20 mg/dL los valores de creatinina no se reportan con decimales ($LC_{95\%} = 1.58$). Para simplificar se recomienda reportar todo el rango de concentraciones de creatinina urinaria sin decimales.

En una curva donde se corrieron estándares de 0 a 2.0 mg/dL (la regresión es $y = -0.0996 + 9.42x$, $r = 0.999$), se obtuvieron los resultados del cuadro 7. Los intervalos de confianza para los estándares muestran que, en teoría, es posible discriminar del valor de 0 el estándar con concentración 0.025 mg/dL, así que es sería el límite de detección. Sin embargo este valor está sujeto a la precisión que se alcance en cada corrida de estándares y algunas veces se obtendrán respuestas con mayor variación, que no permitan la estimación de cantidades tan pequeñas. Lo importante de este estudio es que se mostró la capacidad del método para detectar concentraciones muy bajas. En análisis con cromatografía líquida de alta resolución (cita 7 del anexo B) Scott cuantificó muestras de suero entre 0.63 y 2 mg/dL, con variaciones alrededor de 3.5%. Todos los estándares de la corrida 0-2.0 mg/dL tuvieron variaciones de 6.0 a 7.9% para el rango 0.15 a 0.30 mg/dL y de 1.2 a 3.7% para el rango 0.40 a 2.00 mg/dL. Parece factible la aplicación a muestra de suero con bajas concentraciones de creatinina (como ocurre en neonatos). Scott incluye un paso de desproteinización, que resolvería el principal problema del método de Jaffé con picrato, que

es la reacción lateral del picrato con proteína, para formar complejos que también absorbe a 490 nm. El tiempo de corrida en HPLC es de 7 min por muestra (14 en duplicado), mientras que en microplaca se pueden correr 40 muestras en duplicado, en 13 min. Otro método muy específico, la electroforesis capilar (cita 4 del Anexo B), tiene un límite de detección de 0.06 mg/dL, con variaciones reportadas entre 4 y 7%. Así, el método cinético en microplaca presenta características que lo hacen muy competitivo como método de rutina y tiene posibilidades de ser usado como método de referencia para análisis de creatinina en suero, una vez que se analicen interferencias de los demás componentes del suero.

Experimento 5. La precisión del método, estimada como variación dentro de un mismo ensayo y entre ensayos, fue de 3.81 y 5.5% respectivamente. El error analítico resultante fue 3.34% (Cuadros 8 y 9). La variación en los controles no debería ser mayor que dos veces el error analítico, así que se decidió tomar como criterio de repetición de la corrida una variación mayor del 7%. El mismo valor se sugiere para repetición de réplicas de la misma muestra.

Experimento 6. La prueba final del método fue la comparación con otro método de referencia. No había posibilidades de analizar creatinina por electroforesis capilar o por cromatografía líquida (Faltaba una columna Techsphere 5SCX 25 cm x 4.6 mm), así que se usó un método de la casa Sigma. Este se basa también en la reacción de Jaffé con picrato alcalino, pero tiene la ventaja que elimina (por lo menos teóricamente) el efecto de interferentes, pues mide la absorbancia de la muestra antes y después de la adición de un reactivo ácido que destruye el color debido al complejo creatinina-picrato. Así la absorbancia final debida a interferentes se resta de la absorbancia inicial, para dar el valor neto de absorbancia debido a creatinina, exclusivamente. Después de correr varias veces el método se encontraron valores variables para la absorbancia final en las muestras y estándares. Este valor estaba a veces alrededor de 0.300 y otras alrededor de 0.070. Por otro lado, la variación entre duplicados de los estándares fue mucho más alta que la del micrométodo cinético (2-12%).

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos por ambos métodos, con 20 muestras diferentes. El rango de concentraciones fue de 64 a 170 mg/dL (5.8 - 15.5 mg/dL en concentración final en el ensayo). En la gráfica puede verse que la dispersión de los datos

es adecuada para efectuar un análisis de regresión. Los resultados (Cuadro 10) muestran una buena correlación ($r = 0.988$) y una pendiente significativamente igual a 1 ($t_{95\%}$, para 18 g.l. = 2.101, $t_{\text{exp.}} = 0.072$). El sesgo, o sea el promedio de las diferencias entre los valores obtenidos fue de -1.539, con una variación (s_d) de 4.606 (ecuaciones 18 y 19 del Anexo G). La prueba de hipótesis (H_0 : sesgo = 0), al 95% de significancia, con 18 grados de libertad, tiene un $t_{\text{cr.}}$ de -1.456, por lo que se acepta la hipótesis nula. Estas dos pruebas indican que no existe diferencia entre los resultados obtenidos por uno u otro método.

Si el método usado como comparación tuviera una muy alta precisión y exactitud, los resultados permitirían decir que el micrométodo es tan exacto y preciso. Sin embargo, la variación del método de Sigma es alta y hubo 6 muestras que tuvieron que repetirse debido a una variación entre duplicados mayor al 5%, lo cual no ocurrió con el micrométodo. La replicabilidad entre corridas fue mejor en el micrométodo. Las muestras se corrieron nuevamente con los dos métodos, debido a la variación en el macrométodo. Los resultados iniciales del micrométodo se reprodujeron con una variación menor al 4%. Dos muestras (6 y 13) cuyos valores iniciales por el macrométodo (190.2 y 114.3 mg/dL) no concordaban en el micrométodo, al repetirse, si dieron valores cercanos a los del micrométodo (163.7 y 166.2 mg/dL, comparados con 164.5 y 168.7 mg/dL, obtenidos por el micrométodo).

Estos resultados, unidos con los experimentos de variación intra y entre ensayos, permiten decir que el micrométodo es altamente reproducible. Por otro lado, los experimentos de recuperación mostraron que no existen errores proporcionales. Si asumimos que no existe en la orina ningún interferente que produzca errores constantes, suposición que se confirma por el hecho que el método de comparación supuestamente elimina la interferencia, entonces podemos decir que el método es exacto. No existen muestras certificadas para creatinina urinaria, pero se analizaron dos controles de suero de Sigma (Accutrol Normal y Accutrol Abnormal). Los valores teóricos son 2.7 (1.0-4.4) y 8.2 (5.8-10.6) mg/dL respectivamente. Los valores obtenidos en varias corridas y con diluciones (1:2 a 1:16) dieron, en promedio 1.38 ± 0.24 y 7.84 ± 0.39 mg/dL. Aunque la concentración de ambos controles caía en el rango directo de la curva de trabajo, los valores para los sueros sin diluir eran mucho más bajos que los valores teóricos y aumentaban a

medida que incrementaba el factor de dilución. Se ha mostrado (Referencia 5 del Anexo B) que la bilirrubina produce interferencia negativa en el análisis de creatinina sérica y aparentemente el efecto de ésta disminuye al diluir el suero. Si consideramos los valores obtenidos con los sueros diluidos, vemos que el método cinético en microplaca es capaz de cuantificar la creatinina en suero. En orina, que no contienen interferentes, el método es absolutamente confiable.

El resumen de las características del método se adjunta al protocolo del método tal como quedó para análisis de rutina (Anexo B). Con base en estas características también se elaboró un sistema de control de calidad, brevemente descrito en el Anexo B. También se hace una evaluación del método, comparado con el método de Sigma.

Evaluación comparativa del método cinético en microplaca contra el método comercial de Sigma

		Método	
Característica del método		Sigma	Método cinético en microplaca
Principio	El método es espectrofotométrico, con base en la reacción de Jaffé. Mide absorbancias antes y después de la adición de reactivo ácido.	El método es espectrofotométrico, con base en la reacción de Jaffé. Mide absorbancias antes y después de la adición de reactivo ácido.	El método es cinético, mide el cambio de absorbancia durante un período de 2 minutos. La reacción se lleva a cabo en pozos de la microplaca.
Preparación de la muestra	Dilución 1:11 de la orina con solución isotónica (NaCl 0.9%)	Dilución 1:11 de la orina con solución isotónica (NaCl 0.9%)	Idem.
Remoción de sustancias interferentes	La absorbancia debida a interferentes se cuantifica por lectura de la absorbancia después de la destrucción del color del complejo creatinina-picrato.	La absorbancia debida a interferentes se cuantifica por lectura de la absorbancia después de la destrucción del color del complejo creatinina-picrato.	El análisis cinético en corto tiempo elimina la interferencia de cromógenos interferentes que reaccionan más despacio. Bowers (Ref. Anexo B) demostró que la reacción del picrato con acetoacetato es tan rápida que es completa al cabo de 10 s, por lo que tampoco interfiere con el análisis cinético, aunque sí en los métodos espectrofotométricos de punto final.
Precisión	Las corridas diferentes no replican los valores de absorbancia brutos, aunque esto se compense al hacer la diferencia de absorbancias. La variación de los estándares es mayor a 2% (C.V. 2-12%). Dos muestras corridas en dos ocasiones dieron diferencias de -15.7 y 32.2%. El porcentaje de repeticiones en 20 muestras fue 30%.	Las corridas diferentes no replican los valores de absorbancia brutos, aunque esto se compense al hacer la diferencia de absorbancias. La variación de los estándares es mayor a 2% (C.V. 2-12%). Dos muestras corridas en dos ocasiones dieron diferencias de -15.7 y 32.2%. El porcentaje de repeticiones en 20 muestras fue 30%.	Los valores de la pendiente y la constante de las regresiones son similares en corridas diferentes. La variación entre réplicas de estándares es excelente (0-4%). La precisión intraensayo es 3.81% y entre ensayos de 5.5%. El porcentaje de repeticiones en 20 muestras fue 0%.
Complejidad técnica	El proceso es complicado pues hay que leer la solución antes y después de la adición de reactivo ácido, así que la solución no se puede descartar después de leer. Otra opción es dividir en dos tubos y agregar sólo a uno el ácido, pero esto implica 4 tubos por muestra. El surfactante agregado al reactivo de color hace difícil el traspaso de soluciones.	El proceso es complicado pues hay que leer la solución antes y después de la adición de reactivo ácido, así que la solución no se puede descartar después de leer. Otra opción es dividir en dos tubos y agregar sólo a uno el ácido, pero esto implica 4 tubos por muestra. El surfactante agregado al reactivo de color hace difícil el traspaso de soluciones.	El error humano se reduce al mínimo, pues el método es completamente automatizado a partir de la adición de picrato alcalino. Si hubiera diferencias entre duplicados, es muy fácil la repetición de la lectura, para verificar si el error está en la dilución o simplemente en el análisis final.

Característica del método	Sigma	Método	Método cinético en microplaca
Muestras procesadas/día/técnico	<p>Se cuentan 2 horas de preparación de muestras (Descongelar y rotular tubos) y 30 min de preparación de reactivos. Si se requiere una hora para hacer las diluciones de 180 muestras, el factor limitante es el ensayo, pues no se pueden hacer más de 60 muestras en 5 horas. Los resultados deben calcularse por aparte, según los datos de la curva de calibración respectiva. Un estimado máximo son 60 muestras/día/técnico.</p>		<p>Se cuenta el mismo tiempo para preparación de muestras y reactivos. Si se calculan 15 minutos para cargar las muestras (39 + 8 estándares + 1 control) en la microplaca y 5 minutos para hacer el análisis, se pueden analizar cerca de 137 muestras por hora. Calculando que se pueden diluir 180 muestras/hora, en las restantes 6 horas del día se pueden analizar 400 ó más muestras (3 horas para diluir y 3 horas para analizar). Los resultados pueden obtenerse directamente con el programa Softmax</p>
Instrumentación requerida	<p>Se puede usar un espectrofotómetro con adaptador múltiple para celdas, pero también un espectrofotómetro muy sencillo con una sola celda. Con esto varía drásticamente el tiempo de análisis.</p>		<p>Se requiere un lector de microplacas con opción cinética. Casi todos los modelos actuales la incluyen.</p>
Costo del equipo	<p>Un espectrofotómetro sencillo, US\$ 2,000. Con cuatro celdas, de US\$ 5,000 a 10,000.</p>		<p>Alrededor de US\$ 15,000.</p>
Costo de operación	<p>Según cálculos internos que incluyen costo directo, salarios y depreciación de equipo, US\$ 3.46 por muestra.</p>		<p>Según cálculos internos que incluyen costo directo, salarios y depreciación de equipo, US\$ 1.25 por muestra.</p>
Seguridad	<p>El volumen generado puede ser considerable (6.0 mL de picrato alcalino- 0.5% por muestra). Se aconseja recoger las soluciones analizadas para su posterior disposición.</p>		<p>Debido a la reducción de volumen, se requieren sólo 10 mL de picrato 0.3% para una placa (39 muestras). Este volumen se puede descartar con suficiente agua en el lavadero.</p>

B. YODO URINARIO

El método de yodo urinario fue el primero que se adaptó al análisis cinético en microplaca. Las pruebas preliminares mostraron que sí era posible analizar yodo por ese método. Sin embargo los resultados iniciales no se interpretaron con el programa Softmax 2.0, porque en ese entonces todavía no estaba instalado. Por esa razón se escogió presentar primero los resultados de creatinina, que se analizaron desde un inicio, con el programa. Para el método microcinético para yodo se habían establecido las siguientes condiciones de análisis:

- El proceso de digestión de la orina no se modificó. 250 μL de orina se digerían con 750 μL de ácido clórico. Sin embargo, un punto crítico fue el volumen resultante: Como sólo se usa una porción del digerido para el análisis cinético, es vital que se compensen las pérdidas de volumen en todos los tubos para obtener resultados reproducibles. Así, quedó establecido marcar el menisco de la solución antes de la digestión y llevar a ese volumen (1 mL) después de la digestión, antes de tomar la alícuota para hacer el análisis en la placa.

- Los volúmenes utilizados para el análisis eran 50 μL de muestra, 100 μL de ácido arsenioso y 100 μL de sulfato cérico amónico, diluido 1:4 respecto al reactivo usado en el macrométodo.

- La lectura de cambio de absorbancia se monitoreaba por dos minutos a 405 nm.

Con esas condiciones de análisis, el método cinético permitía analizar un número mayor de muestras, pero la precisión del macrométodo era mejor (en promedio 3.7% de variación entre duplicados), que la del micrométodo, siempre que la técnica se llevara a cabo con extremo cuidado. Un punto a favor del micrométodo era que el rango de análisis del micrométodo parecía más amplio que el del macrométodo (la curva de este último es lineal de 2 a 16 $\mu\text{g/dL}$). Además, el método macro requiere mucha habilidad técnica para dar resultados confiables y se había observado que el error en la medición de los intervalos de lectura se acumulaba en las últimas muestras, por lo que no era posible analizar más de 20 muestras diarias. Todas estas razones nos condujeron a trabajar en la optimización del micrométodo.

Experimento 1. Uno de los problemas principales del método cinético de yodo es que las curvas de velocidad de reacción, aunque tienen un comportamiento lineal, son más fluctuantes que las que se obtuvieron con creatinina. La agitación previa de la placa no resolvió este problema. La metodología de donde se adaptó el análisis clínico de yodo deriva del método publicado por Garry *et al.* (1973), donde el equipo utilizado es un autoanalizador que registra picos de transmitancia generados cuando se mezclan los reactivos, en proporciones determinadas por la velocidad de flujo con que se mezclan. Fisher *et al* (1986) justifican el uso de cloruro como estabilizador de la línea base del registrador de transmitancia. Se pensó que en el caso del análisis espectrofotométrico el cloruro no tenía razón de ser, o incluso la cantidad de cloruro de sodio añadida podía ser la causa de la fluctuación, por la fuerza iónica que le da a la solución, así que se probó eliminarlo de la solución. Los resultados son concluyentes. La Figura 9 muestra la respuesta de estándares de yodato y yoduro de potasio y muestras, con el reactivo de ácido arsenioso con NaCl 25 g/L (Filas 1 a 6) y sin cloruro (Filas 7 a 12). La reducción del cerio (IV) por el As (III) ocurre a una velocidad incluso inferior a la velocidad del blanco, en donde no hay acción catalítica del yodo. La respuesta obtenida en los pozos con ácido arsenioso sin cloruro de sodio no aumenta en función lineal de la concentración de yoduro (Figura 10 y cuadro 11). Rodríguez y Pardue (1969) ya habían establecido el papel estabilizador del cloruro en la catálisis del yodo y éste quedó confirmado con los resultados experimentales obtenidos. Otra conclusión que se desprende es que el cloruro proveniente de las muestras no puede interferir en la cuantificación del yodo, ya que la contribución de cloruro proveniente del reactivo de ácido arsenioso es 100 a 1000 veces mayor que la que puede encontrarse en la muestra de orina. Esto también es cierto para las muestras de sal, donde la dilución mínima que debe hacerse antes de realizar el análisis es una dilución 1:10 de una solución que contenga 10 g de sal/dL. La concentración de sal resultante en la solución diluida es por lo tanto 10g/L. Se probó hacer lecturas de soluciones de cloruro de sodio diluidas, con concentraciones de 0 a 20 g/L. La respuesta obtenida no fue diferente del blanco con agua destilada.

Los estándares corridos con ácido arsenioso con cloruro sí presentan correlación lineal ($r = 0.987$) entre la concentración de yodo y la respuesta (Figura 11 y cuadro 12).

La replicabilidad entre duplicados fue variable (desde 0.026 hasta 16.50%), lo cual indica que el método podía ser mejorado. Parte de esta variabilidad se atribuyó al hecho que los estándares son digeridos junto con las muestras de orina, por lo que ocurren ciertos cambios de volumen, aun cuando se ajuste el volumen final del digerido con agua desionizada. La ventaja de digerir los estándares está en que las pérdidas de yodo por evaporación se compensan en estándares y muestras. Las modificaciones posteriores de las condiciones de análisis pretendían lograr mejor reproducibilidad en las curvas.

Experimento 2. Se estudió el efecto de la concentración del sulfato cérico amónico (SCA) en la respuesta de los estándares digeridos. Las condiciones finales de análisis se mantuvieron: 50 μL de estándar, 100 μL de ácido arsenioso y 100 μL de SCA, en diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:10 del reactivo original. Las curvas para las diferentes diluciones pueden observarse en las Figuras 12 a 15, la Figura 16 resume el comportamiento de las diluciones. Como el Ce^{4+} es componente esencial de la reacción, los resultados obtenidos eran previsibles: La respuesta es mayor cuando la concentración de cerio es mayor. Se observa que el análisis todavía presenta problemas de linealidad de la respuesta. La diferencia entre las curvas 1:4 y 1:8 es mucho más marcada que entre las curvas de SCA 1:2 y 1:4. Aunque la mayor pendiente es la del SCA 1:2, se escogió trabajar con la concentración 1:4, debido a que las lecturas tenían mucho menor fluctuación en cada pozo (Figura 17). Una vez escogida la dilución para el análisis, se preparó un stock de la solución diluida. Con el paso del tiempo se observó que la estabilidad obtenida era mayor. Al investigar en la literatura (Rodríguez y Pardue, 1969), se encontró que el cerio forma complejos con el ácido sulfúrico y el equilibrio de estos complejos no se alcanza sino hasta varias horas después de la preparación de los reactivos. La variación en la respuesta se atribuyó por lo tanto a que no se dejó estabilizar el reactivo. Por consiguiente se recomendó preparar el reactivo con anterioridad y dejarlo reposar por lo menos un día entero. Los resultados obtenidos desde entonces tuvieron mejor linealidad y menor fluctuación individual.

Experimento 3. La variación de la concentración final de ácido arsenioso (AA) en el pozo no produjo resultados significativamente diferentes: Puede verse en la Figura 18 la respuesta de los estándares, agregando 50 μL de ácido arsenioso en un caso y 100 μL en

el otro. Cuando se agregan 100 μL de ácido arsenioso, tenemos, en concentraciones molares finales en el pozo, 20.22 mM para ácido arsenioso y 3.80 mM para SCA, lo cual da un radio $[\text{As}^{3+}/\text{Ce}^{4+}]$ de 5.3. Cuando se agregan 50 μL de AA, las concentraciones son 12.64 mM para el AA y 4.74 para el SCA, lo cual da un radio $[\text{As}^{3+}/\text{Ce}^{4+}]$ de 2.7. En ambos casos se mantiene el exceso molar de arsénico sobre cerio. Este es necesario porque en la mezcla de reacción ambas especies pueden reaccionar con el yodo, cambiando su estado de oxidación. Un exceso de arsénico garantiza que el yodo en solución se mantiene en su forma reducida de yoduro, I^- , en la cual es catalíticamente activo. Como las curvas no presentan mayor diferencia en cuanto a linealidad o pendiente, se prefirió utilizar en lo sucesivo sólo 50 μL de ácido arsenioso, ya que se reduce la producción de desechos tóxicos.

La forma de preparación del reactivo tampoco fue de importancia en la respuesta obtenida: Los reactivos "PAMM" o "INCAP" no dieron resultados diferentes, a pesar de su diferente concentración (50.5 y 99.1 mM, respectivamente). Tampoco hubo diferencia cuando se probaron ambos reactivos agregando 50 o 100 μL .

Una etapa que sí mostró ser crítica fue el tiempo que se dejaban en contacto la solución de yodo y el ácido arsenioso. Cuando los estándares o las muestras salen del proceso de digestión, el yodo está en su forma oxidada de yodato. Si no se deja la placa por lo menos 25 minutos antes de agregar el último reactivo (SCA), no se obtienen curvas de calibración con buena correlación. Esto se atribuyó a la diferente proporción de yodo en forma reducida y catalíticamente activa en los pozos con diferente concentración total de yodo. La conclusión del estudio del ácido arsenioso es que la cantidad que se agrega no es tan importante, pero sí el tiempo que permanece en contacto con la placa. Puesto que una vez agregado el sulfato cérico, el análisis de las muestras es muy rápido, se recomienda dejar la placa con ácido arsenioso de 20 a 30 minutos. Al hacer esto, se redujo la variabilidad de los duplicados de los estándares.

Experimento 4. Se resume en el cuadro los resultados de tres corridas de estándares y muestras de referencia 941, 942 y 943, enviadas por el laboratorio del PAMM. Todas las muestras cayeron dentro de los límites de los valores esperados que define el laboratorio de referencia que envía las muestras. Los valores de la regresión, tal como se

esperaba, son más altos al aumentar la cantidad de muestra en el digerido. Aunque no se ha probado.

Experimento 5. Las Figuras 19 y 20 muestran las curvas con estándares de yodo preparados con yodato y yoduro de potasio. Las curvas son estadísticamente iguales ($\alpha/2 = 0.025$, prueba de hipótesis sobre la pendiente), a pesar de que la curva con yoduro es un poco más alta. Cuando este experimento se realizó con estándares sin digerir, las rectas son incluso más parecidas. Hay que incubar la placa entera a temperatura ambiente con ácido arsenioso por 25 minutos para obtener estos resultados.

Con base en estos resultados, para analizar sal fortificada con este método, solo había que correr los estándares sin digerir y analizar el comportamiento de las sales en cuanto a recuperación. Esto se hizo paralelamente a la validación del método de yodo urinario.

Validación y caracterización de los métodos de análisis de yodo

Los resultados del análisis de recuperación se observan en los cuadros 14 a 16. Tanto la recuperación como el análisis de adición de estándar son satisfactorios, para el método de yodo urinario, si no se toma en cuenta que la variación de las réplicas es un poco alta. Podíamos esperar recuperaciones inferiores a 100%, debido a la pérdida por digestión, pero como los estándares también se digieren, la curva corrige errores debidos a esta pérdida. De ambos experimentos puede decirse que no hay interferencias significativas en la matriz. Esto es lo lógico pues para evitar estos errores se lleva a cabo la digestión. El análisis de yodo en sal no es tan satisfactorio como el de yodo. La recuperación calculada por el método de recuperación de estándar, sí es estadísticamente igual a 1 ($t_{\text{exp}} = -1.462$, $t_{\text{crit}} (95\%, 3\text{gl}) = 3.182$), pero el intervalo de confianza es muy amplio [0.616 - 1.142]. Esto se atribuyó a la variación que hay dentro y entre corridas, para las mismas muestras. Dado que la variación de los estándares es baja (0-4%) y que el experimento con cloruro de sodio demostró que éste no cambia la respuesta de los estándares, siempre que esté presente en exceso (25 g/L en el reactivo de ácido arsenioso), todavía no se ha encontrado la razón para este aparente error proporcional del método aplicado a yodo en sal.

Se hicieron análisis de linealidad, tanto para los estándares digeridos como para los no digeridos. La curva para estándares digeridos se muestra en la Figura 21. Esta curva muestra a la vez valores muy pequeños, que se usaron para calcular el límite de detección y un valor máximo de $56 \mu\text{g/dL}$. La regresión con puntos con esa distribución no es válida, pero la gráfica demuestra que no se observa desviación de la linealidad hasta $56 \mu\text{g/dL}$. En este aspecto el método es mucho mejor que el método espectrofotométrico manual, que sólo es lineal hasta $16 \mu\text{g/dL}$. Otros autores (Dunn, *et al*, 1993) recomiendan hacer una conversión del logaritmo de la absorbancia obtenida por el macrométodo, para linearizar la curva que se obtiene por ese método. A nuestro criterio, esta aproximación matemática no es válida, porque la absorbancia ya es un logaritmo y esta regresión le quita sensibilidad a la curva. El método cinético es más exacto desde el punto de vista de la transformación matemática de la curva ya que se usa un rango donde la respuesta es lineal (r va de 0.990 a 0.999 en las corridas de rutina). Con estándares no digeridos, se usó en el eje de concentraciones, la concentración que equivaldría a la concentración original de estándares digeridos, es decir la concentración de los estándares multiplicada por $4/3$. Con este eje la Figura 22 muestra que ya hay curvatura a partir de $48 \mu\text{g/dL}$. Este valor es más bajo que el que se obtiene con estándares digeridos ($56 \mu\text{g/dL}$), pero el ácido clórico es un agente oxidante fuerte y afecta el estado químico, tanto del yodo como del cerio y del arsénico, así que debe tener algún efecto en las curvas. En este caso es positivo, pues amplía el rango lineal del método. La Figura 23 muestra sólo la porción lineal de la curva con estándares sin digerir, en concentración equivalente. En la Figura 24 y cuadro 18 se presentan esos mismos resultados pero con la concentración real de los estándares, en unidades de ng/mL . Con base en esta curva y en los resultados del cuadro 17, se estimaron el límite de detección, de cuantificación y los intervalos de confianza para los estándares, para ambos métodos. Estos resultados se presentan en los cuadros 19 a 21.

Con base en esos datos, el límite de detección teórico para yodo urinario es $0.2 \mu\text{g/dL}$, el límite de cuantificación $0.5 \mu\text{g/dL}$. El límite experimental es $1 \mu\text{g/dL}$. Para yodo en sal, el límite de detección teórico es 0.08 ng/mL , experimental 5 ng/mL , por ser el estándar más bajo que se probó. Estos valores son muy buenos, porque se basan en la lectura del blanco, que en estas corridas tiene muy poca variación. Haciendo un promedio

de corridas anteriores (no tan precisas), el límite de detección se estima entre 1 y 2 $\mu\text{g/dL}$. En muestras de orina la variación entre las lecturas es mayor (0.5 a 6%), por lo que no creemos que se deban reportar valores de muestras abajo de 2.0 $\mu\text{g/dL}$. Actualmente los métodos reportan valores hasta 1 $\mu\text{g/dL}$, pero en la experiencia del laboratorio se sabe que la variación con el método macro es incluso mayor. En estos métodos no se ha analizado el límite de detección y probablemente está muy por encima del valor de 2 $\mu\text{g/dL}$ que se encontró.

El problema que se encontró con los métodos en microplaca fue la falta de precisión (ver el resumen de la variación en los cuadros 22 a 25). La conclusión de este estudio es que el método de microplaca es una opción muy buena, rápida y exacta. El micrométodo tiene una variación un poco alta (Error analítico 5.7%) y se atribuye principalmente al problema de ajustar el volumen del digerido. La recomendación final del estudio es que se investigue la digestión seca, para reducir la variabilidad y que se haga la caracterización del método macro, para confirmar que el límite de detección es más alto. La comparación de ambos métodos da resultados adecuados (Figura 25), porque se tomaron para el análisis de regresión sólo los valores abajo de 20 $\mu\text{g/dL}$, ya que no se pueden analizar muestras más concentradas con el macrométodo si no se diluye la orina. En la página siguiente se presenta el cuadro de evaluación del método cinético micro, comparado con el método macro.

