

Método semiautomático para la determinación de calcio en suero sanguíneo humano

Blanca Semprún de Villasmil^{1*}, Stella Bermúdez de Rangel², Gusdanis A. Campos³
y Ana Cáceres³

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. ²Laboratorio Clínico de la Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza", SAHUM. ³Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos (LDMA), Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo 4011.

Recibido: 20-04-2012 Aceptado: 02-11-2012

Resumen

Se presenta el desarrollo metodológico para la determinación espectrométrica en la región visible, de Ca^{2+} en suero sanguíneo humano por FIA. El método se basó en la formación de un complejo de Ca^{2+} -Murexida en medio básico (pH 12) a través de un sistema semiautomático con un volumen de inyección de 16,5 μL , longitud del reactor de 1 m, el complejo se midió a 491 nm, permitió procesar 44 muestras por hora, con un intervalo lineal de 2-12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se obtuvo un L_D y L_C de 0,076 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0,25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente y una precisión (DER) de 1,81%. La exactitud se evaluó por comparación de las concentraciones de calcio usando el método desarrollado con otros basados en técnicas espectrométricas. Se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); obteniendo valores de Ca ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \pm \text{DE}$) en suero sanguíneo de: $93,9 \pm 15,2$ (FIA-UV-Vis), $96,5 \pm 8,3$ (ICP-AES) y $89,5 \pm 13,7$ (espectrofotómetro Konelab). Por último se realizó un ANOVA para la comparación de medias entre estas técnicas, y se encontró que no existen diferencias significativas. El método desarrollado resultó reproducible, exacto y libre de interferencias, así como simple, rápido y de bajo costo, lo que permite utilizarlo en el análisis de rutina en los laboratorios clínicos.

Palabras clave: calcio, análisis por inyección en flujo, suero sanguíneo humano.

Semi-automatic method for the determination of Ca in human blood serum

Abstract

We present the methodological development for the spectrometric determination in the visible, range of Ca^{2+} in human blood serum by FIA. The method is based on the formation of a complex Ca^{2+} -Murexida in basic medium (pH 12). We used a semi-automatic system with an injection volume of 16.5 μL , reactor length of 1 m, the complex was measured at 491 nm, can process 44 samples per hour, with a linear range of 2-12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. We obtained a L_D and L_C of 0.076 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and a precision (RSD) of 1.81%. Accuracy is assessed by comparing the concentrations of Ca using the method developed by others based on spectrometric techniques. We observed no statistically significant differences ($p < 0.05$), obtaining val-

* Autor para la correspondencia: jchirinos@fec.luz.edu.ve; blansenirene@gmail.com

ues of Ca ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1} \pm \text{SD}$) in human blood serum: 93.9 ± 15.2 (FIA-UV-Vis), 96.5 ± 8.3 (ICP-AES) and 89.5 ± 13.7 (Konelab Spectrophotometer). Finally, we performed an ANOVA for comparing means between these techniques, which found that $F_c < F_t$, so the null hypothesis is accepted. The developed method was reproducible, accurate and interference-free and simple, fast, low cost, which can be used in routine analysis in clinical laboratories.

Keywords: calcium, flow injection analysis, human blood serum.

Introducción

La evaluación de los oligoelementos (e.g. Ca, Mg, Fe, entre otros) en fluidos biológicos, permite conocer el estado de salud del individuo (1-4). Asimismo, establece la importancia de éstos en algunas vías metabólicas y relaciona sus carencias o deficiencias con algunas enfermedades, estableciendo algunas relaciones entre las concentraciones de ellos y ciertas patologías clínicas (5-7). Estos metales son esenciales para el organismo humano, ya que forman parte de enzimas y proteínas (8).

El calcio es considerado un elemento esencial debido a que participa en la construcción y mantenimiento de los huesos y dientes; es esencial para la coagulación de la sangre, contracción y relajación muscular (9). La concentración de calcio en la sangre está regulada por las hormonas paratiroidea y calcitonina; y por la vitamina D. El calcio ocupa el quinto lugar entre los elementos más abundantes en el cuerpo humano, representa el 0,31% de los átomos presentes en el organismo y constituye cerca del 2,0 % del peso del cuerpo de una persona adulta. Los valores normales en suero sanguíneo oscilan entre $8,5\text{-}10,5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ (9).

