



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo y validación de un método analítico por
Cromatografía de líquidos para cuantificar
Ácido Hipúrico en orina humana”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

P R E S E N T A:

IXZEL HERNÁNDEZ CARVAJAL

MÉXICO, D. F.

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado.
Vocal	M. en C. Lauro Misael del Rivero Ramírez.
Secretario	M. en F. Liz Jannet Medina Reyes.
Primer suplente	M. en F. Luis Jesús García Aguirre.
Segundo suplente	M. en C. Julio Cesar Rivera Leyva.

Sitio donde se desarrolló el tema:

CIF-BIOTEC Fundación Clínica Médica Sur

ASESOR:

M. en C. Lauro Misael del Rivero Ramírez. _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q. F. B. Angélica Ochoa Zarate. _____

SUSTENTANTE:

Ixzel Hernández Carvajal. _____



**Hoy te doy gracias Señor
por la luz y por el día
por mis ratos de dolor
y por toda mi alegría
por los padres que me diste
y también por mis hermanos
por lo que de mi ser hiciste
y por mis sueños logrados
por los que mucho me aman,
por los que nada me quieren
por la dicha, por la paz
por la unidad y el amor
por todo cuanto me das,
HOY TE DOY GRACIAS SEÑOR.**

Gracias Mamá por ser la
mujer que me enseña
todos los días,
a cumplir mis metas
sin importar el camino que tenga que recorrer.
por que eres mi mejor ejemplo
y mi más grande orgullo.

Gracias Papá por que
me ensañaste a ver más allá
del horizonte, y ahora se
que la felicidad no se encuentra
en lo que una persona tiene,
sino en lo que una persona es.

Sac-nicte y Yuzviranelly
su cariño, apoyo y compañía
son las señales que me guían
y me impulsan
para ser mejor cada día.

Gracias Abuelitos Rosendo y Gloria,
por que sus cuidados,
amor y comprensión
son las bases de la
persona que hoy soy.

Ale, ya lo sabes mi tía
favorita. Gracias por que siempre
me haces sentir grande
y capaz de alcanzar
mis más difíciles anhelos.
Muchas gracias!!!.

Y a todos ustedes, tíos y primos, que están
pensando que su nombre no aparece aquí,
gracias familia, por que son el verdadero ejemplo
de unidad, de trabajo en equipo y por que
simplemente son la única familia
que Dios me pudo haber dado.

Gracias.....





Misael, por pensar sólo en lo mejor,
trabajar por lo mejor y
esperar sólo lo mejor.
Por tener alma para el sufrimiento
y mucha nobleza para la cólera;
fortaleza para el temor,
pero sobre todo
por ser justo y
entusiasta por el éxito de otros,
como lo eres por el tuyo.

Carmen, Oscar, Giovanni, Angie,
Noemi, Betty, Patty, Ana y Laura
mis compañeros y amigos
por recibirme con una sonrisa
y mirarme con el corazón,
por entregarme su confianza
y ser parte de mi, hoy.

Xochitl, Daniel, David, Enrique, Ricardo,
Jaime, José J. D, Agustín y Edgar
que compartimos nuestro
inolvidable Bachilleres No 12,
chicos, sin su amistad
mi historia no sería igual.
Gracias por su verdadera y sincera
compañía en cada paso de mi vida.

Grissel, Cecilia, Kadiya, Yuri, Roxana,
Fernando, Rafa, Ernesto y Diego
por darme la oportunidad de conocerlos
y por que mi paso por la Universidad
fue grato e incomparable gracias a ustedes.
Por que se que la amistad va más allá
de un aula y una generación.
Gracias colegas por que caminaron
a mi lado, hacía lo que hoy es
mi más grande triunfo.

Hugo A. A ti principalmente
por comprenderme, por aceptarme,
por ser mi amigo incondicional,
por que eres único y especial,
por lo mucho que me quieres
y por que siempre rezas por mí.
Dios te bendiga siempre.

A mi querida Facultad de Química, que me dio
la oportunidad de formar parte de ella,
a todos y cada uno de los profesores que se esmeraron
por sacar lo mejor de mí, y que no sólo nos dejaron los
conocimientos, sino también las lecciones de vida.
Gracias máxima casa de estudios
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.





ÍNDICE

	Pág.
I. Introducción	1
II. Generalidades	2
II.1 Encefalopatía Hepática	4
II.1.1 Fisiopatología	4
II.1.2 Factores desencadenantes de encefalopatía hepática	7
II.1.3 Diagnóstico	8
II.1.4 Tratamiento	9
II.2 Justificación del presente estudio	14
II.3 Ácido Hipúrico	14
II.4 Otras aplicaciones del ácido hipúrico	17
II.4.1 Defectos enzimáticos del ciclo de la urea	17
II.4.2 Monitoreo de ácido hipúrico como indicador de la exposición ocupacional a tolueno	17
II.4.3 El ácido hipúrico en urología	18
III. Parte Experimental	19
III.1 Elaboración del protocolo analítico	20
III.1.1 Selección de las condiciones cromatográficas	20
III.1.2 Selección del método de extracción	21
III.1.3 Selección del intervalo de trabajo de la curva estándar	21
III.1.4 Selección de estándar interno	21
III.1.5 Selección del modelo matemático	22
III.1.6 Optimización del método analítico	22
III.2 Desarrollo del método analítico para cuantificar ácido hipúrico en orina humana	22
III.2.1 Materiales	22
III.2.2 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución	22
III.2.3 Equipos	23
III.2.4 Instrumentos	23
III.2.5 Reactivos y sustancias de referencia	24
III.2.6 Preparación de la mezcla de orina humana	24
III.2.7 Preparación de la fase móvil	24
III.2.8 Preparación de las soluciones estándar	25
III.2.9 Preparación de la curva estándar	26
III.2.10 Método de extracción	27
III.2.11 Preparación de las muestras control en sistema	28
III.2.12 Condiciones cromatográficas	29
III.3 Validación del método analítico	30
III.3.1 Linealidad	31
III.3.2 Precisión	31
III.3.3 Exactitud	32
III.3.4 Recobro absoluto	32
III.3.5 Selectividad	33
III.3.6 Límite de detección	33





III.3.7	Límite de cuantificación	33
III.3.8	Estabilidad	34
III.3.9	Tolerancia	39
IV.	Resultados y análisis	40
IV.1	Condiciones cromatográficas	40
IV.2	Método de extracción optimizado	41
IV.3	Linealidad del método	42
IV.3.1	Determinación de la bondad de ajuste de Concentración adicionada vs. Concentración recuperada	44
IV.4	Precisión del método	45
IV.4.1	Repetibilidad	45
IV.4.2	Reproducibilidad intra-analista (efecto día)	46
IV.4.3	Reproducibilidad inter-analista (efecto analista)	48
IV.5	Exactitud del método	49
IV.6	Recobro absoluto	49
IV.7	Selectividad	51
IV.8	Límite de detección	56
IV.9	Límite de cuantificación	57
IV.10	Estabilidad	58
IV.10.1	Estabilidad a temperatura ambiente	58
IV.10.2	Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento	59
IV.10.3	Estabilidad a ciclos de congelación y descongelación	60
IV.10.4	Estabilidad en el automuestreador	61
IV.11	Tolerancia	62
IV.12	Análisis de resultados	63
V.	Conclusiones	65
VI.	Bibliografía	66



*ÍNDICE DE TABLAS*

	Pág.
Tabla 1. Porcentaje de defunciones generales y principales causas 1990 a 2004.	3
Tabla 2. Métodos analíticos para la cuantificación de ácido hipúrico	16
Tabla 3. Preparación de la curva estándar y muestras control	26
Tabla 4. Preparación de muestras control para recobro	28
Tabla 5. Evaluación de estabilidad a temperatura ambiente	34
Tabla 6. Evaluación de estabilidad a largo plazo	35
Tabla 7. Evaluación de la estabilidad en refrigeración	36
Tabla 8. Evaluación de la estabilidad en ciclos de congelación y descongelación ...	37
Tabla 9. Evaluación de la estabilidad en el automuestreador	38
Tabla 10. Evaluación de las dos diferentes condiciones de Tolerancia	39
Tabla 11. Parámetros cromatográficos de validación	40
Tabla 12. Presición y exactitud para linealidad	42
Tabla 13. Modelo matemático de linealidad	43
Tabla 14. Parámetros estadísticos de la bondad de ajuste	44
Tabla 15. Residuos obtenidos para cada concentración adicionada	44
Tabla 16. Resultados de repetibilidad	45
Tabla 17. Reproducibilidad intra-analista 1	46
Tabla 18. Reproducibilidad intra-analista 2	47
Tabla 19. Reproducibilidad inter-analistas	48
Tabla 20. Recobro obtenido para ácido hipúrico	49
Tabla 21. Recobro obtenido para ácido benzoico	50
Tabla 22. Selectividad del método	51
Tabla 23. Límite de detección para el método	56
Tabla 24. Límite de cuantificación para el método	57
Tabla 25. Resultados de estabilidad a temperatura ambiente	58
Tabla 26. Resultados de estabilidad a largo plazo	59
Tabla 27. Resultados de estabilidad en refrigeración	60
Tabla 28. Resultados de estabilidad a dos ciclos de congelación y descongelación .	61
Tabla 29. Resultados de estabilidad en el automuestreador	62
Tabla 30. Resultados de la tolerancia al variar la proporción de fase móvil	63
Tabla 31. Resumen de resultados durante la validación	64





ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formación del ácido hipúrico, a partir del ácido benzoico conjugado con la glicina ..	12
Figura 2. Diagrama de Flujo del método analítico	27
Figura 3. Linealidad promedio del método analítico	42
Figura 4. Gráfica de regresión de la Concentración recuperada vs. Concentración adicionada	44
Figura 5. Gráfica de la Concentración adicionada vs. Residuos	44
Figura 6. Selectividad para cuantificar ácido hipúrico en orina humana	52





I. Introducción.

En México, las enfermedades del hígado representan la quinta causa de muerte, siendo de interés particular el desarrollo de nuevas metodologías para la evaluación del comportamiento de estas enfermedades.

Una de las enfermedades del hígado con mayor prevalencia en México es la cirrosis hepática donde las complicaciones más frecuentes son la aparición de síntomas relacionados con depresión del sistema nervioso central, que en conjunto se conocen como síndrome de encefalopatía porto sistémica (EPS), la teoría más consistente de su origen es la intoxicación por amonio.

El ácido hipúrico (AH) es un compuesto que surge de la condensación de la glicina con el ácido benzoico (AB) y es un componente habitual de la orina sobre todo en herbívoros ya que se encuentra en alimentos de origen vegetal. Su síntesis se lleva a cabo mediante el ciclo fosfogliceraldehído-glicina que forma amino alcoholes y la metilación de estos amino alcoholes da lugar a diferentes sustratos de importancia biológica entre ellos el ácido hipúrico.

Una de las alternativas terapéuticas para disminuir los niveles sanguíneos de nitrógeno es favorecer la eliminación del mismo por vía renal como ácido hipúrico, siendo necesario contar con metodología analítica que permita monitorear las concentraciones en orina, por lo que se proponen los siguientes objetivos:

Objetivos

1. Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección Ultravioleta para cuantificar ácido hipúrico en orina humana para su aplicación estudios de excreción urinaria.
2. Validar el método analítico de acuerdo a los lineamientos de la norma NOM-177-SSA1-1998.





II. Generalidades.

Uno de los factores de mayor peso para la evaluación del grado de desarrollo de un país, es la inversión en su sistema de salud, y paradójicamente el grado del índice de mortalidad es el aspecto que mejor describe la situación de la salud de una población. En México, de acuerdo a las estadísticas de la Secretaría de Salud,⁽¹⁾ a partir de 1940 se apreció un descenso sostenido de la mortalidad en general; sin embargo, de acuerdo a la información proporcionada por el INEGI ⁽²⁾ las enfermedades del hígado se han incrementado hasta llegar a ocupar el quinto lugar de la causa de muerte en nuestro país, tal y como se aprecia en el tabla 1 “Porcentaje de defunciones generales a partir de 1990 hasta el 2004”.

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas, es el lugar principal en el que los nutrientes se han absorbido del intestino y luego son transferidos a la sangre. Los nutrientes son procesados para ser utilizados por las otras células del cuerpo; la mayor parte del aporte sanguíneo que recibe proviene directamente del tracto intestinal (por la vía de la vena porta). Además, actúa como filtro para eliminar patógenos y toxinas de la sangre. Teniendo en cuenta la cantidad de funciones vitales que realiza el hígado, no es sorprendente que las lesiones hepáticas afecten a casi todos los sistemas orgánicos, entre ellos al digestivo, endócrino, cardiovascular e inmunitario. ^(3,4) Por tal motivo no es extraño que las enfermedades del hígado ocupen un lugar importante en las principales causas de muerte en nuestro país.

Dentro de la enfermedades del hígado, la encefalopatía por la asociación con otras enfermedades propias del hígado y por las complicaciones derivadas de la misma, es de interés para realizar estudios de investigación clínica relacionadas a la mejora de la calidad de vida de pacientes con esta patología.





Tabla 1. Porcentaje de defunciones generales y principales causas 1990 a 2004.

Causa	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Defunciones Generales	422,803	411,131	409,814	416,335	419,074	430,278	436,321	440,437	444,665	443,950	437,667	443,127	459,687	472,140	473,417
Enfermedades del corazón.	12.5	13.2	13.6	14	14.5	14.8	15	15.4	15.4	15.6	15.7	15.9	16.2	16.4	16.4
Diabetes Mellitus	6.1	6.6	6.9	7.1	7.2	7.7	8	8.2	9.4	10.3	10.7	11.3	11.9	12.5	13.1
Tumores malignos	9.7	10.2	10.7	10.8	11.1	11.2	11.4	11.6	11.8	12.1	12.6	12.7	12.7	12.7	12.9
Accidentes	9.3	9.5	9.3	8.9	8.9	8.3	8	8.1	8	8	8.1	8	12.7	7.5	7.4
Enfermedades del hígado ^a	4.2	4.5	4.7	4.9	5	4.9	5	5.2	6.1	6.1	6.3	6.3	7.8	6.2	7.4
Enfermedades cerebrovasculares ^b	4.7	5.1	5.2	5.2	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	5.8	5.8	5.8	6.2	5.7	5.7
Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	5.5	5.4	5.3	5	4.9	4.8	4.5	4.5	4.5	4.3	4.4	4.1	5.8	3.6	3.5
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas ^c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.5	2.5	2.5	4	2.8	3
Influenza y neumonía.	5.3	4.7	4.6	4.5	4.6	4.6	4.7	4.5	3.4	3.2	2.8	2.6	2.6	2.5	2.6
Insuficiencia renal ^d	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.5	NA	2
Agresiones (homicidios) ^d	3.4	3.7	4	3.9	3.8	3.6	3.3	3.1	3.1	2.8	2.5	2.3	NA	2.1	NA
Enfermedades infecciosas intestinales.	5.2	4.6	3.5	3.2	2.4	NA									
Síndrome nefrítico agudo y síndrome nefrítico rápidamente progresivo ^f	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.4	2.3	NA						
Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	NA	NA	NA	NA	NA	2.4	NA	NA	2.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Las demás causas	34.1	32.5	32.2	32.5	32.2	32.3	32.1	31.5	30.3	29.3	28.6	28.5	28.1	27.8	27.2
NOTA:	En cada año se consideran las diez principales causas de muerte. De 1990 a 1997, se utilizó la metodología de la Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-9, a partir de 1998 se utiliza la Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10														
a	De 1990 a 1997 se denominaba cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado. Para 1998 se denominaba enfermedad alcohólica y otras enfermedades crónicas del hígado.														
b	Hasta 1997 se denominaba enfermedad cerebrovascular														
c	Hasta 1997 se denominaba como otras enfermedades pulmonares obstructivas crónicas.														
d	Hasta 1997 se denominaba neumonía e influenza.														
e	Hasta 1997 se denominaba homicidio y lesiones inflingidas intencionalmente por otra persona.														
f	Hasta 1997 se denominaba nefritis, síndrome nefrótico y nefrosis.														
NA	No Aplicable														
Fuente	INEGI. Estadísticas de Mortalidad														





II.1. Encefalopatía Hepática.