C. CUADROS Y GRAFICAS

Se presentan los cuadros y gráficas de los resultados a partir de la página 76.

Evaluación comparativa del método cinético en microplaca contra el método macro manual para el análisis de yodo urinario

Método	
Característica del método	Método cinético en microplaca
Principio	<p>El método es cinético, mide el cambio de absorbancia durante un período de 2 minutos. La reacción se lleva a cabo en pozos de la microplaca.</p>
Preparación de la muestra	Idem.
Remoción de sustancias interferentes	Idem.
Precisión	<p>La variación entre réplicas de estándares es buena (0-5%). La variación entre ensayos es mayor (7.3%). Sin embargo no hay errores acumulados en las muestras, pues se leen simultáneamente con los estándares. Hay ligeros diferencias de lectura a lo largo de la placa, por lo que se recomienda colocar los estándares en las filas intermedias, para promediar las diferencias. El rango lineal (0-40 µg/dL) permite analizar la mayoría de muestras directamente, evitando el paso de dilución.</p>
Complejidad técnica	<p>El error humano se reduce al mínimo, pues el método es completamente automatizado después de la digestión. Con el uso del lector de microplacas se puede verificar si el error está en la última etapa, corriendo nuevamente la muestra, sin tener que volver a digerir la orina.</p>
Muestras procesadas/día/técnico	<p>El paso limitante es la digestión. Si se dispone de suficientes bloques de calentamiento se pueden digerir alrededor de 150 muestras y analizarlas el mismo día.</p>
Instrumentación requerida	<p>Se requiere un lector de microplacas con opción cinética. Casi todos los modelos actuales la incluyen.</p>
Costo del equipo	Alrededor de US\$ 15,000.
Costo de operación	Según cálculos internos que incluyen costo directo, salarios y depreciación de equipo, US\$ 0.72 por muestra.
Seguridad	Debido a la reducción de volumen, se requieren sólo 5 mL de ácido arsenioso para una placa (39 muestras). Este volumen se puede descartar con suficiente agua en el lavadero. La solución digerida restante se reduce con sulfato de sodio antes de descartar en el lavadero.

Sigma

El método es espectrofotométrico, con base en la reacción de Sandell-Kolthoff. Mide la absorbancia 10 min después de la adición de SCA a la solución con la muestra y el ácido arsenioso.

Digestión de la muestra con ácido clórico

Es aparentemente adecuada.

La variación entre ensayos es inferior a 10%, pero la precisión intraensayos no es muy buena (C.V. 2-10%). En los últimos tubos, se acumula error de tiempo, que causa valores falsamente altos. Las muestras arriba de 16 µg/dL deben diluirse desde el principio para ser analizadas.

El proceso es complicado pues hay que leer los tubos con intervalos fijos de tiempo. En el laboratorio se leen grupos de 3 tubos con intervalos de 20 segundos entre cada grupo, pero requiere práctica para lograr resultados reproducibles. Esto crea dependencia del factor humano para realizar el análisis.

Con análisis manual no es posible analizar más de 40 muestras por día.

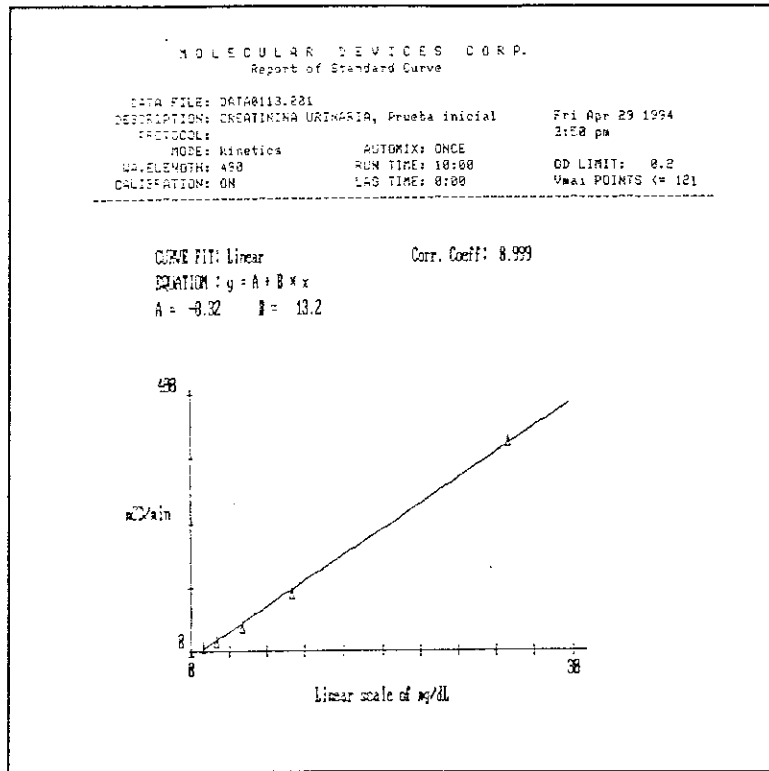
Se requiere de un espectrofotómetro con adaptador múltiple para celdas, de preferencia con regulador de temperatura.

Un espectrofotómetro de US\$ 5,000 a 10,000.

Según cálculos internos que incluyen costo directo, salarios y depreciación de equipo, US\$ 2.55 por muestra.

El volumen de desechos es de 6 mL por muestra. La muestra contiene arsenitos, por lo que se aconseja guardar para su posterior disposición segura.

Figura 1. Estandarización de condiciones para el análisis de creatinina en microplaca. Experimento 1



Cuadro 1. Reporte de los datos obtenidos en el análisis preliminar de creatinina urinaria, generados por el programa Softmax 2.0.

MOLECULAR DEVICES CORP.
Report of Analyzed data

DATA FILE: DATAB113.001 PAGE: 1
DESCRIPTION: CREATININA URINARIA, PRUEBA INICIAL Fri Apr 29 1994
PROTOCOL: 3:51 pm
MODE: kinetics AUTOMIX: ONCE
WAVELENGTH: 490 RUN TIME: 10:00 OD LIMIT: 0.2
CALIBRATION: ON LAG TIME: 0:00 Vmax POINTS <= 121

Curve Fit: Linear Corr. Coeff: 0.999
Equation: $y = A + B * x$ Std Units: mg/dL
A = -0.32 B = 13.2

STANDARDS	Value	Wall	mOD/min	Mean	Std Dev	CV
S01	0.000 mg/dL	A1	-0.347	-0.220	0.094	33.63
		A2	-0.214			
S02	1.000 mg/dL	B1	7.374	7.388	0.017	0.235
		B2	7.398			
S03	2.000 mg/dL	C1	15.05	15.08	0.041	0.272
		C2	15.11			
S04	4.000 mg/dL	D1	39.54	39.56	0.028	0.070
		D2	39.58			
S05	8.000 mg/dL	E1	89.81	92.00	3.095	3.354
		E2	94.19			
S06	25.00 mg/dL	F1	323.7	324.2	0.767	0.218
		F2	324.7			

Figura 2. Gráfica del cambio de Absorbancia en el tiempo, para los estándares de creatinina de 0 a 25 mg/dL.
Experimento 1

MOLECULAR DEVICES CORP.
Kinetics Plot Display

DATA FILE: DATA0113.001
 DESCRIPTION: CREATININA URINARIA, Prueba inicial
 PROTOCOL: Fri Apr 29 1994
 MODE: kinetics AUTOMIX: ONCE 7:14 pm
 WAVELENGTH: 490 RUN TIME: 10:00
 CALIBRATION: ON LAG TIME: 0:00 OD LIMIT: 0.4
 Vmax POINTS <= 121

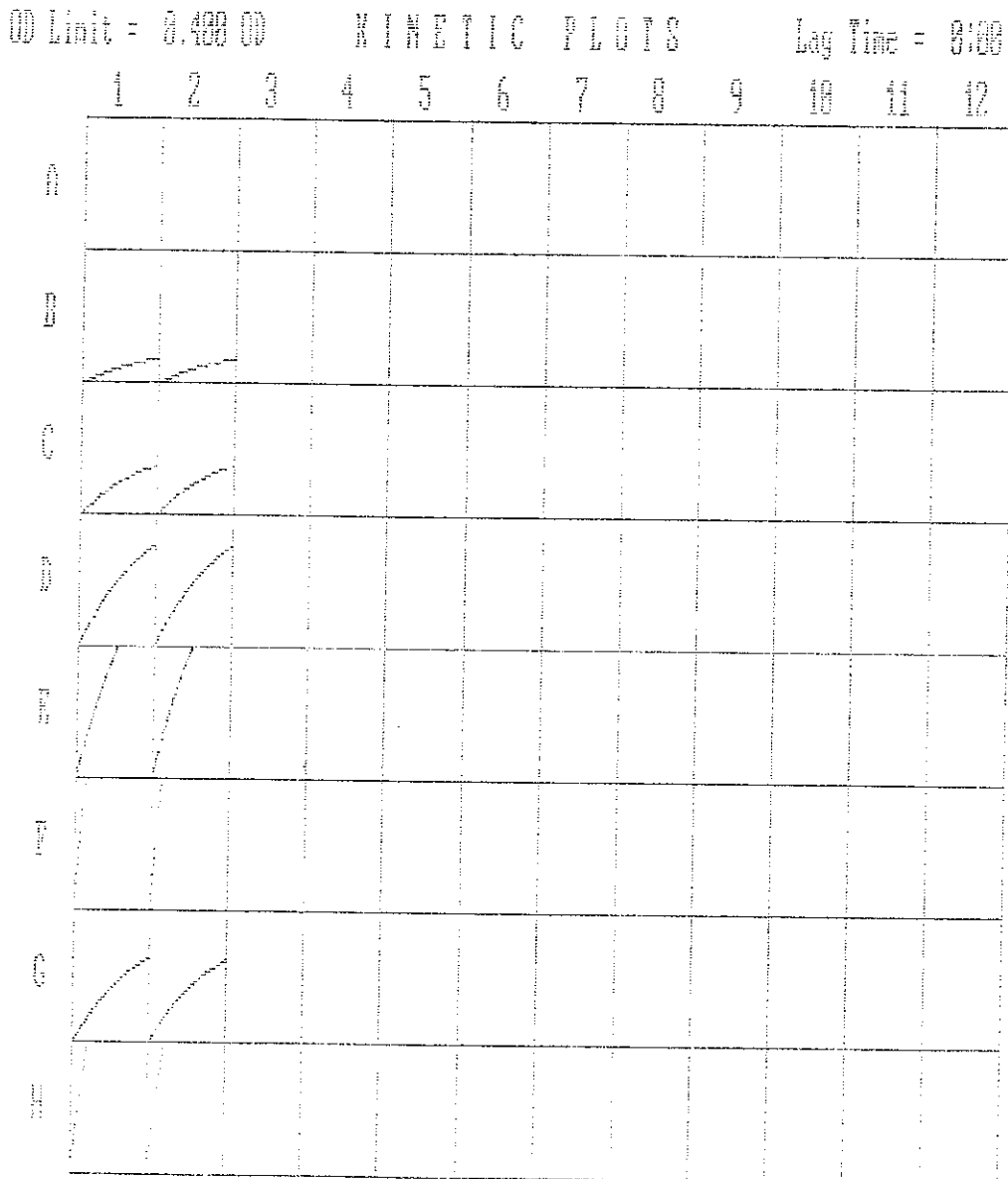


Figura 3. Curvatura observada en el curso del tiempo, en la gráfica de cambio de absorbancia versus tiempo.
Experimento 1

MOLECULAR DEVICES CORP.
Kinetics Plot Display

DATA FILE: DATA0113.001
DESCRIPTION: CREATININA URINARIA, Prueba inicial
PROTOCOL: Fri Apr 29 1994
MODE: kinetics AUTOMIX: ONCE 6:59 pm
WAVELENGTH: 490 RUN TIME: 10:00 OD LIMIT: 0.4
CALIBRATION: ON LAG TIME: 0:00 Vmax POINTS <= 121

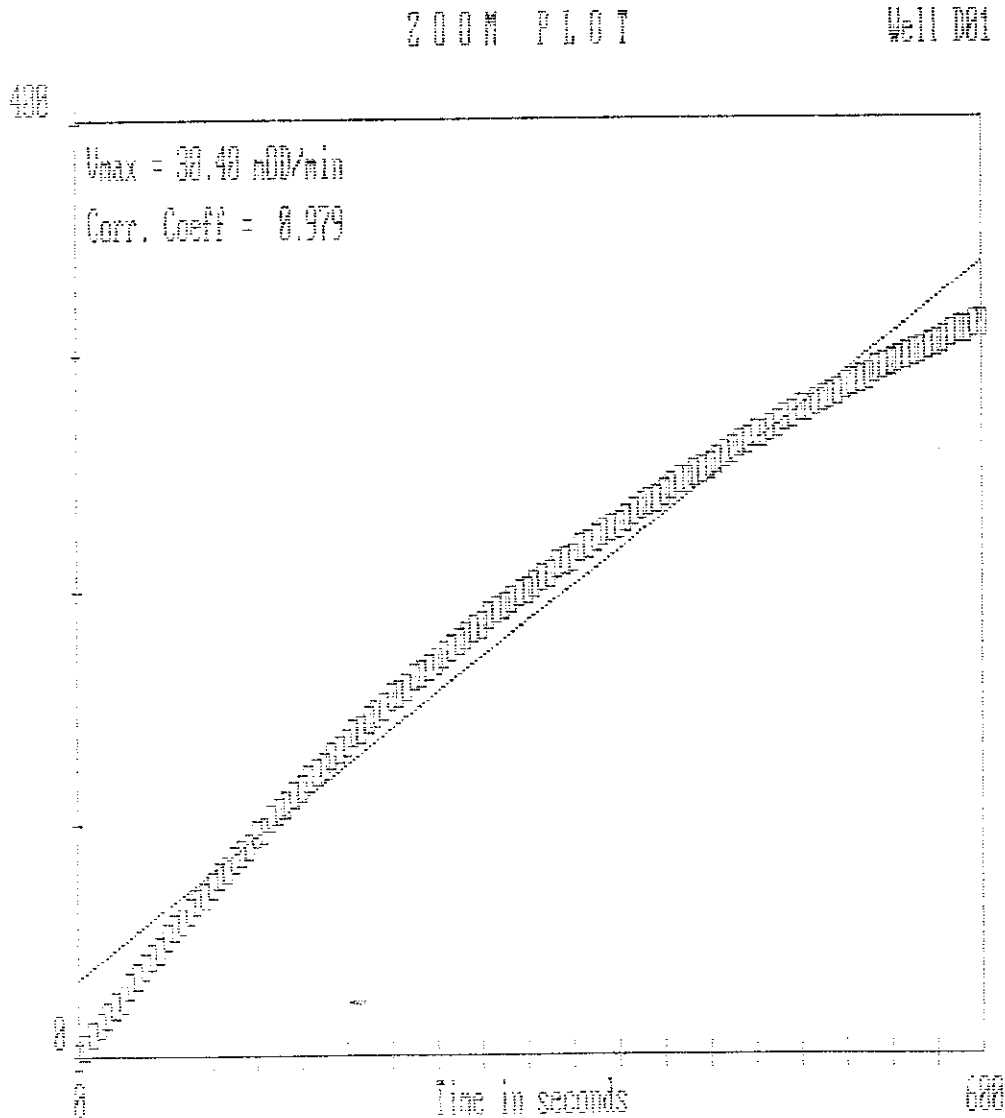
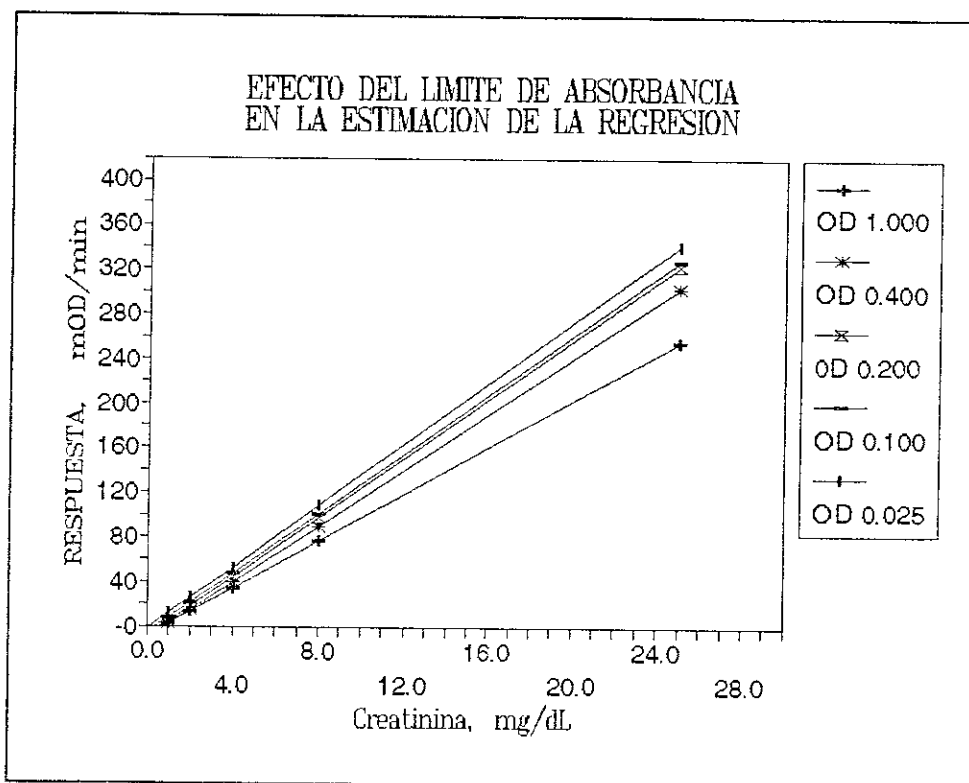


Figura 4. La gráfica muestra las diferentes rectas de regresión generadas cuando se varía el límite de absorbancia (OD LIMIT) para el cálculo de velocidad de la reacción de formación del complejo de Janowsky creatinina-picrato.



Cuadro 2. Efecto del límite de absorbancia en la sensibilidad de la curva de calibración para el método de creatinina urinaria.

OD LIMIT	A	B	r
1.000	- 7.98	10.5	0.996
0.500	-10.80	12.1	0.996
0.400	-10.60	12.5	0.997
0.300	- 9.95	12.8	0.998
0.200	- 8.32	13.2	0.999
0.150	- 7.42	13.3	0.999
0.100	- 5.19	13.3	1.000
0.050	- 3.9	13.8	1.000
0.025	- 1.65	13.7	1.000

La recta de regresión es $y = A + Bx$
r es el coeficiente de correlación.

Cuadro 3. Análisis de recuperación de analito agregado -Creatinina urinaria Experimento 2

MUESTRA	Creatinina, en mg/dL (D.S.)		Recuperación(%)
	C. basal	C. obtenida	
A	65.7 (2.3)	86.5 (2.9)	97.9
B	31.2 (0.8)	52.1 (1.3)	96.5
C	71.5 (2.8)	92.4 (2.6)	98.0
D	71.0 (4.1)	92.8 (4.0)	97.3
E	76.8 (2.1)	96.8 (5.0)	103.3
Recuperación Promedio (D.S):			98.6 (2.7)

Cada valor es el promedio de 6 análisis. La concentración agregada fue de 22.73 mg/dL.

Cuadro 4. Valores obtenidos por el método de adición de estándar Creatinina urinaria Experimento 3

Concentración de creatinina, en mg/dL	
C. añadida	C. obtenida \pm D.S
0.00	33.67 \pm 0.92
12.02	44.08 \pm 1.21
24.04	57.69 \pm 0.54
36.08	65.05 \pm 1.14
48.08	78.90 \pm 1.84

DATOS DE LA REGRESION

Constante:	33.59
Error std. de y	1.74
r cuadrado	0.98868
r	0.99433
Coefficiente de x	0.927
Error std. del coeficiente	0.019

Figura 5. Recta de regresión del método de adición de estándar La pendiente es estadísticamente igual a 1 ($\alpha/2 = 0.025$)

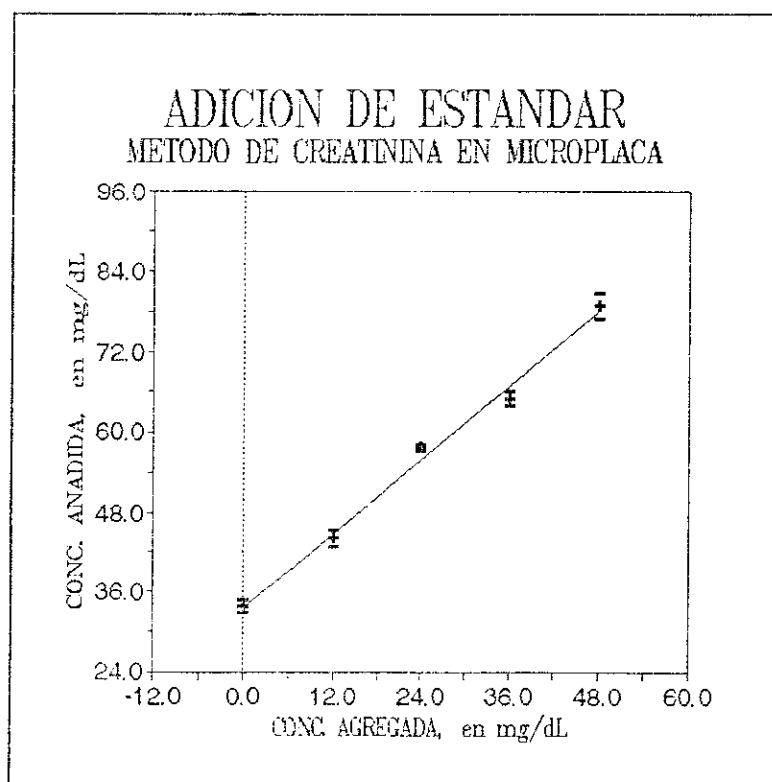


Figura 6. Rango lineal del método cinético en microplaca Experimento 4
No se observa desviación de la linealidad hasta 100 mg/dL

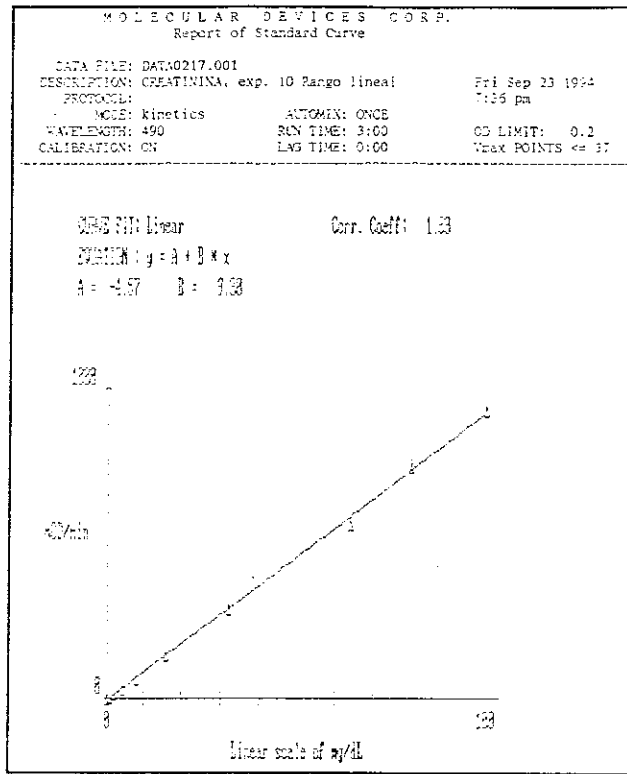
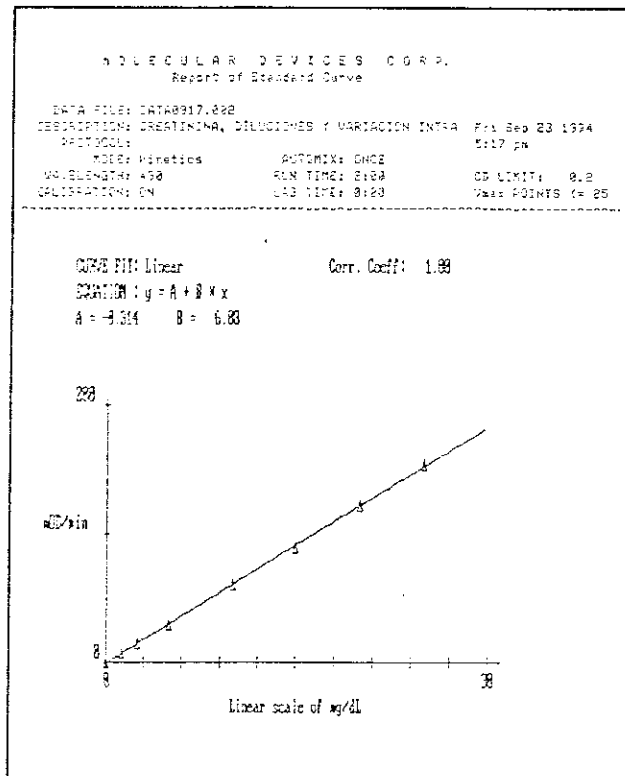


Figura 7. Recta típica de regresión en el rango de trabajo del método
Concentraciones de creatinina de 1.25 a 25.0 mg/dL



Cuadro 5. Reporte de los resultados de la Figura 7, generado por el programa Softmax 2.0

STANDARD	Std. Value	MOD/min	Mean	Std. Dev	CV	Calc. Value
S01	0.000 mg/dL	0.000	-0.053	0.159	300.0	0.052
		-0.032				0.036
		-0.249				0.011
		0.129				0.073
S02	1.250 mg/dL	7.726	8.112	0.299	3.683	1.323
		8.123				1.389
		8.142				1.391
		8.455				1.443
S03	2.500 mg/dL	15.16	14.97	0.330	2.206	2.546
		15.39				2.570
		14.56				2.447
		14.87				2.499
S04	5.000 mg/dL	30.51	30.11	0.267	0.888	5.072
		30.00				4.989
		29.92				4.975
		30.03				4.993
S05	10.00 mg/dL	57.74	60.02	2.169	3.615	9.553
		51.66				10.20
		62.07				10.27
		58.60				9.695
S06	15.00 mg/dL	90.94	88.53	3.306	3.734	15.02
		85.85				14.20
		85.44				14.11
		91.81				15.16
S07	20.00 mg/dL	117.0	121.3	5.207	4.293	19.30
		121.0				19.96
		128.7				21.23
		119.5				19.55
S08	25.00 mg/dL	146.9	153.0	4.785	3.126	24.22
		157.3				25.94
		151.7				25.01
		156.3				25.73

Cuadro. 6. Intervalos de confianza al 95% para los estándares de creatinina.
Rango 0 a 25 mg/dL
DATA0917.002

Conc. mg/dL	Valores de Respuesta (Y_i), en mOD/min				Y_i medio	Y_i regr.	D.S(y)	L.C. 95%	Intervalos de confianza para x	
0.00	0.000	-0.092	-0.249	.129	-0.053	-0.314	0.05	0.014	-0.014	0.014
1.25	7.726	8.123	8.142	8.455	8.112	7.286	0.23	0.060	1.190	1.310
2.50	15.16	15.30	14.56	14.87	14.97	14.89	0.08	0.021	2.48	2.52
5.00	30.51	30.00	29.92	30.03	30.12	30.09	0.29	0.077	4.92	5.08
10.00	57.74	61.66	62.07	58.6	60.02	60.49	2.26	0.592	9.41	10.59
15.00	90.94	85.95	85.44	91.81	88.54	90.89	2.88	0.753	14.25	15.75
20.00	117.0	121.0	128.7	118.5	121.3	121.3	2.30	0.609	19.4	20.6
25.00	146.9	157.3	151.7	156.3	153.1	151.7	6.0	1.579	23.4	26.6

Cuadro 7. Intervalos de confianza para los estándares de creatinina
(DATA0223.002)

Conc. mg/dL	Valores de Respuesta (Y_i), en mOD/min				Y_i medio	Y_i regr.	D.S (y)	L.C. 95%	Intervalos de confianza de x	
0.000	-0.430	-0.620	0.005	0.002	-0.261	-0.100	0.110	0.019	-0.019	0.019
0.025	0.176	0.171	0.105	0.122	0.144	0.136	0.003	0.001	0.025	0.025
0.050	0.311	0.287	0.269	0.362	0.307	0.371	0.014	0.002	0.048	0.052
0.100	0.595	0.975	0.691	0.938	0.800	0.842	0.219	0.037	0.063	0.137
0.150	1.346	1.166	1.292	1.282	1.272	1.313	0.104	0.018	0.132	0.168
0.200	1.584	1.527	1.600	1.820	1.633	1.784	0.033	0.006	0.194	0.206
0.300	2.532	2.254	2.477	2.695	2.490	2.726	0.161	0.027	0.273	0.327
0.400	3.514	3.411	3.454	3.48	3.465	3.668	0.059	0.010	0.390	0.410
0.500	4.862	8.426	4.828	5.166	5.821	4.610	2.058	0.348	0.152	0.848
1.000	9.857	9.850	9.960	10.18	9.962	9.32	0.004	0.001	0.999	1.001
2.000	18.38	17.48	18.90	18.96	18.43	18.74	0.520	0.088	1.912	2.088

Cuadro 8. Resultados de la variación intraensayo
Experimento 5

Réplica #	Concentración de creatinina, mg/dL		
	Orina A	Orina B	Orina C
1	80.8	36.2	86.0
2	76.1	35.5	82.7
3	80.5	35.6	87.6
4	78.1	37.4	86.6
5	83.2	35.9	88.0
6	77.3	35.8	76.2
7	81.6	33.4	85.9
8	84.3	35.4	84.6
9	80.1	38.7	85.5
10			86.4
Media:	80.2	36.0	85.0
D.S:	2.7	1.4	3.4
C.V. (%)	3.4	4.6	4.1

Cuadro 9 Resultados de la variación entre ensayos
Experimento 5

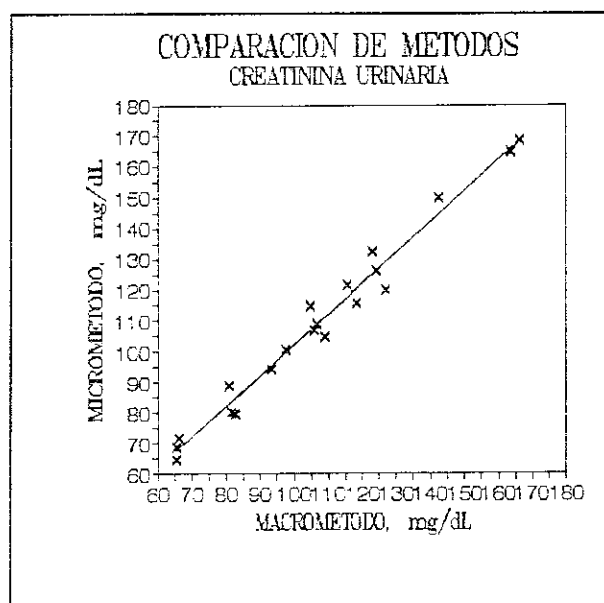
Corrida #	Concentración de creatinina, mg/dL		
	Orina A	Orina B	Orina C
1	73.5	34.1	78.6
2	73.0	35.6	85.0
3	81.3	35.3	78.4
4	78.1	38.3	71.3
5	72.4	35.9	68.9
6	78.6	33.7	71.4
7	74.1	33.4	78.9
Media:	75.4	35.5	76.1
D.S:	3.4	1.6	5.7
C.V. (%)	4.5	4.6	7.5
Variación media: 5.5 %			

Error Analítico del método

$$E_a = \frac{1}{2} \sqrt{(CV_{\text{datos}})^2 + (CV_{\text{intra}})^2} = 3.34 \%$$

Cuadro 10. Comparación de métodos para análisis de creatinina urinaria. El método "macro" es espectrofotométrico de punto final (Casa comercial Sigma).