Debido a la importancia clínica del calcio sobre el organismo humano, es de gran interés su determinación en diferentes fluidos biológicos (e.g sangre completa, suero, orina, entre otros). En tal sentido, existen diferentes métodos de análisis basados en técnicas analíticas para su cuantificación en suero sanguíneo humano. Éstas incluyen: (i) espectrometría de absorción atómica

con atomización electrotérmica (ETA-AAS), (1) (ii) espectrometría de emisión atómica con plasma inductivo (ICP-AES), (2) (iii) espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS), (3) (iv) la espectrometría de absorción molecular UV-Vis (4) y (v) el análisis por inyección en flujo (FIA) (5).

Sin embargo, la espectroscopia UV-Vis es una técnica accesible y común en la mayoría de los laboratorios de análisis, su utilización resulta difícil para la determinación de Ca^{2+} , ya que es una especie no absorbente en esta región del espectro electromagnético (4). Existen especies no absorbentes (e.g. Fe, Ca, Mg, entre otros) que pueden ser determinadas mediante la formación de complejos que absorben en las regiones UV-Vis, para lo cual se ha reportado el empleo de agentes complejantes tales como: el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (4), negro de eriocromo T (6), o-cresolftaleína complexona (7), arsenazo III (10), entre otros. Por lo tanto, en este trabajo se presenta el desarrollo metodológico para la determinación espectrométrica visible de Ca^{2+} en suero sanguíneo humano por FIA, empleando la murexida como el agente formador del complejo.

Materiales y métodos

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Como reactivo formador del complejo se empleó la Murexida (Riedel-de Haën, Germany). Todas las soluciones de trabajo se prepararon con agua desionizada grado I ASTM (11), en ácido nítrico 0,01 mol

L^{-1} (HNO_3 , Merck 99%). Las soluciones concentradas de Ca (ca. $1000\text{ mg}\cdot L^{-1}$) se prepararon a partir de carbonato de calcio ($CaCO_3$, 99%, Merck). Las soluciones estándares para la curva de calibración se prepararon diariamente en el intervalo de concentración de: $2,0\text{-}12,0\text{ mg}\ L^{-1}$. Se utilizó la solución amortiguadora de NH_4Cl/NH_4OH a $0,1\text{ M}$ (Riedel-de Haën, Germany) como solución de arrastre.

Equipos

Para la validación del método analítico desarrollado se emplearon los siguientes equipos: Espectrofotómetro de emisión atómica con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) con vista axial, marca Varian modelo Liberty AX, un espectrofotómetro de absorción marca Konelab (perteneciente al laboratorio Clínico de la Maternidad "Armando Castillo Plaza"). Para obtener los espectros de absorción molecular UV-Vis en modo manual y de continua (online) y los fiagramas se empleó un espectrofotómetro UV-Vis 1800 Shimadzu, cuyo intervalo espectral se encuentra entre 190 y 1100 nm . Además, se utilizó una válvula de inyección de 6 vías (marca Rehodyne), una bomba peristáltica modelo minipuls Evolution (Gibson), centrifuga Herml. Z 232 MK II (Labnet), agitador Vortex-Genie, modelo K-500-G (Fisher Scientific), balanza analítica marca analytical plus (precisión $0,00010\text{ g}$) y un potenciómetro microprocesador (Quimis) con su electrodo de membrana de vidrio.

Muestras

El muestreo se realizó de manera aleatoria a pacientes que acudieron a la maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza". Para la recolección de las muestras se consideraron criterios como: ayuno de 12 horas, sueros no lipémicos y no hemolizados. Aproximadamente, se recolectó 5 mL de sangre completa por venopunción las cuales se colocaron en tubos de polipropileno, luego se centrifugaron a 1500 rpm por 20 minutos para separar el suero, éste se colocó en tubos de polipropileno con tapas de rosca y se almacenaron a $4^\circ C$ hasta el momento de medición analítica. Para el análisis, las muestras de suero sanguíneo se diluyeron 10 veces con agua desionizada y cada porción de prueba se preparó por triplicado y las lecturas de absorbancia se registraron por pentuplicado.

