

## Evaluación del desempeño de los métodos analíticos para el estado redox extracelular en suero humano

Evaluation of the performance of analytical methods for extracellular redox state in human serum

Haydée Cruz Vadell<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2058-2469>

Leidys Cala Calviño<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6548-4526>

Leonardo Ramos Hernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7427-2568>

Celeste Roque Rodríguez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2446-0613>

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [haydeecruzv77@gmail.com](mailto:haydeecruzv77@gmail.com)

### RESUMEN

**Introducción:** La evaluación del estado redox en fluidos biológicos reviste gran importancia en el campo de la medicina, si se considera la relación demostrada del estrés oxidativo con múltiples procesos fisiopatológicos. Existen métodos evaluadores del estado redox extracelular, pero no se ha mostrado el cumplimiento de sus criterios de calidad en el contexto cubano.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño de los métodos analíticos que se emplean como medida del estado redox extracelular en suero humano para su uso eficiente en futuros estudios.

**Métodos:** A partir de un estudio analítico transversal realizado en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, se validaron los métodos empleados para la evaluación del estado redox extracelular en suero sanguíneo a través de valores de exactitud, especificidad, linealidad y precisión (repetibilidad y precisión intermedia).

**Resultados:** La evaluación realizada a los diferentes métodos analíticos mostró su elevada especificidad y los valores cuantificables solo en muestras correspondientes a los analitos evaluados. Las curvas de calibración para malonildialdehído y glutatión reducido resultaron ser lineales con coeficientes de correlación  $\geq 0,995$ . Los coeficientes de variación de los estudios de repetibilidad

fueron inferiores del 3 %, mientras que en los análisis de la precisión intermedia el ANOVA indicó diferencias no significativas entre las mediciones.

**Conclusiones:** La estandarización de los métodos analíticos que se emplean como medida del estado redox extracelular en suero humano, a partir del empleo de parámetros evaluadores de la calidad demuestran, por las características de su desempeño, que cumplen con los requisitos para su aplicación en la práctica médica e investigaciones biomédicas.

**Palabras clave:** estado redox; espectrofotometría; parámetros de calidad; validación.

## ABSTRACT

**Introduction:** The evaluation of redox state in biological fluids is of great importance in the field of medicine, if it is considered the demonstrated relationship of oxidative stress with multiple pathophysiological processes. There are methods to assess extracellular redox state, but compliance with their quality criteria has not been shown in the Cuban context.

**Objective:** Assess the performance of the analytical methods used as a measure of extracellular redox status in human serum for efficient use in future studies.

**Methods:** Based on a cross-sectional analytical study conducted at the Basic Sciences Laboratory of the University of Medical Sciences of Santiago de Cuba, the methods used for the evaluation of extracellular redox state in blood serum were validated through values of accuracy, specificity, linearity and precision (repeatability and intermediate precision).

**Results:** The assessment of the different analytical methods showed their high specificity, and also quantifiable values only in samples corresponding to the evaluated analytes. The calibration curves for malonaldehyde and reduced glutathione were found to be linear with correlation coefficients  $\geq 0.995$ . The variation coefficients of the repeatability studies were under the 3%, while in the intermediate accuracy analyses the ANOVA indicated non-significant differences between the measurements.

**Conclusions:** The standardization of the analytical methods used as a measure of the extracellular redox state in human serum from the use of quality evaluation parameters demonstrate, by the characteristics of their performance, that they meet the requirements for their application in medical practice and biomedical research.

**Keywords:** Redox state; spectrophotometry; quality parameters; validation.

Recibido: 05/06/2021

Aceptado: 14/07/2021

## Introducción

La evaluación del estado redox en fluidos biológicos reviste gran importancia en el campo de la medicina, si se considera la relación demostrada del estrés oxidativo con múltiples procesos fisiopatológicos.<sup>(1)</sup> La peroxidación lipídica es un proceso complejo, en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan la abstracción de un hidrógeno, formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente; uno de estos compuestos es el malonildialdehído (MDA).<sup>(2)</sup> De igual manera, la defensa antioxidante ha sido evaluada en fluidos biológicos a través de la concentración de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reducido (GSH), entre otras.<sup>(3)</sup> Estos últimos muestran una medida del grado de protección del organismo frente a la agresión de los radicales libres.

