

# Linealidad, algo más que $r^2$ : un ejemplo práctico

**Idania González-Pérez y Anelis Quintana Cantillo.\***

Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Avenida 25, Apartado Postal 6653, Código Postal 11600, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana. \*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, Código Postal 10600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de enero de 2005. Aceptado: 23 de diciembre de 2005.

Palabras clave: ELISA, regresión, linealidad, rango dinámico, rango lineal.

Key words: ELISA, regression, linearity, dynamic range, lineal range.

**RESUMEN.** El trabajo se propuso mostrar a través de un sencillo ejemplo, cómo la evaluación del **coeficiente de determinación** de la regresión  $r^2$  no puede considerarse el mejor parámetro para evaluar la linealidad de un procedimiento analítico y su sola determinación no es suficiente para este fin. Se trabajó con un ELISA tipo *sandwich*, empleado en la cuantificación y chequeo de diferentes etapas del proceso de producción del IFN $\alpha$ 2bHuLe. Se probaron cuatro curvas en tres ELISA realizados en días y por operarios diferentes, las cuales cubrieron seis concentraciones en el rango de 0,25 a 10 ng/mL. Se realizó análisis de regresión por el MMC. Se graficaron los logaritmos de las concentraciones contra los cocientes de las respuestas y concentraciones (**DO/C**), para cada concentración y curva estudiada. Como método complementario para evaluar la calidad del ajuste en las diferentes rectas de regresión, se estimó la concentración de los diferentes puntos de las curvas ensayadas, por interpolación de sus absorbancias promedio en las curvas de regresión, para su comparación con los valores esperados o teóricos a través de los porcentajes de recuperación. Aún cuando los  $r^2$  calculados fueron superiores a 0,95 para todas las curvas ensayadas, solamente para dos de estas no hubo falta de ajuste para niveles de significación del 5 y 1 %. Sin embargo, solo para una de estas curvas, el **IC 95 %** de la pendiente estuvo incluido en el rango de tolerancia definido para su variación en el rango lineal y correspondiente a  $\pm 5 %$  según la ASTM. La graficación de linealidad permitió visualizar las variaciones de la pendiente responsables de la falta de linealidad (falta de ajuste) detectada para dos de las curvas. Se apreció cómo para las concentraciones extremas de estas curvas (mínima y máxima), la pendiente (cociente **DO/C**) tuvo una variación mayor que en la zona media. Esta disminución de la pendiente para las concentraciones más bajas en la curva patrón, lleva a errores cuando la mejor recta obtenida por el MMC es usada para la cuantificación de muestras desconocidas con **DO** en esa zona, debido a la falta de ajuste. Esto se apreció en los bajos porcentajes de recuperación obtenidos, en la estimación de las concentraciones más pequeñas de las curvas con falta de ajuste, a partir de sus rectas de regresión. La graficación de linealidad resulta útil en la evaluación de linealidad, al visualizar la tendencia en la variación de la pendiente en todo el rango de concentraciones explorado y ofrecer una primera idea acerca del rango de concentraciones en que el método es lineal. El cálculo de  $r^2$  no obstante ser el método más frecuentemente usado en el chequeo de la linealidad para un conjunto de datos en estudio y de ofrecer una medida de la calidad del ajuste que se logra con la regresión, no es suficiente para este fin. El análisis debe ser complementado con métodos alternativos como la graficación de linealidad en un primer acercamiento, o el cálculo de los porcentajes de recuperación para los diferentes puntos de la curva patrón y finalmente confirmado a través de una dócima para la falta de ajuste.

