

Estudio comparativo para determinar ácido hipúrico (HA) en orina mediante los métodos colorimétricos de Ogata y de Astudillo

Mayor M.C. M. en M.F. Nayeli Isabel **Trejo-Bahena**,* Dr. en M. Luis Humberto **Pérez-Astudillo**,**** M. en C. Dairo Jesús **Orjuela-Henry**,*** Tte. Q.B. Andrés **Balderas-Cornelio**,*** Cap. 2/o. Q.B. Fabiola **Salinas-Cano**,**** Q.C. Claudia María **Martínez-Martínez**,*** Mayor M.C. Dr. en C. Dolores Javier **Sánchez-González*******

Escuela Médico Militar/Procuraduría General de Justicia Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. El uso de inhalantes como sustancias de abuso es un problema de salud pública. Los solventes industriales de mayor uso en México contienen benceno que se metaboliza a ácido benzoico. El ácido hipúrico (HA) es biosintetizado a partir de glicina, ácido benzoico y acetilcoenzima A (CoA). El HA se excreta por la orina y su determinación sirve para estimar la cantidad promedio de tolueno inhalado como droga o por inhalación exposicional. Los valores normales de HA van desde 10 µg a 650 µg/mL, y en inhaladores de tolueno llega hasta 3,000 µg/mL.

Planteamiento del problema. ¿El método colorimétrico de Astudillo para determinación de HA en orina será mejor que el método de Ogata?

Objetivo general. Comparar los métodos colorimétricos de Ogata y de Astudillo para determinar ácido hipúrico (HA) en orina.

Metodología. Este estudio experimental se realizó en el Laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar y en el Laboratorio Científico de Investigaciones de la Procuraduría General de Justicia Militar utilizando un derivado del ácido sulfónico (AS) y piridina reactiva.

Resultados. El HA es el único componente de la orina que reacciona con el método colorimétrico de Astudillo a 572 nm de longitud de onda determinado espectrofotométricamente. Se observó que la orina tiene una absorbancia de 0.95786 y la diluida 1:5 de 0.18709 a 422 nm, lo cual hace poco específico al método establecido como estándar de oro (método de Ogata) que reacciona a esta longitud de onda.

Conclusión: El método desarrollado por el Dr. Astudillo es mejor que el de Ogata.

Palabras clave: ácido hipúrico, orina.

Comparative study to determine hippuric acid (HA) in urine by Ogata and Astudillo colorimetric methods

SUMMARY

Introduction. The use of inhaling as substances of abuse is a public health problem. The industrial solvents of more use in Mexico contain benzene that is metabolized to benzoic acid. The hippuric acid (HA) is formed from benzoic acid and CoA. It is excreted by the urine and their determination is good to estimate the quantity toluene average inhaled as drug or for work inhalation. The normal values of HA go from 10 µ to 650 µg/mL, and in toluene inhalers it arrives up to 3,000 µg/mL.

Position of the problem. Astudillo method will be better for HA determination in urine than Ogata method?

General objective. To compare the methods of Ogata and Astudillo to determine hippuric acid (HA) in urine.

Methodology. This experimental study was carried out in the Histology Laboratory of the Medicine Military School and in the scientific laboratory of investigations of the General Attorney's office of Military Justice using a derived of the sulfonic acid (SA) and pyridine.

Results. HA it is the only component of the urine that reacts with the method from Astudillo to 572 nm of wave longitude determined spectrophotometrically. It was observed that the urine has an absorbance of 0.95786 and the one diluted 1:5 from 0.18709 to 422 nm, that which recently specific to the established method as gold standard (Ogata method) that reacts to this wave longitude.

Conclusion. The method developed by Dr. Astudillo is better than that of Ogata.

Key words: Hippuric acid, urine.

*Sección de Medicina Legal, Hospital Central Militar. **Laboratorio de análisis clínicos BIOTEST, Ciudad Sahagún Hidalgo, México. ***Subsección de Biología Celular y Tisular Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México. ****Laboratorio Científico de Investigaciones de la Procuraduría General de Justicia Militar. *****Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México.

Correspondencia:

Dr. Dolores Javier Sánchez-González.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI- CONACyT) y Jefe de la Subsección de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Escuela Médico Militar. Cerrada de Palomas y Batalla de Celaya 5°. Piso Histología. Col. Lomas de San Isidro. C.P. 11200. Del. Miguel Hidalgo. México, D.F. Tel.: 5540-7728 Ext. 175; Fax 5520-2121. Correo electrónico: javiersglez@yahoo.com

Recibido: Septiembre 25, 2007.

Aceptado: Noviembre 18, 2007.

