



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN
DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Ingenieras en Biotecnología**

AUTORAS: PASQUEL GORDÓN ANA ELIZABETH

CHANGOLUISA CORONEL CRISTINA ELIZABETH

TUTOR: IBARRA MARTÍNEZ MARCO VINICIO

Quito-Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Ana Elizabeth Pasquel Gordón con documento de identificación N°. 1717856171 y Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel con documento de identificación N°. 1725791303; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 07 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ana Elizabeth Pasquel Gordón

CI: 1717856171



Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel

CI: 1725791303

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotras, Ana Elizabeth Pasquel Gordón con documento de identificación N°. 1717856171 y Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel con documento de identificación N°. 1725791303, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Comparación entre las técnicas HPLC y ELISA para la detección de vitamina D en suero sanguíneo”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 07 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ana Elizabeth Pasquel Gordón

CI: 1717856171



Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel

CI: 1725791303

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Marco Vinicio Ibarra Martínez con documento de identificación N° 1720878329 docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO**, realizado por Ana Elizabeth Pasquel Gordón con documento de identificación N° 1717856171 y por Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel con documento de identificación N° 1725791303, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 07 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Marco Vinicio Ibarra Martínez MSc

CI: 1720878329

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen del Carmen, en señal de gratitud y humildad, dedico esta tesis a ustedes fuente de fe y esperanza en mi vida, su guía y protección han sido mi refugio en cada momento de este camino académico.

A mis queridos padres, por todo su amor, paciencia y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida académica y personal, sus sacrificios y esfuerzos para proporcionarme una buena educación han sido invaluable y hoy con inmensa gratitud en mi corazón quiero dedicarles este logro a ustedes, gracias por haberme inculcado valores fundamentales como el esfuerzo y la perseverancia, su ejemplo y consejos me han enseñado a nunca rendirme y siempre dar lo mejor de mí misma en cada proyecto que emprendo.

A mis hermanos, por sus consejos, el apoyo y las alegrías que me han motivado e impulsado a seguir adelante hasta alcanzar mis metas, gracias por ser mis cómplices, mis confidentes y mis mejores amigos, este logro también es para ustedes ya que son una parte esencial de mi vida.

A mi sobrino, tu alegría ha sido un recordatorio constante de la belleza de la vida, me has impulsado a seguir esforzándome para construir un mejor futuro para todos nosotros, ver como creces y aprendes de la vida me ha recordado la importancia de nunca dejar de aprender y mejorar.

A mi fiel compañero, tu lealtad inquebrantable y amor desinteresado han sido mi refugio en los días más difíciles, tu presencia ha sido una fuente inagotable de tranquilidad en mi vida, gracias por enseñarme el verdadero significado de lealtad y compasión.

A mi compañera de tesis y una de mis mejores amigas que la universidad me brindó, este logro es resultado de nuestra colaboración y crecimiento en conjunto, espero que esta dedicación sea un recordatorio de lo agradecida que estoy por tenerte en mi vida y por todo lo que hemos compartido juntas, gracias por ser tan comprensiva, por tu apoyo, los consejos, las risas, las anécdotas compartidas y la conexión especial que hemos forjado.

A mis familiares y demás personas importantes en mi vida.

Con cariño y gratitud sincera,

Ana Elizabeth Pasquel

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a Dios, quien ha sido mi guía y apoyo inquebrantable durante todo este camino. Gracias Dios por darme la capacidad de aprender y crecer a lo largo de esta travesía académica. Tu guía constante me ha dado la confianza para superar obstáculos y alcanzar metas que hace 5 años parecían inalcanzables.

Con profundo amor y gratitud, dedico este logro a ustedes, mis queridos padres Sandra y Pablo. Su inquebrantable dedicación y apoyo han sido la fuerza que me ha impulsado detrás de cada paso que he dado en este camino, siempre me han alentado a seguir mis sueños y a nunca dejar de esforzarme para alcanzar mis metas. Su confianza en mí ha sido mi mayor motivación en los momentos de duda y desafío. Gracias por sacrificar su tiempo y energía para poder brindarme una educación de calidad. Se han convertido en mi ejemplo vivo de fortaleza, perseverancia, amor desinteresado y en cada logro futuro, llevaré conmigo la profunda gratitud que siento hacia ustedes.

A mis hermanos, Emily y Pablo, con quienes hemos compartido risas, aventuras y desafíos. Gracias por ser mi apoyo incondicional en cada paso de esta etapa académica, sus palabras de aliento y su confianza han sido fuente de fortaleza en aquellos momentos en los que más dudaba de mis propias habilidades. Gracias porque sé que través de los altibajos de la vida, siempre puedo contar con ustedes para estar a mi lado, listos para brindar consuelo y ánimo cuando más lo necesito.

A mi querida familia, que con su presencia, amor y apoyo han sido el pilar que me ha sostenido a lo largo de mi trayecto académico. Desde que comencé este camino, cada uno de ustedes han sido mi mayor fuente de aliento. Su respaldo incondicional ha sido el motor que me ha impulsado a seguir adelante dándome las fuerzas necesarias para perseverar y alcanzar mis metas. Su paciencia y comprensión han sido fundamentales para que pueda dedicarme a mis estudios con tranquilidad porque sé que siempre podré contar con el amor y apoyo de cada uno de ustedes.

Por último, dedico este trabajo a mi querida amiga Ana, con quien inicié este desafiante viaje académico y que nunca imaginé cuánto significaría tu amistad durante todo este recorrido. Al llegar al final de esta etapa, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por todo tu apoyo y cariño incondicional, ya que cada paso de este camino ha sido más llevadero gracias a tu presencia en mi vida. Los momentos compartidos contigo durante esta etapa académica serán recuerdos que atesoraré para siempre. Cada risa, cada consejo y cada palabra de aliento han sido pilares para el alma que han hecho que este proceso sea más significativo. Quiero agradecer tu amistad la cual ha dejado una huella imborrable dentro de mi corazón. Gracias por ser esa amiga excepcional que siempre estaré agradecida de tener en mi vida.

Cristina Elizabeth Changoluisa

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana, todos los docentes que forman parte de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y ayudantes del Laboratorio Ciencias de la Vida, por compartir sus conocimientos e instruirnos a formarnos como buenas profesionales en esta área que tanto nos apasiona.

A nuestro tutor, MSc. Marco Ibarra, nuestro más sincero agradecimiento por su guía y apoyo durante todo el proceso de esta tesis, su experiencia, paciencia, compromiso y dedicación ha sido fundamental para nuestro crecimiento académico. Gracias por ser un tutor excepcional y brindarnos la confianza y motivación necesaria para superar obstáculos en esta travesía, su orientación ha sido clave para alcanzar los resultados esperados.

Al Laboratorio Clínico e Inmunológico INMUNOLAB a cargo del Doc. Galo Leoro y a todos los profesionales que ejercen en dicho establecimiento, por brindarnos esta gran oportunidad ha sido un honor y privilegio para nosotras realizar esta investigación en un entorno profesional excepcional. Agradecemos la constante orientación, el apoyo brindado ante cualquier duda y los recursos facilitados para el desarrollo exitoso de nuestra tesis.

A todos nuestros amigos y amigas, en especial a Paula, Lisbeth y Thomas, por su amistad, confianza y apoyo incondicional durante todo este proceso y etapa universitaria. Ha sido un viaje emocionante y ustedes han sido parte esencial en cada paso, hemos compartido horas de estudio, proyectos estresantes y hemos superado juntos los desafíos académicos, han contribuido a nuestro crecimiento personal y profesional. Gracias por ser una familia lejos de casa, por las risas contagiosas, los consejos sinceros y por los momentos compartidos que quedarán grabados en nuestros corazones para siempre.

Resumen

El presente estudio tiene como propósito, comparar la detección de Vitamina D en suero sanguíneo humano entre cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Para esto se aisló suero sanguíneo de cuatro voluntarios, luego se cuantificaron los índices de Vitamina D utilizando HPLC para identificar los metabolitos 25-(OH) D₂ y 25(OH) D₃ y un kit comercial para cuantificar los metabolitos medibles de Vitamina D mediante ELISA. El trabajo se estructuró en base a los objetivos planteados, incluyendo; la purificación del suero sanguíneo, el desarrollo de un suero de control denominado “suero zero” para utilizarlo en el análisis por HPLC, la medición de Vitamina D mediante los dos métodos mencionados: ensayo ELISA utilizando el kit comercial Accu Bind ELISA Microwells, y HPLC junto con un análisis de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud con el fin de otorgar fiabilidad a los resultados.

Se realizaron seis repeticiones para cada muestra, los resultados promedio obtenidos por HPLC para 25(OH) D₃ fueron 31,22 ng/mL, 32,92 ng/mL y 31,52 ng/mL correspondientes para las muestras M1, M2 y M4 valores considerados como óptimos, mientras que para M3 se obtuvo un valor de 22,9 ng/mL catalogándose como carencia de Vitamina D. Por otro lado, los resultados promedio del ensayo ELISA fueron de 30,67 ng/mL, 32,67 ng/mL y 29,83 ng/mL para M1, M2 y M4, a diferencia de M3 la cual se obtuvo una concentración de 19,50 ng/mL coincidiendo con los parámetros relacionados en HPLC. Por último, se realizó una prueba U de Mann-Whitney para determinar si los resultados de alguna técnica tuvieron diferencias entre sí, dando como resultado que la técnica de HPLC tiene resultados diferentes frente al ensayo ELISA en la determinación de Vitamina D en suero humano.

Palabras clave: Vitamina D, muestras sanguíneas, cromatografía líquida, ensayo de inmunoadsorción.

Abstract

The present study aims to compare the detection of Vitamin D in human serum using high-performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). For this purpose, serum was isolated from four volunteers, and the levels of Vitamin D were quantified using HPLC to identify the metabolites 25-(OH) D₂ and 25(OH) D₃, and a commercial kit was used to quantify the measurable metabolites of Vitamin D through ELISA. The work was structured based on the stated objectives, including the purification of the serum, the development of a control serum called "zero serum" for HPLC analysis, and the measurement of Vitamin D using the two mentioned methods: ELISA assay using the commercial kit Accu Bind ELISA Microwells, and HPLC along with an analysis of linearity, detection limit, quantification limit, precision, and accuracy to ensure reliable results.

Six repetitions were performed for each sample. The average results obtained by HPLC for 25(OH) D₃ were 31.22 ng/mL, 32.92 ng/mL, and 31.52 ng/mL for samples M1, M2, and M4, respectively, which were considered optimal. However, sample M3 showed a value of 22.9 ng/mL, indicating a deficiency of Vitamin D. On the other hand, the average results from the ELISA assay were 30.67 ng/mL, 32.67 ng/mL, and 29.83 ng/mL for M1, M2, and M4, respectively, while sample M3 had a concentration of 19.50 ng/mL, coinciding with the parameters related to HPLC. Finally, a Mann-Whitney U test was performed to determine if there were differences between the results of the two techniques. The results showed that HPLC had different outcomes compared to the ELISA assay in determining Vitamin D levels in human serum.

Keywords: Vitamin D, blood samples, liquid chromatography, immunoassay.

Índice de contenidos

1. Introducción.....	1
2. Fundamentación teórica.....	3
2.1 Vitamina D.....	3
2.1.1 Vitamina D ₂	3
2.1.2 Vitamina D ₃	4
2.2 Biosíntesis de los compuestos con actividad vitamínica D.....	5
2.2.1 Fase epidérmica.....	5
2.2.2 Fase hepática.....	7
2.2.3 Fase de activación.....	7
2.3 Funciones de la Vitamina D.....	8
2.3.1 Necesidades e ingestas recomendadas.....	9
2.4 Presencia de Vitamina D en la sangre.....	10
2.5 Deficiencia de Vitamina D.....	11
2.5.1 Enfermedades asociadas.....	12
2.5.2 Grupos potencialmente en riesgo.....	14
2.6 Toxicidad causada por presencia de Vitamina D.....	15
2.7 Técnicas de cuantificación de Vitamina D.....	15
2.7.1 Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.....	16
2.7.2 Ensayos de inmunoadsorción ELISA.....	20
3. Materiales y métodos.....	21
3.1 Obtención de muestras sanguíneas.....	21

3.2	Obtención de suero sanguíneo.....	21
3.2.1	Elaboración de suero Zero	22
3.3	Detección y cuantificación de Vitamina D por HPLC	23
3.3.1	Materiales.....	23
3.3.2	Preparación del estándar y elaboración de la curva de calibración.....	26
3.3.3	Pretratamiento de la muestra.....	27
3.3.4	Modo de operación del HPLC UV/VIS	28
3.4	Validación del método HPLC	29
3.4.1	Linealidad.....	29
3.4.2	Límite de detección (LD).....	30
3.4.3	Límite de cuantificación (LC).....	31
3.4.4	Repetibilidad y Reproducibilidad	31
3.4.5	Precisión.....	32
3.4.6	Exactitud	32
3.5	Detección y cuantificación de Vitamina D por inmunoensayo ELISA.....	33
3.5.1	Materiales.....	33
3.5.2	Elaboración de la curva de calibración con estándares de vitamina D	35
3.5.3	Pretratamiento de la muestra.....	35
3.5.4	Cuantificación de vitamina D en muestras de suero sanguíneo humano.....	36
3.6	Comparación entre la técnica de HPLC y ELISA	37
4.	Resultados y discusión.....	38
4.1	Obtención de suero Zero	38
4.2	Detección y cuantificación de Vitamina D por HPLC	40

4.2.1	Curva de calibración y validación de la linealidad	41
4.2.2	Análisis de las muestras	43
4.3	Validación del método por HPLC	46
4.3.1	Límite de detección	46
4.3.2	Límite de cuantificación.....	46
4.3.3	Repetibilidad y Reproducibilidad	47
4.3.4	Precisión.....	49
4.3.5	Exactitud	50
4.4	Cuantificación de vitamina D por ensayo de inmunoabsorbancia enzimática ELISA.....	52
4.4.1	Curva de calibración	52
4.4.2	Análisis de las muestras	53
4.5	Comparación entre la técnica de HPLC y ELISA	54
5.	Conclusiones.....	56
6.	Recomendaciones	58
7.	Bibliografía.....	59
8.	Anexos	72

Índice de figuras

Figura 1 Estructura química de la Vitamina D2	4
Figura 2 Estructura química de la Vitamina D3	4
Figura 3 Pasos fundamentales en el metabolismo de la Vitamina D	6
Figura 4 Componentes del HPLC	18
Figura 5 Cronograma de HPLC representativo para la cuantificación de Vitamina D.....	19
Figura 6 Proceso de irradiación de luz UV para obtención de suero Zero	22
Figura 7 Pretratamiento de la muestra para la cuantificación de vitamina D por HPLC.....	28
Figura 8 Suero Zero de Vitamina D.....	38
Figura 9 Resultados densidad óptica ensayo ELISA para detección de 25(OH) D total en suero Zero	39
Figura 10 Cuantificación de suero Zero en Curva de Calibración.....	39
Figura 11 Cromatogramas superpuestos de los dos estándares de Vitamina D.....	40
Figura 12 Análisis de linealidad - Curva 1 de calibración de Vitamina D3	42
Figura 13 Análisis de linealidad - Curva 2 de calibración de Vitamina D3	42
Figura 14 Análisis de linealidad - Curva 3 de calibración de Vitamina D3	43
Figura 15 Cromatograma Suero Zero	51
Figura 16 Resultado curva de calibración ensayo ELISA para la detección de 25(OH) D total	53
Figura 17 Gráficas de normalidad para HPLC y ELISA	55
Figura 18 Ejemplo curva de calibración de 25(OH)D mediante ensayo ELISA	81

Índice de tablas

Tabla 1 Recomendaciones y aporte diario de ingesta de Vitamina D	10
Tabla 2 Equipos para la detección y cuantificación de 25-(OH) D en HPLC	23
Tabla 3 Materiales utilizados para la detección y cuantificación de 25-(OH) D en HPLC	24
Tabla 4 Reactivos utilizados para la detección y cuantificación de 25-(OH) D en HPLC	26
Tabla 5. Reactivos y materiales del kit comercial Vitamina D direct Accu Bind ELISA Microwells	33
Tabla 6 Datos de las curvas de calibración para las concentraciones de Vitamina D3	41
Tabla 7 Resultado detección de Vitamina D en suero sanguíneo por HPLC	45
Tabla 8 Resultados análisis de repetibilidad y reproducibilidad.....	48
Tabla 9 Estudio R&R del sistema de medición - método ANOVA.....	49
Tabla 10 Resultados análisis de exactitud.....	52
Tabla 11 Resultado detección de Vitamina D en suero sanguíneo en ensayo ELISA.....	54

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Pendiente de la recta.....	29
Ecuación 2. Pendiente	30
Ecuación 3. Ordenada al origen	30
Ecuación 4. Coeficiente de correlación.....	30
Ecuación 5. Desviación estándar	30
Ecuación 6. Error típico	30
Ecuación 7. Límite de detección	31
Ecuación 8. Límite de cuantificación.....	31
Ecuación 9. Porcentaje de coeficiente de variación experimental	32
Ecuación 10. Porcentaje de recuperación	32

Índice de anexos

Anexo 1 Convenio específico entre Laboratorio Clínico e Inmunológico INMUNOLAB y la Universidad Politécnica Salesiana para favorecer el desarrollo de trabajos de titulación por parte de estudiantes del nivel de grado de la UPS.	72
Anexo 2 Consentimiento informado para obtención de muestras de sangre por punción venosa.....	78
Anexo 3 Protocolo para la elaboración de curva de calibración en ensayo ELISA 25(OH) D kit comercial.....	80
Anexo 4 Firma de autorizaciones.....	82
Anexo 5 Cromatogramas de la curva de calibración 2	86
Anexo 6 Cromatogramas análisis M1	92
Anexo 7 Cromatogramas análisis M2.....	98
Anexo 8 Cromatogramas análisis M3.....	104
Anexo 9 Cromatogramas análisis M4.....	110

1. Introducción

La vitamina D es una sustancia liposoluble que se refiere de forma genérica a sus dos formas existentes, el ergocalciferol (Vitamina D₂) producida en plantas, levaduras y hongos a través de la radiación UV sobre el ergosterol; y el colecalciferol (Vitamina D₃) la cual se obtiene mediante la radiación de rayos UV a partir del 7-deshidrocolesterol en humanos y animales (Collado, 2020). Las vitaminas D₂ y D₃ presentan estructura de esteroides pero se diferencian una de otra debido al doble enlace entre los carbonos 22 y 23 que presenta la vitamina D₂ (Collado, 2020; E. Rodríguez et al., 2019).

En el ser humano, la vitamina D es un micronutriente de carácter lipídico esencial para conservar los niveles normales de calcio y fosfato en la sangre (Zúñiga, 2015). Las acciones metabólicas de esta vitamina se deben a dos hidroxilaciones: la primera hidroxilación se realiza mediante la 25-hidroxilasa en el hígado (Serrano Díaz et al., 2017), dando lugar a la 25- hidroxivitamin D (OHD) la cual pasa a la sangre (Valero Zanuy & Hawkins Carranza, 2007); mientras que la segunda hidroxilación enzimática formada a nivel renal y en otros tejidos, se obtiene su forma biológicamente activa que es la 1,25-dihidroxivitamin D (Barberán et al., 2014).

Por otra parte, debe señalarse que la falta de vitamina D en los seres humanos es considerada como una epidemia mundial ya que un 88% de la población carece de concentraciones normales, siendo este un motivo suficiente para impulsar a profesionales de la salud a tomar una posición en este aspecto (Pharma, 2019). Durante los últimos años, múltiples estudios han demostrado que existe una asociación notable entre la deficiencia de vitamina D relacionada con un mayor riesgo de infecciones, enfermedades autoinmunitarias, diabetes, obesidad, enfermedades neurológicas, síndrome metabólico y enfermedades reumáticas que afectan a todo tipo de pacientes (Maldonado et al., 2017; Masvidal Aliberch et al., 2012).

Actualmente, existen diversas técnicas para el análisis de vitamina D en sangre mediante la cuantificación de 25-hidroxivitamin D, dichos ensayos incluyen la cromatografía líquida de alta resolución HPLC debido que es una metodología rápida para el análisis y separación de mezclas

cuyos progresos tecnológicos relacionados con esta técnica permiten analizar una amplia gama de analitos de manera eficiente y precisa (Bastidas, 2021). Por otra parte, se encuentran los enzimoimmunoensayos cualitativos como ELISA el cual se basa en la unión específica entre un anticuerpo y su antígeno (Vitamina D) que brinda una división tanto del analito libre como de la forma unida por medio del uso de anticuerpos monoclonales anti – 25 – OHD (Manuel & Gómez, 2021). Sin embargo, en el uso de esta técnica existe discrepancia en cuanto a resultados analizados de una misma muestra debido a la baja reproducibilidad (Masvidal Aliberch et al., 2012; M. Rumancela, 2021).

Cabe resaltar que en Ecuador, este tipo de ensayos para la cuantificación de vitamina D se realizan exclusivamente en laboratorios de alta complejidad y solamente por métodos de inmunoabsorción enzimática como ELISA debido a la facilidad en la adquisición de reactivos y equipos, sin embargo presentan costos muy elevados debido a la importación de kits comerciales, anticuerpos específicos y demás reactivos imprescindibles (L. M. Rumancela, 2021).

Todo lo mencionado anteriormente conlleva a plantear la siguiente hipótesis nula; la cuantificación para detectar vitamina D en suero sanguíneo mediante la técnica HPLC, presenta resultados diferentes frente a técnicas de ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), mientras que la hipótesis alternativa propone; la cuantificación para detectar vitamina D en suero sanguíneo mediante la técnica HPLC, tiene resultados similares frente a técnicas de ensayos de inmunoabsorción enzimática. Para lo cual se plantea aislar suero sanguíneo a partir de muestras de sangre obtenidas de personas involucradas en la investigación situados en la zona de Quito-Ecuador, luego se cuantificará los índices de vitamina D mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa para la identificación de las dos formas de metabolitos medibles, como también los índices de vitamina D mediante el ensayo de inmunoabsorción enzimática ELISA para la identificación de los metabolitos: 25- hidroxí vitamina D₂ y 25- hidroxí vitamina D₃, finalmente se realizarán pruebas estadísticas para evaluar si los resultados de las técnicas presentan diferencias o similitudes.

2. Fundamentación teórica

2.1 Vitamina D

La vitamina D, es considerada una vitamina liposoluble que se puede encontrar en el organismo en forma endógena y exógena (Serrano Díaz et al., 2017). Esta vitamina engloba de manera genérica a dos formas existentes; el ergocalciferol (vitamina D₂) y el colecalciferol (vitamina D₃) (E. Rodríguez et al., 2019). Dado que la forma activa de la vitamina D requiere una síntesis interna y desempeña una función crucial en la regulación del metabolismo fosfocálcico, varios autores como Masvidal Aliberch et al. (2012) y Saponaro et al. (2020) la han clasificado más como una hormona esteroide que como una vitamina.

2.1.1 Vitamina D₂

El ergocalciferol o vitamina D₂ posee una estructura típica de un esteroide se diferencia de la D₃ debido al doble enlace presente entre los carbonos 22 y 23 como se observa en la Figura 1, es obtenida por medio de la dieta, su absorción es favorecida por la presencia de grasas en alimentos como: pescados grasos frescos y conservados, huevos, crustáceos, moluscos así como también los lácteos y derivados (Gallardo, 2020). No obstante, se puede sintetizar por la exposición del ergosterol de las plantas a la radiación ultravioleta B (UVB), en este sentido algunas plantas como la alfalfa (Ayuso, 2020) y los hongos son fuentes de vitamina D₂ suponiendo un 55% y un 99% de la ingesta oral (Masvidal Aliberch et al., 2012; E. Rodríguez et al., 2019)

Vitamina D₂ – Ergocalciferol

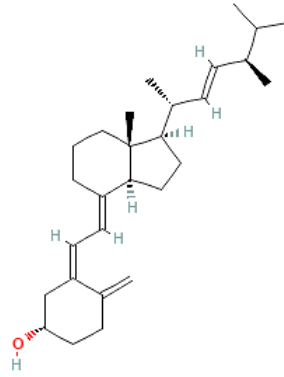


Figura 1 Estructura química de la Vitamina D₂

Fuente: (National Center for Biotechnology Information, 2023b)

2.1.2 Vitamina D₃

Colecalciferol o vitamina D₃, presenta una estructura similar a la vitamina D₂ como muestra la Figura 2 (National Center for Biotechnology Information, 2023a). La vitamina D₃ tiene una forma de producción endógena, es la principal fuente de vitamina D en los seres humanos y se sintetiza en la piel por acción de la radiación ultravioleta B (UVB), que produce la fotólisis del 7-dehidrocolesterol, convirtiéndolo en vitamina D₃, aunque también puede haber una aportación externa de colesterciferol a través de algunos alimentos como el aguacate, atún, la sardina (Gallardo, 2020; Masvidal Aliberch et al., 2012; Wagner & Greer, 2008).

Vitamina D₃ – Colecalciferol

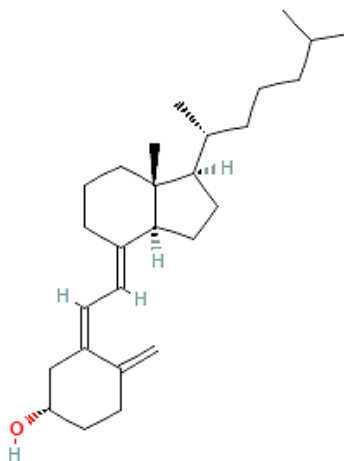


Figura 2 Estructura química de la Vitamina D₃

Fuente: (National Center for Biotechnology Information, 2023a)

2.2 Biosíntesis de los compuestos con actividad vitamínica D

La vitamina D, ejerce un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis ósea y del calcio, muestra un complejo metabolismo de varios pasos y principalmente actúa como una hormona en muchos objetivos extraesqueléticos (Saponaro et al., 2020). Como se mencionó anteriormente esta vitamina existe en dos formas: la vitamina D₃ que se obtiene fundamentalmente de animales (colecalfiferol) y se origina en la piel; y la vitamina D₂ (ergocalciferol) producida por las plantas, sin embargo estas formas son precursores biológicamente inactivos que deben ser convertidos a formas biológicamente activas ocurriendo principalmente este proceso en la piel, hígado y riñones (Higdon et al., 2021).

Algunos autores como Higdon et al. (2021); Serrano Díaz et al. (2017); Valero Zanuy & Hawkins Carranza. (2007) clasifican al metabolismo de la Vitamina D en tres fases: fase epidérmica, fase hepática y fase de activación.

2.2.1 Fase epidérmica

El mayor aporte de vitamina D proviene de la exposición solar, en la piel la vitamina D₃ se origina a partir del 7-dehidrocolesterol (7DHC) como se puede observar en la Figura 3, actúa como un intermediario en la síntesis del colesterol (Serrano-Moreno, 2019). Cuando la piel se expone a la luz ultravioleta (UVB) en un rango específico de 290 a 315nm, se produce un reordenamiento electrocíclico en el anillo ubicado en la posición C9-C10. Este proceso conduce a la formación de una molécula conocida como previtamina D₃ (PreD₃) que posteriormente experimenta una isomerización térmica en la que un átomo de hidrógeno en la posición C19 se desplaza hacia la posición C9, lo que resulta en la formación de la vitamina D₃ (Tian & Holick, 1995).

Pasos fundamentales en el metabolismo de la Vitamina D

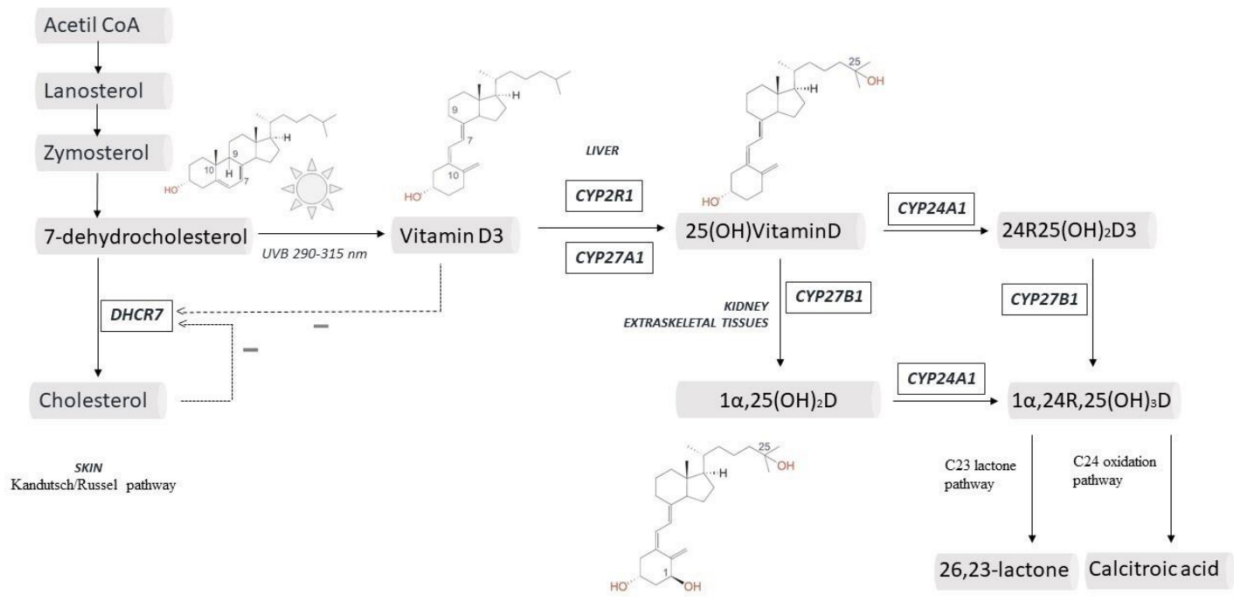


Figura 3 Pasos fundamentales en el metabolismo de la Vitamina D

Fuente: (Saponaro et al., 2020).

Esta reacción es de tipo reversible y pueden coexistir la PreD₃ y la vitamina D₃, se cree que la producción de vitamina D₃ depende directamente de los rayos UVB y este proceso se ha desarrollado probablemente como un mecanismo para eliminar y protegernos contra la radiación. En realidad, la síntesis de vitamina D₃ dependerá de la concentración de 7DHC que esta a su vez dependerá de la 7-deshidrocolesterol reductasa (DHCR7) enzima que cataliza la reducción reversible de 7DHC en colesterol (Saponaro et al., 2020)

Por otra parte, la regulación bioquímica de DHCR7 es un hecho necesario en la producción de vitamina D, ya que la baja actividad de esta enzima es lo que conduce a redirigir la vía de la síntesis del colesterol a la vitamina D, además que a nivel postraduccional la fosforilación de enzimas es de carácter importante ya que se mostró que al inhibir la proteína quinasa se redujo significativamente la actividad de DCR7, mejorando de esta forma la síntesis de vitamina D y reduciendo la producción de colesterol (Prabhu et al., 2017).

Así mismo, se ha investigado que los queratinocitos de la epidermis y los folículos pilosos expresan las enzimas hidrolasas requeridas para la producción de la hormona activa 1,25 dihidroxi-vitamina D [1,25 (OH)₂ D] y han demostrado que el receptor de vitamina D (VDR) está presente en los

queratinocitos y que la vitamina D controla tanto la proliferación y diferenciación como la actividad de barrera y una posible respuesta inmunitaria (Khammissa et al., 2018).

