



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Laboratorio de Análisis Instrumental



Comparación de los Niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas, Orina Matinal y Orina Vespertina en pacientes elegidos al azar, mediante Espectrofotometría UV-visible.

Por: Karili Andreina Rivas Mendoza
Heidy Yolimar Vera Carrillo
Tutor: Prof. Dr. Pedro R. Matheus R.

MÉRIDA, 19 de Noviembre de 2013



República Bolivariana de Venezuela

Universidad de los Andes

Facultad de Farmacia y Bioanálisis

Escuela de Bioanálisis

Laboratorio de Análisis Instrumental



Comparación de los Niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas, Orina Matinal y Orina Vespertina en pacientes elegidos al azar, mediante Espectrofotometría UV-visible.

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de licenciado en Bioanálisis

Por: Karili Andreina Rivas Mendoza

Heidy Yolimar Vera Carrillo

Tutor: Prof. Dr. Pedro R. Matheus R.

MÉRIDA, 19 Noviembre de 2013

Comparación de los Niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas, Orina Matinal y Orina Vespertina en pacientes elegidos al azar, mediante Espectrofotometría UV-visible

Autores: Por: Karili Rivas y Heidi Vera

Tutor: Prof. Dr. Pedro R. Matheus R.

Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Escuela de Bioanálisis. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Mérida. Venezuela.

RESUMEN

Se determinó la relación entre los niveles de ácido úrico en orinas de 24 horas, matinal y vespertina en pacientes, elegidos al azar, por medio de Espectrofotometría UV-visible. La metodología utilizada se basó en la preparación de curvas de calibración, construidas con diferentes patrones de ácido úrico (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/dL), obteniendo una buena regresión lineal (0,995), lo que indica que el método utilizado comprueba la linealidad referida por la casa comercial. Se recolectaron 61 muestras de orina de pacientes elegidos al azar, pertenecientes a una población de estudiantes y trabajadores del Municipio Libertador del Estado Mérida, en edades comprendidas entre 19 y 50 años. Se seleccionaron 45 muestras (31 mujeres y 14 hombres), de las cuales 33 se encontraban dentro de los valores de referencia (250 a 850mg/24 h), lo que representó un 73% de la población seleccionada. Los resultados obtenidos mostraron que se puede plantear un ecuación matemática ($X = n.Y$), que indica una relación directamente proporcional entre los valores de ácido úrico en orina de 24 horas y los valores obtenidos en orinas de la mañana y orinas vespertinas. Es importante mencionar que en ambos casos la correlación fue bastante débil y positiva lo que refleja que debemos mejorar los valores de correlación obtenidos (0,27498621 para la relación orina 24 horas/orina matinal y 0,20246801 para la relación orina 24 horas/orina vespertina).

Palabras claves: Ácido Úrico; Orina 24 horas; Orina matinal; orina vespertina.

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por darnos la vida, por amarnos y siempre estar a nuestro lado y guiar nuestros caminos hacia el bien. Por brindar su apoyo incondicional y apartar del camino los obstáculos para así seguir adelante y cumplir nuestras metas. Gracias padre en el nombre de Cristo.

A nuestros padres, por apoyarnos y que siempre estuvieron presentes en nuestro camino, por su amor incondicional, creer en nosotros, mostrándonos que con honestidad se pueden lograr las metas y los sueños.

A nuestros familiares y amigos, por brindar su amistad y sus mejores deseos.

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que de uno u otro modo, ayudaron y apoyaron a la realización de este trabajo.

Le agradecemos a la ilustre Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por abrirnos sus puertas y permitirnos crecer como personas y profesionales.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental, por permitirnos el uso de sus instalaciones, suministro de reactivos y equipos para la realización de este trabajo.

Así como también agradecemos a los profesores y licenciados que cooperan en el Laboratorio por todo su apoyo y maravillosa atención.

Les agradecemos a los Jurados por brindar su tiempo y aportación en este proyecto que con sus conocimientos se pudo terminar con satisfacción el objetivo planteado.

.

Al profesor Dr. Pedro Matheus, por darnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

PROBLEMA

ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

RECOMENDACIONES

ANEXOS

ÍNDICE

1.0. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.....	1
1.1. Ácido úrico.....	1
1.2. Ciclo metabólico del ácido úrico.....	3
1.3. Catabolismo de las purinas y formación de ácido úrico.....	5
1.4. Excreción de ácido úrico.....	6
1.5. Hiperuricemia.....	7
1.6. Orina.....	7
1.6.1. Funciones de la orina.....	8
1.6.2. Formación de la orina.....	8
1.6.3. Composición de la orina.....	8
1.6.4. Contenidos anormales de la orina.....	9
1.6.5. pH urinario.....	9
1.7. Toma de muestras de orina.....	10
1.7.1. Orina de 24 horas.....	10
1.7.2. Procedimiento para la obtención de la muestra de orina de 24 horas.....	10
1.8. Orina matinal.....	10
1.8.1. Procedimiento para la obtención de la muestra de orina matinal.....	10
1.9. Orina vespertina.....	11
1.9.1. Procedimiento para la obtención de la muestra de orina vespertina.....	11
2.0. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO.....	12
2.1. Método Enzimático.....	12
2.2. Métodos de HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia).....	12
2.3. Métodos por Electroforesis Capilar.....	12
2.4. Métodos Electroquímicos.....	12
2.5. Técnica de Espectrofotometría UV-visible.....	13
3.0. JUSTIFICACIÓN.....	18
4.0. PROBLEMA.....	19
5.0. ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS.....	20
6.0. HIPÓTESIS.....	21
7.0. OBJETIVOS.....	22
7.1. Objetivo General.....	22
7.2. Objetivos Específico.....	22
8.0. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
8.1. Materiales y equipos.....	23
8.2. Reactivos y diluciones.....	24
8.3. Métodos.....	24
8.3.1. Lectura de los patrones.....	25
8.3.2. Dilución de los patrones.....	25
8.3.3. Curva de calibración.....	25
8.3.4. Recolección de las muestras.....	25
8.3.5. Tratamiento de la muestra.....	25
8.3.6. Procedimiento Analítico.....	26
8.3.7. Técnica para la Determinación <i>in vitro</i> del Ácido Úrico.....	26
8.3.7.1. Tipo de muestra.....	26
8.3.7.2. Preparación del reactivo de trabajo.....	26
8.3.7.3. Lectura de las Muestra.....	26
8.3.7.4. Cálculos.....	27
8.4. Metodología esquemática.....	28
8.5. Diseño específico.....	29
8.5.1. Preparación de Patrones.....	29

8.5.2. Tratamiento de las muestras de Orina.....	30
9.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
9.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO.....	31
9.2. DISCUSIÓN DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.....	32
9.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	32
9.3.1. Orina 24 horas, orina matinal y orina vespertina.....	32
9.4. Muestreo.....	34
9.5. Coeficiente de Correlación.....	38
9.6. Diagramas de Dispersión.....	39
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	43
Anexo 1:Consentimiento Autorizado.....	46
Anexo 2: Indicaciones para la toma de muestra.....	47

1.0 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

1.1. Ácido úrico.

Es un compuesto orgánico formado por carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno. Su fórmula química es $C_5H_4N_4O_3$. El ácido úrico es un producto de desecho del metabolismo del nitrógeno en el cuerpo humano (el producto de desecho principal es la urea), y se encuentra en la orina en pequeñas cantidades (Zhao, S. y col., 2008) (ver figura 1).

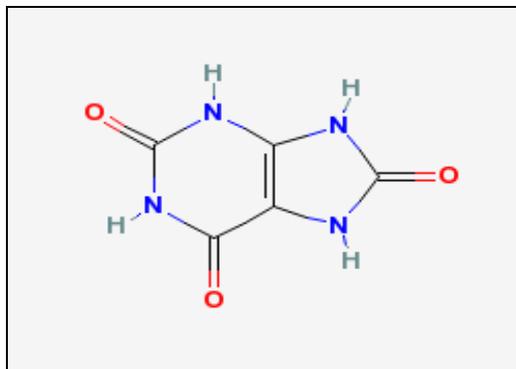


Figura 1: Estructura química del ácido úrico.

Fuente: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary>.

En humanos, el ácido úrico es el producto final del catabolismo de los nucleótidos de purina, adenina y guanina, siendo la uricemia el producto final de dicho catabolismo. Esto es así, debido a que el ser humano carece de la enzima uricasa, que en la mayoría de los animales transforma el ácido úrico en alantoína (Valenzuela, J., 2001).

El ácido úrico es uno de los principales parámetros controlados en la orina y en la sangre. Normalmente está presente en la sangre en el intervalo de concentración de 2,52-7,56 mg/dL y se excretan por la orina alrededor de 250 a 850 miligramos por 24 horas (Jaimes, J. y col., 2003).

El valor normal de ácido úrico en sangre para el sexo masculino es de 7,0 mg/dL y en la mujer premenopáusica 6,0 mg/dL. En los niños los niveles son variables con rangos de 3 a 5 mg/dL para ambos sexos, incluso hasta la adolescencia. La menor concentración sérica en el paciente pediátrico obedece a la rápida y eficiente depuración de ácido úrico por el riñón (Jaimes, J. y col., 2003).

La variabilidad de los niveles de ácido úrico en el suero es multifactorial, debido a que está influenciada por una serie de factores tanto ambientales como genéticos (Zhao, S. y col., 2008).

Habitualmente la concentración de ácido úrico en suero varía de un individuo a otro dependiendo de la edad, sexo, peso, presión arterial tanto sistólica como diastólica, función renal, ingesta de una dieta con alto contenido de purinas y consumo regular de alcohol (Villarán, R. y col., 2000). Sin embargo, en general los niveles séricos dependen de la reserva de nucleótidos de purina derivados de la síntesis del catabolismo de los ácidos nucleicos y del incremento en el recambio de formación de purinas (Jaimes, J. y col., 2003).

La concentración sérica de uratos no es constante a lo largo de la vida, en la pubertad se asocia a un incremento de la uricemia (de 1,0 a 2,0 mg/dL) en los hombres, que no se produce en las mujeres. Por ello, en el adulto la uricemia media es superior en los hombres que en las mujeres. Este hecho se relaciona con un mayor aclaramiento renal de uratos en mujeres, que algunos autores han atribuido al efecto de los estrógenos sobre el manejo tubular de uratos. Tras la menopausia estas diferencias desaparecen y la incidencia de gota aumenta en mujeres (Jaimes, J. y col., 2003).

Los cambios en la concentración de ácido úrico están asociados a una alteración en el metabolismo de las purinas, lo que se relaciona a numerosas enfermedades y alteraciones fisiológicas. Los Niveles de ácido úrico en fluidos fisiológicos como plasma y orina, pueden servir como valiosos indicadores para determinar ciertas condiciones clínicas (Villarán, R. y col., 2000).

1.2. Ciclo metabólico del ácido úrico.

El ácido úrico es formado a partir de los nucleótidos de purina a través de compuestos intermediarios como xantina, hipoxantina y guanina por acción de la enzima xantina oxidasa (Jaimes, J. y col., 2003).

La renovación celular conlleva a la desintegración del material celular, que incluye el contenido nuclear de ácidos nucleicos, y en consecuencia, se acompaña de un aumento en la producción de ácido úrico.

Los primates han sufrido pérdida evolutiva de la enzima uricasa, que cataliza la degradación de ácido úrico en alantoína ($C_4H_6N_4O_3$).

De todos los mamíferos, la especie humana es la que presenta los valores más elevados de uratos en plasma. En condiciones fisicoquímicas y fisiológicas, el ácido úrico se encuentra mayormente como anión urato en el plasma. Los niveles de urato en plasma son de forma simple, un reflejo del equilibrio entre su producción y su excreción (Villarán, R. y col., 2000) (ver figura 2).