La encefalopatía hepática se define como un síndrome neuropsiquiátrico en donde se altera el estado mental de pacientes con enfermedad hepática, como consecuencia del desarrollo de una derivación portosistémica de la sangre asociada a la presencia de hipertensión portal. Se puede presentar en individuos con enfermedad aguda del hígado que progresa a falla hepática fulminante (encefalopatía tipo A), o en personas que tienen enfermedad hepática crónica avanzada (cirrosis) con hipertensión portal (encefalopatía tipo C). En raras ocasiones la encefalopatía se puede presentar por una derivación portosistémica quirúrgica ("Bypass"), en ausencia de enfermedad hepática (encefalopatía tipo B).⁽⁵⁾

La aparición de este síndrome se basa en la derivación de sustancias potencialmente nocivas para el sistema nervioso central, desde la circulación portal a la circulación sistémica. Se ha evidenciado una asociación con sustancias nitrogenadas, fundamentalmente el amonio como principal factor causal de encefalopatía hepática,⁽⁶⁾ pero también se ha presentado con otros fenómenos desencadenantes como el uso de sedantes en pacientes cirróticos, o con la presencia de hipoglicemia secundaria a insuficiencia hepática importante.

La encefalopatía hepática se puede detectar con un examen médico y neurológico adecuado, y así poder establecer el grado de severidad. No obstante, se pueden encontrar alteraciones subclínicas que sólo son evidentes con estudios adicionales como son las pruebas psicométricas (conexión numérica, evolución de la firma personal), los potenciales evocados y el electroencefalograma. Si el cuadro neuropsiquiátrico es irreversible o no, aún no está definido, pues desde el punto de vista clínico hay aparente recuperación completa. Sin embargo, al realizar pruebas sofisticadas neurológicas, aún se pueden detectar alteraciones muy sutiles que persisten en forma indefinida. De igual forma, aún no se ha establecido si se producen cambios orgánicos y/o estructurales en el sistema nervioso central.

II.1.1 Fisiopatología

Son múltiples las hipótesis que se han descrito como posibles desencadenantes de la encefalopatía hepática, y aunque todas parecen intervenir en la fisiopatogenia de este





síndrome, hay tres que parecen predominar en el desarrollo de todo el cuadro neuropsiquiátrico:

1. Hipótesis del amonio.
2. Intervención de falsos neurotransmisores
3. Aumento de la actividad de ácido gamma aminobutírico (GABA)-benzodiazepinas endógenas.

II.1.1.1 Hipótesis del amonio: el amonio normalmente se genera a partir de la ingestión de proteínas u otras sustancias nitrogenadas. ⁽⁵⁾ Parte del amonio también se genera de los músculos ejercitados y de los riñones. En condiciones normales fisiológicas, el amonio es convertido en urea a nivel hepático y en menor proporción a glutamina. La urea será luego eliminada por vía renal.

Cuando se presenta un compromiso importante de la función hepática, como en la cirrosis, la detoxificación del amonio se compromete seriamente. Esto se debe al daño de los hepatocitos que por lo tanto no podrán lograr la conversión a urea. Además, por el desarrollo de hipertensión portal y aparición de circulación colateral portosistémica, se va a presentar derivación de sangre rica en amonio de origen intestinal desde el sistema porta a la circulación sistémica.

El exceso de amonio que llega al torrente sanguíneo sistémico logra pasar al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, lo cual se hace más evidente cuando se presenta un aumento del pH (p.ej. alcalosis hipokalémica) ya que esto permite un incremento del amonio no ionizado el cual es más permeable.

Una vez en el cerebro, el amonio es convertido a glutamina, lo cual aumenta la relación glutamina/glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del cerebro, y ante la presencia de exceso de amonio, se convierte en glutamina que no tiene función excitatoria. Así, se produce un déficit de la función excitatoria del glutamato a nivel de la función sináptica del sistema nervioso central. Por otra parte, también se ha identificado que el amonio en el cerebro produce inhibición de receptores especializados de glutamato, denominados NMDA (N-metil, D-aspartato), disminuyendo así la actividad neuroexcitatoria. También, el amonio lleva a la inhibición de la proteinquinasa C, ⁽⁶⁾ lo cual producirá un aumento de la actividad de la Na-K ATPasa que llevará a una depleción de ATP, fuente de energía del cerebro.





II.1.1.2 Intervención de falsos neurotransmisores: se ha descrito una alteración en el metabolismo normal de aminoácidos por diferentes mecanismos: descarboxilación mediada por bacterias colónicas, desaminación hepática reducida, y metabolismo extrahepático aumentado. Esto conduce a un desequilibrio de aminoácidos, produciendo un incremento de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano) y una reducción de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina, valina).⁽⁷⁾

El exceso de aminoácidos aromáticos desencadena la producción de falsos neurotransmisores, tales como feniletanolamina y octopamina, que desplazan neurotransmisores verdaderos, necesarios para la transmisión sináptica, como las catecolaminas (noradrenalina y dopamina). El resultado final es una depresión del sistema nervioso central. Aunque esta hipótesis es muy atractiva, no hay evidencia clara de que se relacione directamente con el desarrollo de encefalopatía hepática.

Se han diseñado fórmulas de nutrición enteral ricas en aminoácidos de cadena ramificada y pobres en aminoácidos aromáticos para ser empleadas en pacientes cirróticos con encefalopatía hepática. Los resultados sobre la resolución de la encefalopatía no son concluyentes, pero se ha visto una mayor tolerancia a este tipo de fórmulas enterales que a otras fórmulas con mezclas convencionales de aminoácidos.

II.1.1.3 Hipótesis del aumento de la actividad de ácido gamma aminobutírico (GABA) y benzodiazepinas endógenas: GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Se ha postulado que el GABA producido a nivel intestinal escapa el metabolismo hepático, atraviesa la barrera hematoencefálica y penetra al cerebro desencadenando la encefalopatía hepática. Esta hipótesis es controvertida, pues se han hecho mediciones de GABA en el cerebro y líquido cefalorraquídeo y no se encuentran aumentadas en los pacientes cirróticos con encefalopatía hepática.

El GABA actúa a nivel del complejo receptor GABA-benzodiazepina, y más que su propia acción directa, se han identificado benzodiazepinas endógenas que parecen incrementar la actividad neuroinhibitoria GABAérgica.⁽⁵⁾ Se ha determinado claramente que el uso de sedantes narcóticos y benzodiazepinas en pacientes cirróticos pueden desencadenar o empeorar la severidad de una encefalopatía hepática. También se ha visto cómo el





antagonista de las benzodiazepinas, flumazenil, logra mejorar el grado de encefalopatía en forma transitoria cuando se aplica en cirróticos con alteraciones del estado de consciencia.

No obstante, el estudio de las benzodiazepinas endógenas se debe continuar para poder aclarar más el papel de esta hipótesis en el desarrollo de encefalopatía hepática, y así poder disponer de nuevas alternativas terapéuticas en esta entidad.

II.1.2 Factores desencadenantes de encefalopatía hepática

Múltiples factores asociados pueden contribuir para que un individuo con insuficiencia hepática desarrolle encefalopatía hepática. El sangrado digestivo provee al intestino de substrato para la producción aumentada de amonio. La hipokalemia, frecuentemente desencadenada por el uso excesivo de diuréticos, se asocia con alcalosis metabólica que aumentará la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permite así el paso libre del amonio al cerebro. ⁽⁶⁾ La dieta con gran contenido proteico de origen animal también constituye una fuente para la producción intestinal de amonio. El uso de sedantes puede aumentar la depresión del sistema nervioso central ya que debido a la presencia de insuficiencia hepática, estas sustancias no se eliminarán adecuadamente y se acumularán. Por otra parte, el uso de benzodiazepinas puede aumentar la actividad GABAérgica, potenciando así el efecto de las benzodiazepinas endógenas. Las infecciones se asocian con estados hipercatabólicos, en donde se produce un aumento de compuestos nitrogenados y por lo tanto de amonio. El estreñimiento permite un mayor contacto de sustancias nitrogenadas con las bacterias intestinales, lo cual lleva a una mayor producción de amonio.

Cabe resaltar por separado, que la introducción del TIPS (derivación transyugular intrahepática portosistémica) ha sido un procedimiento innovador en el manejo de la hipertensión portal, fundamentalmente en el sangrado por várices esofagogástricas y en la ascitis refractaria. ⁽⁸⁾ No obstante, pacientes con grados importantes de insuficiencia hepática en donde se les practica la colocación de TIPS, el riesgo de encefalopatía hepática aumenta por el incremento de la derivación de la circulación portal a la circulación sistémica. El diámetro del TIPS influye mucho en el deterioro de la función neuropsiquiátrica cuando no se escoge adecuadamente el paciente (p.ej. cirrosis descompensadas) y en algunas ocasiones es necesario revertir este procedimiento para controlar la encefalopatía.





II.1.3 Diagnóstico

La base fundamental para el diagnóstico es la evaluación clínica y el examen físico. Se debe pensar en encefalopatía hepática cuando uno se enfrenta a un paciente que tiene disfunción hepática severa, alteración neurológica y del estado de conciencia. También se deben realizar exámenes básicos para descartar otras causas de encefalopatía (p.ej. hipoglucémica, por desequilibrio hidroelectrolítico, por hipoxemia).⁽⁶⁾

II.1.3.1 Cambios sugestivos de hepatopatía: las alteraciones que en el examen clínico hacen pensar en hepatopatía importante son diversos. Algunos de los más frecuentes son: telangiectasias en araña en la piel, eritema palmar, pérdida de vello púbico y axilar, ginecomastia, aumento del tamaño de parótidas, ictericia, ascitis y circulación colateral, esplenomegalia, xantomas y evidencia de rascado por depósito de bilirrubina.

Las pruebas de laboratorio para evaluar una hepatopatía deben incluir un perfil hepático completo en donde se aprecien elevaciones de aminotransferasas, fosfatasa alcalina y bilirrubinas. Es frecuente la prolongación del tiempo de protrombina por coagulopatía, leucopenia y trombocitopenia por hiperesplenismo. Asimismo se deben realizar estudios serológicos para investigar etiologías virales, inmunológicas y metabólicas, así como un interrogatorio exhaustivo sobre posibles sustancias o medicamentos hepatotóxicos.

II.1.3.2 Evaluación del estado neurológico: no hay cambios neurológicos específicos en la encefalopatía hepática. En general, lo más apreciable es una alteración en el estado de conciencia y una disfunción motora generalizada.

Cambios iniciales pueden presentarse con somnolencia y alteración del patrón normal del sueño. Puede evolucionar hasta el estupor y el coma dependiendo de la severidad del cuadro clínico. Alteraciones en la personalidad y en el nivel intelectual también son evidentes. En estadíos iniciales se puede presentar irritabilidad y a veces personalidad agresiva con comportamiento inapropiado, y a medida que va progresando, el estado de conciencia se va deteriorando. La progresión de la encefalopatía se puede evaluar con pruebas psicométricas como la prueba de conexión numérica. El tiempo para la conexión de números se prolonga en la medida en que la encefalopatía sea más severa.

Los grados de encefalopatía hepática están ampliamente descritos y se dividen en:⁽⁶⁾

Grado 1. Alteración leve del estado de conciencia, pero puede haber euforia, pérdida de la capacidad de atención y de cálculo (sumas o restas).





Grado 2. Paciente letárgico, desorientación temporo espacial, cambios de la personalidad y comportamiento inapropiado.

Grado 3. Somnolencia progresiva y estado estuporoso, desorientación severa.

Grado 4. Coma sin respuesta a estímulos. Hay que tener en cuenta que las pruebas psicométricas sólo son útiles en los grados 1 y 2, además de encefalopatía hepática subclínica que no es fácilmente detectable al examen clínico.

Los trastornos motores también hacen parte del cuadro clínico general de encefalopatía hepática. Dentro de los hallazgos físicos mas frecuentes está el asterixis, que es básicamente un temblor con aleteo de las manos mediante extensión y flexión rápida, y se aprecia más con los brazos y las muñecas extendidas y los dedos separados. ⁽⁷⁾ El asterixis es apreciable fundamentalmente en las encefalopatías grado 1 y grado 2. Otros signos motores evidentes pero menos específicos de encefalopatía hepática son la hiperreflexia, el signo de Babinski, movimientos parkinsonianos y los casos de falla hepática fulminante, posturas de descerebración y decorticación.

Algunos estudios que se están realizando aplican potenciales evocados sensoriales, que no son de comunes en la práctica clínica para la evaluación de encefalopatía hepática, pero que hacen parte de protocolos de investigación. Las imágenes diagnósticas, como la escanografía cerebral o la resonancia magnética, son más útiles en mostrar cambios estructurales relacionados a la cirrosis en sí, pero no relacionados a la encefalopatía. El electroencefalograma muestra cambios inespecíficos, pero se ha documentado la aparición de ondas lentas, de gran amplitud, y trifásicas a medida que el cuadro neuropsiquiátrico empeora. El estudio del líquido cefalorraquídeo no aporta mayor beneficio para el diagnóstico y puede ser peligroso debido a la presencia de coagulopatía en la mayoría de los pacientes.

II.1.4 Tratamiento

La encefalopatía hepática debe ser manejada teniendo en consideración varios aspectos. Primero, manejo de la encefalopatía en sí; segundo, buscar y corregir los factores desencadenantes; tercero, estudio y manejo de la enfermedad hepática *per sé*.





II.1.4.1 Manejo de la encefalopatía

a) Lactulosa: la base fundamental del tratamiento para la encefalopatía hepática sigue siendo la lactulosa, la cual es un disacárido que al ser ingerido no es absorbido por la mucosa intestinal y al estar en contacto con las bacterias colónicas se transforma en ácidos orgánicos, reduciendo así el pH intestinal. De esta manera, disminuirá la absorción del amonio y por ende las concentraciones de nitrógeno que llegan al sistema nervioso. Otras funciones importantes de la lactulosa son el aumento de la peristalsis y el efecto laxante osmótico, lo cual favorecerá una eliminación fecal más rápida y por lo tanto de la carga nitrogenada intestinal. La dosis recomendada de lactulosa es de 30 mL vía oral 2 a 4 veces al día, hasta que se produzcan deposiciones semilíquidas, sin llegar a diarrea y deshidratación. Cuando no se puede dar vía oral (encefalopatía grados 3 y 4) se puede aplicar por enemas de 300 mL disueltos en 700 mL de agua. La lactosa y el lactitol pueden ser alternativas con similar efectividad a la lactulosa. ⁽⁹⁾

b) Nutrición: se debe procurar disminuir las fuentes de alimentos que se transforman en amonio por el contacto con las bacterias intestinales. Por lo tanto, es necesario restringir la proteína en la dieta, y luego ir aumentando el aporte de acuerdo a la mejoría que se vaya presentando en el estado de la encefalopatía. La cantidad de restricción puede ir desde ausencia total de dieta proteica e ir incrementando la cantidad en intervalos de 0.5 miligramos por kilogramo de peso diarios, hasta 1.0 mg/Kg. Si el paciente se encuentra neurológicamente estable, se puede beneficiar de mayores aumentos, hasta 1.4 mg/Kg de peso diarios, ya que si se logra obtener un balance nitrogenado positivo, se puede promover la regeneración hepática y la capacidad del músculo para disminuir la carga de amonio en la circulación. Se recomiendan dietas con componente proteico fundamentalmente vegetal y también son útiles suplementos de aminoácidos de cadena ramificada ⁽¹⁰⁾.

c) Antibióticos: el uso de antibióticos ha demostrado tener efectividad en el tratamiento de la encefalopatía hepática, básicamente por disminución de la flora bacteriana intestinal productora de amonio.