2.2.2 Fase hepática

Está bien fundamentado que la vitamina D requiere de dos pasos de hidroxilación posteriores para convertirse en su forma activa 1,25-(OH)₂ D también denominada calcitriol (Saponaro et al., 2020). En el hígado, se produce el primer paso de la activación metabólica, mediante la combinación de vitamina D proveniente de diversas fuentes: la dieta, aportada por alimentos de origen animal (colecalfiferol) y vegetal (ergocalciferol), así como la vitamina obtenida a través del 7-dehidrocolesterol sintetizado en la piel gracias a la radiación del sol, la cuál es transportada hasta el hígado con ayuda de una proteína de unión a la vitamina D denominada DBP (Valero Zanuy & Hawkins Carranza, 2007).

Durante esta primera etapa, la vitamina D es hidroxilada por una enzima llamada 25-hidroxilasa (CYP2R1), que agrega un grupo hidroxilo (-OH) en la posición C25 de la vitamina D, convirtiéndolo en su forma circulante predominante conocida como 25-(OH) D o calcidiol; el cual pasa a la circulación sanguínea unido a la DBP, su vida media es de 2 a 3 semanas o puede resguardarse por meses como reserva en tejido adiposo o en el mismo hígado (Cheng et al., 2003; Serrano-Moreno, 2019)

2.2.3 Fase de activación

Una vez que la 25-(OH) D (calcidiol) está presente en la circulación sanguínea, se da inicio al segundo paso del proceso de activación. En este proceso, la molécula de 25(OH)D es transportada desde la sangre a los riñones donde experimentará una última hidroxilación en el carbono 1 del anillo alfa. Para llevar a cabo esta hidroxilación, intervienen enzimas mitocondriales llamadas 1 α -hidroxilasas, siendo la CYP27B1 la única 1 α -hidroxilasa conocida en el ser humano (Bikle et al., 2018). La acción de CYP27B1 produce como resultado el 1,25 dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH)₂ D₃), también conocido como calcitriol, que representa a la forma activa de la vitamina D y que a su vez se encuentra en mayor cantidad en la sangre (Serrano-Moreno, 2019; Valero Zanuy & Hawkins Carranza, 2007).

Por otra parte, después de que ocurre la 25-hidroxiación la molécula de 25-(OH) D₃ junto con la 1,25(OH)₂ D₃ puede conllevar a una 24-hidroxiación adicional que de igual forma sucede en el riñón mediante la acción enzimática 24-hidroxiolasa (CYP24A1) para dar lugar a la 24-25(OH)₂ D₃ y 1,24-25(OH)₃ D₃, respectivamente (Saponaro et al., 2020). Así mismo, se propuso que este proceso de 24-hidroxiación adicional de la cadena lateral podría ocurrir solo después de la 25-hidroxiación (Rossi et al., 2005) y a pesar de que sea el caso del metabolismo de la vitamina D₃, no parece ser un requisito para la vitamina D₂ ya que la 24-hidroxiación para esta vitamina puede ocurrir en el hígado (Houghton & Vieth, 2006).

En consecuencia, la 1,24(OH)₂D₂, formada en el riñón a partir de la 24(OH)D₂, tiene menos afinidad por el receptor de vitamina D (VDR) que la 1,25(OH)₂D₃ y la 1,24(OH)₂D₃, es importante resaltar que esta unión a VDR representa un evento molecular importante para la acción biológica de los metabolitos de la vitamina D. En conjunto, las explicaciones más plausibles para la mayor bioeficacia de la vitamina D₃ posiblemente se deban a las mayores afinidades de la vitamina D₃ y sus metabolitos que la vitamina D₂ por la 25-hidroxiolasa hepática, DBP y VDR y porque la vitamina D₃ no se metaboliza directamente a 24(OH)D como lo es la vitamina D₂, sin embargo, cabe recalcar que ambas formas de la vitamina aumentan su concentración en la sangre aunque es la vitamina D₃ la que se encuentra en mayor proporción (Houghton & Vieth, 2006).

2.3 Funciones de la Vitamina D

La vitamina D₃, que es la forma activa de la vitamina D, se encuentra en la circulación sanguínea unida a proteínas transportadoras DBP y a medida que circula por el torrente sanguíneo, llega a varios tejidos donde desencadena una variedad de efectos a través de diferentes mecanismos de acción, destacando entre los principales; aquellos que afectan a la regulación del metabolismo del calcio y el fosfato aumentando la absorción del calcio a nivel intestinal, la movilización del calcio y fosfato inorgánico del hueso, así como la reabsorción renal de los mismos (Lorenzo, 2014).

La vitamina D induce un aumento en la expresión de TRPV6 (canal transportador de calcio de la subfamilia V del receptor de potencial de transmembrana transitoria 6) en las células intestinales, lo

que potencia la absorción de calcio en el intestino. De manera similar se incrementa la expresión de TRPV5 (canal transportador de calcio de la subfamilia V del receptor de potencial de transmembrana transitoria 5) en las células epiteliales tubulares renales, lo cual aumenta la reabsorción renal de calcio (Elsevier, 2017).

La vitamina D ayuda al cuerpo a absorber el calcio, que es uno de los principales elementos que constituyen los huesos, también es muy importante para el cuerpo de muchas otras formas, dado que los músculos dependen de esta vitamina para realizar movimientos de manera adecuada, y los nervios la necesitan para transmitir señales entre el cerebro y el cuerpo, es evidente que una deficiencia de esta vitamina puede resultar en la debilidad y fragilidad de los huesos, haciéndolos delgados y frágiles (MedlinePlus, 2021).

De igual manera, se ha encontrado que la vitamina D y el calcio pueden llegar a afectar en distintas enfermedades como el cáncer, la esclerosis, la soriasis, la hipertensión arterial y la depresión (Lorenzo, 2014). Debido a todo lo mencionado anteriormente, una ingesta adecuada de vitamina D ayuda al buen funcionamiento del sistema inmune, regula el crecimiento, la diferenciación celular y brinda la capacidad de prevenir varios tipos de enfermedades que afecten tanto a niños, adultos como en mujeres embarazadas (MedlinePlus, 2021).

2.3.1 Necesidades e ingestas recomendadas

Los requerimientos nutricionales de vitamina D, aún no han podido ser definidos con exactitud, debido a su capacidad de síntesis a nivel cutáneo, su gran capacidad de almacenamiento en el tejido adiposo y en menor cantidad en el tejido muscular. De igual manera, el número de alimentos que contienen de forma natural una cantidad considerable de vitamina D es muy limitado (como por ejemplo en caso del aguacate con 4,5 μg / 100 g de vitamina), conllevando a que el aporte diario recomendado de vitamina D sea actualmente objeto de polémica (Grant, 2012).

Varias agencias internacionales, como el Instituto de Medicina (IOM), la Sociedad Alemana de Nutrición y la European Food Autoridad de Seguridad (EFSA), recomiendan 15 $\mu\text{g}/\text{día}$ para la población entre 1 y 70 años y 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ para la población de 71 o más años, y con un nivel máximo

de ingesta diaria de 100 µg para poder mantener los niveles de 25 (OH) vitamina D superiores a 20 ng/mL, valor que se considera necesario para poder mantener la salud en general de la población (Bacha et al., 2021; Jódar Gimeno, 2014a).

A continuación, en la Tabla 1, se muestran las recomendaciones de aporte diario de vitamina D, este tipo de recomendaciones se dan provisionalmente en términos de ingestas adecuadas para que de este modo se pueda mantener una buena salud ósea y un metabolismo normal del calcio.

Tabla 1 Recomendaciones y aporte diario de ingesta de Vitamina D

Grupo de Edad	Necesidades estimadas (µg /día)	Recomendaciones dietéticas (µg /día)	Niveles máximos tolerados (µg/día)
0 a 6 meses	*	*	25
6 a 12 meses	*	*	37,5
1 a 3 años	10	15	62,6
4 a 8 años	10	15	75
9 a 18 años	10	15	100
>19 años	10	15	100
Mujeres y adolescentes embarazadas y en período de lactancia	10	15	100

Fuente: (Jódar Gimeno, 2014b; NIH, 2022).

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Nota: µg/día (Microgramos por día).

2.4 Presencia de Vitamina D en la sangre

Debido a que nuestras fuentes de vitamina D son los alimentos, el sol y otro tipo de suplementos dietéticos necesitamos saber si estamos recibiendo la cantidad necesaria de la misma. En la sangre, una forma de vitamina D denominada 25-hidroxivitamina D se mide en nanomoles por litro (nmol/L) o en nanogramos por mililitro (ng/mL) (NIH, 2022).

A continuación, se detallan los valores considerados normales de la vitamina D en sangre:

- Los niveles menores a 5 ng/mL considerados como una deficiencia muy grave podrían llegar a debilitar los huesos y causar un daño general de la salud (Monobind Inc., 2018; NIH, 2022).
- Los niveles de 5 a 10 ng/mL considerados como deficiencia severa (Monobind Inc., 2018; NIH, 2022).
- Los niveles de 10 a 20 ng/mL considerados como deficientes (Monobind Inc., 2018; NIH, 2022).
- Los niveles de 30 a 50 ng/mL considerados como suministro óptimo para la salud (Monobind Inc., 2018; NIH, 2022).
- Los niveles de 50 a 150 ng/mL superior elevado pero no tóxico (Monobind Inc., 2018; NIH, 2022).
- Los niveles superiores a 150 ng/mL son muy altos con lo cual la persona puede llegar a presentar problemas de toxicidad en su salud (Monobind Inc., 2018; NIH, 2022).

2.5 Deficiencia de Vitamina D

Existen múltiples opiniones sobre el déficit de vitamina D, basadas en diferentes principios acerca de la cantidad necesaria de su forma activa, si bien se aprueba que la concentración de 25-(OH) D en suero/plasma debe evaluarse para medir el estado de la vitamina D porque refleja tanto su aporte en dieta como en la síntesis dérmica (Seamans & Cashman, 2009). Aún existe un debate considerable sobre los puntos de medición sugeridos para definir un nivel bajo de la misma (Cashman, 2020). Aunque en un principio se discutían valores entre rangos de 10 a 30 ng/mL, se han ido modificado hasta abarcar que valores menores a 10 o 19 ng/mL son los más indicativos para un mayor riesgo de enfermedad (Cashman et al., 2017; Garza Garza Mario Alberto et al., 2020). Así mismo, se cree que parte de esta variabilidad en su concentración se relaciona con las diferencias en la gravedad de ciertas enfermedades, a pesar de que en casi todos o la mayoría de casos estos rangos afectan principalmente en trastornos musculoesquelético como por ejemplo el raquitismo nutricional, osteomalacia, osteoporosis, enfermedades renales crónicas, insuficiencia hepática, síndromes de malabsorción, hiperparatiroidismo, algunos linfomas, enfermedades cutáneas, algunos pacientes que usan

medicamentos específicos, así como otros grupos potencialmente en riesgo entre ellos, obesos, mujeres en embarazo y lactancia (Bresson et al., 2016; Cashman, 2020; Munns et al., 2016).

2.5.1 Enfermedades asociadas

La falta de vitamina D puede causar múltiples enfermedades debido que a esta hormona se le atribuye diversas funciones muy importantes que van más allá de la homeostasis cálcica, por esta razón, el aumento en el interés por la vitamina D se encuentra estrechamente relacionado con el descubrimiento de sus receptores y de la expresión de la enzima 1α -hidroxilasa en diferentes tejidos del organismo, ayudando en numerosos procesos fisiológicos como la actividad antitumoral, reparación del ácido desoxirribonucleico, control de la apoptosis, estrés oxidativo, inmunomodulación y algunas otras funciones que se encuentran por establecer aún, por lo que se ha concluido que los niveles bajos de esta vitamina se encuentran en relación con algunas enfermedades crónicas, autoinmunes y oncológicas (Bioti et al., 2020).

Dentro de los problemas que puede causar la deficiencia de la vitamina D, se encuentran en lista a las siguientes enfermedades:

- **Osteoporosis**

Es la enfermedad del metabolismo óseo más frecuente, la cual se caracteriza por una disminución de la densidad mineral ósea dando como resultado la fragilidad del esqueleto, aumentando la posibilidad de riesgo de fracturas relacionándose estrechamente con el envejecimiento, enfermedad en la cual la hormona de la vitamina D (1,25 dihidroxicolecalciferol, o calcitriol) facilita la absorción intestinal de calcio mediante la regulación de proteínas de transporte de calcio y la consecuente promoción del transporte de calcio transcelular a nivel del intestino, debido a esto, la deficiencia de esta vitamina promueve la pérdida ósea fisiológica y acelera el proceso fisiopatológico de la osteoporosis (Sosa Henríquez et al., 2021).

- **Enfermedades cutáneas**

El papel de la vitamina D en enfermedades cutáneas como; el lupus eritematoso, la ictiosis, el acné, el melanoma, el cáncer cutáneo, entre otras (Navarro-Triviño et al., 2019). Debido, que aún

existe información contradictoria sobre el efecto de esta vitamina en el desarrollo de enfermedades alérgicas de la piel; sin embargo, en la mayoría de estudios evalúan el impacto de la vitamina D y su relación con la dermatitis atópica llegando a la conclusión que cada vez existe mayor evidencia que demuestra que la vitamina D desempeña un papel importante en el sistema inmunitario ya que mejora los efectos microbianos de los macrófagos y monocitos (Benson et al., 2012).

- **Enfermedad renal crónica**

Los riñones son uno de los principales reguladores del sistema endocrino de vitamina D y desempeñan un papel clave en la regulación de los niveles sistémicos activos, motivo por el cual se asocia que la deficiencia de esta es común en pacientes con enfermedad renal crónica, debido que los defectos en la vía de la hormona vitamina D pueden alterar su capacidad de ser activada, además se han observado que niveles bajos de vitamina D en condiciones como el envejecimiento prematuro podría tener implicaciones en la progresión de la enfermedad de los pacientes (Martinelli et al., 2023; Villafuerte-Ledesma et al., 2020).

- **Obesidad**

Esta enfermedad ha ido aumentando paulatinamente a nivel mundial debido a diferentes factores sociales y culturales (Pérez, 2021). En estudios de Golzarand et al. (2018); Wu et al. (2023), señalan que el nivel de vitamina D esta inversamente relacionado con el porcentaje de masa muscular indicado que el nivel de 25-(OH) D en obesos es más bajo que en sujetos de peso normal. A la obesidad se la considera como un estado proinflamatorio y la poca capacidad de almacenamiento de la vitamina D en el tejido adiposo causa una biodisponibilidad nula aumentando los niveles de calcio intracelular en los adipocitos favoreciendo a la ganancia de peso (Pérez, 2021; Wang et al., 2017).

- **Cáncer**

Múltiples funciones biológicas de la vitamina D que ayudan a la prevención del cáncer se han abordado recientemente debido a estudios clínicos y epidemiológicos que evidencian la correlación entre la disminución de la mortalidad y morbilidad de algunos tipos de cáncer y la

exposición a la luz solar (Spina et al., 2006). Se cree que una vez activada la $1, 25 (OH)_2 D_3$, esta cumple funciones antiproliferativas y prodiferenciadores en líneas celulares normales y malignas (Spina et al., 2006).

- **Enfermedad del COVID 19**

La vitamina D juega un papel importante en múltiples mecanismos como: mantener las uniones celulares estrechas y eliminar los virus envueltos mediante defensinas que ayudan a potenciar el sistema inmunológico y a reducir la gravedad de infecciones tracto respiratorias (A. Rodríguez et al., 2020). El estímulo que ejerce la vitamina D sobre la inmunidad innata celular se realiza mediante la inducción de péptidos antimicrobianos como catelicidina y beta-2-defensina, además contribuye a disminuir la denominada “tormenta de citoquinas” que ocurre en infecciones virales severas como en el caso de COVID-19 (Mansur et al., 2020).

2.5.2 Grupos potencialmente en riesgo

El contenido de vitamina D en los alimentos es muy baja por lo que la manera de aprovechar su obtención es a través de la exposición al sol (Holick, 1996). Por lo cual, la relación de la exposición a rayos UVB y el estado de la vitamina D se encuentra asociado con la geografía existiendo mayor insuficiencia en latitudes altas como países del norte aunque también en latitudes bajas donde niveles de UVB son generalmente elevados y las tasas de cáncer de piel se encuentran entre las más recurrentes, razón suficiente por la que se sugiere recomendaciones de exposición a la luz solar todos los días para una producción adecuada de vitamina D pero sin abusar de tanta como para aumentar el riesgo a contraer cáncer (Bonevski et al., 2013).

Así mismo, se pone a consideración a aquellos grupos poblacionales con mayor riesgo de deficiencia de Vitamina D incluyendo a:

- **Mujeres embarazadas**

Corren un mayor riesgo de desarrollar deficiencia de Vitamina D, debido que el feto desarrolla matriz de colágeno para la formación de su esqueleto durante el primer y segundo trimestre, y calcifica el esqueleto en el tercer trimestre, razón por la cual se debe aumentar la demanda materna

de calcio y Vitamina D durante el embarazo (Lin et al., 2023; Holick et al., 2011). También, se ha considerado que su deficiencia incrementa el riesgo de preeclampsia, cesárea, diabetes gestacional y parto prematuro (De-Regil et al., 2016; ElSORI & Hammoud, 2018; Pham et al., 2021).

- **Adultos mayores**

Con el avance de la edad, el metabolismo de la Vitamina D se va comprometiendo, dando como resultado una disminución en la absorción del calcio, una producción de $1,25\text{ (OH)}_2\text{ D}_3$ a nivel renal comprometida; esto sumado a otros factores asociados a la edad como el uso de medicamentos, una mala ingesta dietética, aumento de adiposidad y la falta de tiempo al aire libre, lo que coloca a los adultos mayores en riesgo de deficiencia de vitamina D, junto con una mayor mortalidad y gravedad a contraer infecciones virales (Feehan et al., 2022).

2.6 Toxicidad causada por presencia de Vitamina D

La administración inadecuada de la vitamina D puede llegar a producir algunos efectos adversos entre los cuales se destaca la toxicidad que es producida por dosis exageradamente altas, tanto la toxicidad aguda como crónica son muy poco frecuentes y se presentan ante una ingesta elevada de mega dosis de suplementos sobre un corto o largo periodo de tiempo respectivamente, como un medio compensatorio para la alta prevalencia de hipovitaminosis a nivel mundial (Villalta et al., 2022 ; González-Wong et al., 2021).

2.7 Técnicas de cuantificación de Vitamina D

Múltiples investigaciones contradictorias señalan la estrecha relación de la Vitamina D con la salud y varias enfermedades, esto puede deberse en parte, a la dificultad analítica que existe con respecto a las técnicas de medición de sus metabolitos activos, razón por la cual existe variación entre las técnicas analíticas y los ensayos de inmunoabsorción (Holick, 2007). Estos estudios de investigación sobre los efectos de la vitamina D en los criterios de valoración clínica de múltiples enfermedades dependen en gran medida de la evaluación precisa del estado de esta vitamina (Bioti et al., 2020).

Los ensayos más comunes que se utilizan en la actualidad para la determinación analítica de la 25- (OH) D , se basan en métodos que se han utilizado de forma rutinaria para múltiples propósitos dentro

de los cuales están incluidos; los radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA), ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), cromatografía líquida (LC) con detección UV y cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS) (Stokes et al., 2018). Aunque en la práctica clínica RIA, CLIA y ELISA siguen siendo los ensayos más aplicados debido a su fácil disponibilidad en forma de kit y que además pueden automatizarse fácilmente lo que permite medir cientos de muestras a la vez. En cambio, los métodos de cromatografía líquida se han utilizado con frecuencia en el pasado debido a su principal ventaja, que es la capacidad para separar las diferentes formas de la vitamina D, lo que permite su cuantificación individual (Stokes et al., 2018). Sin embargo, este proceso conlleva inevitablemente a la pérdida del analito, la cual puede ser corregida mediante la inclusión de un estándar interno (Serrano Díaz et al., 2017).

2.7.1 Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia conocidas por sus siglas (HPLC), en la cual la determinación de la muestra se realiza con el uso de un detector UV-VIS, es una de las técnicas más utilizadas debido a su capacidad de separar analitos de distinta naturaleza que se encuentran presentes dentro de una mezcla, por la acción de las fases móviles y estacionarias inmiscibles entre sí y la muestra de interés (Bastidas, 2021).

Esta técnica consta de dos fases (una fase estacionaria o también llamada columna y una fase móvil) por la cual se distribuirán los analitos de las mezclas en función de su afinidad. Primero, se introduce la muestra en la fase móvil y, mediante el uso de una bomba, se hace circular la mezcla de compuestos o analitos a través de una columna que contiene un sistema disolvente, esto permite que los componentes se desplacen a lo largo de la columna en función de las interacciones no covalentes que experimentan entre la fase estacionaria y la fase móvil (Melián, 2019). Aquellos compuestos más afines a la fase estacionaria se quedarán más tiempo retenidos en la columna y le supondrá más tiempo a la fase móvil desplazarlos por su fase estacionaria o columna. Por otra parte, en cuanto a los modos de separación se diferenciaron dos tipos de desarrollo, conocidos como fase normal y fase inversa (Schüep, 1997). Inicialmente, la cromatografía se desarrolló utilizando una fase estacionaria polar y

un eluyente no polar como componente principal de la fase móvil, lo que llevó a que se denominara como "fase normal" (Snyder & Joseph, 1997). No obstante, se encontraba una gran variedad de mezclas de analitos que no eran polares y presentaban propiedades hidrofóbicas que requerían una separación más precisa, por esta razón, el uso de una fase estacionaria no polar en combinación con una fase móvil polar permitió una mejor separación de los analitos hidrofóbicos y a este enfoque se denominó "fase inversa" (El Maaty et al., 2015).

Se debe mencionar también que en la actualidad se disponen de fases móviles que pueden ir variando su composición durante el análisis para ir aumentando su poder de elución, a este tipo de separaciones se le denomina en gradiente de composición de fase móvil, mientras que si en la fase móvil su composición permanece constante durante toda la separación se denomina método isocrático (Melián, 2019). Un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia consta de los siguientes componentes descritos en la

Figura 4.

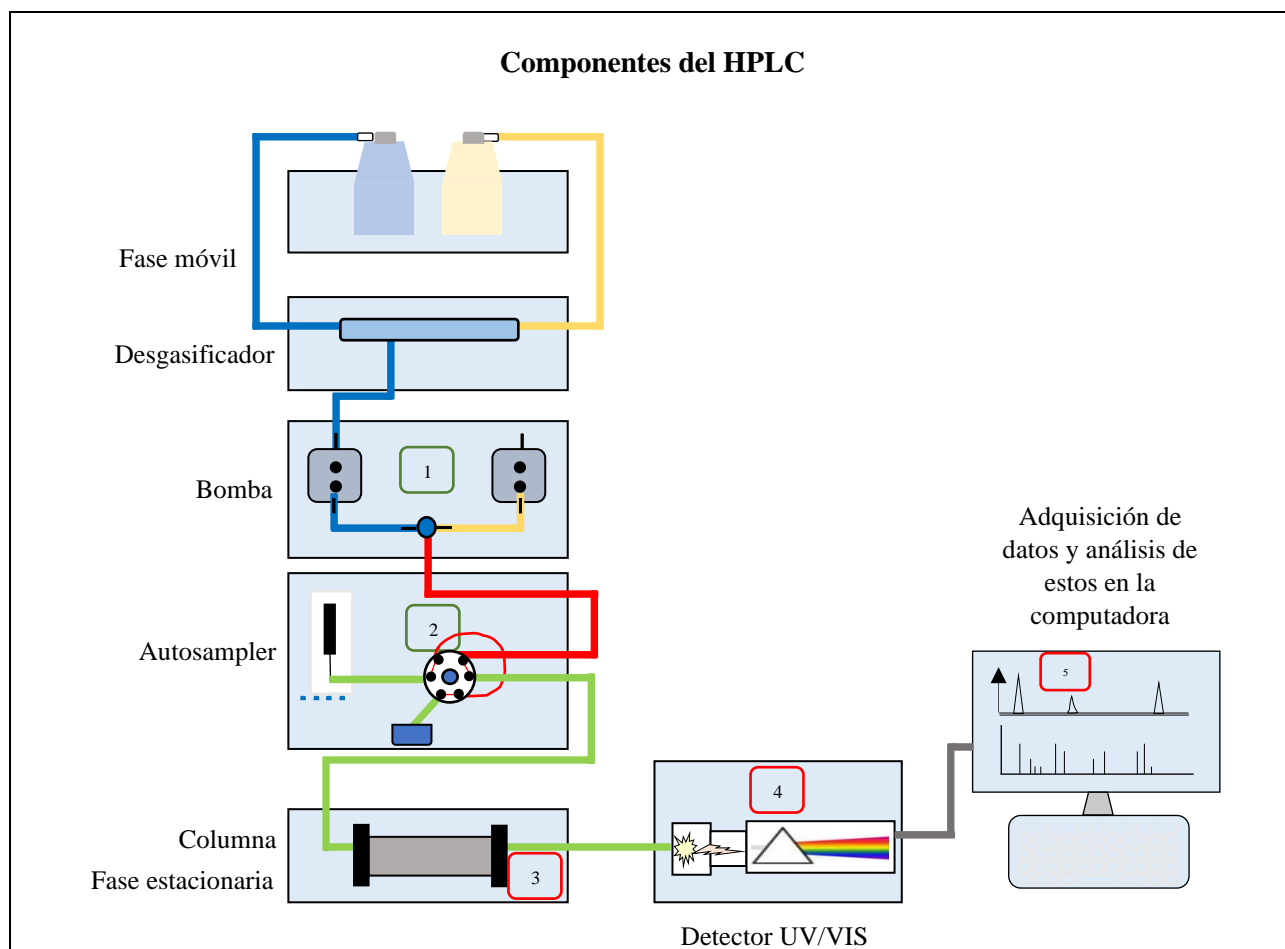


Figura 4 Componentes del HPLC

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Nota: (1) Bomba, (2) Autosampler, (3) Columna, (4) Detector UV/VIS, (5) Adquisición y análisis de datos en la computadora.

Los componentes principales con los que consta el HPLC se detallan a continuación;

Fase móvil: también denominados solventes o reservorios, consiste desde los frascos con disolventes hasta los sistemas de filtrados y el desgasificador, por lo general los nuevos equipos de HPLC constan con 4 reservorios los cuáles permiten generar una gradiente necesaria para eluir el compuesto deseado proporcionando la capacidad de separar diferentes analitos (Melián, 2019).

Bomba: sistema de bombeo o bomba cromatográfica se le denomina aquel dispositivo que es capaz de controlar la fase móvil junto con la presión necesaria para atravesar un determinado flujo a través de la fase estacionaria (Melián, 2019).

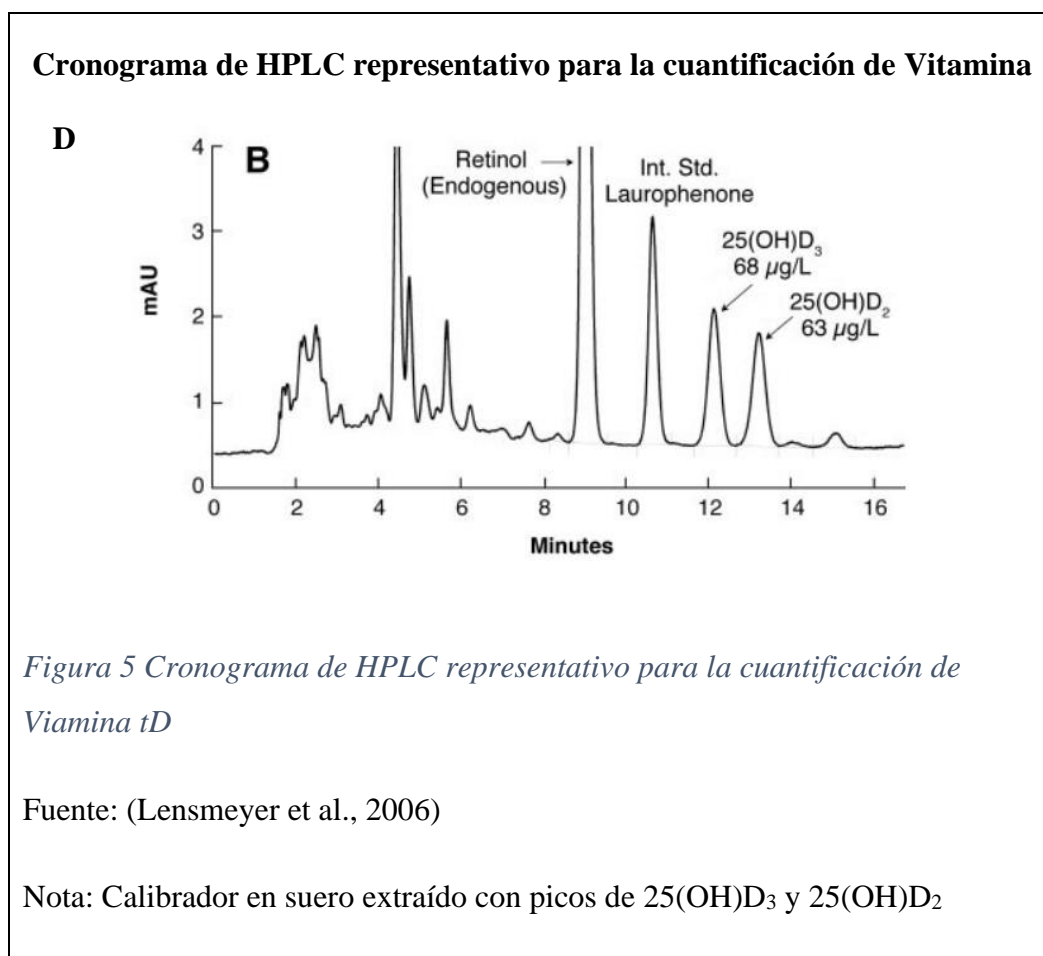
Autosampler: inyector o muestreador automático, este dispositivo garantiza una excelente precisión y linealidad al momento de la inyección de la muestra a la fase móvil (Labomesa, 2023).

Fase estacionaria o columna: es el componente más esencial del sistema y al elegirla, se deben tener en cuenta diversas variables; además de la naturaleza química, la longitud de la columna, el tamaño de las partículas, el diámetro interno, la uniformidad entre las partículas y el tamaño de los poros. (Melián, 2019).

Detector UV/VIS: la espectroscopía UV/VIS se fundamenta en la absorción de la radiación ultravioleta-visible (con longitudes de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula, por lo que los picos de absorción se pueden relacionarse con los diferentes tipos de enlace presentes en el compuesto, debido a esto, este tipo de espectroscopía se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en la molécula (LaboratoryInfo, 2020).

Adquisición de datos: para la adquisición de los resultados por lo general se utilizan softwares como el N2000 Online Chromatostation (Surwit, 1998), el cual se basa en la obtención de un diagrama denominado cromatograma que es una representación gráfica en tiempo real de picos generados a medida que los componentes separados pasan por el detector (Ko et al., 2012). Estos picos a su vez dependerán de variables como; el poder de resolución de la columna, la cantidad de muestra inyectada, temperatura, velocidad de flujo y presión, aunque no siempre sucede que el resultado a una primera inyección sea un cromatograma perfecto por lo cual se deberá realiza variaciones en las condiciones descritas hasta su optimización (Lensmeyer et al., 2006).

En este caso para la cuantificación de Vitamina D se visualizarían picos como muestra la Figura 5 y que posteriormente mediante cálculos de integración del área bajo la curva que el propio software proporciona se obtendrán datos cuantitativos para su posterior valorización (Surwit, 1998).