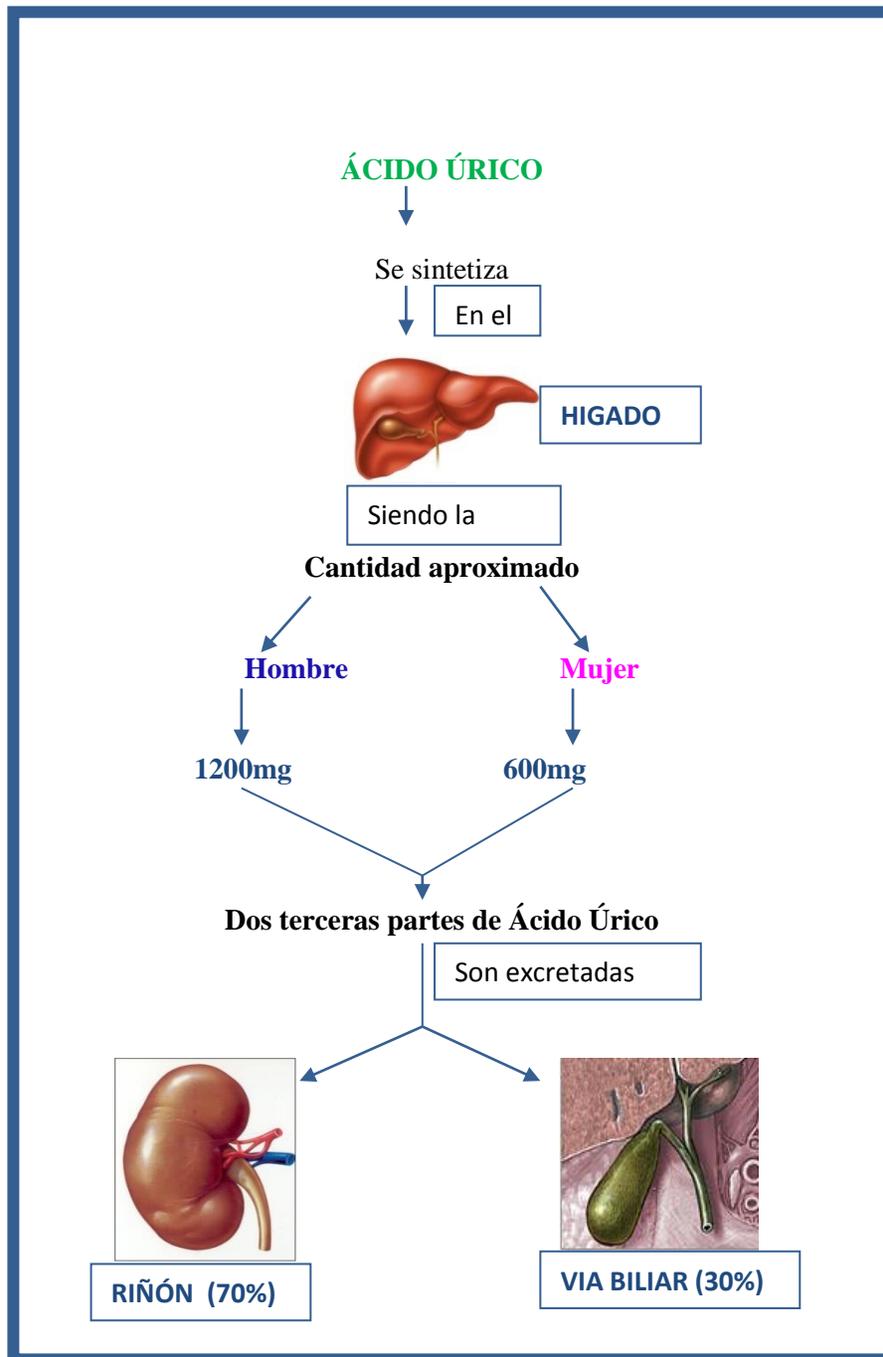


Figura 2: Síntesis del Ácido Úrico.

Fuente: Macchi, C. y col., 2008.

1.3. Catabolismo de las purinas y formación de ácido úrico.

La degradación de DNA y RNA por nucleasas produce nucleótidos (ribo y desoxirribonucleótidos) y estos a su vez son sometidos a hidrólisis de nucleotidasas con acción de la fosfatasa, dando nucleósidos libres, en el caso de las purinas, Adenosina y Guanosina; esta última, es degradada a guanina y ribosa-1-fosfato por la nucleósido purínico-fosforilasa. El nucleósido adenosina, por acción de la adenosina desaminasa, se convierte en inosina y en xantina, luego una nucleósido fosforilasa divide a la inosina en hipoxantina y pentosa-1-guanasa. Tanto adenina como guanina convergen en xantina. Este metabolito es sustrato de la xantina oxidasa, que lo convierte en ácido úrico, producto final de la degradación de purinas, el cual es excretado principalmente por orina. (Rosales, R., 2004) (ver figura 3).

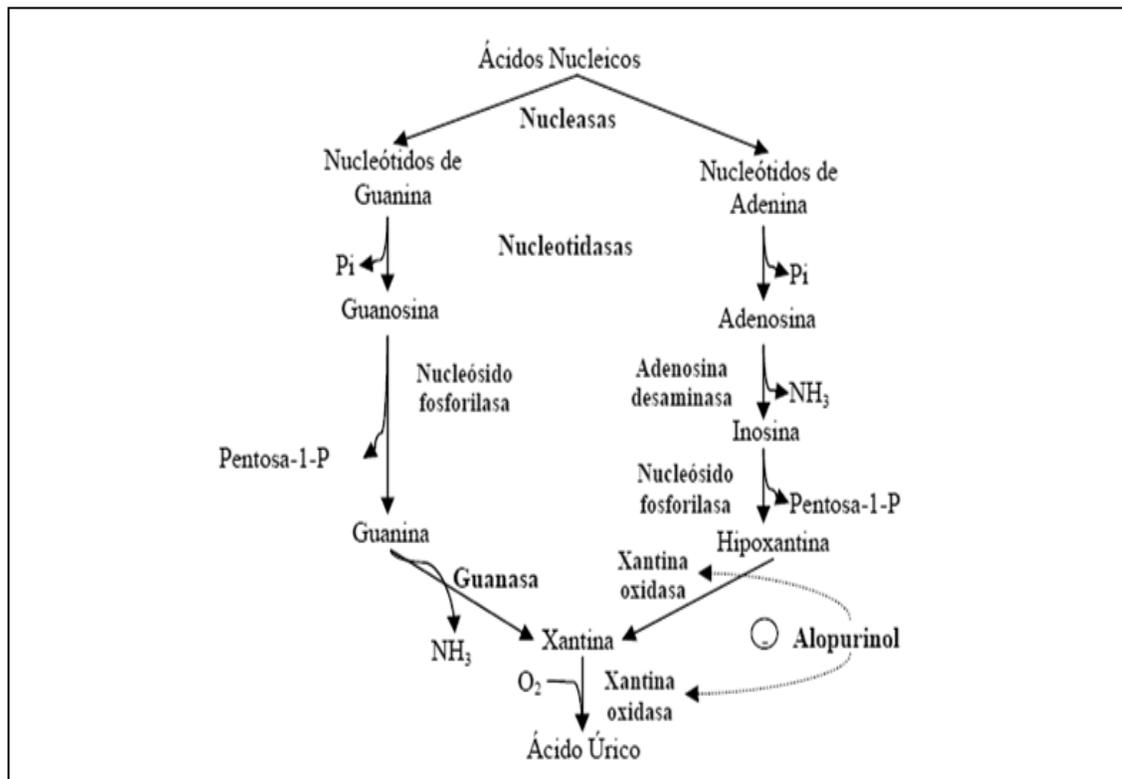


Figura 3: Catabolismo de purinas y formación de ácido úrico.

Fuente: <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/urea/pdf/nitro.pdf>.

1.4. Excreción de ácido úrico.

El ácido úrico procedente de la degradación de las purinas se elimina principalmente por las vías renal y entérica. En condiciones fisiológicas, la mayor parte del ácido úrico se excreta a través de la orina, y aproximadamente el 30% se elimina por vía intestinal. Es decir, aproximadamente dos tercios del ácido úrico sintetizado diariamente se eliminan por vía renal, el resto es excretado con distintas secreciones a la luz intestinal donde las bacterias intestinales degradan el ácido úrico a alantoína y dióxido de carbono (uricolisis intestinal). El manejo de ácido úrico por el riñón no está claramente definido, sin embargo se conocen por lo menos cuatro etapas antes de su excreción final por el sistema renal. Estas son: filtración, reabsorción en el túbulo proximal, secreción, y finalmente, reabsorción post-secretora (Valenzuela, M. y col., 2001). En la figura 4 se muestra el proceso de excreción del Ácido Úrico en el hombre.

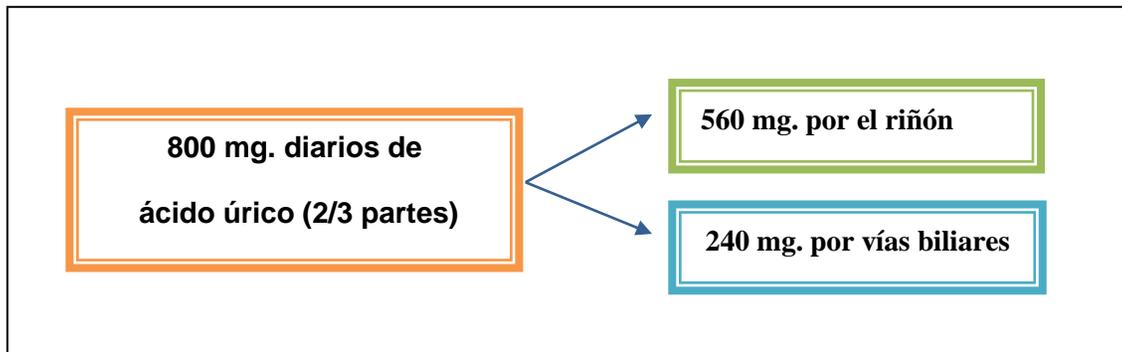


Figura 4: Excreción del Ácido Úrico en el hombre.

Fuente: Valenzuela, J. y col., 2001.

La capacidad del organismo para eliminar el ácido úrico está relacionada con la concentración de éste, tanto en el torrente sanguíneo como en la orina. El ácido úrico puede presentarse en dos formas: como ácido (a pH bajo menor de 5,75) o como sal monosódica (Torres, J. y col., 2002).

La importancia de esto radica en que el ácido úrico es 17 veces menos soluble que el urato monosódico; así, una persona que tenga orina con pH de 5,0, solo podrá solubilizar 15 mg de ácido úrico en 100 mL, mientras que si el pH de la orina se alcaliniza (>7,0), es posible solubilizar de 150 a 200 mg/dL.

El ácido úrico es relativamente insoluble en orina ácida concentrada. Bajo condiciones específicas que disminuyen el pH urinario puede producirse cristalización y formación de piedra (cálculos). (Rosa, F. y col., 2006).

1.5. Hiperuricemia.

La hiperuricemia es un trastorno metabólico que ocurre frecuentemente en la población general; es definida como aquel valor que rebasa el límite superior de los niveles normales de ácido úrico (2,6,8-trihidroxipurina) en sangre y que epidemiológicamente puede ser definido como la media del valor de ácido úrico más dos desviaciones estándar (Rosa, F. y col., 2006).

1.6. Orina.

La orina es un líquido transparente de color amarillento formado por 95% de agua y aproximadamente un 5% de sólidos disueltos. Los riñones producen alrededor de 1,5 litros de orina por día; la orina contiene desechos metabólicos y escasa o nula cantidad de proteínas en plasma, eritrocitos o moléculas de glucosa. Un litro de orina contiene normalmente agua, 10 miligramos de cloruro de sodio y dos productos tóxicos: urea (25 gramos) y ácido úrico (0,5 gramos).

La orina se ha definido por algunos autores como una biopsia líquida de los tejidos del tracto urinario. Se trata de un material que permite obtener una considerable información de forma rápida y económica, y es por ello que su análisis se considera de rutina y se realiza con frecuencia. Su capacidad diagnóstica no sólo abarca aquellas enfermedades propias del aparato genitourinario sino muchas otras de carácter metabólico, o simplemente, como indicador de salud (González, J. M. y col., 1998).