**ABSTRACT.** The work intended to show through a simple practical example, how the evaluation of the coefficient of determination  $r^2$ , can't be considered the best parameter to assess the linearity of an analytical procedure, and its single determination is not enough for this purpose. A *sandwich* ELISA assay, employed to control the process of production of IFN $\alpha$ 2bHuLe was chosen as the model for the study. Four different curves were tested in three assays, done in different days and by different operators. The data were analyzed using the linear regression method. The Logs of concentrations (LogC) were plotted versus the quotients of absorbances

and concentrations (**OD/C**), for each curve and studied concentration. As a complementary method to measure the goodness-of-fit to linear model, the concentrations of different points of the assayed curves were estimated, interpolating its mean absorbances in the regression curves, and the calculated values were compared with the theoretic, expected values, through the percentages of recovery. Although the calculated  $r^2$  were  $> 0,95$  for all of the assayed curves, there was no lack of fit, with significance levels of 5 and 1 %, only for two of them. However, only for one of these linear, well adjusted curves, the 95 % confidence interval of the slope was included in the range of tolerance for its variation in the linear range, defined by the ASTM as  $\pm 5 %$ . The plot of linearity allowed visualizing the variations of the slope, and the associated lack of fitting to the linear model, detected for two of the assayed curves. It was shown how for the extremes values of concentration of these two curves; the slope (**OD/C**) had bigger variations than for concentrations in the central zone of the curves. This variation of the slope for the smallest evaluated concentrations in these curves, leads to bigger errors when the linear regression curves are used to estimate concentrations in this zone, which is a result of the lack of fitting. This lack of fitting was very well visually expressed in the low percentages of recovery obtained when the smallest concentrations of the curves were estimated through its lineal regression curves. The plot of linearity is useful for the evaluation of linearity, allowing visualizing the trend of the slope in the range of explored concentrations, and offering a first idea about the lineal range of the method. Although the calculation of  $r^2$  although is the most frequently used method in the check-up of linearity, offering a measure of the quality of the adjustment that is

achieved with the regression, is not enough for this purpose. The analysis should be supplemented with some other alternatives, as the plot of linearity first, the calculation of the percentages of recovery for the different concentrations of the curve, and finally, confirmed through a test for measuring the goodness-of-fit to a linear model.

## INTRODUCCION

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad que éste tiene para producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro de un rango dado. Están descritos los rangos dinámico y lineal para técnicas analíticas. Usualmente, cuando se cuantifica por interpolación en una curva patrón, los rangos de trabajo son acotados al *rango lineal del método*, definido como el rango de concentraciones para el cual, la pendiente es constante en el intervalo de tolerancia que se defina. La ASTM (del inglés *American Society for Testing and Materials*) tolera  $\pm 5\%$  de variación para la pendiente.<sup>1</sup> El *rango dinámico*, determinado como el rango de concentraciones de la sustancia en ensayo, para el cual, un cambio en la concentración produce un cambio en la señal detectada, es usualmente más amplio que el lineal.<sup>1</sup>

La linealidad puede ser expresada en términos de varianza alrededor de la pendiente de la curva de regresión calculada por el Método de los Mínimos Cuadrados (MMC),<sup>2,3</sup> pero es el cálculo del *coeficiente de determinación* de la regresión,  $r^2$ , el método más frecuentemente usado en el chequeo de la linealidad.

$r^2$  puede ser interpretado como una medida de la linealidad del conjunto de datos en estudio y de la calidad del ajuste que se logra con la regresión, pero es bien conocido que curvas de respuestas no lineales pueden tener asociados coeficientes de determinación mayores a 0,9;<sup>4</sup> por lo que  $r^2$  no se considera el mejor parámetro para evaluar la linealidad de un procedimiento analítico<sup>3</sup> y su sola determinación no es suficiente para este fin.<sup>5</sup>

Por ejemplo, para la *Ley de Lambert-Beer*, que define la relación entre absorbancia o densidad óptica ( $DO$ ) y la concentración de sustancia ( $C$ ), a elevadas concentraciones se obtienen valores de respuesta ( $DO$ ) bajos, que determinan una pérdida de ajuste cuando se construye la curva de regresión que ofrece el mejor ajuste lineal, aún cuando el  $r^2$  aso-

ciado a ella sea relativamente elevado ( $> 0,95$ ). Este fenómeno es conocido como fallo<sup>5</sup> o no cumplimiento de la relación  $DO = DO(C)$  a grandes concentraciones.