2.7.2 Ensayos de inmunoadsorción ELISA

Los ensayos más comunes en la actualidad para la determinación analítica de la 25-(OH) D, se basan en métodos que se han utilizado de forma rutinaria para múltiples propósitos como es el caso de Enzyme Linked ImmunoSobent Assay o más conocido por sus siglas ELISA, este inmunoensayo es cuantitativo y actualmente se distinguen cuatro variantes; directo, indirecto, competitivo y tipo sándwich (Biotech, 2019; IBL, 2018; Ramirez, 2022). Para la detección y cuantificación de la vitamina D en suero, el tipo de ensayo ideal es el ELISA competitivo o también conocido de inhibición, esta es la variante más compleja de la técnica debido que se usa generalmente para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en bajas cantidades (Biotech, 2019), los reactivos necesarios para realizar este inmunoensayo enzimático secuencial en fase sólida incluyen por lo general un anticuerpo inmovilizado, el conjugado enzima-antígeno y el antígeno nativo (Monobind Inc., 2018).

El principio de esta técnica se basa que al mezclar el anticuerpo inmovilizado y una muestra de sangre completa que contiene el antígeno nativo, se produce una reacción de unión entre el antígeno nativo para un número limitado de sitios de unión insolubilizados (Monobind Inc., 2018). Después, de eliminar cualquier antígeno nativo que no haya reaccionado mediante un paso de lavado, se introduce el antígeno conjugado con enzima, este conjugado reacciona con sitios del anticuerpo desocupados por el antígeno nativo y después de una breve segunda incubación, la fracción unida al anticuerpo se separa del antígeno no unido por decantación, esta actividad enzimática en la fracción unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo (Monobind Inc., 2018). Parte importante de este ensayo es el uso de calibradores los cuales tienen diferentes concentraciones del antígeno conocido, lo cual puede ayudar a generar una curva de respuesta a la dosis y a partir de esta se podría determinar la concentración de antígenos presentes en una muestra desconocida (Zárate, 2019).

3. Materiales y métodos

La fase experimental de esta investigación fue desarrollada en los laboratorios de la empresa INMUNOLAB ubicada en la Av. Gran Colombia junto al Teatro Capitol, empresa que se encuentra cargo del Dr. Galo Leoro Monroy.

3.1 Obtención de muestras sanguíneas

Antes de la obtención de muestras sanguíneas el/los sujeto/s involucrados en la investigación y el personal del Laboratorio Inmunolab firmaron una carta de consentimiento la misma que se detalla en el Anexo 4, en el cuál autorizaron de forma voluntaria que el uso destinado de las muestras sea con fines investigativos y que el manejo de datos obtenidos sea publicado en la presente investigación.

Para la realización de esta prueba, el/los sujeto/s debían encontrarse con al menos 8 horas de ayuno antes de la toma de la muestra (Krist et al., 2021). El procedimiento consistió en la extracción de sangre por punción venosa para el cuál se siguieron los protocolos descritos en los sitios web (EACT LAB, 2020; MedlinePlus, 2022).

Pasos para extracción de sangre por punción venosa:

- Limpiar con alcohol el sitio de punción.
- Colocar una banda elástica alrededor del antebrazo con el fin de aplicar presión en la zona.
- Introducir la aguja en la vena.
- Recolectar la sangre en un tubo de recolección sin aditivos de tapa roja de 5mL, el cual facilitó el proceso de coagulación sin impedimentos manteniendo las composiciones normales del suero.

3.2 Obtención de suero sanguíneo

Una vez obtenida la muestra de sangre como se menciona en el apartado 3.1, se procedió a separar el suero sanguíneo (analito de interés) de los demás componentes, para este proceso se realizó un protocolo propuesto por el laboratorio de investigación INMUNOLAB, primero se llevó a incubar la muestra a 37°C durante 10 minutos hasta la formación de coágulos, luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se observó que la fracción superior o sobrenadante tras la centrifugación fue de

un aspecto amarillento claro y transparente el cuál correspondía al suero sanguíneo, posterior a esto con ayuda de una micropipeta se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo estéril. Finalmente se registró el nombre del voluntario, la fecha en la que fue extraído el suero y se pone a consideración que el suero almacenado en refrigeración dura un periodo de 7 días.

3.2.1 Elaboración de suero Zero

La preparación del suero Zero fue desarrollada en INUMNOLAB bajo la autoría del Doc. Galo Leoro, con el propósito de eliminar la presencia de Vitamina D natural y posteriormente añadir una concentración conocida la cual servirá como un control o punto de referencia para realizar la validación del método por HPLC. Una vez recolectado el suero sanguíneo se midió la cantidad inicial de vitamina D mediante el ensayo ELISA como se menciona en el apartado 3.5, a continuación se colocó el suero en placas Petri y se procedió a irradiar luz UV en un transiluminador con longitud de onda a 310nm durante 1 hora con la finalidad de degradar la vitamina existente en el suero como indica la Figura 6 y una vez irradiado se procedió a medir nuevamente la cantidad de vitamina D presente mediante el ensayo ELISA con kit comercial con el propósito de cuantificar la cantidad de vitamina D después del tratamiento y verificar la efectividad de su degradación.



3.3 Detección y cuantificación de Vitamina D por HPLC

Esta parte de la investigación experimental fue desarrollada mediante el uso del sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) PerkinElmer Serie 200 equipo que junto con los materiales y reactivos necesarios para la cuantificación de 25-(OH) D fueron proporcionados por el laboratorio INMUNOLAB.

3.3.1 Materiales

Los equipos utilizados para realizar la detección y cuantificación de 25-(OH) D mediante la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) se detallan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2 Equipos para la detección y cuantificación de 25-(OH) D en HPLC

Equipo	Marca	Característica
HPLC	PerkinElmer Series 200 HPLC Systems	Procesador de muestras avanzado que se puede utilizar con prácticamente todos los sistemas o aplicaciones de cromatografía líquida.
Bomba al vacío	Vacuubrand	Permite la extracción de gases o líquidos de diferentes recipientes o sistemas, mediante el traslado de los fluidos o gases que estos contienen, en este caso se emplea con el objetivo de realizar un proceso de filtración.
Ultrasonicador	DAIHAN-KR	Sirve para una sonicación más eficiente de la muestra de interés, ayudando a desgasificar las soluciones para el uso en el HPLC.
TurboVap LV Evaporator	ZYMARK	Es un concentrador de muestras de pequeño volumen y alta velocidad. Este equipo

		puede procesar simultáneamente hasta 50 muestras en muchos tamaños.
Colector de vacío para cartuchos de fase sólida	Thermo Scientific	Colector de vacío de 12 puertos, acelera el procesamiento de las muestras mediante el proceso de extracción en fase sólida con el uso de cartuchos y facilitando la limpieza de muestras.
Vórtex	Thermo Scientific	-
Transiluminador	UVP	Equipo que posee una fuente de luz ultravioleta a diferentes longitudes de onda con el fin de degradar las Vitaminas en el suero.

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Por otro lado, se detalla en la Tabla 3 los materiales empleados para el proceso de cuantificación de 25-(OH) D mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y se pone a consideración que todos los materiales referentes con la manipulación del analito y estándares de la vitamina D, se recomienda el uso de material de vidrio color ámbar debido a la sensibilidad a la luz de los mismos (Bofill, 2011).

Tabla 3 Materiales utilizados para la detección y cuantificación de 25-(OH) D en HPLC

Materiales	Presentación y/o capacidad
Micropipetas	5-10, 10-100, 100-1000 μ L
Columna Chromegabond BAS Cyano	30cm x 3.9 mm
Viales ámbar para HPLC	2 mL
Microfiltros	0,45 μ m
Frascos Boecos	100 y 1000 mL
Matraz kitazato	250 mL

Papel filtro redondo	0,20 μ m
Manguera de hule	8mm de diámetro x 50cm de largo
Funnel (embudo)	300 mL
Abrazadera de aluminio	47 mm
Base de vacío con disco sinterizado	47 mm
Canastillo (baño de ultrasonido)	5 Lts
Jeringas	5mL
Tubos Eppendorf	1.5 y 2 mL
Cartucho de extracción Waters Oasis	1mL
Tubo de ensayo	5mL
Cajas Petri	50mm x 13mm

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Finalmente, los reactivos empleados en el desarrollo de esta investigación se detallan en la Tabla 4 y se debe tomar en cuenta que debido a la alta sensibilidad del equipo (HPLC) todos estos deben contar con una alta pureza y una baja absorción de UV, razón por la cual se recomienda que tengan características grado HPLC o en caso de no ser así se deberá filtrar y medir el pH con el fin de evitar daños al equipo y a la columna (García de Marina Bayo et al., 2016).

Tabla 4 Reactivos utilizados para la detección y cuantificación de 25-(OH) D en HPLC

Reactivo	Proporción	Función	Característica
Metanol	67%	Fase móvil	Grado HPLC
Agua destilada	33%	Fase móvil	Grado HPLC
Etanol	100%	Dilución del estándar	Grado HPLC
Acetonitrilo	100%	Precipitación de proteínas	Grado HPLC
Vit D 25-(OH) D	25 mL al 99.7%	Estándar	Líquido y en diluciones

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

3.3.2 Preparación del estándar y elaboración de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración, la misma que fue necesaria para la identificación y cuantificación de la 25-(OH) D, se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) PerkinElmer Serie 200, empleando como fase móvil metanol: agua (67:33) y como fase estacionaria una columna de la marca ES Industries Chromegabond BAS-CN de 30cm X 3,9mm.

Los estándares líquidos que se adquirieron, corresponden a los metabolitos 25-(OH) D₃ y 25-(OH) D₂, los cuales fueron proporcionados por la empresa EcuChemLab y contiene una pureza de 99,7% y 90% presentados en un vial ámbar de 25mL diluido en etanol a una concentración de 1,028 mg/mL y 1,011 mg/mL. Con los estándares se procedió a preparar soluciones disueltas en etanol a una concentración de 10, 20, 30, 50, 70, y 90 ng/mL en volúmenes de 1,5 mL, previo a que las muestras fueran introducidas en el equipo se filtraron con un microfiltro de poro de 0,45 µm y se recolectaron en un vial ámbar con tapa de 2mL. Algunos de los parámetros definidos para la corrida se basaron en recomendaciones del autor Lensmeyer et al., (2006) como el tipo de fase móvil y tipo de columna, sin embargo los parámetros como el volumen de inyección de 25 µL, el tiempo estimado de 25 a 30 minutos por corrida, el flujo de 0,8 mL/min de la fase móvil y la temperatura de 40°C de la columna fueron definidos por las investigadoras.

3.3.3 Pretratamiento de la muestra

En este caso, luego de obtener la muestra de sangre como se menciona en el apartado 3.1 seguido de la obtención del suero en el apartado 3.2, se necesitó de un proceso adicional de purificación para el cual se empleó un protocolo de extracción de fase sólida (SPE) mismo que consiste en 3 fases como se mencionan a continuación:

- **Fase de precipitación:** En un tubo Eppendorf mezclar 500 μ L de la muestra (suero) + 1000 μ L de acetonitrilo, dejar reposar durante 5 min luego agitar en vórtex durante 10 segundos y finalmente centrifugar a 2000g durante 10 min, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y proteger de la luz, así mismo tomar en cuenta que durante este procedimiento se aplica una dilución 1:3 de la muestra (Lensmeyer et al., 2006).
- **Fase de lavado:** Para esta fase se emplean los cartuchos de extracción Waters Oasis HLB de 1mL con ayuda del colector de vacío para cartuchos de fase sólida; primero se debe acondicionar previamente los cartuchos activándolos con 1mL de metanol grado HPLC y eluir a presión negativa, a continuación para equilibrar el cartucho se debe adicionar 1mL de agua y filtrar al vacío, centrifugar previamente la muestra a 8000g durante 10 min y luego cargar 1mL de la muestra. Para el lavado se debe aplicar 1mL de metanol al 5% y filtrar al vacío, tomar en cuenta que los eluyentes en esta fase del lavado se desechan (Hib, 2023).
- **Fase de Extracción:** Se debe acondicionar el analito para el proceso de recuperación, para esto colocar 1mL de metanol y recolectar la elución en un tubo eppendorf. A continuación, en el TurboVap LV Evaporator llevar a evaporación lo recolectado a una sequedad de 35°C bajo una corriente de nitrógeno por un tiempo de 40 min y reconstituir el residuo seco con 500 μ L de metanol finalmente pasar por un microfiltro de 0,45 μ m y transferir a un microvial de color ámbar para su posterior análisis (Lensmeyer et al., 2006).

Pretratamiento de la muestra para la cuantificación de vitamina D por HPLC

Fase de precipitación



Fase de lavado



Fase de extracción

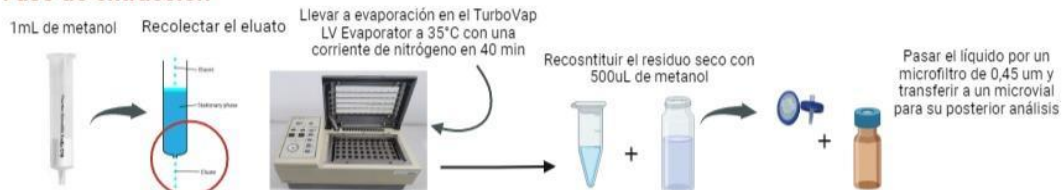


Figura 7 Pretratamiento de la muestra para la cuantificación de vitamina D por HPLC

Fuente: (Las autoras, 2023).

3.3.4 Modo de operación del HPLC UV/VIS

El modo de operación y programación del equipo HPLC consistió en el empleo de los siguientes parámetros:

- La fase móvil fue inversa, mediante una mezcla de metanol: agua en una relación 67:33 (Lensmeyer et al., 2006)..
- La presión a la que se trabajó la bomba no debía sobrepasar los 3000 psi para mantener las condiciones necesarias e integridad de la columna.
- El volumen de inyección de los estándares fue de 25 μ L.
- Las muestras de suero fueron inyectadas con un volumen de 25 μ L y a las mismas condiciones que los estándares.

- La columna empleada fue la Chromegabond BAS CN, la cual consta de un diámetro de 30cm x 3,9 mm y operó a una temperatura de 40°C.
- La longitud de onda usada fue de 273 nm (Lensmeyer et al., 2006).
- Por último, para la adquisición de los resultados se utilizó dos softwares como el N2000 Online Chromatostation y el N2000 Offline Chromatostation.

3.4 Validación del método HPLC

Los parámetros que se tomaron en consideración para la validación del método son: linealidad, límites de detección, límites de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, precisión y exactitud.

3.4.1 Linealidad

Se ejecutaron tres curvas de calibración siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.2. Se realizó la estimación de la ecuación de la recta en base a condiciones de reproducibilidad y se analizó el coeficiente de correlación lineal el mismo que se toma a consideración como un criterio de aceptabilidad cuando su valor es igual o superior a 0,999 (Balseca, 2019). Así mismo, para determinar la linealidad del método se utilizó la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

Ecuación 1. Pendiente de la recta

Donde:

y= Área que representa a cada estándar

x= Concentración del estándar de vitamina D

m= Pendiente de la recta

b= Ordenada al origen

Para demostrar que las curvas cumplen con la ecuación de la recta formulada en la (Ec.1), se calculó los valores de: pendiente (Ec.2), ordenada al origen (Ec.3), coeficiente de correlación el cual debe ser valores menores a 0,999 (Ec.4), desviación estándar (Ec.5) y error típico (Ec.6)(Balseca, 2019).

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ecuación 2. Pendiente

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Ecuación 3. Ordenada al origen

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

Ecuación 4. Coeficiente de correlación

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 5. Desviación estándar

$$SE_{xy} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - [m^2 \sum (x - \bar{x})^2]}{n - 2}}$$

Ecuación 6. Error típico

Donde:

x= datos de concentración

y= datos del área

\bar{x} = media de los datos de concentración

\bar{y} = media de los datos del área

m= pendiente

n= número de datos

3.4.2 Límite de detección (LD)

Analiza la menor cantidad del analito que pueda detectarse por muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, todas las muestras se realizaron bajo las mismas condiciones del análisis indicado (Castillo & González, 1996). Se utilizó el límite de detección como ejemplo de la guía de validación

ICH Q2 (R1) la cual especifica los requisitos en la sección 6.3 y 6.3.2 (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

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

Ecuación 7. Límite de detección

Donde:

σ = desviación estándar de la respuesta

S= pendiente de la curva de calibración (m).

3.4.3 Límite de cuantificación (LC)

Analiza la menor cantidad de analito en muestras que puedan determinarse bajo precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de cada proceso (Castillo & González, 1996). Para calcular el límite de cuantificación se utilizó la fórmula descrita en la guía de validación ICH Q2 (R1) descrita en la sección 7.3 (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

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

Ecuación 8. Límite de cuantificación

Donde:

σ = desviación estándar de la respuesta

S= pendiente de la curva de calibración (m).

3.4.4 Repetibilidad y Reproducibilidad

Este análisis se realizó utilizando dos muestras preparadas artificialmente, para esto se utilizó el suero zero y se añadió una concentración única conocida de 35 y 50 ng/mL respectivamente, las cuales teóricamente están dentro de los límites aceptables de medición en sangre (apartado 2.4), posteriormente se aplicó el protocolo de pretratamiento de la muestra y se corrió bajo las mismas

condiciones descritas en el apartado 3.3.4, se realizó un total de 6 réplicas por cada muestra, en diferentes días y por operadores distintos (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

Para la evaluación estadística de los resultados obtenidos, se empleó MiniTab Statistical Software mediante un estudio R&R del sistema de medición (cruzado) por medio del análisis ANOVA.

3.4.5 Precisión

Se valoró la precisión del método bajo los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad mencionados en el ítem anterior. Además con los resultados obtenidos se calculó la precisión intermedia, para lo cual se necesitan calcular los datos respectivos de la media aritmética, desviación estándar relativa y finalmente el coeficiente de variación experimental (%CV) (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

Ecuación 9. Porcentaje de coeficiente de variación experimental

3.4.6 Exactitud

Se empleó un análisis repetido de dos muestras con concentración única conocida, para esto se utilizó el procedimiento descrito para la obtención de un suero zero en el apartado 3.2.1 y se añadió una concentración conocida (30 y 50 ng/mL respectivamente) con la finalidad de calcular el porcentaje de recuperación (%R), seguido de esto se aplicó el protocolo de pretratamiento de la muestra (apartado 3.3.3), se corrió un total de tres veces cada muestra a las mismas condiciones para el protocolo de HPLC (apartado 3.3.4) y según la guía de validación ICH Q2 (R1) debió encontrarse entre los valores del 98% y 102% (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005). Para este punto se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{X \text{ estimada}}{X \text{ verdadera}} \times 100$$

Ecuación 10. Porcentaje de recuperación

Además, se puso a consideración que previo al estudio de exactitud se corroboró que la muestra de suero zero tenga una cantidad no detectable del analito de estudio y que el estándar añadido no solape con algún otro analito presente en la muestra, por lo cual se corrió en HPLC bajo las mismas condiciones y purificando previamente la muestra cómo se describe en la metodología (apartado 3.3.3 y 3.3.4).

3.5 Detección y cuantificación de Vitamina D por inmunoensayo ELISA

Para llevar a cabo esta investigación, se empleó un kit comercial para la determinación cuantitativa de la concentración de 25 – (OH) D en suero humano, mediante un inmunoensayo enzimático en microplaca, colorimétrico de la marca Accu Bind ELISA Microwells, con código de producto: 9425-300^a y número de lote EIA – 94K1A3.

3.5.1 Materiales

Los reactivos y materiales proporcionados por el kit comercial Vitamin D Direct - Accu Bind ELISA Microwells, se detallan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y materiales del kit comercial Vitamina D direct Accu Bind ELISA Microwells

Código	Función	Característica	Concentración	Presentación
A	Calibradores de vitamina D	Llevan en su envase los íconos de AG, son un total de siete viales que contienen calibradores de referencia de albúmina sérica humana para la 25 – (OH) D.	0, 5, 10, 25, 46, 85 y 150 ng/mL	1mL/ vial
B	Controles de vitamina D	Son dos viales representados con los íconos de M y N los cuales contienen controles	21,12 - 45,86 ng/mL y 49,16 – 97,6 ng/mL	1mL/vial

		de referencia de suero respectivamente humano.	para M y N	
C	Agente liberador de vitamina D	Vial que contiene agentes liberadores de la proteína de unión a la Vitamina D y en cuyo envase presenta el icono [I].		12mL/vial
D	Reactivo enzimático de vitamina D	Representado con el icono E, contiene 25-(OH) D3 (análogo) – peróxido de rábano picante (HRP) conjugado en una matriz estabilizadora de proteínas.		12mL/vial
E	Placas recubiertas de anticuerpo vitamina D	Contienen IgG de oveja antivitaminas D y se encuentran envasados en una bolsa de aluminio con un agente secante	< 1,0 µg/mL de IgG de oveja antivitaminas D	Placas de 96 pocillos
F	Solución de lavado concentrada	Contiene un tensioactivo en solución salina tamponada la cuál debe ser resuspendida antes de su uso		20mL/vial
G	Reactivo de sustrato	Contiene tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en el búfer		12 mL/ vial

H	Solución	Contiene un ácido fuerte	8mL/vial
	Stop	(H ₂ SO ₄)	
I	Folleto	Folleto de carácter instructivo sobre el producto	

Fuente: (Monobind Inc., 2018)

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Además de los reactivos proporcionados por el kit se requirieron de otros materiales como micropipetas de 25 y 100 µL, lavador de microplacas o botellas comprimibles, lector de microplacas con capacidad de absorbancia de longitud de onda de 450nm y 620 nm, papel absorbente para secar los pocillos de las microplacas, envoltura o cubierta plástica para incubación de microplacas y temporizador.

3.5.2 Elaboración de la curva de calibración con estándares de vitamina D

Para la construcción de la curva de calibración se llevó a cabo el protocolo proporcionado por el inserto del kit Accu Bind ELISA Microwells para detección de 25 – (OH) D total como se detalla en el Anexo 3, se debe tener presente que antes de comenzar con el ensayo todos los reactivos y controladores debían estar a temperatura ambiente de (20-27°C) y que en este caso los pocillos tenían que estar ordenados para cada calibrador por duplicado y siguiendo su respectivo orden de concentración (Monobind Inc., 2018).

Además, hay que considerar que para agregar cada reactivo se debe seguir siempre el mismo orden para minimizar el tiempo de reacción, y que, en caso de que algún calibrador, reactivo o solución presente alguna coloración azulada en los mismo, no utilizarlos ya que estos pueden encontrarse oxidados o contaminados, por lo que dicho kit debería descartarse (Monobind Inc., 2018).

3.5.3 Pretratamiento de la muestra

El protocolo empleado para la detección de vitamina D mediante el inmunoensayo de absorción enzimática ELISA, una vez que se obtuvo la muestra de sangre como se menciona en el apartado 3.1 y recolectado únicamente el suero como se menciona en el apartado 3.2, la muestra no necesitó de ningún otro proceso de filtrado y se prosiguió con la elaboración del ensayo ELISA.

3.5.4 Cuantificación de vitamina D en muestras de suero sanguíneo humano

Se aplicó la metodología de Monobind Inc. (2018), descrita en el manual del kit:

1. Pipetear 25 μ L de la muestra de suero extraída en el pocillo asignado, considerar realizar por duplicado.
2. Agregar 100 μ L del agente liberador de vitamina D 25-OH a todos los pocillos.
3. Mezclar la microplaca durante 20-30 segundos hasta su homogenización.
4. Cubrir los pocillos con la envoltura de plástico de microplacas y dejarlo incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se realiza por medio de un proceso de decantación, secar lo sobrante con ayuda de papel absorbente.
6. Agregar 350 μ L de tampón de lavado para luego realizar su respectiva decantación. Repetir dos veces más este proceso para llegar a un total de 3 lavados.
7. Añadir 100 μ L de reactivo enzimático 25-OH vitamina D a todos los pocillos. No agitar la placa después de la adición de este reactivo.
8. Cubrir e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración, siguiendo lo anteriormente explicado.
10. Agregar 350 μ L de tampón de lavado, decantar y repetir dos veces más.
11. Agregar 100 μ L de reactivo de sustrato a todos los pocillos. No agitar la placa después de la adición de este reactivo.
12. Incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 20 minutos.
13. Agregar 50 μ L de solución de parada a cada pocillo y mezclar suavemente durante 15 a 20 segundos.
14. Leer la absorbancia a 450 nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-639 nm)

Además, se tomó en cuenta varios aspectos como; seguir siempre el mismo orden de cada calibrador para minimizar el tiempo de reacción y que el protocolo descrito en el Anexo 3 se realizó a la par de este protocolo por lo cual facilitó el tiempo de investigación para esta metodología.

3.6 Comparación entre la técnica de HPLC y ELISA

Se evaluaron los resultados de los datos obtenidos de las dos técnicas, primero se analizaron si estos datos son paramétricos o no paramétricos para lo cual se emplea un análisis de normalidad en el Software MiniTab Statistical, en caso de ser datos con una distribución normal ($p > 0.01$) se procede a realizar la prueba de T-Student, en caso de no ser datos con una distribución normal ($p < 0.05$) se procede a realizar una prueba U de Mann-Whitney, donde se plantean dos hipótesis a probar:

H₀: La técnica de HPLC presenta resultados diferentes frente a la técnica de ELISA, en la medición de vitamina D en suero sanguíneo donde $\mu_1 > \mu_2 = 0$.

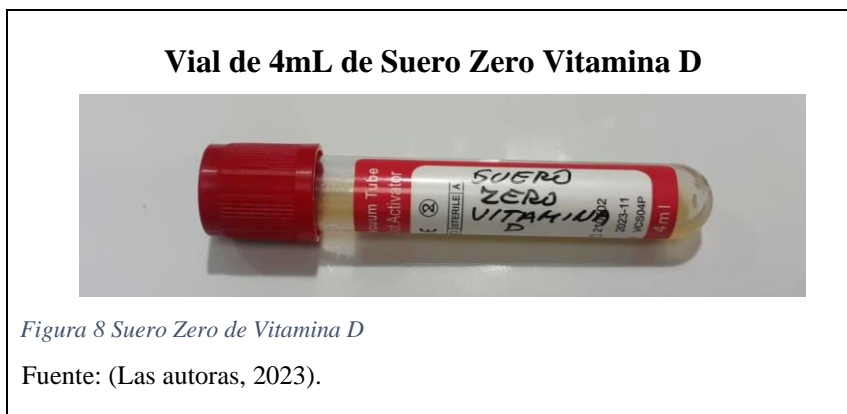
H₁: La técnica HPLC presenta resultados similares frente a la técnica ELISA, en la medición de vitamina D en suero sanguíneo, donde $\mu_1 - \mu_2 = 0$

4. Resultados y discusión

Mediante una serie de análisis estadísticos ejecutados en el software de Microsoft Excel y MiniTab se calcularon e interpretaron los resultados obtenidos de los procedimientos realizados en el laboratorio Inmunolab para la investigación de “Comparación entre las técnicas de HPLC y ELISA para la detección de Vitamina D en suero sanguíneo”.

4.1 Obtención de suero Zero

Se obtuvo dos viales de 4mL de suero zero a partir de un total de dos muestras de sangre de 10mL correspondientes a voluntarios dentro de la investigación, las cuáles previamente a la extracción sanguínea firmaron la autorización como se indica en el Anexo 4.



Para comprobar que el protocolo este correctamente efectuado se realizó un ensayo de ELISA para cuantificación de Vitamina D previo a la irradiación UV y después de la misma, donde se obtuvo un resultado inicial de 12.10 ng/mL y un resultado final no detectable de 25-(OH) D, estos datos se obtuvieron a partir de la lectura de densidad óptica (Figura 9) y su respectiva cuantificación mediante la curva de calibración de la Figura 10 realizada con los calibradores del kit comercial Accu Bind ELISA Microwells para detección de 25 – (OH) D total tal como describe el protocolo (apartado 3.5.2).

Resultados densidad óptica ensayo ELISA para la detección de 25 –(OH) D total en suero Zero

INMUNOLAB							QUITO, ECUADOR						
MOLECULAR DEVICES			Vmax KINETICS MICROPLATE READER				PLATE# : 1						
ASSAY :	25-OH VIT D					DATE :	18	5	2023				
OPERATOR :	ANA Y CRISTINA		O.D. LIMIT :	3.000		TIME :	16 h	30	AM/PM				
WAVELENGTH :	450nm - 650nm		READ MODE :	OPTICAL DENSITY					AUTO MIX:	ON			
NOTES :												CAL:	ON
OPTICAL DENSITY													
Calibrador	0	5	10	25	47	85	150	Z- Antes	Z- Después	Vacio	Vacio	Vacio	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	2,169	1,505	1,109	0,743	0,525	0,423	0,629	1,085	2,048	0,000	0,000	0,000	
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Figura 9 Resultados densidad óptica ensayo ELISA para detección de 25(OH) D total en suero Zero

Fuente: (Las autoras, 2023).

Nota: Se obtuvo una densidad óptica de 1.085 del suero zero antes y de 2.048 después de la irradiación UV.

Cuantificación del suero Zero en Curva de calibración

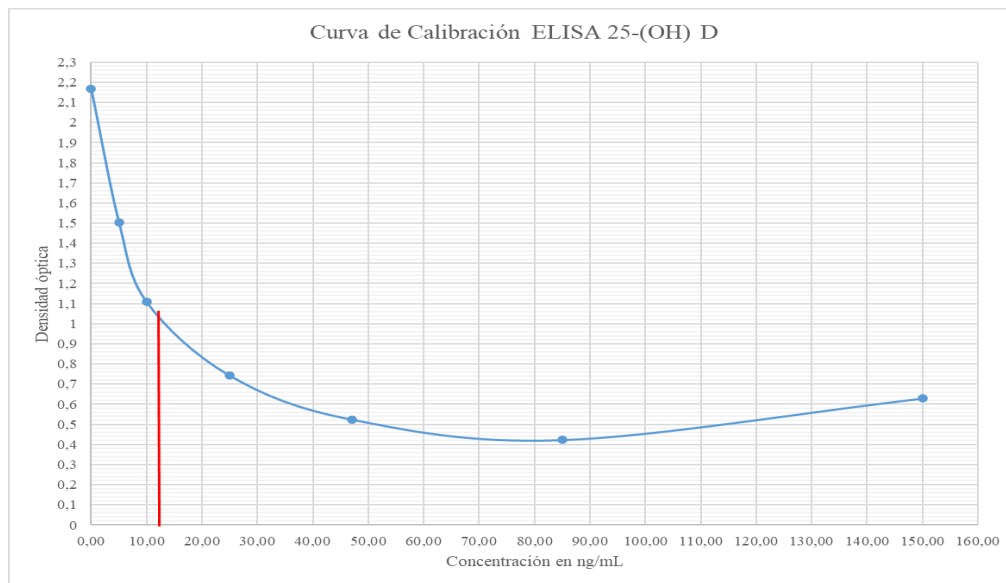


Figura 10 Cuantificación de suero Zero en Curva de Calibración

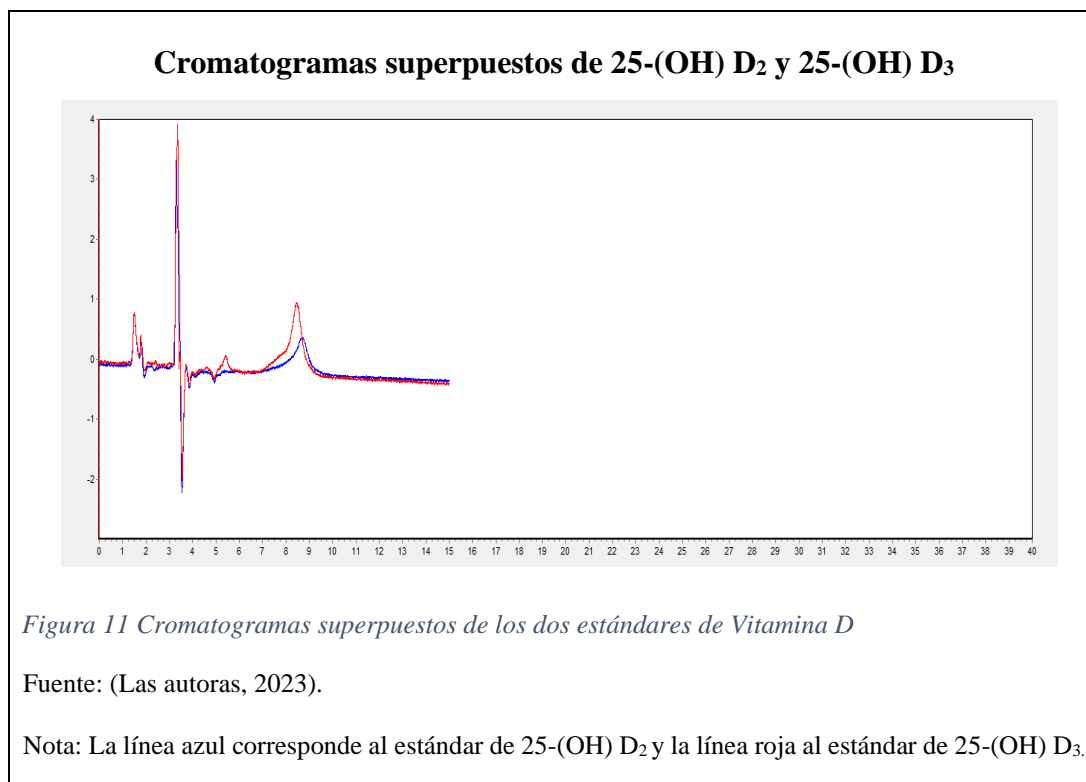
Fuente: (Las autoras, 2023).