1.6.1. Funciones de la orina.

Entre las funciones de la orina se pueden mencionar:

1. Eliminación de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo celular, tal es el caso de la urea.
2. Eliminación de sustancias tóxicas como las drogas.
3. El control electrolítico, regulando principalmente la excreción de sodio y potasio.
4. Regulación hídrica o de la volemia, para el control de la tensión arterial.
5. Control del equilibrio ácido-base.

1.6.2. Formación de la orina.

La formación de la orina comprende los procesos de filtración de la sangre por el glomérulo para formar el ultra filtrado, reabsorción de sustancias esenciales incluyendo el agua, y secreción tubular de ciertas sustancias. Después de su formación en el riñón, la orina pasa por el uréter hacia la vejiga, donde es almacenada en forma temporánea antes de ser excretada a través de la uretra (Graff, L., 2007).

1.6.3. Composición de la orina.

Los principales constituyentes de la orina son agua, urea, ácido úrico, creatinina, sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio, fosfatos, sulfatos y amoníaco. En 24 horas el organismo excreta aproximadamente 60,0 gramos de material disuelto, la mitad del cual está constituido por urea. En algunos procesos patológicos aparecen en gran cantidad sustancias tales como cuerpos cetónicos, proteínas, glucosa, porfirinas y bilirrubina. La orina también puede contener estructuras como cilindros, cristales, células sanguíneas y células epiteliales (Graff, L., 2007).

1.6.4. Contenidos anormales de la orina.

Existen algunas patologías relacionadas con la presencia de otros componentes (anormales) en la orina, entre las cuales se pueden mencionar:

- **Glucosuria:** es la presencia de glucosa en orina y aparece sobre todo en pacientes con Diabetes Mellitus.
- **Hematuria:** es la presencia de sangre en la orina, debiendo descartarse: infección urinaria, litiasis urinaria, glomerulonefritis, neoplasia (cáncer de vejiga, uréter, riñón, próstata, entre otros).
- **Bacteriuria:** es la presencia de bacterias en la orina, cuando normalmente es estéril.
- **Piuria:** es la presencia de pus en la orina.
- **Proteinuria:** es la presencia de proteínas en la orina, como suele observarse en glomerulonefritis, infección urinaria, intoxicaciones, diabetes, entre otros.

1.6.5. pH urinario.

El pH de la orina está determinado por la concentración de H^+ . Como el pH es la recíproca del ión hidrógeno, a medida que la concentración de este ión aumenta, el pH disminuye o se torna más ácido. A medida que la concentración del ión H^+ disminuye, el pH aumenta o se torna más alcalino. El pH de la orina puede variar entre 4,6 y 8,0, pero en promedio se encuentra alrededor de 6,0, de modo que por lo general es ligeramente ácida. No hay un intervalo anormal ya que la orina puede normalmente variar de ácida a alcalina, por esta razón, es importante para el médico poder correlacionar el pH de la orina con otra información para determinar si existe o no algún problema (www.gaptalavera.sescam.jccm.es/.../muestra_orina_de_24_horas.pdf).

1.7. Toma de muestras de orina.

Es fundamental tomar una muestra limpia de la orina. Para tomar una muestra limpia, las personas deben lavarse los genitales con agua y jabón antes de recoger la orina en el recolector estéril. Normalmente el recipiente para la toma de muestra está cubierto por una bolsa de plástico que garantiza que está estéril. Si no es así, hay que asegurarse de que esté completamente limpio antes de llenarlo de orina, para lo cual se recomienda hacerle una esterilización.

(<http://www.urologia.tv/icua/es/diagnostics>).

1.7.1. Orina de 24 horas.

En este análisis se mide la cantidad de orina que se produce en personas en el transcurso del día, la acidez (pH) y la cantidad de ciertas sustancias presentes como: calcio, sodio, ácido úrico, oxalato, citrato y creatinina. Los valores normales de ácido úrico en orina van de 250 a 850 mg/24 horas.

(<http://www.urologia.tv/icua/es/diagnostics>).

1.7.2. Procedimiento para la obtención de la muestra de orina de 24 horas.

Ver anexo 2.pag (47).

1.8. Orina matinal.

La primera orina del día es la más concentrada y la que tiene mayor probabilidad de mostrar anomalías. Se debe recoger la primera orina después de levantarse por la mañana, desechando la primera parte del chorro antes de recoger la muestra. Se recomienda recoger aproximadamente unos 30 mililitros de orina, no obstante, el especialista puede pedir más cantidad si desea realizar un mayor número de pruebas (www.nlm.nih.gov/medlineplus/.../003616.htm).

1.8.1. Procedimiento para la obtención de la muestra de orina matinal.

Ver anexo 2.pag (48).



1.9. Orina vespertina.

Es la orina tomada en cualquier hora del día (preferiblemente entre 2 pm y 3 pm). Según algunos autores, valor normal de ácido úrico en estas muestras es de hasta 25 mg/dL. Al igual que en los casos anteriores, es fundamental tomar una muestra limpia (www.nlm.nih.gov/medlineplus/.../003616.htm).

1.9.1. Procedimiento para la obtención de la muestra de orina vespertina.

Ver anexo 2.pag (48).

2.0. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO.

Existen diferentes métodos para la determinación de ácido úrico en fluidos biológicos, entre los que se puede mencionar los siguientes:

2.1. Método Enzimático.

El método enzimático, por lo general, se basa en el uso de la enzima uricasa, o la combinación de uricasa y peroxidasa. El método enzimático colorimétrico, usado tradicionalmente en los laboratorios clínicos, consiste en la oxidación química del ácido úrico a alantoína. Según este método la absorbancia de la muestra es proporcional a la concentración de ácido úrico (a una longitud de 520 nm) (Lab. Heiga).

2.2. Métodos de HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

Los métodos de HPLC se han convertido en métodos de análisis clínico de rutina, debido a su alto rendimiento y especificidad, mayor que el obtenido con el uso de métodos enzimáticos, sin embargo, presentan el inconveniente de ser muy costosos (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3. Métodos por Electroforesis Capilar.

La electroforesis capilar es otra técnica utilizada para el análisis cuantitativo de muestras biológicas, especialmente en el campo clínico, debido a su simplicidad, alta eficiencia, sensibilidad, necesidad mínima de solventes y muestras, y costos relativamente bajos. También se ha desarrollado electroforesis capilar basada en métodos UV y detección electroquímica para determinación de metabolitos, entre ellos el ácido úrico. Otro método de detección combinado con Electroforesis Capilar es la quimioluminiscencia; éste se ha convertido en un sistema bastante utilizado, debido a su alta sensibilidad, bajo costo y baja demanda de energía (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4 .Métodos Electroquímicos.

También se han desarrollado métodos para la determinación de ácido úrico en muestras biológicas, basados en análisis electroquímico; estos procedimientos presentan mayor selectividad y sensibilidad (Torres, J. y col., 2002).

2.5. Técnica de Espectrofotometría UV-visible.

El principio de la espectrofotometría ultravioleta visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190-780 nanómetros (nm) la cual está dividida en diferentes tipos de radiación entre las que se encuentran: el ultravioleta extremo (<200nm), ultravioleta cercano (entre 200 y 380nm), luz visible (entre 380 y 750nm) e infrarrojo (>750nm) (ver figura 5).

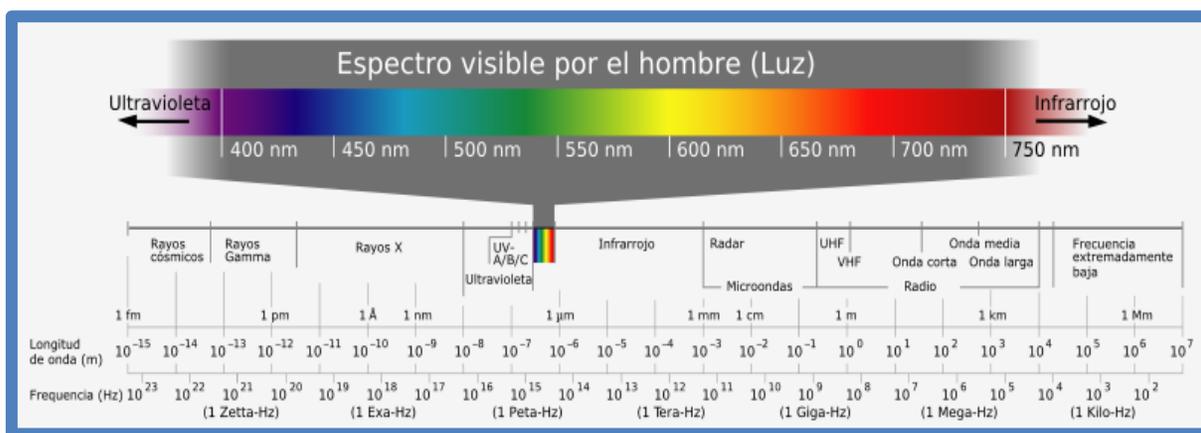


Figura 5: Espectro Electromagnético.

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Espectro_visible.

La absorción de radiación por moléculas biológicas en las regiones ultravioleta y visible del espectro, depende de la estructura electrónica de los átomos de carbono que las componen. La absorción de las radiaciones electromagnéticas por las disoluciones se rige por la Ley de Lambert-Beer, que relaciona la intensidad de luz incidente (I_0) y la de la luz transmitida (I), cuando un rayo de luz atraviesa la longitud b de un medio que absorbe. Esta relación se expresa de la siguiente manera:

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot b}$$

Donde **k** es el coeficiente de absorción que depende de la naturaleza de la sustancia. Para las disoluciones diluidas, la ley de Lambert-Beer puede escribirse de la forma:

$$I = I_0 \cdot e^{-a' \cdot c \cdot b}$$

Donde **a'** es el coeficiente de absorción y **c** la concentración de la disolución. La relación entre las intensidades de luz transmitida e incidente I/I_0 se denomina transmitancia, y el logaritmo decimal de la transmitancia es la absorbancia (**A**). Puede escribirse:

$$\log (I/I_0) = A$$

Donde, **A = a.c.b**, siendo **a**, la constante de proporcionalidad. Cuando la concentración se expresa en mol/litro, **a** se escribe con el símbolo (ϵ), sus unidades son litro/mol.cm y se denomina coeficiente de absorción molar. La ley de Lambert-Beer queda de la forma:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

La técnica de UV- Visible está basada en la utilización de un espectrofotómetro de barrido con óptica de red, donde se puede obtener un cromatograma completo a una longitud de onda definida. Alternativamente cuando los picos están suficientemente separados se puede elegir distinta longitud de onda para cada pico. Los espectrofotómetros son los instrumentos que se utilizan para las medidas de absorción de las radiaciones electromagnéticas (Bedis, A y col., 2003).

Los principales componentes de un espectrofotómetro se pueden observar en la figura 6.

- 1) Fuente de luz.
- 2) Sistema de selección de longitud de onda (Monocromador).
- 3) Dispositivo para la celda que contiene el analito.
- 4) Detector de luz.
- 5) Dispositivo de lectura de la señal generada por el detector (Registrador).