Otro acercamiento a la linealidad lo constituye la graficación de linealidad, obtenido al graficar los logaritmos de las concentraciones ( $\text{Log}C$ ) en función de los cocientes de las respuestas y concentraciones ( $DO/C$ ), para cada concentración estudiada. Este ha sido recomendado con anterioridad para la evaluación de la linealidad en un rango de concentraciones en estudio (es decir para determinar si la pendiente es constante en dicho rango dentro de los límites de tolerancia definidos), demostrando su utilidad en los casos en que  $r^2$  no constituye un indicador suficiente de la calidad del ajuste.<sup>6</sup> Esta representación gráfica de la linealidad ha sido considerada por algunos autores como la evaluación más útil y rigurosa de la aplicabilidad del modelo lineal al caso dado.<sup>5</sup>

Este trabajo a través de un sencillo diseño aplicado al ELISA tipo *sandwich*, empleado en la cuantificación y chequeo de diferentes etapas del proceso de producción del IFN $\alpha$ 2bHuLe en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Ciudad de La Habana), pretendió mostrar la incapacidad del coeficiente de determinación  $r^2$ , por sí solo, para la estimación de linealidad y la necesidad de complementar la evaluación de la linealidad por el cálculo de  $r^2$ , con el empleo de métodos como la graficación de linealidad y la dócima de la falta de ajuste.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

Se trabajó con un ELISA tipo *sandwich*, empleado en la cuantificación y chequeo de diferentes etapas del proceso de producción del IFN $\alpha$ 2bHuLe producido en el CIB. Se emplearon microplacas NUNC<sup>TM</sup> MaxiSorp<sup>TM</sup> de fondo plano, recubiertas con anticuerpo de captura CB-IFN 2.3 [Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad de La Habana, Cuba] a una concentración final de 10  $\mu\text{g/mL}$ . El conjugado de peroxidasa-anticuerpo monoclonal CB IFN 2.4 (CIGB) y las disoluciones y tiempos de incubación empleados fueron los habituales para este ELISA.<sup>7</sup> Como blanco se empleó leche descremada al 0,05 % en disolución reguladora de fosfato 1X (PBS1X).

### Diseño

Con el objetivo de determinar el rango de concentraciones para la curva patrón de cuantificación que ofrece el mejor ajuste lineal, se probaron cuatro curvas en tres ELISA realizados con el diseño correspondiente (Fig. 1).

En la microplaca se ensayaron, en tres días diferentes, cuatro curvas cada vez (curvas 1, 2, 3 y 4) preparadas con un patrón de IFN $\alpha$ 2b humano recombinante (División Control de la Calidad, CIGB). Cada una de estas curvas incluyó seis concentraciones diferentes, las cuales se aplicaron en la placa por duplicado.

### Métodos

El análisis de las diferentes curvas de regresión se realizó por el MMC, para lo cual, se programó en Excel el cálculo de las sumas de cuadrados, del coeficiente de determinación  $r^2$ , de los parámetros de la regresión ( $b_0$ -intercepto y  $b_1$ -pendiente) y de los diferentes estadígrafos para la realización de las dócimas de la pendiente y de la falta de ajuste.

Se calcularon y compararon los coeficientes de determinación para cada curva. Se realizaron las dócimas de la pendiente y de la falta de ajuste. La dócima de la pendiente se realizó con el objetivo de demostrar que las variables  $C$  y  $DO$  no son independientes. Con la dócima de la falta de ajuste fue posible determinar si el modelo lineal de primer orden era adecuado para representar la relación entre las variables en estudio, de manera que

$$DO = b_0 + b_1C$$

siendo posible estimar la concentración  $C$  en función de la densidad óptica  $DO$ . Paralelamente, se construyó un gráfico de linealidad, para demostrar su utilidad en la evaluación de esta.

Se calcularon los intervalos de confianza del 95 % (IC 95 %) y los rangos de variación correspondientes a  $\pm 5\%$  de tolerancia para las pendientes de todas las curvas estudiadas.

Como método complementario para evaluar la calidad del ajuste en las diferentes rectas de regresión, se estimó la concentración correspondiente a los diferentes puntos de las curvas ensayadas, por interpolación de sus absorbancias promedio en las curvas de regresión, para su comparación con los valores esperados o teóricos a través de los porcentajes de recuperación.