Introducción

En México el uso de inhalantes como sustancias de abuso se ha convertido en un problema de salud pública que afecta a niños y jóvenes. El empleo de solventes industriales en el ámbito laboral afecta a miles de trabajadores de la industria petrolera, química, imprentas, gasolineras, pintores, carpinteros, zapateros, etc. El término inhalantes se refiere a un grupo de sustancias psicoactivas que se definen más por su modo de administración que por su mecanismo de acción o farmacología, donde se incluye a un grupo de sustancias volátiles (con punto de ebullición bajo por lo que “hierven” a temperatura ambiente) que se utilizan para alterar el estado mental. En esta definición, se excluyen otras sustancias que también se inhalan como el tabaco, marihuana, opio o cocaína.¹⁻³

Uno de los grandes problemas de los inhalantes es que se encuentran en numerosos productos para el hogar, la escuela, la industria, las papelerías, las tlapalerías, etc., y que se pueden adquirir fácilmente de manera legal a bajo costo. Como sustancias de abuso, su empleo cambia de acuerdo con el grupo social que las utiliza; ya sea para combatir el aburrimiento en las clases medias-altas, o para quitar el hambre, entre las clases bajas.³ Los inhalantes tienen diversos efectos y grados de toxicidad: algunos son hepatotóxicos como los clorohidrocarburos, otros son nefrotóxicos como el tolueno, también existen neurotóxicos del sistema nervioso periférico como el hexano, hematotóxicos como el benceno. De manera general, todos son neurotóxicos debido a sus características fisicoquímicas, particularmente la alta solubilidad en grasas y pequeño tamaño. Los inhalantes después de ser inhalados se distribuyen ampliamente en todo el cuerpo, y atraviesan las membranas celulares donde actúan con varios tipos de receptores. El efecto agudo de la intoxicación con solventes es semejante al ocasionado por el alcohol: se presenta una excitación inicial seguida por desinhibición, con una sensación de euforia y agitación. A dosis altas se puede observar ataxia, hiporreflexia, mareo y desorientación. En casos de intoxicación severa se producen arritmias, depresión de médula ósea, degeneración cerebral, hepática y de nervios periféricos, debilidad muscular, alteraciones del lenguaje, nistagmus, delirio y ocasionalmente alucinaciones con alteración de la conducta. Transcurrido el efecto, queda una resaca con cefalea, letargo, incoordinación muscular y desorientación. Las defunciones por el abuso de inhalantes ocurren por arritmias cardíacas o por obstrucción de las vías aéreas. Se ha observado que el abuso de hidrocarburos volátiles está implicado en las muertes súbitas y que habitualmente se obtienen autopsias negativas a otras causas en adolescentes y jóvenes.⁴⁻⁶

Los efectos asociados a la intoxicación aguda severa o a la crónica leve con solventes orgánicos son reversibles, pero se tornan irreversibles en casos de intoxicación severa por exposición a largos periodos, donde la concentración de estas sustancias en sangre se eleva varios cientos de veces comparadas con las existentes en un medio laboral. Algu-

nas de las manifestaciones del daño neurológico pueden ser parcialmente reversibles cuando se suspende la inhalación.^{7,8}

Los solventes industriales de mayor uso en México son: cementos (tricloroetileno y tetracloroetileno), pegamentos (tolueno, acetato de etilo y acetona), removedores de barniz o pintura (acetona, tolueno, benceno, cloruro de metileno) y thinner. El thinner es una mezcla variada de solventes tóxicos. El thinner de México contiene cerca de 20 sustancias, predominando el tolueno con 79.48%, mientras que el thinner de USA contiene sólo nueve elementos con mayor concentración de metilpropilcetona 21.44%. En México el tiempo de inhalación de thinner es de tres a 15 años entre las edades de 18 a 38 años con promedio de 26 años y una proporción hombre/mujer de 10:1.^{1,2}

Los solventes son un grupo heterogéneo de hidrocarburos volátiles derivados del petróleo, cuyo punto de ebullición es bajo por lo que se evaporan al entrar en contacto con el aire. Su importancia y patrón de uso determinan su clasificación en: solventes activos, consolventes, solventes latentes y diluyentes.⁴

Los solventes activos tienen como función disolver sustancias no hidrosolubles, para su uso se requiere determinada viscosidad, así como determinar la velocidad a la que el solvente se evapora al aplicarse en el producto que interviene (acetona, acetato de etilo, acetato de butilo, thinner, etc.).

