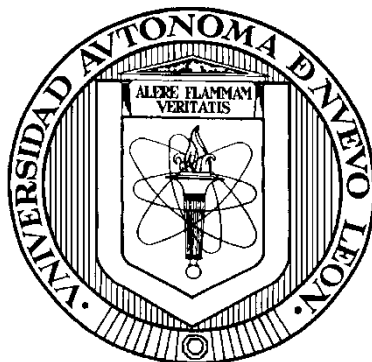


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN  
LA ORINA HUMANA POR RESONANCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR DE HIDRÓGENO**

**Por**

**Q.C.B. EDUARDO ANTONIO ZUL HERNÁNDEZ**


**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en  
Química Biomédica**

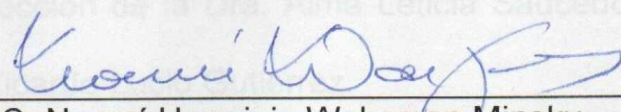
**A g o s t o , 2 0 2 1**


**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN  
LA ORINA HUMANA POR RESONANCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR DE HIDRÓGENO**

Aprobación de la Tesis:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. C. Alma Leticia Saucedo Yáñez  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez  
Co-Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. C. Noemí Herminia Waksman Minsky  
Miembro de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez  
Co-Director de Tesis

RESUMEN

Q.C.B. **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN  
LA ORINA HUMANA POR RESONANCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR DE HIDRÓGENO**

Número de Páginas: 183

Candidato para el Grado de Maestría en  
Ciencias con orientación en Química  
Biomédica

Área de Estudio: Química Analítica

Presentado por:

**Propósito y Método del Estudio:** El presente trabajo tuvo como propósito desarrollar y validar un método por Resonancia Magnética Nuclear para la cuantificación de metabolitos presentes en la orina humana. Para ello, en primera instancia, se seleccionaron los metabolitos a cuantificar a través de la revisión bibliográfica y considerando además distintos datos de cuantificación de metabolitos orgánicos del proyecto H119-00001. Posteriormente, se construyeron las curvas de calibración para el método de estándar externo como por el de los estándares internos. Se determinaron los parámetros de adquisición y de procesamiento de señales de 1H-NMR. Después de ello, se evaluó la especificidad de las señales, y posteriormente se realizó la validación de ambos métodos, considerando la evaluación de la exactitud, la precisión, la exactitud, el límite de detección, el límite de cuantificación y la robustez. Finalmente, se evaluó la aplicabilidad del método con las mejores características de desempeño, mediante la evaluación del efecto matriz y la aplicación

Q.C.B. Eduardo Antonio Zul Hernández

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina bajo la dirección de la Dra. Alma Leticia Saucedo Yáñez y la co-dirección del Dr. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez.

**Contribuciones y Conclusiones:** El presente trabajo se realizó en el marco de un convenio suscrito entre la Facultad de Medicina y el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina. La mayoría de los metabolitos se pudieron cuantificar en las muestras de orina analizadas. El método desarrollado presenta un excelente desempeño y puede ser empleado en muestras de metabolismo de orina de sujetos sanos y enfermos afectados por alguna patología.



---

Dra. C. Alma Leticia Saucedo Yáñez

Director de Tesis



---

Dr. C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez

Co-Director de Tesis

## RESUMEN

Q.C.B. Eduardo Antonio Zul Hernández

Fecha de Graduación: Agosto, 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN LA ORINA HUMANA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO.

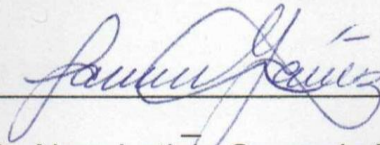
**Número de Páginas:** 183

**Candidato para el Grado de Maestro en  
Ciencias con orientación en Química  
Biomédica**

**Área de Estudio:** Química Analítica

**Propósito y Método del Estudio:** El presente trabajo tuvo como propósito desarrollar y validar un método por Resonancia Magnética Nuclear para la cuantificación de metabolitos presentes en la orina humana. Para ello, en primera instancia, se seleccionaron los metabolitos a cuantificar a través de la revisión bibliográfica y considerando además distintos datos de cuantificación de metabolitos urinarios del proyecto HI19-00001. Posteriormente, se construyeron las curvas de calibración de los metabolitos, tanto por el método de estándar externo como por el de estándar interno (empleando imidazol) y se evaluaron los parámetros de adquisición y de procesamiento de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Después de ello, se evaluó la especificidad de las señales, y posteriormente, se realizó la validación de ambos métodos, considerando la evaluación de la linealidad, la precisión, la exactitud, el límite de detección, el límite de cuantificación y la robustez. Finalmente, se evaluó la aplicabilidad del método con las mejores características de desempeño, mediante la evaluación del efecto matriz y la aplicación a muestras de orina de sujetos sanos.

**Contribuciones y Conclusiones:** El método de estándar externo mostró el mejor desempeño general, presentando linealidad ( $R^2$ : 0.9987 – 1.0000), precisión (%DER: 0.43 – 3.37%), exactitud (% de recuperación: 87.01 – 103.43%), límites de detección entre 0.01 y 0.10 mM, y límites de cuantificación entre 0.03 y 0.20 mM. Se encontró además que la espera interpulso es un factor que necesita ser controlado. El método en cuestión no presentó efecto matriz. La mayoría de los metabolitos se pudo cuantificar en las muestras de orina analizadas. El método desarrollado presenta un excelente desempeño y puede ser empleado en estudios de metabolómica de orina de sujetos sanos o de pacientes afectados por alguna patología.



---

Dra. C. Alma Leticia Saucedo Yáñez

Director de Tesis

## **DEDICATORIA**

A mi madre, hasta el cielo.

A mi padre.

A mis hermanas.

A mi novio Adrián.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi madre, Irma Hernández Cedillo, por haberme amado y apoyado tanto durante el tiempo que estuvo conmigo. Por ti es que me he convertido en la persona que soy ahora, y nada me alegra más que saber que siempre estuviste muy orgullosa de mí. Gracias por aconsejarme en todo momento, por estar ahí siempre que lo requerí, y por darme fuerzas cuando más lo necesitaba. Todos y cada uno de mis logros son por y para ti.

A mi padre, Juan Zul Pachuca, por apoyarme en todo lo que hago y por siempre darme palabras de aliento. Gracias por confiar tanto en mí y por hacérmelo saber, créeme que eso es la mejor motivación que puedo tener. Además, te doy las gracias por entenderme, por forjar mi carácter y por hacerme mejor persona día a día. Todos mis logros también son por y para ti.

A mi hermana Rubí Zul, gracias por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida. Te agradezco también por las enseñanzas que me has dado en todo tipo de ámbito. Admiro demasiado tus conocimientos y habilidades, y me honra mucho que me puedas compartir un poco de todo lo que sabes. Te quiero sis.

A mi hermana Berenice Zul, muchas gracias por creer en mí, y, sobre todo, por el apoyo moral que me brindaste durante este tiempo. Gracias por cada uno de tus consejos, de verdad los considero muy importantes. Muchas gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. Te quiero babe.

A mi novio Adrián Leyva, por tu excepcional apoyo durante todo el tiempo que llevamos de conocernos. Gracias por demostrarme tu interés todos los días, y por preocuparte mucho por mí. Sabes que te admiro muchísimo y que

estoy muy orgullo de ti. Aprovecho para agradecer al destino por ponerte en mi camino. Eres el mejor médico y Maestro en Ciencias. Te amo mucho.

A la Dra. Alma Saucedo, gracias por haberme invitado para ser su estudiante de maestría, por haber creído en mi potencial, y por haberme guiado de excelente manera a lo largo de este proyecto. Gracias por su comprensión y por resolver muy bien cada una de mis dudas. La admiro mucho.

Al Dr. Ricardo Lucio, por aclarar todas las dudas de la parte de validación, y por sus sabios comentarios a este trabajo.

A la Dra. Noemí Waksman, por permitirme llevar a cabo la maestría en el departamento que está a su cargo, y por sus comentarios a mi trabajo de tesis.

A mis compañeros de posgrado, Barbara, Yazmín, Denisse, Juan y Gerardo, porque cada uno de ustedes hizo que la maestría valiera mucho la pena. Gracias por todas las reuniones, las risas, los juegos, y los buenos ratos en general. No pude haber pedido mejores compañeros de cubículo.

A Barbara González, por ser excelente amiga y por apoyarme demasiado, tanto de forma académica como personal. Gracias por motivarme cada vez que podías. Gracias también por invitarme a tu festejo del 17/11/19, nunca olvidaré eso, de verdad. Fue muy grato reencontrarme contigo después de la carrera.

A Yazmín Solís, por estar ahí desde el día 1 de la maestría, por el apoyo académico y personal otorgado, y por tu buena amistad.

A Denisse Rosales, por el apoyo mutuo durante estos años, por tu gran amistad, y por los momentos de diversión, los cuales nunca faltaron.

A Paola Rentería, por todos tus años de amistad, por las palabras de motivación dadas, y por la admiración mutua.

## **AGRADECIMIENTO AL CONACYT**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de posgrado.

Este proyecto fue realizado con fondos de la Convocatoria de Atención a Problemas Nacionales 2017-5652.



*“Si las cosas que valen la pena se hicieran fácilmente, cualquiera las haría”.*

- Anthony Quinn.

*“There’ve been times that I thought I couldn’t last for long,*

*But now I think I’m able to carry on...”*

- Sam Cooke, 1963.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Metabolómica	1
1.1.1 Generalidades de la Metabolómica	1
1.1.2 Metabolómica Dirigida y no Dirigida	3
1.1.3 Metabolómica a partir de Biofluidos	4
1.1.4 Metabolómica de Orina	5
1.1.5 Naturaleza Química del Metaboloma Urinario Humano	7
1.1.6 Técnicas Analíticas Empleadas en Metabolómica	9
1.2 La Resonancia Magnética Nuclear	12
1.2.1 Fundamento	12
1.2.2 Información Obtenida de un Espectro de RMN de Hidrógeno	14
1.2.3 Aplicaciones de la RMN	17
1.2.4 Análisis Cuantitativo por RMN (RMNc)	19
1.2.4.1 Métodos de Cuantificación en RMNc	20
1.2.4.2 Métodos de Calibración en RMNc	21
1.2.5 Parámetros de Adquisición y de Procesamiento para Métodos de $^1\text{H}$ -RMNc	22
1.3 Validación de Métodos Basados en RMNc	24
1.3.1 Especificidad	25
1.3.2 Linealidad	25
1.3.3 Precisión	26
1.3.4 Exactitud	26
1.3.5 Límite de Detección	27
1.3.6 Límite de Cuantificación	28
1.3.7 Robustez	28
1.3.8 Efecto Matriz	29
1.4 La RMNc Aplicada a Metabolómica de Orina	29
1.4.1 Procesamiento de la Muestra	31
1.4.2 Análisis por $^1\text{H}$ -RMNc de Orina Humana	32
1.5 Justificación	36
1.6 Objetivo General	37
1.7 Objetivos Específicos	37

2. MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Materiales, Equipos, Reactivos, Programas de Cómputo y Muestras Biológicas	38
2.2 Selección de los Metabolitos a Cuantificar	41
2.3 Evaluación de los Parámetros de Adquisición y Procesamiento	42
2.4 Asignación de las Señales en los Espectros de RMN	47
2.5 Determinación de los Intervalos de Concentración de los Metabolitos	48
2.6 Evaluación del Imidazol como Estándar Interno	49
2.7 Validación del Método de <sup>1</sup> H-RMNC	50
2.7.1 Preparación de las Disoluciones de Trabajo	51
2.7.2 Evaluación de la Especificidad de las Señales en la Mezcla de Analitos	53
2.7.3 Evaluación de la Linealidad	55
2.7.4 Evaluación de la Precisión	56
2.7.5 Evaluación de la Exactitud del Sistema	56
2.7.6 Determinación del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación	57
2.7.7 Evaluación de la Exactitud del Método	59
2.7.8 Evaluación de la Robustez	62
2.8 Evaluación del Efecto Matriz	64
2.9 Aplicación del Método al Análisis de Muestras de Orina	66
3. RESULTADOS	67
3.1 Selección de los Metabolitos a Cuantificar	67
3.2 Evaluación de los Parámetros de Adquisición y Procesamiento	74
3.2.1 Evaluación de la Ganancia del Receptor	74
3.2.2 Evaluación de la Espera Interpulso	76
3.2.3 Evaluación del Tiempo de Adquisición	77
3.2.4 Evaluación de los Parámetros de Procesamiento	78
3.3 Asignación de las Señales en los Espectros de RMN	80
3.4 Determinación de los Intervalos de Concentración de los Metabolitos	82
3.5 Evaluación del Imidazol como Estándar Interno	85
3.6 Evaluación de la Especificidad de las Señales en la Mezcla de Analitos	86
3.7 Validación del Método de <sup>1</sup> H-RMNC por Estándar Externo	87
3.7.1 Evaluación de la Linealidad	88
3.7.2 Evaluación de la Precisión	91
3.7.3 Evaluación de la Exactitud del Sistema	93
3.7.4 Determinación del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación	93
3.7.5 Evaluación de la Exactitud del Método	96
3.7.6 Evaluación de la Robustez	98

3.8 Validación del Método de $^1\text{H-RMNc}$ por Estándar Interno	100
3.8.1 Evaluación de la Linealidad	100
3.8.2 Evaluación de la Precisión	103
3.8.3 Evaluación de la Exactitud del Sistema	104
3.8.4 Determinación del Límite de Cuantificación	105
3.9 Evaluación del Efecto Matriz	106
3.10 Aplicación del Método al Análisis de Muestras de Orina	108
4. DISCUSIÓN	111
4.1 Selección de los Metabolitos a Cuantificar	111
4.2 Evaluación de los Parámetros de Adquisición y Procesamiento	113
4.3 Asignación de las Señales en los Espectros de RMN	119
4.4 Determinación de los Intervalos de Concentración de los Metabolitos	123
4.5 Evaluación del Imidazol como Estándar Interno	124
4.6 Evaluación de la Especificidad de las Señales en la Mezcla de Analitos	125
4.7 Validación del Método de $^1\text{H-RMNc}$ por Estándar Externo	126
4.8 Validación del Método de $^1\text{H-RMNc}$ por Estándar Interno	136
4.9 Comparación de los Métodos de $^1\text{H-RMNc}$	139
4.10 Evaluación del Efecto Matriz	141
4.11 Aplicación del Método al Análisis de Muestras de Orina	143
5. CONCLUSIONES	147
6. PERSPECTIVAS	149
BIBLIOGRAFÍA	150
APÉNDICES	158
APÉNDICE A.- ESPECTROS EMPLEADOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD	158
APÉNDICE B.- RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD POR EL MÉTODO DE ESTÁNDAR EXTERNO	160
APÉNDICE C.- RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD POR EL MÉTODO DE ESTÁNDAR INTERNO	172
APÉNDICE D.- DIAGRAMAS EMPLEADOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ	183