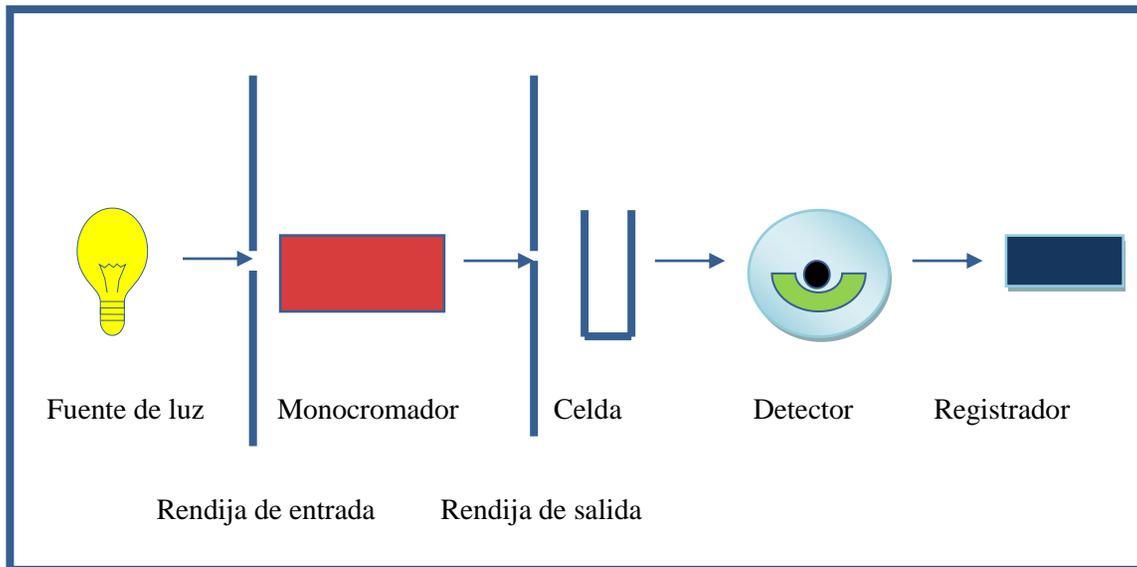


Figura 6: Diagrama de Bloques de un espectrofotómetro UV-visible.
Fuente: González y col., 1998.

Las medidas de absorción de radiación ultravioleta y visible tienen una amplia aplicación en la identificación y determinación de una gran cantidad de especies inorgánicas y orgánicas. Es probable que los métodos de absorción molecular ultravioleta-visible sean los más utilizados entre todas las técnicas de análisis cuantitativo en los laboratorios químicos y clínicos en todo el mundo. (www.ulpgc.es/descargadirecta.php).

En la tabla 1 se muestra un resumen de las distintas técnicas utilizadas para la determinación de ácido úrico en muestras de orina y sangre.

Tabla 1: Distintas técnicas utilizadas para la determinación de ácido úrico en muestras de orina y sangre:

Método	Niveles de ácido úrico Orina:mg/24h Sangre:mg/dL	Conclusiones	Referencias Bibliográficas
Plataformas portátiles Lab-on-a-chip	Suero: 3,36 ± 0,08	Se comprobó la posibilidad de determinar de forma directa y simultánea el ácido úrico y sus interferentes sin la necesidad de pre-tratar las muestras. Por otra parte, esta metodología, puede ser empleada en el análisis de muestras biológicas (suero o plasma).	Catlab on line. El portal de laboratorios analíticos. Lab-on-chip. 2012.
Espectrofotometría UV-visible	Suero: Hombres:3,4-7,0 Mujeres: 2,5-6,0	Se afirmó que en los pacientes obesos, puede existir diferencia en los niveles de ácido úrico en sangre comparado a una población control, pero no necesariamente hay relación directa con la obesidad.	Ramos, V. y col., 2011.
Método enzimático-colorimétrico	-Suero: Mujeres: 5.1±1.0 Hombres: 7.2±1.2	En la población estudiada se comprobó la participación del ácido úrico en la fisiopatología del SM, al asociarse significativamente con los niveles séricos de urea y creatinina.	Campos, M. y col., 2010

continúa ...

Comparación de los Niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas, Orina Matinal y Orina Vespertina de pacientes elegidos al azar mediante Espectrofotometría UV-visible

Electroforesis capilar con detección quimioluminiscente	-Orina: 370–880 -Suero: 4-7,2	Con el método utilizado se evaluó la cuantificación de ácido úrico en orina humana y suero, encontrándose resultados satisfactorios que coinciden con los valores de referencia.	Zhao, S. y col., 2008.
Método Espectrofotométrico	Suero: Mujeres: 4,84 ± 0,97 Neonatos: 5,03 ± 1,06	Sólo el 13% de la uricemia del recién nacido está relacionada con la uricemia materna; la uricosuria en los neonatos es mayor a la descrita por otros autores.	Medina, M. col., 2007
Test fotométrico-enzimático in vitro	-Suero: -Hombres: ≤ 7 -Mujeres: ≤ 6	Los valores de uricemia aumentan a medida que lo hacen los episodios respiratorios obstructivos y la desaturación durante el sueño, pero este aumento parece condicionado por factores como la obesidad.	Ruíz A. y col., 2006.
Método Fosfotungstico	-Suero Mujeres: 2,4-5,7 Hombres: 3,4 - 7,0 -Orina: 300–700	Los hallazgos sugieren que la hiperuricemia no es el resultado del aumento en la producción de ácido úrico, sino de una disminución en su excreción renal.	Lecocq, F.y col., 2003
Método uricasa	Suero: Hombres: 9,2 ± 1,9 Mujeres: 6,8 ± 1,9	Sugieren que la hiperuricemia en la población obesa se atribuye principalmente a una disminución en el aclaramiento de ácido úrico, y no a una superproducción de uratos.	Yamashita, S.y col., 2003
Método enzimático	-Suero: 3,5 -Orina: 360,0	En este estudio se establece que la ingesta de proteínas ejerce una marcada influencia en la excreción de ácido úrico.	Nishida, Y. y col., 2001.

3.0. JUSTIFICACIÓN

Los niveles anormales de ácido úrico están frecuentemente asociados a enfermedades renales, diabetes, enfermedades cardiovasculares, gota y obesidad (Barbany, M. y col., 2002).

Las determinaciones de ácido úrico se realizan frecuentemente en muestras de orina de 24 horas lo que hace que el procedimiento de toma de muestra sea muy laborioso, además del tiempo que se debe esperar para tener el resultado del análisis. En estas muestras, los pacientes incurren en numerosas fallas al momento de tomar la muestra, lo que hace que los resultados obtenidos, sean en muchos casos erróneos.

Por estas razones, esta investigación tiene como finalidad comparar los niveles de ácido úrico en orinas de 24 horas, matinal y vespertina en el mismo paciente y establecer relación entre estas muestras, diseñando para ello una ecuación matemática para que el médico tratante pueda disponer de información preliminar. Obtenidos los valores de las muestras de orina matinal y vespertina, el médico podría descartar el análisis de orina de 24 horas, para algunos de sus pacientes.



4.0. PROBLEMA

¿Qué relación existe entre los niveles de ácido úrico en orinas de 24 horas, matinal y vespertina en pacientes, elegidos al azar (sin criterios de inclusión)?

5.0 ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS.

Con respecto a los antecedentes de la hipótesis, en la Bibliografía consultada, sólo se encontró un artículo relacionado, el cual resumimos a continuación:

Krieg, M. y col. en 1986 realizaron el Análisis clínico-químico cuantitativo de muestras de orina de 24 horas y orina de la mañana. Compararon la relación entre la orina de la mañana y en la orina de 24 horas en 80 pacientes sanos. Según estos autores, se requiere un período de al menos 4 horas entre la micción anterior y la recogida de orina de la mañana. Se determinaron los siguientes parámetros: sodio, potasio, cloruro, creatinina, urea, ácido úrico, glucosa, calcio, fósforo inorgánico y proteína total. Cada parámetro, con la excepción de la proteína total, se determinó sin dilución manual previa, por un procedimiento totalmente mecanizado, utilizando un analizador multicanal SMA 12/60 (Technicon) adaptado para los propósitos de rutina. Los resultados obtenidos mostraron que la dispersión de los valores de excreción suele ser menor en orina de 24 horas que en la orina de la mañana, pero en su conjunto los intervalos de referencia son relativamente amplios. Casi sin excepción, existe una correlación significativa entre la excreción de las orinas de 24 horas y las de la mañana, con un coeficiente de correlación promedio de sólo 0,5. Se concluye a partir de los resultados, que la composición de la orina de la mañana de pacientes aparentemente sanos, refleja adecuadamente la excreción de la orina de 24 horas. Quedaría por ver si esto también es válido para los estados patológicos.

6.0. HIPÓTESIS

Es posible que los niveles de ácido úrico en orina de 24 horas de pacientes elegidos de forma no-aleatoria, se encuentren relacionados de manera directa con los niveles de ácido úrico en orina matinal y orina vespertina. De ser así, se piensa en la posibilidad de establecer una fórmula matemática o un programa de computación que relacione los resultados obtenidos para las diferentes muestras. De poder lograr esto, se estaría disminuyendo el tiempo para la toma de la muestra, haciendo el procedimiento más rápido y práctico. Además de facilitar el procedimiento para la toma de muestras de orina 24 horas, se lograría posiblemente que los pacientes fueran más sinceros en el momento de decir como tomaron la muestra, lo que a su vez daría más confiabilidad al análisis realizado.



7.0. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Determinar la relación que existe entre los niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas, Orina Matinal y Orina Vespertina en pacientes elegidos al azar (sin criterios de inclusión).

7.2 Objetivos Específicos

- Preparar curvas de calibración utilizando patrones preparados con ácido úrico comercial.
- Determinar los niveles de ácido úrico en las diferentes muestras de orina utilizando espectrofotometría UV-visible.
- Comparar los niveles de ácido úrico entre las diferentes muestras de orina de cada paciente.
- Relacionar los valores de Ácido Úrico obtenidos, utilizando para ello una fórmula matemática o un programa de computación.

8.0. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales y equipos.

- Tubos de ensayo (20 mL): utilizados para colocar las muestras.
- Recolectores estériles de orina: usados para la recolección.
- Cilindro Graduado (0-2000 mL): Utilizado para medir el volumen de orina de 24 horas.
- Embudo de vidrio.
- Pipetas y micro pipetas de 0-100 y de 100-1000 μL : utilizadas para medir los diferentes volúmenes indicados en la metodología de trabajo.
- Tiras reactivas de pH: utilizado para medir el pH de la orina.
- Papel para-film (Laboratorio Film).
- Baño de maría: se utilizó un baño de maría a 37 °C para la incubación de las muestras.
- Celdas de plástico 1cc de paso óptico.
- pH metro H-1931401.
- Espectrofotómetro: Las mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro Jenway 6310 a longitudes de onda de 520 nm, para la determinación de los niveles de ácido úrico (ver figura 7).



Figura 7: Espectrofotómetro Jenway 6310.
Fuente: Ramos, V. y col., 2011.

8.2. Reactivos y diluciones.

- Reactivo enzimático (Lab. Heiga).
- Soluciones Buffer (Lab. Heiga).
- Patrón de Ácido Úrico (5 mg/dL, Lab. Heiga).
- Agua ultrapura (18 MΩ).

8.3. Métodos.

Partiendo de una solución madre se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de ácido úrico.

- Patrones de ácido úrico a partir de una solución madre 5mg/dL

Concentración de solución (mg/dL)	Volumen de solución madre (μL)
1,0	40,0
2,0	80,0
3,0	120,0
4,0	160,0
5,0	200,0

Volumen final a preparar: 200 μL

8.3.1. Lectura de los patrones.

Una vez preparados los patrones se procedió a realizar la lectura de sus absorbancias en el espectrofotómetro Jenway 6310 a 520 nm.

8.3.2. Dilución de los patrones.

A cada patrón preparado se le realizaron diluciones en tubos de ensayo por el método de doble seriado.

8.3.3. Curva de calibración.

Una vez realizada las diluciones, se midieron sus respectivas absorbancias en el Espectrofotómetro Jenway 6310 a 520 nm. Finalmente con los valores de absorbancias obtenidos para cada analito, se procedió a construir la curva de calibración.

8.3.4. Recolección de las muestras.

Se recolectaron muestras constituidas por orinas (orina de 24 horas recolectada durante un periodo de 24 horas), orina matinal (orina en ayunas) y orina vespertina (recolectada en cualquier hora del día, preferiblemente entre 2 y 3 pm) de pacientes aparentemente normales elegidos al azar. A los pacientes se les hizo entrega de una ficha de autorización (Anexo 1) y las indicaciones para la toma de las muestras de orina (Anexo 2), así como un recolector de orina para la toma de las muestra.