La neomicina ⁽⁵⁾ ha sido utilizada por mucho tiempo para el manejo de la encefalopatía hepática. Es un aminoglucósido con muy baja absorción a nivel intestinal; con una biodisponibilidad aproximada del 3%, lo cual puede tener potencial nefrotóxico y ototóxico.





El metronidazol también disminuye la flora productora de amonio y no presenta los riesgos de toxicidad que se presenta con la neomicina. La dosis recomendada es de 500 mg tres veces al día vía oral o por vía endovenosa cuando hay una alteración marcada del estado de conciencia.

Recientemente se ha introducido en el armamento para el tratamiento de la encefalopatía hepática un nuevo compuesto antibiótico denominado rifaximina.⁽⁵⁾ La rifaximina es prácticamente inabsorbible después de su administración oral y tiene un perfil de seguridad muy bueno, con efectos secundarios en menos de 1% de los casos, principalmente de tipo gastrointestinal y urticaria, cefalea, pérdida de peso y leve aumento de sodio y potasio. La dosis establecida es de 1200 mg diarios en varias dosis, con lo cual se vio una disminución sérica del amonio, mejoría de la prueba de conexión de números, mejoría de los cambios electroencefalográficos y por supuesto mejoría de la encefalopatía.

d) L-Ornitina, L-Aspartato (LOLA): este compuesto aminoácido es un sustrato importante para la producción de urea y de glutamina, logrando así disminuir la concentración de amonio en cirróticos. Se ha visto disminución significativa del amonio con L-Ornitina y con L-Aspartato por separado,⁽⁸⁾ pero cuando se usan en un compuesto único, se produce un efecto sinérgico que mejora la efectividad. La dosis establecida de L-Ornitina, L-Aspartato es de uno a dos sobres granulados de 5 g cada uno por vía oral, o en casos de encefalopatía hepática grados 3 a 4, la dosis parenteral es de 4 a 8 ampollas diarias de 5 g cada una, en infusión continua.

e) Benzoato de sodio (C₆H₅COONa).- El uso del benzoato de sodio ha demostrado mejorar el estado mental de pacientes con cirrosis hepática. El mecanismo por el cual se explica dicho beneficio se atribuye a que el benzoato de sodio tiene la capacidad de unirse al grupo amino de la glicina, formando ácido hipúrico, la glicina tiene un libre intercambio con la serina y esta a su vez puede convertirse en glutamato. De esta manera, se emplea una vía alterna de eliminación del amonio paralela al del ciclo de la urea.⁽¹¹⁾

El ácido benzoico puede ser generado a nivel intestinal por bacterias que metabolizan el ácido quínico. El ácido quínico es el constituyente de diversas frutas, incluyendo la cereza, ciruela, arandano, chabacano, manzana, durazno y además la canela y el clavo.⁽¹²⁾

El benzoato de sodio puede ser administrado por vía oral, intravenosa o peritoneal. La principal vía de su metabolismo en mamíferos es la conjugación con la glicina dando lugar





a la formación de hipurato el cual es excretado en la orina. Los seres humanos excretan hasta 1 g de hipurato al día. La formación de hipurato a partir del ácido benzoico más la glicina se realiza principalmente en el hígado.⁽¹³⁾

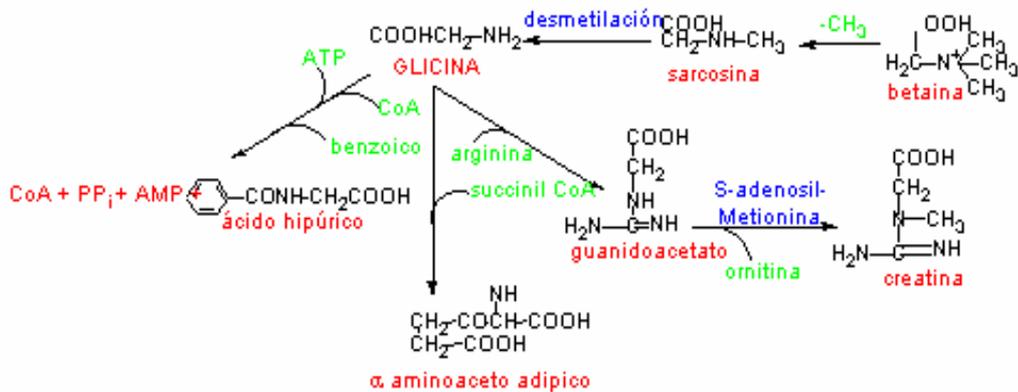


Fig 1. Formación del ácido hipúrico, a partir del ácido benzoico conjugado con la glicina. ⁽²⁷⁾

El metabolismo del ácido benzoico se lleva a cabo en la matriz mitocondrial del hígado, la energía requerida para llevarse a cabo la síntesis en el organismo proviene del ATP exógeno en presencia de oxígeno o de sustratos oxidables como lo son el glutamato, glicerol -3-fosfato, 2-oxoglutarato, piruvato o citrato. Las enzimas involucradas en este proceso son la benzoil coenzima A sintetasa, glicina n-acetiltransferasa y benzoil coenzima A hidrolasa. El paso limitante de la reacción es la disponibilidad en el organismo de coenzima A y de la glicina. La disponibilidad de la coenzima A depende de la beta oxidación.

Su aplicación clínica básicamente es como diagnóstico en pacientes con coma hiperamonémico secundario a deficiencia enzimática del ciclo de la urea y pacientes con cirrosis hepática y encefalopatía porto-sistémica.⁽¹²⁾

f) Otros medicamentos: se han investigado diversas sustancias que pueden tener efectos benéficos adicionales para el manejo de la encefalopatía hepática, con resultados





controvertidos. Entre estas están la administración de zinc ⁽⁵⁾, aminoácidos de cadena ramificada, bromocriptina y flumazenil.

Tal vez, el único que ha podido demostrar un beneficio terapéutico es el flumazenil, que aplicado en pacientes con encefalopatías hepáticas severas, ha producido mejoría transitoria, posiblemente por su efecto antagónico contra las benzodiazepinas endógenas a nivel del complejo receptor GABA-benzodiazepina. Sin duda, puede ser una alternativa terapéutica en el futuro, si se logra disponer por vía oral.

En general, se espera que un individuo con encefalopatía hepática tenga una respuesta favorable en las primeras 72 horas. De lo contrario, es necesario identificar si existe otra causa de encefalopatía asociada, y es importante determinar si alguna causa desencadenante aún persiste.

g) Corregir factores desencadenantes: la presencia de sangrado digestivo debe ser controlada ya sea mediante intervención endoscópica y farmacológica idealmente. Se debe iniciar profilaxis antiulcerosa gastroduodenal. Los procedimientos para control de sangrado digestivo portal hipertensivo de difícil manejo son de tipo quirúrgico (derivaciones) o radiológico (TIPS) ⁽⁶⁾, pero no son benéficos en pacientes con encefalopatía hepática porque la pueden empeorar.

Cualquier foco infeccioso o séptico debe ser tratado adecuadamente con antibióticos para disminuir el sustrato de amonio desencadenado por las infecciones.

Se deben corregir las alteraciones hidroelectrolíticas y se deben evitar los diuréticos en el manejo inicial de la encefalopatía.

Están contraindicados los sedantes por el efecto depresor del sistema nervioso central aumentado en los cirróticos. El uso de flumazenil ⁽⁶⁾ en esta situación puede ser benéfico.

Manejo de la enfermedad hepática de base: al mismo tiempo que se está tratando la encefalopatía hepática, se debe investigar la enfermedad hepática de base con el fin de tener un plan terapéutico a largo plazo.

Se debe investigar si el desarrollo de la encefalopatía hepática se originó a partir de una falla hepática fulminante o de una hepatopatía crónica avanzada con insuficiencia hepática, y decidir si se está enfrentado ante un caso que requiere evaluación para trasplante hepático.





Sea la etiología que esté presente (viral, inmunológica, metabólica, tóxica, tumoral, criptogénica, post TIPS), se debe dirigir el tratamiento específico para cada una de estas entidades.

II.2 Justificación del presente estudio

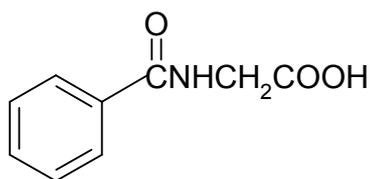
En base a lo anteriormente expuesto, se puede apreciar que una de las alternativas terapéuticas para el tratamiento de la encefalopatía hepática es la administración del benzoato de sodio, el cual favorece la eliminación del amonio sanguíneo como ácido hipúrico en la orina, como resultado de la conjugación del ácido benzoico con la glicina. Con la finalidad de contar con otras alternativas terapéuticas, el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, está desarrollando una serie de moléculas homologas al ácido benzoico, sustituyendo al sodio por zinc, esperando con ello incrementar la cantidad de amonio eliminado por vía renal y suplir la deficiencia de zinc en pacientes con encefalopatía hepática.

II.3 Ácido Hipúrico

El ácido hipúrico fue descubierto por el químico Justus Von Liebig en el año de 1824 en la ciudad de París, Francia. El ácido hipúrico es el resultado de la conjugación de glicina con el ácido benzoico y es un componente habitual de la orina, sobre todo en herbívoros ya que se encuentra en alimentos de origen vegetal.⁽¹²⁾

El nombre científico del ácido hipúrico es el ácido benzoilamino acético, cuya masa molecular es de 179.17 g/mol y su fórmula condensada es la $C_9H_9NO_3$. Es un polvo cristalino con punto de fusión de 187-188°C. Un gramo de AH se disuelve en aproximadamente 250 mL de agua fría, 1 L de cloroformo, 400 mL de éter y 60 mL de alcohol amílico. Es totalmente soluble en alcohol o agua caliente, también es soluble en solución de fosfato de sodio. Prácticamente insoluble en benceno, disulfuro de carbono y éter de petróleo.⁽¹⁴⁾





Ácido Hipúrico

$C_9H_9NO_3$ MM 179.17 g/mol

El ácido hipúrico es el producto final de la vía fosfogliceraldehído –glicina, el cual se obtiene como resultado de la conjugación de la glicina con el ácido benzoico y excretado por vía urinaria. La tabla 2 resume la información de métodos analíticos en fluidos biológicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de ácido hipúrico en fluidos biológicos.





Tabla 2. Métodos analíticos para la cuantificación de ácido hipúrico.

Métodos Analíticos en fluidos biológicos para cuantificar Ácido Hipúrico							
Técnica	Matriz biológica	Análitos	Condiciones cromatográficas		Método de extracción	Validación	Ref
HPLC/UV	Plasma humano	ácido benzoico	Columna Fase Móvil	Yanapak ODS-A 250 x 4.6, 7 µm	PP con ACN	Linealidad PLASMA 10 a 200 µg/mL (r=0.9992)	21
	Orina humana	ácido hipúrico	Flujo λ Temp Vol iny	ACNH ₂ O:Ac acético (35:65:2) 235 nm 30 °C 5-10 µL		Precisión INFERIDA PLASMA 0.7 a 9.6% ORINA 0.3 a 7.5% INTRADIA PLASMA 1.4 a 9.7% ORINA 0.3 a 2.1% PLASMA -2.5 a 5.4% ORINA -6.1 a 5.4% Restar la respuesta del AH endógeno PLASMA 97.7 a 102.2% ORINA 96.9 a 100.6% 0.1 a 10 mg/mL y = 23 237 x + 3.7 r = 0.999	
HPLC/UV	Orina humana	ácido hipúrico	Precolumna Columna Fase Móvil	LiChroperpSI 60 100 x 4.6 mm LiChrosorbSI 120 x 4.6 mm, 5 µm ACNH ₂ K ₂ PO ₄ 0.2 M pH 7.5:H ₂ O (30:5:65) +1.25M bromuro trimetilhexadecilamonio	PP con ACN	Linealidad 0.1 a 10 mg/mL y = 23 237 x + 3.7 r = 0.999	22
		o-cresol	Flujo λ Temp Vol iny	1.5 mL/min 254 nm 40 °C 10 µL		Precisión < 2.1% Recobro 96.9 a 102.7% LD 0.05 mg/mL	
HPLC/UV	Orina humana	ácido hipúrico	Columna Fase Móvil Flujo λ Vol iny	Partisil C18 ODS-2 250 x 4.6 mm Ac acético 1%:ACN (80:20) 1.35 mL/min 250 nm 20 µL	PP con ac. Acético 1N	Linealidad 0.1 a 1.5 g/L y = 139.9 x - 0.38 r = 0.9999	23
						Precisión 1.50 a 2.45% Selectivo benzoico, ac salicílico, ac salicílico, ac malónico y acetaminófen 96%	
HPLC/UV	Orina humana	ácido hipúrico	Columna Fase Móvil Flujo λ Vol iny	µBondapak 300 x 4.0 mm MeOH:K ₂ PO ₄ 0.01 M + 0.5% ac. Acético (20:80) 1.0 mL/min 254 nm 4 µL	Extracción liq-liq acetato de etilo	Linealidad 0 a 5 mg/mL y = 0.965x - 0.0003 r=0.999	24
						Precisión INTRADIA 11 % Selectivo ác mandálico, ac feniglexílico, ac metilhipúrico, ac salicílico, ac m-(p)-metilhipúrico, ac nicotínico 98-102%	
HPLC/UV	Plasma perro	ácido benalico	Precolumna Columna Fase Móvil Flujo λ	Co-Pell ODS 25-37 µm Ultrasphere ODS 250 x 4.6 mm, 5 µm ACNH ₂ O:ac acético glacial (120:380:2.5) 2 mL/min 254 nm	Extracción con SPE	Linealidad A. Benzilico 0.08 a 0.64 µg y = 1.01x + 0.004 r = 0.999	25
		ácido benzoico				Precisión A. Benzicoico 0.01 a 0.08 µg y = 3.94x + 0.001 r = 0.998 Selectivo A. Hipúrico, benzocaina, benzaldehído, fenobarbital A. Benzilico 98.3% A. Benzicoico 101.4% A. Benzilico 4 ng A. Benzicoico 0.1 ng	





II.4 Otras aplicaciones del ácido hipúrico

II.4.1 Defectos enzimáticos del ciclo de la urea ⁽¹⁵⁾

El déficit de arginasa es uno de los trastornos hereditarios raros del ciclo de la urea. Se detecta una deficiencia de la arginasa citosólica, que se expresa en el hígado y en los hematíes o eritrocitos (los glóbulos rojos de la sangre).