Figura 8. Correlación entre métodos



#	Valores obtenidos, mg/dL		% de Dif.
	MACRO	MICRO	
1	108.9	104.8	3.7
2	115.4	121.7	5.5
3	106.7	108.9	2.0
4	124.2	126.2	1.6
5	142.3	150	5.4
6	163.7	164.5	0.5
7	126.8	119.5	5.8
8	80.9	88.9	9.9
9	65.5	68.6	4.7
10	65.3	64.5	1.2
11	106.1	106.9	0.8
12	82.8	79.8	3.6
13	166.2	168.7	1.5
14	97.8	100.5	2.8
15	81.5	80.1	1.7
16	93.2	94.2	1.0
17	66.3	71.7	8.2
18	104.7	114.5	9.3
19	118.4	115.5	2.4
20	123.1	132.2	7.4

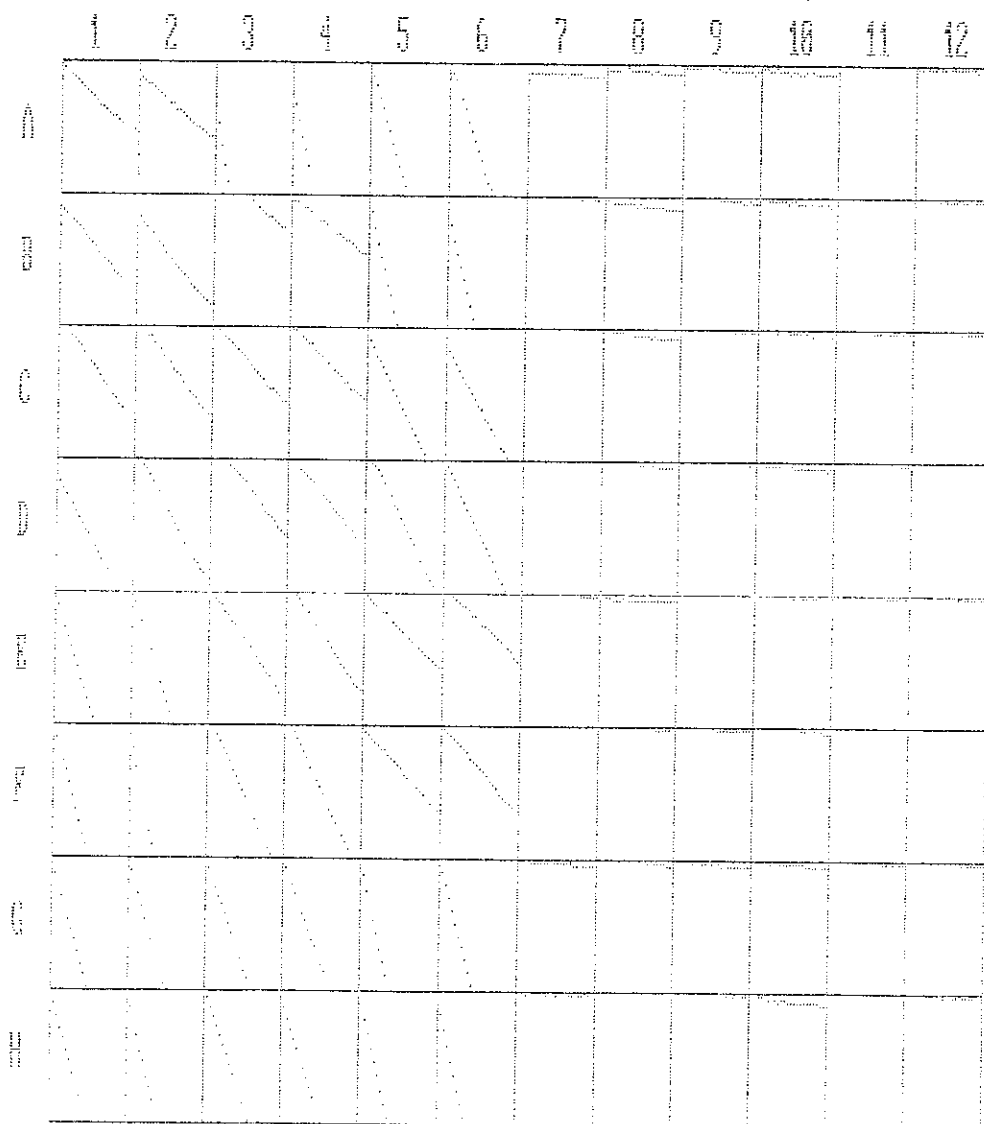
DATOS DE LA REGRESION	
Constante:	1.9
Error std del estimado	4.8
Pendiente:	1.0018
Error std. de la pendiente:	0.0371
r^2 (%explicado por el modelo)	0.975924
Coefficiente de correlación	0.987889

Figura 9. Efecto del NaCl en la velocidad de reacción de los estándares de yodo

MOLECULAR DEVICES CORP.
Kinetics Plot Display

DATA FILE: DATA0624.002
 DESCRIPTION: YODO, Exp. 19 Efecto de NaCl en el AA Fri Apr 29 1994
 PROTOCOL: 7:27 pm
 MODE: Neg. kinetics AUTOMIX: ONCE
 WAVELENGTH: 405 RUN TIME: 2:00 OD LIMIT: -0.2
 CALIBRATION: ON LAG TIME: 0:00 Vmax POINTS <= 25

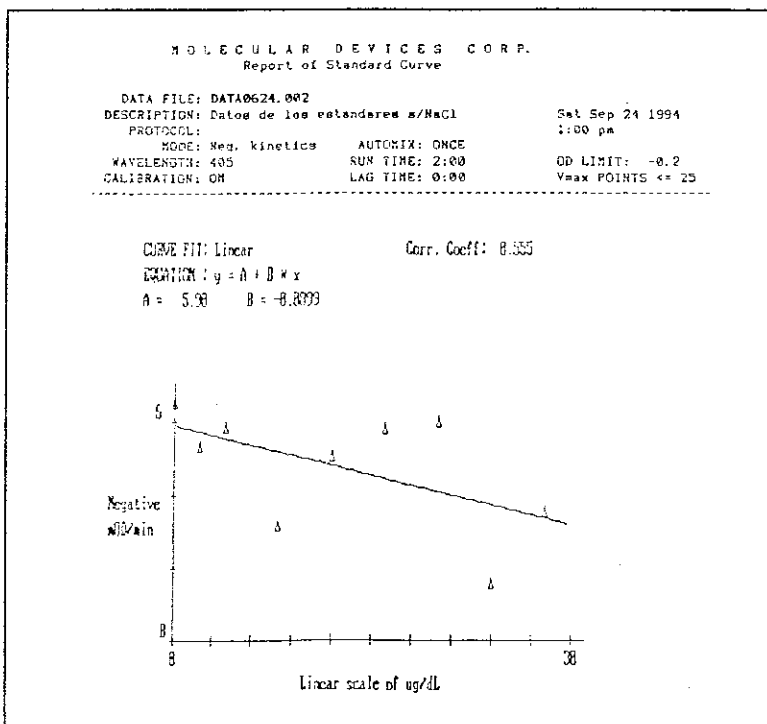
OD Limit = -0.200 OD KINETIC PLOTS Lag Time = 0:00



Filas 1,2(A-H) y 3,4(A): KIO_3 0-28 $\mu\text{g/dL}$ en ac. arsenioso con NaCl
 Filas 3,4(B-H) y 5,6(A-B): KIO_3 0-28 $\mu\text{g/dL}$ en ac. arsenioso con NaCl
 Filas 5,6(C-H) Muestras de orina en ac. arsenioso con NaCl

La otra mitad de la placa contiene los mismos estándares y muestras en el mismo orden relativo, pero con reactivo de ácido arsenioso sin NaCl.

Figura 10. Curva estándar utilizando reactivo sin cloruro de sodio



Cuadro 11. Reporte de la curva con reactivo sin cloruro de sodio

STANDARD	Std. Value	mOD/min	Mean	Std. Dev	CV	Calc. Value
SC1	0.000 ug/dL	6.222 6.748	6.485	0.572	5.737	-3.563 -9.435
SC2	2.000 ug/dL	4.551 6.120	5.333	1.110	20.80	15.00 -2.454
SC3	4.000 ug/dL	5.668 6.028	5.848	0.255	4.353	2.577 -1.427
SC4	8.000 ug/dL	1.440 4.511	3.175	2.454	77.29	45.50 11.00
SC6	12.00 ug/dL	4.071 5.023	5.049	1.384	27.41	20.34 -1.427
SC8	16.00 ug/dL	5.474 6.120	5.797	0.457	7.882	4.733 -2.454
SC7	20.00 ug/dL	3.120 8.882	5.991	4.060	67.77	30.91 -32.85
SC8	24.00 ug/dL	0.286 2.945	1.616	1.680	116.4	62.43 32.85
SC9	28.00 ug/dL	4.248 2.751	3.549	1.129	31.62	17.26 33.02

DATOS DE LA REGRESION

Ecuación: $Y = A + B * x$
 $A = 5.90; B = -0.0899; r = 0.555$

Figura 12. Curva de estándares de yodo con reactivo SCA 1:2

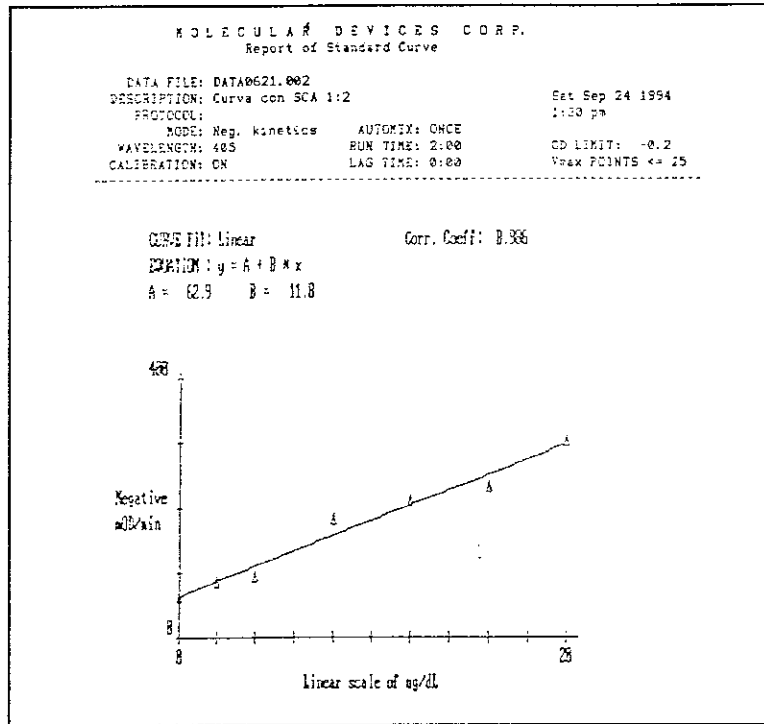


Figura 13. Curva de estándares de yodo con reactivo SCA 1:4

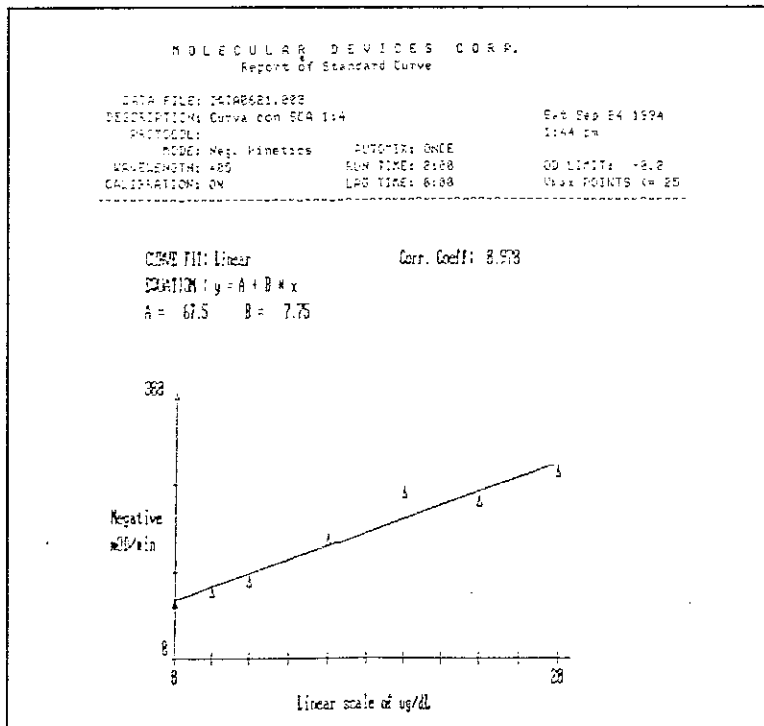


Figura 14. Curva de estándares de yodo con reactivo SCA 1:8

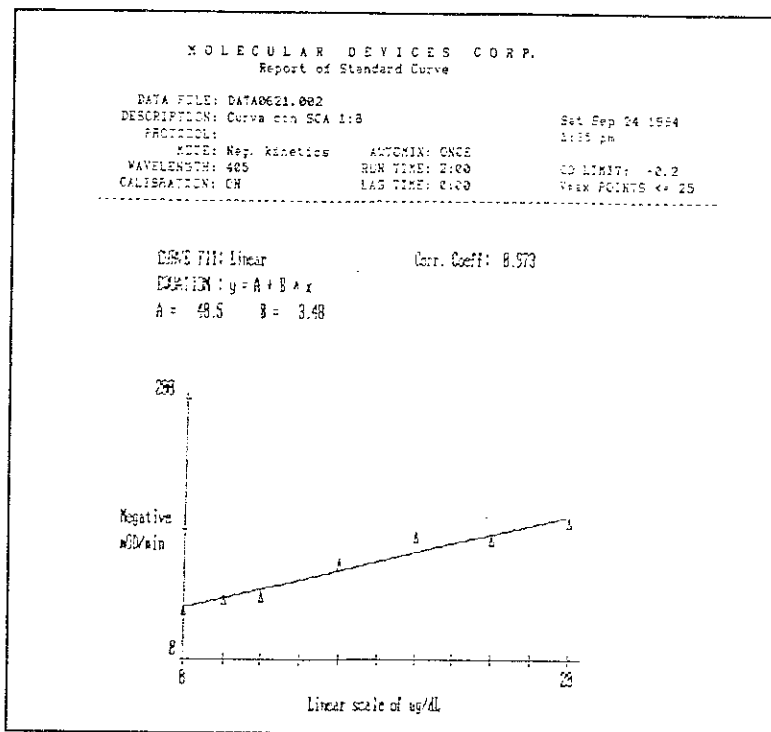


Figura 15. Curva de estándares de yodo con reactivo SCA 1:10

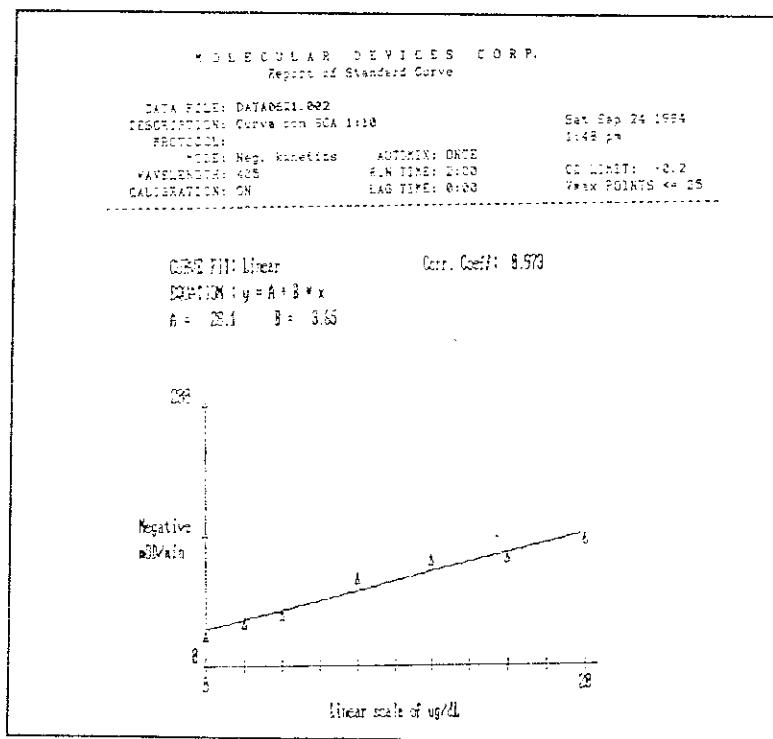


Figura 16. Efecto de la concentración de sulfato cérico amónico (SCA) en la respuesta de los estándares de yodo

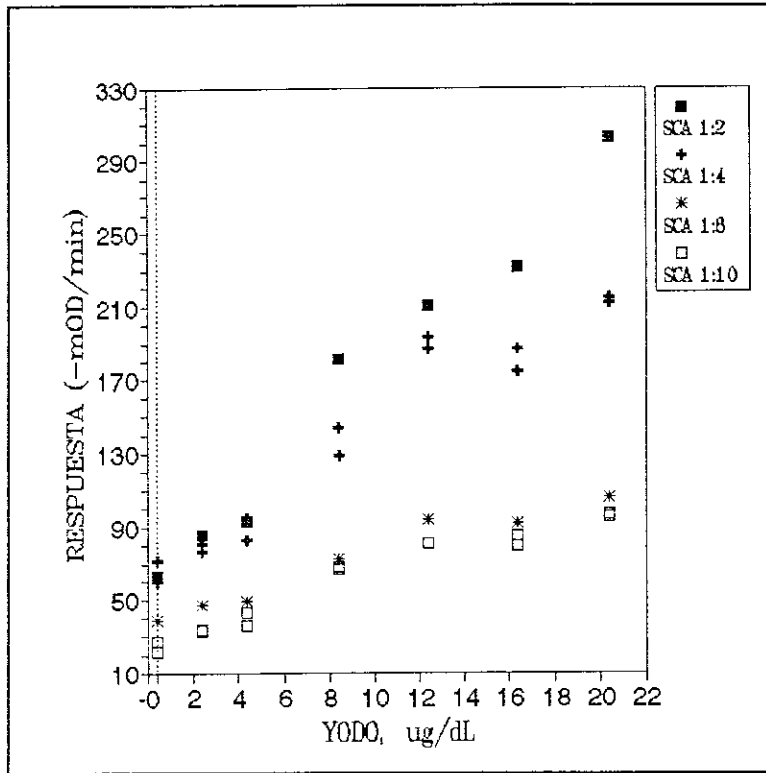


Figura 17. Fluctuación de la respuesta con el reactivo SCA 1:2 (C01) y 1:4 (C04)

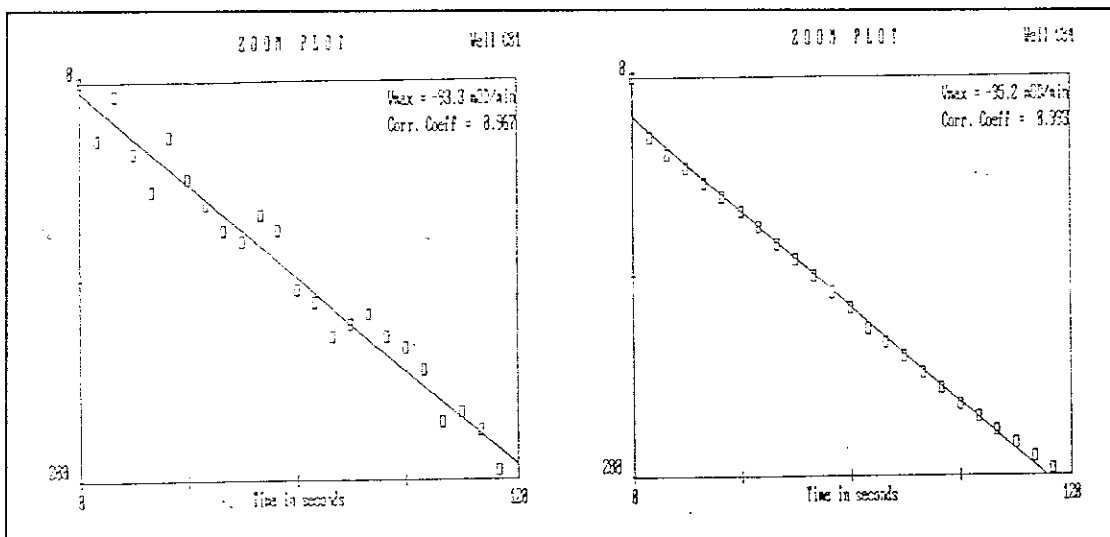


Figura 18. Efecto de la cantidad de ácido arsenioso agregada (50 y 100 μL) en la respuesta de los estándares de yodo.

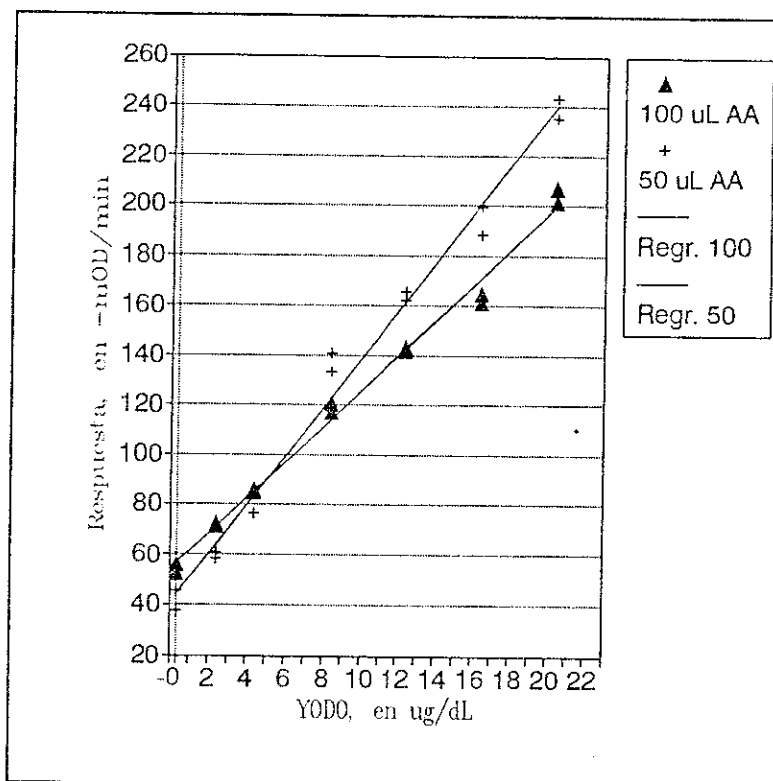


Figura 19. Curva estándar utilizando yodato de potasio (KIO_3)

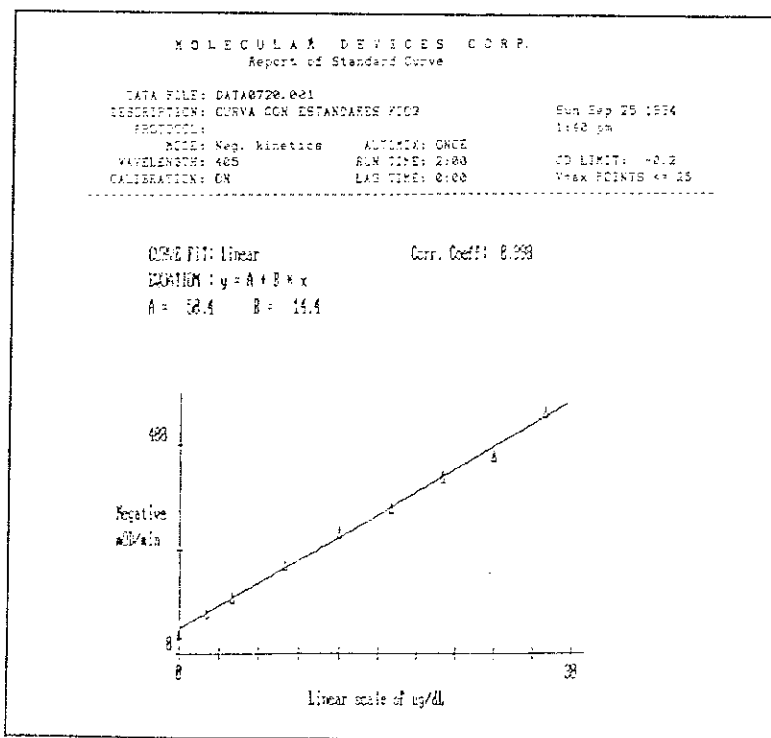
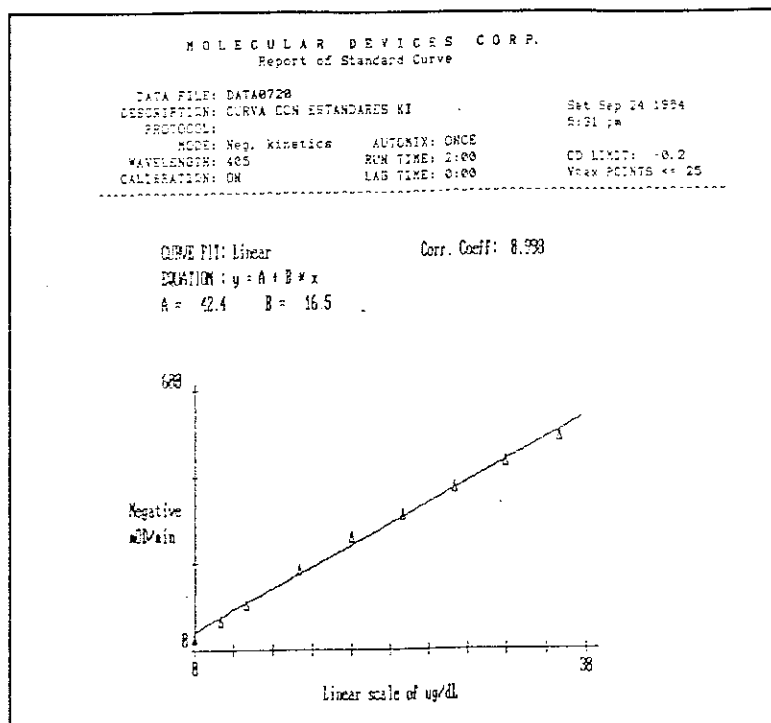


Figura 20. Curva estándar utilizando yoduro de potasio (KI)



Cuadro 13. Efecto de la proporción de muestra y ácido clórico empleados en la digestión de la orina para el análisis de yodo.