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Cantidades pesadas de cada analito para la preparación de las disoluciones madre para las pruebas preliminares.	43
2. Niveles de concentración para la realización de las curvas de calibración preliminares.	45
3. Parámetros para la adquisición de los espectros de <sup>1</sup> H-RMNC utilizando la secuencia de pulsos NOESYPR1D.	46
4. Valores de ganancia del receptor y espera interpulso evaluados para la selección de parámetros de adquisición.	46
5. Cantidad pesada, volumen y concentración de cada analito para la preparación de las distintas disoluciones madre.	52
6. Concentración de las disoluciones para la realización de las curvas de calibración.	54
7. Concentración de las disoluciones para la evaluación de la exactitud del sistema.	58
8. Concentración de las disoluciones para la evaluación de la exactitud del método.	61
9. Factores involucrados en la evaluación de la robustez.	63
10. Experimentos realizados para la evaluación de la robustez.	63
11. Concentración de las disoluciones para la evaluación del efecto matriz.	65
12. Listado de los 92 metabolitos incluidos en la primera etapa de selección .	68

13. Listado de metabolitos incluidos en la segunda etapa de selección, a partir de su identificación en la orina de sujetos sanos en distintos artículos de metabolómica de orina por <sup>1</sup> H-RMN.	70
14. Metabolitos seleccionados para realizar la cuantificación por RMN.	72
15. Desplazamiento químico y multiplicidad de las señales de los metabolitos y el estándar interno.	81
16. Concentraciones reportadas de los metabolitos en distintos trabajos de metabolómica.	83
17. Valores de R <sup>2</sup> y %DER de FR obtenidos para cada uno de los 14 metabolitos por el método de estándar externo.	90
18. %DER para la evaluación de la precisión intradía por el método de estándar externo.	91
19. %DER para la evaluación de la precisión intermedia por el método de estándar externo.	92
20. Porcentajes de error para la evaluación de la exactitud del sistema por el método de estándar externo.	94
21. Límite de detección de los metabolitos cuantificados por RMN.	95
22. Límites de cuantificación encontrados por el método de estándar externo.	97
23. Porcentajes de recuperación para la evaluación de la exactitud del método de estándar externo.	98
24. Resultados de la evaluación de la robustez por el método de estándar externo.	99
25. Valores de R <sup>2</sup> y %DER de FR obtenidos para cada uno de los 14 metabolitos por el método de estándar interno.	102
26. %DER para la evaluación de la precisión intradía por el método de estándar interno.	103
27. %DER para la evaluación de la precisión intermedia por el método de estándar interno.	104

28. Porcentajes de error para la evaluación de la exactitud del sistema por el método de estándar interno.	105
29. Límites de cuantificación encontrados por el método de estándar interno.	106
30. Porcentajes de efecto matriz de los metabolitos cuantificados por RMN	107
31. Resultados de la aplicación del método de estándar externo a muestras de orina de sujetos sanos.	110

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Supeclases químicas en la Base de Datos del Metaboloma Urinario.	9
2. Flujo de trabajo general en metabolómica.	11
3. A. Orientación de los espines nucleares antes y después de la aplicación de un campo externo. B. Precesión del vector de magnetización durante la relajación.	13
4. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN típico.	14
5. Regiones generales de desplazamientos químicos en un espectro de $^1\text{H}$ -RMN.	15
6. Acoplamiento de espines entre dos protones con desplazamientos químicos muy diferentes.	17
7. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN típico de orina humana, adquirido en un espectrómetro de 500 MHz.	30
8. Estructura química del imidazol.	74
9. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN adquiridos con distintos valores de ganancia, a partir del nivel más bajo de concentración.	75
10. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN adquiridos con distintos valores de ganancia, a partir del nivel más alto de concentración.	76
11. Señal representativa del espectro de $^1\text{H}$ -RMN, adquirido con distintos valores de D1.	77
12. Gráfico del FID obtenido a partir del nivel más alto de concentración.	78



13. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN de los 14 metabolitos seleccionados para el análisis y el estándar interno (imidazol).	79
14. Comparación de las señales de TMNO de 3 muestras de orina y de los niveles de concentración inferior y superior de las curvas de calibración preliminares.	84
15. Señal del imidazol en la región aromática del espectro de $^1\text{H}$ -RMN de una muestra de orina de un sujeto sano adicionada con el estándar correspondiente (azul).	85
16. Espectro HSQC de la mezcla de los 14 metabolitos y el estándar interno (imidazol).	87
17. Curva de calibración de la alanina por estándar externo.	89
18. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la alanina por estándar externo.	89
19. Señal de la alanina a las concentraciones empleadas para la determinación del límite de detección por el método visual.	95
20. Gráfico de coeficientes para la trigonelina en función de las distintas variables.	100
21. Curva de calibración de la alanina por estándar interno.	101
22. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la alanina por estándar interno.	101
23. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN de una de las muestras de orina analizadas.	108

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Concentración Micromolar
%DER	Porcentaje de Desviación Estándar Relativa
%EM	Porcentaje de Efecto Matriz
% p/v	Porcentaje Peso Volumen
% v/v	Porcentaje Volumen Volumen
1D	Unidimensional
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
$^1\text{H}$ -RMNc	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno Cuantitativa
2D	Bidimensional
$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ Desacoplado de $^1\text{H}$
ANOVA	Análisis de Varianza
AQ	Tiempo de Adquisición
$B_0$	Campo Magnético Externo
CG	Cromatografía de Gases
CL	Cromatografía Líquida
CL-EM	Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas
COSY	Espectroscopía de Correlación

CVD	Enfermedad Cardiovascular
d	Doblete
D	Deuterio
D1	Espera Interpulso
D <sub>2</sub> O	Óxido de Deuterio o Agua Deuterada
dB	Decibel
DOE	Diseño de Experimentos
DQA	Departamento de Química Analítica
DSS	2, 2-Dimetil-2-Silapentano-5-Sulfonato de Sodio
EC	Electroforesis Capilar
EE	Estándar Externo
EI	Estándar Interno
EM	Espectrometría de Masas
ERC	Enfermedad Renal Crónica
EUROLAB	Federación Europea de Asociaciones Nacionales de Laboratorios de Ensayo, Calibración y Análisis
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
FID	Decaimiento Libre de la Inducción
FR	Factor de Respuesta
<i>g</i>	Fuerza Gravitacional
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido Clorhídrico
HMDB	Base de Datos del Metaboloma Humano
HPHPA	Ácido 3-(3-Hidroxifenil)-3-Hidroxipropanoico

HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Simple
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
LB	Ensanchamiento de Línea
LC	Límite de Cuantificación
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LD	Límite de Detección
m	Multiplete
M	Concentración Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Concentración Milimolar
MMA	Metabolitos Menos Abundantes
MHz	Megahertz
n	Tamaño de Muestra
N	Concentración Normal
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sodio Dibásico
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Sodio Monobásico
NaOH	Hidróxido de Sodio
NI	No Identificado
NS	Número de Incrementos
<i>p</i>	Valor de P

pH	Potencial de Hidrógeno
pKa	Logaritmo Negativo de la Constante de Acidez
ppm	Partes por Millón
Q <sup>2</sup>	Bondad de Predicción
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinación o Bondad de Ajuste
RG	Ganancia del Receptor
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMNc	Resonancia Magnética Nuclear Cuantitativa
s	Segundo
s	Desviación Estándar
S	Pendiente de la Recta de Regresión
sa	Singulete Ancho
S/R	Señal Ruido
SW	Ventana Espectral
t	Triplete
T	Tesla
T <sub>1</sub>	Tiempo de Relajación Longitudinal
T <sub>2</sub>	Tiempo de Relajación Transversal
TD	Número de Puntos
TMNO	N-Óxido de Trimetilamina
TOCSY	Espectroscopía de Correlación Total
TSP	Ácido 2, 2, 3, 3-Tetradeutero-3-(Trimetilsilil)-Propiónico
UMDB	Base de Datos del Metaboloma Urinario
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución

$\nu$	Frecuencia de la Radiación Electromagnética
$x$	Promedio
ZF	Llenado de Ceros
$\gamma$	Constante Giromagnética
$\delta$	Desplazamiento Químico
$\sigma$	Desviación Estándar de la Respuesta

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Metabolómica**

#### **1.1.1 Generalidades de la Metabolómica**

La metabolómica es una rama relativamente joven de las ciencias “ómicas” que se ocupa del estudio sistemático de los productos químicos o metabolitos que generan las células y los organismos. Debido a que los metabolitos son los productos posteriores de numerosas interacciones de todo el genoma o de todo el proteoma, el metaboloma (la suma de todos los metabolitos en un organismo) puede ser una medida muy sensible del fenotipo (Bouatra et al., 2013).

El metaboloma humano, por su parte, representa la colección completa de moléculas de bajo peso molecular que se encuentran en el organismo, incluyendo péptidos, lípidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos orgánicos, aminas biogénicas, vitaminas, minerales, aditivos alimentarios, fármacos, cosméticos, contaminantes y casi cualquier otra sustancia química que los humanos ingieren, metabolizan, catabolizan o con los que entran en contacto (Wishart et al., 2018). El número de metabolitos

conocidos, esperados y predichos que constituyen dicho metaboloma corresponde a 114,222, según la Base de Datos del Metaboloma Humano (HMDB, *Human Metabolome Database*) (Human Metabolome Database [HMDB], 2020).

El enfoque inicial de la metabolómica ha sido el descubrimiento de biomarcadores, con el objetivo de identificar metabolitos correlacionados con diversas enfermedades y exposiciones ambientales. Esto ha llevado, por ejemplo, a la identificación del N-óxido de trimetilamina (TMNO, *trimethylamine N-oxide*) plasmático y la taurina urinaria como marcadores de enfermedad cardiovascular (CVD, *cardiovascular disease*) y exposición a radiación ionizante, respectivamente (Johnson et al., 2016).

La metabolómica no solo permite la identificación de biomarcadores de enfermedad en forma de metabolitos endógenos (derivados de los genes) y exógenos (derivados del medio ambiente), sino que también proporciona conocimientos únicos sobre las causas fundamentales de la enfermedad, ya que, en contraste con los genes y las puntuaciones de riesgo genético, que pueden ser utilizadas para indicar lo que podría suceder, el perfilado metabolómico y la fenotipificación metabólica indican lo que está ocurriendo realmente. Aplicaciones adicionales de la metabolómica en el área biomédica incluyen el monitoreo del paciente, el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, así como su utilización en la medicina de precisión, cuyo objetivo es utilizar pruebas diagnósticas avanzadas para personalizar el tratamiento médico



de un individuo de acuerdo con sus perfiles “ómicos” específicos (Wishart, 2016).

### 1.1.2 Metabolómica Dirigida y no Dirigida

Para llevar a cabo un estudio de este tipo, las estrategias de metabolómica implican ya sea un enfoque dirigido o uno no dirigido. La metabolómica dirigida se refiere a la detección y cuantificación precisa de un pequeño conjunto de compuestos conocidos, impulsadas por una pregunta o hipótesis bioquímica específica en la que el conjunto de metabolitos relacionados con una o más vías metabólicas ya está definido. Una limitación del enfoque dirigido es que requiere que los compuestos de interés se conozcan *a priori* y además estén disponibles en su forma purificada. En cambio, el enfoque no dirigido no es conducido por una hipótesis *a priori* y se utiliza para una comparación completa de metabolomas (es decir, se miden y comparan entre muestras tantos metabolitos como sea posible). A diferencia de la metabolómica dirigida, la metabolómica no dirigida no intenta cuantificar con precisión todos los metabolitos medibles en una muestra, sino que solo da su cuantificación relativa (Cambiaghi et al., 2017).

### 1.1.3 Metabolómica a Partir de Biofluidos

Diversas muestras biológicas se utilizan comúnmente en el análisis metabolómico, incluyendo: biofluidos (también conocidos como fluidos corporales), extractos de células, extractos de bacterias, tejidos intactos de animales o humanos y extractos de plantas (Emwas, 2015).

La lista de biofluidos que han sido utilizados en estudios de metabolómica con énfasis en las ciencias biomédicas es realmente vasta, y algunos ejemplos de los más utilizados son: el plasma, el suero, la orina, la saliva, el líquido cefalorraquídeo (LCR), y las heces (Karu et al., 2018).

En cuanto al análisis de los perfiles de metabolitos en los biofluidos, éste nos proporciona información sobre el diagnóstico y el pronóstico de las enfermedades, los patrones dietéticos y la toxicidad de fármacos, entre otros hallazgos (Bingol, 2018). La sangre, por ejemplo, irriga cada tejido y cada órgano del cuerpo y recolecta y transporta moléculas que son asimiladas, secretadas, excretadas o descartadas por diferentes tejidos. En la mayoría de los estudios de metabolómica, se utilizan matrices de plasma o suero como sustituto de la sangre completa. El perfilado metabolómico y el análisis de tales muestras han sido aplicados exitosamente a la investigación de una variedad de enfermedades, como cáncer, enfermedades renales, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedad celíaca (Suarez-Diez et al., 2017).

Finalmente, existen diferentes bases de datos que contienen información sobre los intervalos de concentración de metabolitos específicos en biofluidos

humanos, tal como la HMDB, la cual proporciona intervalos para metabolitos en sangre, orina, saliva, LCR, heces, sudor, leche materna, bilis y líquido amniótico, entre otros bioespecímenes (HMDB, 2020; Johnson et al., 2016).

#### 1.1.4 Metabolómica de Orina

La orina, tal como la producen los mamíferos, es un líquido transparente, estéril (aún en la vejiga) y de color ámbar generado por los riñones. Los riñones extraen los desechos solubles del torrente sanguíneo, así como el exceso de agua, azúcares y una variedad de otros compuestos. La orina resultante contiene altas concentraciones de urea (del metabolismo de los aminoácidos), sales inorgánicas (cloruro, sodio y potasio), creatinina, amoníaco, ácidos orgánicos, diversas toxinas solubles en agua y productos pigmentados de la degradación de la hemoglobina, incluida la urobilina, que le da su color característico (Bouatra et al., 2013).

Si bien diversos fluidos corporales han sido objeto de estudios de metabolómica, la orina es uno de los biofluidos que más se han estudiado a la fecha. Esto se debe a que es fácilmente disponible, se puede obtener de forma no invasiva y requiere una preparación mínima. Además, es rica en metabolitos y tiene una concentración de macromoléculas muy baja (Bezabeh et al., 2019). Estas propiedades intrínsecas de la orina la convierten en una fuente atractiva de biomarcadores para estudios clínicos de metabolómica, ya que además

retiene información de los tejidos proximales y de la sangre que perfunde órganos distantes. También es fácil recolectar repetidamente grandes cantidades de orina del mismo individuo para estudios longitudinales. Finalmente, la orina es estable y relativamente menos compleja que otros biofluidos (Wu & Gao, 2015). La posibilidad de recolectar fácilmente las muestras de orina de manera pasiva, no invasiva y longitudinal representa una ventaja clave frente a otras matrices biológicas que pueden ser empleadas como fuente de información metabólica, como la sangre y el LCR, por ejemplo (Miller et al., 2019).