	Curva 1 (ng/mL)		Curva 2 (ng/mL)		Curva 3 (ng/mL)		Curva 4 (ng/mL)	
	1	2	3	4	5	6	7	8
A		Blanco	10	10	5	5	8	8
B	Blanco	Blanco	5	5	4	4	6	6
C	10	10	2,5	2,5	3	3	4	4
D	5	5	1,25	1,25	2	2	3	3
E	2	2	0,63	0,63	1	1	2	2
F	1	1	0,31	0,31	0,5	0,5	1	1
G	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-
H	0,25	0,25	-	-	-	-	-	-

**Fig. 1.** Diseño de aplicación de las curvas patrones en la microplaca. Curva 1 Curva de 0,25 a 10 ng/mL, cada punto obtenido a partir de una dilución del patrón a 10 ng/mL. Curva 2 Curva de 0,31 a 10 ng/mL, obtenida partiendo del patrón diluido a 10 ng/mL y haciendo diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ . Curva 3 Curva de 0,5 a 5 ng/mL, preparada como se describe para la Curva 1. Curva 4 Curva de 1 a 8 ng/mL, preparada como se describe para la Curva 1.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los coeficientes de variación (CV) intraensayo, obtenidos para los duplicados de DO medidos para cada punto de las cuatro curvas, fueron siempre inferiores al 10 %, con un valor medio de 2,28 al promediar para las cuatro curvas (Tabla 1). Los CV interensayo fueron inferiores al 15 %, en las cuatro curvas, para todas las concentraciones ensayadas, excepto para la concentración más baja de la curva 1, para la cual se obtuvo un valor de 32,24 %. Obviando este caso, los CV están en el rango de aceptación regulado por la Organización Mundial de la Salud, que considera para bioensayos tipo ELISA una variación interensayo entre un 5 y 20 %.<sup>8</sup>

Para todas las curvas ensayadas se realizaron pruebas ANOVA para las décimas de la pendiente y de la falta de ajuste (Tablas 2 y 3).

Para cada curva fueron determinados el coeficiente de determinación  $r^2$ , el intercepto ( $b_0$ ), la pendiente ( $b_1$ ), el IC 95 % para la pendiente y su rango de variación para una tolerancia de  $\pm 5$  % (Tabla 4).

Todas las pendientes fueron diferentes de cero, por lo que se corroboró que las variables en estudio C y DO son dependientes en los rangos de concentración explorados.

En cuanto a la falta de ajuste, aún cuando los coeficientes de determinación calculados  $r^2$  fueron superiores a 0,95 para todas las curvas ensayadas

(Tabla 4), solamente para las curvas 3 y 4 no hubo falta de ajuste para niveles de significación de 5 y 1 %, por lo que una recta muestra satisfactoriamente la relación entre las variables C y DO para ellas. Mientras que para las curvas 1 y 2 hubo varias concentraciones para las cuales los porcentajes de recuperación estuvieron fuera de los límites reconocidos para este tipo de ensayo (85 y 115 %).<sup>9</sup>

No obstante, se pudo apreciar que solo para la curva 3 el IC 95 % de la pendiente estaba incluido en el rango de tolerancia definido para su variación en el rango lineal según la ASTM y correspondiente a  $\pm 5$  % (Tabla 4).

Fue posible visualizar las variaciones de la pendiente responsables de la falta de linealidad (falta de ajuste) detectada para las curvas 1 y 2 (Fig. 2). Se pudo apreciar cómo para las concentraciones extremas de la curva 1 (puntos de 0,25 y 10 ng/mL con Log C equivalentes a -0,602 y 1,000 en el eje de las x del gráfico), la pendiente (cociente DO/C) presenta una variación mayor que en la zona media de la curva. Lo mismo ocurre para la curva 2 que cubre aproximadamente el mismo rango de concentraciones y para el punto de 8 ng/mL de la curva 4 (Log C equivalente a 0,903), que explora un rango de concentraciones menor.