Relación Orina:muestra	Valores de la regresión			Valores para los controles, en $\mu\text{g/dL}$		
	A	B	r	941 (2.0-4.0)	942 (4.5-6.0)	943 (8.5-10.5)
1:4 (0.25+0.75)	40.3	7.36	0.987	2.37/2.29	4.54/3.57	7.18/8.77
1:1 (0.5+0.5)	18.1	15.10	0.984	3.90/3.64	6.33/6.66	9.08/9.50
4:1 (0.75+0.25)	25.0	22.70	0.991	1.96/2.11	5.13/5.82	9.56/8.63

Cuadro 14. Análisis de recuperación de analito agregado, método de yodo urinario

Muestra	Yodo, $\mu\text{g/dL} \pm \text{D.S.}$		Recuperación (%)
	C. Basal	C. Obtenida	
A	3.6 ± 0.2	11.8 ± 0.6	89.4
B	10.2 ± 0.5	19.8 ± 0.6	99.0
C	28.5 ± 1.7	40.2 ± 1.2	100.1
Recuperación promedio $\pm \text{D.S.}$: 96.3 ± 6.0			

Cada valor es el promedio de 4 análisis. La concentración de estándar agregada fue de $8.80 \mu\text{g/dL}$.

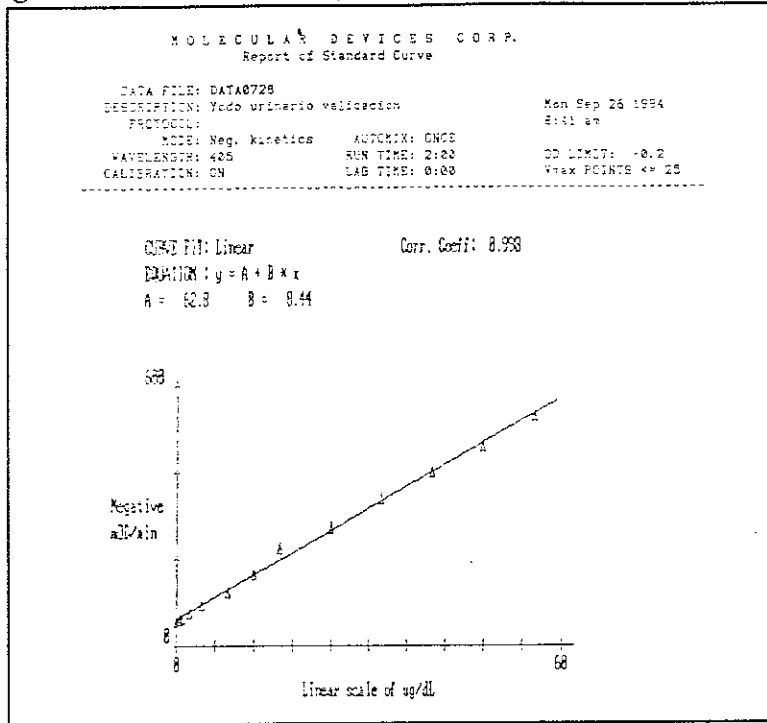
Cuadro 15. Valores obtenidos por el método de adición de estándar - Yodo urinario

Concentración de yodo, en $\mu\text{g/dL}$	
C. añadida	C. obtenida \pm D.S.
0.00	3.4 \pm 0.3
4.90	8.2 \pm 0.3
9.80	14.0 \pm 0.5
14.70	18.1 \pm 1.2
19.60	23.3 \pm 2.0
DATOS DE LA REGRESION	
Constante:	3.38
Error std. del estimado de y	1.03
Coefficiente de correlación (r)	0.9930
Pendiente	0.986
Error std. de la pendiente	0.067

Cuadro 16. Valores obtenidos por el método de adición de estándar - Yodo en sal

Concentración de yodo, en ppm	
C. añadida	C. obtenida \pm D.S.
0.0	1.2 \pm 0.1
10.0	14.3 \pm 0.9
20.0	23.7 \pm 0.7
30.0	27.8 \pm 0.9
40.0	38.4 \pm 0.8
DATOS DE LA REGRESION	
Constante:	3.50
Error std. del estimado de y	2.62
Coefficiente de correlación (r)	0.9869
Pendiente	0.879
Error std. de la pendiente	0.083

Figura 21. Rango lineal del método de yodo urinario.



Cuadro 17. Reporte de los datos de la Figura 17.

STANDARD	Std. Value	mOD/min	Mean	Std. Dev	CV	Calc. Value
S01	0.000 ug/dL	59.28 58.1A	58.71	0.603	1.357	-0.421 -0.556
S02	0.500 ug/dL	67.73 67.04	62.41	7.593	12.17	0.525 -0.667
S03	0.887 ug/dL	61.28 64.36	62.91	2.337	3.715	-0.187 0.204
S04	1.000 ug/dL	64.35 65.55	55.30	1.453	2.279	0.157 0.417
S05	2.000 ug/dL	79.24 77.19	78.51	1.873	2.356	2.015 1.701
S06	4.000 ug/dL	94.30 99.13	96.72	3.415	3.530	3.729 4.302
S07	8.000 ug/dL	121.3 129.9	125.6	6.030	4.802	5.932 7.943
S08	12.00 ug/dL	159.0 159.9	164.4	6.420	3.940	12.59 11.50
S09	16.00 ug/dL	224.7 224.3	224.5	0.309	0.137	19.19 19.14
S10	24.00 ug/dL	293.1 293.2	273.1	29.35	10.38	22.55 27.30
S11	32.00 ug/dL	352.3 328.0	340.1	17.17	5.045	34.31 21.43
S12	40.00 ug/dL	441.3 355.7	398.6	50.45	15.18	44.55 24.71
S13	48.00 ug/dL	451.2 457.0	459.1	11.15	2.429	46.03 47.90
S14	55.00 ug/dL	534.0 525.5	529.8	5.940	1.121	55.84 54.85

Figura 22. Rango lineal del método de yodo en sal 0-90 $\mu\text{g/dL}$.

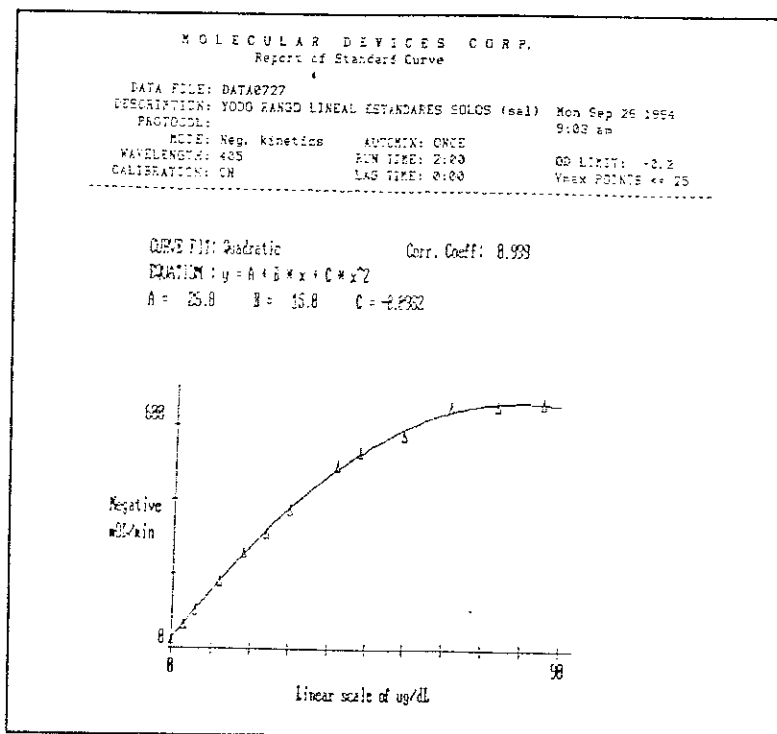


Figura 23. Rango lineal del método de yodo en sal 0-40 $\mu\text{g/dL}$.

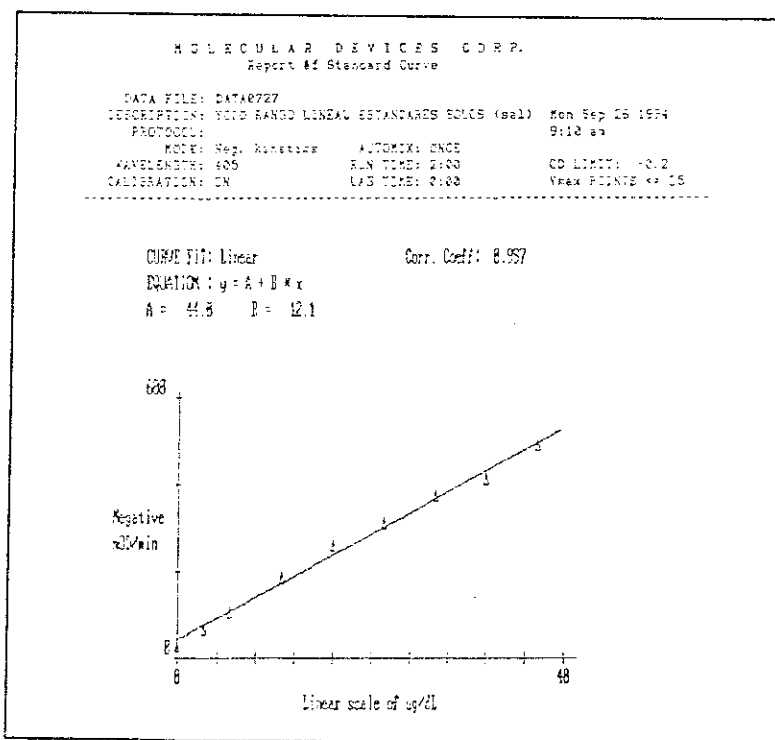
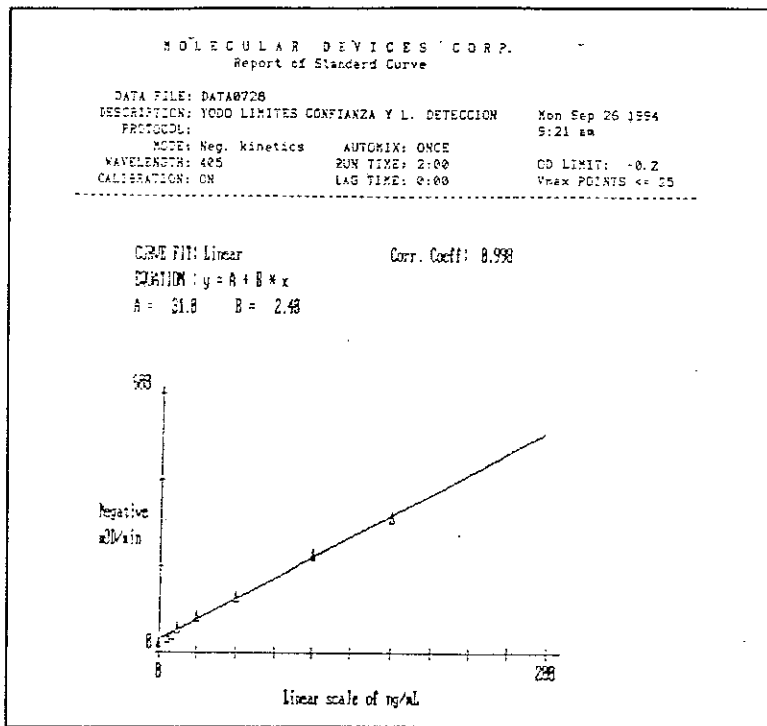


Figura 24. Curva de yodo en sal, en unidades de ng/mL.



Cuadro 18. Reporte de los datos de la Figura 24.

STANDARD	Std. Value	mOD/min	Mean	Std. Dev	CV	Calc. Value
S01	0.000 ng/mL	28.28	26.94	1.617	5.250	-1.120
		25.81				-2.161
		26.05				-1.225
		25.63				-2.234
S02	5.000 ng/mL	35.89	37.24	0.791	2.124	2.376
		36.47				2.264
		36.15				2.984
		37.63				2.769
S03	6.667 ng/mL	42.49	41.71	2.573	6.170	5.208
		38.00				2.922
		43.42				5.181
		41.92				4.554
S04	10.00 ng/mL	58.53	58.30	0.381	0.654	11.48
		58.55				11.49
		58.37				11.41
		57.74				11.15
S05	20.00 ng/mL	87.54	87.78	0.971	1.106	23.58
		86.95				23.33
		89.19				24.26
		87.45				23.54
S06	40.00 ng/mL	128.5	130.5	3.731	2.859	40.56
		128.2				40.92
		136.1				43.81
		128.3				40.56
S07	80.00 ng/mL	230.9	228.2	3.253	1.426	83.35
		223.5				80.25
		229.5				82.81
		228.6				52.45
S08	120.0 ng/mL	313.6	312.9	1.151	0.368	117.8
		313.9				117.9
		312.9				117.5
		311.3				116.8

**Cuadro 19. Intervalos de confianza para los estándares de yodo, de 0 a 32.0 $\mu\text{g/dL}$
Método cinético en microplaca, con digestión ácida**

Conc. $\mu\text{g/dL}$	Valores de Respuesta (Y_i) en mOD/min		Y_i medio	D.S.(y)	L.C.y	L.C.x	Intervalos de confianza para x	
0.0	59.28	58.14	58.71	0.81	1.81	0.20	-0.20	0.20
2.0	79.84	77.19	78.52	1.87	4.22	0.47	1.53	2.47
4.0	94.30	99.13	96.72	3.42	7.68	0.86	3.14	4.86
8.0	121.3	129.9	125.6	6.08	13.68	1.54	6.46	9.54
12.0	169.0	159.9	164.4	6.43	14.48	1.62	10.38	13.62
16.0	224.7	224.3	224.5	0.28	0.64	0.07	15.93	16.07
24.0	253.1	293.2	273.2	28.35	63.80	7.16	16.84	31.16
32.0	352.3	328.0	340.2	17.18	38.66	4.34	27.66	36.34

**Cuadro 20. Intervalos de confianza para los estándares de yodo, de 0 a 16.0 $\mu\text{g/dL}$
Método cinético en microplaca, con digestión ácida**

Conc. $\mu\text{g/dL}$	Valores de Respuesta (Y_i), en mOD/min		Y_i medio	D.S.(y)	L.C.y	L.C.x	Intervalos de confianza para x	
0.0	59.28	58.14	58.71	0.81	1.81	0.18	-0.18	0.18
0.5	67.78	57.04	62.41	7.59	17.09	1.74	-1.24	2.24
0.7	61.26	64.56	62.91	2.33	5.25	0.53	0.13	1.20
1.0	64.25	66.35	65.30	1.48	3.34	0.34	0.66	1.34
2.0	79.84	77.19	78.52	1.87	4.22	0.43	1.57	2.43
4.0	94.30	99.13	96.72	3.42	7.68	0.78	3.22	4.78
8.0	121.3	129.9	125.6	6.08	13.68	1.39	6.61	9.39
12.0	169.0	159.9	164.4	6.43	14.48	1.47	10.53	13.47
16.0	224.3	224.3	224.5	0.28	0.64	0.06	15.94	16.06

**Cuadro 21. Intervalos de confianza para los estándares de yodo, 0.0 a 120.0 ng/mL
Método cinético en microplaca, curva sin digestión**

Conc. $\mu\text{g/dL}$	Valores de Respuesta (Y_i), en mOD/min		Y_i medio	D.S.(y)	L.C.y	L.C.x	Intervalos de confianza para x	
0.00	28.28	25.81	26.94	1.42	2.25	0.94	-0.94	0.94
5.00	36.69	36.47	37.24	0.79	1.26	0.52	4.48	5.52
6.67	43.49	38.00	41.78	2.58	4.10	1.71	4.96	8.37
10.00	58.53	58.55	58.30	0.38	0.61	0.25	9.75	10.25
20.00	87.54	86.95	87.78	0.97	1.55	0.64	19.36	20.64
40.00	128.50	129.20	130.52	3.74	5.94	2.48	37.52	42.48
80.00	230.90	223.50	228.20	3.25	5.17	2.16	77.84	82.16
120.00	313.60	313.90	312.92	1.16	1.85	0.77	119.23	120.8

VII. CONCLUSIONES

1. El uso del lector de microplacas permitió desarrollar el análisis cinético tanto de creatinina como de yodo urinarios. Con estos métodos es posible analizar un mayor número de muestras reduciendo el error debido al factor humano. A pesar de ser adaptaciones con reducción considerable de volumen, la precisión de los análisis es mejor que la de los métodos usados de rutina en laboratorios clínicos, debido a que se fundamentan en el seguimiento cinético de una reacción y no en el análisis de punto final.
2. El método cinético en microplaca para creatinina demostró ser un método rápido y confiable para el análisis rutinario de muestras de orina. Este método muestra una sensibilidad comparable a la reportada con métodos más sofisticados, como la cromatografía líquida o la electroforesis capilar. Su costo es 3 veces más bajo que el del método espectrofotométrico manual.
3. El análisis cinético de yodo urinario mostró un rango lineal más amplio que el del método convencional. El número de muestras que se pueden procesar es, igual que el micrométodo de creatinina, mayor que con el método manual, con la ventaja que se eliminan los errores debidos al factor humano. Los métodos "macro" manual y microcinético son comparables en cuanto a precisión y exactitud. El análisis de límite de detección mostró que no es posible cuantificar, por ninguno de los dos métodos, muestras de orina con un contenido menor a $2 \mu\text{g/dL}$.
4. El análisis de muestras de sal con el método cinético utilizado para la cuantificación de yodo en orina fue posible, pero presenta un grado de complejidad que no está de acuerdo con la simplicidad requerida para el análisis. El método de titulación, aunque muy sencillo, es adecuado para la cuantificación del yodo en la sal común.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que se investiguen las posibilidades de aplicación de otros métodos espectrofotométricos al análisis en microplaca, por las ventajas de rapidez y bajo costo que presentan los métodos adaptados a este equipo. Si el análisis es espectrofotométrico de punto final, será necesaria la corrección de absorbancia a otra longitud de onda.
2. A la luz de los resultados obtenidos, es necesario mejorar la sensibilidad de los métodos para análisis de yodo aplicable a bajas concentraciones, ya que la detección de cantidades en los rangos de 2 a 4 $\mu\text{g/dL}$ presenta problemas, tanto por el micrométodo como con el método macro. Se recomienda mejorar la sensibilidad del método de microplaca actual, utilizando un método de digestión seca.
3. Se recomienda investigar la posible aplicación del método cinético para análisis de yodo a un método rápido de campo para determinar yodo en sal, cuyo principio sea la medición del tiempo en que desaparece el color amarillo del cerio en presencia del ión arsenioso y el catalizador yodo.
4. La garantía de la calidad de los resultados obtenidos radica en un control de calidad adecuado al análisis que se está realizando. Es por lo tanto indispensable en cualquier laboratorio analítico que se implementen programas de calidad para los métodos de rutina. Estos programas de calidad deben ser el resultado de una validación y caracterización de los métodos, ya que las características analíticas del método estipulan los márgenes de error que se le pueden permitir al método cuando éste sea usado rutinariamente. Esto también evitará que los resultados de los métodos den lugar a malinterpretaciones, dependiendo de los márgenes de tolerancia que se hayan demostrado para cada método.

IX. REFERENCIAS

1. Arroyave, G; Pineda, O. y Scrimshaw, N.. 1955. **La Estabilidad del Yodato de Potasio en la Sal común.** *Bol. Of. San. Panam.* 39:576-577.
2. Ayres, G. 1970. **Análisis Químico Cuantitativo.** 2a.ed. Harper y Row, Nueva York. 740 p.
3. Bakker, H. 1977. **Gas-Liquid Chromatographic Determination of Total Inorganic Iodine in Milk.** *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 1307-1309.
4. Barkley, R.; y Thompson, T. 1960. **Determination of Chemically Combined Iodine in Sea Water by Amperometric and Catalytic Methods.** *Anal. Chem.* 32 (2): 154-158.
5. Belling, B. 1983. **Further Studies on the Recovery of Iodine as Iodine-125 after Alkaline Ashing prior to Assay.** *Analyst* 108: 763-765.
6. Benotti, J.; y Benotti, N. 1963. **Protein Bound Iodine, Total Iodine, and Butanol-extractable Iodine by Partial Automation.** *Clin. Chem.* 9(4): 408-416.
7. Benotti, J.; y Benotti, N. 1965. **Determination of Total Iodine in Urine, Stool Diets and Tissue.** *Clin. Chem.* 11(10): 932-936.
8. Bourdoux, P.; Thilly, C.; Delange, F.; y Erman, A.. 1986. **A New Look at Old Concepts in Laboratory Evaluation of Endemic Goiter.** En: Dunn, J.; Pretell, E.; y Viteri, F. (Eds.) Towards the Eradication of Endemic Goitre, Cretinism, and Iodine Deficiency. Publicación Científica No. 502 de la PAHO. pp 115-129.
9. Carey, N.; y Garber, C.. 1989. **Evaluation of Methods.** En: Kaplan, L. y Pesce, A. (Eds) Clinical Chemistry. Theory, Correlation and Analysis. 2a. ed. CV Mosby Company, San Luis. Capítulo 19 pp 290-310.
10. Cavalieri, R. 1980. **Iodine.** En: Goodhart, R.; y R. Shills (Eds) Modern Nutrition in Health and Disease. 6a.ed.. Lea y Febiger, Filadelfia. pp 395-407.
11. Copeland, B. 1989. **Quality Control.** En Kaplan, L. y A. Pesce (Eds) Clinical Chemistry. Theory, Correlation and Analysis. 2a. ed. CV Mosby Company, San Luis. Capítulo 18 pp 270-289.
12. Crecelius, E. 1975. **Determination of Total Iodine in Milk by X-Ray Fluorescence Spectrometry and Iodide Electrode.** *Anal. Chem.* 47 (12): 2034-2035.

13. Delange, F. 1986. **Anomalies in Physical and Intellectual Development Associated with Severe Endemic Goiter.** En: Dunn, J.; Pretell, E.; y Viteri, F. (Eds.) Towards the Eradication of Endemic Goitre, Cretinism, and Iodine Deficiency. Publicación Científica No. 502 de la PAHO, pp 46-67.
14. Dunn, J. 1974. **Thyroglobulin and others factors in the Utilization of Iodine by the Thyroid.** En: Dunn, J.; y Medeiros-Neto, A. (Eds) Endemic Goitre and Cretinism: Continuing Threats to World Health. Publicación Científica No. 292 de la PAHO. pp 17-24.
15. Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D.. 1993. **Methods for Measuring Iodine in Urine.** Publicación del Consejo Internacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD)/UNICEF/WHO. 71 p.
16. Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D.. 1993. **Two Simple Methods for Measuring Iodine in Urine.** *Thyroid* 3(2): 119-123.
17. Dunn, J.; y Van der Haar, F. 1992. **Guía práctica para la Corrección de la Deficiencia de Yodo.** Consejo Internacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo ICCIDD/UICEF/OMS, Holanda. 62p.
18. Fernández-Ulloa, M.; y Maxon III, H.. 1989. **Thyroid.** En Kaplan, L. y Pesce, A. (Eds) Clinical Chemistry. Theory, Correlation and Analysis. 2a. ed. CV Mosby Company, San Luis. Capítulo 41 pp 620-649.
19. Fisher, P.; y L'Abbé, M. 1981. **Acid Digestion Determination of Iodine in Foods.** *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 (1): 71-74.
20. Fisher, P.; L'Abbé, M.; y Giroux, A. 1986. **Colorimetric Determination of Total Iodine in Foods by Iodide Catalyzed Reduction of Ce⁴⁺.** *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (4): 687-689.
21. Follis, R.; Vanprapa, K.; y Damrongsakdi, D.. 1962. **Studies on Iodine Nutrition in Thailand.** *J. Nutr.* 76: 159-173.
22. Ford, H.; y Johnson, L. 1990. **Ascorbic Acid Interferes with an Automated Urinary Iodide Determination Based on the Ceric-Arsenious Acid Reaction.** *Clin. Chem.* 37 (5): 759.
23. Frey, H.; Roselund, B.; y Torgersen, J.. 1973. **Value of Single Specimens of Urine in Estimation of 24 hour urine Iodine Excretion.** *Acta Endocrinol (Kbh)* 72: 287-292.
24. Gaitán, E.; Cooksey, R.; y Lindsay, R.. 1986. **Factors other than Iodine in Endemic Goiter: Goitrogens and Protein-Calorie Malnutrition.** En: Dunn, J.; Pretell, E.; y Viteri, F. (Eds.) Towards the Eradication of Endemic Goitre, Cretinism, and Iodine Deficiency. Publicación Científica No. 502 de la PAHO. pp 28-45.

25. Garber, C.; y Carey, N.. 1989. **Laboratory Statistics**. En: Kaplan, L. y Pesce, A.(Eds) Clinical Chemistry. Theory, Correlation and Analysis. 2a. ed. CV Mosby Company, San Luis. Capítulo 16 pp 250-261.
26. Garfield, F. 1993. **Principios de Garantía de Calidad para los laboratorios Analíticos**. Association of Official Analytical Chemists AOAC International, Arlington, Virginia. 194 p.
27. Garry, P.; Lashley, W.; y Owen, G. 1973. Automated Method of Urinary Iodine. *Clin. Chem.* 19(9): 950-953.
28. Gibson, R. 1990. **Assessment of trace-element status**. En: Gibson, R. Principles of Nutritional Assessment. Oxford Press, Nueva York. pp 527-532.
29. Hearn, G. 1992. **A Guide to Validation in HPLC**. Perkin Elmer Ltd, Inglaterra. 20 p.
30. Hernández, G.; y Contreras, G. 1992. **Desórdenes por Deficiencia de Yodo**. Boletín Técnico del Ministerio de Salud Pública de Honduras/Asociación de Salineros del Sur/UNICEF, Tegucigalpa. 35p.
31. Hershman, J.; Melnick, G.; y Kastner, R. 1986. **Economic Consequences of Endemic Goiter**. En: Dunn, J. ; Pretell, E. y Viteri, F. (Eds.) Towards the Eradication of Endemic Goitre, Cretinism, and Iodine Deficiency. Publicación Científica No. 502 de la PAHO. pp 96-106.
32. Hetzel, B. 1987. **An Overview of the Prevention and Control of Iodine Deficiency Disorders**. En: Hetzel, B.; Dunn, J.; y Stanbury, J. (Eds) The Prevention and Control Of Iodine Deficiency Disorders. Elsevier, Amsterdam. pp.10.
33. Hetzel, B. 1986. **The Concept of Iodine Deficiency Disorders (IDD) and Their Eradication**. En Dunn, J.; Pretell, E.; y Viteri, F. (Eds.) Towards the Eradication of Endemic Goitre, Cretinism, and Iodine Deficiency. Publicación Científica No. 502 de la PAHO, Washington. pp 109-114.
34. Hetzel, B. 1990. **Iodine Deficiency: An International Public Health Problem**. En Brown, M. (Ed) Present Knowledge in Nutrition. 6a ed. ILSI, Nueva York. pp 308-313.
35. Hetzel, B. 1993. **Introduction**. *Am J Clin Nutr Suppl* (Interrelationships between Selenium Deficiency, Iodine Deficiency and Thyroid Hormones) 57 (2S):235S.
36. Hetzel, B.; y Dunn, J.. 1989. **The Iodine Deficiency Disorders: Their Nature and Prevention**. *Ann. Rev. Nutr.* 9: 21-38.
37. Joerin, M. 1975. **A Rapid Method of Determining Total Iodine in Bovine Milk**. *Analyst* 100: 7-11.