El catabolismo de los aminoácidos conduce a la producción de amoníaco libre que es sumamente tóxico para el sistema nervioso central (sistema formado por el encéfalo y la médula espinal). El amoníaco es detoxificado convirtiéndose en urea, que se excreta normamente en la orina, a través de una serie de reacciones conocidas como ciclo de la urea o de Krebs-Henseleit. Se necesitan 5 enzimas para sintetizar la urea: la carbamil fosfato sintetasa (CPS), la ornitina transcarbamilasa (OTC), la argininosuccinato sintetasa (AS), la argininosuccinato liasa (AL) y la arginasa. La prevalencia (número de casos de una enfermedad en una población) global de todos estos trastornos es de 1 por cada 30.000 nacidos vivos y constituyen la causa más frecuente de hiperamonemia (nivel elevado y tóxico del amoníaco en la sangre) en los lactantes. Los niños afectados pueden presentar retraso mental, crisis epilépticas y espasticidad, pero no suele haber episodios de hiperamonemia intensa. La deficiencia de arginasa se hereda como un rasgo genético autosómico recesivo.

II.4.2 Monitoreo de ácido hipúrico como indicador de la exposición ocupacional a tolueno.

El tolueno es el disolvente más popular en la industria y puede ser que este presente como uno de los contaminantes ambientales al cual la población en general se encuentre expuesta. El tolueno es primeramente metabolizado a ácido benzoico que conjugado con glicina forman el ácido hipúrico. El ácido hipúrico es el indicador más usado en el biomonitoreo de la exposición ocupacional a tolueno, ya que muestra una buena correlación y especificidad del nivel de exposición. ⁽¹⁶⁾

La Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-1993, QUE ESTABLECE LOS LÍMITES BIÓLOGICOS MÁXIMOS PERMISIBLES DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN EL PERSONAL OCUPACIONALMENTE EXPUESTO, publicada el 23 de Septiembre de 1996, en el diario de la federación, es producto de la necesidad de contar con una guía para valorar el riesgo a que pueden estar expuestos los trabajadores que laboran con





sustancias como hidrocarburos aromáticos, benceno, xileno y tolueno y los efectos que generan a la salud y prevención de daños en esta, de la población ocupacionalmente expuesta.

En el caso del monitoreo biológico de la exposición a tolueno la NOM-047-SSA1-1993⁽¹⁷⁾ establece que se realice mediante la determinación del ácido hipúrico en orina e indicando como criterio de aceptación máximo 2.5 g/g de creatinina al final de la jornada de trabajo.

II.4.3 El ácido hipúrico en urología.

Desde mediados del siglo XIX se pudo comprobar que los frutos del Arándano, conocido en Inglaterra como “Cranberry”, eran capaces de aliviar los síntomas irritativos urinarios. Los frutos son bayas comestibles, negruzcas, rojizas o azuladas, de gusto agridulce. Provoca al masticarlas una sensación refrescante y astringente.⁽¹⁸⁾

Una proporción significativa de la población estadounidense consideran que las bebidas derivadas de los arándanos previenen o alivian las infecciones en el tracto urinario. El presunto efecto antibacterial del jugo de cranberry es polémico, atribuido a la acidificación y al efecto bacteriostático directo del ácido hipúrico sobre *E. coli*.⁽¹⁹⁾

En el trabajo prospectivo realizado por el Dr. Potenziani y cols.,⁽²⁰⁾ dentro de las recomendaciones que se tienen para disminuir la recurrencia de infecciones urinarias en mujeres, se menciona:

- a) Mantener la orina con un bajo pH (5.5 o menos) es decir mantener la orina ácida a través de la ingesta de vitamina C, con tabletas de arándano o con la ingesta elevada de frutas y proteínas. El jugo de arándano (Cranberries) ha sido usado para la prevención y tratamiento de infecciones urinarias, ya que contiene ácido quínico que produce cantidades considerables de ácido hipúrico el cual tiene propiedades antibacterianas. El jugo de arándano previene la adherencia bacteriana de la *E coli*. a las células uroepiteliales de la pared vesical.





III. Parte Experimental

El estudio se dividió en tres etapas, cada una de ellas precedidas por una extensa revisión bibliográfica:

- a) Elaboración del protocolo analítico
- b) Desarrollo del método analítico
- c) Validación del método analítico

El desarrollo del método analítico tomo como punto de partida las condiciones reportadas en la literatura. Sin embargo, durante el transcurso de la misma fue necesario realizar modificaciones para establecer las condiciones cromatográficas finales de acuerdo a los recursos con los que se contaban en el Laboratorio de Farmacología Analítica y a las respuestas obtenidas del analito de interés.





III.1 Elaboración del protocolo analítico

Antes de iniciar con la fase de desarrollo del método analítico, se elaboró el protocolo analítico, considerando los siguientes aspectos:

III.1.1. Selección de las condiciones cromatográficas

Se determinaron las condiciones del sistema cromatográfico, tales como tipo de columna, fase móvil, longitud de onda de detección, flujo, temperatura, tiempo y volumen de inyección, de acuerdo a los siguientes criterios:

Tiempo de retención	Libre de interferencias a componentes endógenos de la orina.
Factor de coleo	menor o igual a 2
Resolución	mayor o igual a 2
Eficiencia	Superior a 3000 platos teóricos.

- a) **Fase estacionaria (Columna):** Todos los métodos reportados, indican que la columna más adecuada es de fase reversa C₁₈. Se evaluó la señal de ácido hipúrico en solución con la columna Gemini C₁₈ 5µm (250 x 4.6 mm) con la que disponía el Laboratorio.
- b) **Fase móvil:** Se realizaron pruebas, inyectando soluciones de ácido hipúrico a una concentración de 100 µg/mL, comenzando con proporciones 50:50 de disolventes orgánicos-agua. Se realizaron cambios en la fase orgánica en incrementos y decrementos del 10% de la composición final.
- c) **Flujo:** Selección del flujo de la fase móvil más adecuado para obtener picos que cumplieran con los criterios cromatográficos anteriormente descritos. Se seleccionó como punto de partida el flujo de 1 mL/min.
- d) **Detección:** La mayoría de los métodos analíticos para ácido hipúrico en fluidos biológicos reportan longitudes de onda de 254, 250 y 235 nm. Sin embargo, con la finalidad de establecer la longitud de onda de máxima absorción en nuestro equipo cromatográfico, se realizó un barrido en tercera dimensión con el detector de arreglo de diodos, este barrido se comparó contra muestras de ácido hipúrico en orina. La longitud de onda de trabajo seleccionada presentó una mayor absorción del analito y una mínima de los componentes endógenos de la orina.





e) **Volumen de inyección:** La primera inyección se efectuó con una cantidad considerable de muestra para verificar la elución del analito. Así evitamos confundir el pico buscado con otros picos que eluyen en el frente de disolvente o durante la prueba. Dado el intervalo de concentraciones tan amplio que se requiere de 50 a 1500 $\mu\text{g/mL}$, se evaluaron volúmenes de inyección alrededor de 10 a 20 μL .

III.1.2 Selección del método de extracción

El método de extracción para el ácido hipúrico se determinó de acuerdo a lo reportado en la literatura; siendo el de primera elección el método de precipitación de proteínas, por adición de acetonitrilo o ácido acético, y la inyección directa del sobrenadante al sistema cromatográfico.

III.1.3 Selección del intervalo de trabajo de la curva estándar

De acuerdo con la información reportada en la literatura donde se determina la farmacocinética del ácido hipúrico en orina humana, se establece trabajar la curva estándar en el intervalo de concentraciones de 50 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, decidimos incrementar el intervalo de trabajo a 1500 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando que el ácido hipúrico es un componente endógeno del metabolismo del ciclo de la urea en el ser humano y la cantidad presente en la orina es variable debido a factores ambientales como: fumadores, exposición a agentes tóxicos (gasolina, tolueno, benceno), hábitos alimenticios; como ingesta de verduras, arándanos, duraznos y granos de café verde. Es necesario que cada día de trabajo se reste la cantidad de ácido hipúrico endógeno presente en la muestra blanco.

III.1.4 Selección del estándar interno

Se selecciono el estándar interno más adecuado para el método analítico en base a los criterios establecidos en la sección III.1.1, además de la evaluación del recobro donde se tomo como criterio de aceptación, un coeficiente de variación inferior al 15%.

La concentración del estándar interno se establecio en base a la respuesta cromatográfica (área), la cual debería corresponder a la mitad del punto más alto de la curva estándar en orina.





III.1.5 Selección del modelo matemático

Los valores de respuesta (relación de áreas AH/AB) y los valores de la variable conocida (relación de concentraciones AH/AB) se ajustaron a diferentes modelos matemáticos (lineal, cuadrático y potencial). La elección del modelo matemático se determinó en base a los valores de correlación y a los valores de concentración recuperada que deberían cumplir con los criterios de Desviación Estándar Absoluta (%DEA) inferior al 15% y hasta el 20% en el punto más bajo de la curva. ⁽²⁸⁾

III.1.6 Optimización del método analítico

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y el método de extracción, fue necesario optimizar el método con la finalidad de mejorar la respuesta del analito de interés.

III.2 Desarrollo del método analítico para cuantificar ácido hipúrico en orina humana

III.2.1 Materiales

- Tubos de ensayo de vidrio de 16 x 100 mm.
- Combitips para pipeta de repetición Repeater Plus.
- Puntas para micropipetas de 200 y 1000 μ L.
- Matraces volumétricos de 2, 5, 10, 25, 50, 500, 1000 y 2000 mL.
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 1000 y 2000 mL.
- Probetas de 50, 100 y 500 mL.
- Pipetas de transferencia de plástico.
- Sistema de filtración para disolventes HPLC.
- Frascos graduados para fase móvil de 1000, 2000 mL.

III.2.2 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución

- Bomba cuaternaria modelo G1311A, Agilent Technologies.
- Detector de arreglo de diodos con microcelda modelo G1315A, Agilent Technologies.





- Degasificador en línea modelo G1322A, Agilent Technologies.
- Automuestreador automático modelo G1329A, Agilent Technologies.
- Termostato del automuestreador modelo G1330A, Agilent Technologies.
- Compartimento de columna con termostato modelo G1316A, Agilent Technologies.
- Gabinete para columnas con control de temperatura modelo G1316A, Agilent Technologies.
- Programa Chemstation Rev. A. 08.03 (847), Agilent Technologies.
- Unidad de poder In-interrumpible modelo: RL-2K, EBS

III.2.3 Equipos

- Ultracongelador vertical marca Thermoforma modelo 923.
- Refrigerador marca Thermoforma modelo 3771.
- Equipo de agua bidestilada marca Millipore modelo Ellix 5.
- Equipo de agua HPLC marca Millipore modelo Milli Q Gradient A10.
- Campana de extracción de gases marca Labconco modelo Basic 47.
- Bomba de presión al vacío marca Millipore No. Catalogo XX55 000 00.
- Agitadores tipo vortex marca IKA modelo MS1-S1 Minishaker.
- Baño de ultrasonido marca Brandson modelo: 5510R-DTH.
- Parrilla termoagitadora marca VELP Scientific modelo ARE/10.1162.
- Parrilla termoagitadora marca Thermolyne modelo Cimarec 2.
- Termohigrómetro marca Daigger KX-14442

III.2.4 Instrumentos

- Balanza Analítica marca Sartorius modelo BP121S
- Balanza de precisión marca Sartorius modelo BP 410
- Centrífuga refrigerada marca Jouan modelo MR23i
- Pipetas de repetición marca Eppendorf modelo Repeater Plus





- Pipetas de volumen variable marca Eppendorf modelo 100-1000 μL
- Pipeta de volumen variable marca Eppendorf modelo 20-200 μL

III.2.5 Reactivos y sustancias de referencia

- Agua grado HPLC (Milli Q)
- Acetonitrilo grado HPLC marca Mallinckrodt
- Metanol grado HPLC marca Mallinckrodt
- Ácido acético glacial marca J.T. Baker
- Controles de orina sintética marca Bayer.
- Ácido hipúrico marca Aldrich pureza 98%
- Ácido benzoico marca Sigma-Aldrich pureza 99.5%

III.2.6 Preparación de la mezcla de orina humana.

Se obtuvieron muestras donadas de orina de 6 voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno de al menos 10 horas, no fumadores y libres de medicación y se mezclaron las muestras de orina de los 6 voluntarios sanos.

III.2.6.1 Solución de orina diluida 1:100 % v/v

En un matraz volumétrico de 1 L colocar un volumen aproximado de 500 mL de agua grado HPLC, agregar 10 mL de la mezcla de orina humana. Llevar a volumen con agua grado HPLC y agitar vigorosamente.

III.2.7 Preparación de la fase móvil.

Solución de ácido acético al 3%

En un matraz volumétrico de 1L colocar un volumen aproximado de 500 mL de agua grado HPLC, en una probeta de 50 mL medir un volumen de 30 mL de ácido acético glacial y transferir al matraz volumétrico conteniendo el agua. Llevar a volumen con agua grado HPLC.





Fase móvil ácido acético al 3 %- acetonitrilo 65:35 % v/v

Colocar en frascos reservorios por separado la solución de ácido acético al 3 % y el acetonitrilo, previamente filtrados y desgasificados por ultrasonido durante 5 minutos. Por medio del programa computacional del equipo cromatográfico ajustar las proporciones de ácido acético al 65 % y acetonitrilo al 35 %.

III.2.8 Preparación de las soluciones estándar.

Solución estándar de ácido hipúrico en metanol 50 mg/mL

Pesar el equivalente a 2.5 g de ácido hipúrico y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver con aproximadamente 25 mL de metanol grado HPLC, llevar a volumen con metanol HPLC y agitar vigorosamente.

Solución estándar de ácido hipúrico en orina 2500 µg/mL

Tomar una alícuota de 2.5 mL de la solución de ácido hipúrico de 50 mg/mL, transferir a un matraz de 50 mL y llevar a volumen con orina diluida.

Solución estándar de ácido hipúrico en acetonitrilo 2500 µg/mL

Tomar una alícuota de 2.5 mL de la solución de ácido hipúrico de 50 mg/mL, transferir a un matraz de 50 mL y llevar a volumen con acetonitrilo grado HPLC.

Solución estándar de ácido benzoico 10 mg/mL

Pesar el equivalente a 100 mg de ácido benzoico y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL. Disolver en aproximadamente 5 mL de acetonitrilo grado HPLC, llevar a volumen con acetonitrilo y agitar vigorosamente.

Solución estándar de ácido benzoico (EI) en acetonitrilo 300 µg/mL

Tomar una alícuota de 1.5 mL de la solución de ácido benzoico de 10 mg/mL, transferir a un matraz de 50 mL y llevar a volumen con acetonitrilo grado HPLC.

Solución de verificación de la adecuabilidad AH/AB (40/100 µg/mL)

Tomar una alícuota de 160 µL de la solución de ácido hipúrico 2500 µg/mL y 100 µL de la solución ácido benzoico de 10 mg/mL y llevar a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con acetonitrilo grado HPLC.





III.2.9 Preparación de la curva estándar

A partir de la solución estándar de ácido hipúrico en orina de 2500 $\mu\text{g/mL}$, preparar la curva estándar de 50 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ y muestras control de acuerdo al siguiente esquema:

Tabla 3. Preparación de la curva estándar y muestras control.