Análisis estadísticos

La optimización de los parámetros concentración del complejante y pH de la solución amortiguadora, así como la longitud del reactor y volumen de muestra en el desarrollo metodológico se realizó mediante un diseño de experimento con un arreglo factorial 2^k empleando como estadístico de prueba el algoritmo de Yates (12) (tabla 1). Para el procesamiento de los datos y posterior análisis, se aplicó un análisis de varianza con dos factores (ANOVA). La exactitud del método desarrollado se verificó por comparación con otras técnicas espectroscópicas y un estu-

Tabla 1

Factores y niveles para el diseño de experimento para la determinación de calcio en suero sanguíneo humano

Factor	Nivel	
	Bajo	Alto
Longitud del reactor (m)	1,0	2,0
Volumen de muestra (μL)	16,5	50,0
Concentración de Murexida (M)	$3,30 \times 10^{-5}$	$3,30 \times 10^{-4}$
pH	10,0	12,0

dio de recuperación. La precisión se evaluó en la corrida y entre corrida expresadas como DE y % DER.

Resultados y discusión

Reacción de formación del complejo Ca^{2+} -Murexida

Los metales alcalinotérreos se caracterizan por ser electropositivos, son muy reactivos y forman complejos más estables con ligando que contengan átomos muy electronegativos como nitrógeno, oxígeno y fluor (4,13). La formación del complejo Ca^{2+} -Murexida involucra una reacción ácido-base de Lewis, en la cual la murexida ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) actúa como base, donando pares de electrones no enlazantes del oxígeno al Ca^{2+} (figura 1) (14) que a su vez generan las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ responsables de la absorción en región visible del espectro. Para que se lleve a cabo la formación del complejo $[\text{Murexida-Ca}]^{2+}$ la reacción requiere de un medio altamente alcalino, el máximo de absorción del complejo se observó a 491 nm (15).

Optimización de las variables del sistema: volumen de muestra y longitud del reactor; concentración de reactivo y pH de la solución amortiguadora.

La optimización de todas estas variables se llevó a cabo a través de un diseño de experimento empleando un arreglo factorial

2^k , y utilizando el algoritmo de Yates como estadístico de prueba. En la tabla 2, se muestran las variables optimizadas con el diseño de experimento (11).

Concentración de reactivo (murexida)

La concentración óptima del reactivo complejante es similar al reportado por Haj-Hussein Amin y Christian Gary (6), ya que al emplear concentraciones muy diluidas de éste, la línea base no se estabilizó y los estándares de la curva de calibración presentaron menor absorbancia. De forma similar ocurrió cuando se emplearon soluciones concentradas, el sistema se saturó y losogramas no se observaron bien definidos; por esta razón se decidió trabajar con la concentración de $3,30 \times 10^{-4}$ M. En relación a la solución amortiguadora ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) y el valor de pH 12 es similar con lo reportado en la literatura (4, 7).

Diseño del sistema FIA

En la figura 2, se muestra el diseño del sistema FIA empleado para el desarrollo metodológico de Ca^{2+} en suero sanguíneo humano. Mediante la válvula de inyección se inyectó un volumen de muestra de 16,5 μL , el cual se mezcló con el portador ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) y posteriormente con la solución de murexida, seguidamente pasa al reactor para la formación del complejo coloreado que es medido en el espectrofotómetro.

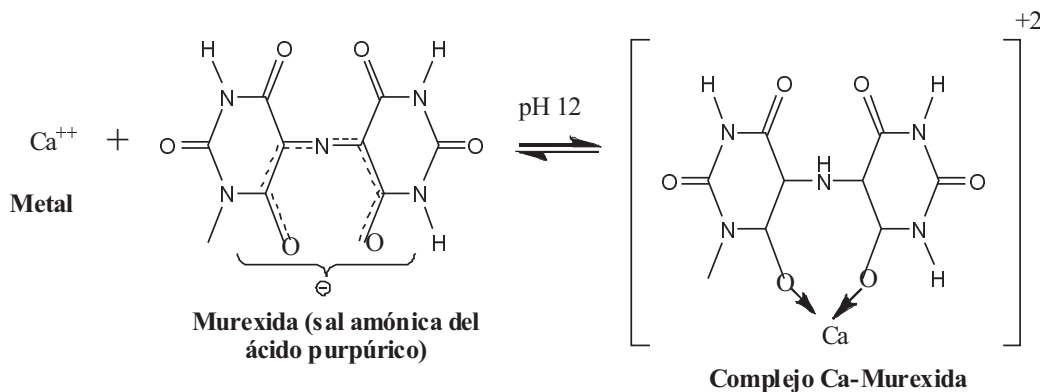


Figura 1. Reacción de formación del complejo Ca^{2+} -Murexida¹⁴.