38. Johansen, O.; y Steinnes, E. 1976. **Determination of Iodine in Plant Material by a Neutron Activation Method.** *Analyst* 101: 455-457
39. Jolin, T. y R. Escobar Del Rey. 1965. **Evaluation of iodine creatinine ratios of casual samples as indices of daily urinary output during field studies.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25: 540-542.
40. Knapp, G. 1974. **Automatic Digital System for Quantitative Kinetic Analysis: Application to Catalytic Determination of Thyroid Hormones.** *Anal. Chem.* 46 (6): 719-723.
41. Lauber, K. 1975. **Iodine Determination in Biological Material. Kinetic Measurement of the Catalytic Activity of Iodide.** *Anal. Chem.* 47(4): 769-771.
42. Mahesh, D.; Deosthale, Y. y Naransinga Rao, B. 1992. **A Sensitive Kinetic Assay for the Determination of Iodine in Foodstuffs.** *Food Chem.* 43: 51-56.
43. Matovinovic, J.; Child, M.; Nichaman, M.; y Trowbridge, F.. 1974. **Iodine and Endemic Goiter.** En: Dunn, J.; y Medeiros-Neto, A. (Eds) Endemic Goitre and Cretinism: Continuing Threats to World Health. Publicación Científica No. 292 de la PAHO, Washington. pp 67-91
44. May, W.; Wu, D.; Eastman, C.; Bourdoux, P. y Maberly, G. 1990. **Evaluation of Automated Urinary Iodine Methods: Problems of Interfering Substances Identified.** *Clin. Chem.* 36(6): 865-869.
45. Miles, P. 1978. **Determination of Iodide in Nutritional Beverage Products Using an Ion Selective Electrode.** *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61 (6): 1366-1369.
46. Moxon, R.; y Dixon, E. 1980. **Semi-Automated Method for the Determination of Total Iodine in Food.** *Analyst* 105: 344-352.
47. Phillips, D. 1989. **Controlling Iodine Deficiency Disorders in Developing Countries.** Oxfam Practical Health Guide No.5. Oxfam, Oxford. 35 p.
48. Querido, A.; Djokomoeljanto, R.; y Van Hardeveld, C.. 1974. **The Consequences of Iodine Deficiency for Health.** En: Dunn, J.; y Medeiros-Neto, A. (Eds) Endemic Goitre and Cretinism: Continuing Threats to World Health. Publicación Científica No. 292 de la PAHO. pp 8-14.
49. Refetoff, S. 1986. **Thyroid Physiology Update.** En: Dunn, J.; Pretell, E. y Viteri, F. (Eds) Towards the Eradication of Endemic Goitre, Cretinism, and Iodine Deficiency. Publicación Científica No. 502 de la PAHO. pp 3-14.
50. Rodríguez, P.; y Pardue, H. 1969a. **Kinetics of the Iodide-Catalyzed Reaction between Cerium(IV) and Arsenic(III) in Sulfuric Acid Medium.** *Anal. Chem.* 41(11): 1369-1376.

51. Rodríguez, P.; y Pardue, H. 1969b. Analytical applications of the Iodide and Osmium Catalized Reaction between Cerium(IV) and Arsenic(III). *Anal. Chem.* 41(11): 1376-1380.
52. Sandell, E. y Kolthoff, M.. 1937. Micro Determination of Iodine by a Catalytic Method. *Mikrochem Acta* 1: 9-25.
53. Scriba, P. 1974. **Hypothalamic and Pituitary Control of Thyroid Function.** En: Dunn, J.; y Medeiros-Neto, A. (Eds) Endemic Goitre and Cretinism: Continuing Threats to World Health. Publicación Científica No. 292 de la PAHO. pp 33-42.
54. Scrimshaw, N.; Vega Franco, L.; Arellano, C.; Sagastume, C; Méndez, J. y De León, R. 1966. Efecto de la Yodación de la Sal sobre la Prevalencia de bocio Endémico en Niños Escolares de Guatemala. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 50: 222-228.
55. Silva, E. 1985. Effects of Iodine and Iodine-Containing Compounds on Thyroid Function. *Med. Clinics North Am.* 69 (5): 881-898.
56. Thilly, C.; Delange, F.; Lagasse, R.; Bourdoux, P.; Ramioul, L.; Berquist, H.; y Ermans, A. 1978. Fetal Hypothyroidism and maternal Thyroid status in Severe Endemic Goitre. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 354-360.
57. Thompson, D.; Lee, S.; y Allen, R. 1983. Differential Pulse Polarographic Determination of Iodine in Foods and Nutricional products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66 (6): 1380-1384.
58. Truesdale, V. y Smith, P. 1975. **The Automatic Determination of Iodide or Iodate in Solution by Catalytic Spectrophotometry, with Particular Reference to River Water.** *Analyst* 100: 111-123.
59. Vidor, G. 1978. Iodine Toxicity in Man and Animals. En: Rechcigl, M. (Ed) Handbook Series in Nutrition and Food, Section E: Nutritional Disorders Volumen 1. CRC Press, West Palm Beach, Florida. pp 219-282.
60. Vought, R.; y London, W.. 1964. Dietary Sources of Iodine. *Am J Clin Nutr* 14: 186-192.
61. Wellby, M. 1990. **Clinical Chemistry of Thyroid Function Testing.** En: Spiegel, H (Ed) Advances in Clinical Chemistry Volumen 28. Academic Press, San Diego. pp 1-92.
62. Whitehead, T. 1993. **Principios de Control de Calidad.** Reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) WHO Documento WHO/LAB/93.1. 60 p.
63. WHO/UNICEF/ICCIDD. 1993. **Indicators for Assessing Iodine Deficiency Disorders and their Control Programmes.** Documento WHO/NUT/93.1. 33 p.

ANEXO A

CREATININA Test fotométrico

3385 Merckotest

Para aprox. 60 determinaciones

Reactivos

- 1 Solución buffer (313 mmol/NaOH; 12.5 mmol/l fosfato)
- 2 Acido pícrico (8.73 mmol/l)
- 3 Solución estándar (1 mg/dl \approx 88.4 μ mol/l creatinina)

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de expiración señalada si se guardan entre +15 y +25°C.

Preparación

Los reactivos están listos para su uso.

Procedimiento

Long de onda: Hg 492, IL 500, Cd 509. Paso de luz: 1 cm.

Prepare uno o dos estándares para cada serie de pruebas.

Dado que la reacción es altamente sensible a la temperatura, debe tenerse cuidado de asegurar que las soluciones sean precalentadas a una temperatura exacta y la reacción debe proceder a una temperatura constante. La temperatura de reacción de las muestras y los estándares debe ser idéntica!!. Mientras se cumplan estas condiciones, la determinación se puede llevar a cabo a cualquier temperatura escogida entre +20 y +37°C.

Método sin premezcla

	Muestra	Estándar
Agregue en tubos de ensayo:		

Suero u		
orina diluida 1+99	200 μ L	-
Solución estándar 3	-	200 μ L
Solución buffer 1	500 μ L	500 μ L

Mezcle e incube por 5 min.

Acido pícrico 2	500 μ L	500 μ L
-----------------	-------------	-------------

Mezcle, agregue inmediatamente a las celdas, después de 1 min lea la absorbancia de la

muestra (A_{S1}) y del estándar (A_{St1}). Exactamente 5 min después de la primera lectura, lea nuevamente la absorbancia de la muestra (A_{S2}) y del estándar (A_{St2}).

Si la reacción procede a más de +30°C la absorbancia A_1 debe leerse después de 30 s.

Método con premezcla

Reactivo: Mezclar la solución buffer 1 y el ácido pícrico en un ratio 1+1. La mezcla es estable por unas 5 horas si se deja a temperatura ambiente. Preincube el reactivo por 10 min.

	Muestra	Estándar
Agregue en tubos de ensayo:		

Suero u		
orina diluida 1+99	200 μ L	-
Solución estándar 3	-	200 μ L
Solución buffer 1	1000 μ L	1000 μ L

Mezcle e incube por 5 min.

Mezcle, agregue inmediatamente a las celdas, después de 1 min lea la absorbancia de la muestra (A_{S1}) y del estándar (A_{St1}). Exactamente 5 min después de la primera lectura, lea nuevamente la absorbancia de la muestra (A_{S2}) y del estándar (A_{St2}).

Si la reacción procede a más de +30°C la absorbancia A_1 debe leerse después de 30 s.

Cálculos

Suero:

$$\text{Creatinina} = \frac{A_{S2} - A_{S1}}{A_{St2} - A_{St1}} \text{ [mg/dL]}$$

Orina:

$$\text{Creatinina} = \frac{A_{S2} - A_{S1}}{A_{St2} - A_{St1}} * 100 \text{ [mg/dL]}$$

Límite de dilución

Si el valor obtenido es mayor a 5 mg/dL, diluya 1:6 el suero u orina ya diluida con NaCl 0.9% y lea otra vez.

CREATININA
(SIGMA DIAGNOSTICS)
DETERMINACION COLORIMETRICA CUANTITATIVA
EN SUERO, PLASMA U ORINA A 500 nm (Método 555)

ANTECEDENTES Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La mayoría de métodos para cuantificación de creatinina están basados en la reacción de Jaffé, donde se forma un color amarillo/anaranjado cuando el metabolito es tratado con picrato alcalino. Desafortunadamente, la reacción de Jaffe no es específica y un número de sustancias incluyendo proteínas en fluidos biológicos podrán interferir.

Slot desarrolló un método que mejora la especificidad, notando que bajo condiciones ácidas el color de creatinina-picrato se perdía más rápido que los cromógenos que interfieren. Más adelante, Heinegard y Tiderstrom simplificó el procedimiento eliminando la necesidad de la precipitación de proteínas. El trabajo de éstos autores sirve como base para el manual del método descrito, donde el color derivado de la creatinina se destruye en pH ácido. La diferencia en intensidad de color medido a o cerca 500 nm antes y después de la acidificación es proporcional a la concentración de creatinina. Para cuantificaciones automatizadas discretas, se toma ventaja en el hecho que el cromógeno de creatinina se forma más rápido que las sustancias interferentes. De allí, que se diseñaron aplicaciones cinéticas donde las lecturas a determinados intervalos de tiempo se toman durante el desarrollo del color de la reacción de Jaffé.

REACTIVOS INCLUIDOS

SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO, 1.0 N, No. catálogo 930-65.

REACTIVO ACIDO, No. catálogo 555-2
Mezcla de ácido sulfúrico y ácido acético.

REACTIVO DE COLOR PARA CREATININA, No. catálogo 555-1
Acido pícrico, aproximadamente 0.6%, borato de sodio y surfactante.

PATRON DE CREATININA, No. catálogo 925-3
Creatinina, 3.0 mg/dL (265 $\mu\text{mol/L}$), en ácido clorhídrico, 0.02 N.

PATRON DE CREATININA, No. catálogo 925-15
Creatinina, 15 mg/dL (1326 $\mu\text{mol/L}$), en ácido clorhídrico, 0.02 N.

PRECAUCIONES:

Deben seguirse las precauciones normales en el manejo de reactivos de laboratorio. La solución de hidróxido de sodio y el reactivo ácido son **CORROSIVOS**. Causa quemaduras. Es dañino por inhalación, en contacto con la piel y si es ingerido. En caso de contacto con los ojos, lave inmediatamente con abundante agua y consulte al médico. Quítese la ropa contaminada inmediatamente. Use ropa apropiada para protección, guantes y protección para cara y ojos.

El reactivo de color para creatinina es dañino si se ingiere. Puede causar reacción alérgica en la piel. Es irritante a los ojos, sistema respiratorio y piel. Los órganos blanco son: sangre, riñones. En caso de contacto con los ojos, lave inmediatamente con abundante agua y busque ayuda médica. Use ropa para protección apropiada. El reactivo de color para creatinina contiene ácido pícrico. En caso de derrame, absorba inmediatamente y lave el área. NOTA: El ácido pícrico seco puede ser explosivo. Si la solución se ha secado, no la maneje. Busque ayuda del departamento de bomberos.

PREPARACION:

La solución de picrato alcalino se prepara mezclando 5 volúmenes del reactivo de color de creatinina, No. catálogo 555-1, con 1 volumen de la solución de hidróxido de sodio, No. catálogo 930-65 (e.g., 50 mL reactivo de color de creatinina más 10 mL de solución de hidróxido de sodio).

La solución de hidróxido de sodio, reactivo ácido y patrón de creatinina son soluciones listos para usar.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Guarde la solución de hidróxido de sodio, reactivo ácido, reactivo de color para creatinina y la solución de picrato alcalino a temperatura ambiente (18-26 °C). Si el reactivo de color para creatinina se vuelve viejo, puede desarrollarse turbidez. Entibie el reactivo hasta que aclare y mezcle bien antes de usar.

Guarde los estándares de creatinina en la refrigeradora (2-8°C).

El picrato alcalino es estable por lo menos una semana si se guarda en oscuro a temperatura ambiente. Se oscurece con el tiempo, pero esto no afecta su funcionamiento.

PROCEDIMIENTO

MATERIAL PROPORCIONADO

Ver sección de reactivos.

MATERIALES REQUERIDOS:

Instrumento: Cualquier colorímetro o espectrofotómetro que transmite luz a o cerca de 500 nm es apropiado para la prueba.

Materiales:

Celdas equivalentes específicas para el instrumento a usar.

Pipetas automáticas o convencionales para dispensar 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mL.

Probeta graduada, 100 mL.

PROCEDIMIENTO:

El procedimiento descrito es para un volumen de reacción de 3.4 mL, siendo necesaria una celda de 10-12 mm. Si se usa una celda más larga, los volúmenes de reactivos y muestra deben duplicarse.

1. A una celda rotulada BLANCO, agregue 0.3 mL de agua.
A una celda rotulada PATRON, agregue 0.3 mL de patrón de creatinina, No. de catálogo 925-3.
A una celda rotulada MUESTRA, agregue 0.3 mL de muestra.
2. A todas las celdas, agregue 3.0 mL de la solución de picrato alcalino. Mezcla y deje reposar a temperatura ambiente de 8-12 minutos.

3. Lea y anote la absorbancia (A) del PATRON y MUESTRA contra el BLANCO como referencia a o cerca 500 nm. Esta es la inicial A.
4. A todas las celdas, agregue exactamente 0.1 mL de reactivo ácido, No. catálogo 555-2. Mezcla inmediatamente y vigorosamente. Deje reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
NOTA: Puede formarse un precipitado al agregar el reactivo ácido, pero se disuelve luego de mezclar.
5. Lea y anote la absorbancia (A) del PATRON y la MUESTRA contra el BLANCO como referencia a la misma longitud de onda usada para las lecturas iniciales. Esta es la A final.

NOTAS:

1. Usualmente, una dilución de orina de 10-15 es satisfactoria para los ensayos, paso 1. Multiplica los resultados por el factor de dilución.
2. El límite de linealidad del procedimiento depende del tamaño de la celda y del instrumento empleado. La respuesta del colorímetro obedece a la ley de Beer hasta al menos 10 mg/dL en un espectrofotómetro de ancho de banda angosto y al menos hasta 5 mg/dL para la mayoría de instrumentos con un ancho de banda ancho, usando celdas de 12 mm. Para los espectrofotómetros con ancho de banda ancho y celdas de 10 mm, el límite de linealidad puede ser menos. Por lo tanto, se debe preparar una curva de calibración para establecer el límite de linealidad del sistema instrumento-celda usado.
3. Si el valor de la muestra se excede del límite de linealidad del sistema instrumento-celda, la muestra debe diluirse, correrla nuevamente y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

CALCULOS

Creatinina en mg/dL:

$$\frac{Abs_{MUESTRA\ final} - Abs_{MUESTRA\ inicial}}{Abs_{STD\ final} - Abs_{STD\ inicial}} \times 3$$

donde 3 es la concentración del estándar de creatinina utilizado.

Para convertir el resultado a unidades internacionales ($\mu\text{mol/L}$), multiplique la concentración obtenida por 88.4.

CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO

ESTUDIOS DE REPRODUCIBILIDAD: Se ensayaron pools de sueros con valores medios de creatinina de 1.1, 2.7 y 6.9 mg/dL. Los coeficientes de variación fueron 10.9, 9.3 3.6%, respectivamente.

ESTUDIOS DE RECUPERACION: Pools de suero a los que se les agregó creatinina para elevar su nivel en 2.5 y 5.0 mg/dL dieron recuperaciones de 103 y 95%.

ESTUDIOS DE CORRELACION: 42 sueros con valores entre 0.5 y 41.3 mg/dL se ensayaron por el procedimiento de Miller y Miller, que requiere separación previa de la creatinina por una técnica de absorción. Los valores medios fueron 3.8 y 3.9% mg/dL respectivamente, y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.997.

Sigma garantiza que sus productos cumplen con la información contenida en esta y otras publicaciones de Sigma. El comprador debe determinar que el producto es adecuado para su uso particular.

REFERENCIAS

1. Tietz NW: Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders, Filadelfia, 1986, pp 1271-1281
2. Bowers LD, Wong, ET: Kinetic serum creatinine assay. II. A initial evaluation an review. Clin. Chem 26:255, 1980
3. Jaffé, M: Über den Niederschlag, welchen Picrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 10:391, 1886
4. DiGiorgio J: Nonprotein Nitrogenous Constituents. IN Clinical Chemistry -Principles and Technics, 2nd ed. RJ Henry, DC Cannon, JW Winkelman, Editors, Harper & Row, Hagerstown (MD), 1974, pp 541-553
5. Slot C: Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffé reaction method. Scand J Clin Lab Invest 17:381, 1965
6. Heinegard D, Tiderstrom G: Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. Clin Chim Acta 43:305, 1973
7. Cook JGH: Factors influencing the assay of creatinine. Ann Clin Biochem, 12:219, 1975.
8. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed. DS Young, Editor, AACC Press, Washington (DC), 1990
9. Doolan PD, Alpen EL, Theil GB: A clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine. Am J Med 32:65,1962
10. Tobias GJ, McLaughlin RF, Hopper J: Endogenous creatinine clearance. N Engl J Med 266:317, 1962
11. Hepler OE: Manual of Laboratory Clinical Methods, 4th ed. Thomas, Springfield (IL), 1977, pp 285-288
12. Miller Z, Miller BJ: Specific determination of serum creatinine. Proc Soc Exp Biol Med 78:471, 1951.

ANEXO B

INSTITUTO DE NUTRICION
DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)
LABORATORIO ESPECIALIZADO
DE QUIMICA Y BIOQUIMICA (LEQB)

REVISIÓN NO.: ____
FECHA: _____

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE CREATININA EN ORINA METODO CINETICO EN MICROPLACA

Técnica desarrollada por: Dora Ines Mazariegos, B.S Fecha: Agosto 1994
Ultima Revisión efectuada por:
Aprobada por: Omar Dary, Ph.D.

I. PRINCIPIO

La creatinina se forma por deshidratación no enzimática de la creatina en el músculo (6). La creatina se sintetiza principalmente en el riñón y se almacena en la masa muscular. La creatinina urinaria refleja la masa muscular del individuo: Se excretan alrededor de 56.6 mg de creatinina por kg de masa muscular (3).

El ensayo se basa en el método de Jaffé, en el que la creatinina reacciona con una solución alcalina de picrato de sodio para formar un complejo rojo-naranja, llamado de Janovsky. La absorbancia del complejo se monitorea en los métodos espectrofotométricos usuales a 510-520 nm, aunque el máximo de absorción está alrededor de 485 nm. La concentración de complejo coloreado en un cierto período de tiempo es proporcional a la concentración de creatinina. La reacción entre creatinina y ácido pícrico es rápida, de modo que reacciones secundarias más lentas no interfieren (1). El método cinético sigue el cambio de absorbancia con el tiempo, a medida que la reacción avanza y aumenta en la solución el color rojo, que se registra a 490 nm con el lector de microplacas con opción cinética.

II. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

1. La temperatura de reacción afecta la velocidad de reacción. Para mantener condiciones de trabajo reproducibles en cada corrida, es importante mantener la temperatura constante. Se debe dejar que todos los reactivos almacenados en refrigeración (picrato alcalino) y las muestras lleguen a temperatura ambiente antes de iniciar el procedimiento. Sin embargo, como la curva y las muestras se corren simultáneamente, no importan las diferencias de ± 1 °C.
2. El reactivo de picrato de sodio (picrato alcalino) debe prepararse cada vez que se haga una nueva corrida, pero hay que dejarlo reposar por lo menos 15 minutos antes de usarlo. Esto garantiza curvas de calibración reproducibles de día a día.

III. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Colecte la muestra de orina en frascos limpios. Transporte en hieleras. Acidifique con 0.040 mL de HCl-2.0 M por cada mililitro de orina. Almacene las muestras en refrigeración o congele a -20°C, si el análisis no se hace en la semana siguiente a la recolección.

IV. CONTROL DE CALIDAD

El control para el ensayo es una muestra de orina cualquiera, que haya sido preservada con ácido clorhídrico. El control puede guardarse en refrigeración, dividido en tubos de ensayo con alícuotas de 2 mL de orina. Los valores de creatinina son estables por más de un mes, pero la decisión de cambiar de control es en base a 4 puntos que caigan consecutivamente abajo de una desviación estándar del valor esperado. El valor del control se calcula originalmente por análisis de 10 réplicas del mismo. Los valores diarios del control se registran en la hoja de control de calidad (anexo un ejemplo). Si el valor obtenido está fuera de la media $\pm 2D.S.$, se corre nuevamente el control diluido, sólo. Si éste cae en el intervalo de la media $\pm 2D.S.$, se aceptan los valores para las muestras. Si no, se vuelven a analizar todas las muestras con nueva curva de calibración.

Si el coeficiente de variación entre los duplicados de la muestra es mayor que 7% se repite el análisis de la muestra previamente diluida. Si la variación es todavía mayor a 7%, se repite la dilución y la corrida de la muestra.

V. EQUIPO

Lector de microplacas Molecular Devices (Opción cinética, Filtro 490)
Pipetas manuales (10-100 μL , 200-500 μL)
Pipeta multicanales (10-100 μL)
Vortex

VI. MATERIALES

Balones volumétricos 100 mL (3)
Beakers de 50 mL (3)
Beakers de 250 mL (2)
Fascos de plástico de 250 mL (4)
Fascos de vidrio oscuro
Microplacas
Puntas de pipeta

VII. REACTIVOS

Acido clorhídrico-HCl, 37%, 1.19 g/mL, Merck Art. 317, PM 36.46
Acido púrico pa, $\text{C}_6\text{O}_4\text{N}_3\text{H}_3$, 99%, Merck Art. 623, PM 229.11
Cloruro de sodio pa, NaCl, 99%, Merck Art. , PM 58.44
Creatinina anhidra, >99.5%, Merck 5208, PM 113.12

CREATININA-INCAP

Fosfato de sodio, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 99%, Merck Art. 6345, PM 137.99

Hidróxido de sodio, NaOH , 99%, Merck Art. 6498, PM 40.01

- A. Acido clorhídrico-HCl 0.02 M
- B. Acido pícrico-0.2%
- C. Picrato alcalino (Solución B + Sol. D en proporción 1 + 1)
- D. Solución Buffer (NaOH-313 mM/Fosfato 12.5mM)
- E. Solución salina-NaCl 0.9%
- F. Solución patrón de creatinina - 25 mg/dL en HCl-0.02 M

SOLUCIONES PATRON

Prepare diariamente diluciones a partir de la solución madre de creatinina-25 mg/dL (F), agregando en tubos de ensayo lo siguiente:

[Creatinina] (mg/dL)	Vol. std 25 mg/dL (mL)	Vol. HCl 0.02 M (mL)
0	0.00	5.00
1	0.20	4.80
2	0.40	4.60
5	1.00	4.00
10	2.00	3.00
15	3.00	2.00
20	4.00	1.00
25	5.00	0.00

VIII. PROCEDIMIENTO

1. Diluya en duplicado la muestra de orina con NaCl -0.9%, agregando 0.5 mL de orina y 5 mL de solución salina en un tubo de ensayo con 5 mL. Agite en vortex.
2. Agregue 50 μL de estándar, control o muestra (orina diluida según el paso 1) a cada pozo en la microplaca. Los duplicados se colocan lado a lado en sentido horizontal (Ver un ejemplo de la placa en el anexo).

3. Encienda el lector de microplacas. Programe las siguientes condiciones para el análisis:

AUTOMIX:	ONCE	El equipo agita la placa 1 vez antes de hacer la lectura.
READ MODE	KINETIC, 490 nm	El equipo hace lecturas automáticas cada 5s
TIEMPO DE LECTURA	3 min	
OD LIMIT	0.2 unidades	Es el valor de absorbancia con que el que el aparato hace los cálculos de velocidad
DATA DISPLAY	ANALIZED, LINEAR	Es el tipo de análisis numérico para los datos

En el lector también se indica (opción TEMPLATE F1) la posición de la curva de calibración y de las muestras, con su factor de dilución (inicialmente 1) para que el programa realice los cálculos automáticamente, con la regresión que se le hay indicado en DATA DISPLAY.

4. Cuando ya colocó todas las muestras en la placa, agregue 100 µL de picrato alcalino a cada pozo. Esto se hace rápidamente con una pipeta multicanales.
5. Coloque la microplaca en el aparato y lea la microplaca inmediatamente después de la adición del picrato alcalino.

IX. CALCULOS

Con el programa Softmax 2.0, al ingresar la posición de las muestras y la curva de calibración, el aparato hace los cálculos directamente. Si es cálculo manual:

1. Calcule la recta de regresión concentración de creatinina (mg/dL) versus Velocidad de reacción.

$$Vel. reacción = a + b * (Conc, mg/dL)$$

2. Calcule la concentración de creatinina en base a la recta de regresión y multiplicando por el factor de dilución de la muestra (11). Reporte sin decimales la concentración estimada de creatinina en la orina.

$$[Creat.], mg/dL = \frac{(vel. reacc - a)}{b} \times FD$$

X. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los rangos normales son los siguientes:

Mujeres

7.3-21.4 mg/kg peso/24 horas ó 44 a 130 mg/dL en muestras casuales.

Hombres

8.7-24.6 mg/kg peso/24 horas ó 61 a 173 mg/dL en muestras casuales.

Si se quiere calcular la tasa de aclaramiento renal se convierte la concentración de creatinina (mg/mL) multiplicando por el volumen excretado por unidad de tiempo (mL/min) y se divide entre la concentración de creatinina en el plasma (mg/mL). El valor se reporta en mL/min.