8.3.5. Tratamiento de la muestra.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes. A las muestras de orinas se les midió: volumen, pH y densidad, para posteriormente ser procesadas. Seguidamente fueron colocadas en tubos de ensayo para realizar el procedimiento analítico indicado en el protocolo de trabajo para determinaciones de ácido úrico en orina, según el Laboratorio Heiga.

8.3.6 .Procedimiento Analítico.

8.3.7. Técnica para la Determinación *in vitro* del Ácido Úrico: Método Enzimático-Colorimétrico. (Laboratorio Heiga).

8.3.7.1. Tipo de muestra:

-Orina 24 horas, orina matinal y orina ocasional (diluidas todas 1:10).

8.3.7.2. Preparación del reactivo de trabajo:

Se preparó disolviendo el reactivo enzimático con 50 mL de Buffer (Laboratorio Heiga).

Luego se procedió como se indica en el siguiente recuadro:

	Muestra (mL)	Patrón (mL)	Blanco (mL)
Reactivo de trabajo	1	1	1
Patrón	-----	0,02	----
Muestra	0,02	----	----

Seguidamente se mezclaron los tubos y se incubaron a 37 °C, durante 5 minutos.

8.3.7.3. Lectura de las muestras.

Con el blanco reactivo se ajustó el aparato a cero de absorbancia y se realizaron las lecturas de las muestras a 520 nm. Siendo la reacción de color estable a los 30min.



8.3.7.4. Cálculos.

Las medidas de ácido úrico se obtuvieron en absorbancia, para luego transformarlas a concentración mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de ácido úrico (mg/dL)} = \frac{\text{D.O de la Muestra} \times [\] \text{ del patrón} \times 10}{\text{D.O. del patrón}}$$

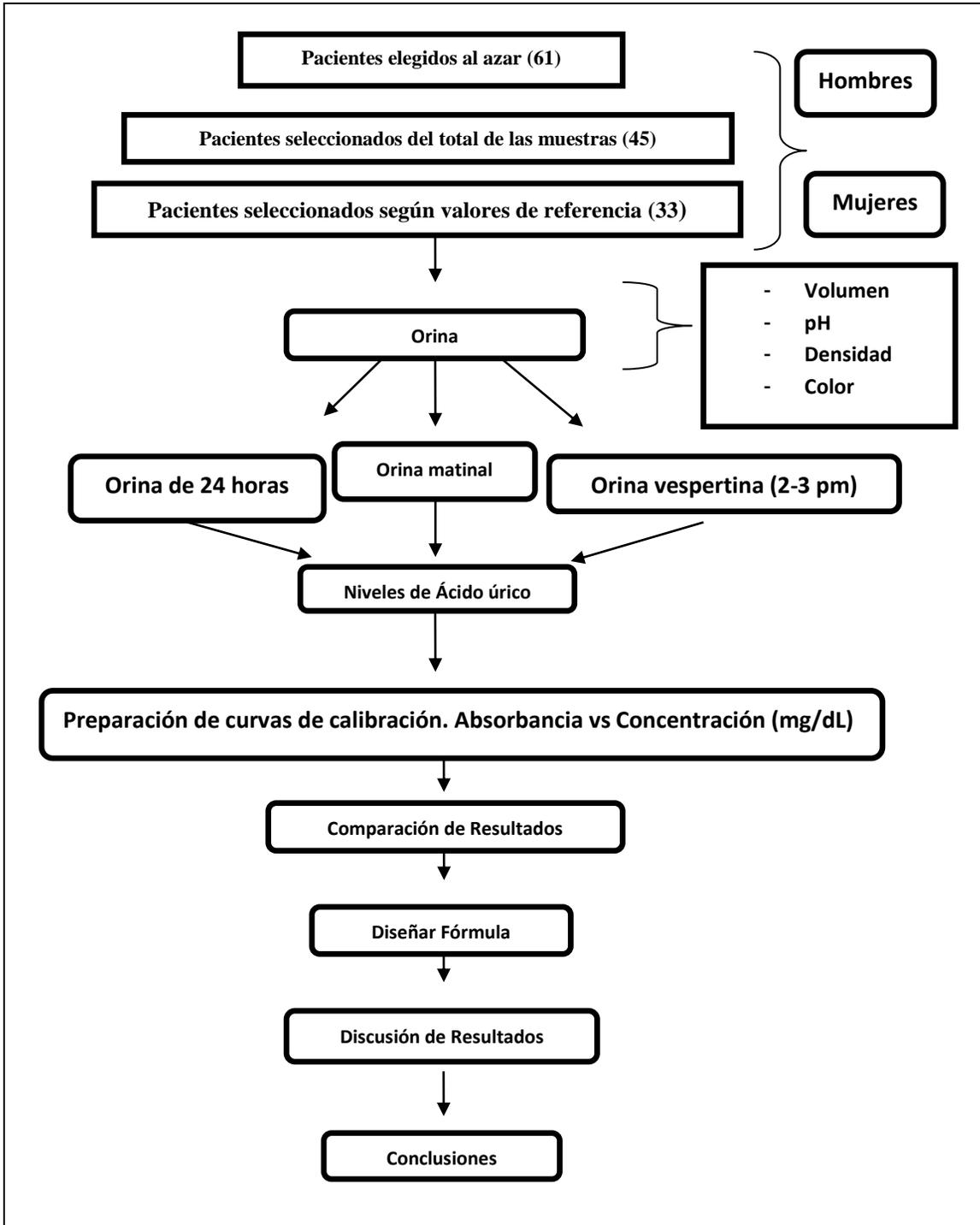
D.O = Absorbancia medidas a 520 nm.

[] del Patrón de Ácido Úrico: 5mg/dL

Nota: En orina el resultado obtenido se multiplica por 10 (factor de dilución).

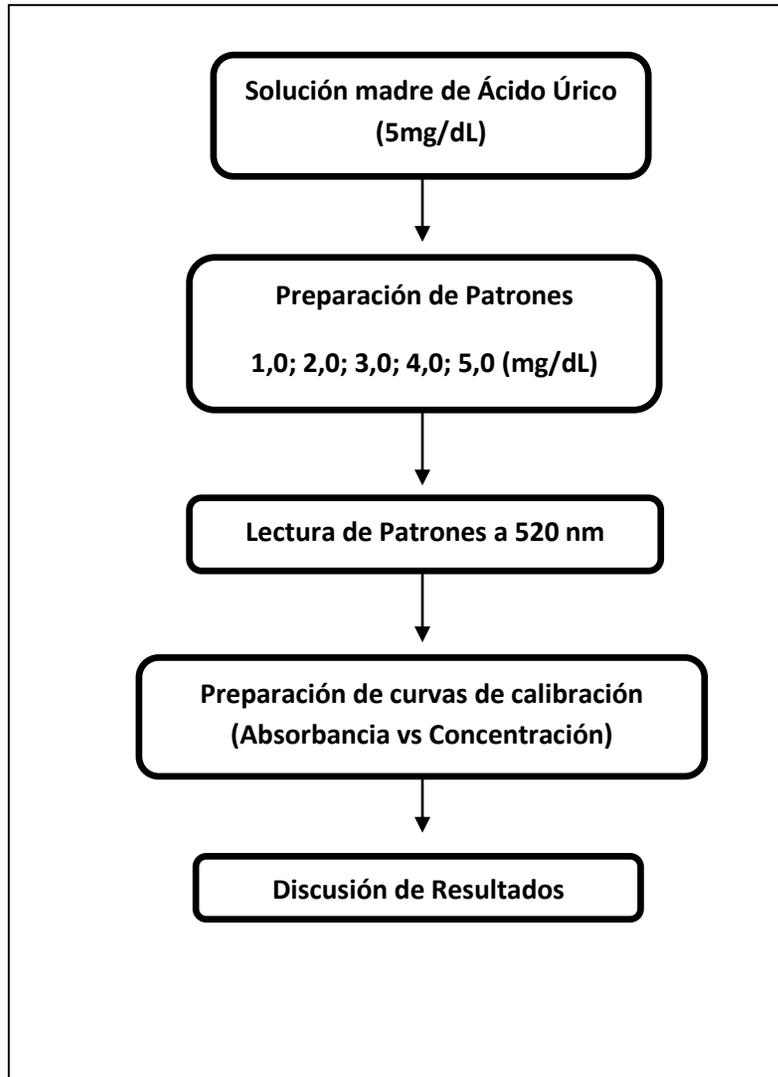
VALORES DE REFERENCIA: 250-850 mg/24 h

8.4. Metodología esquemática.



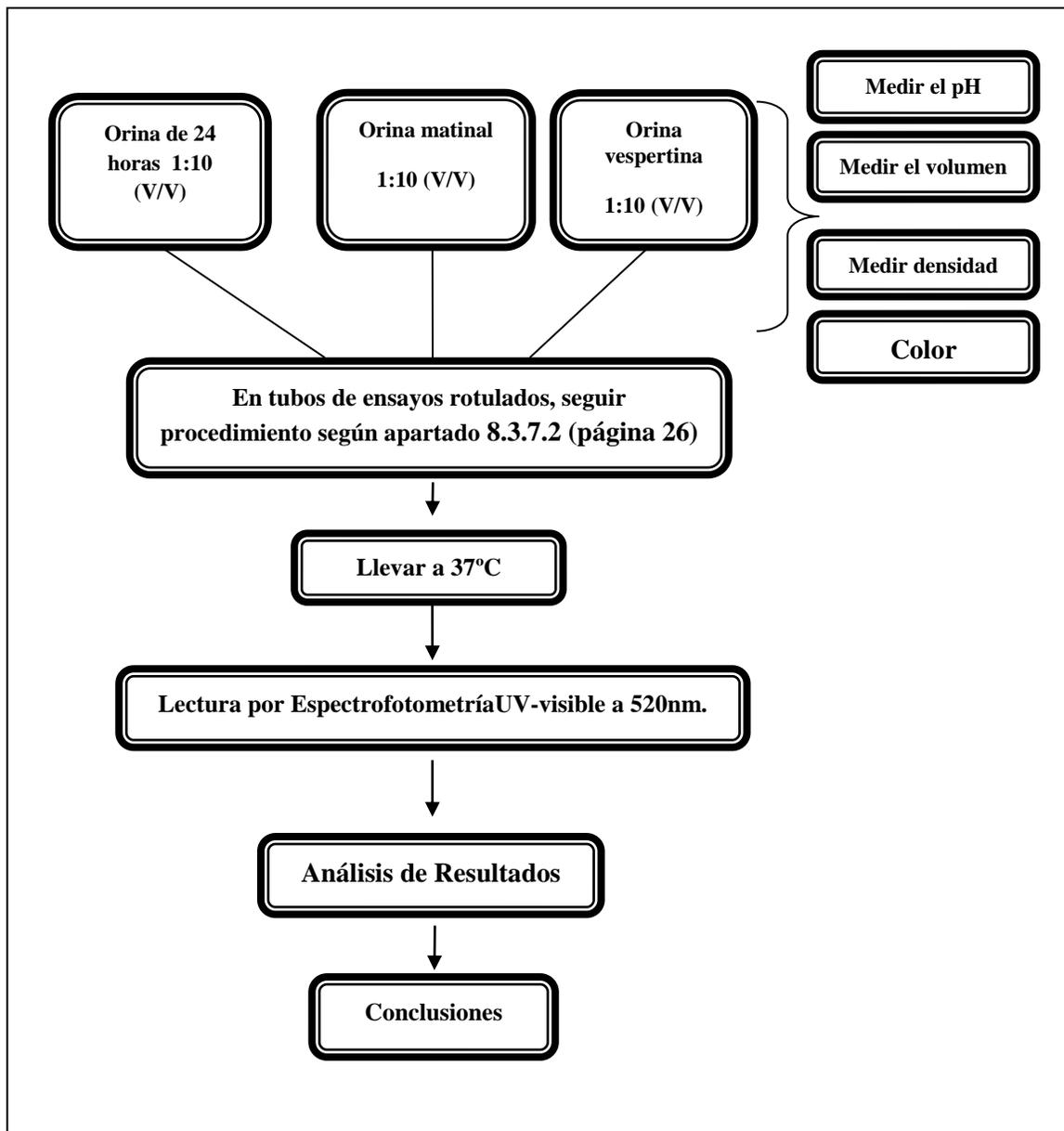
8.5. Diseño Específico:

8.5.1. Preparación de Patrones.



8.5.2. Tratamiento de las muestras de Orina.

Las muestras de orinas se obtuvieron de pacientes adultos aparentemente normales, elegidos al azar. Se recolectaron **61 muestras** de orina de individuos pertenecientes a una población de estudiantes y trabajadores del Municipio Libertador del Estado Mérida, en edades comprendidas entre 19 y 50 años. De éstas, se seleccionaron 45 muestras (31 mujeres y 14 hombres). De las 45 muestras seleccionadas, sólo se consideraron 33 muestras, dado que sólo 33 de ellas se encontraban dentro de los valores de referencia de ácido úrico en orina de 24 horas (250 a 850mg/24 h). Una vez seleccionadas las muestras, se procedió de la siguiente manera:



9.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1. Curva de calibración de ácido úrico.