Tabla 2
Optimización de las variables del sistema y de reactivos a través de un diseño factorial 2^k

Variable	Valor optimizado
Volumen de muestra	16,5 µL
Logintud del reactor	1,0 m
Concentración del reactivo (murexida)	3,30 x10 ⁻⁴ M
pH de la solución amortiguadora (NH ₄ OH/NH ₄ Cl)	12,0

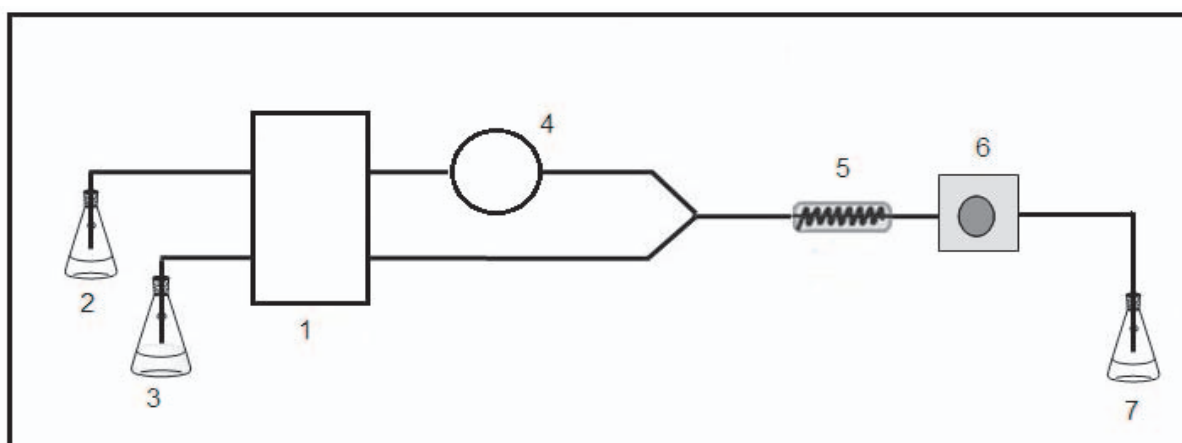


Figura 2. Diagrama del sistema en línea diseñado para la determinación de Ca²⁺ en suero sanguíneo humano. 1) Solución amortiguadora. 2) Reactivo complejante. 3) Bomba peristáltica 30 rpm. 4) Válvula de inyección de seis puertos/ 2 vías. 5) Reactor de TEFLON 0,5 mm diámetro interno. 6) Celda de flujo continuo/ Detector UV-Visible de longitud de onda variable. 7) Desecho. 8) Fiagrama

Evaluación de los parámetros analíticos

La linealidad de la curva de calibración para Ca²⁺ estuvo en un intervalo de 2,0-12,0 mg·L⁻¹, el cual es un rango de trabajo bastante amplio. Estos resultados contrastan con lo reportado por Yamane Takeshi y Goto Eiichi (16), quienes reportaron un rango lineal de 5,0-30 µg mL⁻¹ empleando o-Cresoltaleina para la determinación de calcio en aguas naturales y Haj-Hussein Amin y Christian Gary (6), de 0,8-4,0 mg·mL⁻¹ empleando NET en muestras de suero sanguíneo humano.

La cuantificación de la concentración del metal en las muestras de estudio se rea-

lizó a través de la ecuación de la recta ($Y = 0,02165 \pm 8,88 \times 10^{-5} X + (0,0114 \pm 4,28 \times 10^{-4})$; $r = 0,9999 \pm 0,32$). La figura 3, muestra el fiagrama obtenido para la elaboración de la curva de calibración.