Los consolventes y los solventes latentes sirven para realzar la capacidad de las resinas, aunque al combinarse con los solventes activos, actúan como catalizadores del secado (metanol, n-butanol, etc.). Los diluyentes son elementos químicos que se utilizan únicamente porque bajan los costos del producto que se esté aplicando, ya que en la mayoría de los casos no desarrollan ningún efecto solvente por sí mismos (heptano, benceno, tolueno, xileno, etc.). La vía de absorción natural de los solventes industriales es pulmonar, los cementos y pegamentos suelen verse en bolsas de plástico, mientras que los solventes líquidos se impregnan en trapos que se aplican directamente a las fosas nasales para ser inhalados. Al entrar al torrente sanguíneo estas sustancias se distribuyen rápidamente en el cerebro e hígado. Debido a la desigualdad en las concentraciones de los hidrocarburos volátiles presentes en los diversos productos que los contienen, resulta difícil cuantificar las dosis, habitualmente se mide el tiempo de inhalación. El consumo regular se calcula en media hora de aspiraciones continuas. Tres horas consecutivas ocasionan riesgo de sofocación que puede ser letal. El efecto de cualquier solvente comienza unos minutos después de haber sido inhalado y finaliza aproximadamente una hora después de la última inhalación. El uso reiterado de varios tipos de solventes genera tolerancia. Por ejemplo: después de un año de uso continuo un consumidor de cemento plástico necesita ocho veces la cantidad con la que inició para experimentar los mismos efectos. Generen o no dependencia física, los solventes industriales causan dependencia psicológica junto con una amplia variedad de efectos tóxicos y neurodegenerativos.²⁻⁴

El tolueno, metilbenceno o toluol (*Figura 1*) como se le conoce comercialmente, es un hidrocarburo aromático cuya exposición afecta al sistema nervioso,⁵ es uno de los solventes más frecuentemente utilizados. Se emplea como adelgazador de pintura o lacas, como agente limpiador y secador en la industria del hule y de la madera, así como en la industria química y del petróleo. Es uno de los principales componentes de lacas, pinturas, pegamentos, adhesivos, tintas y líquidos limpiadores. De todos los solventes, el tolueno tiene el mayor potencial de abuso.⁹ El tolueno es un contaminante universal por su presencia en las mezclas de los disolventes orgánicos como los adelgazadores o “*thinners*” y en las gasolinas comerciales. La absorción del tolueno se realiza principalmente a través de la vía respiratoria. Diferentes autores señalan que se absorbe entre 40 y 60% del tolueno inhalado.¹⁰⁻¹² También se absorbe por vía cutánea cuando la piel entra en contacto con la forma líquida del tolueno. De acuerdo a Nise el promedio de la vida media biológica del tolueno en el tejido adiposo es de 79 horas, estos informes contrastan con otros en el sentido de que la vida media biológica del tolueno es corta, es decir, de 1.5 hrs. (5 - 7).

El ácido hipúrico (HA) [$C_6H_5CONHCH_2COOH$], también conocido como N-benzoylglicina (*Figura 2*) es biosintetizado a partir de glicina, ácido benzoico y acetilcoenzima A (CoA) por enzimas localizadas en la matriz mitocondrial de hepatocitos y células renales. Esta vía metabólica provee un flujo alternativo de nitrógeno de precursores habituales de la urea (amonio, alanina y glutamato) a la glicina y se utiliza en la detoxificación de compuestos aromáticos como el to-

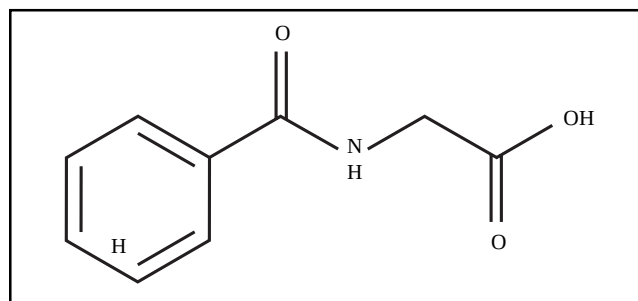


Figura 2. Composición química del ácido hipúrico (HA) ($C_9H_9NO_3$). El HA, benzoyl-glicocol, ácido benzoyl-amidoacético o N-benzoylglicina. Es un ácido orgánico que se excreta por la orina. Cuando el ácido benzoico y el tolueno se mezclan, se convierten en HA por reacción con el aminoácido glicina. También se puede formar a partir del calentamiento del anhídrido benzoico con glicina, y por el calentamiento de la benzamida con el ácido monocloroacético. El ácido nitroso lo convierte a ácido benzoglicólico, $C_6H_5C(=O)OCH_2CO_2H$.