Esta disminución de la pendiente para las concentraciones más bajas

en la curva patrón, lleva a errores cuando la mejor recta obtenida por el MMC es usada para la cuantificación de muestras desconocidas con DO en esa zona, debido a la falta de ajuste. Esto se aprecia en las inexactitudes obtenidas en la estimación de las concentraciones para los diferentes puntos de las curvas 1 y 2, a partir de las rectas de regresión obtenidas por el MMC (Tabla 5, ver los porcentajes de recuperación tan bajos obtenidos para las concentraciones más pequeñas en las curvas 1 y 2).

También en la figura 3a para la curva 1, se aprecia la falta de linealidad referida anteriormente y es evidente la saturación de la señal de DO para el punto de 10 ng/mL. Como se puede observar para la curva 4 (Fig. 3d), la saturación de la señal para este ELISA comienza antes de los 10 ng/mL y es apreciable ya a los 8 ng/mL.

Como resultado de este mismo análisis para la curva 2, que cubre aproximadamente igual rango de concentraciones, se obtienen resultados muy similares.

Para la curva 3 (Fig. 3c), se aprecia la coincidencia casi total entre la curva experimental y aquella que ofrece el mejor ajuste lineal, calculada por el MMC, así como la no saturación de los valores de DO para las concentraciones en estudio.

## CONCLUSIONES

La graficación de linealidad resulta útil en la evaluación de linealidad, al visualizar la tendencia en la variación de la pendiente en todo el rango de concentraciones explorado y ofrecer una primera idea acerca del rango de concentraciones en que el método es lineal.

La evaluación de la linealidad a través del simple análisis del valor del coeficiente de determinación  $r^2$  no permite estimar la calidad real del ajuste. Curvas con coeficientes de determinación superiores a 0,95 pueden tener intervalos de confianza del 95 % de la pendiente fuera del rango de tolerancia definido para su variación en el rango lineal y correspondiente a  $\pm 5$  % según la ASTM.

El cálculo de  $r^2$  es útil para la evaluación de linealidad, pero su valor no es determinante, o suficiente para este fin. El análisis debe ser complementado con métodos alternativos como la graficación de linealidad en un primer acercamiento y finalmente confirmado a través de una décima para la falta de ajuste.

**Tabla 1.** Valores promedio de las DO para cada punto por ensayo, así como los valores de repetibilidad y precisión intermedia para las cuatro curvas estudiadas.

C (ng/mL)	CURVA 1								
	DO				DE n = 3	CV			
	Valores medios por ensayo n = 2			Promedio n = 3 DO <sub>m</sub>		Interensayo n = 3 CV	Intraensayo n = 2		
	I	II	III		CVI		CVII	CVIII	
10	0,927	0,956	0,896	0,926	0,03	3,24	0,53	4,29	2,21
5	0,583	0,552	0,560	0,565	0,02	2,86	0,97	2,82	1,90
2	0,234	0,231	0,231	0,232	0,00	0,75	1,81	3,67	0,00
1	0,112	0,108	0,107	0,109	0,00	2,53	2,53	0,66	0,00
0,5	0,055	0,054	0,051	0,053	0,00	3,40	1,30	1,32	8,32
0,25	0,031	0,024	0,016	0,023	0,01	32,24	2,32	5,89	4,56
CURVA 2									
10	0,799	0,781	0,905	0,828	0,07	8,10	0,80	1,63	1,25
5	0,494	0,486	0,551	0,510	0,04	6,92	0,72	0,58	0,13
2,5	0,274	0,265	0,287	0,275	0,01	4,02	0,78	2,41	3,21
1,25	0,127	0,124	0,142	0,131	0,01	7,30	1,11	1,72	6,50
0,63	0,061	0,060	0,061	0,061	0,00	0,95	2,32	2,36	2,32
0,313	0,030	0,029	0,024	0,027	0,00	12,18	7,19	0,00	3,01
CURVA 3									
5	0,536	0,529	0,621	0,562	0,05	9,14	2,51	3,74	2,96
4	0,462	0,419	0,516	0,466	0,05	10,49	0,61	3,21	4,93
3	0,314	0,310	0,398	0,341	0,05	14,63	1,58	3,65	1,78
2	0,224	0,217	0,283	0,241	0,04	15,05	4,75	1,63	0,25
1	0,107	0,103	0,134	0,115	0,02	14,88	3,97	3,45	5,28
0,5	0,052	0,050	0,059	0,054	0,00	8,81	0,00	2,83	9,59
CURVA 4									
8	0,684	0,756	0,782	0,740	0,05	6,88	1,76	0,28	1,45
6	0,550	0,632	0,683	0,621	0,07	10,80	0,13	2,58	0,10
4	0,382	0,429	0,483	0,431	0,05	11,79	2,04	2,81	2,34
3	0,296	0,311	0,384	0,330	0,05	14,35	0,24	0,23	0,00
2	0,194	0,203	0,247	0,215	0,03	13,21	0,73	0,70	0,00
1	0,113	0,100	0,114	0,109	0,01	6,92	4,40	2,83	1,87