El límite de detección (L_D) y de cuantificación (L_C)

El límite de detección (L_D) y de cuantificación (L_C) obtenidos fueron 0,076 mg·L⁻¹ y 0,25 mg·L⁻¹, respectivamente. Yuan Youxian (5), reportó valores de 0,1 mg·mL⁻¹ empleando el reactivo CPA III en un sistema FIA para el análisis de muestras de agua naturales, mientras que Yamane Takeshi y Goto Eiichi (16) reportaron 0,2 mg·L⁻¹ empleando otras

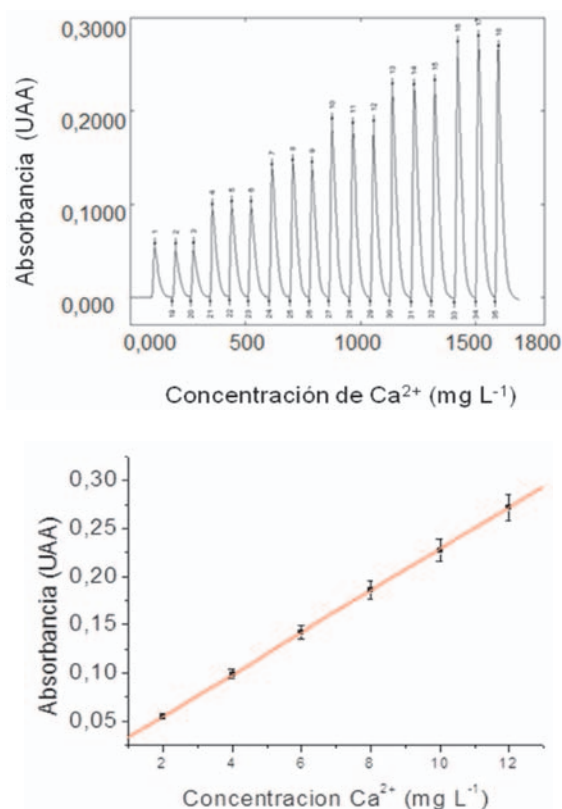


Figura 3. Diagrama y curva de calibración para la determinación de Ca^{2+} en suero sanguíneo humano. Reactor: 1 m; Volumen de muestra: $16,5 \mu\text{L}$; Murexida: $3,30 \times 10^{-4} \text{ M}$; Solución amortiguadora de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (pH 12); Longitud de onda; 491 nm.

condiciones de trabajo. El límite de detección obtenido en este estudio resultó ser más bajo de los reportados, lo cual sugiere su utilización en la determinación de calcio en muestras con bajos niveles del metal.

Precisión

La precisión del método desarrollado se evaluó mediante la determinación de calcio en suero sanguíneo diluido, empleando para su evaluación los estadísticos: media (\bar{X}), desviación estándar (DE) y desviación estándar relativa (DER). Los resultados obtenidos señalan que la DER promedio es de

1,81% tanto en la corrida como entre corrida para el metal bajo estudio, lo cual está dentro del valor aceptado en las normas internacionales (ca. $\pm 5,0\%$) e indica la buena reproducibilidad del método desarrollado.

Exactitud

La exactitud se evaluó mediante estudios de recuperación en muestras de suero sanguíneo humano, obteniendo un porcentaje promedio de recuperación de $99,89 \pm 4,90\%$. Este resultado corrobora la adecuada exactitud para el método analítico desarrollado; ya que se encuentra dentro del intervalo teórico aceptable a nivel internacional de 95 a 105% (17).

Interferencias de matriz

Este estudio se realizó empleando el método de la adición estándar. Las ecuaciones obtenidas para las curvas de adición estándar y de calibración son: $Y = (0,019 \pm 0,0037) X + 0,124 \pm 0,0067$, $r = 0,9819 \pm 0,008$ y $Y = 0,0188 \pm 2,39 \times 10^{-4} X + 0,016 \pm 0,0013$, $r = 0,998 \pm 0,001$; respectivamente. Se obtuvo un 5,2% de error medio relativo entre la pendiente de la curva de calibración y la de adición estándar, este resultado indica que no existieron efectos de matriz significativamente importantes, lo que permite cuantificar la concentración del metal a través de las curvas de calibración.