lueno.¹²⁻¹⁴ Por esta razón, el HA es un componente fisiológico de la orina humana que se filtra en los glomérulos y se excreta por las células tubulares proximales.¹³ La excreción de HA también se modifica en la insuficiencia renal y en personas expuestas a inhalantes que contienen tolueno, su determinación sirve para estimar la cantidad promedio de tolueno inhalado; en su uso como droga, por inhalación en áreas de trabajo o por la ingestión de benzoato de sodio contenido en algunos alimentos y medicamentos.¹⁵⁻¹⁸ Los valores de HA van desde 10 μg a 650 $\mu g/mL$, y se han documentado que en inhaladores de tolueno aumentan hasta 2,300 μg o 3000 $\mu g/mL$.^{15,19}

En 1963, Charles J. Umberger y Frank F. Fiorese introdujeron un método colorimétrico para detectar HA basado en la reacción colorimétrica de éste ácido disuelto en piridina (Pir) y bencenosulfonilcloruro (BSC). Para la aplicación de su método y determinar HA en orina, este debe ser extraído de la orina mediante una extensiva purificación, además de que el ácido salicílico y otros aminoácidos pueden causar interferencia con éste método. El HA produce un color de anaranjado a rojo determinada por la concentración. La detección del color se obtiene desde 0.3 μg de HA en 0.5 mL de la mezcla de reacción. La curva de absorción máxima para la solución roja disuelta en cloroformo se presenta a 420 nm a los tres minutos, pero disminuye gradualmente virando de rojo a naranja con una absorbancia máxima de 380 nm a los 20 minutos.²⁰ En 1967 Kehl describió un método para la determinación del HA en orina, basándose en la formación de un derivado de bromina, el cual es poco sensible.²¹

En 1972 Katsumano Tomokuni y Masana Ogata encontraron que el HA disuelto en una solución de agua y piridina en proporción 1:1 produce un color rojo anaranjado cuando se le adiciona BSC a temperatura ambiente (estándar de oro). La absorción espectral del color muestra sólo una máxima de 410 nm y es totalmente diferente al color dado por el método de Umberger y Fiorese. Con esta reacción colorimétrica, ellos pudieron desarrollar un método directo y sensi-

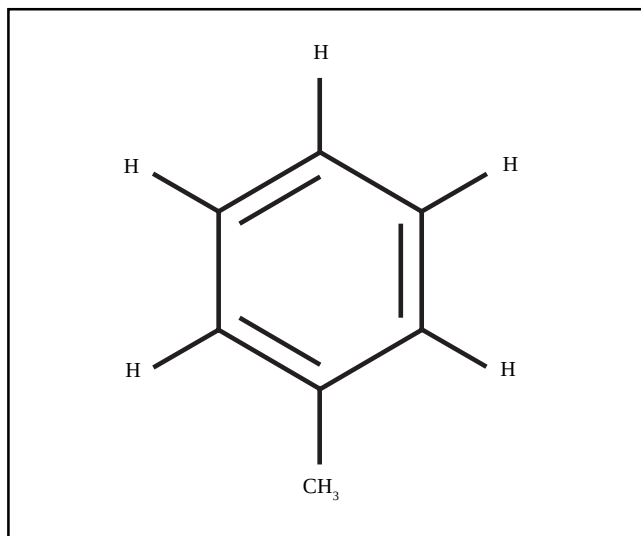


Figura 1. Composición química del tolueno. El tolueno o metilbenceno ($C_6H_5CH_3$), se utiliza para obtener derivados del benceno como ácido benzoico, fenol, caprolactama, sacarina, TNT, detergentes medicamentosos, colorantes y perfumes, entre otros. Su nombre deriva del bálsamo del árbol *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Colombia o bálsamo Tolu) de donde se obtuvo por primera vez en 1844 mediante destilación seca. El tolueno es un líquido incoloro con un olor a solvente de pintura. Es miscible en la mayoría de disolventes orgánicos apolares y poco miscible en agua (0.52 g/L).

ble de determinación de HA en orina, que sigue la ley de Beer-Lambert (relación entre la intensidad de luz que atraviesa una disolución y la concentración de las especies disueltas).^{19,22-24}

La reacción calorimétrica desarrollada por Ogata para detección y estimación de niveles de concentración de HA tiene gran confiabilidad y sensibilidad ya que se encuentra registrado con el número 8,300 en el manual de métodos analíticos (NIOSH, USA), sin embargo, el método desarrollado por el Dr. Luis Humberto Pérez Astudillo es más sensible, específico y rápido, como se demuestra en esta investigación.²⁴

La cuantificación de HA en orina se realiza actualmente como marcador diagnóstico de exposición a tolueno.²⁵ La determinación urinaria de HA se realiza también mediante cromatografía de líquidos (HPLC) y de gases,^{26,27} por resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia,^{28,29} electroforesis capilar,^{24,27} isotacoforesis²⁸ y por cromatografía electrocinética micelar capilar (MEKC).²⁹⁻³¹ El objetivo de esta investigación fue comparar los métodos colorimétricos de Ogata y de Astudillo para determinar ácido hipúrico (HA) en orina.