En cuanto a aplicaciones de la metabolómica de orina, ésta ha sido reconocida durante mucho tiempo como un fluido rico para el diagnóstico médico y en la actualidad se realizan muchos ensayos clínicos en este fluido biológico. Miles de metabolitos han sido documentados en la orina, mostrando conexiones con aproximadamente 600 condiciones humanas que incluyen, entre otras: obesidad, cáncer, inflamación, enfermedades neurológicas y enfermedades infecciosas. Además, el embarazo, la ovulación, la infección del tracto urinario, la dieta y el ejercicio inducen firmas metabolómicas que pueden ser observadas en la orina. Adicionalmente, diversos fármacos y sus metabolitos se detectan fácilmente en la orina, presentando la oportunidad para una dosificación adaptada al individuo y un monitoreo del cumplimiento, así como una estratificación efectiva para ensayos clínicos, lo que puede reducir en gran medida el costo del desarrollo farmacéutico (Miller et al., 2019).

Un ejemplo de aplicación de la metabolómica de orina corresponde a la identificación de biomarcadores de enfermedad renal, incluyendo la lesión renal aguda, la enfermedad renal crónica (ERC), la nefropatía diabética, y el síndrome nefrótico idiopático, entre otras patologías (Barrios et al., 2016; Saucedo et al., 2018).

#### 1.1.5 Naturaleza Química del Metaboloma Urinario Humano

El metaboloma de la orina es la suma de los metabolitos excretados durante las horas previas a la toma de muestra (Barnes et al., 2016). A este respecto, las muestras de orina varían ampliamente en su contenido de agua y solutos, mostrando a menudo una diferencia de más del doble entre muestras de humanos sanos. Estas variaciones se pueden compensar por la recolección de muestras de orina de 24 horas, o por la normalización de las muestras de orina respecto a la osmolalidad, a la gravedad específica o, más comúnmente, a la creatinina (que es un metabolito dependiente de la edad, el sexo, la masa muscular y el grupo poblacional) (Karu et al., 2018).

La información de los metabolitos que han sido detectados en la orina humana, junto con sus respectivas concentraciones y asociaciones con enfermedad, se resume en la Base de Datos del Metaboloma Urinario (UMDB, *Urine Metabolome Database*, <http://www.urinemetabolome.ca>) (Bouatra et al., 2013).

Actualmente, el número de metabolitos detectados y esperados en la orina humana según esta base de datos es de 4,364. De éstos, 1,690 han sido detectados y cuantificados, 474 se han detectado, pero no cuantificado, y 2,200 entran en la categoría de esperados (*Urine Metabolome*, 2020). Los compuestos clasificados como metabolitos "detectados" son aquellos con concentraciones medidas o confirmación experimental de su existencia en la orina, mientras que los metabolitos "esperados" son aquellos compuestos de estructura conocida para los cuales se conocen vías bioquímicas y donde la ingesta/exposición humana es frecuente, pero que aún no han sido detectado en dicho biofluido o el isómero preciso aún no se ha identificado formalmente (Wishart et al., 2018).

En lo que respecta a la naturaleza química de los metabolitos encontrados en la orina humana, ésta contiene un número sustancial de moléculas hidrofílicas. Excluyendo los lípidos (que están presentes en concentraciones muy bajas), en la orina humana predominan los aminoácidos y derivados, y los carbohidratos. Otras moléculas de bajo peso molecular encontradas en gran abundancia en la orina incluyen los hidroxiácidos y derivados (como el ácido cítrico), la urea, el amoníaco, la creatinina y el ácido hipúrico. Asimismo, los distintos tipos de compuestos que constituyen el metaboloma urinario humano se clasifican en "superclases" de grupos químicos (la figura 1 muestra la clasificación de la HMDB) (Bouatra et al., 2013).

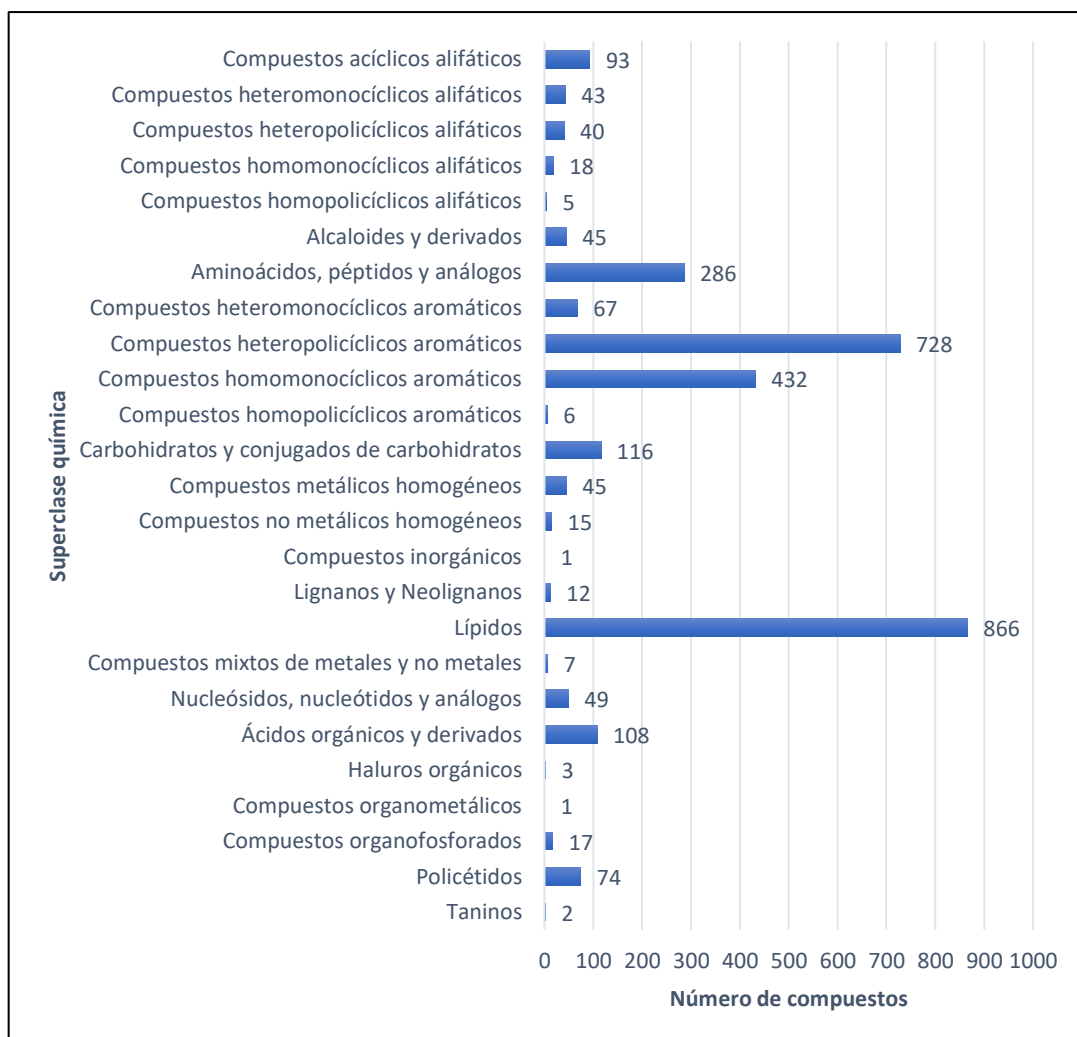


Figura 1. Superclases químicas identificadas en la Base de Datos del Metaboloma Urinario. Adaptado de Bouatra, et al., 2013.

### 1.1.6 Técnicas Analíticas Empleadas en Metabolómica

El flujo de trabajo en metabolómica comienza con el diseño experimental, el cual consta de dos pasos principales. El primer paso consiste en definir el problema biológico, generando las hipótesis del estudio. Basándose en ello, el

segundo paso involucra la selección del enfoque utilizado en el análisis (dirigido o no dirigido, definidos anteriormente). Los pasos restantes típicamente incluyen la preparación de la muestra, el análisis de la muestra y la adquisición de los datos, el preprocesamiento de los datos y el análisis estadístico e interpretación de los datos (figura 2) (Pereira Braga & Adamec, 2019).

En relación con el paso correspondiente al análisis de las muestras, dada la amplia naturaleza de los metabolitos y sus diferencias en rango dinámico (de pico a milimolar), se requiere el uso de diferentes plataformas metabolómicas para asegurar una cobertura óptima del metaboloma (González-Peña & Brennan, 2019).

De este modo, las técnicas analíticas principalmente empleadas para la adquisición de datos en los estudios de metabolómica son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM), la cual generalmente se encuentra acoplada a técnicas de separación como la cromatografía de gases (CG), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) o electroforesis capilar (EC) (Cambiaghi et al., 2017; Pereira Braga & Adamec, 2019).

La elección de la plataforma depende principalmente del enfoque del estudio, así como de la naturaleza de las muestras. Sin embargo, la selección de una plataforma o plataformas analíticas dadas también se determina a



menudo por el costo, su accesibilidad y la experiencia disponible (Emwas et al., 2019).

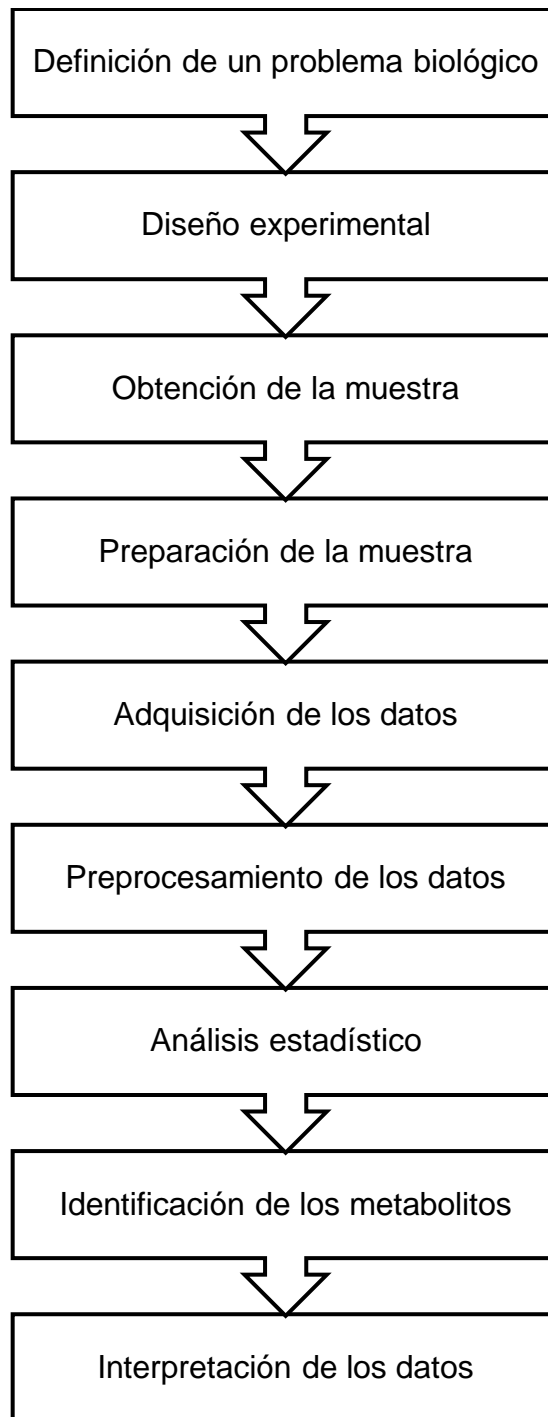


Figura 2. Flujo de trabajo general en metabolómica.

## 1.2 La Resonancia Magnética Nuclear

### 1.2.1 Fundamento

La resonancia magnética nuclear es una técnica analítica basada en espectroscopía de absorción, que involucra a los núcleos magnéticamente activos (aquellos cuyo número cuántico de espín es diferente a cero), los cuales, bajo condiciones apropiadas en un campo magnético, pueden absorber radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia, proceso gobernado por el entorno químico del núcleo en cuestión. Un gráfico de las intensidades de los picos de absorción en función de las frecuencias constituye un espectro de RMN (Silverstein et al., 2005).

El proceso de RMN involucra dos pasos esenciales: en el primero, los espines nucleares magnéticos se alinean en un campo magnético externo aplicado ( $B_0$ ), mientras que, en el segundo, la alineación del espín nuclear se ve perturbada por la aplicación de una onda electromagnética en la región de las radiofrecuencias (figura 3A) (Rhodes, 2017). La relación entre el campo magnético aplicado y la frecuencia de la radiación electromagnética que genera el fenómeno de la RMN queda establecida por la ecuación de Larmor:

$$\nu = \left( \frac{\gamma}{2\pi} \right) (B_0)$$

donde  $\nu$  es la frecuencia de la radiación que causa la transición;  $\gamma$  corresponde a la constante giromagnética, la cual es diferente para cada núcleo

(H, C, N, etcétera); y  $B_0$  es el campo magnético aplicado (Silverstein et al., 2005).

Otro aspecto importante corresponde al de la relajación de los núcleos, de manera que existen dos procesos de relajación: la relajación longitudinal o espín-red, designada por el tiempo  $T_1$ , y la relajación transversal o espín-espín, caracterizada por el tiempo  $T_2$ . La relajación longitudinal involucra la transferencia de energía de los núcleos “excitados” a los núcleos circundantes. La figura 3B muestra la pérdida de la componente  $xy$  por el proceso de relajación longitudinal, cuando la magnetización neta regresa al eje  $z$  en una espiral decreciente (precesión). La relajación transversal, por otro lado, implica la transferencia de energía entre protones en precesión, resultando en un desfase, y provocando ensanchamiento de línea y pérdida de señal (Silverstein et al., 2005).

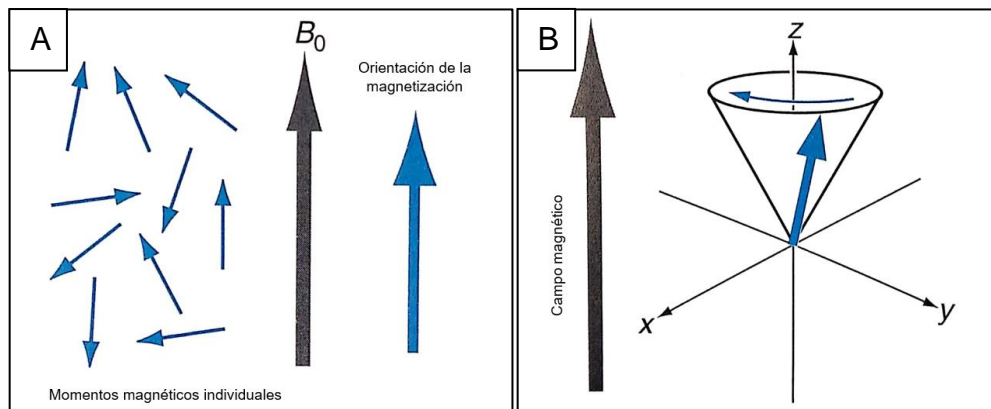


Figura 3. A. Orientación de los espines nucleares antes y después de la aplicación de un campo externo. B. Precesión del vector de magnetización durante la relajación.

### 1.2.2 Información Obtenida de un Espectro de RMN de Hidrógeno

Los espectros de RMN de núcleos, como, por ejemplo,  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , pueden ser fácilmente obtenidos, ya que poseen números de espín de  $\frac{1}{2}$  y una distribución uniforme de carga esférica. De éstos, los más ampliamente utilizados en RMN son, por mucho, el hidrógeno o protón,  $^1\text{H}$ , y el carbono 13,  $^{13}\text{C}$ . A este respecto, la figura 4 muestra el espectro de RMN de hidrógeno ( $^1\text{H}$ -RMN) del acetato de etilo como ejemplo (Silverstein et al., 2005; Rhodes, 2017).