El daño oxidativo puede ser medido de forma directa o indirecta.<sup>(4)</sup> Los métodos indirectos son los más utilizados y determinan los subproductos originados por el ataque de radicales libres a macromoléculas. Dentro de ellos, se destaca el método de reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA), pero ha mostrado baja especificidad. En su lugar, el método del 1-metil-2-fenilindol ha mostrado tener una elevada sensibilidad y especificidad.<sup>(5)</sup> En el caso de los antioxidantes, los más comercializados son los que miden antioxidantes de tipo enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT).<sup>(6)</sup>

La validación es la confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto. En un procedimiento analítico se trata de establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestre científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.<sup>(7)</sup> Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración, sino en el análisis de muestras reales. Según United States Pharmacopoeia (USP 31), los parámetros analíticos que definen la validación de un método analítico son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo, tolerancia y robustez.<sup>(8)</sup>

En Cuba se han empleado en diversas investigaciones biomédicas estos diagnosticadores evaluadores del estado redox con resultados satisfactorios.<sup>(9,10)</sup> Sin embargo, para su implementación en la práctica asistencial e investigaciones biomédicas, es necesario que cumplan determinados criterios de calidad, los cuales no han sido reportados en nuestro contexto. Por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar el desempeño de los métodos analíticos que se emplean como medida del estado redox extracelular en suero humano para su uso eficiente en futuros estudios.

## Métodos

Se realizó un estudio analítico experimental en el periodo comprendido de enero a marzo del 2020, en el Laboratorio de Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba.

### Métodos espectrofotométricos

Los métodos objeto de estudio fueron analizados en el espectrofotómetro UV-T60 (Kaia Business International S.A, Alemania). Se aseguraron elementos participantes en las reacciones -pH de los buffers, calidad de la muestra, temperatura de incubación, entre otras, relacionadas con la calidad analítica, para garantizar el buen desarrollo de las determinaciones.

Los métodos evaluados fueron los siguientes:

- Concentración de malonildialdehído (MDA): reacción de inducción ácida del MDA con el N-metil-2-fenilindol.<sup>(11)</sup>
- Concentración de catalasa (CAT): reacción cinética de la catalasa por la degradación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a agua y oxígeno.<sup>(12)</sup>
- Concentración de glutatión reducido (GSH): reacción colorimétrica con el 5,5'-Ditiobis (2 ácido nitrobenzoico).<sup>(13)</sup>

Todos son métodos normalizados, que no requieren de una validación, sino de una evaluación de su desempeño. La evaluación se realizó conforme a la categoría I (USP 30) y la Regulación 41-2007 establecida por la entidad reguladora en Cuba para estos fines (CECMED).<sup>(7)</sup>

### Parámetros evaluados

Se evaluaron cuatro parámetros:

- Exactitud: se utilizaron cinco diluciones diferentes de un material de referencia, las cuales fueron analizadas por duplicado en tres ensayos como mínimo para cada parámetro evaluado.
- Precisión: se determinó a nivel de intraensayo (repetibilidad) e interensayo (precisión intermedia):

- Repetibilidad: se prepararon muestras provenientes de sujetos aparentemente sanos y afectados con anemia drepanocítica, buscando concentraciones diferentes dentro del intervalo lineal para cada parámetro, con dos réplicas de cada una.
  - Precisión intermedia: se evaluaron tres concentraciones de una muestra en días diferentes por dos analistas, en el mismo laboratorio. En cada caso se evaluó la media, desviación estándar típica y el coeficiente de variación (< 5 %).
- Especificidad: se aseguró por parte del analista que la señal medida por el método analítico correspondiera exclusivamente al analito, sin interferencias de excipientes, productos de degradación e impurezas. Fueron preparadas muestras placebos, las cuales se sometieron a igual procedimiento técnico que las muestras en cada caso.

Criterio de aceptación: ninguno de los componentes de la formulación debe arrojar un valor de densidad óptica (DO) cuantificable en el rango de interés analítico.

- Linealidad: se efectuó sobre soluciones de referencia de los analitos con concentraciones crecientes que cubrían el intervalo de los métodos: GSH (1,17-10,54 nmol/100 mL) y MDA (1,65-13,2 umol/L). Se evaluó la linealidad de las curvas de calibración obtenidas, según su coeficiente de correlación (R) y de determinación (R<sup>2</sup>) entre la señal analítica y la concentración de soluciones de referencia, considerándose el R<sup>2</sup> óptimo > 0,995.