Efecto de iones interferentes

Debido a que el método no es específico para el ión Ca^{+2} , se evaluó el efecto de iones que pueden ser comunes en la matriz de la muestra y que a su vez podrían generar cambios en la señal analítica esperada. Los iones Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , y Zn^{2+} son los que más frecuentemente se reportan como interferentes (18), por lo que se estudiaron en diferentes rangos de concentración. Se estableció como criterio para establecer la existencia o no de interferencia del ión externo una variación de la señal de ocho por ciento ($\pm 8\%$) de la señal correspondiente para una solución de $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de calcio. El efecto de los iones inter-

ferentes se muestra en la tabla 3, donde se puede observar que los iones Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , no interfieren. Mientras, que para el Cu^{2+} tienen un bajo nivel de tolerancia hasta concentraciones de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, a esta concentración y en un medio fuertemente básico (pH 12) el metal puede estar en forma de hidróxido de cobre (CuOH) (15).

Estudio de la robustez

Se evaluó la robustez del método desarrollado a través de la influencia del cambio del equipo. Para ello, se realizó la determinación del metal bajo estudio con el método analítico desarrollado en el espectrofotómetro UV-Vis 1800 Shimadzu (instrumento 1) y luego se montó el mismo experimento en otro espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 11 marca PerkinElmer (instrumento 2). Para verificar o no la existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los dos instrumentos, se les aplicó la prueba estadística denominada contraste t para datos emparejados (19), los resultados demostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la

determinación de calcio en muestras de suero sanguíneo al variar el instrumento. Por lo tanto, se considera que el método analítico propuesto es robusto, ya que permanece invariable ante el cambio del equipo, debido a que no existen alteraciones significativas en los resultados obtenidos como se muestra en la tabla 4.

Trazabilidad del método propuesto

En la tabla 5, se comparan los resultados obtenidos mediante el método propuesto con las técnicas espectrométricas (espectrofotómetro KONELAB) y por la técnica de emisión atómica con fuente de plasma por inducción (ICP-AES). A través, de un ANOVA de dos factores se evaluaron las variaciones en los valores de calcio obtenidos por cada una de las técnicas señaladas y se encontró que no existen diferencias significativas.

Velocidad de análisis

Bajo las condiciones optimizadas, el sistema FIA permitió procesar 44 muestras por hora, lo cual es una ventaja para la determinación de este metal en muestras de

Tabla 3
Efecto de iones externos en la determinación de Ca^{2+} (patrón de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Iones	Cantidad Añadida (mg L^{-1})	% de variación en la señal analítica	Valores Referenciales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Fe^{++}	1,00	1,66	$6,0 \times 10^{-3} - 1,7 \times 10^{-2}$
	2,00	1,66	
	3,00	5,66	
Fe^{+++}	1,00	6,30	$6,0 \times 10^{-3} - 1,7 \times 10^{-2}$
	2,00	3,80	
	3,00	3,16	
Mg^{++}	1,00	2,83	0 - 30
Cu^{++}	1,00	8,60	M: 0,85 - 1,55 H: 0,70-1,40
Zn^{++}	2,00	1,60	0,70 - 1,50
	3,00	2,60	
	4,00	6,80	

Tabla 4
Evaluación de la robustez mediante la medición de la influencia del cambio del equipo

Suero	Concentración de Ca ²⁺ (mg·L ⁻¹)	
	Instrumento 1 ^a	Instrumento 2 ^b
A	91,0 ± 1,0	74,9 ± 0,8
B	105,8 ± 0,30	91,7 ± 0,1
C	112,5 ± 0,10	76,8 ± 0,20

^a: Espectrofotómetro UV-Vis modelo 1800, marca Shimadzu.

^b: Espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 11, marca PerkinElmer.

Tabla 5
Determinación de calcio (mg·L⁻¹) en suero sanguíneo humano por ICP-AES, técnicas espectrométricas y el método propuesto (FIA-UV-Vis)

Suero Sanguíneo Humano	Concentración de Ca ²⁺ (mg·L ⁻¹)		
	ICP-AES	Método propuesto	Espectrométricas
A	99,6 ± 0,1	87,8 ± 0,01	91,2 ± 2,0
B	111,11 ± 1,0	109,2 ± 0,2	98,0 ± 1,0
C	100,2 ± 0,2	91,9 ± 0,1	87,1 ± 0,1
D	100,2 ± 0,2	95,4 ± 0,1	85,7 ± 0,6
E	85,3 ± 0,3	98,7 ± 0,1	83,0 ± 1,0
F	96,2 ± 0,2	112,1 ± 0,1	115,0 ± 1,0
G	85,8 ± 0,2	62,1 ± 0,1	67,0 ± 1,0

fluidos biológicos como el suero sanguíneo humano y al compararlo con métodos similares, el método propuesto presenta mayor velocidad de análisis, por ejemplo Takeshi Yamane y Eiichi Goto (16) reportaron el análisis de 15 muestras por hora, mientras que el propuesto procesa más del doble de muestras en el mismo tiempo de análisis.