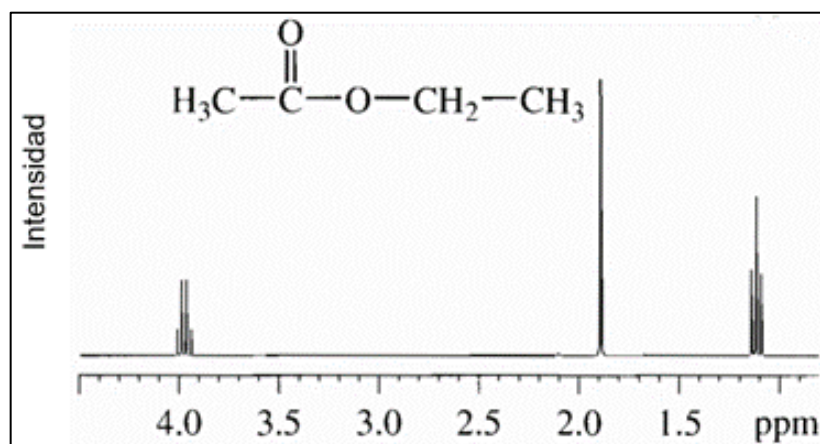


Figura 4. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN típico. El área de cada señal está directamente relacionada con el número de átomos de H que la genera.

Al analizar un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN los parámetros que nos permiten llevar a cabo la elucidación estructural incluyen: el número de señales, el desplazamiento químico, el acoplamiento químico y el área bajo la curva (o integral) de cada señal (Silverstein et al., 2005).

El número de señales nos da información sobre los diferentes tipos de hidrógeno existentes en una molécula o en una mezcla de compuestos. El desplazamiento químico ( $\delta$ ), por su parte, se relaciona con la frecuencia a la que aparece la señal de un protón específico, y depende básicamente de su entorno químico. Los desplazamientos químicos se suelen reportar en unidades adimensionales, denominadas partes por millón (ppm), tal como se muestra en la figura 4, y corresponden al cociente del desplazamiento químico de un pico en Hertz (Hz) y la frecuencia designada de un espectrómetro en Megahertz (MHz). Aquí vale la pena mencionar que, de acuerdo con el grupo funcional al que pertenecen los protones observados, existen regiones generales de desplazamientos químicos en un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 5) (Silverstein et al., 2005).

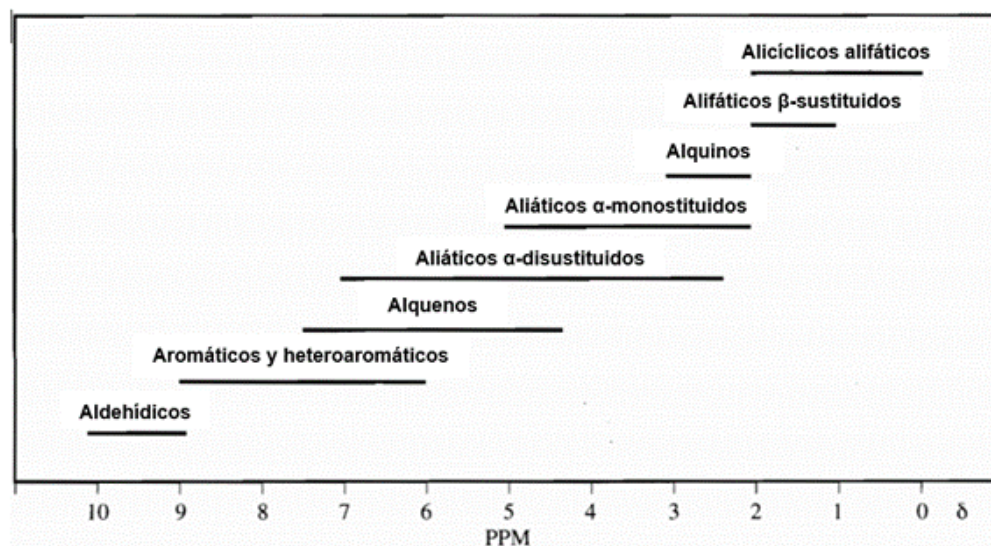


Figura 5. Regiones generales de desplazamientos químicos en un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.

Respecto al acoplamiento de las señales, o de manera más específica, el acoplamiento de los espines, éste puede ser descrito como el acoplamiento de los espines de los protones a través de los electrones que intervienen en los enlaces. De acuerdo con el principio de Pauli, los electrones de enlace entre dos núcleos están apareados de manera que los espines adquieren una distribución antiparalela. En presencia de un campo magnético, existe la tendencia por parte de cada núcleo de aparear su espín con uno de los electrones de enlace, y, en consecuencia, la mayoría son antiparalelos. Así, por ejemplo, suponiendo que dos protones vecinales (es decir, aquellos que se encuentran separados por 3 enlaces) se encuentran en entornos químicos muy diferentes, cada protón dará lugar a una absorción distinta, y dichas absorciones estarán ampliamente separadas, pero el espín de cada protón es afectado levemente por las dos orientaciones del otro protón a través de los electrones de enlace, de modo que cada absorción aparece como un doblete, como se aprecia en la figura 6. En dicha figura también se puede observar que la diferencia en las frecuencias de aparición (en Hz) de los picos constituyentes de una señal es designada como  $J$ , y se refiere a la constante de acoplamiento, la cual es proporcional a la efectividad del acoplamiento (Silverstein et al., 2005).

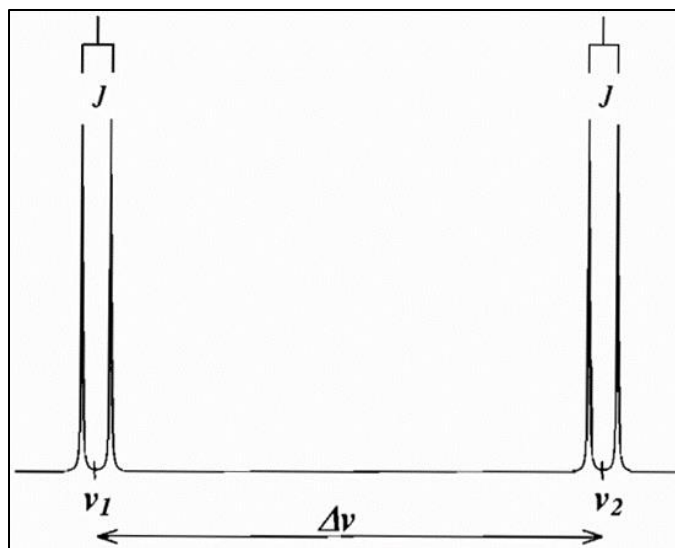


Figura 6. Acoplamiento de espines entre dos protones con desplazamientos químicos muy diferentes.

Finalmente, la integración de las señales nos da información ya sea del número de núcleos que las generan o de la concentración del compuesto en cuestión. Este último hallazgo se relaciona de forma directa con el desarrollo de métodos de cuantificación por RMN, como se mencionará a fondo más adelante (Gödecke et al., 2013).

### 1.2.3 Aplicaciones de la RMN

La RMN ha sido utilizada principalmente en química para la identificación y cuantificación de la composición química de una muestra determinada, y también puede ser utilizada para estudiar las propiedades físicas y químicas de las moléculas, como la densidad electrónica y la dinámica molecular. Además,

la RMN se ha empleado en una amplia gama de áreas de investigación, incluyendo biología estructural, química orgánica, química inorgánica, bioquímica, física, biología, polímeros y descubrimiento de fármacos. En cuanto a los tipos de muestras que se analizan por RMN, las líquidas son las principalmente empleadas, aunque las muestras sólidas y las muestras en fase gaseosa también pueden ser utilizadas (Emwas, 2015).

Entre las aplicaciones de la RMN, además de la elucidación estructural de compuestos *de novo*, también se incluyen: el análisis cinético de las reacciones químicas, los estudios metabólicos *in vivo* en tiempo real, utilizando el rastreo de isótopos estables, y la obtención de imágenes (*imaging*) en tiempo real de células o animales vivos, entre otros (Liu & Locasale, 2017).

La RMN tiene una serie de ventajas únicas sobre otras plataformas metabolómicas. En particular, la espectroscopía de RMN aplicada a la metabolómica destaca porque:

- Es una técnica no destructiva.
- Permite realizar determinaciones cuantitativas.
- Requiere poca o ninguna preparación, tratamiento o derivatización química de la muestra.
- Facilita la identificación rutinaria de distintos compuestos a partir de bases de datos.
- Es altamente automatizable y reproducible.



Además de estas fortalezas, la RMN es particularmente adecuada para detectar y caracterizar compuestos que son menos manejables para el análisis por cromatografía líquida (CL) acoplada a espectrometría de masas (CL-EM), como los azúcares, los ácidos orgánicos, los alcoholes, los polioles y otros compuestos altamente polares (Emwas et al., 2019). Sin embargo, algunas de las limitaciones de la RMN con respecto a la EM son: una baja sensibilidad, una menor cobertura de metabolitos por ejecución, un procesamiento espectral menos automatizado y un alto costo del equipo y del mantenimiento del mismo (Liu & Locasale, 2017).

#### 1.2.4 Análisis Cuantitativo por RMN (RMNc)

La RMN se considera una técnica analítica primaria porque existe una proporcionalidad directa entre el área de la señal y el número de núcleos que la originan. Por lo que, la intensidad de la señal es directamente proporcional a la concentración del analito. Como resultado, la RMN cuantitativa, RMNc (*quantitative nuclear magnetic resonance*), específicamente la RMN cuantitativa de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -RMNc (*qHNMR, quantitative  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance*), tiene ciertas ventajas sobre los métodos basados en CL: se pueden obtener datos estructurales y cuantitativos simultáneamente; el tiempo de preparación de la muestra es relativamente corto; la RMN no es destructiva; y la determinación simultánea de más de un analito en una mezcla es posible, pues no se requiere recalibración específica del compuesto. Este último punto también implica otro

aspecto importante de la  $^1\text{H}$ -RMNc, ya que esta técnica tiene la ventaja de no requerir el uso de materiales de referencia idénticos al analito para realizar análisis cuantitativos, como es el caso de los métodos tradicionales de cuantificación, sino que puede emplear cualquier estándar de calibración de elección altamente puro, químicamente estable e inerte (Gödecke et al., 2013). Hoy en día, la RMNc se aplica principalmente para identificar y cuantificar fármacos, metabolitos biológicos y productos naturales (Sun et al., 2017).

#### 1.2.4.1 Métodos de Cuantificación en RMNc.

En el campo específico de la RMNc, existen dos formas de realizar la cuantificación, en concreto: la absoluta y la relativa. La primera se basa en el empleo de un estándar de calibración adecuado, cuya pureza es conocida, en tanto que en la cuantificación relativa se mide la concentración molar relativa de múltiples compuestos en una muestra, por comparación de la señal espectral del analito con la señal propia de un estándar (Cullen et al., 2013; Gödecke et al., 2013).

A este respecto, pese a todas las ventajas que presenta la  $^1\text{H}$ -RMNc frente a los métodos cuantitativos basados en EM, la cuantificación de señales de RMN de manera exacta y reproducible es frecuentemente desafiante, a pesar del empleo de instrumentos con distintas intensidades de campo y la utilización de diferentes secuencias o anchos de pulsos, así como de distintos tiempos de

espera. De hecho, a pesar de un aumento constante en el número de publicaciones derivadas de la metabolómica basada en RMN centrada en biomarcadores de diagnóstico, solo unas pocas de éstas reportan niveles de metabolitos cuantificados de forma absoluta, pues, en la gran mayoría de los estudios de este tipo se hace uso de cuantificación relativa, la cual no involucra el proceso de validación (Emwas et al., 2016).

#### 1.2.4.2 Métodos de Calibración en RMNc

La cuantificación absoluta por RMNc se puede llevar a cabo por calibración interna o externa. Para la calibración interna, una cantidad definida de un material de referencia se agrega a la disolución de muestra. La cuantificación se realiza comparando las integrales (o una respuesta equivalente) del analito y la referencia (EUROLAB, 2014). Para obtener resultados de análisis exactos, los picos cuantitativos y los picos del estándar interno no deben presentar interferencia con ninguna otra señal (Sun et al., 2017).

Los resultados obtenidos por el método del estándar interno se consideran mejores en exactitud y precisión que los obtenidos por el método del estándar externo. Sin embargo, el uso de estándares internos resulta en la contaminación de los analitos, lo que constituye un serio inconveniente en la cuantificación de ciertos compuestos (Watanabe et al., 2016).

El método de cuantificación por estándar externo, en cambio, implica la comparación de la integral del analito y la de un compuesto externo a la muestra, para lo cual se pueden emplear curvas de calibración por estándar externo. Este método tiene la ventaja de recuperar los analitos sin ninguna contaminación (Watanabe et al., 2016).

#### 1.2.5 Parámetros de Adquisición y de Procesamiento para Métodos de $^1\text{H}$ -RMNc

Al desarrollar un método de cuantificación por  $^1\text{H}$ -RMNc es necesario tomar en cuenta dos grupos de parámetros clave: los de adquisición de datos y los de procesamiento (o post adquisición) de los mismos. Los primeros incluyen el ángulo de giro (*flip angle*), la espera interpulso (*inter pulse delay*, o simplemente *delay*, designado como D1), la ganancia del receptor (RG, *receiver gain*), el tiempo de adquisición (AQ, *acquisition time*) y el número de incrementos (NS, *number of scans*), entre otros, mientras que los parámetros de procesamiento comprenden la función de ventana (*window function*), el llenado de ceros (ZF, *zero filling*), el ajuste o corrección de fase (*phasing*) y la corrección de la línea base (*baseline correction*), entre otros (Gödecke et al., 2013).

En relación con los parámetros de adquisición, se pueden elegir ángulos de pulso de hasta  $90^\circ$ , pues este ángulo conduce a la máxima intensidad de señal con respecto al tiempo de medición empleado. Con el empleo de ángulos menores se requiere menos tiempo para alcanzar la relajación completa de los

núcleos, y por lo mismo, el tiempo de experimento es más corto; sin embargo, en este caso la intensidad de la señal no sería máxima. Respecto a la espera interpulso, se sugiere que ésta debe corresponder a 5 veces el valor del tiempo de relajación longitudinal,  $T_1$ , más alto de todas las señales evaluadas. Por otro lado, la ganancia del receptor debe establecerse de modo que no se produzca truncamiento del decaimiento libre de la inducción (FID, *free induction decay*) (EUROLAB, 2014). El tiempo de adquisición, por su parte, tiene un impacto en la línea base del espectro, y la optimización de este parámetro conduce a la eliminación de las necesidades de corrección de fase de primer orden (Gödecke et al., 2013).

En cuanto al número de incrementos o NS, el valor que tome este parámetro está relacionado con la sensibilidad, medida como una relación señal/ruido, S/R, pues ésta es proporcional a la raíz cuadrada del número de incrementos. La obtención de un espectro con más incrementos aumenta la sensibilidad. Sin embargo, se recomienda que el NS sea en múltiplos de  $2^n$ , al menos 4 u 8, para que se puedan completar los pasos mínimos del ciclo de fase de una secuencia de pulsos de RMN particular (Torres & Price, 2017).