Material y métodos

El presente estudio fue de tipo experimental y se llevó a cabo en conjunto en el Laboratorio Científico de Investigaciones de la Procuraduría General de Justicia Militar y en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: una solución madre de ácido hipúrico (HA), la cual se obtuvo disolviendo 1,000 mg de HA en 1 mL de agua destilada, derivado de ácido sulfónico (AS), piridina reactiva (Pir) al 50%, timol, etanol y cloroformo.

Para realizar el método de Ogata se tomó la muestra de orina obtenida se diluyó 1:4 con agua destilada, se mezcló 0.5 mL de esta orina con 0.5 mL de piridina, posteriormente se le agregó 0.2 mL de bencenosulfonilcloruro y se mezcló por vibración por 5 segundos, se dejó reposar la solución por 30 minutos a una temperatura de 20-30 grados centígrados, posteriormente se le agregó 5 mL de etanol y se mezcló nuevamente por vibración, posteriormente se centrifugó de 1,500-2,000 revoluciones por minuto por 5 minutos para reducir la turbidez, se removió el sobrenadante con una pipeta y se colocó en una cubeta de 1 cm, se observó la coloración anaranjada y enseguida se leyó la absorbancia a 410 nm.

Para realizar el método de Astudillo se procedió a realizar la calibración y control de calidad de los diferentes compuestos utilizados en este estudio; cada uno por separado. Se realizó la curva de calibración de ácido hipúrico sobre los rangos de 15 µg a 150 µg/mL para estandarizar el espectrofotómetro utilizado. Se emplearon valores fijos de 10 concentraciones a 572 nm de longitud de onda y se tomaron las absorbancias de estas concentraciones. Se preparó la solución madre de HA con 0.1 g en 100 mL de agua destilada,

misma que fue empleada en rangos desde 15 µg a 210 µg/mL, AS 1 g en 20 mL de acetona, 50 mL de piridina mas 50 mL de agua destilada obteniendo piridina al 50%. En resumen para la realización de este estudio se utilizaron los siguientes volúmenes: HA (en concentraciones de 15 a 210 µg) + H₂O destilada en un total de 500 µL, AS 200 µL, Pir 500 µL.

Resultados

La absorción espectral del color obtenido en este nuevo método fue realizada con un espectrofotómetro de barrido con lectura a 572 nm y anchura de banda de 1 nm.

Se comparó el espectro de absorción del nuevo método con el estándar de oro y también se determinaron los espectros de los componentes purificados de la orina como se muestra en la figura 3. A 410 nm, el método de Ogata tiene la absorbancia mas alta, pero a 572 nm, solo en nuestro método se detecta una absorbancia significativa, lo que permite discriminar todos los componentes de la orina normal.

Se realizó un análisis en el espectrofotómetro de todos los compuestos utilizados en esta investigación cada uno por separado, se observó que cada uno de los mismos tiene una absorbancia muy baja a 572 nm de longitud de onda como se observa en la figura 4, Los ensayos se realizaron por quintuplicado. Se observó que la orina completa al 100% tiene una absorbancia de aproximadamente 0.95786 y la diluida 1:5 de 0.18709 a 422 nm. Los demás compuestos tienen absorbancias muy bajas a esta longitud de onda.

La estabilidad en la coloración del nuevo método se obtiene desde los 0.5 segundos hasta 120 minutos en las diferentes concentraciones. El HA es el único componente de la orina que reacciona en el nuevo método. Demostrado en la curva de absorción de HA en orina provenien-



Figura 3. Reacción colorimétrica de los métodos: **A)** Ogata 1972 y NIOSH 1994, **B)** Nuevo método 2006. La diferencia de color es evidente. La reacción colorimétrica con el método de Astudillo es de un rojo profundo

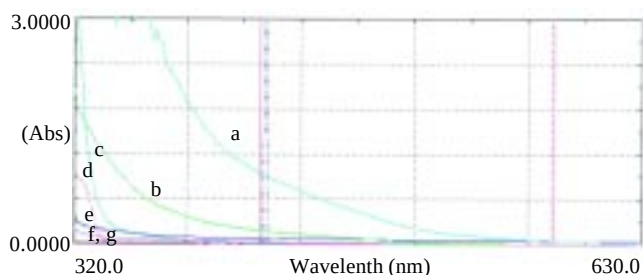


Figura 4. Espectro de absorción de los compuestos utilizados en esta investigación. a = orina al 100%; b = orina diluida 1:5; c = derivado del ácido sulfónico (AS); d = cloruro de bencensulfonilo (CBS); e = piridina (Pir) 100%; f = Pir al 50% en agua; g = HA 1 mg/mL.