## Análisis estadístico

A los valores obtenidos en cada ensayo se les determinó la homogeneidad de varianza para demostrar el comportamiento normal de los datos y se procesaron a partir de métodos paramétricos como el t de Student y el ANOVA con un nivel de confianza del 95 % y regresión lineal con el empleo del software estadístico SPSS (versión 21,0).<sup>(14,15)</sup>

## Resultados

La estandarización de los métodos analíticos relacionados con el estado redox en muestras controles a partir del empleo de parámetros evaluadores de la calidad arribó a los siguientes resultados:

- Exactitud: las diluciones duplicadas aplicadas al material de referencia del GSH y el MDA en dos ensayos independientes mostraron intervalos de confianza del valor experimental acorde al valor de concentración teórico (esperado) en cada caso, tal como muestra la tabla 1. No se observaron diferencias significativas entre las respuestas (DO) obtenidas de las diferentes curvas, a pesar de haberse obtenido estas en diferentes momentos.

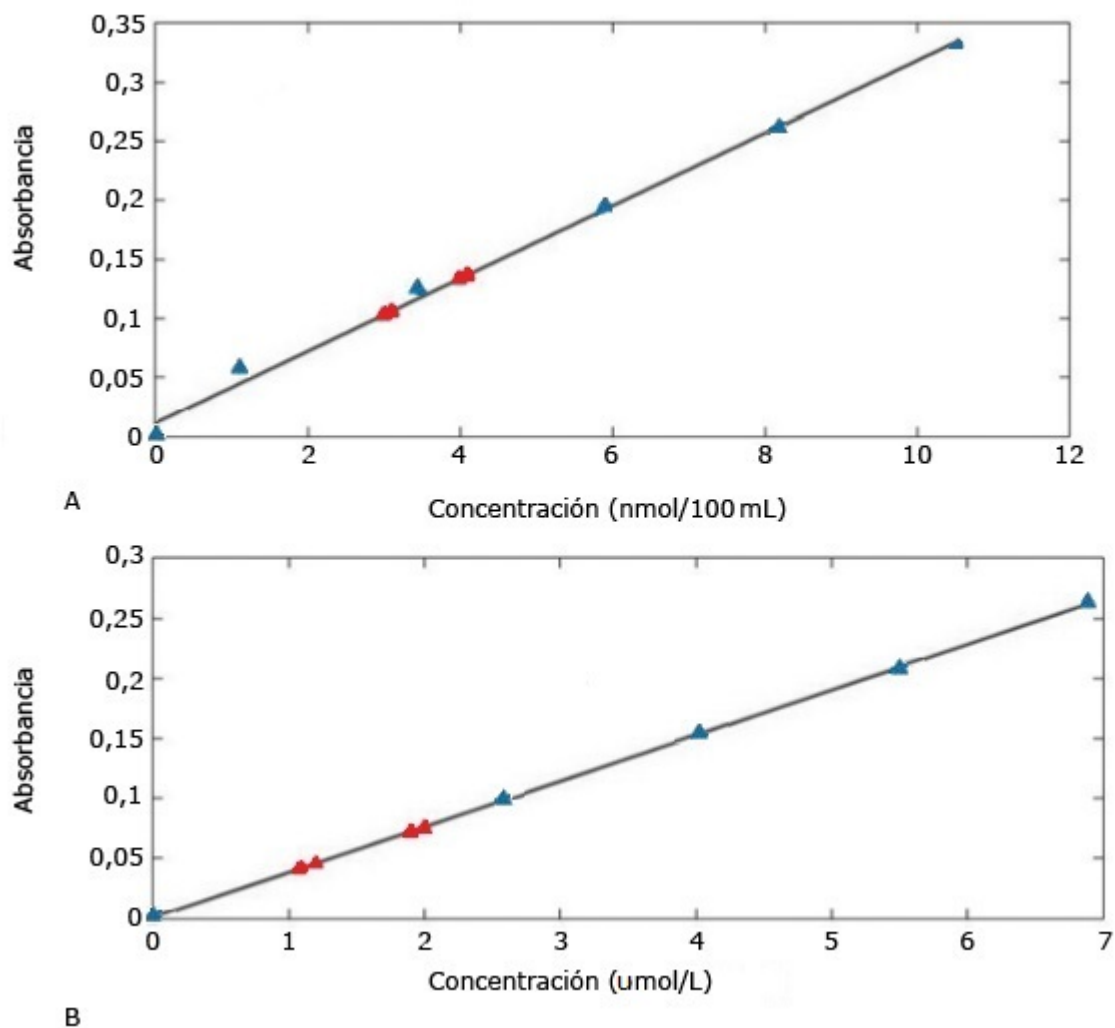
**Tabla 1** - Medida de exactitud del método empleado para la cuantificación del GSH a partir de valores de DO obtenidos en curvas de calibración