Muestra	Alícuota (μL)	Aforo con orina	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
CE 1	100	5 mL	50
CE 2	200		100
CE 3	400		200
CE 4	400	2 mL	500
CE 5	600		750
CE 6	800		1000
CE 7	1200		1500
MCB	150	5 mL	75
MCM	600		300
MCA	1000	2 mL	1250





III.2.10 Método de extracción

En un tubo de ensaye de 16 x 100 mm colocar 200 μ L de la muestra de orina y adicionar 400 μ L de la solución de estándar interno ácido benzoico de 300 μ g/mL en acetonitrilo. Agitar el tubo durante 20 s en un agitador mecánico tipo vortex, posteriormente centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura aproximada de 20°C. Inyectar 10 μ L del sobrenadante.

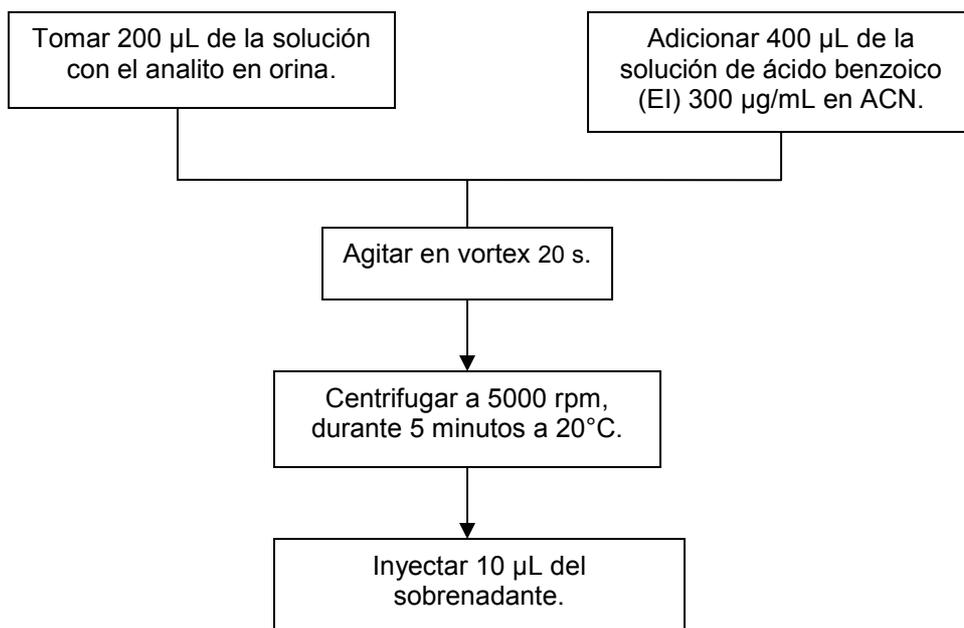


Figura 2. Diagrama de Flujo del método analítico





III.2.11 Preparación de las muestras control de ácido hipúrico en sistema.

A partir de la solución estándar de ácido hipúrico de 2500 $\mu\text{g/mL}$ en acetonitrilo, preparar las muestras control en sistema, de acuerdo a la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de muestras control para recobro

Muestra	Alícuota (μL)	Aforo con Acetonitrilo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
MCB	150	5 mL	75
MCM	600		300
MCA	1000	2 mL	1250

En un tubo de ensaye de 16 x 100 mm colocar 200 μL de cada una de las soluciones control de ácido hipúrico en acetonitrilo y adicionar 400 μL de la solución de estándar interno ácido benzoico de 300 $\mu\text{g/mL}$ en acetonitrilo. Agitar el tubo durante 20 s en un agitador mecánico tipo vortex. Inyectar 10 μL de cada muestra.





III.2.12 Condiciones cromatográficas

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fase de desarrollo las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

Fase estacionaria	Gemini C18 5 μ m 4.6 X 250 mm.
Fase móvil	ácido acético al 3%:acetonitrilo (65:35 % v/v)
Flujo	1 mL/min
Temperatura columna	30° C
Temperatura inyector	4° C
Detección	235 nm y ancho de banda de 8nm
Volumen inyección	10 μ L





III. 3 Validación del método analítico

El método analítico desarrollado se validó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-1998, la cual cubre los siguientes parámetros:

- Linealidad
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad intraanalista
 - Reproducibilidad interanalista
- Exactitud
- Recobro absoluto
- Selectividad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Estabilidad
 - A temperatura ambiente
 - Bajo condiciones de almacenamiento
 - A una temperatura controlada de -70°C
 - En refrigeración
 - Ciclos de congelación-descongelación
 - En el automuestrador
- Tolerancia





III.3.1 Linealidad

El intervalo de trabajo en orina se determinó de 50 a 1500 µg/mL. La evaluación de este parámetro consistió en preparar 3 curvas estándar en orina. Los resultados se ajustaron a una ecuación cuadrática, en donde se incluyó como variable dependiente la relación de áreas del ácido hipúrico entre el ácido benzoico (EI) y como variable independiente la relación de las concentraciones de los mismos analitos y se determinó el factor de correlación. A partir de la ecuación cuadrática para cada una de las curvas se determinó la concentración recuperada y el % DEA.

Criterio de aceptación: coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y DEA inferior al 15% a excepción del límite inferior hasta un 20%.

III.3.2 Precisión

Repetibilidad

A partir de soluciones independientes, se analizaron por quintuplicado los tres niveles de muestras control (75, 300 y 1250 µg/mL). Se determinó la concentración interpolando las muestras en la curva estándar como se indica en la linealidad del método. Se determinó el valor promedio de concentración recuperada y el coeficiente de variación con la aplicación de la siguiente ecuación:

$$C V \% = \frac{100 \times DE}{\bar{X}}$$

En donde:

DE = Desviación Estándar

\bar{X} = Promedio

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación (CV) menor o igual al 15 %.

Reproducibilidad intra-analista (efecto día)

A partir de soluciones independientes, se analizaron por duplicado durante tres días por un solo analista, los tres niveles de concentración de las muestras control (75, 300 y 1250 µg/mL). Se determinó el valor promedio de concentración recuperada y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: CV menor o igual al 15 %.





Reproducibilidad inter-analista (efecto analista)

A partir de soluciones independientes, se analizaron por duplicado durante tres días por dos analistas, los tres niveles de concentración de las muestras control (75, 300 y 1250 µg/mL). Se determinó el valor promedio de concentración recuperada y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: C.V menor o igual al 15 %.

III.3.3 Exactitud

Se determinó a partir de los datos de la precisión, determinando la desviación estándar absoluta del valor promedio de las concentraciones recuperadas respecto a la concentración adicionada con la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DEA} = 100 \times \frac{[\text{Concentración A} - \text{Concentración R}]}{\text{Concentración A}}$$

En donde:

Concentración A = Concentración Adicionada.

Concentración R = Concentración Recuperada

Criterio de aceptación: DEA menor o igual al 15 %.

III.3.4 Recobro absoluto

Se analizaron por triplicado las muestras control en acetonitrilo (sistema) y en la orina (método) a cada uno de los tres niveles de las muestras control (75, 300 y 1250 µg/mL). Se determinó el porcentaje de recobro, considerando la respuesta de los analitos en solución como el 100%.

Criterio de aceptación: C.V del promedio de recobro menor o igual al 15 %.





III.3.5 Selectividad

La selectividad del método se realizó evaluando la no interferencia de la matriz biológica (orina humana) en la cuantificación del ácido hipúrico y el estándar interno (ácido benzoico) bajo los siguientes esquemas:

- Blancos de orina adicionados con tolueno como conservador en tubos marca Sarterds.
- Blancos preparados a partir de orina sintética marca Bayer.
- Muestra de orina de un paciente con daño renal recibiendo los siguientes medicamentos: Furosemida, Metoprolol, Isorbide, Enalapril, Ranitidina, Calcitrol, Sucralfato y gel de aluminio.

Criterio de aceptación: No interferencia en los tiempos de retención del ácido hipúrico y el ácido benzoico.

III.3.6 Límite de detección

Se estableció como la concentración a la cual la señal del compuesto en la orina es al menos 3 veces la altura del nivel de ruido en la misma región cromatográfica de los analitos de interés.

Se prepararon tres muestras blanco de orina, se determinó el nivel de ruido (valor numérico).

Se realizaron muestras a las concentraciones de 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ en orina, se inyectaron y se determinó la altura de los analitos de interés.

Criterio de aceptación: concentración a la cual la altura de los analitos es al menos 3 veces la altura de la respuesta correspondiente a los niveles endógenos de AH.

III.3.7 Límite de cuantificación.

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja de la curva estándar (50 $\mu\text{g/mL}$).

Criterio de aceptación: C.V y DEA menor o igual al 20 %.





III.3.8 Estabilidad

Estabilidad a temperatura ambiente

Se prepararon por duplicado los tres niveles de concentración correspondientes a las muestras control (75, 300 y 1250 $\mu\text{g/mL}$) en orina y se dejaron reposar sobre la mesa de trabajo a temperatura ambiente. Se sometieron a extracción a las 4 horas posterior a su preparación.

Criterio de aceptación: CV y DEA menor o igual al 15 %.

Tabla 5. Evaluación de estabilidad a Temperatura ambiente.

Muestra	Replica	Condiciones de almacenamiento	Tiempo de análisis
MCB	1	Temperatura Ambiente	4 horas
	2		
MCM	1		
	2		
MCA	1		
	2		





Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento

➤ **Estabilidad a largo plazo en congelación a -70°C.**

Se prepararon dos series de muestras control de los tres niveles de concentración en orina y se dividieron en dos fracciones iguales, posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a una temperatura controlada de -70 °C. Las muestras se analizaron en los días 30 y 60 posterior a su preparación.

Criterio de aceptación: CV y DEA menor o igual al 15 %.

Tabla 6. Evaluación de estabilidad a largo plazo.

Muestra	Replica	Condiciones de almacenamiento	Tiempo de análisis
MCB	1	Congelación - 70 °C	37 y 64 días
	2		
MCM	1		
	2		
MCA	1		
	2		





➤ **Estabilidad en refrigeración (2-8°C).**

Adicionalmente se prepararon dos series de muestras control en los tres niveles de concentración en orina, las cuales se almacenaron en refrigeración a una temperatura promedio de 4°C. Las muestras fueron analizadas 5 días posteriores a su preparación.

Criterio de aceptación: CV y DEA menor o igual al 15 %.

Tabla 7. Evaluación de la estabilidad en refrigeración.

Muestra	Replica	Condiciones de almacenamiento	Tiempo de análisis
MCB	1	Refrigeracion Aproximadamente 4 °C	5 días
	2		
MCM	1		
	2		
MCA	1		
	2		





Estabilidad a ciclos de congelación – descongelación

Dos series de muestras control a los tres niveles de concentración (75, 300 y 1250 µg/mL) en orina fueron sometidas a dos ciclos de congelación a -70° C por al menos 24 horas y descongelación a temperatura ambiente. Se analizaron a los ciclos 0, 1 y 2.

Criterio de aceptación: CV y DEA menor o igual al 15 %.

Tabla 8. Evaluación de la estabilidad en ciclos de congelación y descongelación.

Muestra	Replica	Condiciones de almacenamiento	Tiempo de análisis
MCB	1	Ciclos de congelación - descongelación	0, 1 y 2 ciclos
	2		
MCM	1		
	2		
MCA	1		
	2		





Estabilidad en el automuestreador

Se prepararon por duplicado las muestras control en los tres niveles de concentración, a las que se les realizó el proceso de extracción y fueron colocadas en el automuestreador a una temperatura controlada de 4 °C. Las muestras fueron analizadas a las 12 y 18 horas después de haber sido colocadas en el automuestreador.

Criterio de aceptación: CV y DEA menor o igual al 15 %.

Tabla 9. Evaluación de la estabilidad en el automuestreador.

Muestra	Replica	Condiciones de almacenamiento	Tiempo de análisis
MCB	1	Automuestreador a 4 °C	12 y 18 horas
	2		
MCM	1		
	2		
MCA	1		
	2		





III.3.9 Tolerancia

Se preparó una curva estándar a la cual se le realizó la determinación analítica bajo las condiciones normales del método analítico, adicionalmente se prepararon 2 series de muestras control para cada experimento, las cuales se analizaron con las siguientes modificaciones:

Modificación de la proporción de la fase orgánica en la fase móvil.

Dos series de muestras control fueron analizadas bajo las condiciones establecidas en la tabla inferior como: Tolerancia 1. Donde la fase móvil fue modificada a ácido acético al 3 %- acetonitrilo 60:40 % v/v.

Adicionalmente dos series de muestras control fueron analizadas bajo las condiciones establecidas en la tabla inferior como: Tolerancia 2. Donde la fase móvil fue modificada a ácido acético al 3 %- acetonitrilo 70:30 % v/v.

Criterio de aceptación: CV y DEA menor o igual al 15 %.

Tabla 10. Evaluación de las dos diferentes condiciones de Tolerancia.

	Ácido acético 3%	ACN %
Validación	65	35
Tolerancia 1	60	40
Tolerancia 2	70	30





IV. Resultados y análisis de resultados

Las condiciones cromatográficas y el método optimizado se describen a continuación, después de probar distintos métodos y distintas concentraciones de fase móvil, las condiciones cromatográficas y el método de extracción con que se trabajó para determinar ácido hipúrico son los siguientes:

IV.1 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas optimizadas para realizar el análisis de cada una de las muestras son las siguientes:

Fase estacionaria	Gemini C18 5µm, (4.6 X 250 mm)
Fase móvil	ácido acético al 3%:acetonitrilo (65:35 % v/v)
Flujo	1 mL/min
Temperatura columna	30° C
Temperatura inyector	4° C
Detección	235 nm y ancho de banda de 8nm
Volumen inyección	10 µL

Los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos evaluados a las condiciones establecidas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 11. Parámetros cromatográficos de validación.

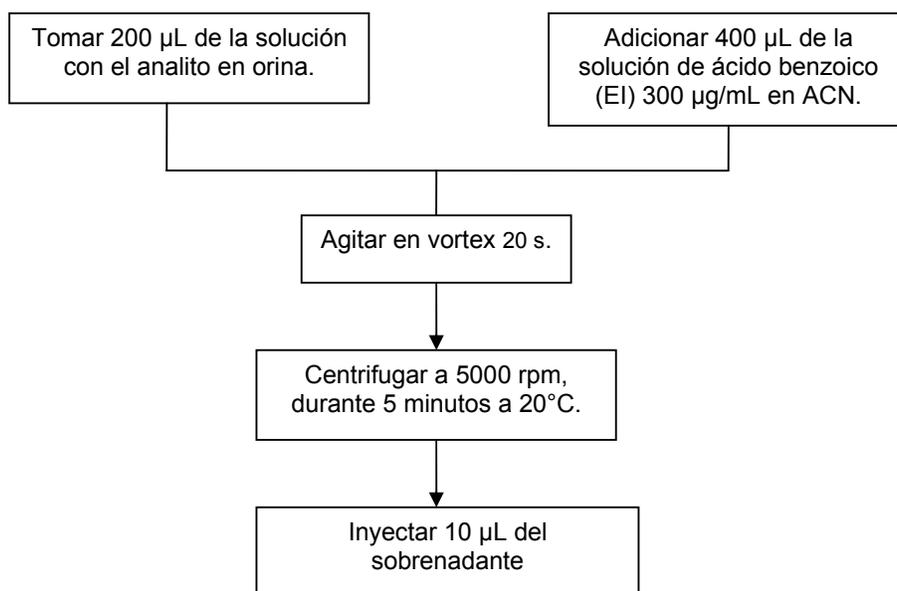
Parámetro Cromatográfico	Ácido Hipúrico	(EI) Ácido Benzoico
Tiempo de retención (minutos)	3.914	6.767
Factor de coe	1.111	1.054
Resolución	NA	14.238
Eficiencia	12467	15055





IV.2 Método de extracción optimizado

Tomar 200 μL de la muestra de orina y adicionar 400 μL de la solución de ácido benzoico (EI) en acetonitrilo de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Agitar en vortex, durante 20 segundos y centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$. Inyectar 10 μL del sobrenadante en el cromatógrafo, con las condiciones cromatográficas descritas en el punto IV.1.