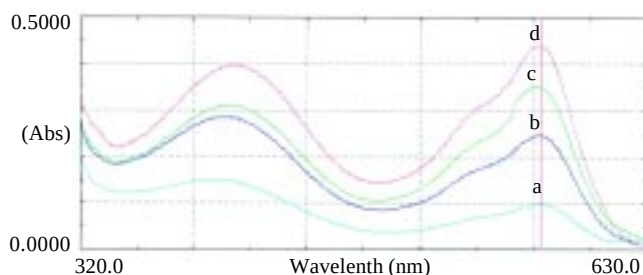


Figura 5. a = orina diluida 1:10; b = orina diluida 1:10 + 15 mg de HA; c = orina diluida 1:10 + 30 mg de HA; d = orina diluida 1:10 + 45 mg de HA. El HA es el único componente de la orina que reacciona con nuestro método.

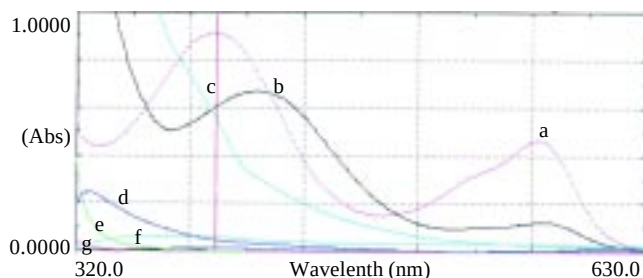


Figura 6. a = nuestro método; b = método de Ogata; c = orina sola; d = urea; e = creatinina; f = glicina; g = ácido úrico. Los ensayos se realizaron por quintuplicado. Nota: Los componentes de la orina tienen absorbancias muy bajas a 572 nm de longitud de onda. d-g. Estos componentes de la orina no reaccionaron con nuestro método.

te de paciente sano como se observa en la *figura 5*, ya que la orina sola y la mezclada con HA puro mantiene el mismo espectro de absorción con la diferencia de que la absorbancia de incrementa proporcionalmente a la concentración de HA, de acuerdo a la Ley de Beer-Lambert.

En nuestro nuevo método, la reacción colorimétrica no reacciona con ninguno de los componentes normales de la orina (urea, creatinina, glicina, ácido úrico) ya que estos presentan absorbancias muy bajas a una lectura de 572 nm de longitud de onda, lo que lo hace específico para determinación de HA como se analiza en la *figura 6*.

Nuestro método permite hacer la reacción sin necesidad de un diluyente previo como en el caso de los otros méto-

dos. No amerita la centrifugación para la extracción de HA puro ni la centrifugación de la orina. El color rosa que se obtiene permite una diferenciación contundente respecto al color normal de la orina y únicamente cambia la tonalidad del color de acuerdo a la concentración de HA. La rapidez de lectura por nuestro método colorimétrico es desde 5 a 30 segundos de realizada la mezcla de reacción. Con este método se obtuvo una absorbancia máxima de 572 nm lo cual lo hace mas específico para HA en comparación de los diferentes componentes de la orina.

Discusión

El HA y sus metabolitos son excretados en la orina por personas expuestas al tolueno y su determinación es útil para calcular la cantidad promedio del tolueno inhalado por personas en la industria.²²

En 1967 Kehl²⁴ desarrolló un método para la determinación de HA en orina basado en la formación de un derivado de bromina, el cual es menos sensible que los métodos desarrollados posteriormente, incluido el nuestro.^{20,23} El método desarrollado por Umberger y Fiorese en 1963 y el desarrollado por Ogata y Tomokuni en 1972 tienen una sensibilidad similar, la cual duplica al método de Kehl.²³

La diferencia sustancial entre el método de Umberger y Fiorese y el desarrollado por Ogata y Tomokuni (considerado el "Gold Standard"), reside en que en el primero el HA debe ser extraído de la orina para poder ser determinado, mientras que en el segundo, la determinación se realiza directamente sobre la orina sin extraer el HA, en una metodología similar a la empleada en nuestro método.^{20,23}

En el método de determinación colorimétrica directa de Ogata y Tomokuni, el ácido salicílico (un metabolito del ácido salicílico) y el ácido m- o p-metilhipúrico (metabolitos del m- o p-xileno) también reaccionan a 410 nm cuando están presentes en la orina de pacientes con riesgo exposicional a solventes industriales, aunque estos metabolitos no se encuentran en orinas normales, lo cual se ha comprobado por cromatografía.²³ En nuestro método, determinamos estos metabolitos más el ácido hidroxihipúrico y la glicina a 572 nm y pudimos discriminarlos espectrofotométricamente ya que el espectro de absorción de cada uno de estos compuestos es diferente, con lo cual podemos afirmar que nuestro método es mas específico que el estándar de oro.