Conclusiones

Se logró desarrollar un método FIA para la medición de Ca²⁺ en muestras de suero sanguíneo humano, el cual resultó ser robusto. El mismo representa una alternativa para el análisis de muestras sanguíneas en laboratorios clínicos, ya que es rápido, simple y de bajo costo, en comparación con

los basados en técnicas atómicas de baja y/o de alta energía.

Agradecimientos

Al Vicerrectorado Académico y Administrativo de La Universidad del Zulia. Proyecto No. 2009000672 y 2005000428 LUZ-FONACIT (Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Referencias bibliográficas

1. FERNÁNDEZ D., VÁSQUEZ A. del C., HERNÁNDEZ M., OCANDO A. M., MANZANILLA J.G., SOTO M., ÁLVAREZ-NAVA F., GRANADILLO M.V.A. *Atom Spectrosc* 26(3):117-123. 2005.

2. LIM H.B., HAN M.S., LEE K.J. **Anal Chim Acta** 320: 185-189. 1996.
3. GONZÁLEZ ROMARIS E.M., CERVANTES I.I., GONZÁLEZ LÓPEZ J.M., ESCANERO MARCÉN J.F. **J of Trace Elem in Med and Biol** 25S: S45-S49. 2011.
4. SKOOG D., WEST D., HOLLER J., CROUCH S. **Fundamentos de Química Analítica** Editorial THOMSON. Mexico. DF. 458-465. 2005.
5. YOUXIAN Y. **Analytica Chimica Acta**. 212: 291-295. 1988.
6. HAJ-HUSSEIN A.T., CHRISTIAN G. D. **Microchem J** 34: 67-75. 1986.
7. NOGUEIRA A.R., BRIENZA S.M., ZAGATTO E.A., LIMA J.L.F.C., ARAÚJO A.N. **Food Chem** 44:165-169. 1996.
8. FORTE G., ALIMONTI A., VIOLANTE N., DI GREGORIO M., SENOFONTE O., PETRUCCI F., SANCESARIO G., BOCCA B. **J Trace Elem Med Biol**. 19: 195-201. 2005.
9. BLOOMFIELD, M. **Química de los organismos vivos** 1^{era} Edición, Editorial Limusa. México. 499-514. 1993.
10. Laboratorio Heiga C.A. **Diagnóstico Gamma. Determinación cuantitativa in vitro del CALCIO ARSENAZO III**. REF. 1110-L. 2010.
11. American Society for Testing and Materials: **Standards Specification for Water** Philadelphia (USA), ASTM D.1193. 1977.
12. MONTGOMERY D. **Diseño y análisis de experimentos** 2^{da} Edición, Editorial LIMUSA WILEY. México. 180-200. 2007.
13. DUFFUS J.H. **Pure Appl Chem** 74(5): 793-807. 2002.
14. DAY R.A., UNDERWOOD A.L. **Química Analítica Cuantitativa** 5^{ta} Edición. Editorial, Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Naucalpan de Juárez, México. 241. 1989.
15. BURRIEL M.F., LUCENA C.F., ARRIBAS J.S., HERNÁNDEZ MÉNDEZ J. **Química Analítica Cualitativa**. 18^{va} Edición. Editorial, Paraninfo-Thomson Learning. Madrid, España. 244, 481-491. 2001.
16. YAMANE T., GOTO, E. **Talanta** 38(2): 139-143. 1991.
17. CÁMARA C., FERNÁNDEZ P., MARTIN ESTEBAN A., PÉREZ-CONDE C., VIDAL M. **Toma y Tratamiento de Muestras**. Editorial Síntesis, Madrid, España. 38-90. 2004.
18. **Rev costarric cienc méd** [online]. <http://www.scielo.sa.cr/scielo>. Fecha de consulta: 10/09/2101.
19. MILLER J.N., MILLER J.C. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. 45-59. 2004.