Métodos		Levene's Test para igualdad de varianzas		t- test para igualdad de medias						
		F	Sig.	t	d f	Sig.(2- tailed)	Diferencia de medias	Diferencia Error Std.	95 % Intervalo de confianza	
									Menor	Mayor
GSH	DO1	5,000	0,089	-0,802	4	0,468	-0,001000	0,001247	-0,004463	0,002463
	DO2	2,286	0,205	-0,500	4	0,643	-0,000667	0,001333	-0,004369	0,003035
	DO3	0,143	0,725	-0,213	4	0,842	-0,000667	0,003127	-0,009348	0,008015
	DO4	0,132	0,734	-0,203	4	0,849	-0,001000	0,004922	-0,014665	0,012665
	DO5	0,145	0,723	-0,237	4	0,825	-0,001333	0,005637	-0,016985	0,014318
	DO6	0,062	0,815	-0,202	4	0,850	-0,001333	0,006616	-0,019704	0,017037
MDA	DO1	2,450	,193	-0,125	4	0,906	0,001333	0,010625	-0,028166	0,030833
	DO2	10,12	0,033	1,863	4	0,136	0,006333	0,003399	-0,003105	0,015771
	DO3	0,408	0,558	1,648	4	0,175	0,006333	0,003844	-0,004340	0,017007
	DO4	0,003	0,961	0,410	4	0,703	0,008667	0,021156	-0,050070	0,067404
	DO5	0,362	0,580	1,448	4	0,221	0,015667	0,010822	-0,014379	0,045713

No se observan niveles significativos de  $p < 0,05$  según el t de Student.

Fuente: software UVWin5(v5.2.0).

- La precisión, según los métodos utilizados por los analistas en el estudio mostró niveles de repetibilidad aceptables (Fig. 1). Se observó en la salida del software la concordancia entre muestras duplicadas para ambos métodos.



*Nota:* los puntos en rojo se corresponden con los valores por duplicado de las mediciones de ambos analitos en las muestras, mientras que los azules indican los puntos de las curvas de calibración correspondientes a cada determinación

*Fuente:* Software UVWin5 (v5.2.0).

**Fig. 1 - A)** Representación gráfica de la repetibilidad de métodos de glutatión reducido y **B)** malonildialdehído.

En el caso particular de la catalasa, donde el valor de concentración fue obtenido a partir de la variación de la absorbancia (DO) en el tiempo del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la repetibilidad quedó demostrada a partir de la concordancia en valores de concentración, tal como muestra la tabla 2.