C Concentración. DO Densidad óptica. DE Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

**Tabla 2.** Resultados correspondientes a las pruebas ANOVA realizadas para las décimas de la pendiente para todas las curvas ensayadas.

CURVA 1						CURVA 3					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>1,16</sub> α = 0,05	Fuente de variación	gl	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>1,16</sub> α = 0,05
Regresión	1	1,893	1,893	1 166,225	4,494	Regresión	1	0,587	0,587	489,256	4,494
Residual	16	0,026	0,002			Residual	16	0,019	0,001		
Total	17	1,919	0,113			Total	17	0,607	0,036		
CURVA 2						CURVA 4					
Regresión	1	1,428	1,428	643,266	4,494	Regresión	1	0,858	0,858	381,364	4,494
Residual	16	0,036	0,002			Residual	16	0,036	0,002		
Total	17	1,463	0,086			Total	17	0,894	0,053		

gl Grados de libertad. SC Suma de cuadrados. CM Cuadrados medios.  
Para las curvas 1, 2, 3 y 4 como  $F_{calculada} = CM_{Reg}/CM_{res} > F_{tab.}$  rechazo Ho, la pendiente es diferente de cero.

**Tabla 3.** Resultados correspondientes a las pruebas ANOVA realizadas para las décimas de la falta de ajuste para todas las curvas ensayadas.

CURVA 1						CURVA 3					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>4,12</sub> $\alpha = 0,05$	Fuente de variación	gl	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>4,12</sub> $\alpha = 0,05$
Residuos	16	0,026				Residuos	16	0,019			
Falta de ajuste		0,024	0,006	28,626	3,259	Falta de ajuste	4	0,001	0,000	0,155 1	3,259
Error puro	12	0,002	0,000 205			Error puro	12	0,018	0,001 522		

CURVA 2						CURVA 4					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>4,12</sub> $\alpha = 0,05$	Fuente de variación	gl	SC	CM	F <sub>calc.</sub>	F <sub>4,12</sub> $\alpha = 0,05$
Residuos	16	0,036				Residuos	16	0,036			
Falta de ajuste	4	0,024	0,006	5,919	3,259	Falta de ajuste		0,010	0,003	1,223 4	3,259
Error puro	12	0,012	0,000 996			Error puro	12	0,026	0,002 131		

gl Grados de libertad. SC Suma de cuadrados. CM Cuadrados medios.

Para las curvas 1 y 2 como  $F_{\text{calc.}} > F_{\text{tab.}}$  se rechaza  $H_0$ , hay falta de ajuste.