En consideración a los parámetros de procesamiento, las funciones de ventana o de apodización (como la de Lorentz-Gauss, muy frecuentemente utilizada en RMN), tienen como objetivo ya sea incrementar la resolución o favorecer una relación S/R más alta en los espectros (Branco et al., 2015). De igual manera, el llenado de ceros permite aumentar la resolución. Aquí, los puntos de datos de amplitud cero se agregan al final del FID para aumentar el

número total de puntos de datos. Un aumento del doble en el número de estos puntos, mediante el ZF, tiene el efecto beneficioso de incrementar la resolución de los picos (hasta cierto punto), especialmente para la definición de estructuras de multiplete en los espectros de  $^1\text{H}$  (Torres & Price, 2017).

La corrección de fase es un proceso de ajuste espectral de RMN que tiene como objeto maximizar el carácter de absorción y la simetría de los picos de RMN en todas las regiones del espectro (Emwas et al., 2018). Finalmente, la corrección de la línea base tiene como fin remediar el problema de los artefactos en dicha línea, y para ello existen muchos procedimientos disponibles en el software de procesamiento (Torres & Price, 2017).

### **1.3 Validación de Métodos Basados en RMNc**

Una vez desarrollado un método de RMNc, es deseable que éste sea validado, mediante la evaluación de parámetros tales como: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), y robustez. La ventaja de los métodos validados es que permiten generar resultados con mayor confiabilidad analítica (EUROLAB, 2014). Adicionalmente, es deseable que se confirme la ausencia de efecto matriz (Fei et al., 2019). A continuación, se describen los parámetros de validación antes mencionados.

### 1.3.1 Especificidad

La especificidad se refiere a la capacidad de evaluar inequívocamente a un analito en presencia de componentes que pudieran interferir con el análisis. Normalmente, éstos pueden incluir impurezas, degradantes, matriz, etcétera (ICH, 1995). En el caso particular de la RMNc, la especificidad de las señales se asegura cuando éstas no se traslapan con las señales propias de otros componentes (EUROLAB, 2014). Para lograr este objetivo, se suelen analizar espectros de RMN en dos dimensiones (2D), con la finalidad de verificar que la asignación de señales sea irrefutable y de esta manera demostrar la especificidad (Gödecke et al., 2013).

### 1.3.2 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se refiere a su capacidad (en un intervalo de concentración dado) de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra (ICH, 1995). Para evaluar este parámetro se necesita construir una curva de calibración de al menos 5 niveles de concentración, y realizar el análisis estadístico apropiado, que corresponde al cálculo de una línea de regresión por el método de mínimos cuadrados (EUROLAB, 2014).

### 1.3.3 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. La precisión se expresa usualmente como la varianza, la desviación estándar o el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de una serie de mediciones, siendo ésta última la forma más común de expresión (ICH, 1995).

La precisión se puede considerar en diferentes niveles, incluyendo la repetibilidad, o precisión intradía, y la precisión intermedia. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un breve intervalo de tiempo, en tanto que la precisión intermedia expresa variaciones dentro de los laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etcétera (ICH, 1995).

### 1.3.4 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre el valor que es aceptado ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado (ICH, 1995).



Existen diferentes métodos para evaluar la exactitud, entre ellos:

- a) La aplicación de un procedimiento analítico a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un material de referencia).
- b) La comparación de los resultados del procedimiento analítico propuesto con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud es definida.
- c) La exactitud puede evaluarse una vez que la especificidad, la linealidad y la precisión se hayan establecido.

#### 1.3.5 Límite de Detección

El límite de detección de un procedimiento analítico es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto (ICH, 1995). En el campo de la RMNc, el LD se puede determinar de manera matemática o visual a partir del espectro. De manera matemática, el LD corresponde a la concentración para la cual la relación S/R es igual a 3. De manera visual, el LD es la mínima concentración con la cual el patrón de señales del analito es reconocible sin ninguna ambigüedad (EUROLAB, 2014). El LD además se puede calcular considerando la desviación estándar de la respuesta ( $\sigma$ ) y la pendiente de la curva de calibración (S):  $LD = 3.3\sigma / S$  (EUROLAB, 2014; Gödecke et al., 2013).

### 1.3.6 Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas (ICH, 1995). En RMNc, el LC se puede determinar experimentalmente por medio de múltiples mediciones a diferentes diluciones. El %DER se determina en cada caso y el LC es igual a la mínima concentración para la cual se obtiene un %DER aceptable (EUROLAB, 2014). Al igual que el LD, el LC se puede determinar basándose en la desviación estándar de la respuesta ( $\sigma$ ) y la pendiente de la curva de calibración ( $S$ ):  $LC = 10\sigma / S$  (EUROLAB, 2014; Gödecke et al., 2013).

### 1.3.7 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método, y proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal (ICH, 1995). Para la validación de la robustez en métodos de RMNc, las posibles influencias provenientes de diferentes fuentes asociadas con la adquisición o el procesamiento de los espectros deben ser consideradas y, en consecuencia, examinadas (EUROLAB, 2014).

### 1.3.8 Efecto Matriz

El efecto matriz es definido como la alteración o interferencia directa o indirecta en la respuesta que puede deberse a la presencia de analitos no deseados u otras sustancias interferentes en la muestra (Kadian et al., 2016). Dicho efecto puede influir drásticamente en el desempeño del análisis, tanto en la identificación como en la cuantificación del analito, es por ello que es relevante su evaluación como parte del proceso de validación (Zhou et al., 2017).

## **1.4 La RMNc Aplicada a Metabolómica de Orina**

La orina, en específico, proporciona una rica fuente de información, ya que generalmente contiene un número significativamente mayor de metabolitos detectables por RMN, en comparación con el suero, el plasma, las células o los tejidos (figura 7). Sin embargo, las contribuciones de numerosos factores, como la dieta, los medicamentos, los hábitos personales como la actividad física o el tabaquismo, el género, la edad, así como la genética, pueden afectar el metaboloma urinario y añadir complejidad al espectro. Además, las variaciones del pH y la concentración de sal inducen desplazamiento de las señales para muchos metabolitos, especialmente para aquellos con grupos funcionales con valores de pKa cercanos al pH fisiológico (Nagana Gowda & Raftery, 2017).

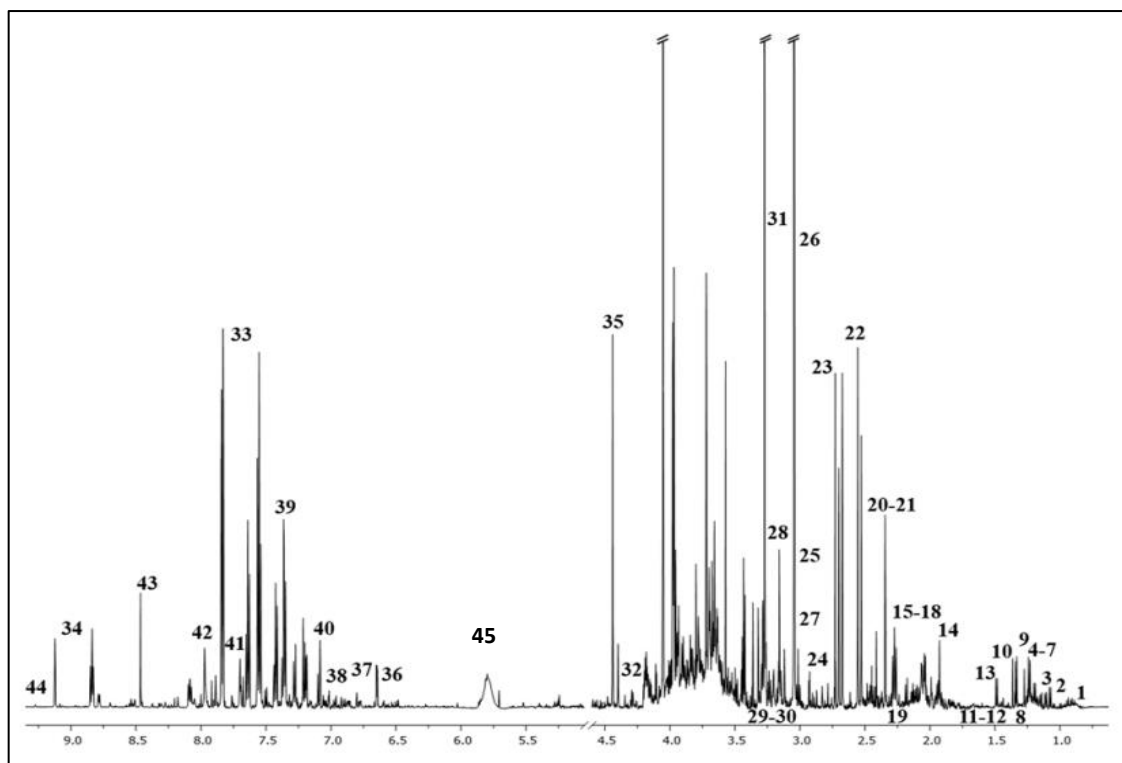


Figura 7. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN típico de orina humana, adquirido en un espectrómetro de 500 MHz. 1: NI\_1 (No identificado 1); 2: 3-Hidroxiisobutirato; 3: 3-metil-2-oxovalerato; 4: Isopropanol; 5: 3-Hidroxiisobutirato; 6: Metilmalonato; 7: Fucosa; 8, 3-Hidroxiisovalerato; 9: Lactato; 10: 2-Hidroxiisobutirato; 11: 2-Fenilpropionato; 12: NI\_2; 13: Alanina; 14: Acetato; 15: NI\_3; 16: NI\_4; 17: N-Isovaleroilglicina; 18: Acetona; 19: 2-Aminoácido; 20: NI\_5; 21: NI\_6; 22: Citrato; 23, Dimetilamina; 24: NI\_7; 25: Creatina; 26: Creatinina; 27, Carnitina; 28, TMMO; 29: NI\_8; 30: NI\_9; 31: Glicina; 32: Glicilprolina; 33: Hipurato; 34: Trigonelina; 35: Ascorbato; 36: 2-Furoilglicina; 37: 3-Hidroxifenilacetato; 38: Tirosina; 39: N-Fenilacetilglicina; 40: 3-Indoxilsulfato; 41: NI\_10; 42: Formiato; 43: NI\_11; 44: 1-Metilnicotinamida; 45: Urea. Obtenida de Wojtowicz, 2017.

De hecho, la enorme variación en las concentraciones químicas en la orina, debida a la diversidad de factores mencionados anteriormente, representa el

principal desafío espectroscópico asociado con el análisis de orina por RMN. Para contrarrestar en cierto grado tal variación, se puede realizar ya sea un ayuno de 12 horas antes de la recolección de la orina o la restricción del consumo de alimentos suplementarios que mejoran el rendimiento de las proteínas, como los batidos de proteínas, antes de cualquier recolección de muestra (Emwas et al., 2016).

Por otro lado, además de los parámetros de adquisición y procesamiento, descritos anteriormente, existen distintos factores relacionados con la recolección y el procesamiento de la muestra que necesitan ser considerados para permitir una cuantificación exacta y precisa de los metabolitos urinarios mediante metabolómica basada en RMN (Emwas et al., 2016).

#### 1.4.1 Procesamiento de la Muestra

La preparación de las muestras de orina generalmente es relativamente sencilla. Es necesario agregar un estándar de desplazamiento químico interno, una disolución amortiguadora preferentemente de fosfatos, y óxido de deuterio (o agua deuterada, D<sub>2</sub>O), la cual se utiliza como una frecuencia de anclaje para las desviaciones del campo magnético a largo plazo (Pereira Braga & Adamec, 2019). El ácido 2, 2, 3, 3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)-propiónico (TSP, 2, 2, 3, 3-*tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propionic acid*) es utilizado con frecuencia como referencia tanto de desplazamiento químico como de concentración interna.

Referente a la adición del amortiguador de fosfatos a las muestras, ésta es necesaria para minimizar las variaciones de pH y fuerza iónica (Tynkkynen et al., 2019).

Por último, desde un punto de vista práctico, los volúmenes de muestra necesarios para el análisis por RMN son cercanos a 0.50 mL de orina para un análisis óptimo (Barnes, 2016).

#### 1.4.2 Análisis por $^1\text{H}$ -RMNc de Orina Humana

El análisis cuantitativo de orina humana como parte de estudios de metabolómica basada en RMN es relativamente reciente, pues este tipo de estudios ganaron relevancia a partir de la primera década de este siglo. Los trabajos publicados a este respecto incluyen principalmente aquellos que buscan una asociación de la concentración de ciertos metabolitos con diversos estados patológicos, y los estudios que involucran el análisis de muestras de sujetos sanos son en realidad muy pocos. Estos últimos se han realizado con distintos motivos, como, por ejemplo, el estudio de la variación de los metabolitos urinarios, el desarrollo de métodos para el análisis cuantitativo de dichos metabolitos, y la cuantificación de metabolitos en la orina con fines epidemiológicos, entre otros. A continuación, se presentará un panorama general de antecedentes referente a la RMNc aplicada a metabolómica de orina en sujetos sanos.

En 2007, por ejemplo, Saude y colaboradores, realizaron un estudio longitudinal en el que investigaron el grado de variación de los metabolitos urinarios. Para ello, analizaron por  $^1\text{H}$ -RMN muestras de orina del mismo individuo en días diferentes, así como la variación en la composición de la orina entre individuos, considerando una cohorte de sujetos sanos, con el fin de proporcionar una línea base metabólica de la orina humana normal, necesaria para que los estudios metabolómicos y clínicos futuros se basen en ella. La recolección de las muestras se llevó a cabo durante 30 días. La cuantificación por  $^1\text{H}$ -RMN se realizó de manera relativa e involucró al singulete del metilo del 2, 2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS, sodium 2, 2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate) para la comparación. Este compuesto además sirvió como estándar interno de desplazamiento químico. La identificación espectral y la cuantificación de 24 metabolitos claramente identificables se llevaron a cabo empleando el programa Chenomx Suite (Saude et al., 2007).

Shaykhutdinov y colaboradores, en 2009, compararon la cuantificación por  $^1\text{H}$ -RMN con la realizada por RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN, con la finalidad de definir áreas de aplicación potenciales en las cuales el análisis por  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN es superior. Ellos identificaron y cuantificaron 50 metabolitos en 2 muestras de orina humana, empleando  $^1\text{H}$ -RMN, mientras que con la  $^{13}\text{C}$ -RMN, lograron identificar y cuantificar 29 metabolitos en una de las muestras, y 31 en la otra. En ambos casos se realizó cuantificación relativa, utilizando una base de datos creada por ellos mismos y con 120 metabolitos

incorporados, empleando el programa Chenomx Suite (Shaykhutdinov et al., 2009).

Por su parte, Da Silva y colaboradores, en el año 2013, plantearon un método de RMN de alto rendimiento automatizado para el análisis de la orina, con el objetivo de ser sometido al análisis metabólico a gran escala de la misma, en estudios en los que se dispone de un gran número de muestras. Para este estudio se analizaron 3,007 muestras de orina de sujetos sanos de ambos géneros, mediante inyección de flujo automatizada. La cuantificación se realizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN, de manera absoluta para el ácido hipúrico, el ácido succínico, la alanina y la glucosa, y de forma relativa para el resto de los metabolitos detectados, usando en este caso una base de datos dentro del programa AMIX (Da Silva et al., 2013).