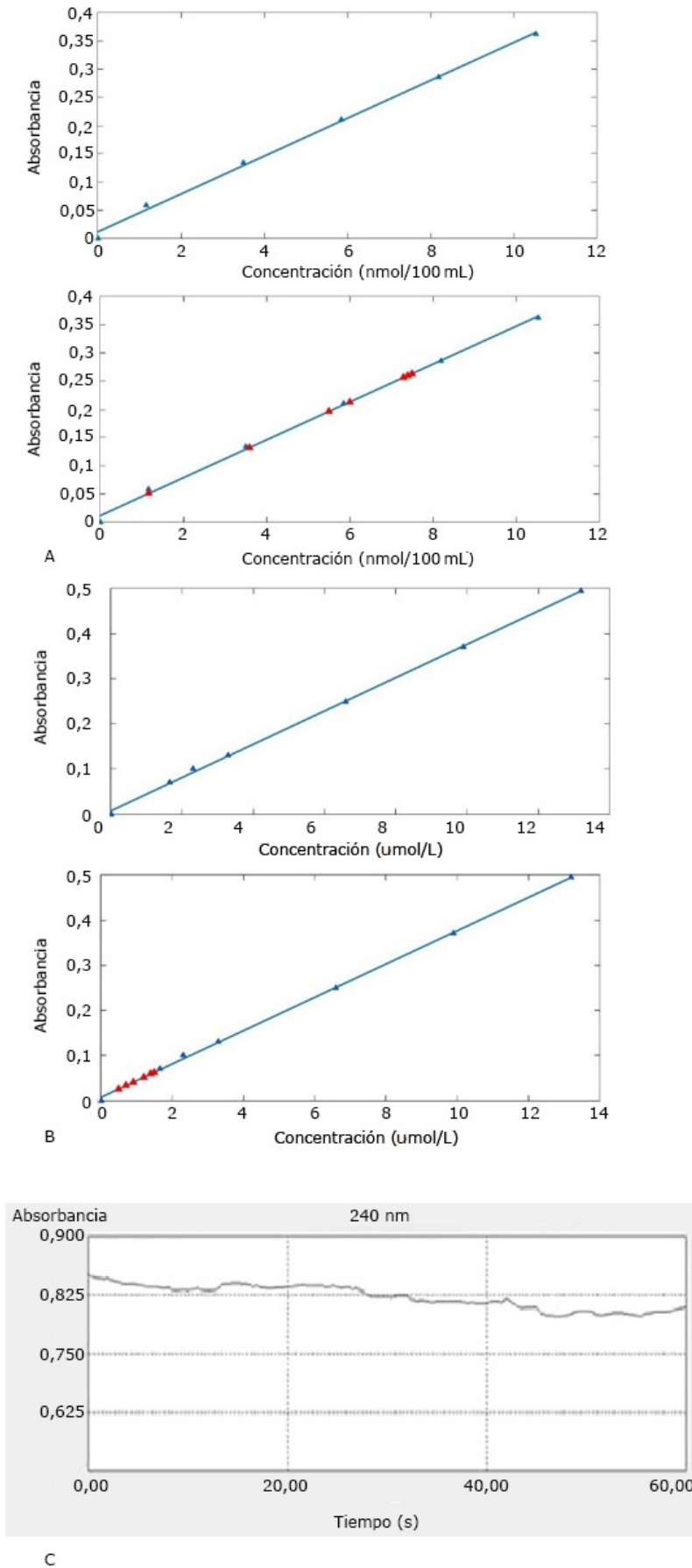
**Tabla 2 - Resultados del estudio de la precisión de los métodos analíticos**

Parámetros	Analista 1 (Conc.)						Analista 2 (Conc.)					
	Día 1			Día 2			Día 1			Día 2		
GSH (nmol/100 mL)	4,3	4,2	4,1	4,0	4,1	4,2	4,1	4,0	4,0	4,2	4,1	4,3
MDA (umol/L)	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8	0,7	0,6
CAT (U/mL/mto.)	2,2	2,6	2,5	2,3	2,4	2,1	2,3	2,2	2,1	2,4	2,4	2,2
Análisis estadístico												
Parámetros	Día 1			Día 2			p valor 1			p valor 2		
GSH (nmol/100 mL)	X= 4,12 CV=0,03			X= 4,15 CV=0,03			0,280			0,060		
MDA (umol/L)	X=0,73 CV=0,14			X=0,68 CV=0,11			0,230			0,768		
CAT (U/mL/mto.)	X=2,31 CV=0,08			X =2,30 CV=0,05			0,326			0,205		

p valor 1: contraste entre días (analista 1); p valor 2: contraste entre días (analista 2); conc: concentración de cada parámetro; X: valor medio y CV: coeficiente de variación.

- Precisión intermedia: el test de contraste de medias (ANOVA) realizado a todos los parámetros indicó diferencias no significativas cuando se procesaron muestras idénticas por cada analista en días consecutivos. Así lo reflejaron los valores de media y coeficiente de variación en cada caso.
3. Especificidad: el trabajo con muestras placebo mostró que ninguno de los componentes arrojó una señal cuantificable, solo aquellas muestras de suero humano con una concentración específica del analito en cuestión mostraron valores cuantificables (Fig. 2).





Nota: los puntos en color rojo de las gráficas(A y B) están mostrando valores de absorbancia de los analitos en contraste con las muestras placebo (gráficos primero y tercero). En la lectura de la CAT(C) se muestra recorrido cinético de DO del peróxido de hidrógeno por acción de la enzima en muestra de suero humano, no observándose señal en la muestra placebo. Captura de pantalla del Software UVWin5 (v5.2.0).