Mujeres 95-160 mL/min

Hombres 98-156 mL/min

XI. REFERENCIAS

- (1) Boyers, L. 1980. **Kinetic Serum Creatinine Assays. I. The Role of Various Factors in Determining Specificity.** *Clin. Chem* 26(5): 551-554.
- (2) **Directions for Use Clinical Chemistry.** Diagnostica Merck, Frankfurt. pp 55-57.
- (3) Murray, R. 1987. **Creatinine.** En: Pesce, A. y L. Kaplan (Eds.) Methods in Clinical Chemistry. pp 10-17. Mosby Company, San Luis, Missouri.
- (4) Lee, K.J.; Suk Heo, G.; y Doh, H.J.. 1992. **Determination of Creatinine in serum by Capillary Zone Electrophoresis.** *Clin. Chem* 38 (11): 2322-2323.
- (5) Lustgarten, J.; y Wenk, R.. 1972. **Simple, Rapid, Kinetic Method for Serum Creatinine Measurement.** *Clin. Chem* 18(11): 1419-1422.
- (6) Perrone, R.; Madias, N.; y Levey, A.. 1992. **Serum Creatinine as an Index of Renal Function: New Insights into Old Concepts.** *Clin. Chem* 38 (10): 1933-1953.
- (7) Scott, P.. 1992. **High Performance Liquid-Chromatographic Measurement of Plasma Creatinine in Newborns.** *Clin. Chem* 38 (1):101-103.

XII. ANEXOS

1. Ejemplo numérico de una curva de calibración
2. Ejemplo de una gráfica de control de calidad
3. Hoja de caracterización del método

MOLECULAR DEVICES CORP.
Report of Standard Curve

DATA FILE: DATA0320

DESCRIPTION: CREATININA URINARIA

PROTOCOL:

MODE: kinetics

AUTOMIX: ONCE

WAVELENGTH: 490

RUN TIME: 3:00

CALIBRATION: ON

LAG TIME: 0:00

Wed Sep 21 1994

8:32 pm

OD LIMIT: 0.2

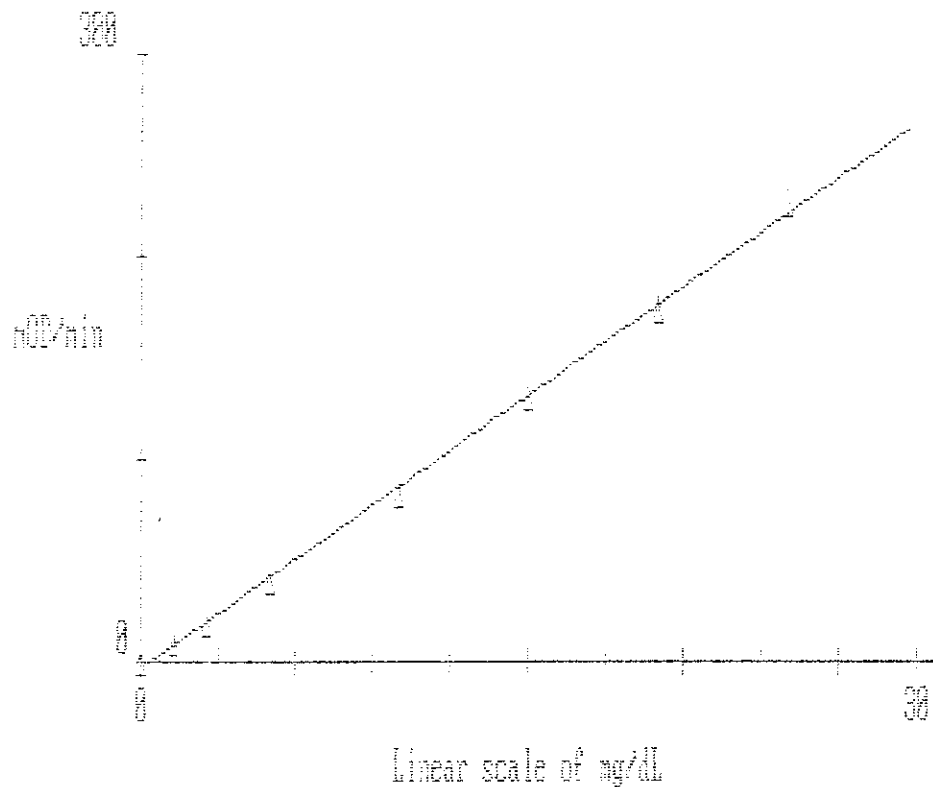
Vmax POINTS <= 37

CURVE FIT: Linear

Corr. Coeff: 0.999

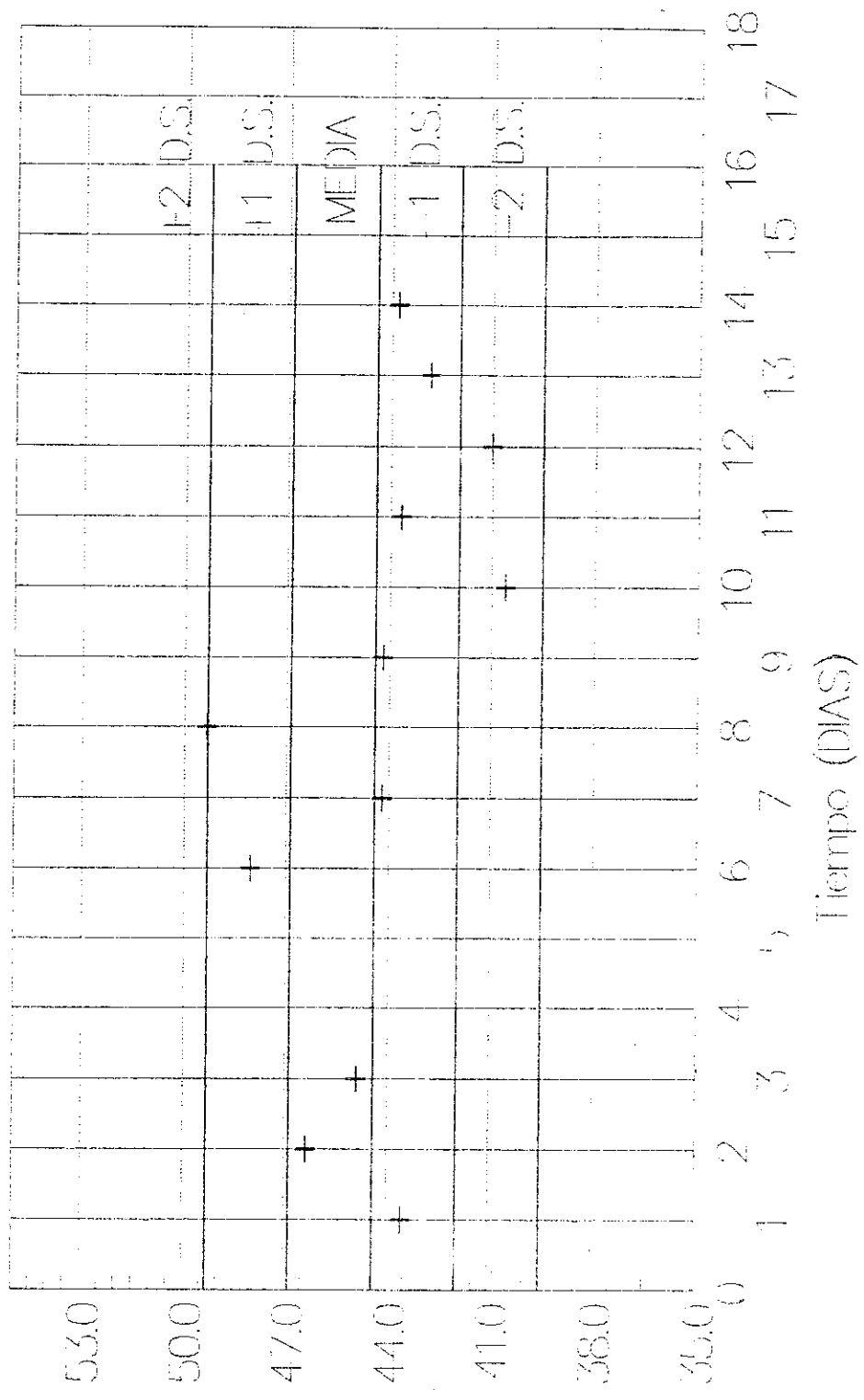
EQUATION : $y = A + B * x$

A = -2.64 B = 0.98



STANDARD	Std. Value	mg/dL	mOD/min	Mean	Std Dev	CV	Calc. Value
S01	0.000	mg/dL	0.077 0.159	0.118	0.058	49.41	0.305 0.315
S02	1.250	mg/dL	10.17 10.17	10.17	0.002	0.020	1.439 1.439
S03	2.500	mg/dL	20.02 19.90	19.96	0.082	0.413	2.546 2.532
S04	5.000	mg/dL	39.75 40.03	39.89	0.193	0.484	4.763 4.793
S05	10.00	mg/dL	82.69 82.63	82.66	0.038	0.046	9.587 9.581
S06	15.00	mg/dL	130.2 130.1	130.1	0.089	0.069	14.92 14.91
S07	20.00	mg/dL	167.4 177.7	172.6	7.287	4.223	19.10 20.26
S08	25.00	mg/dL	223.1 225.6	224.3	1.774	0.791	25.36 25.64

Gráfica de Control de Calidad Creatinina en orina, Micrometodo



[Creat] (mg/dl)

ANEXO C

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)
DIVISION DE NUTRICION Y SALUD
Sección de Bioquímica Nutricional.

DETERMINACION DE YODO EN ORINA

(Con digestión)

I. RECOLECCION, TRANSPORTE Y PRESERVACION DE LA MUESTRA:

Colecte aproximadamente 50 mL de orina en frascos de plástico. Traslade 15 mL de orina dentro de tubos de 20 mL conteniendo 0.6 mL HCl-2.0 M (b) (son 0.040 mL HCl-2.0 M por cada mililitro de orina). Cierre los tubos con tapones de hule. Estos tubos tienen que haber sido lavados por el proceso normal de limpieza para materiales de laboratorio. Transporte en hieleras. Almacene las muestras en refrigeración.

II. EQUIPO:

Baño de agua (37°C) Espectrofotómetro (405 nm)
Bloques calentadores Campana con extractor

III. MATERIALES Y REACTIVOS:

Balones aforados de 25, 100, 200, 500 mL Cronómetro
Cubetas para espectrofotómetro
Embudos
Frascos oscuros de plástico (colección de muestra)
Papel filtro Whatman No. 1 o equivalente
Pipetas
Termómetro
Celdas para espectrofotómetro
Tubos de vidrio de 20 mL

Acido clorhídrico (HCl; Merck 13386 o equiv.; P.M. 36.5, 37% m/v, $d=1.19$)
Acido perclórico (HClO₄ al 70%; Merck 519; 1.67 g/mL; P.M. 100.46).
Acido sulfúrico (H₂SO₄; Merck 714 o equiv.; P.M. 98.08, 96% m/v, $d=1.84$)
Clorato de potasio (KClO₃; Merck 4944; P.M. 122.55)
Cloruro de sodio (NaCl; Sigma S 9888 o equiv.; P.M. 58.44)
Hidróxido de sodio (NaOH; Sigma S 5881 o equiv.; P.M. 40.00)
Sulfato cérico amónico (Ce(SO₄)₂·2(NH₄)₂SO₄·2H₂O; Merck 2273; P.M. 632.55).
Trióxido de arsénico (As₂O₃; Merck 119; P.M. 197.84)
Yodato de potasio (KIO₃; Merck 5051 o equiv.; P.M. 214.00, 1% = 59.3)

IV. SOLUCIONES DE REACTIVOS:

PRIMARIOS:

(a) HCl-5.0 M (500 mL)

A aproximadamente

250.00 mL agua destilada, agregue

207.25 mL HCl concentrado.

Enfríe. Lleve a

500.00 mL con agua destilada.

(b) HCl-2.0 M (500 mL)

A aproximadamente

250.00 mL agua destilada, agregue

200.00 mL HCl-5.0 M (a). Enfríe. Lleve a

500.00 mL con agua destilada.

(c) HCl-0.1 M (1 L)

A aproximadamente

800.00 mL agua destilada, agregue

20.00 mL HCl-5.0 M (a). Lleve a

1.00 L con agua destilada.

(d) H₂SO₄-1.75 M (1 L)

A aproximadamente

900.00 mL agua destilada, agregue

97.17 mL H₂SO₄ concentrado. Enfríe

Lleve a

1.0 L con agua destilada.

(e) 1 mg/mL I de KIO₃ (100 mL)

0.1686 g KIO₃. Lleve a

100.0 mL con agua destilada.

(f) Acido Clórico (≈ 850 mL)

Dentro de un Erlenmeyer de 2 L ponga

910.0 mL agua destilada. Disuelva poco a poco

500.0 g Clorato de potasio (KClO₃). Caliente y agite hasta que se disuelva la mayor parte de la sal. Agregue

375.0 mL Acido perclórico (HClO_3 70%) a razón de 15 mL/min con agitación constante. Guarde en el congelador por una noche.
Al día siguiente, filtre en papel Whatman # 1 o equivalente.
El volumen final del filtrado es de aproximadamente 850 mL.
GUARDE REFRIGERADO.

(g) Acido Arsenioso (HAsO_2) (1 L)

En un vaso de precipitar de 1 L, ponga
9.8 g Trióxido de Arsénico +
7.0 g NaOH. Disuelva en
500.0 mL agua destilada. Agregue cuidadosamente
32.0 mL H_2SO_4 concentrado. Enfríe. Disuelva
25.0 g NaCl. Ponga en balón aforado de 1 L.
Lleve a
1.0 L con agua destilada.
GUARDE EN FRASCO OSCURO.

(h) Sulfato Cérico Amónico (200 mL)

4.8 g Sulfato cérico amónico. Lleve a
200.0 mL H_2SO_4 -1.75 M (d)¹
GUARDE EN FRASCO OSCURO.

CURVA DE CALIBRACION:

PREPARE LAS SIGUIENTES SOLUCIONES DIARIAMENTE:

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ I de KIO_3 (100 mL)

1.0 mL 1 mg/mL I de KIO_3 (e). Lleve a
100.0 mL HCl-0.1 M (c).

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ I de KIO_3 (25 mL)

2.5 mL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ I de KIO_3 . Lleve a
25.0 mL HCl-0.1 M (c).

¹ Si el espectrofotómetro que está usando es lineal sólo hasta 1.0 de absorbancia, diluya una parte de la solución de sulfato cérico amónico (B) con una parte de H_2SO_4 -1.75 M (d).

PATRONES DE YODO

[I] μg/dL	[I] μg/mL	mL KIO ₃ 1μg/mL	V. final con HCl 0.1M (mL)
Blanco = HCl 0.1 M			
2.0	0.02	0.5	25
4.0	0.04	1.0	25
8.0	0.08	2.0	25
12.0	0.12	3.0	25
16.0	0.16	4.0	25
20.0	0.20	5.0	25

V. PROCEDIMIENTO:

1. Mezcle las orinas en un agitador vórtex, luego filtre las muestras de orina usando papel filtro Whatman No.1 o equivalente.
2. En tubos de 10 mL ponga por duplicado 0.25 mL HCl-0.1 M (blanco), o 0.25 mL de cada patrón de yodo, o 0.25 mL de cada muestra de orina.
3. Agregue 0.75 mL de ácido clórico. Caliente por una hora a 110-115°, en un bloque calentador y dentro de una campana con extractor. Tape los tubos con cincos (canicas) durante el período de calentamiento. Enfríe los tubos a temperatura ambiente.

Durante esta etapa pueden procesarse de 50 a 120 muestras.

4. En grupos de 20 a 40 tubos y a intervalos medidos de tiempo (se sugieren 20 s) agregue a cada tubo 2.0 mL ácido arsenioso (g).
5. A los mismos intervalos de tiempo de la etapa anterior, añada 0.35 mL sulfato cérico amónico (h).
6. Exactamente 10 min después de la adición del sulfato cérico al primer tubo lea en espectrofotómetro su absorbancia a 405 nm. Lea los demás tubos a los mismos intervalos de tiempo en que agregó el reactivo. El tiempo entre la adición del sulfato cérico y la lectura debe ser de 10 minutos exactos para cada tubo.

VI. CALCULOS:

1. Determine la absorbancia corregida (Abs.corregida) de las soluciones patrones y de las muestras, restando la absorbancia de los patrones y las muestras de la absorbancia promedio de los blancos de la (Abs.blanco - Abs.patrones o muestras).

2. Con los resultados de los patrones de yodo, haga una gráfica entre Absorbancia corregida (y) versus [I]($\mu\text{g/dL}$) (x). Revise el rango lineal del método; la concentración mayor de [I] de ese rango puede ser menor que 20 $\mu\text{g/dL}$. Calcule la línea de regresión con los valores incluidos dentro del rango lineal.
3. Estime [I] ($\mu\text{g/dL}$) en las muestras de orina utilizando la ecuación de la recta:

$$[I](\mu\text{g/dL}) = (\text{Absorbancia corregida}_{\text{muestra}} - \text{Intercepto}) / \text{Pendiente}$$
4. Cuando el resultado de la muestra sea mayor que el punto máximo del rango lineal, diluya ésta 1/2 con HCl-0.1 M y repita su análisis. Recuerde correr otra curva de calibración. El resultado final de la segunda dilución multiplíquelo por 2, que es el factor de dilución. Esta etapa debe repetirse si la dilución no fuera suficiente. Estime los valores utilizando el factor de dilución correspondiente.

VII. CRITERIO PARA REPETICION:

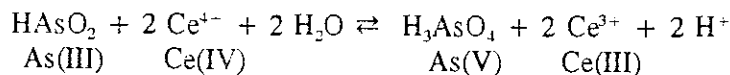
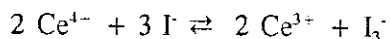
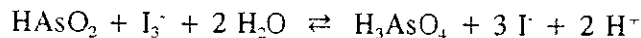
Además de repetir el análisis de las muestras que exhiban concentraciones de yodo superiores al punto máximo del rango lineal, también debe analizar nuevamente aquellas muestras cuyo coeficiente de variación (Desviación estándar/Promedio x 100) sea mayor que 10% -que es dos veces el coeficiente de variación del método (5 %)-.

VIII. INTERPRETACION:

Concentraciones de yodo menores a 5 $\mu\text{g/dL}$ sugiere deficiencia de este elemento.

IX. REFERENCIAS:

El procedimiento descrito es una modificación del método sugerido por Dunn y Crutchfield. El método consiste en medir la concentración de yodo (I_2 o I_3^-) a través de su papel catalítico en la reducción del ión Ce(IV) a Ce(III) en la reacción acoplada de oxidación de arsenito (AsO_2^-) a arseniato (AsO_4^{3-}).



Dunn, J.T. y Crutchfield, H.E. (1991). Draft from manual of urinary iodine methods.

Octubre 15, 1991. RL/rl

ANEXO D

INSTITUTO DE NUTRICION
DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)
LABORATORIO ESPECIALIZADO
DE QUIMICA Y BIOQUIMICA (LEQB)

REVISIÓN NO.: 1
FECHA: Julio 1994

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE YODO EN ORINA METODO CINETICO EN MICROPLACA

Técnica desarrollada por: **Omar Dary y Dora Inés Mazariegos C.** Fecha: Abril 1993

Ultima Revisión efectuada por: **Dora Inés Mazariegos, B.S.**

Aprobada por: **Omar Dary, Ph.D.**

I. PRINCIPIO

La reacción más ampliamente usada para cuantificar yodo en muestras biológicas es la reacción caracterizada por Sandell y Kolthoff (1937), que lleva su nombre. Se basa en que el yoduro (I⁻) actúa como catalizador de la reducción del ión cérico (Ce⁴⁺) a ión ceroso (Ce³⁺) acoplado a la oxidación del arsenito As³⁺, a As⁵⁺. La reacción neta es:



El Ce⁴⁺ es amarillo, mientras que el Ce³⁺ es incoloro. Esto permite, manteniendo las demás condiciones constantes, cuantificar el yodo mediante la desaparición del color amarillo. La reacción catalítica tiene efecto amplificador, y es sensible a muy pequeños cambios en la concentración del catalizador. El método original es espectrofotométrico de punto final (se registra la absorbancia o transmitancia de la muestra a un intervalo de tiempo fijo después de la adición de los reactivos). Este método es el más usado para cuantificar yodo en orina (Dunn *et al.*, 1993; y Garry *et al.*, 1973). En el laboratorio de INCAP se desarrolló una adaptación cinética de esos métodos, en el cual la velocidad de reacción es seguida por 2 minutos. La reacción se lleva a cabo en microplacas.

II. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

1. La cuantificación de yodo se hace a nivel de nanogramos, por lo que el análisis es sumamente sensible a contaminación. De ser posible no se deben preparar las soluciones patrón de yodo en el mismo laboratorio en que se realiza la reacción final. Los reactivos deben ser de alta pureza, debe usarse agua desionizada en la preparación de todas las soluciones y el enjuague final del material debe ser también con agua desionizada.

2. Después de la digestión el volumen de cada tubo puede variar. En el macrométodo esta variación no es significativa porque se usa todo el volumen del tubo. Sin embargo en el micrométodo es necesario ajustar el volumen al volumen inicial (2.0 mL) de cada tubo con agua destilada. Esto se puede hacer marcando en el tubo el menisco de la solución antes de la digestión, y reemplazando después el volumen perdido por evaporación con agua desionizada.

III. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Colecte la muestra de orina en frascos limpios. Acidifique con 0.040 mL de HCl-2.0 M por cada mililitro de orina. Transporte en hieleras. Almacene las muestras en refrigeración o congele a -20°C, si el análisis no se hace en la semana siguiente de la recolección.

IV. CONTROL DE CALIDAD

Los controles para el ensayo son muestras de orina, preservadas con ácido clorhídrico, cuya concentración haya sido determinada previamente. Pueden guardarse en refrigeración, en tubos de ensayo, en alícuotas de 2 mL de orina. Los controles deben tener un valor bajo (2-4 $\mu\text{g/dL}$), medio (4-10 $\mu\text{g/dL}$) y alto (> 10 $\mu\text{g/dL}$). Los valores diarios del control se registran en la hoja de control de calidad. Si dos de los controles están fuera de la media $\pm 2\text{D.S.}$, se corren nuevamente los tres digeridos de los controles. Si estos nuevamente están fuera, se vuelven a analizar todas las muestras y controles, con una nueva curva de calibración.

Si el coeficiente de variación entre los duplicados de la muestra es mayor que 10% se repite el análisis del digerido de la muestra. Si la variación es todavía mayor a 10%, se analiza la muestra desde la digestión.

V. EQUIPO

Bloques calentadores
Campana con extractor
Lector de microplacas Molecular Devices (Opción cinética, Filtro 405)
Pipetas manuales (10-100 μL , 200-500 μL)
Pipeta multicanales (10-100 μL)
Vortex

VI. MATERIALES

Balón volumétrico de 1000 mL
Balones volumétricos 200 mL
Balones volumétricos 100 mL
Beakers de 50 mL (3)
Beakers de 250 mL (2)
Frascos de plástico de 250 mL (4)
Frascos de vidrio oscuro

Microplacas
Puntas de pipeta
Tubos de ensayo de 10 mL

VII. REACTIVOS

Acido perclórico (HClO_4), 70%, 1.67 g/mL, Merck Art. 519, PM 100.46
Acido sulfúrico (H_2SO_4), 96-97%, 1.84 g/mL, Merck Art. 714 PM 98.08
Clorato de potasio (KClO_3), 99.0%, Merck Art. 4944, PM 122.55
Cloruro de sodio (NaCl), 99.5%, Merck Art. 6404, PM 58.44
Hidróxido de sodio (NaOH), 99%, Merck Art. PM 40.01
Sulfato cérico de amonio ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); Merck 2273; PM 632.55
Trióxido de arsénico (As_2O_3), 99.5%, Merck Art. 119; PM 197.84
Yodato de potasio p.a. (KIO_3), 99.5%, Merck Art. 5051, PM 214.01,
Agua desionizada

- A. Acido clórico (500 g KClO_3 + 900 mL H_2O + 375 mL HClO_4)
- B. Acido arsenioso (0.98% en H_2SO_4 1.75 M)
- C. Sulfato cérico amónico (0.6% en H_2SO_4 1.75 M)
- D. Solución stock de yodo (10 mg I/mL)
- E. Solución intermedia de yodo (1 mg I/dL)
- F. Solución final de yodo (40 $\mu\text{g}/\text{dL}$)

SOLUCIONES PATRON

Prepare diariamente a partir de la solución final de yodo (Sol. F)

[Yodo] ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Vol. Sol. F (mL)	Vol. H_2O (mL)
0.0	0.00	5.00
2.0	0.25	4.75
4.0	0.50	4.50
8.0	1.00	4.00
12.0	1.50	3.50
16.0	2.00	3.00
20.0	2.50	2.50
24.0	3.00	2.00

VIII. PROCEDIMIENTO

1. Mezcle las orinas en un vórtex. Luego filtre las muestras de orina usando papel filtro Whatman No. 1 ó equivalente.
2. En tubos de 10 mL ponga 1.5 mL (1500 μ L) de cada estándar, de los controles, y de cada muestra. Haga esto en duplicado.
3. Agregue 0.50 mL (500 μ L) de ácido clórico (Solución A). Tape los tubos con cincos (canicas). Coloque los tubos en los bloques de calentamiento dentro de una campana de extracción y digiera por una hora a una temperatura entre 110 y 115 °C. Enfríe los tubos a **temperatura ambiente**.
4. Ajuste el volumen de todos los tubos a 2.0 mL con agua destilada.
5. Agregue 50 μ L de cada estándar, del control, y de las muestras a cada pozo en la microplaca. Los duplicados se colocan lado a lado en sentido horizontal.
6. Encienda el lector de microplacas. Programe las siguientes condiciones para el análisis:

AUTOMIX	ONCE	El equipo agita la placa 1 vez antes de hacer la lectura.
READ MODE	KINETIC, 405 nm	El equipo hace lecturas automáticas cada 5s
TIEMPO DE LECTURA	2 min	
OD LIMIT	-0.2 unidades	Es el valor de absorbancia con que el que el aparato hace los cálculos de velocidad, el signo negativo indica que es cinética negativa
DATA DISPLAY	ANALIZED, LINEAR	Es el tipo de análisis numérico para los datos

En el lector también se indica (opción TEMPLATE F1) la posición de la curva de calibración y de las muestras, con su factor de dilución (inicialmente 1) para que el programa realiza los cálculos automáticamente, con la regresión que se le haya indicado en DATA DISPLAY.

7. Cuando ya haya colocado todas las muestras en la placa, agregue 50 μ L de ácido arsenioso (Solución B) a cada pozo. Esto se hace rápidamente con una pipeta multicanales. Deje reposar la placa por lo menos 25 minutos. El tiempo que permanecen en contacto el yodo de la muestra y el ácido arsenioso permite la reducción de todas las formas de yodo (principalmente yodato formado por la oxidación con ácido clórico) a yoduro. No es conveniente dejar por mucho más tiempo, porque la acidez de los reactivos puede dañar la transparencia de la placa.
8. Con el equipo listo para leer la placa añada, con ayuda de la pipeta multicanales, 100 μ L de sulfato cérico amónico (Solución C) a cada pozo de la microplaca.
9. Inmediatamente coloque la microplaca en el lector y comience la lectura (Presionando F5). Los resultados se obtienen en mOD/min.

IX. CALCULOS

Con el programa Softmax 2.0, al ingresar la posición de las muestras y la curva de calibración, el aparato hace los cálculos directamente. Si es cálculo manual:

1. Calcule la recta de regresión concentración de yodo ($\mu\text{g/dL}$) versus Velocidad de reacción.

$$vel. reacción = a + b * (Conc, \mu\text{g/dL})$$

2. Calcule la concentración de yodo en base a la recta de regresión y multiplicando por el factor de dilución de la muestra (1, usualmente).

$$Yodo (\mu\text{g/dL}) = \frac{(vel. reacc - a)}{b} \times FD$$

X. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los valores de yodo urinario deben interpretarse como indicadores epidemiológicos. El yodo urinario refleja la ingesta reciente de yodo de la población cuando se analizan muestras casuales, y del individuo, cuando se analiza el yodo excretado en un periodo de 24 horas. El comité conjunto WHO/UNICEF/ICCID (1993) ha propuesto los siguientes valores de referencia para identificar la existencia de problema de salud pública.