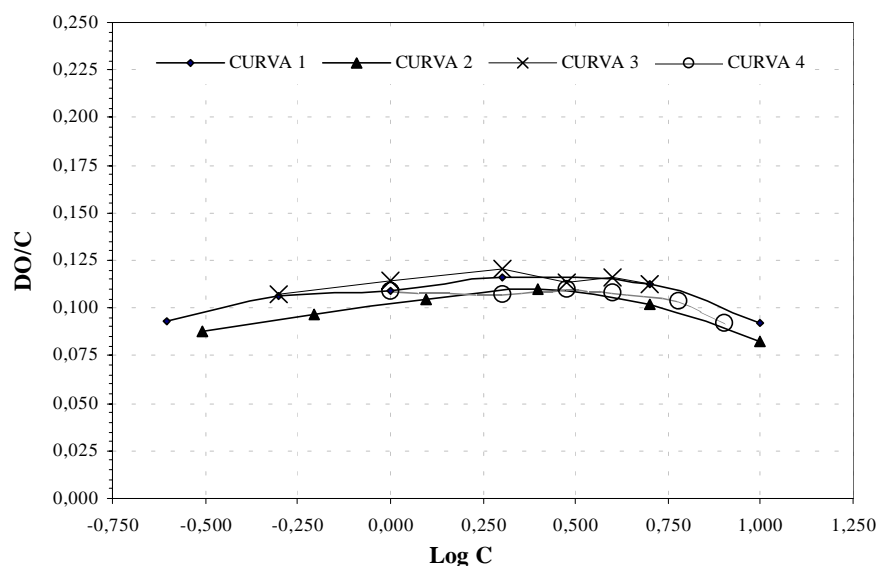
Para las curvas 3 y 4 como  $F_{\text{calc.}} < F_{\text{tab.}}$  se aprueba  $H_0$ , no hay falta de ajuste.

**Tabla 4.** Parámetros correspondientes a todas las curvas ensayadas y rango de variación de la pendiente para una tolerancia de  $\pm 5\%$ .

Curva	$b_0$	$b_1$	$r^2$	IC 95 % $b_1$	$\pm 5\%$ $b_1$
1	0,025	0,094	0,99	(0,088; 0,100)	(0,088; 0,099)
2	0,032	0,083	0,98	(0,076; 0,090)	(0,077; 0,090)
3	0,003	0,113	0,97	(0,103; 0,124)	(0,103; 0,124)
4	0,041	0,092	0,96	(0,082; 0,102)	(0,082; 0,101)

## BIBLIOGRAFIA

1. ASTM Annual Book, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Vol. 14.01, 149-58, 1988.
2. United States Pharmacopeia XXIII, General Chapter 1225. Validation of compendial methods. National Formulary, XVIII. Rockville, MD, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1612-1710, 1995.
3. Brittain G.H. Validation of Non-chromatographic Analytical Methodology. **Pharmaceutical Technology**, March, 82-90, 1998.
4. Analytical Method Committee, Royal Society of Chemistry. **Analyst**, **113**, 1469-71, 1988.
5. Craig A. Dorschel, *et al.* Evaluation and Practical Implications of Linearity. **Anal. Chem.**, **61**, 951A-968A, 1989.
6. Colin H., Guiochon G., Martin M. In Practice of High Performance Liquid Chromatography; Engelhardt, H., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 31, 1986.
7. Duarte C. *et al.*, Anticuerpos monoclonales de ratón contra el Interferón Recombinante Alfa-2: Su empleo en la purificación y detección del antígeno. **Interferon Biotecnol.**, **4**, 221-231, 1987.
8. OMS Requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación. WHO/VSQ/97.02, impreso en agosto de 1998.
9. Obenauer-Kutner L.J., Jacobs S.J., Kolz K., Tobias L. M. and Borden R.W. A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for interferon alfa-2b in human serum. **Journal of Immunological Methods**, **206**, 25-33, 1997.


**Fig. 2.** Gráfico de linealidad para las curvas 1, 2, 3 y 4.

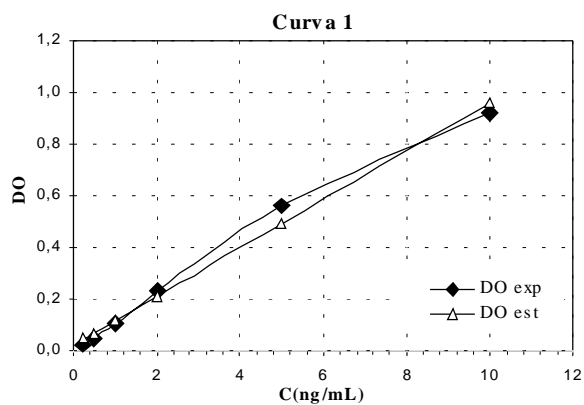
**Tabla 5.** Estimación de las concentraciones de los puntos de las curvas por el MMC.