**Fig. 2 - Especificidad de métodos de cuantificación del A) GSH, B) MDA y C) CAT.**

4. Linealidad: los cinco valores de concentración, obtenidos a partir de soluciones de referencia crecientes que cubrían el intervalo de los métodos, revelan su linealidad a partir de las ecuaciones obtenidas (Fig. 3).

Para el GSH la ecuación de la recta se expresó según:  $y = 0,02708x + 0,00132$  (día 1);  $y = 0,02752x + 0,00532$  (día 2) respectivamente, mientras el coeficiente  $R^2 = 0,9969$ . La figura 3 muestra el desempeño de curvas de calibración de ambos indicadores (A y B) con un coeficiente satisfactorio en cada caso ( $R^2 > 0.995$ ).

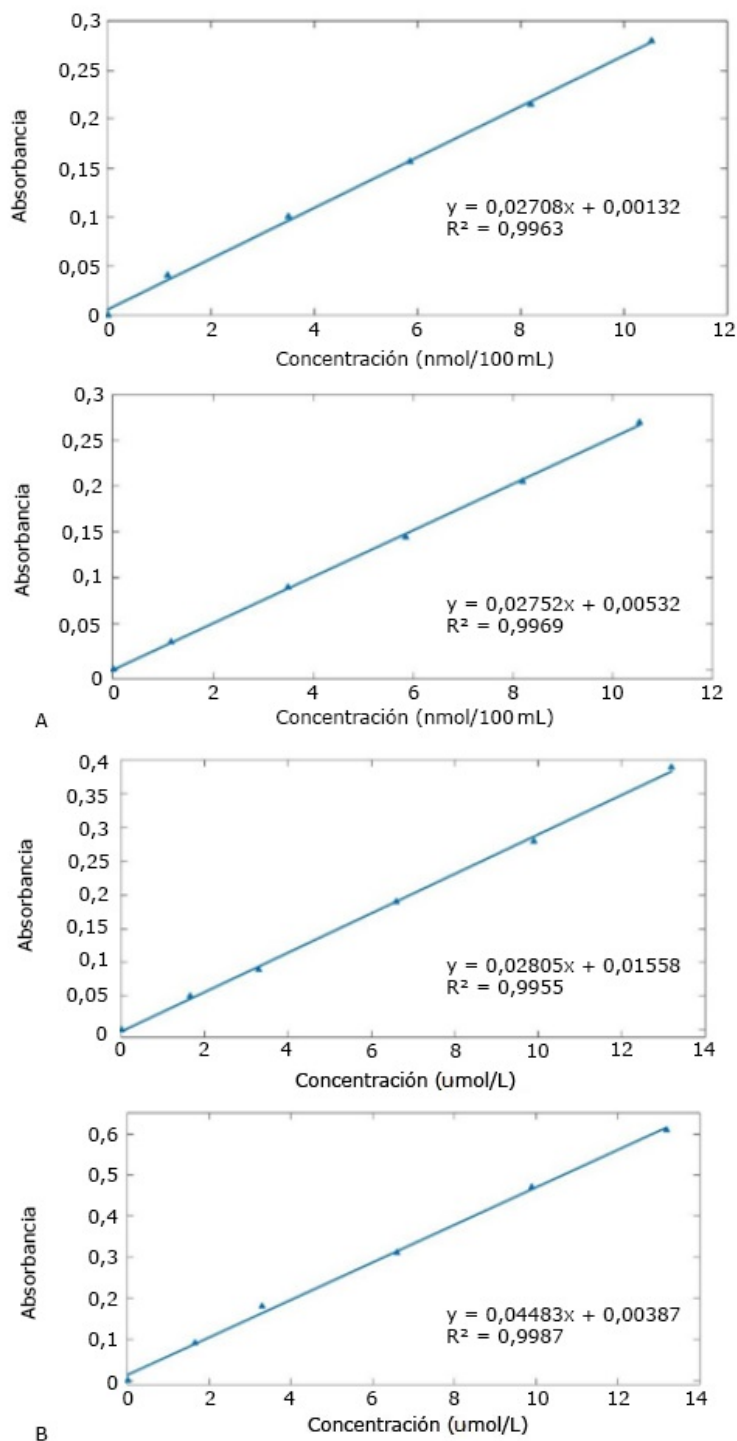


Fig. 3 - A) Representación de la linealidad de métodos analíticos de GSH y B) MDA a partir de curvas de calibración obtenidas en diferentes momentos.