Criterios Epidemiológicos Propuestos como Indicadores de la Severidad de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo

Estadio	Manifestaciones Clínicas ¹			Mediana Yodo urinario ($\mu\text{g/dL}$)	Necesidad de Corrección
	Bocio%	Hipotiroidismo	Cretinismo		
Leve	5-19.9	0	0	5.0-9.9	Importante
Moderado	20-29.9	+	0	2.0-4.9	Urgente
Severo	> 30	+++	++	< 2.0	Crítica

¹ 0 = Ausente; +, ++, +++ = presente, en orden ascendente

XI. REFERENCIAS

- Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D.. 1993. **Methods for Measuring Iodine in Urine**. Publicación del Consejo Internacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD)/UNICEF/WHO. 71 p.
- Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D.. 1993. **Two Simple Methods for Measuring Iodine in Urine**. *Thyroid* 3(2): 119-123.
- Garry, P.; Lashley, W.; y Owen, G. 1973. **Automated Method of Urinary Iodine**. *Clin. Chem.* 19(9): 950-953.
- WHO/UNICEF/ICCIDD. 1993. **Indicators for Assessing Iodine Deficiency Disorders and their Control Programmes**. Documento WHO/NUT/93.1. 33 p.

XII. ANEXOS

1. Ejemplo numérico de una curva de calibración
2. Ejemplo de una gráfica de control de calidad

MOLECULAR DEVICES CORP.
Report of Standard Curve

DATA FILE: DATA0728

DESCRIPTION: Yodo urinario validacion

Mon Sep 26 1994

PROTOCOL:

8:47 am

MODE: Neg. kinetics

AUTOMIX: ONCE

WAVELENGTH: 405

RUN TIME: 2:00

OD LIMIT: -0.2

CALIBRATION: ON

LAG TIME: 0:00

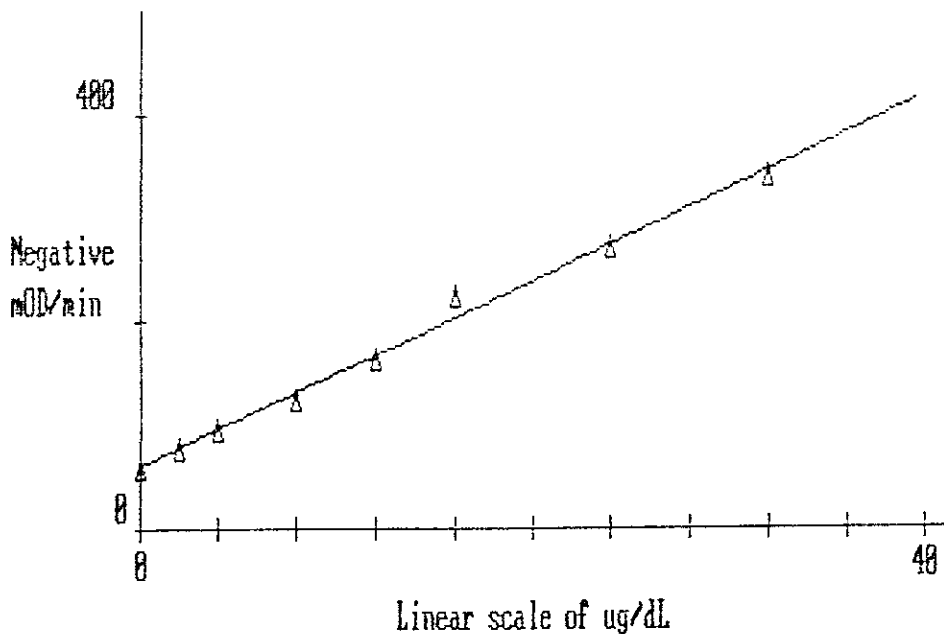
Vmax POINTS <= 25

CURVE FIT: Linear

Corr. Coeff: 0.996

EQUATION : $y = A + B * x$

A = 61.1 B = 8.91



STANDARD	Std. Value		mOD/min	Mean	Std Dev	CV	Calc. Value
S01	0.000	ug/dL	59.28 58.14	58.71	0.803	1.367	-0.201 -0.328
S05	2.000	ug/dL	79.84 77.19	78.51	1.873	2.386	2.106 1.809
S06	4.000	ug/dL	94.30 99.13	96.72	3.415	3.530	3.730 4.272
S07	8.000	ug/dL	121.3 129.9	125.6	6.030	4.802	6.762 7.720
S08	12.00	ug/dL	169.0 159.9	164.4	6.480	3.940	12.12 11.09
S09	16.00	ug/dL	224.7 224.3	224.5	0.309	0.137	18.37 18.32
S10	24.00	ug/dL	253.1 293.2	273.1	28.36	10.38	21.55 26.05
S11	32.00	ug/dL	352.3 328.0	340.1	17.17	5.049	32.68 29.96

ANEXO E

INSTITUTO DE NUTRICION
DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)
LABORATORIO ESPECIALIZADO
DE QUIMICA Y BIOQUIMICA (LEQB)

REVISIÓN No.: 1
FECHA: Junio 1993

DETERMINACION DE YODATO EN SAL POR TITULACION CON TIOSULFATO DE SODIO

Técnica implementada por: Dora Inés Mazariegos C., B.S.

Fecha: Febrero 1993

Ultima revisión efectuada por: Dora Inés Mazariegos C., B.S.

Aprobada por: Omar Dary, Ph.D.

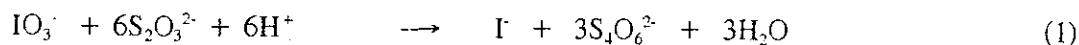
O. MANEJO DE LA MUESTRA

Debe colectarse alrededor de media libra de sal para el análisis. Guárdese en frasco de vidrio y en un lugar fresco para evitar que se humedezca demasiado.

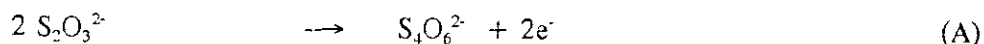
I. PRINCIPIO

El yodato (como yodato de potasio, KIO_3) agregado a la sal para consumo humano en Guatemala es cuantificado por titulación redox con tiosulfato de sodio. El yodato es un oxidante fuerte y reacciona cuantitativamente con el tiosulfato. La reacción se lleva a cabo en medio ligeramente ácido y en presencia de un exceso de iones I^- .

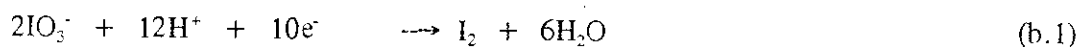
La ecuación global es la siguiente:



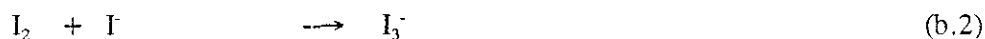
La semi ecuación para el tiosulfato de sodio es:



El yodato, en medio ácido y con exceso de yoduro forma compuestos intermediarios de I_2 y triyoduro (I_3^-):



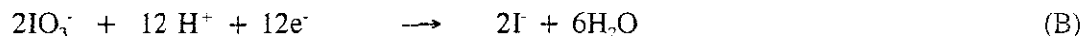
Con un exceso de yoduro (I⁻) el yodo formado forma el complejo I₃⁻:



Bajo condiciones reductoras el complejo triyoduro forma nuevamente yoduro según la ecuación b.3:



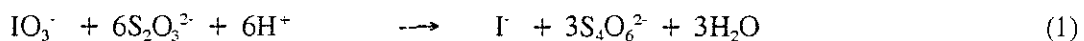
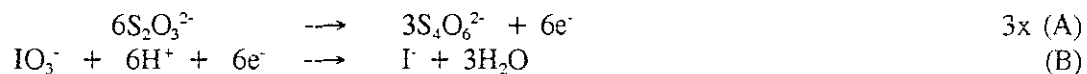
Sumando las ecuaciones b.1 b.2 y b.3 tenemos:



Simplificada queda:



Finalmente, al sumar las ecuaciones A y B obtenemos la ecuación (1) que representa la estequiometría de la reacción global : 1 mol de yodato reacciona con 6 de tiosulfato:



El punto final de la titulación es indicado por la desaparición brusca del color azul característico del complejo I₃⁻-almidón. Se titula sin indicador hasta que el color amarillento inicial de la solución esté por desaparecer. Al agregar el almidón se forma el color azul y entonces se agregan cuidadosamente las últimas gotas del titulante.

II. EQUIPO

Agitador magnético

III. MATERIALES

Balones volumétricos de 1000 mL (1), 500 mL (2), 250 mL (1)
 Beakers de 600 mL (2), 400 mL (2 por muestra), 100 mL (1), 50 mL (1)
 Bureta de 25 mL con divisiones de 0.1 mL
 Embudo de filtración (1)
 Frascos oscuros (100, 250 y 500 mL) para almacenaje de soluciones
 Gotero con tapón de rosca (1)
 Pipetas serológicas de 5 (1) y 10 mL (1)
 Probetas de 500 mL (3)
 Probetas de 250 mL (2)
 Magnetos
 Papel filtro
 Pinza para bureta
 Soporte de metal

IV. REACTIVOS

Acido sulfúrico g.r. (H_2SO_4), 95-97%, 1.84 g/mL, PM 98.08, Merck Art. 7310
Almidón soluble p.a., ($C_6H_{10}O_5$)_n, Merck Art. 1252
Tiosulfato de sodio p.a. ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), 99.5%, PM 248.18, Merck Art 6516.
Yodato de potasio p.a. (KIO_3), > 99.9%, PM 214.00, Merck Art.
Yoduro de potasio (KI) libre de yodato, PM 166.01, Merck Art. 5043
Agua destilada

V. SOLUCIONES

A. Acido Sulfúrico-2M

Precaución, El ácido es corrosivo, deshidratante e irritante para todos los tejidos. Su inhalación puede provocar daño hepático y el contacto con la piel, necrosis. El reactivo concentrado y sus soluciones deben manipularse bajo campana.

Composición

H_2SO_4 2 mol/L

Preparación

En un beaker graduado de 600 mL agregue:

300 mL de agua destilada y
110 mL de ácido concentrado. Enfríe a temperatura ambiente, llegue a la marca de 500 con agua destilada.

Almacenamiento

Guarde en frasco de vidrio bien tapado, alejado de bases.

Expiración

La solución es estable indefinidamente.

B. Yoduro de potasio-10%

Composición

KI..... 100 g/L

Preparación

En un beaker de 600 mL agregue:

50.0 g KI libre de IO_3^- y
500 mL de agua destilada medidos con probeta. Disuelva.

Almacenamiento

Guarde en frasco bien cerrado.

Expiración

Descarte en cuanto la solución se vuelva amarillenta.

C. Solución indicadora de almidón-1%

Composición

Almidón soluble..... 10 g/L

Preparación

En un beaker de 50 mL agregue:

0.5 g almidón y
5 mL de agua caliente. Agregue con movimiento constante esta solución a:
50 mL de agua. Hierva por unos pocos minutos, enfríe, y filtre.

Almacenamiento

Guarde en gotero.

Expiración

La solución debe ser fresca, así que descarte al terminar las titulaciones.

D. Soluciones estándar de yodato de potasio

D.1 Yodato de potasio (KIO₃)-0.1 N (0.01667 M)

Composición

KIO₃..... 0.1 eq /L

Preparación

Seque el reactivo (pureza mayor a 99.9%) en horno a 120°C por 2 horas y enfríe en desecadora. En un beaker de 100 mL pese:

3.5667 g del reactivo y disuelva con unos 60 mL de agua.
Transfiera cuantitativamente a un balón de 1 L y afore con agua destilada.

Almacenamiento

Guarde en frascos oscuros de 250 mL, bien cerrados.

Expiración

Si se usa un frasco a la vez y no se pipetea directamente del frasco, la solución es estable indefinidamente.

D.2 Yodato de potasio (KIO₃)-0.02 N (3.33mM)

Composición

KIO₃..... 0.02 eq./L

Preparación

En un balón de 250 mL agregue:

100 mL de agua destilada y
50.00 mL de la solución D.1, medidos con pipeta. Afore a:
250 mL con agua destilada.

Almacenamiento

Guarde en frasco oscuro bien cerrado.

Expiración

No guarde esta solución por más de dos meses.

E. Soluciones patrón de Tiosulfato de sodio

E.1 Solución de Tiosulfato de sodio-0.2N

Composición

Na₂S₂O₃..... 0.2 mol/L

Preparación

En un balón de 500 mL agregue:

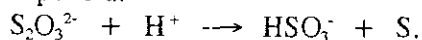
24.943 g Na₂S₂O₃·5H₂O y
3-4 gotas de cloroformo. Afore a:
500 mL con agua destilada.

Almacenamiento

Guarde en frasco oscuro bien cerrado, a temperatura ambiente.

Expiración

La solución es inestable ya que hay descomposición bacteriana y en presencia de CO₂ se descompone a:



Además la solución es sensible a la luz. La reacción bacteriana se inhibe agregando el cloroformo. Descarte después de 1 mes.

E.2 Solución de Tiosulfato de sodio-0.02N

Composición

Na₂S₂O₃..... 0.02 mol/L

Preparación

En un balón de 500 mL agregue:

200 mL de agua destilada y
50.0 mL de la solución E.1 (medidos con pipeta volumétrica). Afore a:
500 mL con agua destilada.

Almacenamiento

Guarde en varios frascos oscuros bien cerrado, a temperatura ambiente.

Expiración

La solución es inestable. No guarde la solución por más de 2 meses y valórela cada vez que se haga nuevo lote de muestras.

VI. SOLUCIONES PATRON

Ninguna.

VII. PROCEDIMIENTO

A. Estandarización de la solución de Tiosulfato de sodio (E.2)

Todo este procedimiento se hace en triplicado, **cada vez que se corre nuevo lote de muestras.**

1. Transfiera 20.0 mL de la solución de KIO₃-0.02N (D.2) a un erlenmeyer de 250 mL y agregue unos 150 mL de agua, 2 mL de H₂SO₄-2M (A) y 5 mL de yoduro de potasio-10% (B). Agregue un magneto.
3. Coloque sobre el agitador magnético y titule con la solución de tiosulfato de sodio (E.2) usando almidón como indicador, según se indica en el procedimiento para las muestras. Se requieren alrededor de 20 mL de tiosulfato para llegar al punto final.

B. Titulación de las muestras

Cada muestra se hace en duplicado.

1. Pese 50 g de la sal y disuélvalos con 200 mL de agua destilada en un beaker de 600 mL. Agregue 1 mL de H₂SO₄-2M (A) y un magneto.
2. Agregue 5 mL de KI-10% (B), ponga la solución en agitación moderada, e inicie el goteo de la bureta conteniendo la solución de tiosulfato (E.2). Continúe hasta que la solución tenga un color amarillo pálido.

3. Agregue 1 mL de la solución indicadora de almidón (C). Continúe con un goteo lento. El punto final es indicado por la desaparición brusca del color azul del complejo I₃-almidón. Anote el volumen final requerido para llegar al punto final. Se requieren entre 3 y 12 mL de titulante para llegar al punto final.

VIII.CALCULOS

1. La normalidad de la solución de tiosulfato de sodio (D.2) es:

$$N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (eq/L)}$$

$$= \frac{\text{Vol. (mL) de solución de KIO}_3 \times 10^{-3} \times 0.02 \text{ eq KIO}_3 \times 1 \text{ eq Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{\text{Vol. (mL) de sol de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 10^{-3} \text{ L sol. de KIO}_3 \quad 1 \text{ eq KIO}_3}$$

$$= 20 \times 0.02 / \text{Vol. (mL) de sol de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 10^{-3}$$

$$= 0.4 / \text{Vol. (mL) de sol de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 10^{-3}$$

Se llama $N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al valor obtenido.

2. El volumen de titulante requerido es entonces:

$$\text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mL)} = 0.4 / N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (eq/L) teórica}$$

$$= 0.4 / 0.02$$

$$= 20.00 \text{ mL.}$$

3. La concentración de las muestras, en μg de yodo (como yodo elemental I) por gramo de sal se calcula así:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/g})$$

$$= \frac{\text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mL)} \times 10^{-3} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (eq/L)} \times 1 \text{ eq KIO}_3}{\text{Peso analizado de sal (g)} \quad 1 \text{ eq Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$$

$$\times \frac{1 \text{ mol IO}_3^- \times 126.90 \text{ g I} \times 10^6 \mu\text{g}}{6 \text{ eq IO}_3^- \quad 1 \text{ mol IO}_3^- \quad 1 \text{ g}}$$

$$= \text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mL)} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (eq/L)} \times \frac{126.90 \times 1000}{50 \text{ g de sal} \times 6}$$

$$= \text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mL)} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (eq/L)} \times 423.00$$

4. El volumen de titulante requerido es entonces:

$$\text{Vol. Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mL)} = \text{Conc. teórica de I } (\mu\text{g/g}) / (N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 423)$$

Se requieren por lo tanto entre 3 y 12 mL de tiosulfato, para muestras dentro del rango permitido por la ley (30-100 $\mu\text{g/g}$).

Rechazo de datos

Si el coeficiente de variación entre las réplicas de la muestra excede el 3% se rechaza el resultado y se repite el análisis.

IX. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La legislación guatemalteca indica que la concentración de yodo en sal debe estar entre 30 y 100 $\mu\text{g/g}$ (= ppm)

X. NOTAS PRACTICAS

1. Las muestras que tengan más de 150 mg de yodo por kg de sal (150ppm) pueden necesitar la adición de más de 5 mL de KI-10%. Cuando se llega al punto final, pruebe agregar un poco más de la solución de yoduro (KI). No debe reaparecer el color azul en la solución que ya estaba incolora. Si reaparece siga titulando con tiosulfato y anote el volumen adicional requerido.
2. El titulante debe agregarse lentamente, sobre todo cerca del punto final, ya que la desaparición del color azul puede tardarse un poco y se corre el riesgo de agregar un exceso si no se da un margen de tiempo adecuado.

XI. REFERENCIAS

1. AOAC Official Methods of Analysis. 1984. Sección 33.147
2. Fisher, R. y D. Peters. 1970. **Análisis Químico Cuantitativo**. 3a ed. Interamericana, México D.F. pp 327-356.
3. Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, LUCAM. 1986. Cuadernos de Investigación, Sección de contaminantes, Guatemala.

ANEXO F

INSTITUTO DE NUTRICION
DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)
LABORATORIO ESPECIALIZADO
DE QUIMICA Y BIOQUIMICA (LEQB)

REVISIÓN NO.: _____
FECHA: _____

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE YODO EN SAL METODO CINETICO EN MICROPLACA

Técnica desarrollada por: Dora Inés Mazariegos, B.S

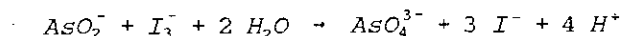
Fecha: Mayo 1994

Última Revisión efectuada por:

Aprobada por: Omar Dary, Ph.D.

I. PRINCIPIO

La reacción más ampliamente usada para cuantificar yodo en muestras biológicas es la reacción caracterizada por Sandell y Kolthoff (1937), que lleva su nombre. Se basa en que el yoduro (I^-) actúa como catalizador de la reducción del ión cérico (Ce^{4+}) a ión ceroso (Ce^{3+}) acoplado a la oxidación del arsenito As^{3+} , a As^{5+} . Las dos ecuaciones de semi reacción son:



La reacción neta es:



El Ce^{4+} es amarillo, mientras que el Ce^{3+} es incoloro. Esto permite, manteniendo las demás condiciones constantes, cuantificar el yodo mediante la desaparición del color amarillo. La reacción catalítica tiene efecto amplificador, y es sensible a muy pequeños cambios en la concentración del catalizador. El método original es espectrofotométrico de punto final (se registra la absorbancia o transmitancia de la muestra a un intervalo de tiempo fijo después de la adición de los reactivos). Este método es el más usado para cuantificar yodo en orina (Dunn *et al.*, 1993; y Garry *et al.*, 1973). En el laboratorio de INCAP se desarrolló una adaptación cinética de esos métodos, en el cual la velocidad de reacción es seguida por 2 minutos. La reacción se lleva a cabo en microplacas.

El método es capaz de determinar yodo total en la muestra, porque se deja reaccionar el ácido arsenioso con la muestra por un tiempo suficiente para convertir todas las especies de yodo a I^- , antes de

agregar el sulfato cérico amónico. Esta ventaja hace que el método sea aplicable a la medición de yodo en sal, no importando si la fortificación se realiza con sales de yoduro o de yodato.

II. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

La cuantificación de yodo se hace a nivel de nanogramos, por lo que el análisis es sumamente sensible a contaminación. De ser posible no se deben preparar las soluciones patrón de yodo en el mismo laboratorio en que se realiza la reacción final. Los reactivos deben ser de alta pureza, debe usarse agua desionizada en la preparación de todas las soluciones y el enjuague final del material debe ser también con agua desionizada.

III. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Debe colectarse alrededor de media libra de sal para el análisis. Guárdese en frasco de vidrio y en un lugar fresco para evitar que se humedezca demasiado.

IV. CONTROL DE CALIDAD

El control para el ensayo es una muestra de sal cualquiera, cuya concentración ha sido determinada previamente. Si el valor obtenido en la corrida está fuera de la media $\pm 2D.S.$, se corre nuevamente el control. Si éste cae en el intervalo de la media $\pm 2D.S.$, se aceptan los valores para las muestras. Si no, se vuelven a analizar todas las muestras con una nueva curva de calibración.

Si el coeficiente de variación entre los duplicados de la muestra es mayor que 10%, se repite el análisis de la muestra previamente diluida. Si la variación continúa siendo mayor a 10% se analiza la muestra en otra corrida.

V. EQUIPO

Lector de microplacas Molecular Devices (Opción cinética, Filtro 405)
Pipetas manuales (10-100 μL , 200-500 μL)
Pipeta multicanales (10-100 μL)
Vortex

VI. MATERIALES

Balón volumétrico de 1000 mL
Balones volumétricos 200 mL
Balones volumétricos 100 mL
Beakers de 50 mL (3)
Beakers de 250 mL (2)
Frascos de plástico de 250 mL (4)
Frascos de vidrio oscuro
Microplacas
Puntas de pipeta
Tubos de ensayo de 10 mL

VII. REACTIVOS

Acido sulfúrico (H_2SO_4), 96-97%, 1.84 g/mL, Merck Art. 714 PM 98.08
Cloruro de sodio (NaCl), 99.5%, Merck Art. 6404, PM 58.44
Hidróxido de sodio (NaOH), 99%, Merck Art. PM 40.01
Sulfato cérico de amonio ($Ce(SO_4)_2 \cdot 2(NH_4)_2SO_4 \cdot 2H_2O$); Merck 2273; PM 632.55
Trióxido de arsénico (As_2O_3), 99.5%, Merck Art. 119; PM 197.84
Yodato de potasio p.a. (KIO_3), 99.5%, Merck Art. 5051, PM 214.01,
Agua desionizada

- A. Acido arsenioso (0.98% en H_2SO_4 1.75 M)
- B. Sulfato cérico amónico (0.6% en H_2SO_4 1.75 M)
- C. Solución stock de yodo (10 mg I/mL)
- D. Solución intermedia de yodo (10 μ g I/mL)
- E. Solución final de yodo (200 ng/mL)

SOLUCIONES PATRON

Prepare diariamente a partir de la solución final de yodo (Sol. E)

[Yodo] (ng/mL)	Vol. Sol. E (mL)	Vol. H_2O (mL)
0	0.00	5.00
20	0.50	4.50
40	1.00	4.00
60	1.50	3.50
80	2.00	3.00
100	2.50	2.50
120	3.00	2.00
140	3.50	1.50

VIII. PROCEDIMIENTO

1. Prepare la solución de muestra de la sal disolviendo 10.0 g de sal en 100 mL de agua destilada. De esta solución concentrada transfiera 0.5 mL a un tubo de ensayo y agregue 4.5 mL de agua destilada (Dilución 1:10). Transfiera 0.5 mL de esta dilución a otro tubo de ensayo y agregue 4.5 mL de agua destilada (Dilución 1:100).
2. Agregue en duplicado 50 μ L de cada estándar, del control, y de las dos últimas diluciones de la solución de sal (1:10) y (1:100) a cada pozo en la microplaca. Los duplicados se colocan lado a lado en sentido horizontal.

3. Encienda el lector de microplacas. Programe las siguientes condiciones para el análisis:

AUTOMIX	ONCE	El equipo agita la placa 1 vez antes de hacer la lectura.
READ MODE	KINETIC, 405 nm	El equipo hace lecturas automáticas cada 5s
TIEMPO DE LECTURA	2 min	
OD LIMIT	-0.2 unidades	Es el valor de absorbancia con que el que el aparato hace los cálculos de velocidad, el signo negativo indica que es cinética negativa
DATA DISPLAY	ANALIZED, LINEAR	Es el tipo de análisis numérico para los datos

En el lector también se indica (opción TEMPLATE F1) la posición de la curva de calibración y de las muestras, con su factor de dilución (inicialmente 1) para que el programa realiza los cálculos automáticamente, con la regresión que se le haya indicado en DATA DISPLAY.

4. Cuando haya colocado todas las muestras en la placa, agregue 50 μL de Acido arsenioso (Solución A) a cada pozo. Esto se hace rápidamente con una pipeta multicanales. Deje reposar la placa por lo menos 15 minutos. El tiempo que permanecen en contacto el yodo de la muestra y el ácido arsenioso permite la reducción de todas las formas de yodo (principalmente yodato) a yoduro. No es conveniente dejar por más de 25 minutos, porque la acidez de los reactivos puede dañar la transparencia de la placa.
5. Con el equipo listo para leer la placa añada, con ayuda de la pipeta multicanales, 100 μL de sulfato cérico amónico (Solución B) a cada pozo de la microplaca.
6. Inmediatamente coloque la microplaca en el lector y comience la lectura (Presionando F5). Los resultados se obtienen en mOD/min.

IX. CALCULOS

Con el programa Softmax 2.0, al ingresar la posición de las muestras y la curva de calibración, el aparato hace los cálculos directamente. Para la dilución 1:100 los cálculos son:

$$\text{Conc. I} \left(\frac{\mu\text{gI}}{\text{gsal}} \right) = \text{Conc. I} \left(\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) * \frac{5\text{mL}}{0.5\text{mL}} * \frac{5\text{mL}}{0.5\text{mL}} * \frac{100\text{mL}}{10\text{gsal}} * \frac{1\mu\text{g}}{1000\text{ng}}$$

$$\text{Conc. I} \left(\frac{\mu\text{gI}}{\text{gsal}} \right) = \text{Conc. I} \left(\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) * 1$$

El mismo razonamiento se aplica para la muestra diluida sólo 1:10, pero en este caso, el resultado final debe multiplicarse por 0.1. La razón de colocar las dos diluciones es que si la concentración de la sal es cercana a 100 ppm, la dilución 1:100 será adecuada, pero si la muestra está más bien cerca de 10 ppm, entonces la dilución 1:10 dará una lectura dentro del rango de concentraciones de la curva de calibración.

Si el cálculo de concentración es manual

1. Calcule la recta de regresión concentración de yodo (ng/mL) versus Velocidad de reacción.

$$vel. reacción = a + b * (Conc, ng/mL)$$

2. Calcule la concentración de yodo en base a la recta de regresión y multiplicando por el factor de dilución de la muestra (1 o 0.1, según lo explicado en el primer párrafo).

$$Yodo (ng/mL) = \frac{(vel. reacc - a)}{b} \times FD$$

X. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La legislación guatemalteca indica que la concentración de yodo en sal debe estar entre 30 y 100 µg/g (= ppm)

XI. REFERENCIAS

- Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D.. 1993. **Methods for Measuring Iodine in Urine**. Publicación del Concejo Internacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD)/UNICEF/WHO. 71 p.
- Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D.. 1993. **Two Simple Methods for Measuring Iodine in Urine**. *Thyroid* 3(2): 119-123.
- Garry, P.; Lashley, W.; y Owen, G. 1973. **Automated Method of Urinary Iodine**. *Clin. Chem.* 19(9): 950-953.