Al igual que el estándar de oro, nuestro método puede ser utilizado para la determinación de HA en cualquier líquido corporal como el suero y el líquido cefalorraquídeo (LCR).

El mecanismo de reacción colorimétrica de los métodos descritos es diferente debido a que en el método de Umberger y Fiorese se observan picos a 360, 420, 440 y 470 nm y en el desarrollado por Ogata y Tomokuni, la reacción se determina en un pico a 410 nm; sin embargo, a estas longitudes de onda, la orina por sí sola (sin estar en contacto con las mezclas de reacción de estos métodos) tiene absorbancias casi tan altas como las que se observan con estos dos

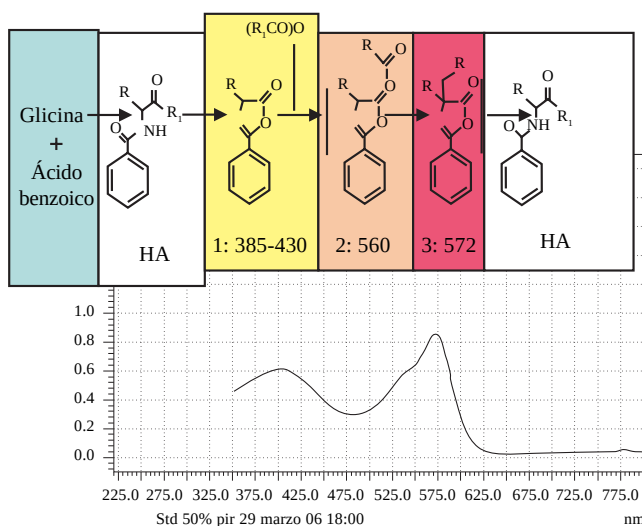


Figura 7. Mecanismo de reacción del HA con la piridina y el AS. En las fórmulas de la figura se observa cómo el HA se transforma en tautómeros de oxazolona debido a la reacción colorimétrica de manera reversible. Cada uno de los tres tautómeros de oxazolona mostrados en la figura, es responsable de los picos que se observan en el espectro de absorción de la gráfica.

métodos. En este contexto, nuestro método aporta una ventaja y especificidad muy clara debido a que la reacción que obtenemos se desarrolla a 572 nm donde la orina sola es prácticamente inerte en términos de absorción.

Otras dos ventajas claras en nuestro método con respecto al estándar de oro son que obtenemos un color rosa más fuerte, en menor tiempo y con mayor resistencia a su degradación. Nosotros podemos determinar la reacción colorimétrica en escasos segundos de iniciada la reacción mientras que en el estándar de oro deben de pasar 30 minutos para la determinación espectrofotométrica. Por otro lado, en el estándar de oro el decaimiento de la absorbancia a una hora es de 0.2 unidades mientras que en nuestro método se mantiene a dos horas.

Finalmente, podemos afirmar que el mecanismo de la reacción colorimétrica con los métodos establecidos, tanto con el estándar de oro como el nuestro es debido a tautómeros de oxazolona como se muestra en la *figura 7*, ya que el espectro de absorción de nuestro método tiene tres picos de absorbancia a 410 nm, a 535 nm y a 572 nm el cual es el más pronunciado de los tres en condiciones óptimas de la reacción.³¹

Conclusiones

1. Este nuevo método propuesto se puede realizar directamente en orina, sin la necesidad de realizar la extracción del HA; además de que se puede realizar en otros líquidos corporales como, por ejemplo: en suero y líquido cefalorraquídeo.
2. Este método es más específico en comparación con el estándar de oro (Método de Ogata), ya que espectrofotométricamente se obtiene una absorbancia a 572 nm de

longitud de onda donde ningún otro compuesto de la orina es detectado.

3. La reacción colorimétrica de este nuevo método es más estable que el estándar de oro por que solo tiene un decaimiento de 0.1 unidad de absorbancia hasta las dos horas en comparación con 0.2 unidades por hora del método de Ogata.
4. Este nuevo método es más rápido y más sencillo de realizar en comparación con el estándar de oro hasta hoy establecido.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Sistema Nacional de Investigadores del CONACyT (Apoyo No. 33834), por el Laboratorio Científico de Investigaciones de la Procuraduría General de Justicia Militar, por la Fundación Gonzalo Río Arronte IAP, y el laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Referencias