Finalmente, en 2019, Tynkkynen y colaboradores, emplearon un método de  $^1\text{H}$ -RMN para la cuantificación de 43 metabolitos en la orina de 1,004 personas, con el fin de facilitar los estudios de metabolómica de orina a gran escala. La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo de manera relativa, empleando el TSP como referencia de concentración interna (Tynkkynen et al., 2019).

Como se muestra en estos antecedentes, la cuantificación de metabolitos llevada a cabo por RMN, como parte de distintos estudios de metabolómica de orina en sujetos sanos, es relativa en la mayoría de los casos, lo cual habla de la pertinencia de desarrollar métodos de cuantificación absoluta, la cual brinda mayor confiabilidad analítica a los resultados generados, y con ello, mayor



certeza a las aseveraciones que se puedan hacer en torno a un biomarcador o un hallazgo en particular.

## 1.5 Justificación

La  $^1\text{H}$ -RMNc presenta una serie de ventajas importantes para su empleo en estudios de metabolómica de biofluidos. La orina, además, presenta diversas facilidades en torno a su obtención y análisis, y es utilizada para diversas aplicaciones de estudios de metabolómica en el área médica.

El desarrollo de métodos analíticos validados para la cuantificación absoluta de metabolitos en orina ya sea empleando calibración interna o externa, es sustentado por el hecho de que la mayoría de los métodos existentes empleando RMN se basan en cuantificación relativa.

Este trabajo plantea la obtención de un método validado basado en RMNc con aplicación en el análisis de orina.

## **1.6 Objetivo General**

Desarrollar y validar un método por resonancia magnética nuclear para la cuantificación de metabolitos presentes en la orina humana.

## **1.7 Objetivos Específicos**

1. Seleccionar los metabolitos a cuantificar a través de la revisión bibliográfica y la información de trabajos previos realizados en el Departamento de Química Analítica.
2. Determinar los parámetros instrumentales para la adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los metabolitos y las variables de procesamiento.
3. Establecer las metodologías basadas en el uso de estándar interno y estándar externo para la cuantificación de los metabolitos por  $^1\text{H}$ -RMN.
4. Evaluar la aplicabilidad del método con las características de desempeño más convenientes para la cuantificación de los metabolitos en orina humana.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Materiales, Equipos, Reactivos, Programas de Cómputo y Muestras**

##### **Biológicas**

###### Materiales

- Criocajas para tubos cónicos
- Crioviales de 1.8 mL, Corning Incorporated
- Espátulas
- Gradillas para tubos cónicos y tubos de RMN
- Matraces de aforación Clase A de 1, 2 y 5 mL, Kimax
- Pipetas automáticas de 2-20, 20-200 y 100-1,000  $\mu\text{L}$ , Thermo Scientific,
- Pipetas Pasteur
- Pissetas
- Probeta de 25 mL, Sibata Scientific Technology
- Puntillas de 2-20, 20-200 y 100-1,000  $\mu\text{L}$ , Corning Incorporated
- Tubos cónicos de plástico de 1.5 mL y 2.0 mL, Eppendorf
- Tubos de RMN estándar de 5 mm x 7 pulgadas, Bruker

- Vasos de precipitado de 50 mL, Pyrex

## Equipos

- Agitador Vórtex Maxi Mix II modelo 37,600, Thermolyne
- Balanza analítica modelo PA214C, Pioneer
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Avance III HD 400 MHz equipado con una sonda SP BBO de 5 mm con gradientes de campo en Z, Bruker
- Microcentrífuga, miniSpin plus
- Microcentrífuga modelo D1008, DLAB
- Potenciómetro modelo Starter 3100, OHAUS
- Sonicador modelo 1510, Branson

## Reactivos

- Ácido glicólico, 99.0%, Sigma
- Ácido hipúrico, 98.0%, Sigma
- Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey
- Oxido de deuterio o agua deuterada ( $D_2O$ ), 99.9% átomos de D, con 0.75% p/v de ácido 2, 2, 3, 3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)-propiónico (TSP), Sigma
- Citrato de sodio tribásico dihidratado,  $\geq 99.0\%$ , Sigma
- Creatinina,  $\geq 98.0\%$ , Sigma

- D-Glucosa, Sigma
- Dimetilamina HCl, 99.0%, Sigma
- Disoluciones para calibración del potenciómetro pH 4, 7 y 10.
- Fosfato de sodio dibásico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 98.5 – 101.0%, Sigma.
- Fosfato de sodio monobásico dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\geq 99.0\%$ , Sigma.
- Glicina,  $\geq 98.5\%$ , Sigma
- HCl 12 N
- Imidazol, grado estándar de referencia certificado, Sigma
- L-Alanina,  $\geq 99.5\%$ , Sigma
- L-Glutamina,  $\geq 99.5\%$ , Sigma
- L-Histidina, Jalmek
- Monohidrato de creatina,  $\geq 98.0\%$ , Sigma
- NaOH, 98.4%, CTR Scientific
- N-óxido de trimetilamina (TMNO), 95.0%, Sigma
- Taurina,  $\geq 99.0\%$ , Sigma
- Trigonelina HCl, Sigma

#### Programas de Cómputo

- Chenomx NMR Suite version 8.6
- Microsoft Excel versión 2114

- MODDE versión 13.0, Sartorius
- TopSpin versión 3.6.2, Bruker

### Muestras Biológicas

- Las muestras de orina utilizadas en este trabajo fueron colectadas dentro del proyecto “Estudio del perfil metabólico de la enfermedad renal crónica asociada a diabetes mellitus tipo 2 como estrategia para la identificación de biomarcadores relacionados con la progresión” con el número de registro HI19-00001, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **2.2 Selección de los Metabolitos a Cuantificar**

Para definir los metabolitos a analizar dentro de este proyecto de tesis se realizó un proceso de selección que se dividió en 3 etapas:

- a) Como primer filtro de selección, partir de los datos publicados para el Metaboloma Urinario Humano se identificaron los metabolitos con ocurrencia del 100% en las muestras de orina analizadas mediante RMN por Boutra y colaboradores (2013).
- b) Posteriormente, como segundo filtro, se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos en donde se reporta la cuantificación por RMN

de metabolitos en orina de sujetos sanos, y se identificaron aquellos metabolitos que fueron reiterativamente mencionados entre los distintos artículos y que, adicionalmente, cumplían con el requisito de la primera etapa.

- c) Finalmente, como tercer filtro, se consideraron los datos de cuantificación de metabolitos urinarios de trabajos experimentales realizados previamente en el Departamento de Química Analítica (DQA) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por lo que se seleccionaron los metabolitos con mayor abundancia y alto porcentaje de ocurrencia, y que además cumplían con el requisito establecido en la segunda etapa.

### **2.3 Evaluación de los Parámetros de Adquisición y Procesamiento**

Para la evaluación de los parámetros de adquisición y procesamiento, se prepararon disoluciones de 10 analitos de prueba y del estándar interno de imidazol. Para ello, se pesaron las cantidades de cada compuesto mostradas en la tabla 1, y se disolvió cada uno de ellos con agua bidestilada. Para la completa disolución de la creatina, la glutamina y la taurina fue necesario agregar HCl 12 N. En la tabla 1 se muestran los volúmenes de disoluciones madre preparados y las concentraciones de dichas disoluciones.



Tabla 1. Cantidades pesadas de cada analito para la preparación de las disoluciones madre para las pruebas preliminares.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad pesada (mg)</b>	<b>Volumen de aforo (mL)</b>	<b>Concentración (mM)</b>
Citrato	420.6	5.00	286.03
Creatina	124.4	2.00	416.67
Creatinina	56.8	5.00	100.00
Glicina	125.6	5.00	333.33
Glucosa	150.0	2.00	416.67
Glutamina	121.7	2.00	416.67
Histidina	130.1	2.00	416.67
Taurina	104.4	2.00	416.67
TMNO	62.2	2.00	416.67
Trigonelina	144.6	2.00	416.67
Imidazol	27.3	5.00	80.00

Adicionalmente, se preparó una disolución secundaria con los 7 metabolitos menos abundantes (7MMA): creatina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, N-óxido de trimetilamina (TMNO) y trigonelina. Para ello, se transfirieron 300  $\mu$ L de la disolución madre de cada uno de los 7 metabolitos a un mismo matraz de aforación de 5 mL, y se llevó al aforo con agua bidestilada, generando una disolución secundaria de concentración 25.00 mM para cada uno de estos compuestos.

Además, se preparó una disolución secundaria de citrato y glicina, transfiriendo 1 mL de las disoluciones madre correspondientes a un matraz de

aforación de 5 mL, y llevando al aforo con agua bidestilada, de manera que se obtuvo una disolución 57.21 mM para citrato, y 66.67 mM para glicina.

A partir de las disoluciones secundarias mencionadas, se construyó una curva de calibración preliminar para cada uno de los 10 metabolitos, conformada por 5 niveles de concentración, preparada por triplicado.

Para la preparación de las disoluciones de trabajo, además, se empleó imidazol, con el objetivo de evaluar su utilización como estándar interno. La concentración final de imidazol en cada uno de los niveles fue de 4.00 mM. Adicionalmente, para reducir la variabilidad por cambios de pH se añadió una disolución amortiguadora de fosfatos 1.00 M pH 7.4, de modo que la concentración final fue de 100.00 mM (dilución 1:10). Se añadió agua deuterada, D<sub>2</sub>O, a una concentración final de 10.00% v/v, la cual contenía el ácido 2, 2, 3, 3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)-propiónico (TSP), que se utilizó como referencia de desplazamiento químico. Finalmente, las disoluciones de trabajo se llevaron a 2 mL de aforo. Las concentraciones de los distintos analitos en los 5 niveles de concentración se muestran en la tabla 2.

Una vez preparadas las disoluciones de trabajo, se utilizó un espectrómetro de RMN de 400 MHz de Bruker y se obtuvieron espectros de <sup>1</sup>H-RMN 1D utilizando la secuencia NOESYPR1D para la supresión de la señal del agua, empleando los parámetros de adquisición que se presentan en la tabla 3, con temperatura controlada de 25.0 °C.

Tabla 2. Niveles de concentración para la realización de las curvas de calibración preliminares.

Nivel de concentración	Concentración de los distintos componentes						
	7MMA* (mM)	Citrato (mM)	Glicina (mM)	Creatinina (mM)	Imidazol (mM)	D <sub>2</sub> O (% v/v)	Buffer de fosfatos pH= 7.4 (mM)
1	0.50	0.43	0.50	0.50	4.00	10.00	100.00
2	1.00	0.86	1.00	5.00	4.00	10.00	100.00
3	2.00	3.34	4.00	10.00	4.00	10.00	100.00
4	3.50	8.58	10.00	20.00	4.00	10.00	100.00
5	5.00	12.87	15.00	30.00	4.00	10.00	100.00

\* 7MMA= Creatina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina.

Tabla 3. Parámetros para la adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMNc utilizando la secuencia de pulsos NOESYPR1D.

<b>Parámetro de adquisición</b>	<b>Valor</b>
Ángulo de giro	90°
Tiempo de adquisición (AQ)	5.45 s
Número de incrementos (NS)	32
Ventana espectral (SW)	15.02 ppm
Número de puntos (TD)	65,536

Adicionalmente, se evaluaron distintos valores de la ganancia del receptor (RG) y la espera interpulso (D1) (tabla 4), empleando las disoluciones de los niveles de concentración 1 y 5.

Tabla 4. Valores de ganancia del receptor y espera interpulso evaluados para la selección de parámetros de adquisición.

<b>Experimento</b>	<b>Valor de RG (dB)</b>	<b>Valor de D1 (s)</b>	<b>Nivel de concentración</b>
1	114	5	1
2	64	5	1
3	114	10	1
4	64	10	1
5	114	15	1
6	64	15	1
7	114	10	5
8	64	10	5

En cuanto al procesamiento postadquisición, en todos los espectros se procesó el FID utilizando una multiplicación exponencial (EM) con factor de ensanchamiento de línea (LB, *line broadening*) de 0.1 Hz, un ajuste de fase de tipo manual, llevado a cabo con corrección de orden 0, y una corrección de la línea base con el algoritmo ABSN. Finalmente, el espectro se calibró con la señal singulete del TSP, a un desplazamiento químico de 0.00 ppm. Tanto el procesamiento como el análisis de los espectros se realizaron con el software TopSpin de Bruker.

#### **2.4 Asignación de las Señales en los Espectros de RMN**

La asignación de las señales en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los metabolitos y del imidazol se realizó comparando distintos datos espectrales encontrados en la HMDB (como son el desplazamiento químico y la multiplicidad de las señales) con los obtenidos de forma experimental.

Asimismo, se consideraron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN individuales de los metabolitos, depositados en la Base de Datos disponible en el laboratorio de RMN del DQA. De igual forma, se tomaron en cuenta datos como el desplazamiento químico y la multiplicidad.

Además, se utilizó la base de datos del programa Chenomx NMR Suite. En este software, las señales a evaluar son comparadas con las señales de la base de datos del programa. Para realizar la comparación, se considera el intervalo

de desplazamientos químicos posibles para cada señal, así como su multiplicidad.

Adicionalmente, se obtuvo el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, así como espectros 2D (COSY, HSQC y TOCSY) para verificar la asignación. Para ello, en el espectro COSY, se verificó la correlación  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  a 2, 3 o 4 enlaces de distancia; en el espectro HSQC, se comprobó la correlación  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a 1 enlace de distancia; y, en el espectro TOCSY, se revisó la correlación de los protones pertenecientes al mismo sistema de espines.

Debido que algunos analitos presentan varias señales de resonancia, fue necesario realizar una selección de las señales a evaluar tomando como criterios de selección la aparente ausencia de traslape y la intensidad de la señal. De modo que se evaluó una señal por metabolito, excepto para el citrato y la trigonelina, para los cuales se evaluaron 2 y 3 señales, respectivamente, debido a que estas señales cumplían con los criterios antes mencionados.

## **2.5 Determinación de los Intervalos de Concentración de los Metabolitos**

Para la determinación de los intervalos de concentración de los metabolitos se consideraron los valores de concentración reportados en distintos artículos de cuantificación relativa por RMN de metabolitos en orina de sujetos sanos, además de los datos experimentales de cuantificación relativa de metabolitos

urinarios incluidos en el proyecto del metaboloma urinario de la ERC del DQA, el cual incluye datos de sujetos sanos.

Sin embargo, además de la búsqueda en la literatura, se realizaron pruebas de comparación de los espectros obtenidos a partir de los niveles de las curvas de calibración preliminares y los obtenidos a partir de 3 muestras de orina de sujetos sanos, con el fin de ajustar los límites inferiores de las curvas y establecer los intervalos de concentración definitivos.

Para la preparación de las muestras se transfirieron 600  $\mu\text{L}$  de la muestra, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  y 100  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 1.00 M pH= 7.4, a un matraz de aforación de 1 mL, y se llevó al aforo con agua bidestilada. Enseguida se centrifugó la disolución generada durante 5 minutos, a 13,000 x g, posteriormente, se tomó una alícuota de 700  $\mu\text{L}$  que fue transferida al tubo de RMN de 5 mm. Para la adquisición y procesamiento de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se consideraron los mismos parámetros mostrados en la sección 2.3, llevando a cabo un análisis por triplicado.