Se prepararon patrones con las siguientes concentraciones 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 mg/dL. Para preparar dichos patrones se agregaron 40, 80, 120, 160 y 200 μ L de solución madre de ácido úrico de concentración 5 mg/dL a los patrones 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Luego, se tomaron 40 μ L de cada patrón preparado y se le agregó 1960 μ L de reactivo de trabajo, para posteriormente realizar sus lecturas a la longitud de onda de 520 nm. El tiempo para la lectura fue de 1 minuto.

La curva se realizó graficando las absorbancias obtenidas en función de cada concentración de solución patrón. Esta curva puede apreciarse en la figura 8.

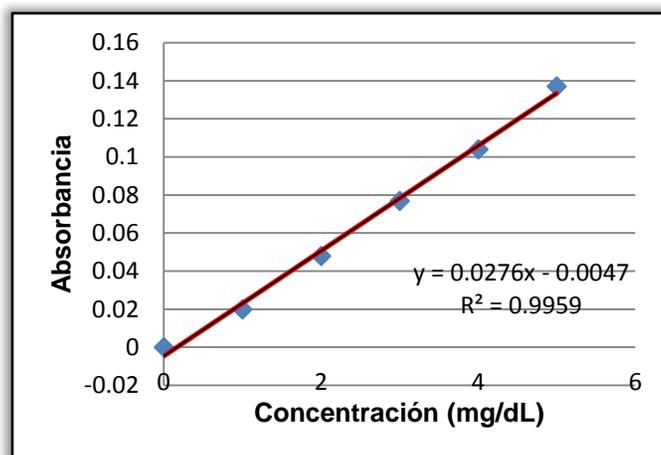


Figura 8: Curva de calibración de ácido úrico.

En la figura 8 se obtiene una regresión lineal de 0,995 lo que indica que el método utilizado comprueba la linealidad referida por la casa comercial (Laboratorios Heiga), siendo ésta desde 0,0 hasta 15,0 mg/dL, confirmándose que existe confiabilidad de los resultados obtenidos en el intervalo utilizado (0,0-5,0 mg/dL).

Al realizar las mediciones de las absorbancias de las muestras de orina de los pacientes, se observó que algunas de éstas se encontraron fuera del valor superior de concentración (5 mg/dL), razón por la cual se realizaron diluciones para que pudieran entrar en la curva de calibración.

9.2 DISCUSIÓN DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.

En todo trabajo experimental es importante evaluar la confiabilidad del método. La confiabilidad es la capacidad para determinar un analito proporcionando resultados idóneos (Boquet, E. y col., 1996). El método debe poseer exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad y linealidad. En la presente investigación estos parámetros no fueron analizados, debido a que el método empleado ha sido utilizado en diversos laboratorios clínicos mostrando el cumplimiento de dichos parámetros, y por ende resultados confiables. Sin embargo, fue realizada la curva de calibración para ácido úrico, obteniendo muy buena linealidad ($R=0,995$).

9.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

9.3.1 Orina 24 horas, orina matinal y orina vespertina:

A cada muestra de orina se le realizó la medición de volumen, pH y densidad. Los resultados de dichas mediciones se reportan en la tabla 2.

Tabla 2: Medición de Parámetros Físicos y Químicos de la Orina.

Paciente (Nº)	pH	Volumen total (mL) [Orina 24 horas]	Densidad (g/mL)
1	6,5	656	0,972
2	6,0	2165	0,974
3	7,0	1860	1,446
4	7,0	2450	1,053
5	6,0	840	0,824
6	6,5	870	0,970
7	6,0	1155	0,960
8	6,0	1705	0,890
9	6,0	1815	1,000
10	6,5	1550	0,810
11	6,0	1735	0,999
12	7,0	1515	0,990
13	7,0	755	1,342
14	6,5	770	0,757
15	6,0	1640	0,924
16	6,0	2200	1,391
17	6,0	1670	1,425
18	7,0	1685	0,972
19	7,0	1615	1,396
20	6,0	2815	0,966
21	6,0	3465	1,532
22	6,0	1155	0,944
23	6,0	1195	1,576
24	6,0	735	1,140
25	7,0	1535	0,982
26	6,5	1755	1,413
27	6,5	1695	1,380
28	6,5	1070	1,023
29	6,0	1860	0,969
30	6,0	2575	0,960
31	6,0	2810	1,299
32	7,0	1535	0,982
33	6,5	1755	1,413
34	6,5	845	0,977

continúa ...

35	6,5	1695	1,380
36	6,5	1070	1,023
37	6,5	1565	0,582
38	6,0	1860	0,969
39	6,0	2575	0,960
40	6,0	2810	1,299
41	6,5	1090	0,962
42	6,5	1515	0,984
43	6,0	2500	1,406
44	6,5	1435	1,355
45	6,5	2820	0,960

9.4. Muestreo.

En la tabla 3 se presentan los niveles de ácido úrico en las muestras de orina de 24 horas, matinal y vespertina. Se recolectaron **61 muestras** de orina (al azar) de individuos pertenecientes a una población de estudiantes y trabajadores del Municipio Libertador del Estado Mérida, en edades comprendidas entre 19 y 50 años. Se seleccionaron 45 muestras (31 mujeres y 14 hombres).

De las 45 muestras seleccionadas, sólo se consideraron 33 muestras, dado que sólo 33 de ellas se encontraban dentro de los valores de referencia de ácido úrico en orina de 24 horas (250 a 850mg/24 h); por lo tanto, la **fracción de muestreo** (f) será:

$$f = n/N = 33/45 = 0,7333$$

Es decir, se muestreó aproximadamente el **73%** de la población seleccionada (sólo la encontrada dentro de los valores de referencia); por lo tanto, el **factor de elevación** (E) será:

$$E = N/n = 45/33 = 1,3636$$

Lo que indica que cada muestra representa aproximadamente a 1,4 de las mismas. El muestreo que se realizó en este trabajo se le denomina **muestreo probabilístico no-aleatorio**, debido a que una vez realizado el muestreo, se procedió a seleccionar sólo aquellas muestras con valores de referencia de ácido úrico en orina de 24 horas.

Comparación de los Niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas, Orina Matinal y Orina Vespertina de pacientes elegidos al azar mediante Espectrofotometría UV-visible

Tabla 3: Niveles de ácido úrico en las muestras de orina de 24 horas, matinal y vespertina.

Paciente	1 Orina 24horas (mg)	2 Orina matinal (mg)	3 Orina vespertina (mg)	1/2	1/3
1	107,20 (Excluido)	1,30	1,66	82,46	64,58
2	324,72	16,27	13,05	19,96	24,88
3	683,27	54,54	39,53	12,53	17,28
4	483,78	53,18	60,45	9,10	8,00
5	846,15	164,76	163,50	5,26	5,30
6	593,88	135,91	47,68	4,37	12,46
7	325,14	79,10	81,14	4,11	4,01
8	847,49	71,70	28,98	11,96	29,59
9	83,95 (Excluido)	21,39	14,84	3,92	5,66
10	206,24 (Excluido)	15,24	33,10	13,53	6,23
11	265,37	51,04	59,90	4,42	3,76
12	504,91	211,99	131,62	2,38	3,84
13	306,57	19,39	77,80	15,81	3,94
14	726,70	29,03	190,90	25,03	3,81
15	253,57	97,53	Excluido -----	2,60	-----
16	313,00	20,15	11,36	15,53	27,55
17	302,31	31,11	17,78	9,72	17,00
18	666,67	47,98	61,38	13,89	10,86
19	716,91	80,97	62,98	8,85	11,38
20	251,03	89,39	95,45	2,81	2,63
21	893,14	130,00	48,61	6,87	18,37
22	881,46	119,77	42,69	7,36	20,65
23	1014,90(Excluido)	164,58	130,96	6,17	7,75
24	259,53	87,49	53,45	2,97	4,86
25	687,96	126,47	28,62	5,44	24,04
26	376,76	125,44	181,15	3,00	2,08
27	724,86	173,86	142,02	4,17	5,10
28	514,07	404,45	345,55	1,27	1,49
29	166,92 (Excluido)	14,87	6,19	11,22	26,97
30	483,66	245,67	163,28	1,97	2,96
31	281,79	8,62	17,28	32,69	16,31
32	188,57 (Excluido)	29,29	58,71	6,44	3,21
33	151,54 (Excluido)	44,54	19,88	3,40	7,62
34	330,30	Excluido -----	7,91	-----	41,76
35	391,25	33,45	Excluido -----	11,70	-----
36	384,37	213,60	7,56	1,80	50,84
37	1037,49(Excluido)	274,27	154,52	3,78	6,71
38	962,86 (Excluido)	238,98	288,39	4,03	3,34
39	565,18	213,31	223,69	2,65	2,53
40	328,72	23,86	25,23	13,78	13,03
41	327,95	22,06	15,91	14,87	20,61
42	1160,74(Excluido)	126,25	53,88	9,19	21,54
43	387,80	20,20	45,40	19,20	8,54
44	1169,29(Excluido)	205,91	Excluido -----	5,68	-----
45	1213,36(Excluido)	315,24	92,77	3,85	13,08

Las columnas 5 y 6, muestran la relación entre los niveles de ácido úrico en orina 24 horas y orina matinal (1/2) y orina 24 horas y orina vespertina (1/3).

Al buscar los factores para comparar los mg de ácido úrico en orina de 24 horas con los mg en orina matinal, encontramos los resultados que se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4: Comparación de los mg de ácido úrico en orina de 24 horas con los mg en orina matinal.

FACTOR	Nº DE MUESTRAS	% DE MUESTRAS
1-5	14	42,42
5-10	7	21,21
10-15	6	18,18
>15	6	18,18

Esto indica que en 21 de las muestras (63,64%) al multiplicar los mg de ácido úrico en orina matinal por un factor entre 1 y 10, se obtienen los mg de ácido úrico en orina de 24 horas, siempre y cuando éstas orinas contengan niveles de ácido úrico dentro de los valores de referencia. Para saber el comportamiento en otras muestras de orina, se deberían clasificar los pacientes según la patología clínica (hiperuricemia, normo-uricemia e hipo-uricemia). Esto lo decimos debido a que el tamaño de la población utilizada es muy bajo y hubo que fijar un parámetro (valores de referencia de ácido úrico en adultos) para poder tener una muestra representativa de la población (73,33%) (ver figura 9).