Fuente: Software UVWin5(v5.2.0).

## Discusión

Los valores de concentración obtenidos en cada método evaluado durante la investigación estuvieron dentro de los límites establecidos en los protocolos de métodos empleados para cada analito.<sup>(11,12,13)</sup> El t de Student corroboró su exactitud, ya que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de DO en las diferentes curvas obtenidas. Estos resultados brindan una mayor seguridad al analista durante la investigación, posibilitando la reproducibilidad del método bajo diferentes condiciones de trabajo. En el caso particular de la CAT, al utilizarse en el estudio un método cinético para la cuantificación de la enzima, no se estableció la evaluación de dicho indicador desde el punto de vista de su exactitud al no requerir de una curva de calibración ni del uso de soluciones de referencia.

El estudio de precisión en la presente investigación indicó que la diferencia entre análisis por duplicado de una muestra determinada bajo condiciones de repetibilidad no es significativa. La evaluación alcanzó un coeficiente de variación adecuado ( $< 0,3\%$ ), lo que demuestra la buena precisión de los métodos aplicados. El estudio de precisión intermedia demostró, a partir del contraste de medias (ANOVA) entre días, que no existían diferencias significativas entre las mediciones realizadas, permitiendo concluir que las precisiones son similares y demostrando la existencia de una reproducibilidad aceptable, como la obtenida en investigaciones previas.<sup>(16)</sup>

Los resultados mostrados en el presente estudio demuestran la especificidad de los métodos al no presentarse valores cuantificables de absorbancia en muestras placebos durante la lectura en espectrofotómetro. Lo que se evidencia al observar que el valor obtenido en cada parámetro es específico del analito en cuestión. La ausencia de un valor de DO en el placebo, al ser comparado con los valores de DO para las muestras analizadas en los métodos evaluados (Fig. 2) indica que los excipientes o sustancias auxiliares presentes en las muestras no interfieren en las determinaciones. Esto permite afirmar que los métodos desarrollados son lo suficientemente específicos para realizar la evaluación de respuesta antioxidante y daño oxidativo a lípidos en suero humano.

Los resultados del estudio de linealidad (Fig. 3) muestran, a partir de curvas de calibración obtenidas para cada indicador, coeficientes de determinación en el rango exigido ( $> 0,995$ ), cercano a la unidad y la existencia de correlación con una probabilidad elevada, demostrando con estos resultados la linealidad de los métodos evaluados. También se observó una proporcionalidad entre la respuesta (DO) y la concentración para cada nivel evaluado. El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero, lo que permite excluir la significación del error del intercepto. Similar resultado fue obtenido por *Isaza*,<sup>(17)</sup> quien validó el método usado para el MDA en el presente estudio en *pisum sativum*, obteniendo un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9986$ .

Los métodos diseñados para analizar la concentración de las enzimas como la CAT en fluidos biológicos suelen no ser lineales. En este sentido, la concentración de la enzima multiplicada por un determinado factor no se corresponde con la absorbancia multiplicada por el mismo factor. Esto obliga al analista, en determinados casos, a elaborar curvas de calibración a partir de soluciones de referencia. Sin embargo, como se ha manifestado, el método de elección en el estudio es cinético, por lo que no procede el análisis de linealidad para este indicador.

Los métodos analíticos evaluados por espectrofotometría, para la cuantificación de catalasa, glutatión reducido y malonildialdehído resultaron ser lineales, precisos, exactos, robustos y específicos, en los intervalos de concentraciones establecidos.

Se concluye con la estandarización de los métodos analíticos empleados como medida del estado redox extracelular en suero humano, a partir del empleo de parámetros evaluadores de la calidad, que los mismos cumplen con los requisitos para su aplicación en la práctica médica e investigaciones biomédicas.