Nota: Se obtuvo una concentración de Vitamina D en el suero antes de ser irradiado de 12,10 ng/mL (línea roja) y después una concentración de suero zero no detectable.

Por otro lado, de acuerdo con los autores Luisa & Casaus (2015) se pudo comprobar que mediante una irradiación con luz UV artificial la vitamina D logró degradarse a productos inactivos, obteniéndose una concentración no detectable de la misma dentro del suero sanguíneo.

4.2 Detección y cuantificación de Vitamina D por HPLC

Se corrió los estándares por separado de 25-(OH) D₂ y 25-(OH) D₃ a una misma dilución (90 ng/mL); se pudo observar que los picos del cromatograma salían al mismo tiempo de retención y al ser superpuestas las dos corridas con ayuda del software N2000 Offline se corroboró que al poseer una estructura química similar puede resultar en picos solapados tal y como evidencian algunas investigaciones de Bravo & Honduras (2006), donde explican que al ser análogos estructurales los estándares pueden actuar de forma similar y tener un tiempo de retención igual. Sin embargo, se visualizó una diferencia de áreas ya que 25-(OH) D₃ tiene mayor área que 25-(OH) D₂ tal como muestra la Figura 11.



Debido que el proceso de separación óptimo de picos análogos, en algunos casos conlleva el ajuste de nuevas condiciones, como cambiar la fase móvil, la columna o los parámetros de gradiente (Collado, 2020), se decidió continuar la investigación con los mismos parámetros descritos pero

empleando únicamente el estándar de Vitamina D₃, ya que fue el pico más representativo y el único visible por el modo de operación descrito en el apartado 3.3.4, a partir de este se realizaron un total de 6 diluciones, las cuales van desde los 10 ng/mL hasta 90 ng/mL debido a que, según estudios de Dahiri et al. (2023) estos son los posibles rangos en que la Vitamina analizada puede encontrarse presente en el suero sanguíneo en forma de 25-hidroxivitamina D₃, en donde delimitan valores de <20 ng/ml como deficientes, 20-30 ng/ml como insuficientes y ≥30 ng/ml como suficientes.

4.2.1 Curva de calibración y validación de la linealidad

Para la validación del método “linealidad” se realizaron un total de tres curvas de calibración, en base a los seis estándares de vitamina D y se analizaron por HPLC, los datos obtenidos para la realización de las curvas de calibración fueron en tres días diferentes, para graficar las curvas se ubicó en el eje X las concentraciones de los seis estándares de Vitamina D₃ en ng/mL y en el eje Y el área a la cual representa cada uno de los estándares expresadas en unidad de absorbancia (UA).

Tabla 6 Datos de las curvas de calibración para las concentraciones de Vitamina D₃

Std	Eje X		Eje Y	
	Concentración del Std en (ng/mL)	Curva 1 Área (UA)	Curva 2 Área (UA)	Curva 3 Área (UA)
1	10	26265,199	22773,500	26252,203
2	20	56328,258	76885,078	75306,805
3	30	104876,086	140398,656	139624,313
4	50	193690,000	258840,688	258926,500
5	70	315925,313	375372,563	380204,281
6	90	436866,813	498343,344	498645,125

Fuente: (Las autoras, 2023)

A continuación, se presentan las curvas de calibración con su respectiva ecuación de la recta y su coeficiente de correlación lineal (R^2):

En base a gráfica de la primera curva de calibración (Figura 12) se obtuvieron los siguientes datos: pendiente (m) 5184,2, coeficiente de correlación (r) 0.9917, valor de la intersección -44297,15, error típico (SE) 16358,95 y la desviación estándar (SD) 40071,078.

Curva 1 de calibración de Vitamina D3

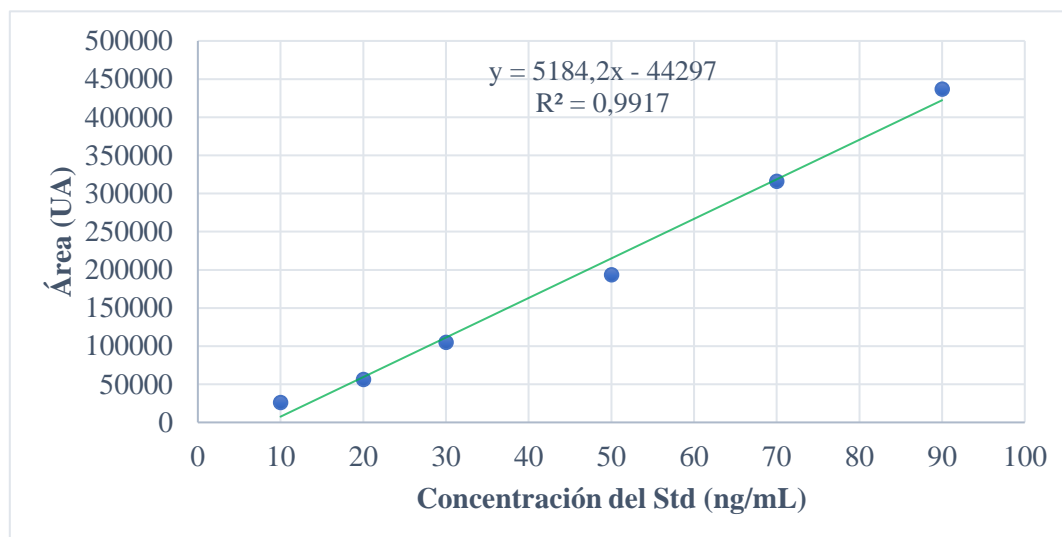


Figura 12 Análisis de linealidad - Curva 1 de calibración de Vitamina D3

Fuente: (Las autoras, 2023)

Nota: $y = 5184,2x - 44297$ y $R^2 = 0,9917$ (Regresión lineal y coeficiente de correlación)

En la segunda curva de calibración (Figura 13) se consiguieron los siguientes datos: pendiente (m) 5953,429, coeficiente de correlación (r) 0.9999, valor de la intersección -39135,5, error SE 2432,133 y la desviación estándar 5957,48.

Curva 2 de Calibración de Vitamina D3

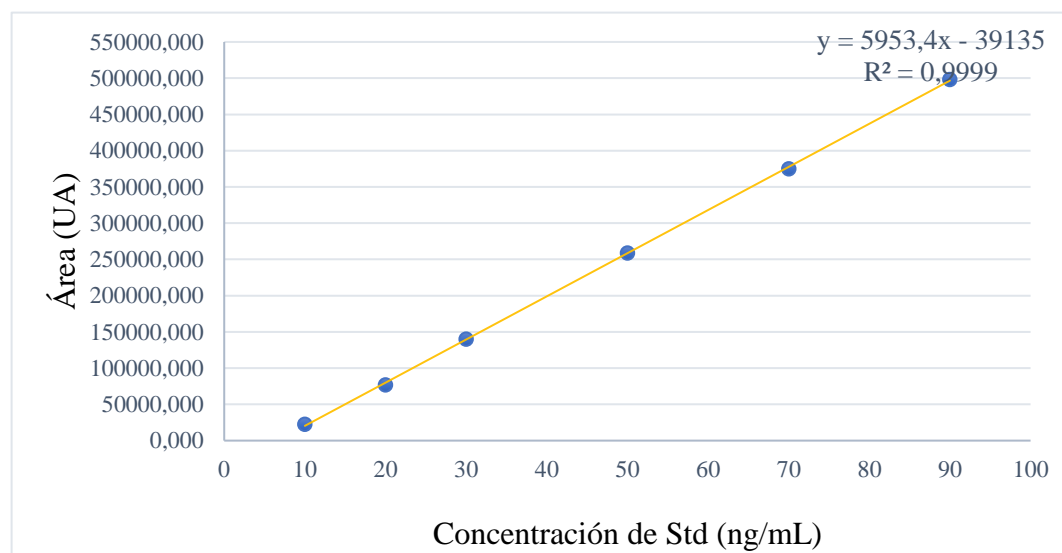


Figura 13 Análisis de linealidad - Curva 2 de calibración de Vitamina D3

Fuente: (Las autoras, 2023).

Nota: $y = 5953,4x - 39135$, $R^2 = 0,9999$ (Regresión lineal y coeficiente de determinación).

La tercera curva de calibración (Figura 14) presentó los siguientes datos: pendiente (m) 5966,928, coeficiente de correlación (r) 0,9997, valor de la intersección -38685,224, error SE 3837,682 y la desviación estándar 9400,363.

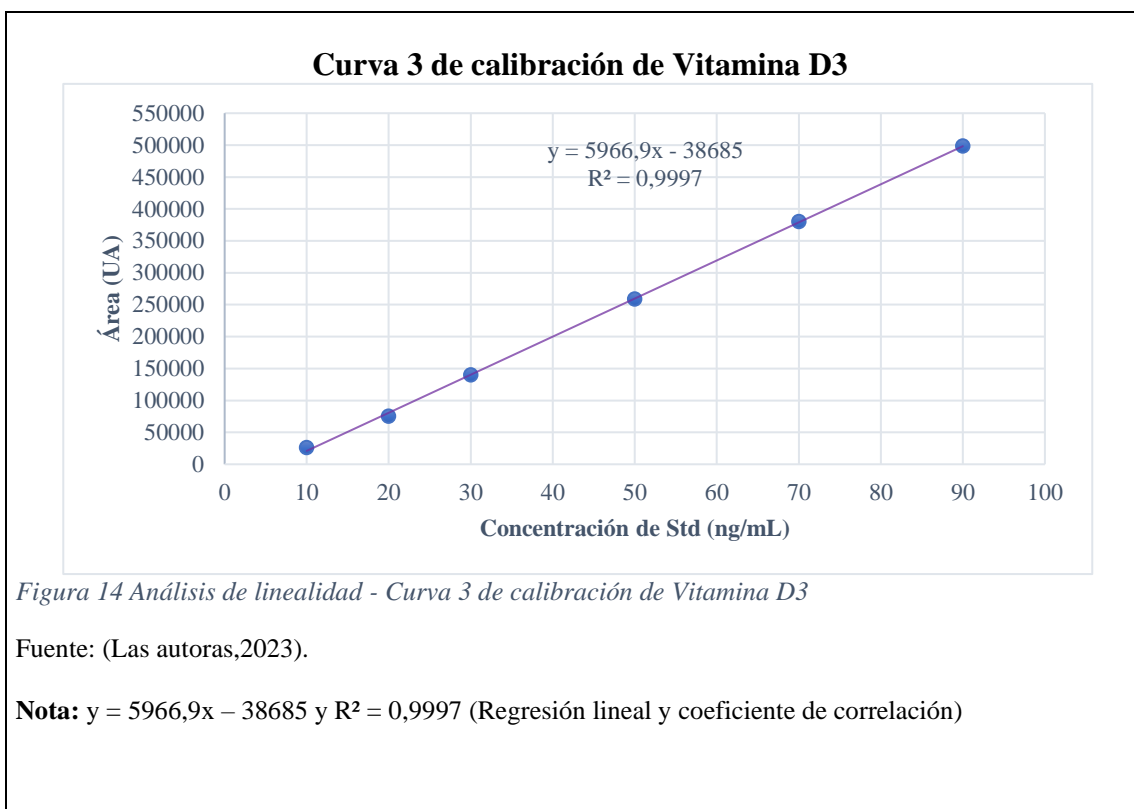


Figura 14 Análisis de linealidad - Curva 3 de calibración de Vitamina D3

Fuente: (Las autoras,2023).

Nota: $y = 5966,9x - 38685$ y $R^2 = 0,9997$ (Regresión lineal y coeficiente de correlación)

Después de analizar los datos de cada una de las curvas, se escogió a la que mejor coeficiente de determinación obtuvo correspondiendo está a la segunda curva y a partir de la cual se elegirá como punto de referencia para el análisis de las muestras ya que autores como Aguirre (2017), coinciden que lo ideal es obtener un valor R^2 que sea igual o mayor a 0.999, para así poder demostrar la fiabilidad de los datos obtenidos.

4.2.2 Análisis de las muestras

Se estudiaron un total de cuatro muestras sanguíneas correspondientes a voluntarios de esta investigación en condiciones de ayunas, se rotularon como M1, M2, M3 y M4 respectivamente y se corrieron en HPLC un total de seis repeticiones por muestra, una vez obtenido el cromatograma en el Software Offline N2000 se obtuvo el valor del área bajo la curva. Para obtener el valor de la concentración se calculó con ayuda de la ecuación de la recta correspondiente a la Curva de

Calibración (Figura 13) despejando el valor de X y luego multiplicando por el factor de dilución que se realizó en la preparación de la muestra durante el precipitado de proteínas (apartado 3.3.3), como se explica a continuación:

Ejemplo de cálculo para la M1 Réplica 1:

- Área bajo la curva: 22116,33 correspondiente a “y”
- Ecuación de la recta: $y = 5953,4x - 39135$
- Despejamos x de la ecuación que corresponde a la concentración y reemplazamos:
 $x = (y + 39135) / 5953,4$
- Se obtiene un total de 10,19 ng/mL y se multiplica por 3 correspondiente al factor de dilución, dando como resultado 30,57 ng/mL

Tabla 7 Resultado detección de Vitamina D en suero sanguíneo por HPLC

Condiciones:		Ayunas			Ayunas			Ayunas			Ayunas		
Muestras:		M1			M2			M3			M4		
Replica	Cromatograma (Anexo 6)	Área	Concentración (ng/mL)	Cromatograma (Anexo 7)	Área	Concentración (ng/mL)	Cromatograma (Anexo 8)	Área	Concentración (ng/mL)	Cromatograma (Anexo 9)	Área	Concentración (ng/mL)	
1	VITAMINA D3 0114	22116,33	30,57	VITAMINA D3 0120	27655,32	33,35	VITAMINA D3 0134	7599,80	23,27	VITAMINA D3 0138	23831,49	31,43	
2	VITAMINA D3 0115	23962,33	31,50	VITAMINA D3 0121	26561,13	32,80	VITAMINA D3 0135	7233,84	23,09	VITAMINA D3 0139	24777,83	31,91	
3	VITAMINA D3 0116	22849,63	30,94	VITAMINA D3 0122	26623,39	32,84	VITAMINA D3 0136	6123,17	22,53	VITAMINA D3 0140	23159,34	31,09	
4	VITAMINA D3 0117	24063,74	31,55	VITAMINA D3 0123	26769,68	32,91	VITAMINA D3 0144	7598,04	23,27	VITAMINA D3 0141	24000,27	31,52	
5	VITAMINA D3 0118	23737,74	31,38	VITAMINA D3 0124	26375,23	32,71	VITAMINA D3 0145	6149,32	22,54	VITAMINA D3 0142	24250,43	31,64	
6	VITAMINA D3 0119	23787,66	31,41	VITAMINA D3 0125	26800,07	32,92	VITAMINA D3 0146	7576,24	23,26	VITAMINA D3 0143	24106,97	31,57	
Promedio			31,22				32,92				22,99	31,53	

Fuente: (Las autoras, 2023)

Nota: Se obtuvieron promedios de M1 correspondiente a 31,22 ng/mL, para la M2 un valor de 32,92 ng/mL y para la M4 un valor de 31,52 ng/mL, valores considerados dentro del rango óptimo de concentración de vitamina D; mientras que para la M3 se obtuvo un valor de 22,9 ng/mL resaltando la carencia de la vitamina en dicha muestra según datos teóricos descritos en el apartado 2.3.1.

Los cromatogramas de las muestras se encuentran en; Anexo 6 (M1), Anexo 7 (M2), Anexo 8 (M3) y Anexo 9 (M4).

Tal y como lo demuestra el estudio de NIH (2022), en su hoja informativa los valores obtenidos tienen relación con los rangos considerados como óptimos o normales de 30 a 50 ng/mL (M1, M2 y M4) y deficientes aquellos menores a 30 ng/mL (M3), es decir podemos considerar que el voluntario M3 presenta valores bajos de vitamina D debido a posibles factores como; no recibe suficiente vitamina D en su dieta, no absorbe suficiente vitamina D de los alimentos, no recibe suficiente exposición a la luz solar o su hígado o riñones no pueden convertir la vitamina D en su forma activa en el cuerpo (MedlinePlus, 2023).

4.3 Validación del método por HPLC

4.3.1 Límite de detección

El límite de detección se determinó mediante el análisis de los valores calculados para la Curva 2 de Calibración (apartado 4.2.1) como la pendiente de la recta (S), el error típico (SE) y la desviación estándar (σ).

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

$$LD = \frac{3.3 (5957,484)}{5953,429}$$

$$LD = 3,302 \text{ ng/mL}$$

Es decir, la concentración mínima que debe tener la Vitamina D para que pueda ser detectada con certeza razonable corresponde a 3,30 ng/mL, asimismo en literatura reciente autores como Domingo (2021), mencionan que estos métodos analíticos poseen cierta variación aleatoria en los resultados por lo que puede llevar a la detección de pequeñas cantidades que no están presentes en la muestra por lo que resultados más bajos al LD no deben ser tomados en cuenta ya que es difícil distinguir entre verdaderos positivos de los aleatorios dispersos.

4.3.2 Límite de cuantificación

De igual forma, el límite de cuantificación se calculó a partir del análisis de los valores obtenidos para la Curva 2 de Calibración (apartado 4.2.1) junto con los valores de desviación estándar (σ) y pendiente de la recta (S).

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

$$LC = \frac{10 (5957,484)}{(5953,429)}$$

$$LC = 10,006 \text{ ng/mL}$$

El autor Domingo (2021), propone que el análisis puede detectar la presencia de una concentración en niveles superiores al límite de detección (LD) sin embargo la Vitamina D estaría presente en una cantidad muy baja, por lo que el analista no puede asignarle un valor numérico con una certidumbre aceptable lo que conlleva a la necesidad de establecer un límite de cuantificación que sea mayor al límite de detección. Es decir, según la validación del LC la concentración mínima que debe tener la Vitamina D para que pueda ser cuantificada con certeza razonable en este estudio corresponde a 10,00 ng/mL.

4.3.3 Repetibilidad y Reproducibilidad

Se realizó un análisis de 2 muestras de suero zero cada una con una cantidad de vitamina D añadida, en este caso la primera muestra tuvo un total de 35 ng/mL y la segunda un total de 50 ng/mL. La prueba fue realizada en dos días diferentes por las dos operadoras para así demostrar la capacidad del equipo de otorgar resultados consistentes y precisos mediante la validación del método de repetibilidad, y de igual manera, demostrar la capacidad del ensayo de ser reproducido por diferentes operadores, tal y como se muestra en la

Tabla 8.

Tabla 8 Resultados análisis de repetibilidad y reproducibilidad

Operador:		1	2	1	2							
Fecha:		jueves, 22 de junio de 2023		viernes, 23 de junio de 2023								
Muestra:		(Z+35ng/mL)		(Z+ 35ng/mL)								
				jueves, 8 de junio de 2023								
				miércoles, 7 de junio de 2023								
				(Z+50ng/mL)								
				(Z+50ng/mL)								
Réplica	Cromatograma	Área	Concentración (ng/mL)	Cromatograma	Área	Concentración (ng/mL)	Cromatograma	Área	Concentración (ng/mL)	Cromatograma	Área	Concentración (ng/mL)
1	VITAMINA D3 0150	31138,80	35,11	VITAMINA D3 0157	31254,31	35,16	VITAMINA D3 0103	58093,07	48,66	VITAMINA D3 0095	57027,57	48,12
2	VITAMINA D3 0151	31190,31	35,13	VITAMINA D3 0158	31178,46	35,13	VITAMINA D3 0102	58206,05	49,76	VITAMINA D3 0096	59319,58	49,27
3	VITAMINA D3 0152	31265,71	35,17	VITAMINA D3 0159	31633,01	35,35	VITAMINA D3 0101	58086,65	49,89	VITAMINA D3 0097	59284,81	49,26
4	VITAMINA D3 0153	31225,47	35,15	VITAMINA D3 0160	31280,17	35,18	VITAMINA D3 0104	59973,77	49,60	VITAMINA D3 0098	60420,21	49,83
5	VITAMINA D3 0154	31569,04	35,32	VITAMINA D3 0161	31196,35	35,13	VITAMINA D3 0105	60573,36	49,90	VITAMINA D3 0099	59314,88	49,27
6	VITAMINA D3 0155	31192,68	35,13	VITAMINA D3 0162	31336,72	35,21	VITAMINA D3 0106	60327,79	49,78	VITAMINA D3 0100	58354,60	48,79

Fuente: (Las autoras, 2023)

Nota: (Z) corresponde a las muestras de suero Zero, los operadores (1) y (2) corresponden a las autoras de la investigación.

Una vez obtenidos los datos de las mediciones se ingresaron a MiniTab Statistical Software, donde se obtuvo la siguiente Tabla 9 de evaluación del sistema de medición.

Tabla 9 Estudio R&R del sistema de medición - método ANOVA

Fuente	Desv.Est. (DE)	Var. estudio (6 × DE)	%Var. estudio (%VE)
Gage R&R total	0,4151	2,4906	4,14
Repetibilidad	0,3951	2,3707	3,94
Reproducibilidad	0,1272	0,7635	1,27
Operadores	0,1272	0,7635	1,27
Parte a parte	10,0143	60,0860	99,91
Variación total	10,0229	60,1376	100,00

Fuente: (Las autoras, 2023).

Nota: % de variación de estudio de Gage R&R (% 4,14) equivalente a un sistema de medición óptimo.

Con los resultados obtenidos por medio del Software MiniTab Statistical Software y su respectiva guía de interpretación de resultados nos dice que la contribución total de R&R permite evaluar simultáneamente la repetibilidad y reproducibilidad del sistema mediante el análisis del porcentaje de variación (% Var estudio); cuando en este se obtiene menos del 10% el sistema de medición es aceptable, entre 10 y 30% es aceptable según la aplicación y el costo de la medición del estudio y superior al 30% el sistema de medición es inaceptable y debe mejorarse (Minitab, 2011). En este caso, al obtenerse un resultado de 4.14 % (Tabla 9) se cataloga como un sistema de medición aceptable.

4.3.4 Precisión

Se evaluó la precisión bajo los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad en el programa Minitab Statistical Software mediante el uso de herramienta de calidad Gage R&R analizados en el apartado 4.3.3 y se corroboró con autores como Rodriguez (2015) y Minitab (2011) que si el valor obtenido

en Gage R&R se encuentra dentro de los porcentajes admitidos, la precisión del análisis se ve influenciada por este y por ende puede ser aceptado.

Por otro lado, se calculó el %CV de cada parte (35 y 50 ng/mL) con el fin de analizar el grado de concordancia entre resultados obtenidos al aplicar el mismo proceso experimental repetidas veces y sobre la misma muestra bajo condiciones constantes establecidas donde se obtuvo los siguientes resultados.

Para 35ng/mL (12 repeticiones y 2 operadores)

$$\bar{X} = 35,18$$

$$\sigma = 0,0773$$

$$\%CV = 0,22$$

Para 50ng/mL (12 repeticiones y 2 operadores)

$$\bar{X} = 49,34$$

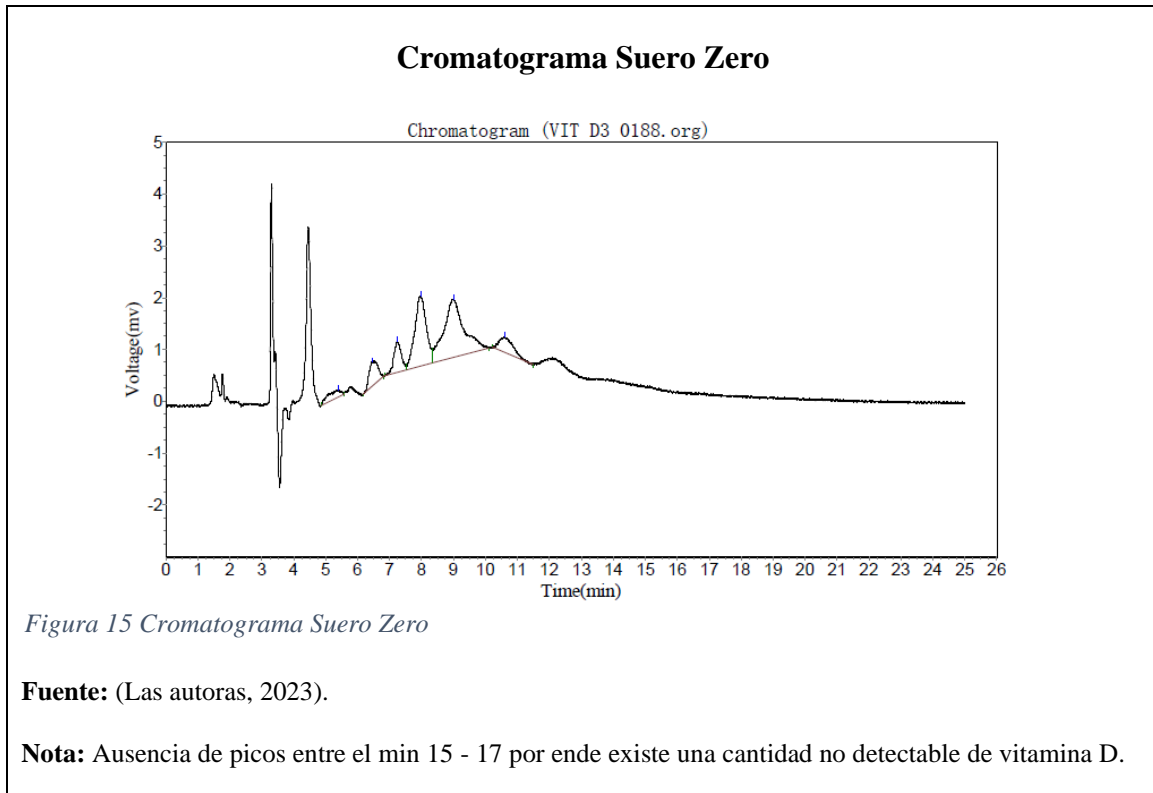
$$\sigma = 0,569$$

$$\%CV = 1,15$$

Según Torralvo (2017), en la terminación de cualquier tipo de muestra la precisión intermedia se considera aceptable cuando el %CV experimental es inferior a 2 y como puede observarse los coeficientes experimentales calculados son menores a este valor, por lo que la precisión del análisis es buena.

4.3.5 Exactitud

Se demostró en el cromatograma del suero zero Figura 15, que no existe presencia de vitamina D ni de ningún otro analito que interfiera en el análisis ya que entre el minuto 15 al 17 el cual se considera como el tiempo de retención de la vitamina D en base a los cromatogramas del Anexo 5, no existe la presencia de ningún pico.



Por otro lado, los resultados del análisis de exactitud se presentan en la Tabla 10 para el cuál se emplearon dos muestras de suero zero y se añadió las cantidades conocidas de 30 y 50 ng/mL, se analizó cada muestra por triplicado y una vez obtenida la concentración real se aplicó la fórmula de % de recuperabilidad (Ec.10) donde se obtuvieron porcentajes desde los 98,86 hasta los 99,81. En base a estos resultados junto con las medidas definidas en el manual de la (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005) se puede confirmar que al estar entre el rango de 98 al 102% el parámetro de exactitud es aceptable.

Tabla 10 Resultados análisis de exactitud

Muestra Z	Repetición	Cromatograma	Área	Concentración (ng/mL)	Factor de dilución	Concentración real (ng/mL)	% Recuperabilidad
30 (ng/mL)	1	VITAMINA D3 0107	20301,91	9,89	3	29,66	98,86
	2	VITAMINA D3 0108	20821,91	9,97	3	29,92	99,73
	3	VITAMINA D3 0109	20411,65	9,90	3	29,71	99,04
50 (ng/mL)	1	VITAMINA D3 0104	59973,77	16,53	3	49,60	99,21
	2	VITAMINA D3 0105	60573,36	16,63	3	49,90	99,81
	3	VITAMINA D3 0106	60327,79	16,59	3	49,78	99,56

Fuente: (Las autoras, 2023).

4.4 Cuantificación de vitamina D por ensayo de inmunoabsorbancia enzimática ELISA.

Resultados densidad óptica ensayo ELISA para la detección de 25 –(OH) D total												
INMUNOLAB						QUITO, ECUADOR						
MOLECULAR DEVICES			Vmax KINETICS MICROPLATE READER						PLATE# 1			
ASSAY	25-OH VIT D						DATE	20/ 6/ 23				
OPERATOR	ANA Y CRISTINA		O.D. LIMIT	3.000			TIME	13 :00		AM/PM		
WAVELENGTH	450nm - 650nm		READ MODE	OPTICAL DENSITY						AUTO MIX	ON	
NOTES										CAL	ON	
OPTICAL DENSITY												
CALIBRADO	0	5	10	25	47	85	150	M	N			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,520	2,003	1,909	1,444	1,019	0,704	0,579	1,246	0,00	0,885	0,000	0,000
B	1,298	1,247	1,698	1,319	1,406	1,264	1,619	1,332	0,00	0,000	0,000	0,000
C	1,217	1,302	1,636	1,297	1,316	1,308	1,536	1,417	0,00	0,000	0,000	0,001
D	1,277	1,098	1,668	1,304	1,340	1,372	1,815	1,315	0,00	0,001	0,001	0,000
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Fuente: (Las autoras, 2023).

Nota: Se obtuvo una densidad óptica de 1.085 del suero zero antes y de 2.048 después de la irradiación UV.

4.4.1 Curva de calibración

Para poder analizar los resultados de las muestras de suero, se elaboró la curva de calibración y se corroboró su validez mediante el análisis de sus dos controles M y N. El primero (M) presentó una absorbancia de 1,246 correspondiente a una concentración de 33 ng/mL y que pertenece dentro de los límites establecidos de 16-97,6 ng/mL, y el segundo (N) presentó una absorbancia de 0,885

correspondiente a una concentración de 59 ng/mL y que de igual forma pertenece dentro de los límites 12-45,86 ng/mL tal y como especifica el inserto del kit (Monobind Inc., 2018).