IV. 3 Linealidad del método

Las curvas estándar se ajustaron a un modelo matemático cuadrático con valores de correlación superiores al 0.99 en el intervalo de 50 a 1500 µg/mL cada una de ellas. Las respuestas en relación de áreas a cada nivel de concentración fueron repetibles con CV inferior al 4.9 %.

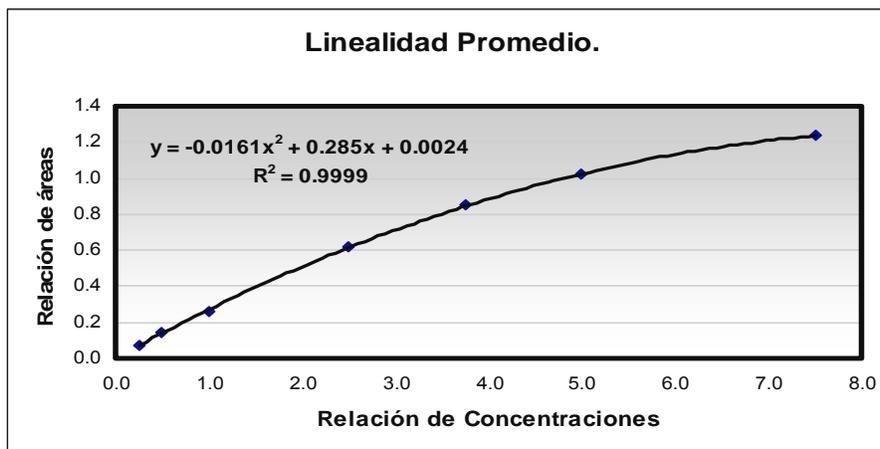


Figura 3. Linealidad promedio del método analítico

Los valores de Desviación Estándar Absoluta (DEA), para cada punto de la curva se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Precisión y exactitud para linealidad.

Concentración de ácido hipúrico (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)							
	Curva 1	DEA %	Curva 2	DEA %	Curva 3	DEA %	Promedio	CV %
50	54.4	8.7	52.4	4.9	46.7	6.6	51.2	7.8
100	101.7	1.7	102.7	2.7	99.5	0.5	101.3	1.6
200	191.2	4.4	194.5	2.7	198.7	0.6	194.8	1.9
500	490.1	2.0	498.0	0.4	520.0	4.0	502.7	3.1
750	785.7	4.8	743.5	0.9	741.9	1.1	757.0	3.3
1000	971.7	2.8	1016.5	1.7	981.6	1.8	989.9	2.4
1500	1508.8	0.6	1487.5	0.8	1526.2	1.7	1507.5	1.3





La tabla siguiente muestra los resultados de correlación obtenidos para cada una de las curvas:

Tabla 13. Modelo matemático de linealidad.

Concentración ácido hipúrico ($\mu\text{g/mL}$)	RELACIÓN DE ÁREAS AH/AB				
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO	CV %
50	0.072	0.073	0.078	0.074	4.9
100	0.137	0.141	0.150	0.143	4.6
200	0.255	0.261	0.278	0.265	4.4
500	0.604	0.610	0.636	0.617	2.7
750	0.881	0.838	0.834	0.851	3.0
1000	1.019	1.035	1.002	1.019	1.6
1500	1.267	1.234	1.208	1.236	2.4
$y = ax^2 + bx + c$	$y = -0.016x^2 + 0.287x - 0.005$	$y = -0.016x^2 + 0.285x - 0.001$	$y = -0.016x^2 + 0.282x + 0.013$	$y = -0.016x^2 + 0.285x + 0.002$	
r	0.9994	0.9999	0.9997	0.9997	

Para cada día de trabajo, se restó la respuesta cromatográfica correspondiente a la muestra blanco promedio de orina humana diluida.





IV.3.1 Determinación de la bondad de ajuste de concentración adicionada vs. Concentración recuperada.

Tabla 14. Parámetros estadísticos de la bondad de ajuste

Estadísticas de la regresión		
	IC 95 %	
m = 1.00252	0.98922	1.01583
b = -0.84129	-11.04259	9.36001
r = 0.99993	No es estadísticamente significativo	
r ² = 0.99987	p = 6.96066E-11	

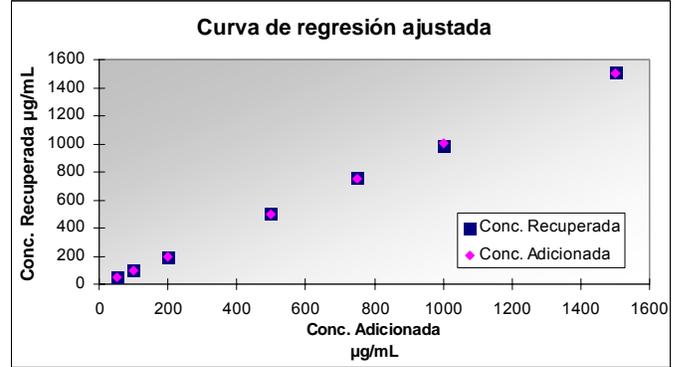


Figura 4. Gráfica de regresión de la Conc. Recuperada vs. la Conc adicionada

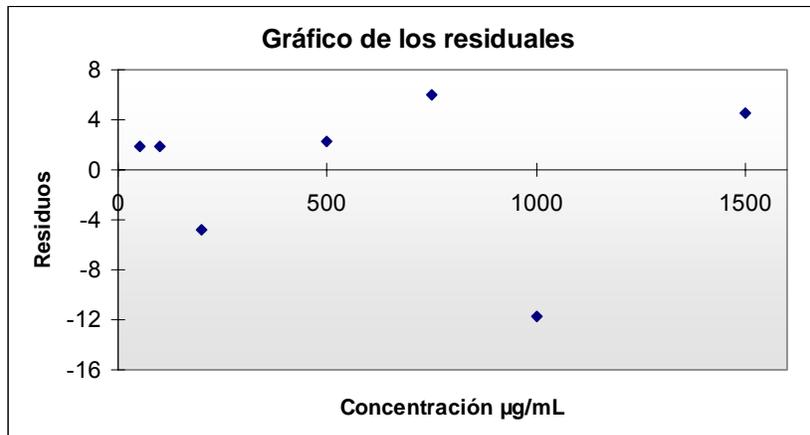


Figura 5. Gráfica de la Conc. Adicionada vs. Residuos.

Tabla 15. Residuos obtenidos para cada concentración adicionada.

Observación	Pronóstico	Residuos	Residuos estándares
1	49.3	1.9	0.3
2	99.4	1.9	0.3
3	199.7	-4.8	-0.8
4	500.4	2.3	0.4
5	751.1	6.0	1.0
6	1001.7	-11.7	-1.9
7	1502.9	4.5	0.7





Como podemos ver no existe ninguna tendencia con los residuos y la regresión entre la concentración recuperada y la concentración adicionada se superponen completamente, por lo que podemos decir que el modelo se ajusta perfectamente a una ecuación cuadrática.

IV.4 Precisión del método

IV.4.1 Repetibilidad

En la tabla 16 se presentan los resultados de repetibilidad, que fueron analizadas por el mismo analista, bajo las mismas condiciones de trabajo y en el mismo día.

Los datos indican que el método analítico es repetible con un coeficiente de variación máximo obtenido de 3.5 %.

Tabla 16. Resultados de repetibilidad.

REPETIBILIDAD			
Muestras Control ($\mu\text{g/mL}$)			
Replica	75	300	1250
1	80.9	317.2	1094.3
2	80.6	312.2	1096.5
3	78.4	300.7	1083.5
4	85.0	305.0	1111.1
5	84.8	308.7	1102.4
Promedio	81.9	308.8	1097.6
CV %	3.5	2.4	0.9
DEA %	9.2	2.9	12.2





IV.4.2 Reproducibilidad intra-analista (efecto día)

Los resultados de la reproducibilidad del método analítico de cada día se muestran en las tablas 17 y 18, para cuantificar ácido hipúrico en orina humana, para el analista 1 y el analista 2, respectivamente.

Tabla 17. Reproducibilidad Intra-analista 1.

REPRODUCIBILIDAD INTRA-ANALÍSTA 1				
Analista 1: Ixzel Hernández		Muestras Control (µg/mL)		
Día	Replica	75	300	1250
1	1	76.9	306.3	1191.0
	2	76.2	315.4	1202.8
2	1	79.9	298.9	1288.6
	2	77.9	297.3	1235.9
3	1	74.9	300.9	1221.8
	2	76.7	297.3	1205.4
PROMEDIO		77.1	302.7	1224.2
C V %		2.2	2.3	2.9
DEA %		2.8	0.9	2.1





Tabla 18. Reproducibilidad Intra-analista 2.

REPRODUCIBILIDAD INTRA-ANALISTA 2				
Analista 2: Carmen Saldaña		Muestras Control (µg/mL)		
Día	Replica	75	300	1250
1	1	85.3	327.8	1109.8
	2	78.9	336.7	1167.3
2	1	84.6	302.7	1241.0
	2	83.0	301.3	1270.1
3	1	78.4	294.0	1118.2
	2	80.2	297.0	1143.5
PROMEDIO		81.7	309.9	1175.0
C V %		3.6	5.7	5.6
DEA %		9.0	3.3	6.0

Los resultados para cada analista demuestran que el método es reproducible y exacto, ya que el C. V y DEA máximos son inferiores al 15% permitido.





IV.4.3 Reproducibilidad inter-analista (efecto analista)

La siguiente tabla resume la precisión entre los analistas en los tres días de la evaluación, con un CV y DEA máximos de 4.7 y 5.9 % respectivamente.

Tabla 19. Reproducibilidad Inter-analistas.

REPRODUCIBILIDAD INTER-ANALISTAS					
Muestras Control ($\mu\text{g/mL}$)					
	Día	Replica	75	300	1250
Analista 1	1	1	76.9	306.3	1191.0
		2	76.2	315.4	1202.8
	2	1	79.9	298.9	1288.6
		2	77.9	297.3	1235.9
	3	1	74.9	300.9	1221.8
		2	76.7	297.3	1205.4
Analista 2	1	1	85.3	327.8	1109.8
		2	78.9	336.7	1167.3
	2	1	84.6	302.7	1241.0
		2	83.0	301.3	1270.1
	3	1	78.4	294.0	1118.2
		2	80.2	297.0	1143.5
Promedio			79.4	306.3	1199.6
C V %			4.2	4.4	4.7
DEA %			5.9	2.1	4.0





IV.5 Exactitud del método

Las tablas 17, 18 y 19 muestran los resultados de la desviación estándar absoluta en porcentaje. Donde podemos ver que la exactitud cumple con la especificación establecida que indica que la desviación estándar absoluta debe ser menor al 15% del valor nominal.

IV. 6 Recobro absoluto

En la tabla 20, se muestra el por ciento de recobro absoluto obtenido para el ácido hipúrico en orina.

La recuperación promedio estuvo entre 99 y 102.8%, en los tres niveles de concentración el recobro fue consistente con un C V de 2.0%, por lo que cumple con los requerimientos para este parámetro.

Tabla 20. Recobro obtenido para ácido hipúrico.

Concentración (µg/mL)	Áreas (AH) en sistema	Áreas (AH) en método	Área de AH - Comp. Endógeno	% Recobro
75 MCB	660.0	733.4	678.8	102.8
	635.0	698.2		
	675.8	727.6		
PROMEDIO	656.9	719.7		
300 MCM	2665.2	2775.2	2707.5	101.6
	2781.2	2751.4		
	2651.9	2718.7		
PROMEDIO	2699.4	2748.5		
1250 MCA	8884.3	8896.8	8792.2	99.0
	8684.2	8759.9		
	9247.0	8842.6		
PROMEDIO	8938.5	8833.1		
			PROMEDIO	101.1
Respuesta del blanco =		40.9	C V %	2.0





Al estándar interno (ácido benzoico), también se le determino el recobro absoluto, donde la recuperación promedio resulto de 98.1%, el resultado fue consistente con un C V de 1.9 %.

Los resultados se pueden observar en la tabla 21.

Tabla 21. Recobro obtenido para ácido benzoico (E. I).

Ácido benzoico	Áreas (AB) en sistema	Áreas (AB) en método
300 µg/mL	7259.2	6984.2
	7478.8	7073.1
	7262.0	7264.8
	7260.1	7342.5
	7436.7	7156.6
	6950.5	7197.8
	7315.7	7113.8
	7367.5	7090.2
	7170.8	7020.0
	% Recobro	
C V %		1.9





IV.7 Selectividad

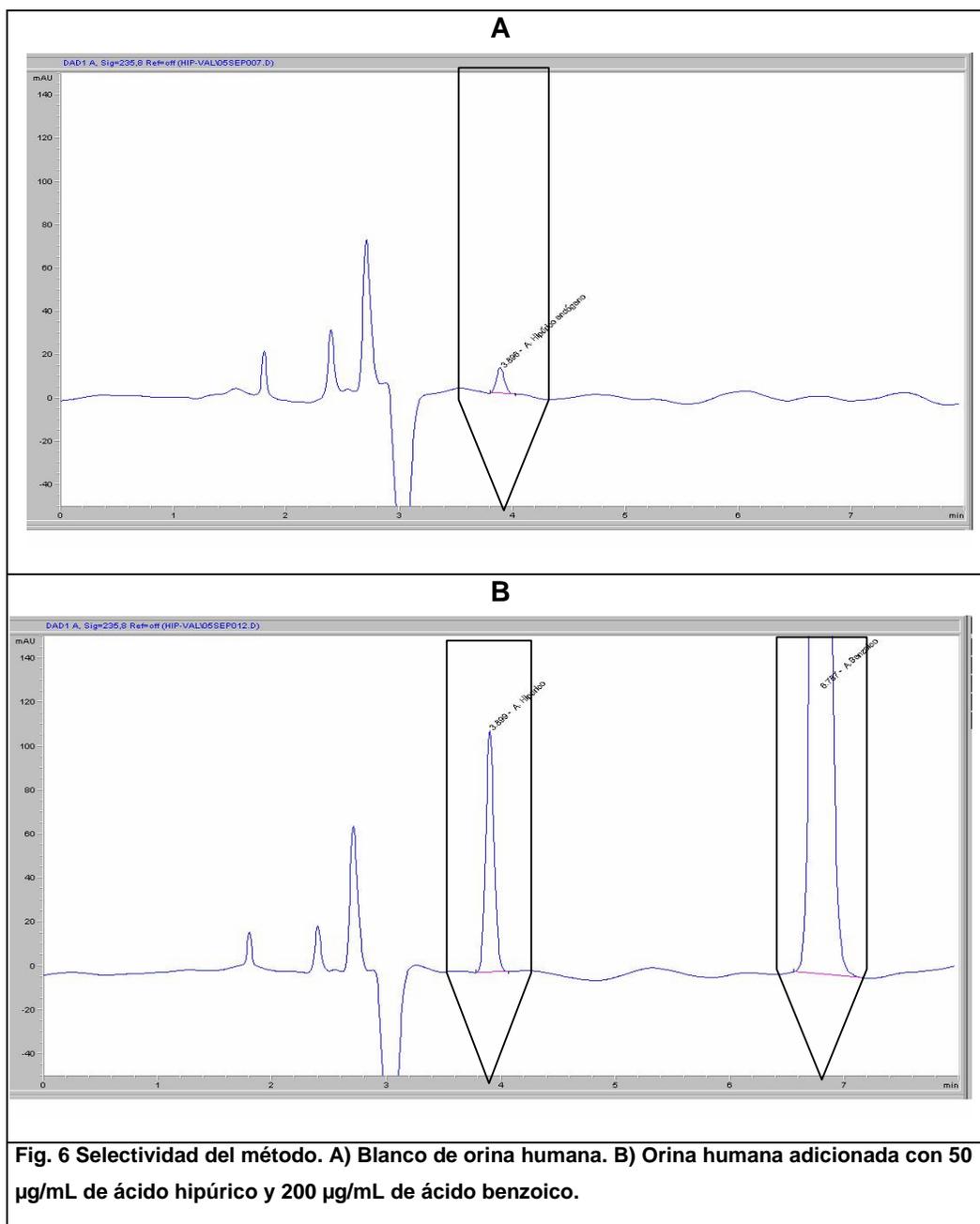
Dado que el ácido hipúrico es un componente habitual de la orina, la evaluación se realizó determinando el porcentaje en el incremento en la respuesta de ácido hipúrico en cada una de las muestras analizadas con respecto a la respuesta obtenida en el blanco de orina.