## **2.6 Evaluación del Imidazol como Estándar Interno**

La evaluación del imidazol para ser utilizado como estándar interno se llevó a cabo mediante la adición de una disolución madre de imidazol a 3 diferentes muestras de orina de sujetos sanos. La ausencia de traslape de la(s) señal(es)

del imidazol con las señales propias de los metabolitos urinarios indica la factibilidad de que el imidazol sea empleado como estándar interno.

Para ello, se tomaron 1,400  $\mu\text{L}$  de la muestra de orina, 100  $\mu\text{L}$  de disolución madre de imidazol (para una concentración final de imidazol de 4.00 mM), 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  y 200  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 1.00 M pH= 7.4, llevando a un volumen de 2 mL. Posteriormente, las muestras se centrifugaron bajo las mismas condiciones que se mencionan en la sección anterior, e igualmente se transfirió una alícuota de la muestra centrifugada al tubo de RMN, para la posterior adquisición y procesamiento de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, bajo las condiciones descritas en el apartado 2.3.

## **2.7 Validación del Método de $^1\text{H}$ -RMNc**

La validación del método de  $^1\text{H}$ -RMNc se realizó siguiendo las pautas marcadas por la Guía para el Desarrollo y Validación de Métodos por RMN de la Federación Europea de Asociaciones Nacionales de Laboratorios de Ensayo, Calibración y Análisis (EUROLAB) (EUROLAB, 2014), y la guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) (FDA & CDER, 2018).

En primera instancia se evaluó la especificidad, y posteriormente, se evaluó la siguiente serie de: linealidad, precisión intradía, precisión intermedia, exactitud del sistema, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud del método y robustez, tanto por el método de estándar externo, como



por el método de estándar interno (empleando imidazol), los cuales se evaluaron a la par.

Para llevar a cabo este objetivo, todas las disoluciones analizadas fueron preparadas a una concentración 4.00 mM de imidazol (grado estándar de referencia certificado), 10.00% v/v de D<sub>2</sub>O y 100.00 mM de buffer de fosfatos pH= 7.4, empleando agua bidestilada para completar un aforo de 2 mL. En el caso de las pruebas que involucraron el empleo de muestras de orina, se siguió el procedimiento marcado en la sección 2.5 para la disolución de la mezcla de orinas. Por otro lado, la adquisición y procesamiento de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se realizó considerando las condiciones indicadas en el apartado 2.3.

#### 2.7.1 Preparación de las Disoluciones de Trabajo

En primer lugar, se prepararon 15 disoluciones madre correspondientes a los 14 metabolitos seleccionados para cuantificar (ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, citrato, creatina, creatinina, dimetilamina, glicina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina) y al estándar interno de imidazol. Para esto, se pesaron las cantidades mostradas en la tabla 5, y se disolvió cada compuesto con agua bidestilada. Para favorecer la disolución de la creatina, la glutamina y la taurina se adicionó HCl 12 N, y para disolver al ácido hipúrico se agregó NaOH. En la tabla 5 además se muestran los volúmenes de disoluciones madre preparados y su concentración.

Tabla 5. Cantidad pesada, volumen y concentración de cada analito para la preparación de las distintas disoluciones madre.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad pesada (mg)</b>	<b>Volumen de aforo (mL)</b>	<b>Concentración (mM)</b>
Ácido glicólico	63.4	2.00	416.67
Ácido hipúrico	149.4	2.00	416.67
Alanina	74.1	2.00	416.67
Citrato	490.3	5.00	333.33
Creatina	124.4	2.00	416.67
Creatinina	56.6	5.00	100.00
Dimetilamina	68.4	2.00	416.67
Glicina	125.0	5.00	333.33
Glucosa	150.1	2.00	416.67
Glutamina	121.7	2.00	416.67
Histidina	129.2	2.00	416.67
Taurina	104.4	2.00	416.67
TMNO	62.7	2.00	416.67
Trigonelina	144.7	2.00	416.67
Imidazol	27.2	5.00	80.00

Posteriormente, se preparó una disolución secundaria de ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, creatina, dimetilamina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina, designados como metabolitos menos abundantes (MMA). Para ello, se transfirieron 300  $\mu$ L de la disolución madre de cada uno de estos metabolitos a un mismo matraz de aforación de 5 mL, y se llevó al aforo con agua bidestilada, de manera que se obtuvo una disolución secundaria de MMA en donde cada uno tiene una concentración de 25.00 mM.

Asimismo, se preparó una disolución secundaria de citrato y glicina, transfiriendo 1 mL de las disoluciones madre de estos 2 compuestos a un matraz de aforación de 5 mL, y llevando al aforo con agua bidestilada, obteniendo concentraciones de citrato y glicina de 66.67 mM.

Por último, se prepararon 6 niveles de concentración, por triplicado, para construir las diferentes curvas de calibración. En la tabla 6 se indican las concentraciones correspondientes a cada nivel.

#### 2.7.2 Evaluación de la Especificidad de las Señales en la Mezcla de Analitos

La especificidad de las señales en la mezcla de los 14 metabolitos e imidazol se evaluó por medio de la adquisición del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN 1D, así como los experimentos 2D: COSY, HSQC y TOCSY. Para la obtención de estos espectros se utilizó una disolución del nivel 6 de concentración. El criterio para la confirmación de la especificidad correspondió a la ausencia de traslape de las señales de interés (EUROLAB, 2014).

Tabla 6. Concentración de las disoluciones para la realización de las curvas de calibración.

Nivel de concentración	Concentración de los distintos componentes					
	MMA* (mM)	Citrato y glicina (mM)	Creatinina (mM)	Imidazol (mM)	D <sub>2</sub> O (% v/v)	Buffer de fosfatos pH= 7.4 (mM)
1	0.20	0.20	0.20	4.00	10.00	100.00
2	0.50	0.50	0.50	4.00	10.00	100.00
3	1.00	1.00	5.00	4.00	10.00	100.00
4	2.00	4.00	10.00	4.00	10.00	100.00
5	3.50	10.00	20.00	4.00	10.00	100.00
6	5.00	15.00	30.00	4.00	10.00	100.00

\* **MMA**= Ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, creatina, dimetilamina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina.

### 2.7.3 Evaluación de la Linealidad

Para la evaluación de la linealidad, a partir de los datos obtenidos por integración manual de las señales de los metabolitos (con el programa TopSpin), se construyeron las curvas de calibración de los 14 metabolitos empleando:

- a) El método de estándar externo (EE), graficando el área de la señal en función de la concentración.
- b) El método de estándar interno (EI), graficando la relación de áreas metabolito/imidazol en función de la concentración.

En el caso particular de la glucosa, para las curvas de calibración se consideró la suma de las áreas correspondientes a las 2 señales generadas a partir del protón enlazado al carbono anomérico (4.65 y 5.24 ppm). Por otra parte, la única señal factible de evaluación para la taurina (3.42 ppm) presentó un problema de traslape, y por ello se recurrió al proceso de deconvolución utilizando el algoritmo disponible en el programa TopSpin. Mediante este procedimiento se determinó la contribución de la taurina en el conjunto total de señales, y una vez obtenido el valor del área correspondiente, se realizaron las curvas de calibración para este compuesto.

Para evaluar la linealidad se llevó a cabo un análisis de regresión por ambos métodos de calibración y se evaluó si el aspecto de las curvas de calibración generadas era lineal, la distribución de los residuales en el gráfico de los mismos, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el %DER de los factores de

respuesta (FR), considerando en este último caso los 18 replicados de las curvas (ICH, 1995).

#### 2.7.4 Evaluación de la Precisión

La precisión intradía se evaluó a través del cálculo del %DER de las áreas (EE) y las relaciones de áreas obtenidas (EI) para los niveles 1, 3 y 6 de concentración, mediante la ecuación 1, en donde el término  $s$  corresponde a la desviación estándar, en tanto que  $x$  corresponde al promedio (ICH, 1995; Miller JN & Miller JC, 2002).

$$\%DER = \left( \frac{s}{x} \right) (100) \quad (1)$$

Para evaluar la precisión intermedia se calculó el %DER (ecuación 1) de las áreas (EE) y las relaciones de áreas (EI) correspondientes a los niveles 1, 3 y 6 de concentración, realizados a partir de disoluciones madre preparadas de forma independiente, durante 3 días no consecutivos (ICH, 1995).

#### 2.7.5 Evaluación de la Exactitud del Sistema

La evaluación de la exactitud del sistema se realizó por medio del cálculo del % de error, de acuerdo con la ecuación 2, para 3 niveles de concentración nuevos, dentro de los intervalos de concentración establecidos para las curvas

de calibración, los cuales fueron preparados de manera independiente, en días diferentes, y por triplicado (del Campo et al., 2016; ICH, 1995).

$$\% \text{ de error} = \left( \frac{\text{Concentración calculada} - \text{Concentración real}}{\text{Concentración real}} \right) (100) \quad (2)$$

En la tabla 7 se muestra la concentración de las disoluciones empleadas para la evaluación de la exactitud del sistema.

#### 2.7.6 Determinación del Límite de Detección y del Límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) se prepararon 6 disoluciones adicionales (0.10, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 y 0.01 mM), a partir de una disolución a una concentración de 0.20 mM para cada uno de los 14 metabolitos. Esta disolución terciaria fue preparada a partir de 40  $\mu\text{L}$  de disolución secundaria de MMA, 15  $\mu\text{L}$  de disolución secundaria de citrato y glicina, y 10  $\mu\text{L}$  de disolución madre de creatinina, a un volumen de aforo de 5 mL.

Una vez adquiridos todos los espectros de  $^1\text{H-RMN}$ , se determinó el LD de cada metabolito, el cual correspondió a la mínima concentración de analito que permitió el reconocimiento del patrón de señales sin ninguna ambigüedad (EUROLAB, 2014). Cabe aclarar que este método de determinación visual depende del criterio del analista.

Tabla 7. Concentración de las disoluciones para la evaluación de la exactitud del sistema.

Nivel de concentración	Concentración de los distintos componentes					
	MMA* (mM)	Citrato y glicina (mM)	Creatinina (mM)	Imidazol (mM)	D <sub>2</sub> O (% v/v)	Buffer de fosfatos pH= 7.4 (mM)
E1**	0.40	0.40	0.40	4.00	10.00	100.00
E2	2.50	7.50	15.00	4.00	10.00	100.00
E3	4.00	12.00	25.00	4.00	10.00	100.00

\* **MMA**= Ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, creatina, dimetilamina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina.

\*\* La letra “E” designa los niveles adicionales (diferentes a los de las curvas de calibración), para la evaluación de la exactitud del sistema.



Por otro lado, se determinó también el LC para cada metabolito, el cual correspondió a la mínima concentración de analito que arrojó valores de %DER y % de error aceptables, considerando para estos cálculos las concentraciones obtenidas mediante el empleo de las ecuaciones de regresión obtenidas (tanto por EE como por EI) (EUROLAB, 2014; Gödecke et al., 2013; ICH, 1995).

### 2.7.7 Evaluación de la Exactitud del Método

La evaluación de la exactitud del método se realizó por medio de la adición a una mezcla (o “pool”) de muestras de orina. De manera inicial, se preparó la mezcla en cuestión, conformada por volúmenes iguales de 3 muestras de orina de sujetos sanos. Una vez obtenida la mezcla, se transfirió 1 mL de la misma a un matraz de aforación de 2 mL, así como las cantidades de disolución madre de imidazol, D<sub>2</sub>O y buffer de fosfatos 1.00 M pH= 7.4 requeridas (para una concentración final de 4.00 mM para el imidazol, 10.00% v/v para el D<sub>2</sub>O, y 100.00 mM para el buffer de fosfatos), y se llevó al aforo con agua bidestilada. Posteriormente, se adquirió por triplicado el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la mezcla de orinas, con el fin de calcular la concentración de todos los metabolitos, y con base en ello, se calculó la cantidad de cada estándar que sería añadida al “pool”.

Para la adición de los metabolitos a la mezcla de muestras, se partió de la disolución secundaria de MMA 25.00 mM, preparada tal cual se describe en la

sección 2.7.1, así como de una disolución secundaria 125.00 mM de citrato y glicina y una disolución madre 467.00 mM de creatinina. La adición se realizó a 3 niveles de concentración y por triplicado. Las concentraciones añadidas se muestran en la tabla 8.

Posterior a la adición de la mezcla de muestras, se adquirieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes y se calculó el % de recuperación (ecuación 3), tomando en cuenta para ello las respuestas (o áreas) observadas y esperadas, para cada uno de los 3 niveles, y para cada metabolito (ICH, 1995); (Calderón Tobar et al., 2014); (Tioosi et al., 2012). Además de ello, se calculó el %DER de las respuestas obtenidas en los 3 niveles. Tanto para el % de recuperación como para el %DER se calculó el promedio de los resultados obtenidos en los 3 niveles de adición.

$$\% \text{ de recuperación} = \left( \frac{\text{Respuesta observada}}{\text{Respuesta esperada}} \right) (100) \quad (3)$$

Tabla 8. Concentración de las disoluciones para la evaluación de la exactitud del método.

Nivel de adición	Concentración de los distintos componentes					
	MMA* (mM)	Citrato y glicina (mM)	Creatinina (mM)	Imidazol (mM)	D <sub>2</sub> O (% v/v)	Buffer de fosfatos pH= 7.4 (mM)
A1**	0.50	2.50	3.50	4.00	10.00	100.00
A2	1.50	7.50	10.50	4.00	10.00	100.00
A3	2.00	12.50	17.50	4.00	10.00	100.00

\* **MMA**= Ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, creatina, dimetilamina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina.

\*\* La letra "A" designa los niveles de adición, para la evaluación de la exactitud del método.

### 2.7.8 Evaluación de la Robustez

Para la evaluación de la robustez se generó un diseño de experimentos (DOE, *design of experiments*) de tipo factorial completo, a 2 niveles, empleando el programa MODDE versión 13.0. El diseño consistió en 11 diferentes experimentos, de los cuales, 8 se realizaron variando las condiciones originales, y 3 correspondieron a los replicados del “punto central”, es decir, aquellos experimentos que se realizaron bajo las condiciones estándar.

Los factores estudiados fueron los microlitros de buffer de fosfato añadidos ( $\mu\text{L}$  de buffer), la temperatura de la muestra durante la adquisición y la espera interpulso (D1). Cabe mencionar que los  $\mu\text{L}$  de buffer hacen referencia a la cantidad añadida del par ácido-base y no producen ningún efecto de dilución, ya que se llevó al mismo volumen de aforo.

Las respuestas involucradas correspondieron al área de la señal de la alanina en 1.48 ppm, representativa de la región alifática, el área de la señal de la creatina en 3.93 ppm, representativa de la parte del espectro en la cual aparecen los protones unidos a grupos o elementos electronegativos, y el área de la señal de la trigonelina en 8.84 ppm, representativa de la zona aromática del espectro.