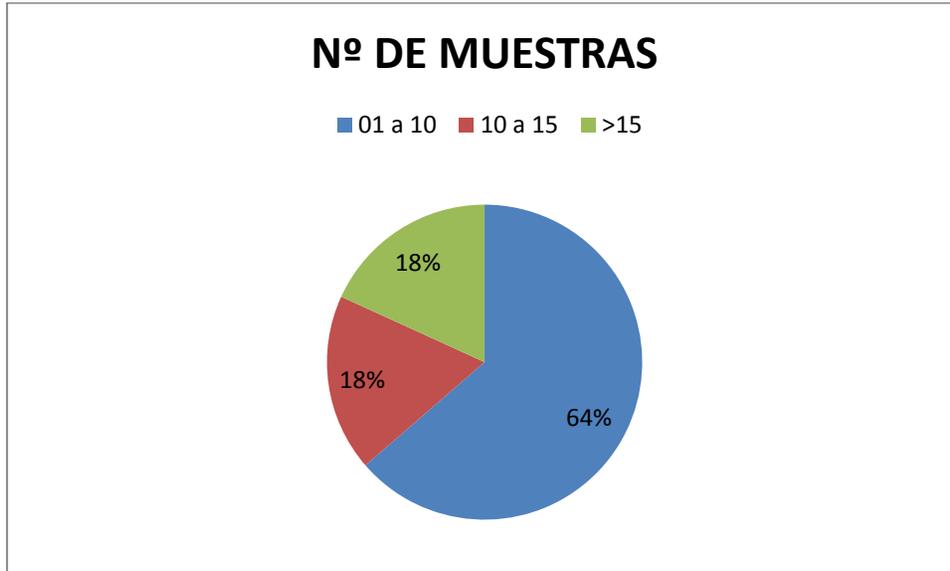


Figura 9: Distribución porcentual de los factores para comparar los mg de ácido úrico en orina de 24 horas y orina matinal.

Con respecto a las muestras de orina vespertina, encontramos los resultados presentados en la Tabla 5.

TABLA 5: Comparación de los mg de ácido úrico en orina de 24 horas con los mg en orina vespertina.

FACTOR	Nº DE MUESTRAS	% DE MUESTRAS
1-10	15	48,39
10-20	8	25,81
>20	8	25,81

Lo que indica que en 15 de las 31 muestras (48,39%), al multiplicar los mg de ácido úrico en orina vespertina por un factor entre 1 y 10, se obtienen los mg de ácido úrico en orina de 24 horas, siempre y cuando éstas orinas contengan niveles de ácido úrico dentro de los valores de referencia (250 a 850mg/24 h) (ver figura 10).

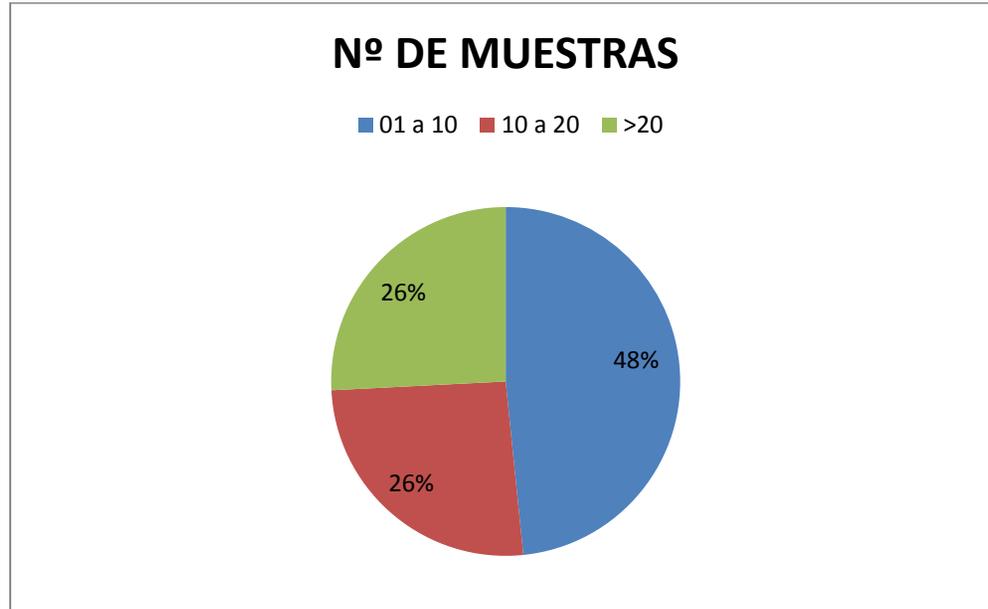


Figura 10: Distribución porcentual de los factores para comparar los mg de ácido úrico en orina de 24 horas y orina vespertina.

Se concluye que a partir de los resultados obtenidos, los niveles de ácido úrico en la orina de la mañana de pacientes aparentemente sanos, refleja adecuadamente la excreción urinaria de ácido úrico en orina de 24 horas. Esto es válido en un 63,64% de las muestras cuando se multiplican por un factor entre 1 y 10 los mg de ácido úrico en las muestras matinales. Queda por ver si esto también es válido para los estados patológicos.

9.5. Coeficiente de Correlación.

Es un cálculo estadístico que se utiliza para examinar la relación entre dos conjuntos de datos. El valor de este coeficiente habla acerca de la fuerza y la naturaleza de la relación. Los valores pueden variar desde 1,00 hasta -1,00. Si el valor es exactamente 1,00, significa que hay una "perfecta" relación positiva entre dos parámetros, mientras que un valor de -1,00 indica exactamente una "perfecta" relación negativa.

Cuando calculamos el coeficiente de correlación de las muestras de orina 24 horas con las muestras de orinas matinales, encontramos un valor de apenas 0,27498621 (EXCEL 2007), lo que indica que existe una **relación positiva** (aprox. 27,5%) entre ambos parámetros, siendo este coeficiente “algo mayor” que el obtenido para la relación orina 24 horas con las muestras de orina vespertinas (0,20246801).

9.6. Diagramas de Dispersión.

Es una representación gráfica del grado de relación entre dos variables cuantitativas. De acuerdo a las figuras 11 y 12, existe una **correlación débil** entre las variables mg de ácido úrico en orina de 24 horas con mg de ácido úrico en orina matinal u orina vespertina; esto se debe a que los puntos no están suficientemente agrupados, como para asegurar que existe la relación. El control de una de las variables no necesariamente conducirá al control de la otra. Ambos diagramas muestran una **correlación positiva**, dado que el valor de la variable "Y" (orina matinal o vespertina) tiende a aumentar cuando aumenta el valor de la variable "X" (orina de 24 horas). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el Coeficiente de Correlación, donde también se obtuvo una relación positiva entre ambas variables.

Así mismo, los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos por Krieg, M. y col., quienes reportaron en 1986 un coeficiente de correlación positivo (0,5) al comparar los niveles de ácido úrico en orina de 24 horas con orina de la mañana. En las figuras 11 y 12 se presentan las Gráficas de Dispersión para la relación de ácido úrico entre orina de 24 horas, orina matinal y orina vespertina respectivamente.

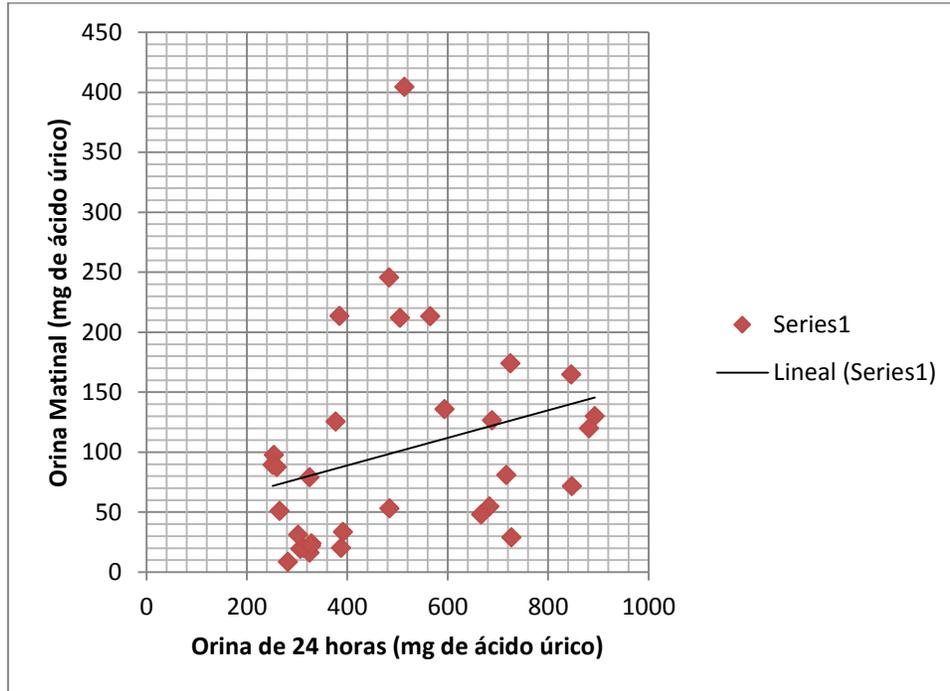


Figura 11: Gráfica de Dispersión para la relación de ácido úrico entre orina de 24 horas y orina matinal.

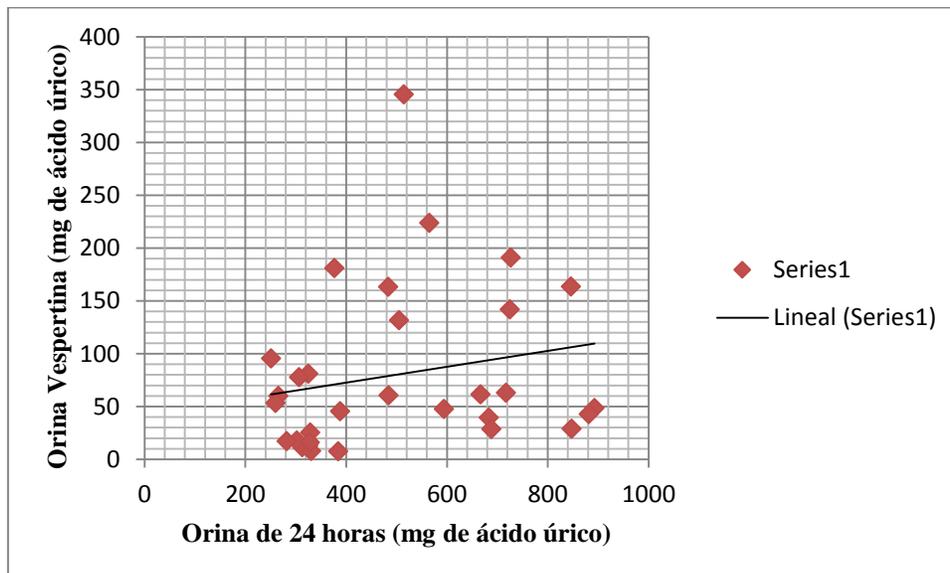


Figura 12: Gráfica de Dispersión para la relación de ácido úrico entre orina de 24 horas y orina vespertina.

CONCLUSIONES

A continuación y a manera de resumen se presentan las conclusiones principales obtenidas en esta tesis:

1. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que se ha cumplido en buena parte los objetivos propuestos. La ecuación que podemos plantear indica una relación directamente proporcional entre los valores de ácido úrico en orina de 24 horas y los valores obtenidos en orinas de la mañana y orinas vespertinas; esta relación tiene como punto de partida, que las muestras a utilizar deben contener niveles de referencia de ácido úrico/24 horas. La ecuación sería: $X = n.Y$, siendo X los miligramos de ácido úrico en orina de 24 horas, Y los miligramos de ácido úrico en orina matinal o vespertina y n el factor que indica la proporcionalidad entre ambas variables. Según esto, se cumple que: $1 \leq n \leq 10$. Es importante mencionar que en ambos casos la correlación fue bastante débil y positiva, lo que indica que debemos mejorar los valores de correlación obtenidos.
2. En cuanto a lo anterior, podemos decir que en primer lugar debemos aumentar el número de muestras a ser analizadas. Así mismo, pensamos en que debe darse información a través de las Juntas Comunales con respecto a la toma de muestras, ya que pensamos que éste es uno de los factores que afectó en gran medida los resultados obtenidos. Esto conduciría a un coeficiente de correlación más cercano a uno.
3. Si bien es cierto que la metodología empleada para la determinación de ácido úrico en orina ha sido utilizada de manera rutinaria en el análisis clínico, al realizar las curvas de calibración pudimos comprobar la linealidad del método ya que se obtuvo una regresión lineal de 0,995, indicando de esta manera confiabilidad en los resultados obtenidos, en el intervalo de concentraciones utilizado (0,0-5,0 mg/dL).
4. La técnica UV-visible continúa siendo muy valiosa para la detección y cuantificación de los niveles de metabolitos en muestras de orina. Podemos decir que la detección y cuantificación de ácido úrico se realizó de manera sencilla y económica, lo que le da más importancia a la metodología utilizada.