Curva de Calibración ensayo ELISA para la detección de 25 –(OH) D total en muestras

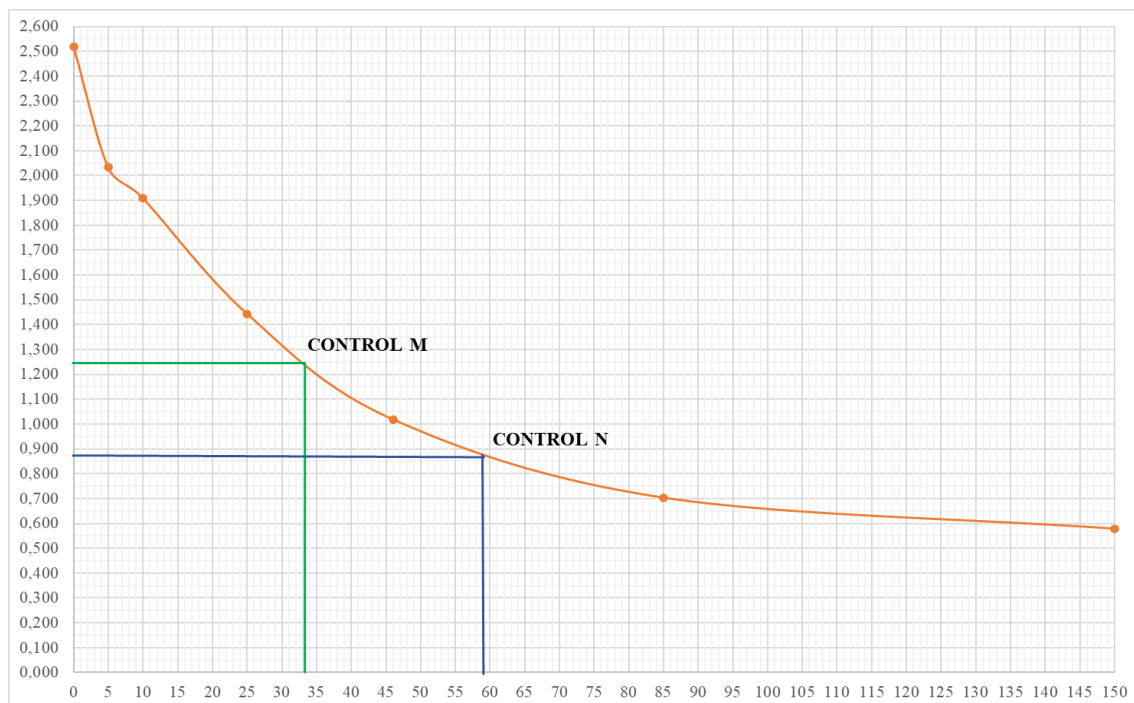


Figura 16 Resultado curva de calibración ensayo ELISA para la detección de 25(OH) D total

Fuente: (Las autoras, 2023).

Nota: La línea verde corresponde para el análisis del control M y la línea azul corresponde al control N

4.4.2 Análisis de las muestras

Se estudiaron un total de cuatro muestras de suero sanguíneo correspondientes a voluntarios de esta investigación; se rotularon como M1, M2, M3 y M4 respectivamente con un total de seis repeticiones por muestra. Una vez conseguido el resultado del ensayo, se obtuvo una concentración de 30,67 ng/mL para M1, 32,67 ng/mL para M2 y 29,83 ng/mL para la M4, las cuales se encuentran dentro del rango óptimo (30 a 50 ng/mL) de concentración de vitamina D de acuerdo con NIH (2022), mientras que para M3 se obtuvo una concentración de 19,50 ng/mL corroborando la carencia de dicha vitamina dentro de la muestra según indica el inserto del kit (Monobind Inc., 2018).

Autores como IBL (2018), en literatura reciente sugiere que los valores obtenidos según sus rangos de clasificación se encuentran en niveles de insuficiente (M3) y suficiente (M1, M2 y M4), sin

embargo Quesada Gómez Alonso & Heureux (2019), recomiendan que este tipo de ensayos todavía debe establecerse como una práctica clínica habitual a través de estudios clínicos en áreas relevantes como mujeres embarazadas, fertilidad, enfermedades renales, hepáticas y osteoporosis, así como en pacientes de estado crítico donde la concentración de vitamina D es mucho más variable de acuerdo a la enfermedad asociada.

Tabla 11 Resultado detección de Vitamina D en suero sanguíneo en ensayo ELISA

Condición	Concentración (ng/mL)			
	Ayunas	Ayunas	Ayunas	Ayunas
Réplica	M1	M2	M3	M4
R1	31	33	17	30
R2	34	31	19	31
R3	33	41	17	31
R4	27	32	19	30
R5	30	31	22	27
R6	29	28	23	30
Promedio	30,67	32,67	19,50	29,83

Fuente: (Las autoras, 2023)

4.5 Comparación entre la técnica de HPLC y ELISA

En base a los resultados obtenidos de cada método de estudio (Tabla 7 y Tabla 11) se realizó un análisis de datos donde autores como Mayorga-Ponce et al (2022) definen que los resultados obtenidos son considerados como datos no paramétricos debido que al efectuar un análisis de normalidad en MiniTab Software para cada método (Figura 17), estos presentaron un valor de probabilidad menor a 0.005 el cual se considera que no presenta una distribución normal. Debido a esto, se procedió a realizar la comparación de resultados mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Gráficas de normalidad para resultados de HPLC y ELISA

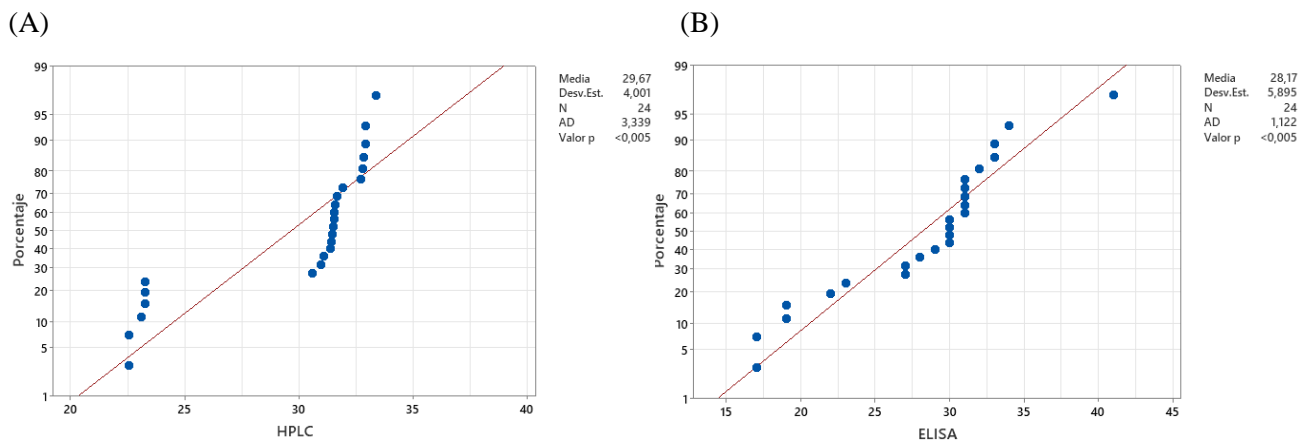


Figura 17 Gráficas de normalidad para HPLC y ELISA

Nota: El gráfico (A) corresponde al análisis de normalidad para los resultados de HPLC y (B) corresponde al análisis de normalidad para los resultados de ELISA, los cuales en ambos se obtuvo un valor $p < 0,005$

Una vez efectuado la prueba U de Mann-Whitney, se obtuvo un valor p de 0,078 con una confianza del 95,11 % por lo cual según definiciones teóricas de MiniTab (2019), al ser ($p > 0,05$), se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa, es decir, los resultados obtenidos en la medición de vitamina D por HPLC fueron diferentes frente a los obtenidos mediante la técnica ELISA.

5. Conclusiones

A lo largo de la presente investigación, se llevaron a cabo una serie de análisis y recopilación de datos para responder a la pregunta de investigación planteada y lograr los objetivos propuestos, por tal razón en este apartado se presentan los hallazgos clave y los patrones observados en los datos.

- La curva de calibración 2 (Figura 13) realizada con el estándar de 25-(OH) D₃ arrojó resultados satisfactorios, demostrando una excelente linealidad y precisión puesto que se obtuvo un valor de coeficiente de correlación R de 0,9999 lo cual indicó correlación lineal entre las respuestas analíticas obtenidas.
- El aislamiento de suero sanguíneo a partir de cuatro personas involucradas en la investigación se realizó con éxito, proporcionando las muestras necesarias para llevar a cabo las comparaciones entre las dos técnicas propuestas para la detección de Vitamina D.
- La cuantificación de los índices de Vitamina D mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa no permitió identificar por separado las dos formas de metabolitos medibles puesto que los metabolitos 25-OH D₃ y 25-OH D₂ se encontraban solapados es decir poseen un pico similar y el mismo tiempo de retención, además, en el laboratorio no se contaba con el equipo necesario para una visualización más avanzada de los picos en 3D que nos permita cuantificar por separado a estos metabolitos.
- La cuantificación de los índices de Vitamina D mediante el ensayo de inmunoabsorción enzimática ELISA también fue exitosa en la identificación de los metabolitos 25- (OH) D de forma general más no de forma específica para cada metabolito D₃ y D₂, obteniéndose promedios entre 19,50 a 32,67 ng/mL.
- Ambas técnicas ofrecieron resultados cuantitativos y es importante destacar que cada una presenta sus ventajas y limitaciones como se consideran a continuación: La cromatografía líquida de alta resolución HPLC, se destacó por su alta resolución, sensibilidad y precisión que fueron comprobados a través de la validación del método, sin embargo esta técnica requiere de un equipo especializado y de conocimientos técnicos avanzados para su correcto

manejo. Mientras que el ensayo ELISA mostró ser más sencillo y rápido de realizar, este dependerá de la sensibilidad del kit comercial, que el anticuerpo tenga una gran afinidad con el antígeno y que los resultados no sean afectados por interferencias y presencias de otras sustancias en la muestra, lo que podría conducir a resultados falsos positivos o falsos negativos.

- Por otro lado, la comparación de los resultados obtenidos mediante técnicas de inmunoadsorción enzimática ELISA y la cromatografía líquida de alta resolución HPLC mediante el análisis U de Mann-Whitney, reveló que existe diferencias significativas en los resultados por lo cual se concluye que la técnica de HPLC presenta resultados diferentes que el ensayo ELISA. Es importante destacar que, a pesar de que se obtuvieron valores ligeramente superiores en HPLC en comparación con el ensayo ELISA, este último sigue siendo una técnica ampliamente empleada en los Laboratorios Clínicos e Inmunológicos del Ecuador debido a su confiabilidad para detectar sustancias específicas, incluida la Vitamina D.

6. Recomendaciones

- Incorporar al sistema de HPLC un saturador de sílice columna (una pre-columna) a la columna previa a utilizar para evitar el deterioro de la misma al ser condicionada a los parámetros de funcionamiento como; temperatura, flujo y presión.
- Ajustar los parámetros de funcionamiento del HPLC a condiciones más adecuadas para lograr la separación de los analitos 25-(OH) D₂ y 25-(OH) D₃, en algunos casos puede ser necesario cambiar la fase móvil o cambiar a un flujo de gradiente.
- Implementar en futuras investigaciones el uso de HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) el mismo que permite cuantificar múltiples formas en 3D a diferentes longitudes de onda o que picos que al visualizarse únicamente en 2D no puedan ser identificados.
- La elección de estas técnicas dependerá de los requisitos del estudio, las limitaciones y los recursos disponibles de cada laboratorio.

Las recomendaciones presentadas en esta investigación tienen el potencial de mejorar, optimizar y realizar avances científicos dentro del tema propuesto y en campo más extensos como la farmacología, razón por la cual al implementar estas sugerencias se puede abrir el camino a nuevas investigaciones y mejoras prácticas en este campo de estudio, se alienta a los lectores a considerar estas recomendaciones como un punto de partida.

7. Bibliografía

- Aguirre, S. (2017). *Validación del método para la determinación de vitamina C (ácido ascórbico) en alimentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en el Laboratorio ECUACHEMLAB CÍA. LTDA.*
- Ayuso, M. (2020). *¿Qué alimentos contienen más vitamina D?*
<https://cuidateplus.marca.com/alimentacion/nutricion/2020/08/08/-alimentos-contienen-vitamina-d-173957.html>
- Bacha, D. S., Rahme, M., Al-Shaar, L., Baddoura, R., Halaby, G., Singh, R. J., Mahfoud, Z. R., Habib, R., Arabi, A., & El-Hajj Fuleihan, G. (2021). Vitamin D3 Requirement That Raises 25-Hydroxyvitamin D to Desirable Level in Overweight and Obese Elderly. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106(9), E3644–E3654. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab296>
- Balseca, A. N. (2019). *Determinación de parámetros de validación para valoración de vitamina C en jugos cítricos mediante HPLC para la facultado de Ciencias-ESPOCH.*
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/13252>
- Barberán, M., Aguilera, G., Brunet, L., & Maldonado, F. (2014). Deficit de Vitamina D. Revisión epidemiológica actual. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 25, 127–134.
- Bastidas, L. (2021). *Verificación del método para la identificación y cuantificación de vitamina A y D en leches fortificadas usando cromatografía líquida de alta resolución HPLC.*
- Benson, A. A., Toh, J. A., Vernon, N., & Jariwala, S. P. (2012). The role of vitamin D in the immunopathogenesis of allergic skin diseases. *Allergy*, 67(3), 296–301.
<https://doi.org/10.1111/J.1398-9995.2011.02755.X>
- Bikle, D. D., Patzek, S., & Wang, Y. (2018). Physiologic and pathophysiologic roles of extra renal CYP27b1: Case report and review. *Bone Reports*, 8, 255–267.
<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.02.004>

- Biotech. (2019). *Tipos de ELISA, ¿Conoces las diferencias?* <http://biotech-spain.com/es/articulos/tipos-de-elisa-conoces-las-diferencias/>
- Bioti, Y., Navarro, D., & Acosta, A. (2020). Vitamina D, más allá de la homeostasis cálcica. *Rev Cubana Endocrinol*, 31(02). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532020000200012
- Bofill, P. (2011). *Fotoprotección y vitamina D*. https://redcronicas.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2014/06/4.1.-Fotoprotecci%C3%B3n-Dra.-Bofill.pdf
- Bonevski, B., Bryant, J., Lambert, S., Brozek, I., & Rock, V. (2013). The ABC of Vitamin D: A Qualitative Study of the Knowledge and Attitudes Regarding Vitamin D Deficiency amongst Selected Population Groups. *Nutrients* 2013, Vol. 5, Pages 915-927, 5(3), 915–927. <https://doi.org/10.3390/NU5030915>
- Bravo, D. F., & Honduras, C. (2006). *Cuantificación de Vitamina D 3 (colecalfiferol) y D 2 (ergocalciferol) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)*. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/f34913e9-1350-4661-a183-436072d87d32/content>
- Bresson, J. L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K. I., Mangelsdorf, I., McArdle, H., Naska, A., Neuhäuser-Berthold, M., Nowicka, G., Pentieva, K., Sanz, Y., Siani, A., Sjödin, A., Stern, M., Tomé, D., Turck, D., Van Loveren, H., ... Willatts, P. (2016). Dietary reference values for vitamin D. *EFSA Journal*, 14(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4547>
- Cashman, K. D. (2020). Vitamin D Deficiency: Defining, Prevalence, Causes, and Strategies of Addressing. In *Calcified Tissue International* (Vol. 106, Issue 1, pp. 14–29). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00559-4>
- Cashman, K. D., van den Heuvel, E. G. H. M., Schoemaker, R. J. W., Prévéraud, D. P., Macdonald, H. M., & Arcot, J. (2017). 25-hydroxyvitamin D as a biomarker of vitamin D status and its

modeling to inform strategies for prevention of vitamin D deficiency within the population.

Advances in Nutrition, 8(6), 947–957. <https://doi.org/10.3945/an.117.015578>

Castillo, B., & González, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev Cubana Farm*, 30(01). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009

Cheng, J. B., Motola, D. L., Mangelsdorf, D. J., & Russell, D. W. (2003). De-orphanization of cytochrome P450 2R1: A microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 38084–38093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307028200>

Collado, Á. (2020). *Análisis de vitaminas liposobubles (A, D y E) mediante quimioluminiscencia*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALVARO%20COLLADO%20TORRES.pdf

De-Regil, L. M., Palacios, C., Lombardo, L. K., & Peña-Rosas, J. P. (2016). Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(1). https://doi.org/10.1002/14651858.CD008873.PUB3/MEDIA/CDSR/CD008873/REL0003/CD008873/IMAGE_N/NCD008873-CMP-002-16.PNG

Domingo, L. (2021). *Límite de detección y límite de cuantificación, ¿por qué es importante aprender a diferenciarlos?* <https://prevencionar.com/2021/05/25/limite-de-deteccion-y-limite-de-cuantificacion-por-que-es-importante-aprender-a-diferenciarlos/>

EACT LAB. (2020). *Cómo elegir el tubo de recolección de sangre correcto – ReactLab*. <https://reactlab.com.ec/cientifico/como-elegir-el-tubo-de-recoleccion-de-sangre-correcto/#tapa-roja>

- El Maaty, M. A. A., Hanafi, R. S., Aboul-Enein, H. Y., & Gad, M. Z. (2015). Design-of-experiment approach for HPLC analysis of 25-hydroxyvitamin d: A comparative assay with ELISA. *Journal of Chromatographic Science*, 53(1), 66–72. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu017>
- Elsevier, G. (2017, October 18). *Metabolismo-funciones- toxicidad y estados deficitarios de la vitamina D*. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/metabolismo-funciones-toxicidad-y-estados-deficitarios-de-la-vitamina-d>
- Elsori, D. H., & Hammoud, M. S. (2018). Vitamin D deficiency in mothers, neonates and children. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175, 195–199. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2017.01.023>
- Feehan, O., Magee, P. J., Pourshahidi, L. K., Armstrong, D. J., & McSorley, E. M. (2022). Vitamin D deficiency in nursing home residents: a systematic review. *Nutrition Reviews*. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUAC091>
- Gallardo, I. (2020). *Los alimentos ricos en vitamina D que debemos comer más ahora que tomamos menos el sol (y 32 recetas para que brillen)*. <https://www.directoalpaladar.com/salud/alimentos-ricos-vitamina-d-que-debemos-comer-tomamos-sol-32-recetas-brillen>
- García de Marina Bayo, A., Yusá Marco, D. J., & e-libro, Corp. (2016). *HPLC instrumental*. Editorial Universitat Politècnica de València.
- Garza Garza Mario Alberto, Aguilar Melgar Ashanti Edith, Dávila Garza Sergio Alberto, Galache Vega Pedro, & Santos Haliscak Roberto. (2020). Correlación de los valores de vitamina D con los de hormona antimülleriana en mujeres con infertilidad. In *Ginecología y Obstetricia de Mexico* (Vol. 88, Issue 2, pp. 127–129). Asociacion Mexicana de Ginecología y Obstetricia. <https://doi.org/10.24245/gom>
- Golzarand, M., Hollis, B. W., Mirmiran, P., Wagner, C. L., & Shab-Bidar, S. (2018). Vitamin D supplementation and body fat mass: a systematic review and meta-analysis. In *European Journal*

of *Clinical Nutrition* (Vol. 72, Issue 10, pp. 1345–1357). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/s41430-018-0132-z>

González-Wong, C., Fuentes-Barría, H., Aguilera-Eguía, R., Urbano-Cerda, S., Vera-Aguirre, V.,
González-Wong, C., Fuentes-Barría, H., Aguilera-Eguía, R., Urbano-Cerda, S., & Vera-Aguirre,
V. (2021). El rol de la vitamina D sobre el riesgo de preeclampsia: Revisión narrativa. *Revista
Chilena de Nutrición*, 48(1), 118–125. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000100118>

Grant, W. B. (2012). *Recomendaciones de Dosificación y Aplicaciones Clínicas sobre la Vitamina
D.* [chrome-
extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.doctoryourself.com/omns/esp/v08n
12-esp.pdf](http://www.doctoryourself.com/omns/esp/v08n12-esp.pdf)

Higdon, J., Delage, B., & Pauling, I. L. (2021). *Vitamina D, mecanismos de acción y mebatolismo.*
<https://ipi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-D#secrecion-insulina>

Hlb, I. O. (2023). *Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates.*

Holick, M. F. (1996). Vitamin D and Bone Health. *The Journal of Nutrition*, 126(suppl_4), 1159S-
1164S. https://doi.org/10.1093/JN/126.SUPPL_4.1159S

Holick, M. F. (2007). *Vitamin D Deficiency.* 357(3), 266–281.
<https://doi.org/10.1056/NEJMRA070553>

Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P.,
Murad, M. H., & Weaver, C. M. (2011). Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D
Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical
Endocrinology & Metabolism*, 96(7), 1911–1930. <https://doi.org/10.1210/JC.2011-0385>

Houghton, L. A., & Vieth, R. (2006). *The case against ergocalciferol (vitamin D 2) as a vitamin
supplement.* <https://academic.oup.com/ajcn/article/84/4/694/4633079>

- IBL. (2018). *Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de la 25-OH-Vitamina D total (Vitamina D2 y D3) en suero humano*. www.IBL-International.com
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). *Validation of Analytical Procedures Text and Methodology Q2 (R1)*.
- Jódar Gimeno, E. (2014a). Recomendaciones sobre cómo administrar la vitamina D: guías internacionales y nacionales. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 6(6), 19–22. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2014000500004>
- Jódar Gimeno, E. (2014b). Recomendaciones sobre cómo administrar la vitamina D: guías internacionales y nacionales. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 6(6), 19–22. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2014000500004>
- Khammissa, R. A. G., Fourie, J., Motswaledi, M. H., Ballyram, R., Lemmer, J., & Feller, L. (2018). The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/9276380>
- Ko, J.-H., Kwak, B.-M., Ahn, J.-H., Shim, S.-L., Kim, K.-S., Yoon, T.-H., Leem, D.-G., & Jeong, J.-Y. (2012). Development of Vitamin D Determination in Infant Formula by Column-Switching HPLC with UV Detector. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 32(5), 571–577. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2012.32.5.571>
- Krist, A. H., Davidson, K. W., Mangione, C. M., Cabana, M., Caughey, A. B., Davis, E. M., Donahue, K. E., Doubeni, C. A., Epling, J. W., Kubik, M., Li, L., Ogedegbe, G., Owens, D. K., Pbert, L., Silverstein, M., Stevermer, J., Tseng, C. W., & Wong, J. B. (2021). Screening for Vitamin D Deficiency in Adults: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 325(14), 1436–1442. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3069>

- Labomesa. (2023). *Autosampler HPLC L-3320H*. <https://labomersa.com/producto/autosampler-hplc-1-3320h/>
- LaboratoryInfo. (2020). *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications*. Biochemistry. <https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/High-performance-liquid-chromatography-hplc.jpg>
- Lensmeyer, G. L., Wiebe, D. A., Binkley, N., & Drezner, M. K. (2006). HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays. *Clinical Chemistry*, 52(6), 1120–1126. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.064956>
- Lorenzo, A. (2014, April 29). *La Vitamina D*. <https://www.asturnatura.com/temarios/biologia/energia-nutrientes-dieta/vitamina-d>
- Maldonado, G., Guerrero, R., & Ríos, C. (2017). Prevalencia de vitamina D en pacientes con enfermedades autoinmunes en Ecuador: estudio retrospectivo. *Revista Colombiana de Reumatología*, 24(4), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2017.08.001>
- Mansur, J. L., Tajer, C., Mariani, J., Inserra, F., Ferder, L., & Manucha, W. (2020). El suplemento con altas dosis de vitamina D podría representar una alternativa promisoriosa para prevenir o tratar la infección por COVID-19. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 32(6), 267–277. <https://doi.org/10.1016/J.ARTERI.2020.05.003>
- Manuel, J., & Gómez, Q. (2021). Métodos de determinación de vitamina D y sus metabolitos. Valor umbral de las manifestaciones óseas METABOLISMO DEL SISTEMA ENDOCRINO DE LA VITAMINA D. In *Rev Osteoporos Metab Miner* (Vol. 13, Issue 2).
- Martinelli, R. P., Rayego-Mateos, S., Alique, M., Márquez-Expósito, L., Tejedor-Santamaria, L., Ortiz, A., González-Parra, E., & Ruiz-Ortega, M. (2023). Vitamin D, Cellular Senescence and Chronic Kidney Diseases: What Is Missing in the Equation? *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 1349, 15(6), 1349. <https://doi.org/10.3390/NU15061349>

- Masvidal Aliberch, R. M., Ortigosa Gómez, S., Baraza Mendoza, M. C., & Garcia-Algar, O. (2012). Vitamina D: Fisiopatología y aplicabilidad clínica en pediatría. *Anales de Pediatría*, 77(4).
<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.05.019>
- Mayorga-Ponce, R. B., Graciano-Ventura, D. C., Hernández, A. M., Moctezuma-Jiménez, P. M., Pérez-Galindo, B., & Roldan-Carpio, A. (2022). Cuadro comparativo de Análisis Paramétrico y No Paramétrico Main Comparative table of Parametric and Non-Parametric Analysis. *Publicación Semestral*, 10(20), 90–93.
- MedlinePlus. (2021). *Vitamina D*. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003569.htm>]
- MedlinePlus. (2022). *Prueba de vitamina D*. <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-vitamina-d/>
- MedlinePlus. (2023). *Deficiencia de vitamina D*. <https://medlineplus.gov/spanish/vitamindeficiency.html#:~:text=Puede%20ser%20que%20usted%20no,exposici%C3%B3n%20a%20la%20luz%20solar>
- Melián, P. (2019). *Análisis de la Vitamina D en muestras biológicas mediante técnicas analíticas cromatográficas HPLC*.
- Minitab. (2011). *Más información sobre cómo interpretar la salida R&R del sistema de medición*. <https://blog.minitab.com/en/quality-data-analysis-and-statistics/how-to-interpret-gage-output-part-2>
- MiniTab. (2019). *¿Qué son los Valores T y los Valores P en Estadística?* <https://blog.minitab.com/es/que-son-los-valores-t-y-los-valores-p-en-estadistica>
- Monobind Inc. (2018). *25-OH Vitamin D Total (Vit D-Direct) Test System Product Code: 9425-300*.
- Munns, C. F., Shaw, N., Kiely, M., Specker, B. L., Thacher, T. D., Ozono, K., Michigami, T., Tiosano, D., Mughal, M. Z., Mäkitie, O., Ramos-Abad, L., Ward, L., Dimeglio, L. A., Atapattu, N., Cassinelli, H., Braegger, C., Pettifor, J. M., Seth, A., Idris, H. W., ... Högler, W. (2016).

Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. In *Hormone Research in Paediatrics* (Vol. 85, Issue 2, pp. 83–106). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000443136>

National Center for Biotechnology Information. (2023a). *Cholecalciferol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280795>

National Center for Biotechnology Information. (2023b). *Ergocalciferol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280793>

Navarro-Triviño, F. J., Arias-Santiago, S., & Gilaberte-Calzada, Y. (2019). Vitamina D y la piel. Una revisión para dermatólogos. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 110(4), 262–272. <https://doi.org/10.1016/J.AD.2018.08.006>

NIH. (2022). *Vitamina D - Hoja informativa para consumidores*. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-DatosEnEspañol/>

Pérez, V. (2021). *Revisión sistemática sobre la relevancia del estado de la vitamina D en sujetos con sobrepeso u obesidad*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26452/1/250069.pdf>

Pham, T. T. M., Huang, Y. L., Chao, J. C. J., Chang, J. S., Chen, Y. C., Wang, F. F., & Bai, C. H. (2021). Plasma 25(OH)d concentrations and gestational diabetes mellitus among pregnant women in taiwan. *Nutrients*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/nu13082538>

Pharma, K. (2019). *Déficit de Vitamina D, problema mundial*. <https://www.kernpharma.com/es/blog/deficit-de-vitamina-d-problema-mundial>

Prabhu, A. V., Luu, W., Sharpe, L. J., & Brown, A. J. (2017). Phosphorylation regulates activity of 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7), a terminal enzyme of cholesterol synthesis. *Journal*

of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 165, 363–368.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.08.003>

Ramirez, A. (2022). *ELISA como herramienta de diagnóstico*.

https://www.3tres3.com/latam/articulos/elisa-como-herramienta-de-diagnostico-1-2-principios-basicos_14334/

Rodríguez, A., Montelongo, E., Martínez, A., Puente, A., & Reyes, R. (2020). *Vista de La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo de mortalidad en pacientes con COVID-19*. *Revista Sanidad*. <https://revistasanidadmilitar.org/index.php/rsm/article/view/1/2>

Rodriguez, E. (2015). *Análisis del sistema de medición mediante estudio de repetibilidad y reproducibilidad en Schott envases farmacéuticos [Ingeniería Industrial]*. Fundación Universitaria Los Libertadores.

Rodríguez, E., Aparicio, A., Sánchez-Rodríguez, P., Lorenzo-Mora, A. M., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2019). Vitamin D deficiency in Spanish population. Importance of egg on nutritional improvement. *Nutricion Hospitalaria*, 36(Ext3), 3–7. <https://doi.org/10.20960/nh.02798>

Rossi, M., Federico, G., Corso, G., Parenti, G., Battagliese, A., Frascogna, A. R., Della Casa, R., Russo, A. Dello, Strisciuglio, P., Saggese, G., & Andria, G. (2005). Vitamin D status in patients affected by Smith[^]Lemli[^]Opitz syndrome. In *J. Inherit. Metab. Dis* (Vol. 28).

Rumancela, L. M. (2021). *Cuantificación de vitamina D en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes*. 3(2), 6.

Rumancela, M. (2021). *Cuantificación de vitamina D en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes*.

- Saponaro, F., Saba, A., & Zucchi, R. (2020). An update on vitamin d metabolism. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>
- Schüep, W. (1997). Análisis de Vitaminas en Alimentos. In *Análisis de Vitaminas en Alimentos* (pp. 1–29).
- Seamans, K. M., & Cashman, K. D. (2009). Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27230D>
- Serrano Díaz, N., Guío Mahecha, E., González, A., Plata Paredes, L., Quintero Lesmes, D. C., & Becerra Bayona, S. (2017). Cuantificación de la Vitamina D: De la práctica a la clínica. *Biosalud*, 16(1), 67–79. <https://doi.org/10.17151/biosa.2017.16.1.8>
- Serrano-Moreno, W. (2019). *Asociación de los niveles de la Vitamina D (25-[OH] D3) con la presencia de deterioro cognitivo en adultos mayores con Diabetes Mellitus Tipo 2. Estudio de casos y controles.* <https://www.researchgate.net/publication/366091545>
- Snyder, L. R., & Joseph, J. (1997). Practical HPLC Method Development. In *Analytical Chemistry* (Vol. 64, Issue 13). <https://doi.org/10.1021/ac00037a722>
- Sosa Henríquez, M., Gómez de Tejada Romero, M., Sosa Henríquez, M., & Gómez de Tejada Romero, M. (2021). La suplementación de calcio y vitamina D en el manejo de la osteoporosis. ¿Cuál es la dosis aconsejable de vitamina D? *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 13(2), 77–83. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2021000200006>
- Spina, C. S., Tangpricha, V., Uskokovic, M., Adorinic, L., & Maehr, H. (2006). Historical Perspective on the Role of Sunlight and Vitamin D on Bone Health and Cancer Prevention. *Anticancer Research*, 26, 2515–2524.