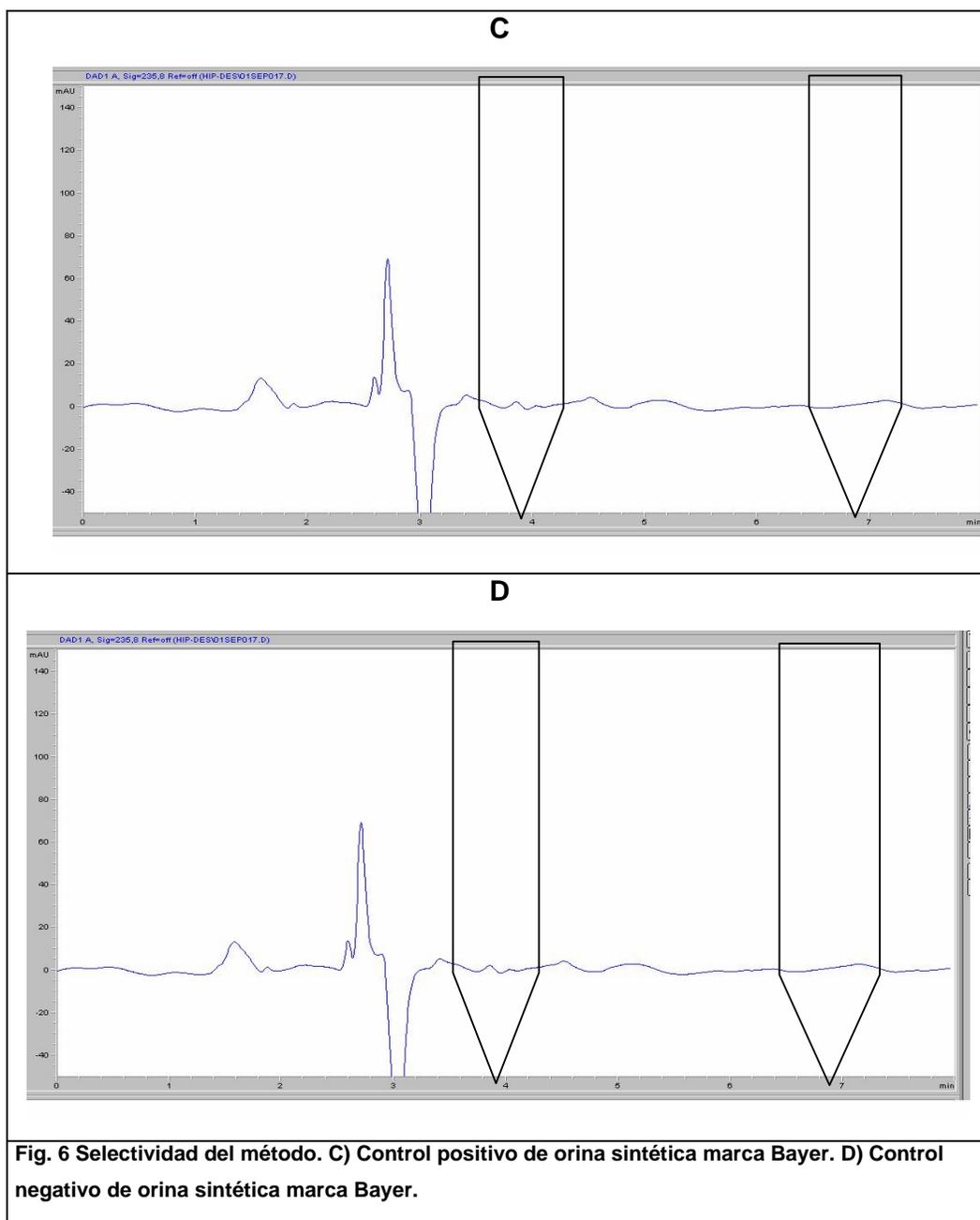
Tabla 22. Selectividad del método.

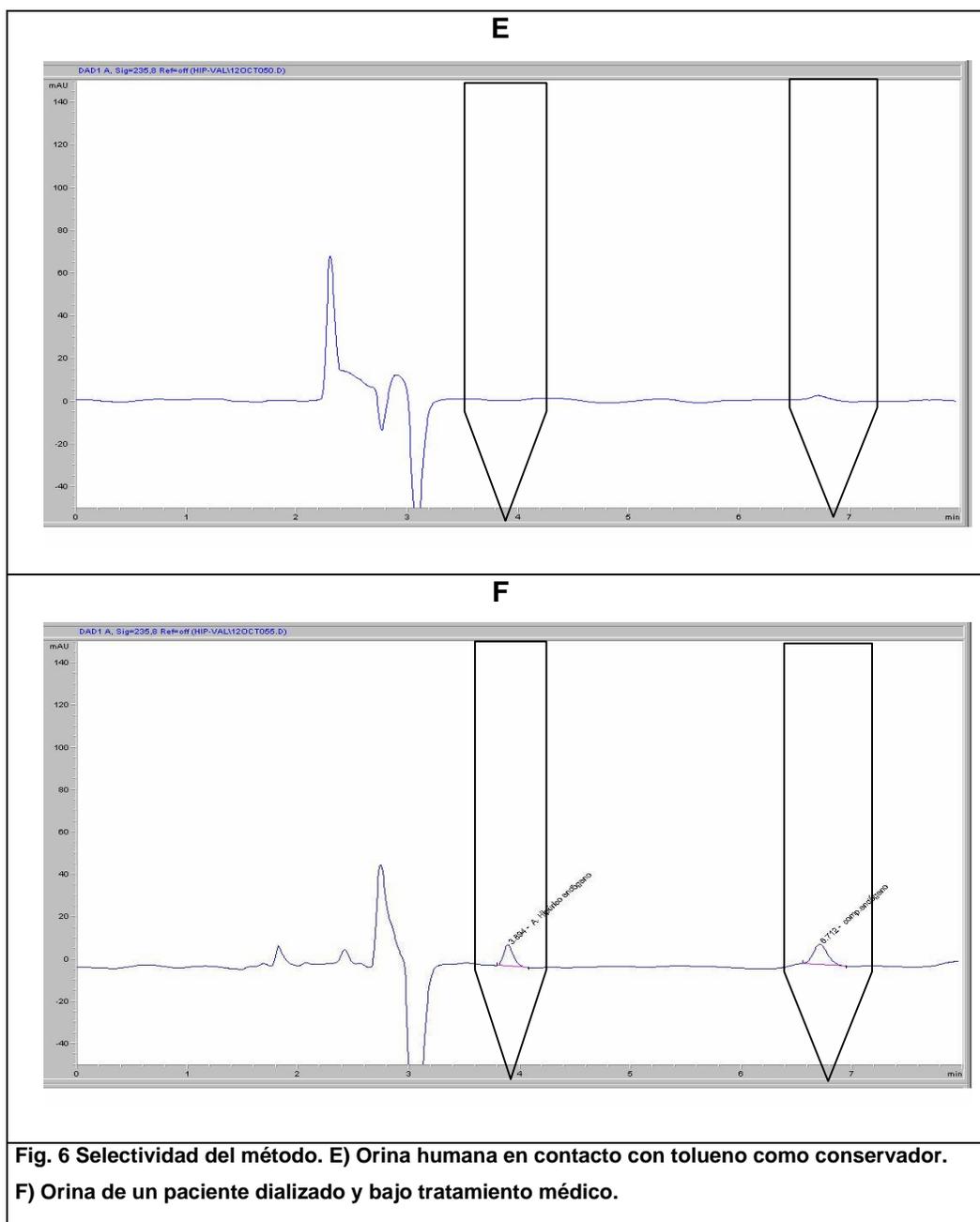
Analito	Tiempo retención (min)	Selectivo
Ácido hipúrico	3.88	NA
Ácido benzoico	6.71	NA
Orina Humana	3.9	No*
Controles de orina sintética, marca Bayer.	ND	Si
Conservador de tubos Sarsterd	ND	Si
Muestra de orina de la diálisis de un paciente con insuficiencia renal crónica, tomando los siguientes medicamentos: Furosemida, Metoprolol, Insorbide, Enalapril, Ranitidina, Calcitriol, Sucralfato y Gel de aluminio.	6.82	No

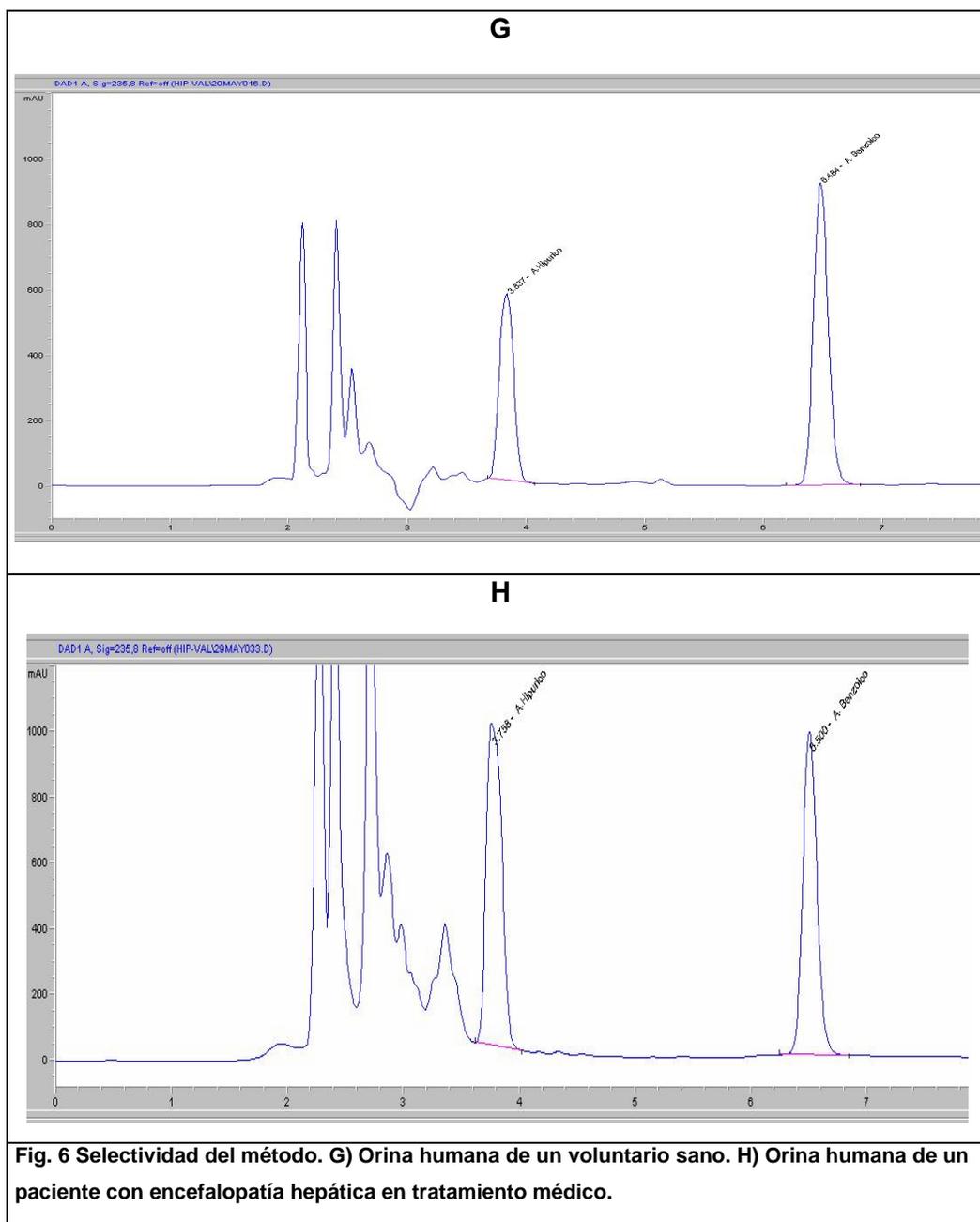
* Dado que el AH es un componente endógeno del organismo, se requiere restar la respuesta correspondiente al promedio de las determinaciones de blanco de orina. En cada día de trabajo.













IV.8 Límite de detección

El límite de detección encontrado es de 25 µg/mL, con una altura promedio de 67.2395, superior a 3 veces el nivel de ruido.

Tabla 23. Límite de detección para el método.

Muestra	Replica	Nivel de ruido (Respuesta AH endógeno)
Blanco de Plasma	1	17.1335
	2	15.0012
	3	16.5902
	Promedio	16.2
	Nivel de ruido * 3	48.7
Muestra	Replica	Altura
25 µg/mL	1	62.75286
	2	68.51379
	3	70.45177
	Promedio	67.2
12.5 µg/mL	1	40.05908
	2	42.66463
	3	46.61062
	Promedio	43.1





IV.9 Límite de cuantificación.

En la tabla 24 se muestran los resultados de las respuestas de ácido hipúrico para la concentración de 50 µg/mL, donde el límite de cuantificación resultó ser exacto y preciso con un C V y DEA de 2.6 y 10.8 % respectivamente

Tabla 24. Límite de cuantificación para el método.

Concentración (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)
50	56.1
	57.4
	55.1
	53.4
	55.1
Promedio	55.4
C V %	2.6
DEA %	10.8





IV.10 Estabilidad.

IV.10.1 Estabilidad a temperatura ambiente.

En la tabla 25 se muestran los resultados de estabilidad para las muestras en orina con ácido hipúrico que permanecieron a temperatura ambiente, y que fueron analizadas en el tiempo 0 y 4 h, después de su preparación.

La estabilidad a temperatura ambiente presentó un C V máximo de 3.2 % y una DEA de 6.3 % para t= 0h y al t= 4h el C V y la DEA máxima de 7.8 y 6.7 % respectivamente.