RECOMENDACIONES

En todo trabajo de investigación es importante sugerir algunas recomendaciones que ayudarían a mejorar los resultados obtenidos, entre las que podemos mencionar:

1. Realizar muestreos más grandes; con una muestra más grande aumentaría la confiabilidad del método.
2. Sería interesante, una vez mejorados los resultados obtenidos en esta tesis, estudiar la relación existente entre los niveles de ácido úrico entre las 3 muestras de orina, clasificando las muestras de orina de 24 horas de acuerdo a las patologías existentes. Así mismo sería interesante separar los pacientes de acuerdo a: hábitos alimenticios, estilo de vida, antecedentes familiares, entre otros.
3. Implementar este tipo de estudios para realizar comparaciones entre distintos metabolitos en las tres muestras de orina; entre ellos podemos mencionar: sodio, potasio, cloruro, creatinina, urea, glucosa, calcio y proteína total.
4. Como recomendación general, podríamos decir que es de suma importancia dar información sobre la toma de muestras de orina, de la forma más sencilla posible. En este trabajo se pudieron observar hechos muy curiosos con respecto a la toma de muestras. Aunque parezca que el paciente entiende las indicaciones, es muy importante asegurarse de que así sea. Se podría pensar en dar charlas a través de las Juntas Comunales y el Servicio Comunitario, con lo que seguramente se mejorarían los resultados de la investigación, ya que pensamos que éste es uno de los factores que afectó en gran parte los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

1. Barbany, M., Foz, M. Obesity: concept, classification and diagnosis. An. Sist.Sanit.Navar.2002; 25(1):7-16.
2. Bedis, A.; Topbas, M.; Tanyeri, F.; Alvur, M.; Arik, N. Leptin might be a regulator of serum acid concentration in humans. Jpn. Heart J. 2003; 44(4): 527-236.
3. Boquet, E.; Castillo, M.; Cáceres, A.; Dybkaer, R.; Escutia, V.; Franzini, C.; Jeffers, D.; Mazziotta, D.; McClactehy, K.; McQueen, M.; Rej, R.; Ruiz, A.; Ruiz, G.; Sierra, R.; Terres, A.; Tiburcio, H.; Wilde, C.1996. Mejoría Continua de la Calidad .Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina. En: Velásquez, Y.; Rodríguez, N.; Mujica, X.; Santiago, G.; Vivas, S.; Labrador, C.; González, E.; Lorente, A. Evaluación de un método enzimático para la determinación de triglicéridos. Revista de la facultad de Farmacia. 2006; 48 (2): 3-6.
4. Campos, M.; Oliart, R.; Méndez, G.; Angulo, O. Síndrome Metabólico y su correlación con los niveles séricos de urea, creatinina y ácido úrico en adultos de Veracruz. Rev. Biomed. 2010; 21 (2):67-75.
5. Catlab onlne. El portal de laboratorios analíticos Lab-on-a-chip. Argentina. 2012.
6. Grabowska I.; Dybko, A. Uric acid determination in a miniaturizator system with dual optical detection. Sensors and Actuators B. 2008; 130(1): 508-513.
7. Graff, L. Análisis de Orina. Atlas color. 2ª ed. Buenos Aires-Argentina. Editorial Médica Panamericana, S.A. 2007. p. 19, 22, 34.
8. González, J.; Ferreiro, A.; Rodríguez, M.; Sánchez, A. Bioquímica Clínica. 1ª ed. Madrid-España. Editorial McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A. 1998. p. 493- 494.
9. Jaimes, J.; Díaz L.; Chagoya, V. Artropatía por ácido úrico en el paciente pediátrico: Presentación de casos y revisión de literatura. Rev. Mex. Reumat. 2003; 18(2): 111-122. En: Ramos, V. y Terán N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
10. Krieg, M.; Gunsser, K.; Steinhagen, E.; Becker, H. Comparative quantitative clínico-chemical analysis of the characteristics of 24-hour urine and morning urine. 1986 Nov; 24(11):863-9.
11. Laboratorio HEIGA, C. A-Método Enzimático Colorimétrico 210-A.

12. Lecocq, K.; McPhaul, J. Effect of starvation high fat diets and ketone infusions on uric acid ballance. *Metabolism* 1965; 14:186-97. En: Maduro, I.; Albuquerque, F.; Barbosa, C.; Martins, R.; Marchini, J. Hiperuricemia em obesas sob dieta altamente retritiva. *Arq. Bras.Endocrinol.Metab.*2003; 47(3):266-270.
13. Macchi, C.; Molino, R.; Polcado, P.; Guarducci, L.; Lauretani, F.; Cecchi, F.; Bandinelli, S.; Guralnik, M.; Ferrucci, L.; Higher circulating levels of uric acid are prospectively associated with better muscle function in older persons. *Mechanisms of ageing and development.* 2008; 129 (9): 522-527.
14. Medina, M.; Sánchez, G.; Salha, J.; Medina, C.; Gala E. Uricosuria neonatal. Su relación con la uricemia materna. *Acta Pediatr. Mex.* 2007; 28 (6): 248-252.
15. Nishida, Y. Relation between creatinine and uric acid excretion. *Ann Rheum Dis.* 2001; 51(1): 101-102.
16. Ramos, V.; Terán, N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela). 109 p.
17. Rosa, F.; Leal, E. Ácido úrico: componente del riesgo cardiovascular en el Síndrome Metabólico. *Academia Biomédica Digital.* Abril - Junio 2006.
18. Rosales, R.,. Ácido Úrico. Universidad de Los Andes Dirección General de Cultura y Extensión Universitaria. Centro Ambulatorio Médico-odontológico Universitario. Programa Educación para la Salud. 2004.
19. Ruíz, A.; Sánchez, Á.; Luque, E.; García, D.; Romero, A.; Carmona, C. Valores de Ácido Úrico en sangre en pacientes con trastornos respiratorios del sueño. *Arch. Bronconeumol.* 2006; 42(10):492-500.
20. Skoog, D.; Holler, J.; Nieman, T. *Principios de Análisis Instrumental.* 5ª ed. Madrid-España. Editorial McGraw-Hill. 2001. p.353.
21. Torres, R.; García, J. Hipertensión e Hiperuricemia [monografía en internet]. Ediciones Doyma, S.L. Madrid: Sociedad Española de Hipertensión- Liga Española para la lucha contra la hipertensión arterial; 2002 [15 de agosto de 2008].
22. Villaran, R.; Quiroz, J.; Adrianzen, E.; Pérez, L.; Saldías, J.; Mendoza, J.; Monge, C. Niveles de ácido úrico en la altura y a nivel del mar. *Rev. Med. Hered.* 2000; 11(1): 7-14.
23. Valenzuela, M. Hiperuricemia: Distintos enfoques. *Rev. Chil. Reumatol.* 2001; 17(4):184-187.

24. Yamashita, S.; Matsuzawa, Y.; Tokunaga, K.; Fujioka, S.; Tarui, S. Studies on the impaired metabolism of uric acid in obese subjects: marked reduction of renal urate excretion and its improvement by a low-calorie diet. *Int J Obes* 1986; 10:255-64. En: Maduro, I.; Albuquerque, F.; Barbosa, C.; Martins, R.; Marchini, J. Hiperuricemia em obesas sob dieta altamente retritiva. *Arq. Bras.Endocrinol.Metab.*2003; 47(3): 266-270.
25. Zhao, S.; Wang, J.; Ye, F.; Liu, Y. Determination of uric acid in human urine and serum by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*. 2008; 378(2): 127-131. En: Ramos, V. y Terán N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
26. www.fundibeq.org/opencms/export/sites/default/pwf
27. www.gaptalavera.sescam.jccm.es/.../MUESTRA_ORINA_DE_24_HORAS.pdf.
28. <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/nitro.pdf>. En: Ramos, V. y Terán N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
29. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003616.htm>. En: Ramos, V. y Terán N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
30. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1175&loc.z>En: Ramos, V. y Terán N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
31. <http://www.urologia.tv/icua/es/diagnostics.aspx?cod=9>.
32. ww.ulpgc.es/descargadirecta.php?codigo_archivo=6650.
33. http://es.wikipedia.org/wiki/Espectro_visible. En: Ramos, V. y Terán N (2011). Determinación de Ácido Úrico y Creatinina en sangre en pacientes obesos por Espectroscopía UV-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).



ANEXO 1

CONSENTIMIENTO

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

“COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDO ÚRICO EN MUESTRAS DE ORINA DE 24 HORAS, ORINA MATINAL Y ORINA VESPERTINA EN PACIENTES ELEGIDOS AL AZAR, MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE”

AUTORIZACIÓN

Nombre y Apellido _____

Edad _____ Sexo M () F () Fecha de Nacimiento _____

Dirección _____

_____ Teléfono _____

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo la COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDO ÚRICO EN MUESTRAS DE ORINA DE 24 HORAS, ORINA MATINAL Y ORINA VESPERTINA EN PACIENTES ELEGIDOS AL AZAR, MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE y determinar la relación que existe entre dichas muestras.

Para el desarrollo del mismo se obtendrán 3 muestras de orina de cada paciente mediante el sistema de recolección por recipientes, que serán recolectadas por el mismo paciente y entregadas en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se garantiza la absoluta confiabilidad de los resultados obtenidos. Los encargados del desarrollo de esta investigación (Profesores y tesistas que laboran en el mismo laboratorio), no reciben beneficios económicos por la realización de este trabajo, salvo los beneficios curriculares que su publicación puede acarrear y el beneficio social para la comunidad.

Quien suscribe, señala que ha leído la información y ha tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre el particular, todas han sido contestadas, y por tanto, da su consentimiento para que se realice la investigación, y recibe una copia de este consentimiento informado.

Mérida, a los _____ días del mes _____ de 2013

Firma del paciente

Lic. En Bioanálisis



ANEXO 2

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

INDICACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE ORINA

NORMAS GENERALES

- Identificar el recipiente con el nombre, la fecha, la hora de determinación.
- Entregar la muestra al laboratorio tan pronto como sea posible después de terminar de recogerla.
- La etiqueta debe contener la identificación del paciente con su nombre y cédula de identidad, así como la hora de la toma de muestra.
- Los hombres y los niños deben limpiarse la cabeza del pene.
- Las mujeres y las niñas deben lavar el área entre los labios de la vagina con agua jabonosa y enjuagarla bien.
- Identificación previa del nombre, cédula de identidad y hora en que fue tomada la muestra.

Orina de 24 horas.

- **El día 1:**
 - La persona debe orinar en la taza de baño al levantarse en la mañana (primer chorro). El resto de orina debe tomarlo en el recipiente para la **orina matinal**.
 - Luego, recoger toda la orina en un recipiente especial durante las siguientes 24 horas. Excepto la muestra de orina entre las 2 y 3 pm, la cual debe tomarla en el recipiente para la **orina vespertina**.
 - Tapar el recipiente y guardarlo en el refrigerador o en un sitio fresco durante el período de recolección.



Comparación de los Niveles de Ácido Úrico en Muestras de Orina de 24 horas. Orina Matinal y Orina Vespertina de pacientes elegidos al azar mediante Espectrofotometría UV-visible

- **El día 2:**

- Orinar en el recipiente en la mañana al levantarse.

Orina Matinal:

- Se debe dejar caer en el inodoro una pequeña cantidad de orina antes de tomar la muestra (esto elimina de la uretra elementos contaminantes).
- Luego, se recoge de 1 a 3 mL de orina en un recipiente limpio.
- Éste se entrega al laboratorio.

Orina Vespertina:

- Orina tomada en cualquier hora del día (preferiblemente entre las 2pm y 3 pm).
- Recolectar en un recipiente limpio y estéril.
- No es necesario eliminar una pequeña cantidad de orina.
- Recolectar de 1 a 3 mL.