- Stokes, C. S., Lammert, F., & Volmer, D. A. (2018). Analytical methods for quantification of Vitamin D and implications for research and clinical practice. In *Anticancer Research* (Vol. 38, Issue 2, pp. 1137–1144). International Institute of Anticancer Research. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12332>
- Surwit. (1998). *Software N2000 Chromatostation*. <http://www.surwit.com/en/about.html>
- Tian, X. Q., & Holick, M. F. (1995). Catalyzed thermal isomerization between previtamin D3 and vitamin D3 via β -cyclodextrin complexation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(15), 8706–8711. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8706>
- Torralvo, J. (2017). *Validación de un método químico analítico de HPLC en R*.
- Valero Zanuy, M. Á., & Hawkins Carranza, F. (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. In *Revista Espanola de Enfermedades Metabolicas Oseas* (Vol. 16, Issue 4, pp. 63–70). Ediciones Doyma, S.L. [https://doi.org/10.1016/S1132-8460\(07\)73506-7](https://doi.org/10.1016/S1132-8460(07)73506-7)
- Villafuerte-Ledesma, H. M., Moragrega, B., Castellón, E., Luzón-Alonso, M., García-Mena, M., Villafuerte-Ledesma, H. M., Moragrega, B., Castellón, E., Luzón-Alonso, M., & García-Mena, M. (2020). Asociación entre los niveles séricos de vitamina D y marcadores inflamatorios en pacientes en hemodiálisis. *Gaceta Médica de México*, 156(6), 519–525. <https://doi.org/10.24875/GMM.20000004>
- Villalta, M., Paúl, J., Albán, L., & Salvador, J. (2022). *Universidad de Guayaquil*. Universidad de Guayaquil .
- Wagner, C. L., & Greer, F. R. (2008). Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. In *Pediatrics* (Vol. 122, Issue 5, pp. 1142–1152). <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1862>
- Wang, E. W., Siu, P. M., Pang, M. Y., Woo, J., Collins, A. R., & Benzie, I. F. F. (2017). Vitamin D deficiency, oxidative stress and antioxidant status: only weak association seen in the absence of

advanced age, obesity or pre-existing disease. *British Journal of Nutrition*, 118(1), 11–16.

<https://doi.org/10.1017/S000711451700188X>

Wu, Y., Zeng, Y., Zhang, Q., & Xiao, X. (2023). The Role of Maternal Vitamin D Deficiency in Offspring Obesity: A Narrative Review. *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 533, 15(3), 533.

<https://doi.org/10.3390/NU15030533>

Zárate, A. (2019). *Determinación de Vitamina D y Calcio en suero*.

Zúñiga, N. (2015, November 26). *Vitamina D*. <https://www.fitnessveganooficial.com/vitamina-d>

8. Anexos

Anexo 1 Convenio específico entre Laboratorio Clínico e Inmunológico INMUNOLAB y la Universidad Politécnica Salesiana para favorecer el desarrollo de trabajos de titulación por parte de estudiantes del nivel de grado de la UPS.



CONVENIO ESPECÍFICO ENTRE LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA PARA FAVORECER EL DESARROLLO DE TRABAJOS DE TITULACIÓN POR PARTE DE ESTUDIANTES DEL NIVEL DE GRADO DE LA UPS.

Concurren a la celebración del presente Convenio, por una parte, LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB, representada legalmente por el Dr. Galo Leoro Monroy a quien en adelante se le denominará INMUNOLAB y, por otra parte, la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, representada por María Sol Villagómez, PhD. en su calidad de Vicerrectora de la Sede Quito y la Dra. Ana Reino Molina, en calidad de Procuradora, quienes en adelante se le denominará como La UNIVERSIDAD. Las partes libre y voluntariamente convienen en celebrar el presente convenio interinstitucional con sujeción a las siguientes cláusulas:

PRIMERA: ANTECEDENTES. -

1. El Laboratorio Clínico Inmunológico INMUNOLAB, fue fundado el 11 de Octubre de 1987 en la ciudad de Quito, tuvo su inicio como compañía limitada, actualmente es empresa bajo R.U.C. otorgado a la persona natural Galo Leoro M. con número 0601287006001. Desde su inicio INMUNOLAB ha tenido como objetivo brindar a los habitantes de la Ciudad de Quito el servicio de diagnóstico de laboratorio de alta complejidad teniendo en consideración las limitadas posibilidades económicas de las clases menos favorecidas de esta Ciudad. Adicionalmente, INMUNOLAB se ha caracterizado por una política de puertas abiertas a estudiantes y profesionales de la rama para la realización de prácticas, pasantías y trabajos de investigación
2. La Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador creada mediante Ley N° 63, publicada en el Registro Oficial N° 499 de 5 de agosto del 1994, es una Institución de Educación Superior particular cofinanciada, católica. Es una persona jurídica de derecho privado, con finalidad social, sin fines de lucro. Acreditada por el Consejo de Acreditación y Aseguramiento de la Calidad (CACES) mediante resolución No. 161-SE-33-CACES-2020.

Su Sede Matriz y domicilio principal se halla en la ciudad de Cuenca, con sedes en las ciudades de Quito y Guayaquil, y con una extensión en el cantón Cayambe dependiente de la Sede Quito en lo académico y administrativo.

Entre otros, su fin es formar personas con madurez humana que sepan hacer coherentemente la síntesis de ética, vida y cultura, para que actúen en la historia en la línea de la justicia, solidaridad y fraternidad, testimoniando los valores éticos más altos del ser humano.

SEGUNDA: OBJETO. -

Con los antecedentes señalados, INMUNOLAB y la UNIVERSIDAD, acuerdan celebrar el presente Convenio de Cooperación, mediante el cual, las partes suscriptoras se comprometen y

se obligan recíprocamente a colaborar y cooperar conjuntamente para generar el proyecto de titulación propuesto, considerando el mutuo beneficio para las partes interesadas.

A favor de las estudiantes: Ana Elizabeth Pasquel Gordón con C.I 1717856171 y Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel con C.I 1725791303, estudiantes de la Universidad Politécnica Salesiana, bajo la tutoría del docente Marco Vinicio Ibarra Martínez, proponen la realización de la investigación titulada “Comparación entre las técnicas de HPLC y ELISA para la detección de Vitamina D en suero sanguíneo”.

TERCERA: RESPONSABILIDADES. -

RESPONSABILIDADES DE INMUNOLAB

Sin perjuicio de las obligaciones establecidas en la normativa que regula lo relativo a trabajos de grado, INMUNOLAB se compromete a:

1. Cumplir y hacer cumplir todas las Cláusulas del Convenio.
2. Designar al administrador del convenio que intervendrá en la supervisión seguimiento y evaluación del Convenio.
3. INMUNILAB se compromete a Facilitar, a las estudiantes de la UPS la información, así como el apoyo técnico-profesional para la estructuración de la investigación y desarrollo de esta.
4. El tiempo a realizarse la investigación, los horarios, actividades, serán determinadas por INMUNOLAB y las estudiantes según sus capacidades, necesidades y políticas internas, al tiempo de iniciación.
5. INMUNOLAB facilitará el acceso a la información y autorizará el uso de aquella que se genere como fruto de la investigación y procesos desarrollados de manera conjunta, con fines académicos y de divulgación científica con el respectivo reconocimiento de autorías.

RESPONSABILIDAD DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA. -

1. Cumplir y hacer cumplir todas las Cláusulas del Convenio.
2. Designar al administrador del convenio que intervendrá en la supervisión seguimiento y evaluación del Convenio.
3. La U.P.S. se compromete, conforme a su propio reglamento de proyectos de titulación, a hacer un seguimiento de cada uno de los estudiantes.
4. Para la realización de cada proyecto se establecerá una propuesta del proyecto bajo el formato institucional avalado y aprobado por el tutor asignado y por el Consejo de Carrera por cada alumno, en el cual se regularán las relaciones entre el Laboratorio clínico e inmunológico INMUNOLAB y las alumnas, de conformidad a los requerimientos institucionales.
5. Al finalizar el plazo del presente documento, el administrador del convenio deberá entregar un informe de las actividades realizadas con la institución contra parte.

OCTAVA: PROPIEDAD INTELECTUAL

Los descubrimientos e invenciones, las mejoras en los procedimientos, así como los trabajos y resultados de las actividades del practicante, se sujetarán a lo establecido Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación y la normativa a nivel internacional en materia de propiedad intelectual.

Las Partes se comprometen a guardar y cuidar que se mantenga absoluta confidencialidad de toda la información de la contraparte que llegue a su conocimiento sin limitarse a información verbal, escrita, o por cualquier otro medio, sea o no protegida por derechos de propiedad intelectual, en especial la relacionada con datos personales, los procedimientos, modelos de gestión y negocio, secretos comerciales y políticas internas, que por motivo del presente convenio lleguen a su conocimiento y que no se encuentren catalogados como información pública de acuerdo a la LOTAIP.

La Información Confidencial, así como los materiales de investigaciones utilizados, no podrán bajo ninguna circunstancia ser revelada a terceros, excepto que existiere autorización expresa y por escrito de la parte propietaria de la Información Confidencial, ni podrán realizar las Partes actos de disposición sobre la misma sea con fines comerciales o científicos con la excepción de las autorizaciones expresamente previstas en el presente artículo.

Las Partes se obligan a sí mismos a comprometer al personal que tuviera acceso a la Información Confidencial, a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial, asumiendo en forma personal quien así obrare, la responsabilidad civil y/o penal que le fuera aplicable. A fin de dar cumplimiento a lo anterior, los profesionales y/o el personal técnico y/o asistentes que deban intervenir total o parcialmente de las tareas relacionadas con la investigación objeto del presente, deberán suscribir Acuerdos de Confidencialidad.

NOVENA: DOMICILIO. -

- **LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB:**

Dirección: Avenida Gran Colombia 13-18 y Julio Castro

Teléfono: 02 2239379

Correo Electrónico: laboratorioinmunolab@hotmail.com

- **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA:**

Dirección: Av. 12 de octubre 2422 y Presidente Wilson

Teléfono: 39628000 y 3962900

Correo Electrónico: tmosquera@ups.edu.ec.

Cualquier cambio de dirección deberá ser notificado por escrito a las otras Partes para que surta sus efectos legales; de lo contrario tendrán validez los avisos efectuados a las direcciones antes indicadas.

Se deja expresa constancia que cualquier notificación se realizará a los correos antes mencionados.

OCTAVA: PROPIEDAD INTELECTUAL

Los descubrimientos e invenciones, las mejoras en los procedimientos, así como los trabajos y resultados de las actividades del practicante, se sujetarán a lo establecido Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación y la normativa a nivel internacional en materia de propiedad intelectual.

Las Partes se comprometen a guardar y cuidar que se mantenga absoluta confidencialidad de toda la información de la contraparte que llegue a su conocimiento sin limitarse a información verbal, escrita, o por cualquier otro medio, sea o no protegida por derechos de propiedad intelectual, en especial la relacionada con datos personales, los procedimientos, modelos de gestión y negocio, secretos comerciales y políticas internas, que por motivo del presente convenio lleguen a su conocimiento y que no se encuentren catalogados como información pública de acuerdo a la LOTAIP.

La Información Confidencial, así como los materiales de investigaciones utilizados, no podrán bajo ninguna circunstancia ser revelada a terceros, excepto que existiere autorización expresa y por escrito de la parte propietaria de la Información Confidencial, ni podrán realizar las Partes actos de disposición sobre la misma sea con fines comerciales o científicos con la excepción de las autorizaciones expresamente previstas en el presente artículo.

Las Partes se obligan a sí mismos a comprometer al personal que tuviera acceso a la Información Confidencial, a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial, asumiendo en forma personal quien así obrare, la responsabilidad civil y/o penal que le fuera aplicable. A fin de dar cumplimiento a lo anterior, los profesionales y/o el personal técnico y/o asistentes que deban intervenir total o parcialmente de las tareas relacionadas con la investigación objeto del presente, deberán suscribir Acuerdos de Confidencialidad.

NOVENA: DOMICILIO. -

- **LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB:**

Dirección: Avenida Gran Colombia 13-18 y Julio Castro

Teléfono: 02 2239379

Correo Electrónico: laboratorioinmunolab@hotmail.com

- **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA:**

Dirección: Av. 12 de octubre 2422 y Presidente Wilson

Teléfono: 39628000 y 3962900

Correo Electrónico: tmosquera@ups.edu.ec.

Cualquier cambio de dirección deberá ser notificado por escrito a las otras Partes para que surta sus efectos legales; de lo contrario tendrán validez los avisos efectuados a las direcciones antes indicadas.

Se deja expresa constancia que cualquier notificación se realizará a los correos antes mencionados.

DECIMA: CONTROVERSIAS. -

En caso de controversias, que se deriven de la aplicación de los términos del presente convenio, las partes agotarán todos los mecanismos amigables pertinentes para la solución de éstas; y, solo en el caso que no sea posible solucionarlos, podrán recurrir al procedimiento de mediación, en el Centro de Mediación de la Cámara de Comercio de Quito, de no alcanzar acuerdo de dichas instancias, las partes someterán sus controversias a los Jueces competentes de Quito.

DÉCIMA PRIMERA: DOCUMENTOS HABILITANTES

Forman parte integrante del presente Convenio, los siguientes documentos habilitantes:

- a) Copia del nombramiento de Gerente General de INMUNOLAB
- b) Copia del nombramiento de la Vicerrectora de Sede de la UPS.
- c) Copia del nombramiento de la Procuradora de la UPS.

DÉCIMA SEGUNDA: ACEPTACIÓN Y RATIFICACIÓN. -

Las partes declaran expresamente su aceptación de todo el contenido del presente Convenio, por haber sido elaborado en seguridad de sus respectivos intereses.

Para constancia de las declaraciones presentes y ratificándose en todo su contenido y fiel cumplimiento de lo estipulado, firman tres ejemplares de igual valor y tenor, en la ciudad de Quito, a los 10 días del mes de marzo del 2023.

**POR: LABORATORIO CLÍNICO
E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB**



Dr. Galo Leoro Monroy
**GERENTE GENERAL
LABORATORIO CLÍNICO E
INMUNOLÓGICO INMUNOLAB**

**POR: LA UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA SALESIANA**



María Sol Villagómez PhD.
**VICERRECTORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA
SEDE QUITO**



Dra. Ana Reino Molina
**PROCURADORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA**

Gestionado por:	Mgtr. Tatiana Mosquera	22-02-2023
Realizado por:	Lcdo. Darwin Cáceres	22-02-2023
Revisado por:	Mgtr. Nancy Bastidas	22-02-2023
Aprobación de Sede:	Mgtr. Maria Sol Villagómez R. Ph.D.	22-02-2023
Revisión Legal:	Procuraduría	28-02-2023

ANEXO A

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE
POR PUNCIÓN VENOSA**

Nombre y Apellido: _____
Sexo: F M
C.I: _____
Edad y Fecha de nacimiento: _____
Grupo Sanguíneo: Rh _____
Teléfono: _____
Correo: _____

Esta autorización firmada tendrá vigencia durante los siguientes periodos:

- Durante el curso de la investigación, desde el primer día de obtención de la muestra sanguínea.
- Valida hasta la presentación y publicación de la investigación como plan de titulación para la obtención de título de postgrado.

1. Usted ha sido invitado/a a participar en el proyecto de titulación **“COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO”** propuesto por las investigadoras Pasquel Gordón Ana Elizabeth y Changoluisa Coronel Cristina Elizabeth estudiantes de la Carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.
2. La presente investigación será parte de un convenio con las instalaciones del Laboratorio **“INMUNOLAB”** a cargo del Dr. Galo Leoro Monroy.
3. Le pedimos participar en este estudio, porque usted es mayor de edad y su ayuda es de importancia para la presente investigación.

4. Su participación es totalmente voluntaria, puede negarse a participar o dejar de participar en cualquier momento sin dar explicaciones o recibir sanción alguna.
5. La identidad de los participantes estará disponible únicamente con el personal relacionado con la investigación y se mantendrá en completa confidencialidad, se guardará el anonimato y la información recolectada no será usada para ningún otro propósito, además de los señalados anteriormente.
6. Su participación consistirá en la obtención de una muestra sanguínea por punción venosa (la cantidad de un tubo de 5 mL), la cual no involucrará ningún daño o peligro para su salud física o mental.

He leído y comprendo totalmente este documento de autorización. Estoy de acuerdo y satisfecho con las explicaciones proporcionadas por las investigadoras al contestar a todas mis preguntas.

Agradecemos desde ya su colaboración.

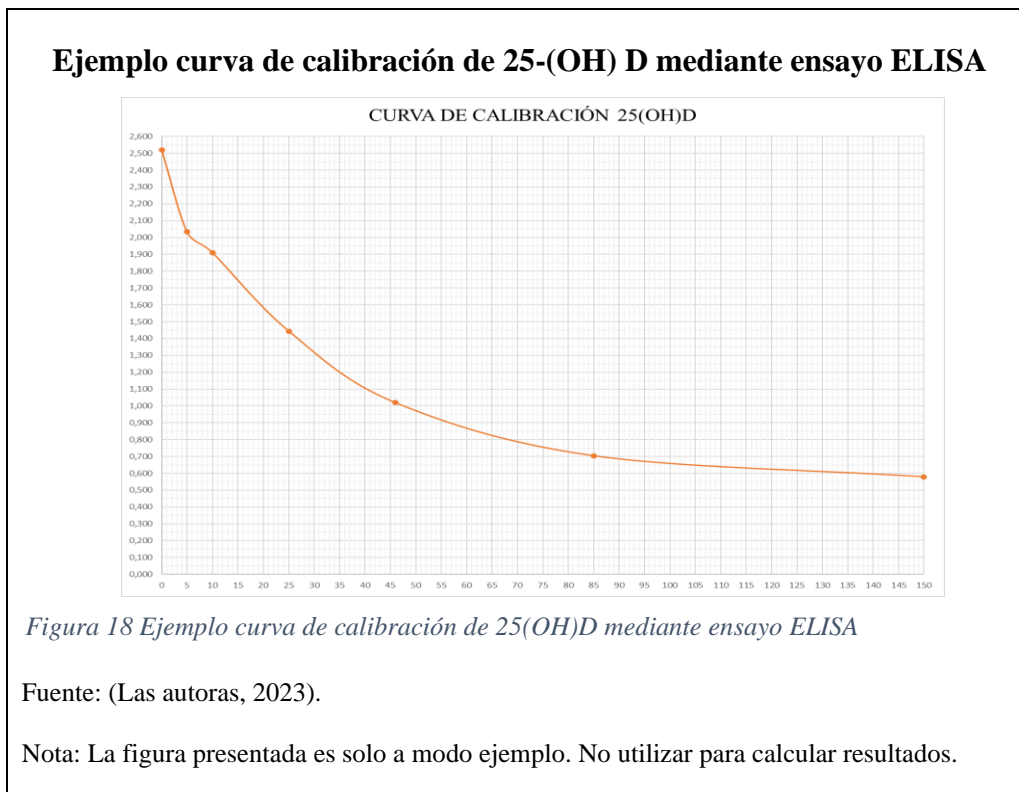
INVESTIGADOR

VOLUNTARIO/A

Protocolo kit comercial Accu Bind Ensayo ELISA 25(OH) D

1. Pipetear 25µL de los calibradores (0, 5, 10, 25, 46, 85, y 150 ng/mL) y 25 µL de los controles M y N en cada pocillo asignado.
2. Agregar 100 µL del agente liberador de vitamina D 25-OH a todos los pocillos.
3. Mezclar la microplaca durante 20-30 segundos hasta su homogenización.
4. Cubrir los pocillos con la envoltura de plástico de microplacas y dejarlo incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad.
5. Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración, en caso de realizarlo por medio de un proceso de decantación, secar lo sobrante con ayuda de papel absorbente.
6. Agregar 350 µL de tampón de lavado para luego realizar su respectiva decantación. Repetir dos veces más este proceso para llegar a un total de 3 lavados.
7. Añadir 100 µL de reactivo enzimático 25-OH vitamina D a todos los pocillos. No agitar la placa después de la adición de este reactivo.
8. Cubrir e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad.
9. Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración, siguiendo lo anteriormente explicado.
10. Agregar 350 µL de tampón de lavado, decantar y repetir dos veces más.
11. Agregar 100 µL de reactivo de sustrato a todos los pocillos. No agitar la placa después de la adición de este reactivo.
12. Incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 20 minutos.
13. Agregar 50 µL de solución de parada a cada pocillo y mezclar suavemente durante 15 a 20 segundos.
14. Leer la absorbancia a 450 nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-639 nm).
15. Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.

16. Grafique la absorbancia de cada calibrador duplicado frente a la concentración de 25-(OH) D correspondiente en ng/mL.
17. Conecte los puntos con una curva de mejor ajuste como se muestra de ejemplo en la Figura 18.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE POR PUNCIÓN VENOSA

Nombre y Apellido:

Cristina Elizabeth Changoluisa Coronel

Sexo: F M

C.I: 1725791303

Edad y Fecha de nacimiento: 22 años / 20-Febrero-2001

Grupo Sanguíneo: Rh A⁺

Teléfono: 0960522324

Correo: cechc201du@hotmail.com

Esta autorización firmada tendrá vigencia durante los siguientes periodos:

- Durante el curso de la investigación, desde el primer día de obtención de la muestra sanguínea.
 - Valida hasta la presentación y publicación de la investigación como plan de titulación para la obtención de título de postgrado.
1. Usted ha sido invitado/a a participar en el proyecto de titulación **“COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO”** propuesto por las investigadoras Pasquel Gordón Ana Elizabeth y Changoluisa Coronel Cristina Elizabeth estudiantes de la Carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.
 2. La presente investigación será parte de un convenio con las instalaciones del Laboratorio **“INMUNOLAB”** a cargo del Dr. Galo Leoro Monroy.
 3. Le pedimos participar en este estudio, porque usted es mayor de edad y su ayuda es de importancia para la presente investigación.
 4. Su participación es totalmente voluntaria, puede negarse a participar o dejar de participar en cualquier momento sin dar explicaciones o recibir sanción alguna.
 5. La identidad de los participantes estará disponible únicamente con el personal relacionado con la investigación y se mantendrá en completa confidencialidad, se guardará el anonimato y la información recolectada no será usada para ningún otro propósito, además de los señalados anteriormente.
 6. Su participación consistirá en la obtención de una muestra sanguínea por punción venosa (la cantidad de un tubo de 5 mL), la cual no involucrará ningún daño o peligro para su salud física o mental.

He leído y comprendo totalmente este documento de autorización. Estoy de acuerdo y satisfecho con las explicaciones proporcionadas por las investigadoras al contestar a todas mis preguntas.

Agradecemos desde ya su colaboración.

INVESTIGADOR

VOLUNTARIO/A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE POR PUNCIÓN VENOSA

Nombre y Apellido:

Ana Elizabeth Pasquel Gordón

Sexo: F M

C.I: 1717856171

Edad y Fecha de nacimiento: 25 años / 20-October-1998

Grupo Sanguíneo: Rh

Teléfono: 0983792724

Correo: apasquel@est.upb.edu.ec

Esta autorización firmada tendrá vigencia durante los siguientes periodos:

- Durante el curso de la investigación, desde el primer día de obtención de la muestra sanguínea.
- Valida hasta la presentación y publicación de la investigación como plan de titulación para la obtención de título de postgrado.

1. Usted ha sido invitado/a a participar en el proyecto de titulación **“COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO”** propuesto por las investigadoras Pasquel Gordón Ana Elizabeth y Changoluisa Coronel Cristina Elizabeth estudiantes de la Carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.
2. La presente investigación será parte de un convenio con las instalaciones del Laboratorio “INMUNOLAB” a cargo del Dr. Galo Leoro Monroy.
3. Le pedimos participar en este estudio, porque usted es mayor de edad y su ayuda es de importancia para la presente investigación.
4. Su participación es totalmente voluntaria, puede negarse a participar o dejar de participar en cualquier momento sin dar explicaciones o recibir sanción alguna.
5. La identidad de los participantes estará disponible únicamente con el personal relacionado con la investigación y se mantendrá en completa confidencialidad, se guardará el anonimato y la información recolectada no será usada para ningún otro propósito, además de los señalados anteriormente.
6. Su participación consistirá en la obtención de una muestra sanguínea por punción venosa (la cantidad de un tubo de 5 mL), la cual no involucrará ningún daño o peligro para su salud física o mental.

He leído y comprendo totalmente este documento de autorización. Estoy de acuerdo y satisfecho con las explicaciones proporcionadas por las investigadoras al contestar a todas mis preguntas.

Agradecemos desde ya su colaboración.

INVESTIGADOR

VOLUNTARIO/A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE POR PUNCIÓN VENOSA

Nombre y Apellido: Marco Ibarra

Sexo: F M

C.I: 172087832-9

Edad y Fecha de nacimiento: 37 años 02-04-1986

Grupo Sanguíneo: Rh O+

Teléfono: 0983000708

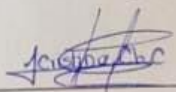
Correo: markv.1986@gmail.com

Esta autorización firmada tendrá vigencia durante los siguientes periodos:

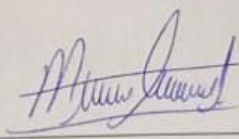
- Durante el curso de la investigación, desde el primer día de obtención de la muestra sanguínea.
 - Valida hasta la presentación y publicación de la investigación como plan de titulación para la obtención de título de postgrado.
1. Usted ha sido invitado/a a participar en el proyecto de titulación **“COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO”** propuesto por las investigadoras Pasquel Gordón Ana Elizabeth y Changoluisa Coronel Cristina Elizabeth estudiantes de la Carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.
 2. La presente investigación será parte de un convenio con las instalaciones del Laboratorio “INMUNOLAB” a cargo del Dr. Galo Leoro Monroy.
 3. Le pedimos participar en este estudio, porque usted es mayor de edad y su ayuda es de importancia para la presente investigación.
 4. Su participación es totalmente voluntaria, puede negarse a participar o dejar de participar en cualquier momento sin dar explicaciones o recibir sanción alguna.
 5. La identidad de los participantes estará disponible únicamente con el personal relacionado con la investigación y se mantendrá en completa confidencialidad, se guardará el anonimato y la información recolectada no será usada para ningún otro propósito, además de los señalados anteriormente.
 6. Su participación consistirá en la obtención de una muestra sanguínea por punción venosa (la cantidad de un tubo de 5 mL), la cual no involucrará ningún daño o peligro para su salud física o mental.

He leído y comprendo totalmente este documento de autorización. Estoy de acuerdo y satisfecho con las explicaciones proporcionadas por las investigadoras al contestar a todas mis preguntas.

Agradecemos desde ya su colaboración.



INVESTIGADOR



VOLUNTARIO/A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE POR PUNCIÓN VENOSA

Nombre y Apellido: GALO LEORO MONROY
Sexo: F (M)
C.I: 060 128 700 6
Edad y Fecha de nacimiento: 63 19 OCT 1959
Grupo Sanguíneo: Rh B⁺
Teléfono: 2239379
Correo: gleoro@hotmail.com

Esta autorización firmada tendrá vigencia durante los siguientes periodos:

- Durante el curso de la investigación, desde el primer día de obtención de la muestra sanguínea.
 - Valida hasta la presentación y publicación de la investigación como plan de titulación para la obtención de título de postgrado.
1. Usted ha sido invitado/a a participar en el proyecto de titulación "COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE HPLC Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DE VITAMINA D EN SUERO SANGUÍNEO" propuesto por las investigadoras Pasquel Gordón Ana Elizabeth y Changoluisa Coronel Cristina Elizabeth estudiantes de la Carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana.
 2. La presente investigación será parte de un convenio con las instalaciones del Laboratorio "INMUNOLAB" a cargo del Dr. Galo Leoro Monroy.
 3. Le pedimos participar en este estudio, porque usted es mayor de edad y su ayuda es de importancia para la presente investigación.
 4. Su participación es totalmente voluntaria, puede negarse a participar o dejar de participar en cualquier momento sin dar explicaciones o recibir sanción alguna.
 5. La identidad de los participantes estará disponible únicamente con el personal relacionado con la investigación y se mantendrá en completa confidencialidad, se guardará el anonimato y la información recolectada no será usada para ningún otro propósito, además de los señalados anteriormente.
 6. Su participación consistirá en la obtención de una muestra sanguínea por punción venosa (la cantidad de un tubo de 5 mL), la cual no involucrará ningún daño o peligro para su salud física o mental.

He leído y comprendo totalmente este documento de autorización. Estoy de acuerdo y satisfecho con las explicaciones proporcionadas por las investigadoras al contestar a todas mis preguntas.

Agradecemos desde ya su colaboración.