CURVA 1			CURVA 2		
Valor (ng/mL)		Recuperación (%)	Valor (ng/mL)		Recuperación (%)
Esperado	Estimado		Esperado	Estimado	
10	9,33	96,08	10	9,38	95,63
5	6,24	115,12	5	6,06	114,82
2	2,45	110,40	2,5	3,10	116,62
1	0,86	89,50	1,25	1,08	94,69
0,5	0,09	59,97	0,625	0,36	54,82
0,25	-0,23	-6,55	0,3125	-0,29	-18,48

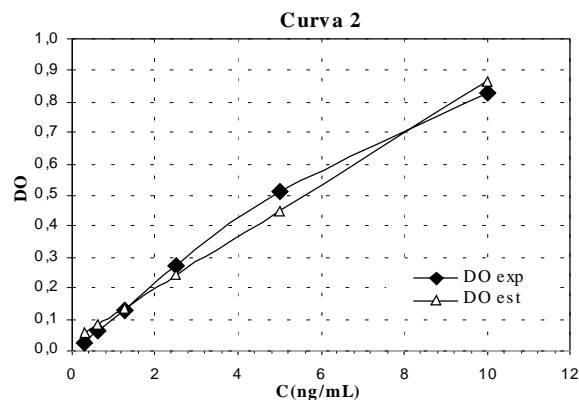
  

CURVA 3			CURVA 4		
5	4,91	98,50	8	7,57	95,34
4	4,06	101,90	6	6,38	105,47
3	3,05	99,14	4	4,39	106,37
2	2,07	104,79	3	2,97	105,12
1	0,98	98,24	2	1,99	94,80
0,5	0,44	89,25	1	0,70	74,02

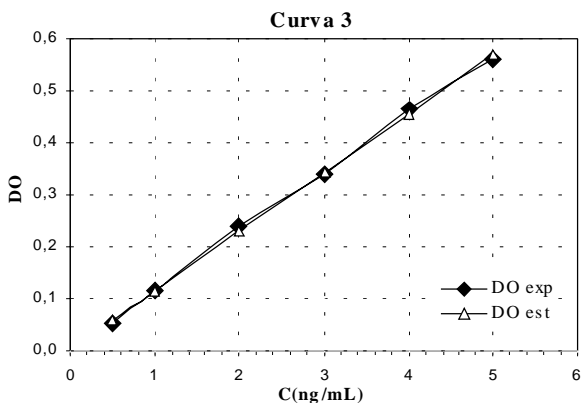
La recuperación se calcula como:  $\frac{\text{Valor estimado}}{\text{Valor esperado}} \cdot 100 = \text{Recuperación (\%)}$



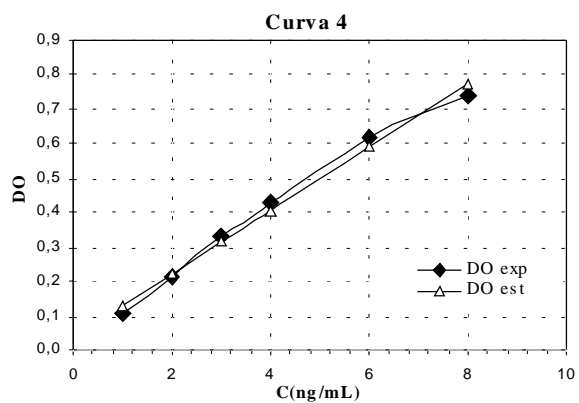
(a)



(b)



(c)



(d)

**Fig. 3.** Curvas experimentales y rectas de regresión lineal obtenidas por el MMC para los cuatro rangos de concentración estudiados. DO exp. Valores experimentales de densidad óptica obtenidos para los diferentes puntos de las curvas. DO est. Densidades ópticas estimadas para las curvas de regresión obtenidas por el MMC.