Tabla 25. Resultados de estabilidad a temperatura ambiente.

	t = 0 h			t = 4 h		
	Concentración Recuperada (µg/mL)			Concentración Recuperada (µg/mL)		
Replica	75	300	1250	75	300	1250
1	74.8	313.2	1277.1	76.4	332.0	1160.6
2	71.5	324.4	1251.4	71.0	297.4	1172.4
Promedio	73.1	318.8	1264.3	73.7	314.7	1166.5
C V %	3.2	2.5	1.4	5.2	7.8	0.7
DEA %	2.5	6.3	1.1	1.8	4.9	6.7





IV.10.2 Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento

➤ Estabilidad a Largo Plazo a – 70 °C.

En la tabla 26 se resumen los resultados obtenidos para la estabilidad bajo condiciones de almacenamiento para las muestras en orina con ácido hipúrico que permanecieron a – 70 °C y que fueron analizadas en el tiempo t= 0 días, t= 37 días y t= 64 días, después de su preparación.

Los resultados demuestran que las muestras en orina con ácido hipúrico son estables durante 64 días con un C V y DEA máximas de 6.4 y 8.9 % respectivamente.

Tabla 26. Resultados de estabilidad a largo plazo.

Replica	t = 0 días			t = 37 días			t = 64 días		
	Concentración Recuperada (µg/mL)			Concentración Recuperada (µg/mL)			Concentración Recuperada (µg/mL)		
	75	300	1250	75	300	1250	75	300	1250
1	67.5	289.8	1153.9	77.7	287.3	1165.9	78.2	287.8	1162.6
2	74.0	305.9	1092.8	82.9	284.1	1265.2	76.0	315.3	1115.4
Promedio	70.7	297.8	1123.4	80.3	285.7	1215.5	77.1	301.6	1139.0
C V %	6.5	3.8	3.9	4.5	0.8	5.8	2.0	6.4	2.9
DEA %	5.7	0.7	10.1	7.1	4.8	2.8	2.8	0.5	8.9





➤ **Estabilidad en refrigeración**

Adicionalmente 2 series de muestras control fueron preparadas y refrigeradas durante 5 días, posteriormente se analizaron, obteniéndose que las muestras son estables, con un C V y DEA máximas de 1.3 y 2.2 % respectivamente.

Tabla 27. Resultados de estabilidad en refrigeración.

Replica	t = 0 días, Refrigerador			t = 5 días, Refrigerador		
	Concentración Recuperada (µg/mL)			Concentración Recuperada (µg/mL)		
	75	300	1250	75	300	1250
1	67.3	280.3	1347.6	74.9	296.1	1248.0
2	72.9	291.0	1299.2	75.5	290.8	1243.8
Promedio	70.1	285.7	1323.4	75.2	293.5	1245.9
C.V %	5.7	2.6	2.6	0.5	1.3	0.2
DEA %	6.5	4.8	5.9	0.2	2.2	0.3

IV.10.3 Estabilidad a ciclos de congelación y descongelación

En la tabla 28 se muestran los resultados de la estabilidad para las muestras en orina que estuvieron bajo dos ciclos de congelación-descongelación y que fueron analizadas al tiempo de 0, 24 y 48 h, después de su preparación. Las cuáles cumplieron con los criterios de exactitud y precisión con un C V máximo de 3.8% y una DEA máxima de 14.9%.





Tabla 28. Resultados de estabilidad a dos ciclos de congelación y descongelación.

Replica	Ciclo 0			Ciclo 1			Ciclo 2		
	Concentración Recuperada (µg/mL)			Concentración Recuperada (µg/mL)			Concentración Recuperada (µg/mL)		
	75	300	1250	75	300	1250	75	300	1250
1	81.9	312.2	1118.4	71.5	285.3	1150.4	73.3	299.0	1063.1
2	80.9	312.1	1103.0	68.6	276.9	1163.7	69.5	302.4	1064.2
Promedio	81.4	312.2	1110.7	70.0	281.1	1157.1	71.4	300.7	1063.6
C V %	0.9	0.0	1.0	2.9	2.1	0.8	3.8	0.8	0.1
DEA %	8.6	4.1	11.1	6.6	6.3	7.4	4.8	0.2	14.9

IV.10.4 Estabilidad en el automuestreador

En la tabla 29 se muestran los resultados para la estabilidad de las muestras en orina que fueron preparadas, procesadas y almacenadas en el automuestreador durante 24 h a una temperatura controlada de 4 °C. El análisis de las muestras se realizó al tiempo 0, 12 y 18 h.

En el caso del análisis de las 12 h, los resultados de C. V y DEA máximos cumplen con los criterios de exactitud y precisión.

Para la estabilidad t= 18h, los resultados son exactos y precisos con un C V y DEA máximos de 4.1 y 2.8 % respectivamente.





Tabla 29. Resultados de estabilidad en el automuestreador.

	t = 0 h			t = 12 h			t = 18 h		
	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
Replica	75	300	1250	75	300	1250	75	300	1250
1	67.3	280.3	1347.6	73.6	284.6	1246.4	75.6	301.5	1286.9
2	72.9	291.0	1299.2	76.7	296.5	1229.2	76.5	284.5	1282.7
Promedio	70.1	285.7	1323.4	75.2	290.6	1237.8	76.1	293.0	1284.8
CV %	5.7	2.6	2.6	3.0	2.9	1.0	0.8	4.1	0.2
DEA %	6.5	4.8	5.9	0.2	3.1	1.0	1.4	2.3	2.8

IV.11 Tolerancia.

Las muestras control, cambiando la proporción de fase móvil, como se especifica en el punto III.3.9 “Modificación de la proporción de la fase orgánica en la fase móvil”, resultaron ser exactas y precisas con un CV y DEA máximas de 7.0 y 3.7 % respectivamente.





Tabla 30. Resultados de la tolerancia al variar la proporción de fase móvil.

Replica	Tolerancia 1			Tolerancia 2		
	Muestras Control ($\mu\text{g/mL}$)			Muestras Control ($\mu\text{g/mL}$)		
	75	300	1250	75	300	1250
1	73.9	312.0	1205.3	77.9	293.2	1212.5
2	81.6	297.4	1212.5	72.0	302.8	1255.7
Promedio	77.8	304.7	1208.9	75.0	298.0	1234.1
C V %	7.0	3.4	0.4	5.6	2.3	2.5
DEA %	3.7	1.6	3.3	0.0	0.7	1.3

IV.12 Análisis de resultados

El método analítico desarrollado y validado cumple con los criterios de la NOM -177-SSA1-1998, demostrando su confiabilidad y puede ser aplicado en estudios de excreción urinaria de ácido hipúrico.

Por medio de la validación se demostró la confiabilidad del método para la cuantificación del ácido hipúrico en orina, de acuerdo a los siguientes criterios:





Tabla 31. Resumen de resultados durante la validación

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Selectividad	No interferencia de los analitos en el tiempo de retención de AH	No interferencia de los compuestos evaluados.	Cumple
Linealidad	Valor de r superior a 0.99	Lineal en el intervalo de 50 a 1500 µg/mL con valor promedio de r de 0.9999.	Cumple
Precisión y exactitud			
Repetibilidad	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 3.5 y DEA ≤ 12.2	Cumple
Reproducibilidad analista 1	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 2.9 y DEA ≤ 2.8	Cumple
Reproducibilidad analista 2	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 5.7 y DEA ≤ 9.0	Cumple
Límite de cuantificación	CV y DEA ≤ al 20.0 %	50 µg/mL con un CV = 2.6 y DEA = 10.8	Cumple
Límite de detección	La altura del pico de AH debe ser 3 veces la señal de ruido	25 µg/mL	Cumple
Ácido hipúrico Ácido benzoico			
		Nivel bajo = 102.8 % Promedio 98.1 %	
Recobro absoluto	% recobro consistente en los tres niveles de concentración	Nivel medio = 101.6 % Nivel alto = 99.0 % Promedio = 101.1 % CV = 2.0 %	Cumple
Estabilidad			
condiciones de almacenamiento	CV y DEA ≤ al 15.0 %	hasta 64 días a -70° C con valores de CV ≤ 6.4 y DEA ≤ 8.9.	Cumple
temperatura ambiente	CV y DEA ≤ al 15.0 %	hasta 6 horas a temperatura ambiente con CV ≤ 7.8 y DEA ≤ 6.7.	Cumple
ciclos congelación-descongelación	CV y DEA ≤ al 15.0 %	hasta 2 ciclos con valores de CV ≤ 3.8 y DEA ≤ 14.9.	Cumple
automuestreador	CV y DEA ≤ al 15.0 %	hasta 24 horas con valores de CV ≤ 4.1 y DEA ≤ 2.8.	Cumple
Tolerancia	CV y DEA ≤ al 15.0 %	Modificación en la proporción de ACN en un 5 %. Valores de CV ≤ 7.0 y DEA ≤ 3.7.	Cumple





V. Conclusiones

- Se desarrolló un método analítico por Cromatografía de líquidos de alta resolución, fácil, rápido y económico para la cuantificación de ácido hipúrico en orina humana, que demostró ser confiable al cumplir con los criterios de validación que establece la NOM-177-SSA1-1998. Y puede ser aplicado en estudios de excreción urinaria para el monitoreo de niveles de nitrógeno en pacientes con deficiencia hepática.
- El método validado además de ser una alternativa para los pacientes que presentan encefalopatía hepática y que requieren un monitoreo continuo de los niveles de nitrógeno, también se podría utilizar en el laboratorio clínico para el monitoreo de la exposición ocupacional a agentes tóxicos como tolueno y benceno.





VI. Bibliografía

1. Secretaría de salud. [sitio en internet]. México c2005- [consultado 2006 Mar 27]. Disponible en : www.ssa.gob.mx
2. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. [sitio en internet] México c2006- [consultado 2006 Mar 27] Disponible en: www.inegi.gob.mx
3. Highleyman L, Franciscus A, Introducción sobre el hígado [hcsp HOJA informativa en internet]. San Francisco: HCV Advocate; 2003 [consultado 2006 Mar 27]. Disponible por: www.hcvadvocate.org/espanol.asp.
4. Bruce A, Dennis B, Julian L. Células diferenciadas y conservación de los tejidos. En: *Biología molecular de la célula*, España: Ediciones Omega; 1996. p. 1229.
5. Wolf D, MD, FACP, FACG, Encephalopathy, Hepatic. *Emedicine*. 2006 March [consultado 2006 May 17]. California (aproximadamente 14 páginas). Disponible en: <http://www.emedicine.com/med/topic3185.htm>
6. Idrovo V. Encefalopatía hepática. *Rev Col Gastroenterol*. 2003 Sep./Aug; 18 (3): 163-167. ISSN 0120-9957.
7. Abou-Assi S, Vlahcevic ZR. Hepatic encephalopathy: Metabolic consequence of cirrhosis often is reversible. *Posgrad Med*. 2001; 109 (2): 52 – 70.
8. Rees CJ, Oppong K, Mardini H AL, Hudson M, Record CO. Effect of L-ornithine-L-aspartate on patients with and without TIPS undergoing glutamine challenge: a double blind, placebo controlled trial.[Consultado 2006 May 17] *Gut* 2000; 47; 571 574. Disponible en: gut.bmjournals.com.
9. Uribe M, Toledo H, Pérez F, Vargas F, Gil S, García G. et al. Lactilol, A Second-Generation Disaccharide for treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. *Dig Dis Sci*. 1987; 32: 1345-1353.
10. Mullen KD, Dasarathy S. Protein restriction in hepatic encephalopathy: necessary evil or illogical dogma? *J. Hepatol*. 2004; 41: 147-148.
11. Uribe M, Bosques F, Marín E, Cervera E, Gil S, Poo JL. et. al. Derivación metabólica del amonio plasmático con benzoato de sodio, como método de tratamiento en pacientes con cirrosis y encefalopatía portosistémica. Informe interino de un estudio multicentrico doble ciego. *Rev. Invest. Clín (Méx)*, 1990; Supl 42: 149-154.





12. Poo JL, Cervera E, De Hoyos A, Gil S, Cadena M, Uribe M. Benzoato de sodio. Fundamentos para su uso clínico en hepatología. Rev Invest Clín. (Méx). 1990; Supl 42: 101-105.
13. Gatley SJ, Sherrat HS. The synthesis of hippurate from benzoate and glycine by rat liver mitochondria. Biochem j, 1977; 166:39-47.
14. 4735. Hippuric acid, pp 841 en: O'Neil, M J. Smith, A. Heckelman, P E. Obenchain, J R. Gallipeau, J A R. Dárecca M A. Budavari, S. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 30 Ed. Whitehouse Station, NJ, USA. 2001
15. Federación Española de Asociaciones de Enfermedades Raras (FEDER), European Organization for Rare Disorders (EURORDIS), [sitio en internet] Déficit de Arginasa España CIE-9-MC: 270.6. [consultado 2006 Mar 28]. Disponible en http://iier.isciii.es/er/prg/er_bus2.asp?cod_enf=171
16. Sisqueira ME, Paiva MJ. Hippuric acid in urine: reference values. Rev Saúde Pública, Dec 2002; vol 36, no. 6. ISSN 0034-8910.
17. NOM-047-1993 QUE ESTABLECE LOS LÍMITES BIÓLOGICOS MÁXIMOS PERMISIBLES DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN EL PERSONAL OCUPACIONALMENTE EXPUESTO. Publicada el 23 de Sep de 1996.
18. Dr. Guzmán JM. USO DEL ARANDANO EN UROLOGIA [monografía en Internet]. Revista Salud; 2002 [consultado 2006 Abr 2]. Disponible en <http://www.astrolabio.net/salud/articulos/101528218447279.html>
19. Stanley MD. Urinary Tract Infections in Children: Why They Occur and How to Prevent Them. Ame of Acad Fam Phys. 1998 May [consultado 2006 Abr 2]; Vol 57 (10): [aproximadamente 7 páginas]. Disponible en: <http://www.aafp.org/afp/980515ap/heller.html>
20. Dr. Potenziani JC, Dr. Carmona O, Dra. Pradella R, BR. Potenziani SD. Trabajo prospectivo MUJERES CON INFECCIONES URINARIAS RECURRENTE: FACTORES PREDISPONENTES EN AMBOS INTEGRANTES DE LA PAREJA. (1987 – 2004) [monografía en internet], Venezuela; 2004 [consultado 2006 Abr 2]. Disponible en: <http://www.urologiaaldia.com/volumenes/PDF/infeccion.pdf>





21. Kubota K, Horai Y, Kushida K, Ishizaki T. Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by High Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr Biomed Applic*, 1988; 425:67-75.
22. Hansen SH, Døssing M. Determination of urinary hippuric acid and o-cresol, as indices of toluene exposure by liquid chromatography on dynamically modified silica. *J Chromatogr Biomed Applic*, 1982; 229: 141-148.
23. Astier A, Deutsch AM. High performance liquid chromatographic determination of hippuric acid un human urine. *J Chromatogr Biomed Applic*, 1980; 182: 88 – 93.
24. Matsui H, Kasao M, Imamura S. High performance liquid chromatographic determination of hippuric acid in human urine. *J Chromatogr Biomed Applic*, 1978; 145: 231 – 236.
25. Tan HSI, Manning MA, Hann MK, Tan Tan HGT. Determination of benzyl alcohol and its metabolite in plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Applic*, 1991; 568: 145 – 155.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realizen las pruebas. Publicada el 7 de Mayo de 1999.
27. Biopsicologia.net. Ruta 13 Ciclo fosfogliraldehído-glicina – [Consultado 2006 Mar 21]. Disponible en: <http://www.biopsicologia.net/rutas/r13.html>
28. FDA Guidance Bioanalytical Method Validation. May 2001. Disponible en <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>