INVESTIGADOR



VOLUNTARIO/A

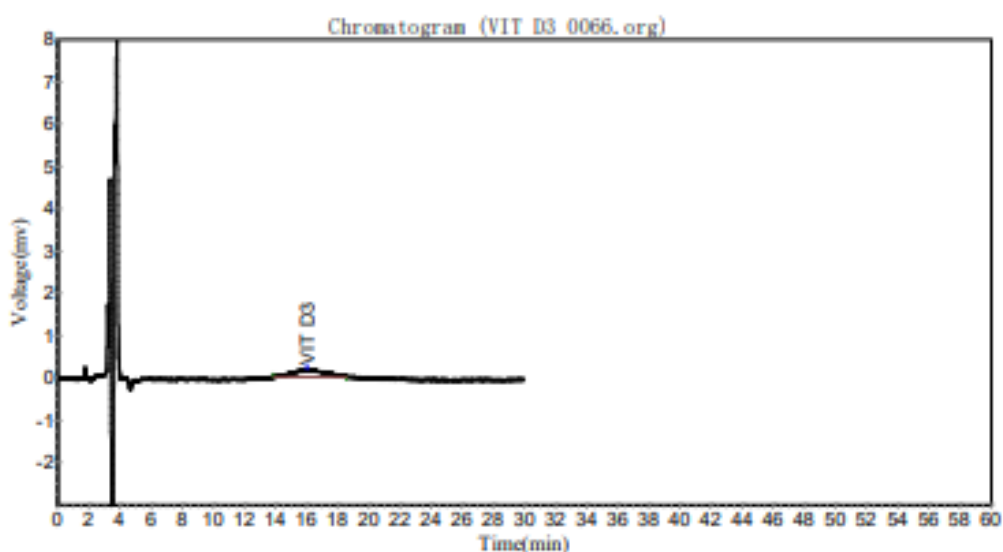
PROYECTO VIT D3

VITAMINA D3

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Date/Time: 2023-06-07, 0:50:37
 0066.org Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH:AGUA (67:33)
 FLUJO: 0.8 mL/min
 CURVA DE CALIBRACION
 CONCENTRACION 10ng/mL



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D3	16,035	173,000	22773,500	100,0000
Total			173,000	22773,500	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	70,000	0,000	10000,000	0,000	4,000	30,000	100,0000

System Evaluation

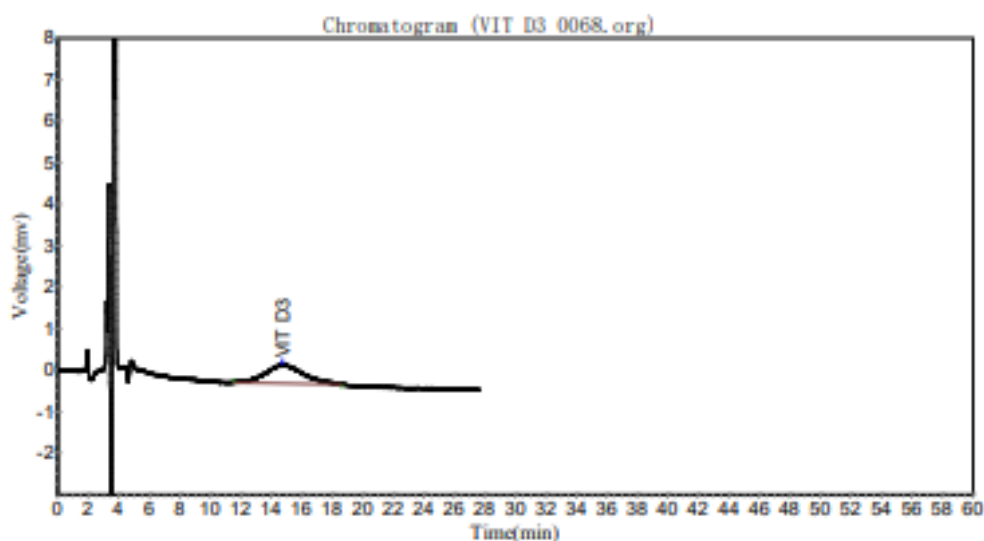
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D3	16,035	1,247	882,931	0,000	1,307	1,612

VITAMINA D3

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-05, 14:49:36 Date/Time: 2023-06-07, 1:05:34
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0068.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH:AGUA (67:33)
 FLUJO: 0.8 mL/min
 CURVA DE CALIBRACION
 CONCENTRACION 20ng/mL



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D3	14,717	457,177	76885,078	100,0000
Total			457,177	76885,078	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	2000,000	0,000	5,000	27,657	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D3	14,717	1,368	634,174	0,000	1,487	1,922

VITAMINA D3

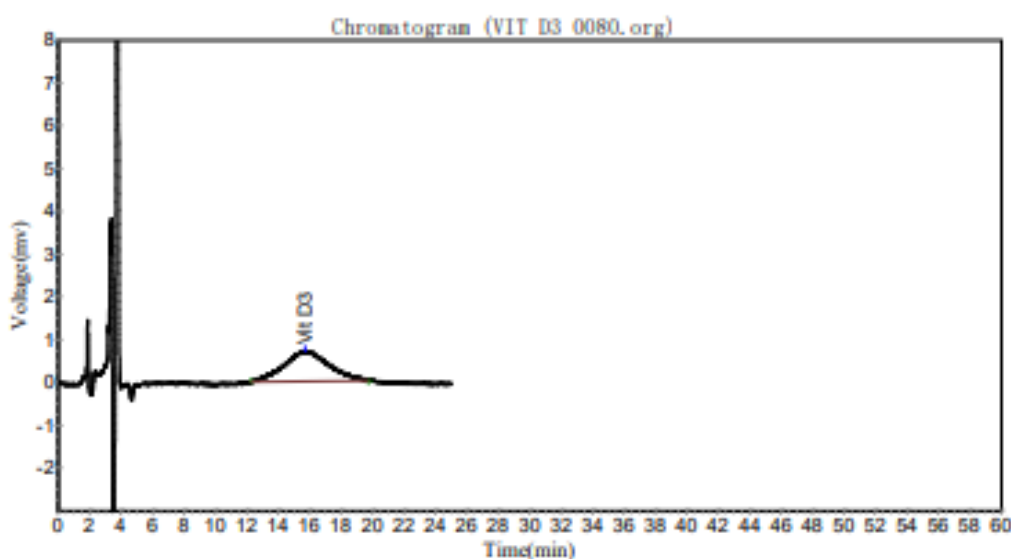
Company: INMUNOLAB
 Date/Time: 2023-06-06, 13:42:31
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0080.org

Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-07, 1:11:05
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow
 Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH-AGUA (67:33)
 FLUJO: 0.8 mL/min
 CURVA DE CALIBRACION
 CONCENTRACION 30ng/mL



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	Vit D3	15,718	705,466	140398,656	100,0000
Total			705,466	140398,656	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	70,000	0,000	20000,000	0,000	4,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	Vit D3	15,718	2,783	177,132	0,000	1,206	1,240

VITAMINA D3

Company: INMUNOLAB
 Date/Time: 2023-06-06, 14:36:14
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0082.org

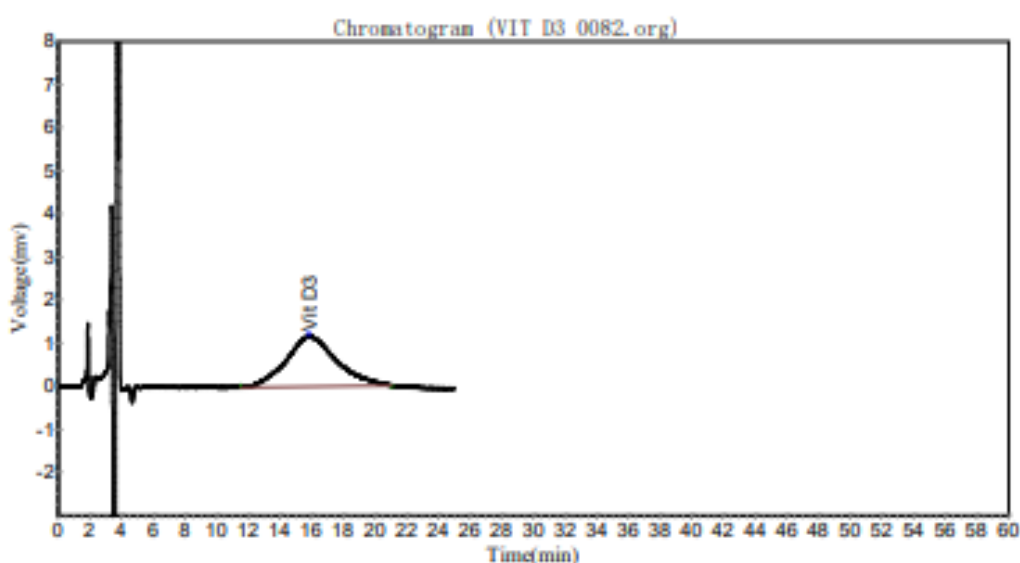
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-07, 1:15:05
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH:AGUA (67:33)
 FLUJO: 0.8 mL/min
 CURVA DE CALIBRACION
 CONCENTRACION 50ng/mL



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	Vit D3	15,843	1172,150	258840,688	100,0000
Total			1172,150	258840,688	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	70,000	0,000	20000,000	0,000	4,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	Vit D3	15,843	3,137	139,650	0,000	1,097	1,212

VITAMINA D3

Company: INMUNOLAB
 Date/Time: 2023-06-06, 15:43:03
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0084.org

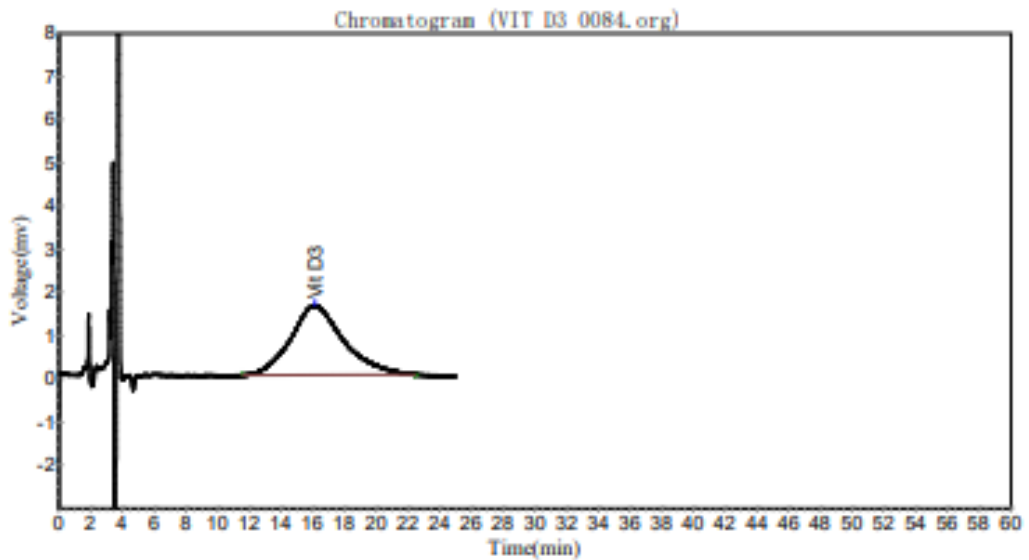
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-07, 1:18:18
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH:AGUA (67:33)
 FLUJO: 0.8 mL/min
 CURVA DE CALIBRACION
 CONCENTRACION 70ng/mL



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	Vit D3	16,138	1622,415	375372,563	100,0000
Total			1622,415	375372,563	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	70,000	0,000	20000,000	0,000	4,000	25,000	100,0000

System Evaluation

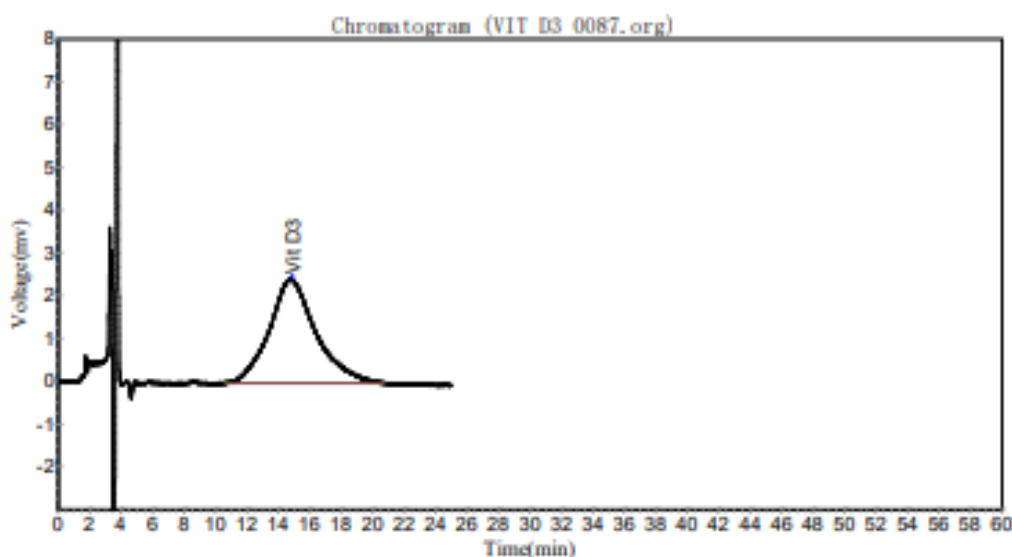
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	Vit D3	16,138	3,207	139,625	0,000	1,089	1,176

VITAMINA D3

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-06, 17:06:18 Date/Time: 2023-06-07, 1:22:53
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0087.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH:AGUA (67:33)
 FLUJO: 0.8 mL/min
 CURVA DE CALIBRACION
 CONCENTRACION 90ng/mL



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	Vit D3	14,892	2430,261	498343,344	100,0000
Total			2430,261	498343,344	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	70,000	0,000	20000,000	0,000	4,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	Vit D3	14,892	2,795	156,141	0,000	1,204	1,286

VITAMINA D3

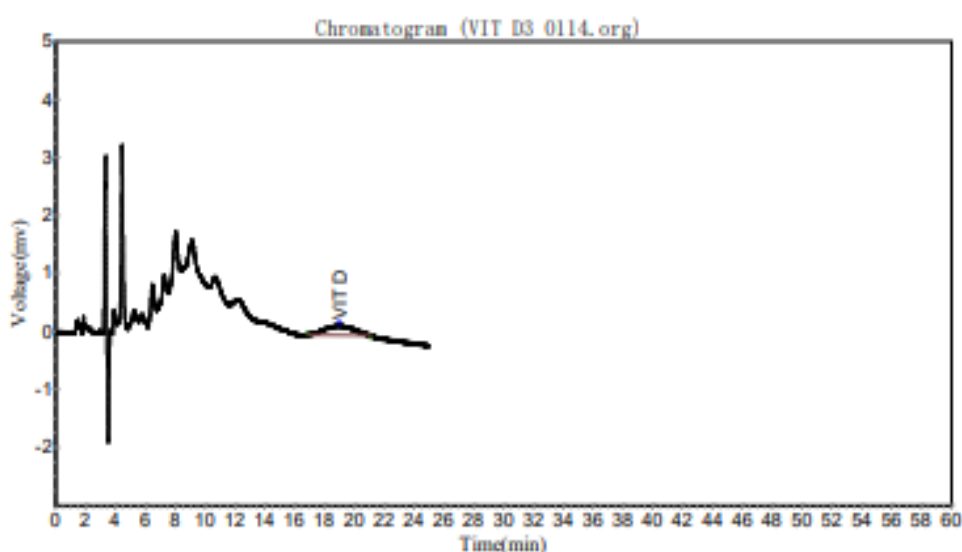
Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 2023-06-15, 11:32:21
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0114.org

Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-26, 10:15:36
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow
 Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 1 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 1



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	19,000	178,429	22116,328	100,0000
Total			178,429	22116,328	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	19,000	1,947	515,697	2,567	1,221	1,439

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 2023-06-15, 11:58:23
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0115.org

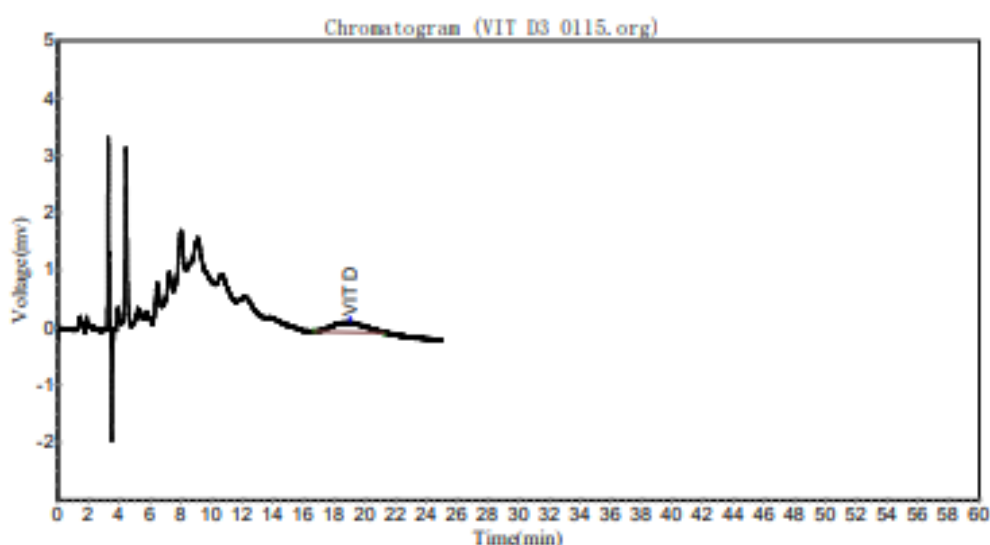
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-26, 10:18:50
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 1 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 2



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	19,048	180,828	23962,326	100,0000
Total			180,828	23962,326	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

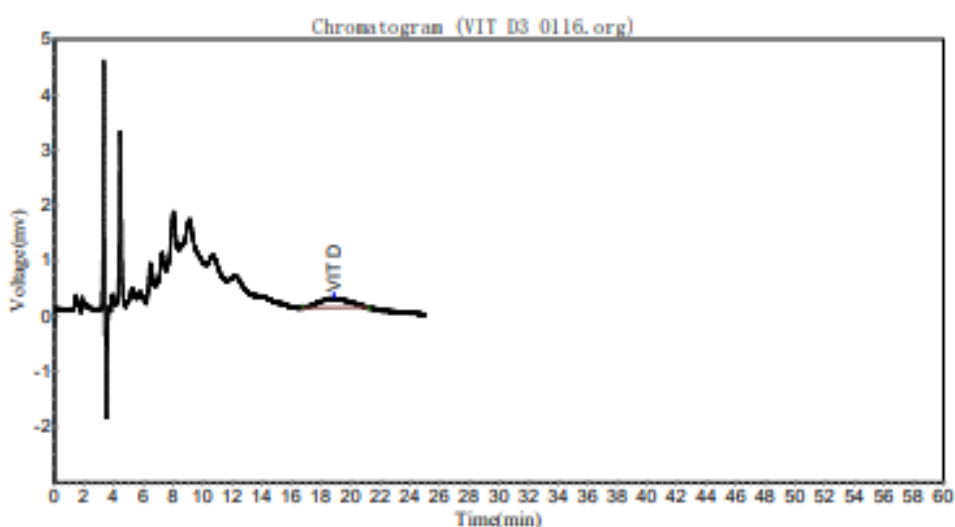
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	19,048	2,518	299,724	0,457	1,462	1,854

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-15, 12:24:24 Date/Time: 2023-06-26, 10:21:28
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0116.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(°C): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 87:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 1 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 3



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	18,873	182,117	22849,629	100,0000
Total			182,117	22849,629	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

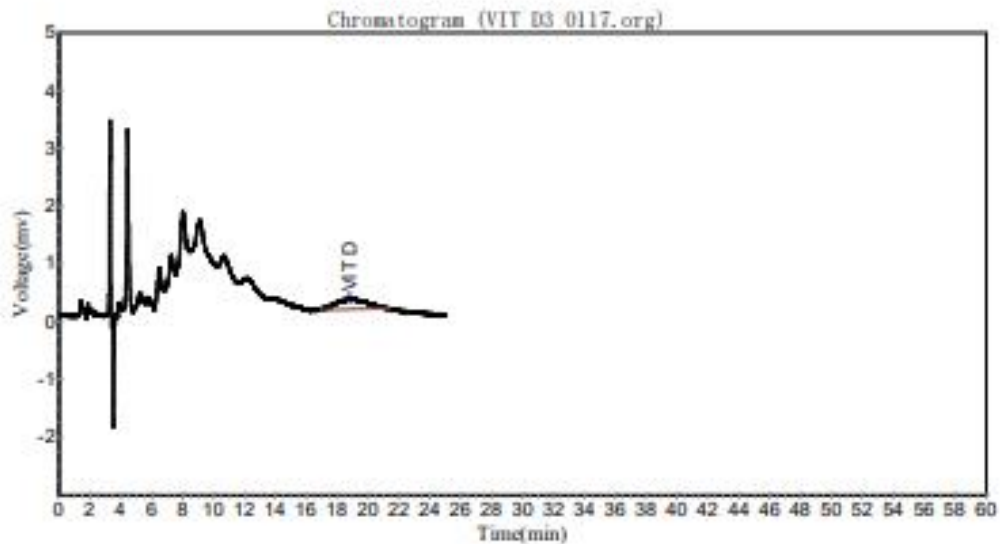
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	18,873	0,043	1049975,250	10,865	0,724	0,445

VITAMINA D

Company: INMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-15, 12:50:25 Date/Time: 2023-06-26, 10:27:53
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0117.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 1 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 4



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	18,793	198,886	24063,742	100,0000
Total			198,886	24063,742	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

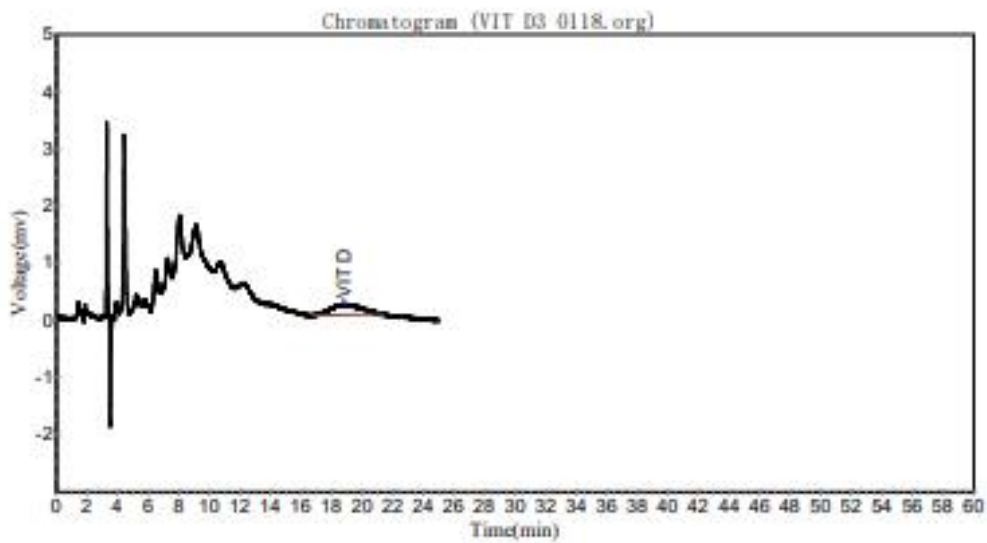
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	18,793	0,085	271203,750	9,167	0,918	0,864

VITAMINA D

Company: INMINOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-15, 13:16:26 Date/Time: 2023-06-28, 10:30:05
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0118.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 1 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 5



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	18,790	189,061	23737,744	100,0000
Total			189,061	23737,744	100,0000

Integeration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	18,790	2,300	362,894	2,056	1,604	1,850

VITAMINA D

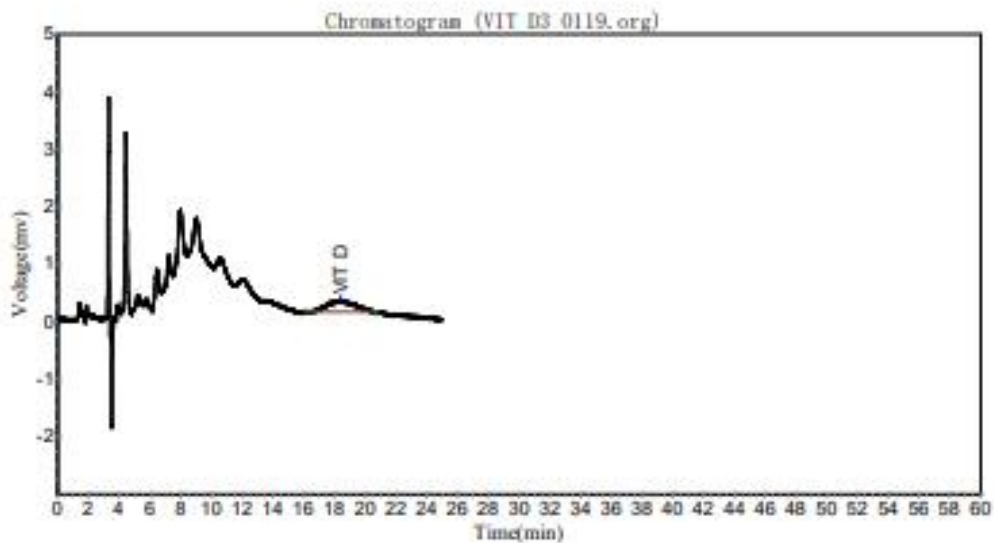
Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 2023-06-15, 13:42:28
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0119.org

Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 2023-06-26, 10:32:30
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jap): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow
 Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 1 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 6



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	18,405	194,294	23787,664	100,0000
Total			194,294	23787,664	100,0000

Integeration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

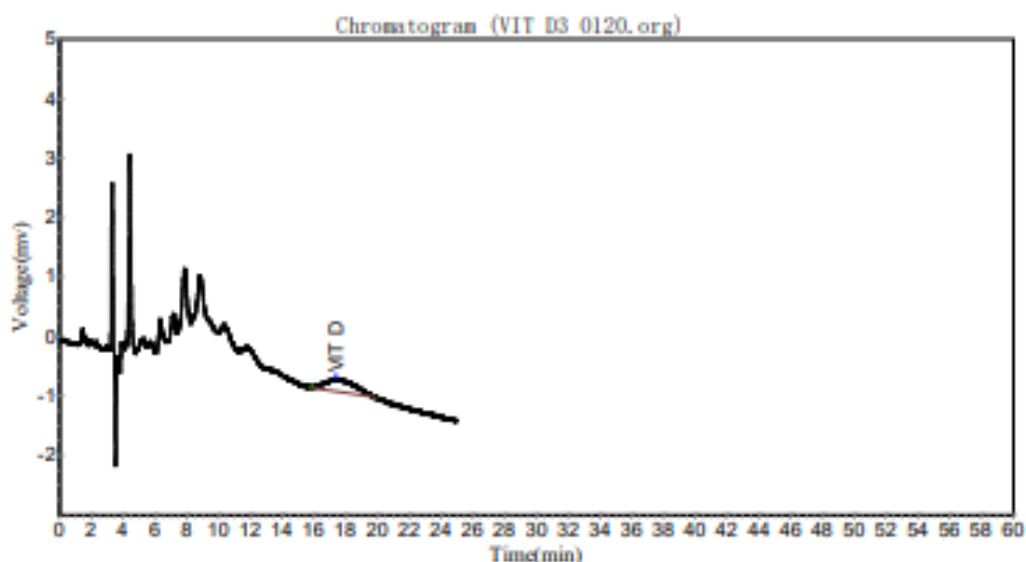
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	18,405	2,315	341,098	2,203	1,478	1,875

VITAMINA D

Company: INMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 16/6/2023, 11:02:58 Date/Time: 25/6/2023, 22:22:29
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0120.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 2 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 1



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	17,385	212,255	27655,316	100,0000
Total			212,255	27655,316	100,0000

Integeration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	50,000	0,000	10000,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	17,385	2,320	309,777	0,000	1,346	1,475

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB

Date/Time: 16/6/2023, 11:28:59

Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0121.org

Analyst: ANA + CRIS

Date/Time: 25/6/2023, 22:31:58

Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC

Model No.: PERKIN ELMER SERIES

200

Column Temp.(jæ):40

Column Part No.: ES CIANO 30 CM X

3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV

Wavelength(nm):273

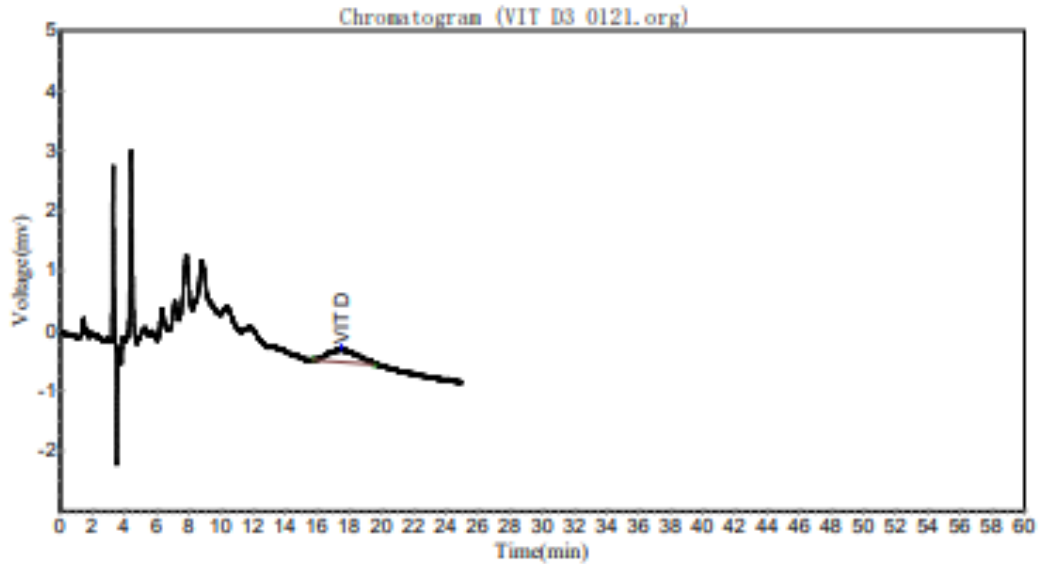
Sample Description:

FM : MEOH :AGUA 67:33

PH: 6.36

ANALISIS DE REPETIBILIDAD

MUESTRA 2 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 2



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	17,515	214,718	26561,131	100,0000
Total			214,718	26561,131	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	50,000	0,000	10000,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	17,515	1,027	1581,854	0,000	1,329	1,434

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 16/6/2023, 11:55:01
 Data File: D:\Copia de TESIS\82000\data\Vitamina D3\VIT D3 0122.org

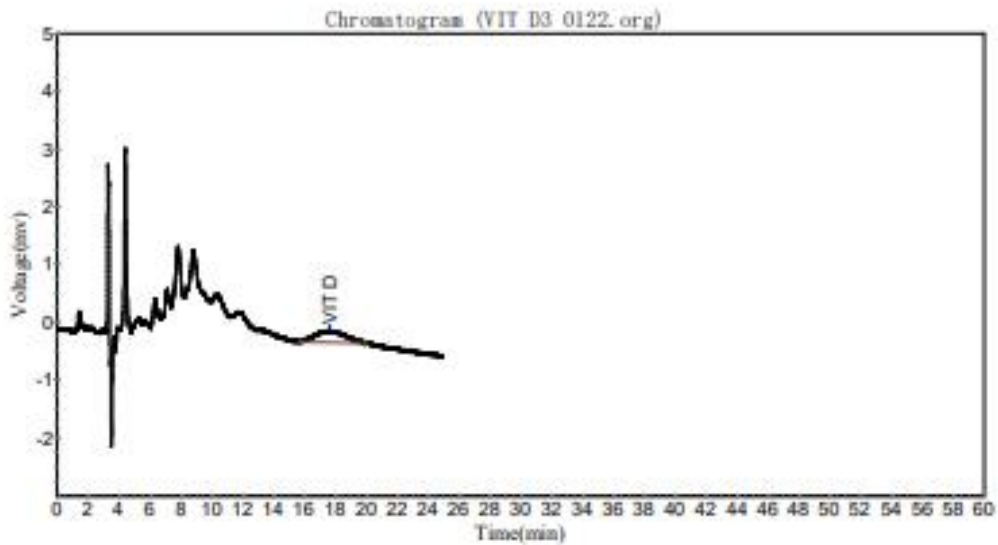
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 25/6/2023, 22:36:43
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jue): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 2 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 3



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	17,653	211,836	26623,387	100,0000
Total			211,836	26623,387	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	50,000	0,000	10000,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

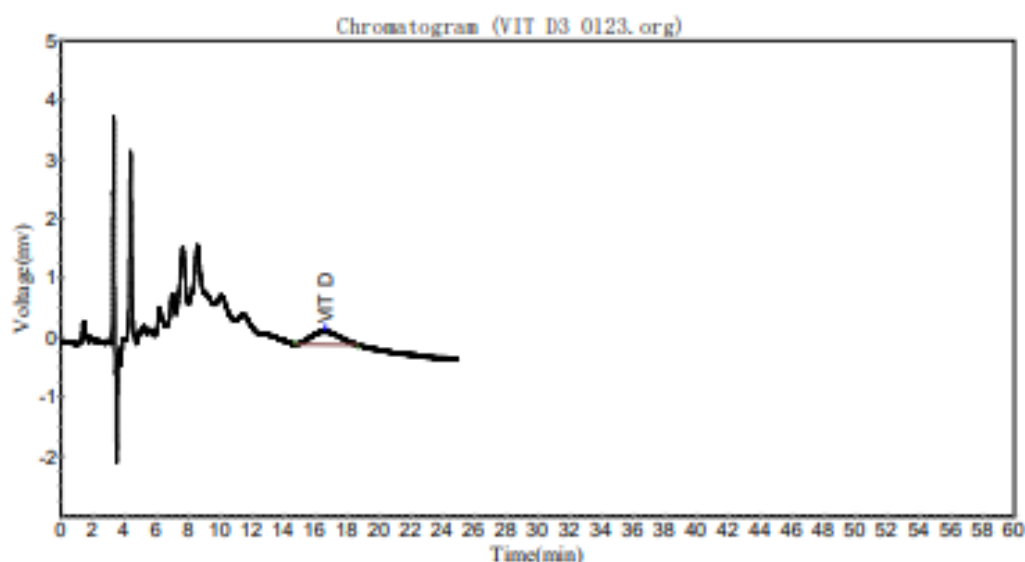
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	17,653	0,247	27377,072	0,000	1,998	2,996

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 16/6/2023, 12:21:02 Date/Time: 25/6/2023, 22:45:13
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0123.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 2 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 4



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,668	240,280	26769,682	100,0000
Total			240,280	26769,682	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	50,000	0,000	15000,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,668	1,807	471,844	0,000	1,110	1,244

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 16/6/2023, 12:47:03
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0124.org