1. Barbosa-Horta S, Lozano-Elizondo D, Fernández-Aguilar M. Cromatografía del thinner, manifestaciones oculares en inhaladores crónicos. *Rev Mex Oftalmol* 1998; 72(1): 8-17.
2. Perez N. Nuevos datos sobre la toxicocinética del tolueno para el monitoreo biológico de la exposición ocupacional *Revista Latinoamericana de la Salud en el Trabajo* 2004; 4: 155-60.
3. Mercado CF. Contaminantes orgánicos volátiles. Organización Panamericana de Salud. 2000; 301-13.
4. Chalmers EM. Volatile substance abuse. *Med J* 1991; 154: 269-74.
5. Nise G, et al. Elimination of toluene from venous blood and adipose tissue after occupational exposure. *Br J Ind Med* 1989; 46: 407.
6. Nise G. Urinary excretion of o-cresol and hippuric acid after toluene exposure in rotogravure printing. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 63: 377.
7. Monster A. Evaluation of biological monitoring parameters for occupational exposure to toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 159.
8. Axelsson O. Current aspects of solvent related disorders in developments in occupational medicine. *Yearbook Med Pub Inc*; 1977, p. 223-5.
9. Kishinami K, Arakida Y. Studies on screening test for urine of workers exposed to organic solvent products such as thinners. *Jpn Rinsho-Kagaku* 1998; 17: 128-35.
10. Jacobson GA, Mclean S. Biological monitoring of low level Occupational Xylene Exposure and the role of recent exposure. *Brit Occup Hyg Soc* 2003; 47, 331-6.
11. Ismet C, Ayfer D, Esin G. Determination of urinary hippuric acid and o-cresol levels as biological indicators of toluene exposure in shoe-worker and glue sniffers. *Epidemiology Biomarkers Prev* 2003; 8: 119-27.
12. Löf A et al. Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to 2H8 -toluene. *Br J Ind Med* 1993; 50-9.
13. Berlin NI, Hewitt C. Hippuric acid synthesis in man after the Administration of [α - 14 C] Glycine. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 255.
14. Theo P, Anton G, Johan M. Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 2565.
15. Siqueira ME, Paiva MJ. Hippuric acid in urine: reference values. *Rev Saude Pub* 2002; 36: 723-7.
16. Alvarez-leite EM, Duarte A, Silveira NS, Barroco MM. Possibles effects of drinking and smoking habits on hippuric acid levels in urine of adults with no occupational toluene exposure. *Occup Health* 1999; 41: 112-14.

17. Alvarez-leite EM, Duarte A, Barroco MM, Caixeta VF. Valores de referencia do acido hipurico na regio metropolitana de Belo Horizonte. *Ver Brás Anal Clini* 1988; 30: 188-90.
18. Villanueva MB, Jonai H. Dietary source and background levels of hippuric acid in urine: comparison of Phillipine and Japanese levels. *Ind Healt* 1994; 32: 239-46.
19. Yoshida M, Akane A, Mitani T, Watabiki T. Simple colorimetric semiquantitation method of hippuric acid in urine for demonstration of toluene abuse. *Leg Med* 2005; 7: 198-200.
20. Umberger CJ, Fiorese F. Colorimetric method for hippuric acid. *Clin Chem* 1963; 9: 91.
21. Khel H. Hipuric acid analysis of urine using the Hofman rearrangement. *Clin Chem* 1967; 13: 475-8.
22. Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y. Quantitative determination in urine of hippuric acid and m-or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m- or p-xylene. *Brit J Int Med* 1969; 26: 330.
23. Tomokuni K, Ogata M. Direct Colorimetric Determination of Hippuric Acid in Urine. *Clin Chem* 1972; 18: 349-51
24. NIOSH Manual of Analytical Methods, 4nd Ed. Method 8300, U.S. Department of Health and Human Services, Publ. (NIOSH) 8/15/94.
25. Takahashi S, Fukui Y. Improved method for rapid determination of urinary hippuric acid by gas chromatography. *Jpn J Legal Med* 1979; 33: 352-7.
26. Evelynne F, Boumendil-Podevin R, René A. Identification of indoxyl sulfate and Hippuric acid. *J Clin Invt* 1975; 55: 1142-52.
27. Machella T, Helm J, Chornock. Relation of hippuric acid excretion to urine volumen. *J Clin Invest* 1942; 21: 763.
28. Ogii K. Determination of hippuric acid in cadaveric urine an urinary stain by high performance liquid chromatography. *J Tokio Womens Med College* 1998; 58: 627-36.
29. Sakai T, Niinuma Y, Yanagihara S, Ushio K. Simultaneous determination of hippuric acid and m-or-p-methylhippuric acid in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983; 276: 182-8.
30. Pagnotto LD, Lieberman. Determination of hippuric acid in urine. *Am Ing Hyg Assoc* 1967; 28: 129-34.
31. Wang G, Graziano M, Perbellin L, Guglielmi G, Brunone F. Reference values for blood tolueno in occupational nonexposed general population. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 201-3.