## Referencias bibliográficas

1. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Med leg. Costa Rica. 2019 [acceso 04/06/2021];36(1):91-100. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en)
2. González del Pozo I. Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en el paciente con hipertrofia cardiaca: estudio observacional. [Tesis doctoral, Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas]. [Madrid]: Universidad Complutense; 2019 [acceso 05/06/2021]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/57665/1/T41428.pdf>
3. Mañon Rossi W, Garrido G, Núñez Sellez AJ. Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. Journ of Pharm & Pharmacog Res. 2016;4(2):62-83 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496053934003>
4. Arteche Hidalgo L, García Sánchez M, Leyva Cerulia M, Martínez Martín S. Estandarización de valores de referencia de parámetros de estrés oxidativo. Rev Cub Med Mil. 2018 [acceso 05/06/2021];47(2):127-32. Disponible en: <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/102/169>
5. Iraizoz Barrios AM, Crespo Ferrá Y, Delgado Roche L, León Fernández OS, Flores Sánchez RM, Brito Sosa G, *et al.* Influencia del estrés oxidativo seminal en el resultado de técnicas de fertilización in vitro. Rev Cumbres. 2017 [acceso 05/06/2021];3(2):31-40. Disponible en: <https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/Cumbres/article/view/124>

6. Forbes-Hernández TY, Betancourt G, Rodríguez D, García MA. Capacidad antioxidante total de la dieta vs. balance redox. QhaliKay. Rev Cien Salud. 2020 [acceso 05/06/2021];4(1):35-4. Disponible en: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/QhaliKay/article/view/2711/2943>
7. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Anexo No. I. De las buenas prácticas para laboratorio de control de medicamentos. Validación de métodos analíticos. La Habana: Minsap; 2013. [acceso 05/06/2021]. Disponible en: [https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/validacion\\_de\\_metodos\\_analiticos.pdf](https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/validacion_de_metodos_analiticos.pdf)
8. Ministerio de Salud. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Cotra Rica: Ministerio de Salud; 2019 [acceso 05/06/2021]. Disponible en: <https://bit.ly/2TIT0gP>
9. Mederos-Pérez I, Vázquez-Silva Y, De la Cruz-Fernández CY, López-Lamezón S. Efecto del tratamiento farmacológico de la diabetes sobre parámetros bioquímicos clásicos y estado redox. Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2020 [acceso 05/06/2021];67(1):17-25. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/COMPLETOS/patol/2020/pt201.pdf>
10. Gil L, Daumy Y, Pérez L, Alvarez A, Díaz H, Luzardo C, *et al.* Evaluación del estado redox y de algunos marcadores inmunológicos en individuos seropositivos al virus linfo-trópico de células T humanas tipo I. Bioq. 2002;27(2): 6-31
11. Esterbauer H, Schaur R, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyde and Related Aldehydes. Free Rad. Bio! & Med. 1991;11:81-128.
12. Aebi H. Catalase in vitro. Meth Enzymol. 1984;105:121-6.
13. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein bound and non-protein sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968;25:192-205.
14. Castro EM. Bioestadística aplicada en investigación clínica: conceptos básicos. Rev méd clín los condes. 2019 [acceso 05/06/2021];30(1):50-65. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864019300045>
15. Manterola C, Quiroz G, Salazar P, García N. Methodology of study designs most frequently used in clinical research. Rev méd clín los condes. 2019 [acceso 05/06/2021];30(1):36-49. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864019300057>
16. Cruz Vadell H, León Nip M, Cáceres Diéguez A, López Barroso R, Álvarez Guerra ED. El análisis multivariado a partir del estado redox asociado a la preeclampsia. Rev Cubana Obstet Ginecol. 2017 [acceso 05/06/2021];43(3):107-

18. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2017000300010&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2017000300010&lng=es).

17. Isaza Martínez JH, Restrepo Vega MJ, Colmenares Dulcey AJ. N-methyl-2-phenylindole colorimetric method as biomarker for lipid peroxidation in *Pisum sativum*. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients. 2015;2:10. DOI: [10.15171/ijpni.2015.10](https://doi.org/10.15171/ijpni.2015.10)

### Conflicto de intereses

Los autores plantean que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Haydée Cruz Vadell*: conceptualización; análisis formal; investigación; metodología; Administración de proyecto; supervisión; validación; visualización; redacción - borrador original; redacción: - revisión y edición.

*Leidys Cala Calviño*: curación de datos; análisis formal; investigación; redacción - borrador original; redacción: - revisión y edición.

*Leonardo Ramos Hernández*: curación de datos; recursos; redacción: - revisión y edición.

*Celeste Roque Rodríguez*: investigación; recursos.