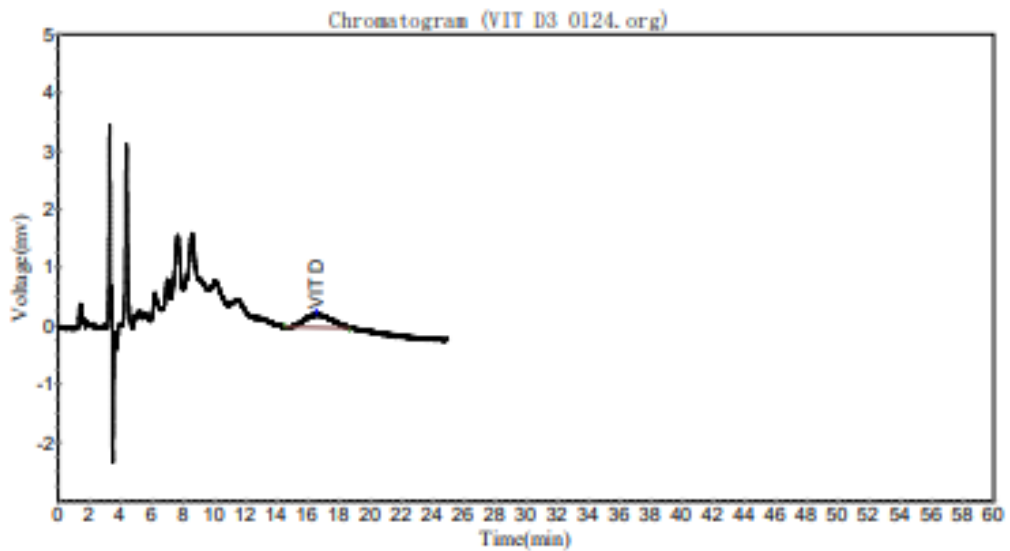
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 25/6/2023, 22:51:10
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 2 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 5



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,583	232,315	26375,227	100,0000
Total			232,315	26375,227	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	50,000	0,000	15000,000	0,000	9,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,583	1,965	396,480	0,000	1,208	1,534

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB

Date/Time: 16/6/2023, 13:13:05

Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0125.org

Analyst: ANA + CRIS

Date/Time: 25/6/2023, 22:59:58

Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC

Gradient: Constant Flow

Detector: UV

Model No.: PERKIN ELMER SERIES

Wavelength(nm): 273

200

Column Temp.(jjae): 40

Column Part No.: ES CIANO 30 CM X

3.9 5UM

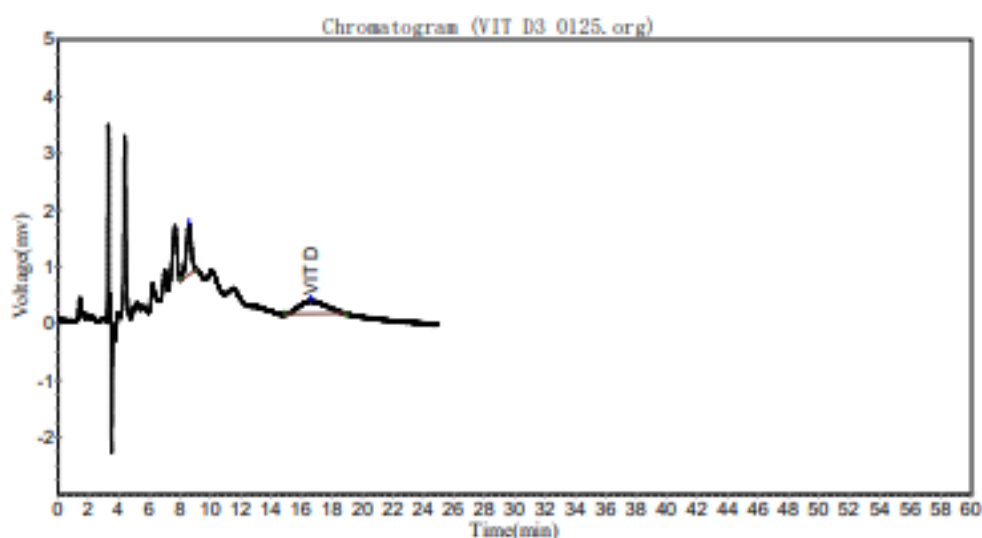
Sample Description:

FM : MEOH :AGUA 67:33

PH: 6.38

ANALISIS DE REPETIBILIDAD

MUESTRA 2 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 6



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		8,597	889,509	20465,350	43,2988
2	VIT D	16,628	238,954	26800,072	56,7012
Total			1128,463	47265,422	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
6	50,000	0,000	12000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

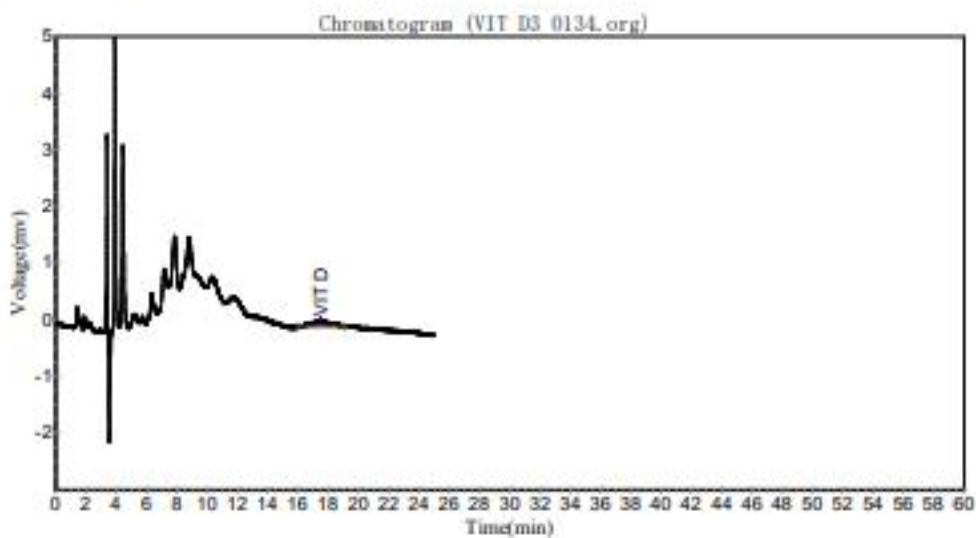
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1		8,597	0,342	3508,594	0,000	0,901	0,776
2	VIT D	16,628	2,050	365,379	3,366	1,328	1,667

VITAMINA D

Company: INMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 19/6/2023, 12:55:23 Date/Time: 25/6/2023, 23:16:27
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0134.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 3 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 1



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	17,493	92,514	7599,795	100,0000
Total			92,514	7599,795	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
4	70,000	0,000	500,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	17,493	0,928	1967,193	4,034	1,095	1,192

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB

Date/Time: 19/6/2023, 13:21:24

Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0135.org

Analyst: ANA * CRIS

Date/Time: 25/6/2023, 23:21:15

Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC

Model No.: PERKIN ELMER SERIES

200

Column Temp.(µe): 40

Column Part No.: ES CIANO 30 CM X

3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV

Wavelength(nm): 273

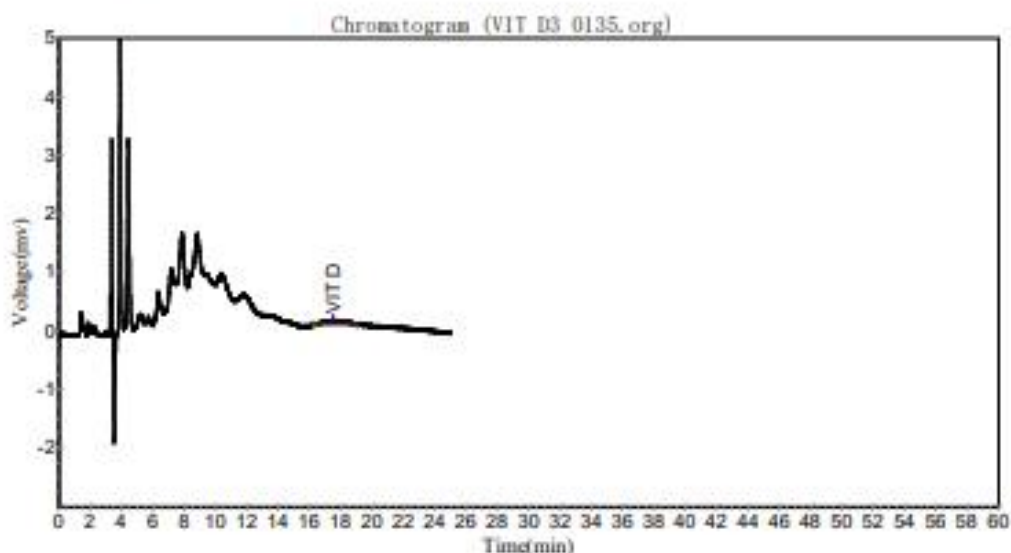
Sample Description:

FM : MEOH :AGUA 67:33

PH: 6.36

ANALISIS DE REPETIBILIDAD

MUESTRA 3 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 2



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	17,510	89,115	7233,837	100,0000
Total			89,115	7233,837	100,0000

Integeration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	50,000	0,000	100,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

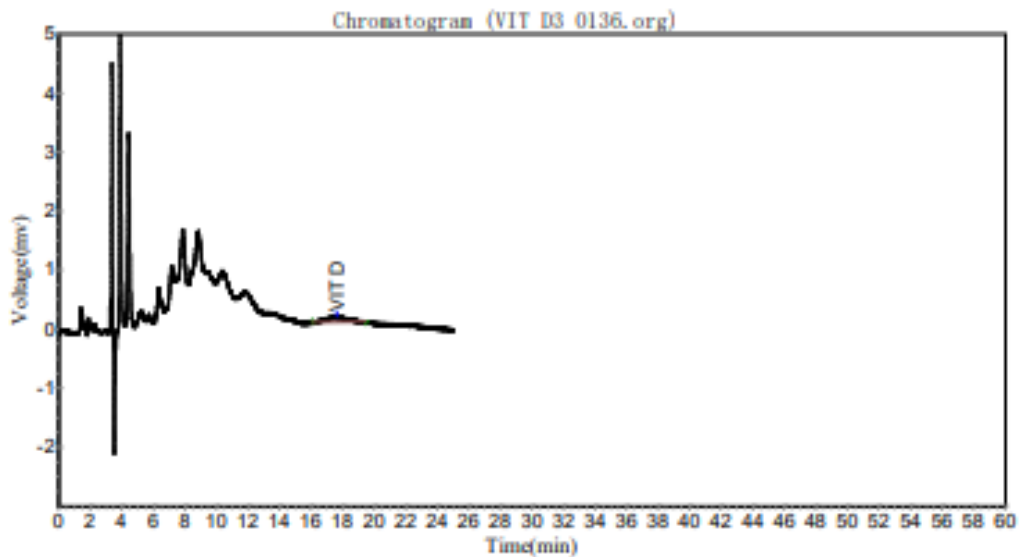
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	17,510	0,067	363353,250	8,833	1,352	1,471

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 19/6/2023, 13:47:26 Date/Time: 25/6/2023, 23:27:31
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0136.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 87:33
 PH: 6.38
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 3 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 3



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	17,643	92,526	6123,167	100,0000
Total			92,526	6123,167	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	50,000	0,000	1000,000	0,000	9,000	25,000	100,0000

System Evaluation

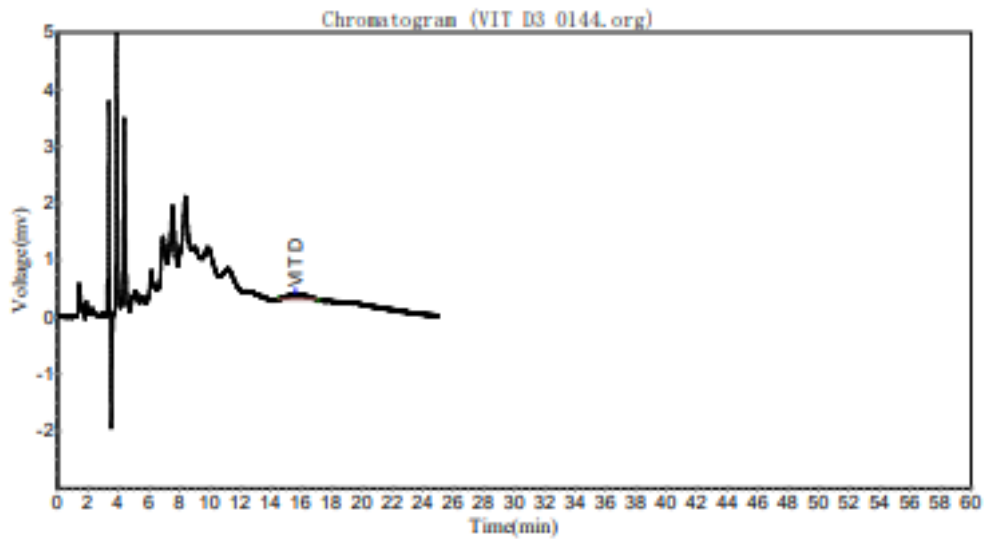
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	17,643	0,495	7042,174	0,167	3,603	6,134

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 20/6/2023, 13:52:09 Date/Time: 25/6/2023, 23:33:19
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0144.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 SUM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 3 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 4



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	15,647	106,259	7598,039	100,0000
Total			106,259	7598,039	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	100,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	15,647	0,010	6610285,000	0,000	0,750	0,190

VITAMINA D

Company: INMUNOLAB

Date/Time: 20/6/2023, 14:18:11

Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0145.org

Analyst: ANA + CRIS

Date/Time: 25/6/2023, 23:53:40

Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC

Model No.: PERKIN ELMER SERIES

200

Column Temp.(jæ):40

Column Part No.: ES CIANO 30 CM X

3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV

Wavelength(nm): 273

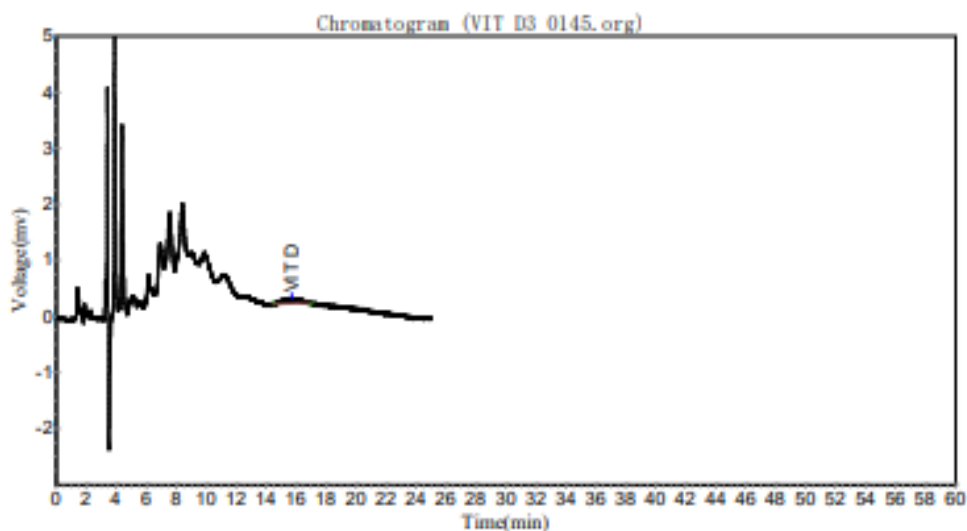
Sample Description:

FM : MEOH :AGUA 67:33

PH: 6.36

ANALISIS DE REPETIBILIDAD

MUESTRA 3 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 5



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	15,712	97,873	6149,316	100,0000
Total			97,873	6149,316	100,0000

Integeration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	100,000	0,000	9,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	15,712	1,158	1021,862	2,578	1,286	1,403

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 20/6/2023, 14:44:12
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0146.org

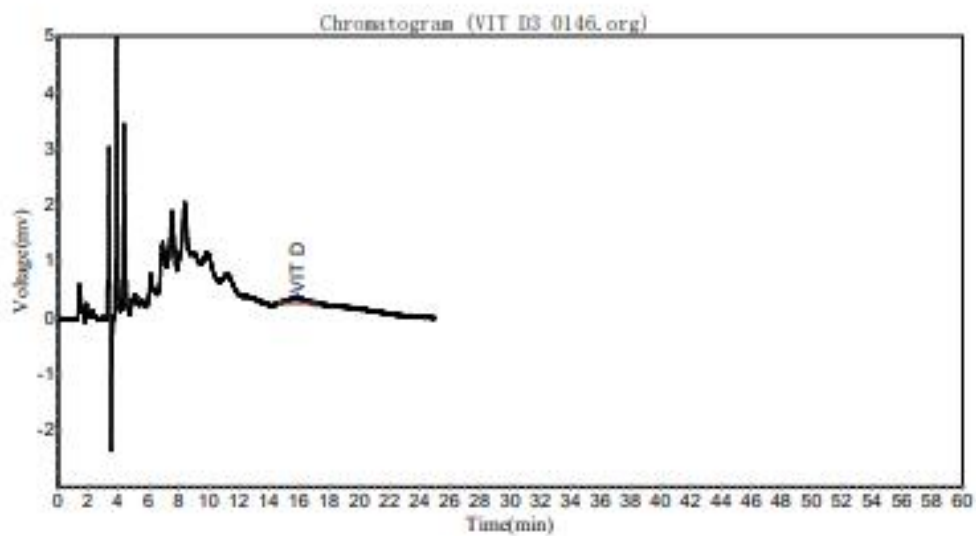
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 25/6/2023, 23:49:04
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 3 (SUERO SIN AYUNAS), REPETICION 6



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	15,862	110,424	7576,239	100,0000
Total			110,424	7576,239	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

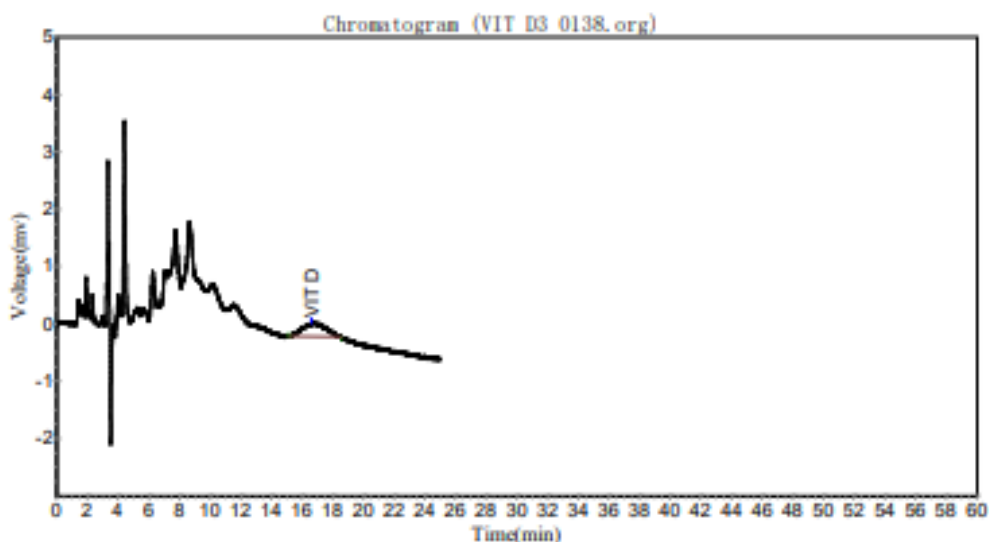
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	15,862	0,238	7970,342	1,222	1,121	1,246

VITAMINA D

Company: INMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 20/6/2023, 11:15:03 Date/Time: 26/6/2023, 0:01:38
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0138.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 4 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 1



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,613	233,585	23831,488	100,0000
Total			233,585	23831,488	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

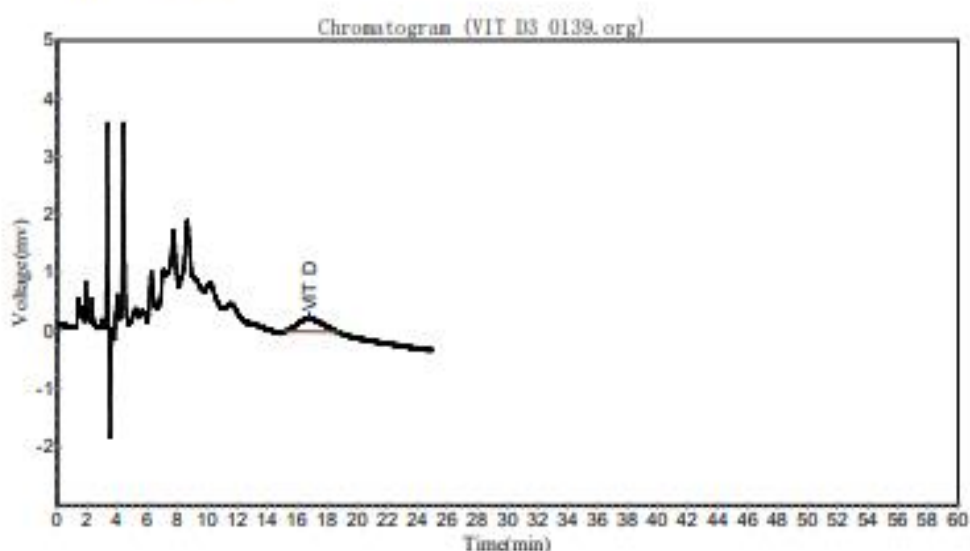
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,613	2,038	368,834	1,927	1,269	1,296

VITAMINA D

Company: INMINOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 20/6/2023,11:41:05 Date/Time: 26/6/2023,0:06:29
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0139.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.($^{\circ}$ C): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 4 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 1



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,800	238,206	24777,832	100,0000
Total			238,206	24777,832	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,800	2,077	357,840	0,519	1,472	1,832

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 20/6/2023, 12:07:06
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0140.org

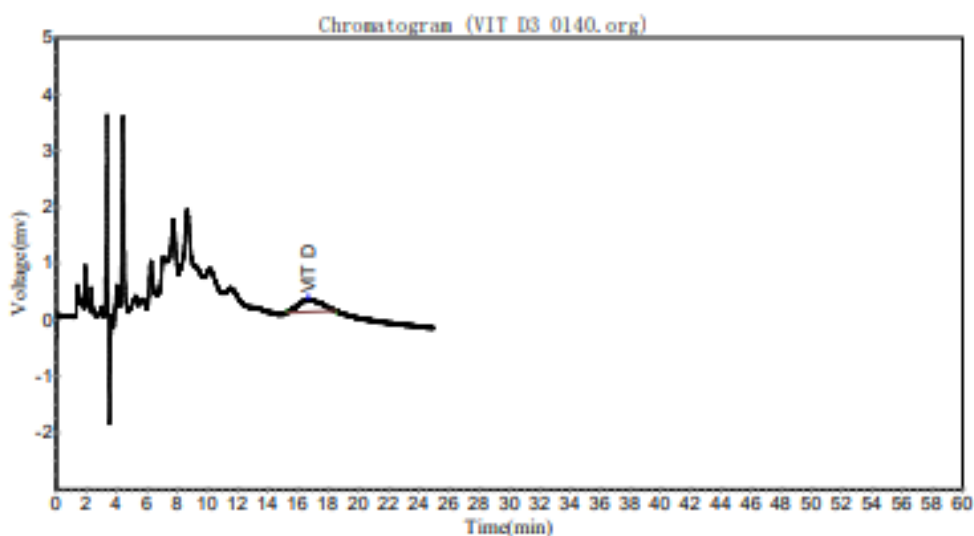
Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 26/6/2023, 0:10:18
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow

Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 4 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 3



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,677	223,675	23159,344	100,0000
Total			223,675	23159,344	100,0000

Integeration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	10000,000	0,000	9,000	25,000	100,0000

System Evaluation

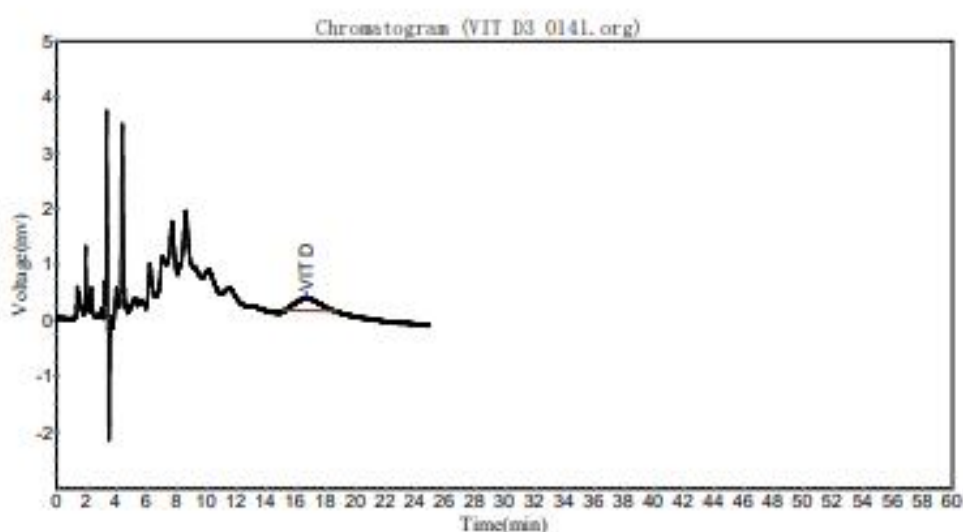
Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,677	1,693	548,452	0,000	1,338	1,553

VITAMINA D

Company: IMMUNOLAB Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 20/6/2023, 12:33:07 Date/Time: 26/6/2023, 0:15:05
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 Quantification: Area/Area%
 0141.org

Type of Instrument: LC Gradient: Constant Flow Detector: UV
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES Wavelength(nm): 273
 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X
 3.9 5UM

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 4 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 1



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,713	242,659	24009,271	100,0000
Total			242,659	24009,271	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	1000,000	0,000	10,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,713	1,973	404,252	2,046	1,317	1,665

VITAMINA D

Company: INMUNOLAB

Date/Time: 20/6/2023, 12:59:09

Data File: D:\Copia de TESIS\X2000\data\Vitamina D3\VIT D3

0142.org

Analyst: ANA + CRIS

Date/Time: 26/6/2023, 0:18:48

Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC

Gradient: Constant Flow

Detector: UV

Model No.: PERKIN ELMER SERIES

Wavelength(nm): 273

200

Column Temp.(jæ): 40

Column Part No.: ES CIANO 30 CM X

3.9 SUM

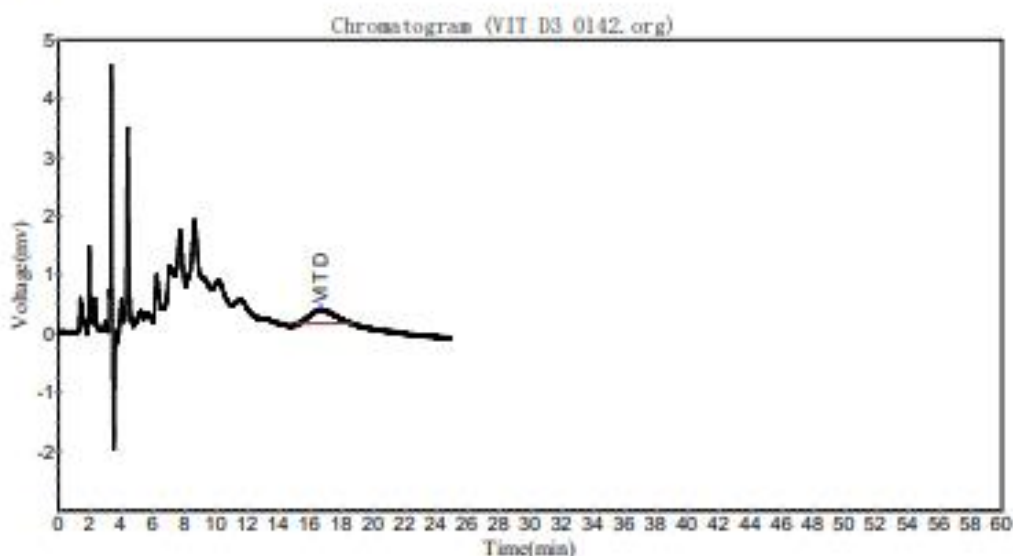
Sample Description:

FM : MEOH :AGUA 67:33

PH: 6.36

ANALISIS DE REPETIBILIDAD

MUESTRA 4 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 5



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,672	235,506	24250,428	100,0000
Total			235,506	24250,428	100,0000

Integration Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	10000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1	VIT D	16,672	1,920	422,811	3,621	1,268	1,487

VITAMINA D

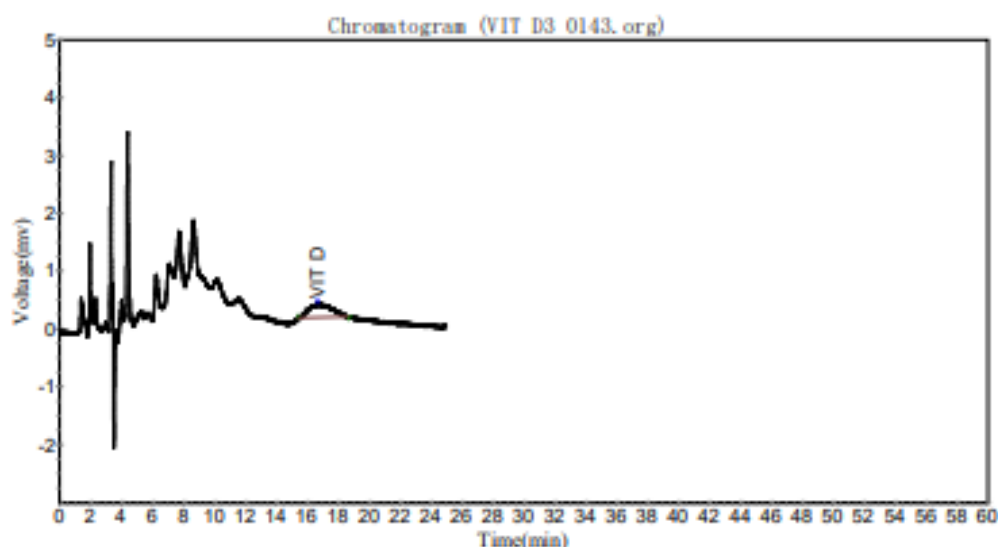
Company: IMMUNOLAB
 Date/Time: 20/6/2023, 13:25:10
 Data File: D:\Copia de TESIS\N2000\data\Vitamina D3\VIT D3 0143.org

Analyst: ANA + CRIS
 Date/Time: 26/6/2023, 0:25:38
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: LC
 Model No.: PERKIN ELMER SERIES 200
 Column Temp.(jæ): 40
 Column Part No.: ES CIANO 30 CM X 3.9 5UM

Gradient: Constant Flow
 Detector: UV
 Wavelength(nm): 273

Sample Description:
 FM : MEOH :AGUA 67:33
 PH: 6.36
 ANALISIS DE REPETIBILIDAD
 MUESTRA 4 (SUERO EN AYUNAS), REPETICION 6



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	VIT D	16,703	239,038	24106,967	20,9227
Total			4249,968	115219,416	100,0000

Inteigerung Parameters

Peak Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking Time	End Time	Sample Wt.
5	70,000	0,000	10000,000	0,000	8,000	25,000	100,0000

System Evaluation

Peak No.	Peak ID	Ret. Time	Half-Peak Width	Theoretical levels	Resolution	Tail Factor	Asymmetry
1		4,398	0,132	6182,077	0,000	23,159	49,224
2		8,972	0,675	1272,073	7,227	1,595	2,145
3		10,228	0,675	1272,073	7,227	1,595	2,145
4	VIT D	16,703	1,683	545,476	2,746	1,260	1,441