XII. ANEXOS

1. Ejemplo numérico de una curva de calibración
2. Ejemplo de una gráfica de control de calidad

M O L E C U L A R D E V I C E S C O R P .
Report of Standard Curve

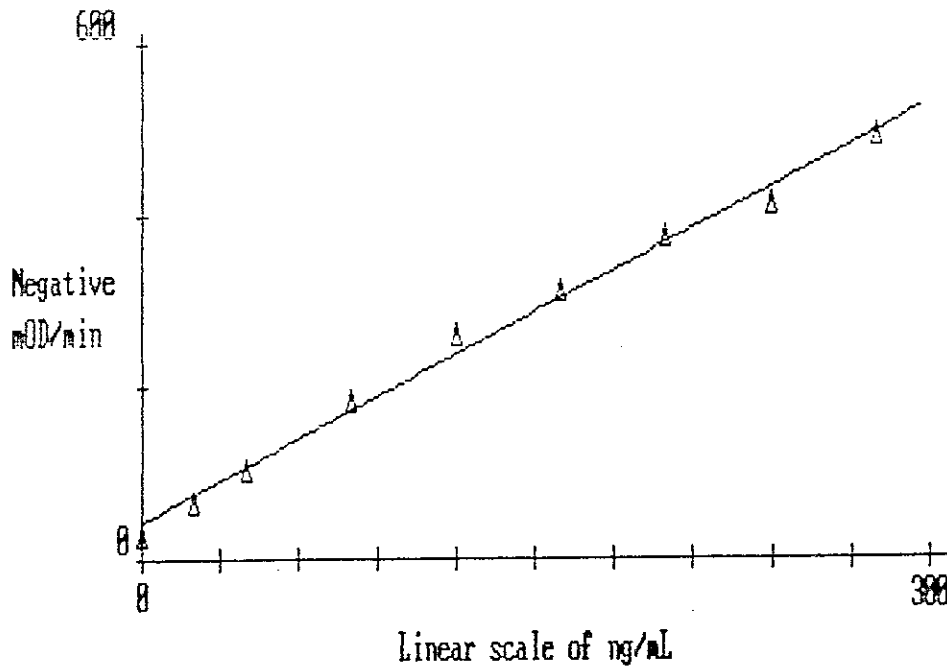
DATA FILE: DATA0727
DESCRIPTION: YODO RANGO LINEAL ESTANDARES SOLOS (sal) Mon Sep 26 1
PROTOCOL: 9:15 am
MODE: Neg. kinetics AUTOMIX: ONCE
WAVELENGTH: 405 RUN TIME: 2:00 OD LIMIT: -
CALIBRATION: ON LAG TIME: 0:00 Vmax POINTS

CURVE FIT: Linear

Corr. Coeff: 0.997

EQUATION : $y = A + B * x$

A = 44.0 B = 1.61



STANDARD	Std. Value		mOD/min	Mean	Std Dev	CV	Calc. Va
S01	0.000 ng/mL		30.82 26.97	28.90	2.722	9.419	-8.174 -10.56
S02	20.00 ng/mL		68.29 70.17	69.23	1.332	1.923	15.07 16.24
S03	40.00 ng/mL		106.9 105.7	106.3	0.805	0.757	39.01 38.31
S04	80.00 ng/mL		184.2 184.0	184.1	0.103	0.056	86.95 86.86
S05	120.0 ng/mL		260.4 258.5	259.4	1.337	0.515	134.2 133.1
S06	160.0 ng/mL		311.6 308.3	309.9	2.323	0.750	166.0 164.0
S07	200.0 ng/mL		376.3 372.9	374.6	2.424	0.647	206.1 204.0
S08	240.0 ng/mL		435.1 387.0	411.0	34.00	8.272	242.6 212.8
S09	280.0 ng/mL		461.8 518.4	490.1	40.00	8.162	259.2 294.3

ANEXO G

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA VALIDACION, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE METODOS ANALITICOS DE QUIMICA Y BIOQUIMICA

Preparado por Dora Inés Mazariegos C.
para el Laboratorio Especializado de Química y Bioquímica
INCAP

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
A. DESARROLLO DE METODOS	2
1. Naturaleza del método	2
2. Revisión de literatura	2
3. Respuesta cuantitativa	2
4. Optimización de las condiciones de análisis	2
5. Puntos críticos del método	2
B. VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METODOS	3
1. Especificidad del análisis en la matriz de interés	3
1.1 <u>Respuesta del blanco</u>	4
1.2 <u>Interferentes constantes</u>	4
1.3 <u>Recuperación</u>	5
1.4 <u>Adición de estándares</u>	5
2. Rango analítico lineal	6
2.1 <u>Límite máximo de cuantificación</u>	7
2.2 <u>Límite mínimo de cuantificación</u>	7
2.3 <u>Límite de Detección</u>	7
2.4 <u>Rango analítico y rango de trabajo</u>	8
3. Sensibilidad/Resolución	8
4. Precisión/Variabilidad del método	9
4.1 <u>Variación Intraensayo</u>	9
4.2 <u>Variación entre ensayos</u>	9
4.3 <u>Error analítico total</u>	9
5. Exactitud	9
5.1 <u>Comparación contra un método de referencia</u>	10
5.2 <u>Análisis de muestras certificadas</u>	10
C. EVALUACIÓN DEL METODO	11
REFERENCIAS	11
CARACTERIZACION DE METODOS	12

INTRODUCCION

El propósito de este manual es proveer al investigador que se encuentre trabajando en el desarrollo de métodos, los criterios a evaluar para garantizar que los resultados obtenidos por esos métodos analíticos son confiables y con precisión y exactitud claramente determinadas.

La mayor parte de las metodologías analíticas que se requieren en el INCAP son para ser aplicadas a un número grande de muestras, ya que por lo general apoyan estudios epidemiológicos. En el laboratorio se manejan dos tipos de métodos: los de tamizaje y los de "referencia". Los métodos de tamizaje son procedimientos sencillos que permiten una estimación rápida del parámetro de interés, con precisión y exactitud aceptables para los propósitos del estudio. Los principales atributos de estos métodos deben ser rapidez, sencillez y bajo costo. Los métodos de "referencia" sirven para validar a los primeros. Estos métodos podrían ser los aprobados por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), o cuando no existe un método oficial, métodos comerciales ampliamente aceptados.

Un método desarrollado debe cumplir con ciertos requerimientos básicos. Si es un método de referencia, los requerimientos serán mucho más estrictos que los de un método de tamizaje. Ciertos métodos clínicos, en donde la variación fisiológica de concentración de analito es muy alta, y los rangos de normalidad son amplios, pueden ser más permisivos en cuanto a exactitud y precisión. Esto también sucede con métodos para análisis de alimentos, donde la falta de homogeneidad de las muestras usualmente permite un margen de variación para los duplicados de alrededor del 10%. Lo importante es asegurar que el método sirve para el propósito del análisis. La confiabilidad del laboratorio dependerá de la demostración de la validez del procedimiento empleado.

En este manual, además de las sugerencias para la validación y caracterización de métodos, se incluye una discusión sobre evaluación de métodos. Esta última sección sirve para tomar la decisión de usar o no determinado método analítico. Los puntos discutidos son, entre otros, grado de especificidad, complejidad técnica, duración del análisis, y costo.

A. DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS

Por principio, el desarrollo de un método nuevo siempre es individual, y los problemas que tendrán que resolverse serán diferentes en cada caso. Sin embargo, el seguimiento de un plan general y sistemático de desarrollo ahorra tiempo y evita el gasto innecesario de tiempo y de reactivos. Para ello, se proponen las etapas siguientes.

1. Naturaleza del método

Establecer el tipo (cualitativo, de tamizaje, o de referencia) y propósitos (para vigilancia, monitoreo, control de calidad, o investigación) del método que se pretende desarrollar. Esto determinará la importancia relativa de los atributos que se caracterizarán.

2. Revisión de literatura

Consultar en la literatura y revisar la existencia de métodos aplicables al uso que se le quiere dar.

3. Respuesta cuantitativa

Debe probarse que existe una respuesta proporcional del método a la concentración del analito. La relación entre concentración del analito y la respuesta obtenida puede no ser lineal, pero debe ser una relación reproducible. La respuesta en esta etapa se mide con soluciones de diferentes concentraciones del analito, en el solvente que se piensa usar posteriormente.

4. Optimización de las condiciones de análisis

Se incluye en este punto cualquier procedimiento que mejore la función de respuesta. Debe variarse un sólo parámetro a la vez.

5. Puntos críticos del método

En esta etapa es necesario definir que pasos del método son críticos para el funcionamiento adecuado del mismo. Es necesario establecer los reactivos y características del equipo que no son sustituibles. Debe establecerse también la estabilidad de los reactivos o estándares utilizados.

B. VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METODOS

Hay determinados requerimientos que un método debe cumplir para que pueda considerarse como un método válido y adecuado. Esto se aplica aún a métodos oficiales cuando se establecen por primera vez en el laboratorio. La validación puede entenderse como los procedimientos que demuestran que el método mide el analito en la matriz de interés, con una precisión específica y uniforme en el rango de concentraciones en que se usará. Confirmar que un método mide el analito de interés en una matriz dada no es suficiente, se requiere también caracterizarlo. La caracterización de un método se concibe como la descripción de las cualidades del método, una vez que se ha establecido que el método funciona. Por esta razón, se considerarán validación y caracterización en la misma sección.

1. Especificidad del análisis en la matriz¹ de interés

La complejidad en la composición de la matriz donde se quiere determinar el analito medible hace que se tenga que probar la especificidad del método en cada matriz de interés. Se entiende por especificidad la habilidad con que el método mide únicamente lo que está supuesto mide, es decir el grado de selectividad con que el método responde a la concentración del analito, y no a otras sustancias identificadas como interferentes.

Se considera interferencia el efecto de un componente en la exactitud de la medición del analito de interés. Como se desprende de la definición, el concepto de interferente va ligado al de la estimación de la magnitud de errores sistemáticos, y por tanto de la exactitud del método. Es necesario realizar experimentos preliminares que determinen la ausencia de interferencia significativa. Si existiera interferencia, el método debe ser descartado, a menos que se encuentre algún procedimiento de separación de los interferentes. Los tipos de error que deben considerarse son errores constantes y errores proporcionales. El error constante tiene la misma magnitud en todo el rango de concentración del analito. Este puede deberse a la presencia de una sustancia interferente que da origen a una señal falsa, positiva o negativa. El error proporcional ocurre cuando la magnitud del error depende de la concentración del analito. Un error proporcional se debe a alguna reacción lateral del interferente con el analito.

Para evaluar estos errores se realizan las pruebas siguientes:

¹ Se entenderá por matriz el conjunto de componentes específicos que constituyen la muestra. Una matriz puede ser de origen biológico animal (orina, plasma, suero) o de otro tipo, por ejemplo alimentos o mezclas químicas artificiales. Un método debe ser validado para cada matriz en que se quiera utilizar, aunque el analito a medir sea el mismo

1.1 Respuesta del blanco

Un primer paso indispensable es la corrida de blancos de la muestra, con una matriz que no contenga al analito de interés. Salvo en casos particulares, la respuesta debe ser significativamente igual a cero. Si se hace una corrida de 10 blancos, se obtiene una respuesta media y su desviación estándar

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

$$D.S. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Un intervalo de confianza al 95% para la respuesta debe incluir el valor nulo. El límite de confianza al 95% (L.C. 95%) es:

$$L.C._{95\%} = \frac{t_{95\%} S}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

en donde $t_{95\%}$ es el valor de la distribución t de Student, con n-1 grados de libertad, para dos colas ($\alpha = 0.025$); s la desviación estándar; y n el número de réplicas.

El intervalo de confianza para la respuesta es un intervalo centrado en la respuesta media:

$$I.C._{95\%} = [\overline{Resp.} - LC_{95\%}; \overline{Resp.} + LC_{95\%}] \quad (4)$$

Si se demostrara que existe una respuesta significativa del blanco, deben investigarse las causas, empezando por los reactivos. Si un blanco de reactivos da señal nula, entonces habrá que incluir algún paso de purificación del método para eliminar las sustancias causantes de la respuesta.

1.2 Interferentes constantes

Para evaluar el efecto de interferentes que producen errores constantes, debe agregarse una cantidad de la sustancia sospechosa de interferencia a una porción de muestra. El volumen agregado no debe ser mayor al 10% del volumen de la muestra. Para compensar por la dilución de la muestra, se agrega a la muestra sin interferente (original) un volumen igual del solvente puro en el que se encuentra el interferente. La muestra original y las muestras con interferente se corren cada una en triplicado. La diferencia entre los resultados de las dos muestras se atribuye al efecto del interferente.

1.3 Recuperación

Cuando se sospecha de algún error proporcional, es decir que la magnitud del error depende de la concentración del analito, se debe hacer el experimento de **recuperación**. La recuperación se define como el ratio de la cantidad recuperada a la cantidad agregada y se expresa como porcentaje. A tres muestras diferentes, con contenidos distintos del analito, se añade artificialmente una misma cantidad, exactamente conocida del analito. Cada muestra se analiza en triplicado. La diferencia entre la medición del nivel basal en la muestra y el nivel medido después de la adición de patrón da el nivel de recuperación. Igual que para el análisis de interferencias, se le añade a la muestra sin analito, un volumen de solvente igual al que se uso para agregar el analito. Debe agregarse una concentración de analito que esté cerca del nivel de interés, y que debe ser suficiente para que la cantidad recuperada no se pierda en el error aleatorio del método. Además, la concentración original del analito en las tres muestras debe cubrir el rango analítico deseado (concentración baja, media y alta); y poseer contenidos distintos de los otros ingredientes de la matriz (muestras biológicas de personas de distintos estados de salud, e.g.)

$$RECUPERACION = \frac{Conc. obtenida}{Conc. esperada} * 100 = \frac{Cant. obtenida}{Cant. basal + Cant. añadida} * 100 \quad (5)$$

La desviación estándar del porcentaje de recuperación es una medida de la incertidumbre del mismo. Un estimado de la recuperación es el intervalo de confianza al 95% usando t de Student al 95%, con n-1 grados de libertad y una sola cola. Si este intervalo incluye el valor de 100% de recuperación, el análisis es definitivamente confiable. Cuando se trabaja al nivel traza, la recuperación puede estar entre 70 y 120%, pero se tiene que ser estricto en tener un intervalo de confianza estrecho y constante del valor de recuperación. Por ejemplo, se puede tener una recuperación de 80%, pero la variación no debe ser mayor de 10% (75%-85%). Obtener a veces recuperaciones de 70% y a veces de 90% no es válido.

1.4 Adición de estándares

El método de adición de estándares se usa para evaluar si la matriz tiene alguna clase de interferencia no específica en el análisis. El principio del método es que, si se agrega a una misma matriz cantidades diferentes del analito, y si la matriz no afecta la respuesta del mismo, entonces debe observarse un incremento lineal de la respuesta de la muestra con niveles crecientes de analito agregado. La matriz debe tener una concentración inicial baja, para poder agregar por lo menos 4 niveles de concentración dentro del rango lineal de respuesta.

Se preparan cinco alícuotas de la muestra. A cada una de ellas se le agrega un mismo volumen (no más del 10% del volumen de la alícuota), que contenga sólo solvente, o cuatro diferentes niveles, exactamente conocidos, de analito. Se mide la respuesta en las cinco muestras en duplicado, siguiendo todas las etapas del procedimiento. Se grafican los resultados obtenidos, poniendo en el eje "x" la concentración de analito agregada, y en el eje "y" la respuesta obtenida. La inspección visual permite detectar desviaciones del comportamiento esperado. La recta de regresión calculada en base a estos puntos permite estimar la concentración basal de la muestra, que

es el negativo de la concentración en donde la recta intercepta el eje "x". En base a esta concentración basal se puede generar otra gráfica, poniendo en el eje "x" la concentración esperada para la muestra (la concentración basal + la concentración añadida), y en el eje "y" la concentración obtenida. Esta recta debería tener una pendiente de 1 y un intercepto nulo. Para demostrarlo se hace una prueba de hipótesis sobre la pendiente (t de Student al 95%, dos colas, n-2 grados de libertad) y sobre el intercepto. Las ecuaciones son:

Ho: Pendiente = 0

Ha: Pendiente ≠ 0

$t_{\text{crítica}}$: (n-2 g.l.; $\alpha/2 = 0.025$)

$$t_{\text{exp}} = \frac{\text{Pendiente}}{s} \cdot \sqrt{SC_x} \quad (6)$$

donde

$$s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - \text{Pend.} \cdot x \sum (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{n-2} \quad (7)$$

$$SC_x = \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (8)$$

Si esto es estadísticamente cierto, entonces queda demostrado que la matriz no interfiere significativamente en el análisis. Esto no demuestra la ausencia de alguna interferencia constante, porque el efecto de ésta se suma a cada punto analizado y no puede verse en la recta de regresión, ya que el error está en el cálculo de la concentración basal.

2. Rango analítico² lineal

Una vez establecido, en las primeras etapas de desarrollo del método, que existe relación proporcional entre la concentración de analito y la respuesta medible, deben ajustarse los datos a una ecuación. La ecuación de ajuste para los datos se calcula usando las diferentes concentraciones de estándar de analito. La mayoría de veces, los datos se ajustan a una línea recta. En este caso, se calcula la recta de regresión de los datos brutos o modificados según el método de mínimos cuadrados. Estos datos provienen generalmente de patrones del analito, entendiéndose como patrones a soluciones del analito en las que están ausentes otras sustancias propias de la matriz.

² La Federación Internacional de Química Clínica define como Rango Analítico "el rango de concentración u otra cantidad en el espécimen sobre el cual el método es aplicable sin modificación."

Si los datos se ajustan a una línea recta, las ecuaciones que se utilizan son las siguientes:

$$y=a+bx \quad (9)$$

$$b=\frac{N\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{N\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (10)$$

$$a=\bar{y}-b\bar{x} \quad (11)$$

2.1 Límite máximo de cuantificación

Se define como el límite superior de concentración aquella a partir de la cual la respuesta se desvía del comportamiento esperado según la curva de calibración.

2.2 Límite mínimo de cuantificación

Esta es la concentración más baja en donde la respuesta tiene una variación similar a los puntos intermedios de la curva (generalmente menor al 5%). Abajo de esta concentración se podría cuantificar el analito, pero la variación esperada es mayor que el promedio de la curva, por lo que hay que utilizar concentraciones menores para calcular la curva y así mejorar la precisión. Conacher (1990) sugiere empíricamente considerar el límite de cuantificación como la concentración que da una respuesta 10 veces superior a la del blanco.

2.3 Límite de Detección

Se calcula en forma preliminar en base a la recta de regresión. El límite de detección teórico es la concentración estimada cuya respuesta es el valor de la respuesta del blanco más tres veces su desviación estándar.

$$RESPUESTA\ de\ L.D. = \overline{RESP. BLANCO} + 3 * D.S. blanco \quad (12)$$

$$L.D. teórico = \frac{(Resp.L.D - intercepto)}{pendiente} \quad (13)$$

Posteriormente, se confirma este valor haciendo estándares de concentraciones bajas, múltiplos del límite de detección estimado. Se selecciona como límite de detección experimental la concentración más baja cuyo intervalo de confianza al 95% sea diferente del intervalo de confianza al 95% del blanco. Se recomienda utilizar como patrón de concentración más baja el que sea dos veces más concentrado que el límite de detección confirmado experimentalmente.

2.4 Rango analítico y rango de trabajo

Este es el rango de concentraciones en donde la pendiente de concentración versus la respuesta es máximo, y la precisión en la respuesta de los patrones de diferentes concentraciones es similar. En otras palabras, es el rango delimitado por los límites máximo y mínimo de cuantificación. Para esto se corre una curva de calibración con 6 réplicas para cada concentración y se calcula el coeficiente de variación de cada punto:

$$C. V. (\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (14)$$

El coeficiente de variación de la respuesta de los patrones en el rango analítico debe ser entre 0 y 5%.

A veces, el rango analítico es más amplio que la concentración máxima que se encontrará en las muestras. Entonces, se puede reducir el rango analítico al rango que a uno le interese. Este nuevo **rango de trabajo** tiene la ventaja de ser más exacto en los niveles bajos, y no se comete el error de sobreestimar la bondad de ajuste, que mejora con la inclusión de puntos altos.

Finalmente con los puntos del rango de trabajo, se calcula el coeficiente de correlación de Pearson (r^2). Se sugiere tomar por lo menos cinco concentraciones diferentes, equidistantemente separadas.

$$r^2 = \frac{N\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{[N\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2] [N\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]} \quad (15)$$

3. **Sensibilidad/Resolución**

Se entiende por sensibilidad del método, la mínima concentración discriminable en el rango de trabajo. Por ejemplo, un método A es más sensible que un método B si el método A permite diferenciar dos muestras con 10.5 y 11.0 unidades de concentración, mientras que el otro sólo puede dar una estimación entre 10 y 11 unidades de concentración. Tomando dos concentraciones diferentes, tenemos, para cada una, cierta variación en la respuesta. Podemos decir que las dos concentraciones son discriminables, si una respuesta es significativamente diferente de la otra. Esto depende de la variación para cada respuesta, y de la magnitud absoluta de la respuesta de cada concentración. La prueba de hipótesis para ver si dos valores son diferentes es equivalente a que los intervalos de confianza al 95% no se traslapen.

Para estimar la sensibilidad o resolución se usan los límites de confianza al 95% de tres patrones cuya concentración es cercana a los valores de los cuartiles del rango de trabajo. El intervalo de confianza al 95% de cada punto determina la concentración mínima "diferenciable" a estos tres niveles. Esta concentración diferenciable determina también el número de cifras significativas con las que se informa la concentración estimada del analito en las muestras. Este

valor debe multiplicarse, cuando aplicable, por el factor de dilución para ajustarlo al nivel del analito en las muestras.

4. Precisión/Variabilidad del método

La precisión es la medida de reproducibilidad del método bajo condiciones de operación normales. La precisión indica que tan bien se comporta el método bajo condiciones diferentes de uso repetido. Tiene dos componentes: la variación aleatoria entre réplicas en un mismo ensayo o corrida, llamada la variación intraensayo; y la variación que ocurre entre ensayos independientes, llamada variación entre ensayos. Para evaluar la precisión, se necesita usar muestras control. Un control es una muestra con una concentración dada del analito. Se asume que la muestra se puede preservar de modo tal que la concentración del analito no varía considerablemente en un período de tiempo razonable.

4.1 Variación Intraensayo

Se toman tres muestras control, a tres niveles de concentración que abarquen el rango de trabajo del analito de interés y se analizan 10 veces. La variación se reporta en términos del coeficiente de variación. En la práctica se sugiere aceptar la concentración estimada de réplicas de una misma muestra si la variación de sus resultados es inferior a dos veces la variación intraensayo del método.

4.2 Variación entre ensayos

Se toman los mismos tres controles y se analizarán en triplicado en 10 corridas diferentes, con curva de calibración diferente. La variación se reporta en términos del coeficiente de variación. En la práctica se sugiere repetir una corrida si la variación de 2 de 3 controles están afuera de dos veces su variación entre ensayos.

4.3 Error analítico total

Se define como E_a :

$$E_a = \frac{1}{2} \sqrt{CV_{intra.}^2 + CV_{intere.}^2} \quad (16)$$

Un buen método es aquel que posee un error analítico inferior al 5%, aunque en ocasiones uno que tiene un error analítico del 10% puede ser aceptable.

5. Exactitud

Con este término se pretende agrupar las pruebas necesarias para demostrar que el método cuantifica la concentración **real** del analito en una muestra. Se incluyen tres pruebas, consideradas alternativas, siendo recomendable usar más de una para establecer la exactitud del método.

5.1 Comparación contra un método de referencia

El método en su versión final se compara contra un método aceptado que sirve de referencia para el análisis. Se analizan un mínimo de 20 muestras diferentes por ambos métodos y se comparan los resultados graficando los resultados por el método de referencia y el método que se está probando. La correlación entre ambos resultados debe ser buena, y la pendiente debe ser significativamente igual a 1 (prueba de hipótesis sobre la pendiente, que equivale a hacer intervalos de confianza al 95% con dos colas, y verificar que el valor de 1 está incluido en el intervalo). El intercepto debe ser significativamente igual a 0 (la misma prueba que para la pendiente).

Las diferencias sistemáticas entre los dos métodos están dadas por el sesgo σ_d . Si tomamos como x_i el valor obtenido por un método y y_i el obtenido por el otro,

$$sesgo = \frac{\sum (y_i - x_i)}{n} \quad (17)$$

La significancia del sesgo, es decir si es diferente de 0, se determina con la distribución t de Student. La desviación estándar del sesgo, s_d , es una medida del error aleatorio entre los métodos.

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (y_i - x_i - sesgo)^2}{n-1}} \quad (18)$$

El valor experimental de t

$$t = \frac{sesgo \sqrt{n}}{s_d} \quad (19)$$

se compara con el valor crítico de t para n-2 grados de libertad, al 95%, y con dos colas.

5.2 Análisis de muestras certificadas

Cuando sea posible obtenerlas, se analiza muestras cuya concentración haya sido certificada por uno o varios laboratorios ajenos al laboratorio en donde se realiza el análisis.

C. EVALUACIÓN DEL METODO

La evaluación del método se hace como una comparación con otros métodos publicados, de los siguientes aspectos: precisión, exactitud, velocidad, capacidad de procesamiento, grado de complejidad del método, instrumentación requerida, aspectos de seguridad, y finalmente costos del análisis.

La decisión se toma en base a la importancia relativa de estos factores. La ponderación de estos criterios depende de los propósitos y facilidades de cada laboratorio, y del uso que se le pretenda dar al nuevo método. Es posible sacrificar un poco la precisión o exactitud, cuando otra característica deseable es satisfecha por el nuevo método, este puede ser el caso de la velocidad de procesamiento, o la reducción del grado de complejidad. Cada método debe ser examinado en base a prioridades predeterminadas.

En cualquier caso, la decisión final debe estar respaldada por la adecuada caracterización de los métodos. Esto permitirá a cualquiera que quiera usar el método a sus propias necesidades, conocer cuantitativamente todas sus características.

REFERENCIAS

- (1) Carey, N.; y Garber, C.. 1989. **Evaluation of Methods**. En: Kaplan, L.; y Pesce, A.(Eds) Clinical Chemistry. Theory, Correlation and Analysis. 2a. ed. CV Mosby Company, San Luis. Capítulo 19 pp 290-310.
- (2) Conacher, H. 1990. **Validation of Methods Used in Crisis Situations: Task Force Report**. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **73**(2): 332-334.
- (3) Cornbleet, J.; y Gochman, N. 1979. **Incorrect Least Squares Regression Coefficients in Method-Comparison Analysis**. *Clin. Chem.* **25**(3): 432-438.
- (4) **Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis**. 1988. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **71**(1): 161-173 .
- (5) **Guía de Validación en HPLC**. 1993. Manual de trabajo, Perkin Elmer-Anaqui. Guatemala.
- (6) Ruig, W.; Stephany, R.; y Dijkstra, J. 1989. **Criteria for the Detection of Analytes in Test Samples**. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **72**(3): 487-490

CARACTERIZACION DE METODOS

METODO: _____
 RESPONSABLE: _____
 APROBADO POR: _____ FECHA: _____

1. Rango Analítico Lineal

Límites de cuantificación: Mínimo: _____ Máximo: _____ r^2 : _____

Límite de detección: Teórico: _____ Experimental: _____

Rango de trabajo: Límite inferior: _____ Límite superior: _____ r^2 : _____

2. Sensibilidad/Resolución (Intervalos de confianza al 95%)

	Rango	Diferencia	Diferencia x F.D.
Patrón de concentración baja ()	_____	_____	_____
Patrón de concentración media ()	_____	_____	_____
Patrón de concentración alta ()	_____	_____	_____
Promedio:	_____	_____	_____

3. Precisión/Variabilidad (Coeficientes de variación) (%)

<u>Controles</u>	<u>Variación intraensayo</u>	<u>Variación entre ensayos</u>	<u>Ea</u>
Concentración baja ()	_____	_____	_____
Concentración media ()	_____	_____	_____
Concentración alta ()	_____	_____	_____
Promedios:	_____	_____	_____

4. Exactitud

Recuperación (%)

Control de concentración baja	()	_____ %
Control de concentración media	()	_____ %
Control de concentración alta	()	_____ %
Promedio:		_____ %

Comparación contra método de referencia (_____)

Pendiente de la regresión: _____ Intercepto: _____ r^2 _____

Sesgo(s_d): _____

5. Observaciones (Recuperación, interferentes, puntos críticos, etc.):