Las disoluciones analizadas correspondieron al nivel 3 de la curva de calibración, es decir, 1.00 mM para los MMA, el citrato y la glicina, y 5.00 mM para la creatinina, y, por lo tanto, se prepararon como se indica en la tabla 6, omitiendo la adición de imidazol y modificando el volumen de buffer añadido,

según el experimento. En la tabla 9 se muestran los valores altos y bajos evaluados para cada factor estudiado, mientras que en la tabla 10 se presenta el diseño de experimentos que se desarrolló.

Tabla 9. Factores involucrados en la evaluación de la robustez.

<b>Factor</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Nivel original</b>	<b>Nivel alto</b>
μL de buffer	198	200	202
Temperatura (°C)	24.8	25.0	25.2
D1 (s)	9	10	11

Tabla 10. Experimentos realizados para la evaluación de la robustez.

<b>Número de experimento</b>	<b>Orden de realización</b>	<b>μL de buffer</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>D1 (s)</b>
1	7	198	24.8	9
2	11	202	24.8	9
3	3	198	25.2	9
4	1	202	25.2	9
5	5	198	24.8	11
6	6	202	24.8	11
7	8	198	25.2	11
8	9	202	25.2	11
9	2	200	25.0	10
10	4	200	25.0	10
11	10	200	25.0	10

Una vez realizados todos los experimentos, y adquiridos los 11 diferentes espectros, se integró la señal de la alanina, la de la creatina y la de la trigonelina. Posteriormente, las áreas obtenidas fueron empleadas para la

generación de 3 modelos distintos, y se evaluó la siguiente serie de parámetros (Umetrics AB, 2000):

- Coeficiente de determinación ( $R^2$ )
- Bondad de predicción ( $Q^2$ )
- Significancia de la regresión (ANOVA)
- Gráfico de coeficientes

## **2.8 Evaluación del Efecto Matriz**

La evaluación del efecto matriz se llevó a cabo mediante el método de adición estándar. Para ello, se realizó una mezcla de muestras de orina (tal como se describe en la sección 2.7.7) y se adicionaron 5 diferentes niveles de concentración de estándar, utilizando las disoluciones secundarias y madre destinadas para la evaluación de la exactitud del método. Los 5 niveles de concentración añadidos para evaluar el efecto matriz se presentan en la tabla 11.

Posterior a la adición de las 5 concentraciones, se adquirieron por triplicado los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  tanto de la mezcla sin adición como de los 5 niveles de adición, y a partir de ello, se construyeron las curvas de calibración por adición estándar correspondientes a los 14 metabolitos, graficando el área obtenida en función de la concentración de estándar añadido.

Tabla 11. Concentración de las disoluciones para la evaluación del efecto matriz.

Nivel de adición	Concentración de los distintos componentes				
	MMA* (mM)	Citrato y glicina (mM)	Creatinina (mM)	D <sub>2</sub> O (% v/v)	Buffer de fosfatos pH= 7.4 (mM)
AE1**	0.00	0.00	0.00	10.00	100.00
AE2	0.50	2.50	3.50	10.00	100.00
AE3	1.00	5.00	7.00	10.00	100.00
AE4	1.50	7.50	10.50	10.00	100.00
AE5	2.00	10.00	14.00	10.00	100.00
AE6	2.00	12.50	17.50	10.00	100.00

\* **MMA**= Ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, creatina, dimetilamina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina.

\*\* Las letras "AE" designan los niveles de adición de estándar para la evaluación del efecto matriz.

Una vez obtenidas todas las curvas, se calculó el % de efecto matriz (%EM), mediante el empleo de la ecuación 4, en la cual  $S$  corresponde a la pendiente de la recta respectiva (Wang et al., 2021).

$$\%EM = \left( \frac{S \text{ curva por adición estándar}}{S \text{ curva por estándar externo}} - 1 \right) (100) \quad (4)$$

## 2.9 Aplicación del Método al Análisis de Muestras de Orina

Finalmente, se aplicó el método desarrollado y validado al análisis de 3 muestras individuales de orina de sujetos sanos. El análisis se realizó por triplicado. Las muestras de orina fueron colectadas a través del proyecto de investigación con número de registro HI19-00001, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Los individuos en cuestión fueron valorados por medio de una entrevista clínica y diferentes estudios de laboratorio de rutina, para ser designados dentro de la categoría de sujetos sanos.

Las muestras fueron procesadas conforme a lo indicado en el apartado 2.5 y se calculó la concentración para cada metabolito, por medio de la ecuación de la recta obtenida por calibración externa. Adicionalmente, se calcularon los %DER considerando las respuestas de los metabolitos, tomando como criterio de aceptación un %DER menor al 15% (FDA & CDER, 2018).



## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Selección de los Metabolitos a Cuantificar**

Como resultado de la primera etapa de selección de los metabolitos se eligieron metabolitos con ocurrencia en el 100% de las muestras de orina, fueron identificados mediante RMN por Bouatra y colaboradores (2013), como parte del proyecto del Metaboloma Urinario Humano. De los 209 metabolitos mencionados en este estudio, solamente 92 metabolitos cumplieron esta condición. En la tabla 12 se presentan los metabolitos preseleccionados.

En la segunda etapa de selección, se definieron cuáles de los 92 metabolitos preseleccionados en la primera etapa fueron incluidos en el 50% o más de una selección de artículos de metabolómica de orina basada en RMN, en los que se reportaron datos de cuantificación de metabolitos urinarios en sujetos sanos. Aplicando este criterio, se redujo a 27 metabolitos. En la tabla 13 se indica el listado de metabolitos considerados para la segunda etapa. En la misma se muestran los 8 artículos que se consultaron para realizar dicha selección.

Tabla 12. Listado de los 92 metabolitos incluidos en la primera etapa de selección.

Metabolito	Valores de ref. ( $\mu\text{M}/\text{mM creat.}$ )	Metabolito	Valores de ref. ( $\mu\text{M}/\text{mM creat.}$ )	Metabolito	Valores de ref. ( $\mu\text{M}/\text{mM creat.}$ )	Metabolito	Valores de ref. ( $\mu\text{M}/\text{mM creat.}$ )
1-Metilhistidina	15.9	2-Furoilglicina	10.0	3-Metilhistidina	15.1	3-Metilxantina	4.0
Acetil-L-carnitina	1.9	Acetona	2.2	Ácido 2-cetobutírico	2.6	Ácido 2-hidroxi-3-metilpentanoico	-
Ácido 2-hidroxi-glutámico	33.0	Ácido 3-aminoisobutanoico	2.9 – 116.4	Ácido 3-hidroxiisovalérico	8.5	Ácido 4-desoxitreónico	25.0
Ácido 4-hidroxi-butírico	3.3	Ácido 4-hidroxihipúrico	0.0 – 14.0	Ácido acético	45.3	Ácido acetoacético	33.0
Ácido alfa-hidroxiisobutírico	3.8	Ácido <i>cis</i> -aconítico	13.0	Ácido cítrico	242.0	Ácido fórmico	20.4
Ácido glicérico	4.5	Ácido glicólico	35.0	Ácido glucónico	-	Ácido guanidoacético	89.0
Ácido hipúrico	257.0	Ácido homovanílico	4.9	Ácido indolacético	2.0	Ácido L-glutámico	10.0
Ácido L-láctico	12.3	Ácido metilsuccínico	2.3	Ácido N-acetilaspártico	4.7	Ácido N-acetilneuramínico	8.6
Ácido oxoglutámico	3.0	Ácido pantoténico	2.7	Ácido p-hidroxifenilacético	9.7	Ácido piroglutámico	28.8
Ácido pirúvico	2.1	Ácido quinolínico	2.5	Ácido treónico	10.0	Alantoína	19.7

Anserina	16.2	Arabinitol	19.3	Betaína	4.1	Colina	5.3
Creatina	46.0	Creatinina*	10,090.0	D-Galactosa	4.4	D-Glucosa	31.1
Dimetil sulfona	4.6	Dimetilamina	39.3	Dimetilarginina asimétrica	4.6	Dimetilarginina simétrica	3.7
Dimetilglicina	6.2	D-Treitól	10.0	Eritritol	51.0	Etanolamina	21.4
Fenilacetilglutamina	47.0	Glicerol	20.0	Glicina	151.0	Hipoxantina	4.7
HPPHA	0.6 – 54.9	Indoxil sulfato	19.7	L-Alanina	22.0	L-Arabinosa	8.8
L-Carnitina	5.7	L-Cisteína	33.4	L-Cistina	9.0	L-Fenilalanina	4.5
L-Glutamina	33.3	L-Histidina	60.8	L-Isoleucina	1.6	L-Leucina	2.5
L-Lisina	18.0	L-Serina	26.0	L-Tirosina	8.8	L-Treonina	5.2 – 24.6
L-Tripófano	2.5 – 29.4	L-Valina	3.0	Metanol	-	Metilamina	10.5
Mioinositol	18.8	Pirocatecol	6.0	Prolina-betaína	12.7	Propilenglicol	-
Pseudouridina	26.0	Sacarosa	7.1	Sorbitol	3.5	Taurina	4.0 – 160.0
TMNO	118.7	Trigonelina	16.0	Uracilo	12.0	Urea	22,566.0

\* La concentración de la creatinina está expresada en  $\mu\text{M}$ .

Tabla 13. Listado de metabolitos incluidos en la segunda etapa de selección, a partir de su identificación en la orina de sujetos sanos en distintos artículos de metabolómica de orina por <sup>1</sup>H-RMN.

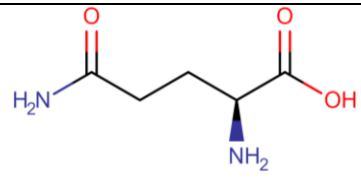
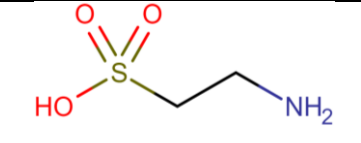
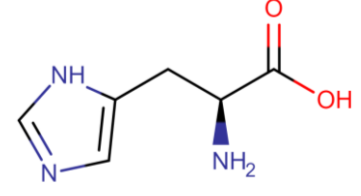
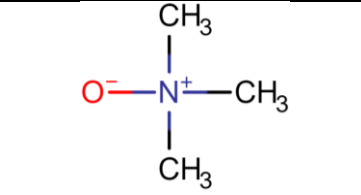
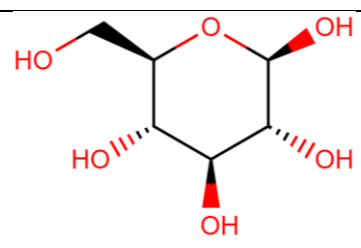
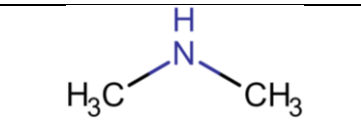
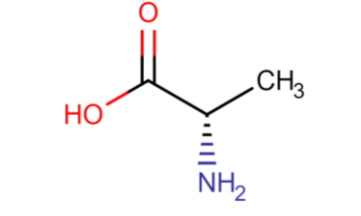
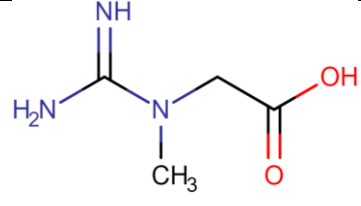
Metabolito	Artículo							
	Saude et al., 2007	Shaykhutdinov et al., 2009	Da Silva et al., 2013	Pietzner et al., 2015	Cassiède et al., 2017	Wojtowicz et al., 2017	Silva et al., 2019	Tynkkynen et al., 2019
Acetona			✓	✓	✓	✓		✓
Ácido 3-hidroxiisovalérico	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Ácido acético	✓	✓	✓	✓		✓		✓
Ácido alfa-hidroxiisobutírico	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Ácido <i>cis</i> -aconítico	✓	✓		✓				✓
Ácido cítrico	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido fórmico	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido hipúrico	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido L-láctico	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Ácido p-hidroxifenilacético	✓	✓	✓	✓			✓	✓
Betaína	✓		✓	✓				✓
Creatina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

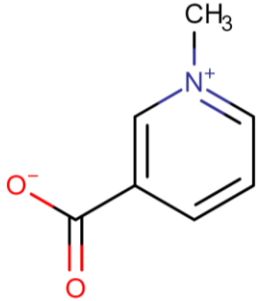
Creatinina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
D-Glucosa	✓	✓	✓					✓
Dimetilamina	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Glicina	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Hipoxantina		✓	✓	✓	✓		✓	✓
Indoxil sulfato	✓	✓	✓			✓		✓
L-Alanina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L-Carnitina	✓			✓	✓			✓
L-Histidina	✓	✓		✓	✓		✓	✓
L-Tirosina	✓	✓				✓	✓	✓
L-Treonina		✓	✓	✓			✓	✓
L-Valina	✓	✓		✓	✓			✓
Taurina	✓		✓	✓				✓
TMNO	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Trigonelina	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓

En la tercera y última etapa de selección de metabolitos, se consideraron los resultados de cuantificación de metabolitos urinarios identificados en muestras control de sujetos sanos del proyecto del metaboloma de la ERC realizado en el DQA (Proyecto CONACYT 2017-5256). En la tabla 14 se presenta el listado con los 14 metabolitos seleccionados de manera definitiva para el desarrollo del método de cuantificación por  $^1\text{H-RMN}$  de este proyecto de tesis, ya que estos compuestos pertenecen al grupo de metabolitos con mayor abundancia y presentan un alto % de ocurrencia ( $\geq 50\%$ ).

Tabla 14. Metabolitos seleccionados para realizar la cuantificación por RMN.

Metabolito	Concentración relativa (mM)	% de ocurrencia	Estructura química
Creatinina	13.31	100	
Glicina	2.86	100	
Citrato	2.80	100	
Ácido hipúrico	1.33	100	
Ácido glicólico	0.87	100	

L-Glutamina	0.81	100	
Taurina	0.78	80	
L-Histidina	0.78	90	
TMNO	0.51	100	
D-Glucosa	0.44	90	
Dimetilamina	0.42	100	
L-Alanina	0.37	100	
Creatina	0.33	50	

Trigonelina	0.17	100	
-------------	------	-----	---

Asimismo, se propuso el imidazol (figura 8) como estándar interno, puesto que cumple con los requisitos establecidos por la EUROLAB, para métodos de  $^1\text{H-RMNc}$  (EUROLAB, 2014).

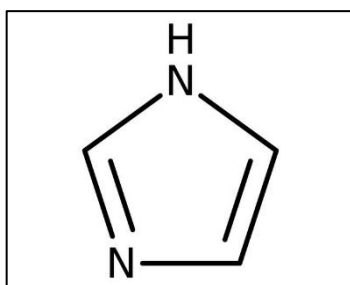


Figura 8. Estructura química del imidazol.

### 3.2 Evaluación de los Parámetros de Adquisición y Procesamiento

#### 3.2.1 Evaluación de la Ganancia del Receptor

Para establecer un valor de RG óptimo para la obtención de los espectros de  $^1\text{H-RMN}$ , se obtuvieron los espectros con los dos valores de ganancia considerados (RG= 114 y RG=64), utilizando una disolución de la mezcla de



metabolitos a concentración 0.50 mM cada uno (ver tabla 1). Los resultados se muestran en la figura 9, en donde el espectro en color azul corresponde al adquirido con una ganancia de 114, mientras que el que se muestra en rojo corresponde al espectro obtenido con una ganancia de 64.

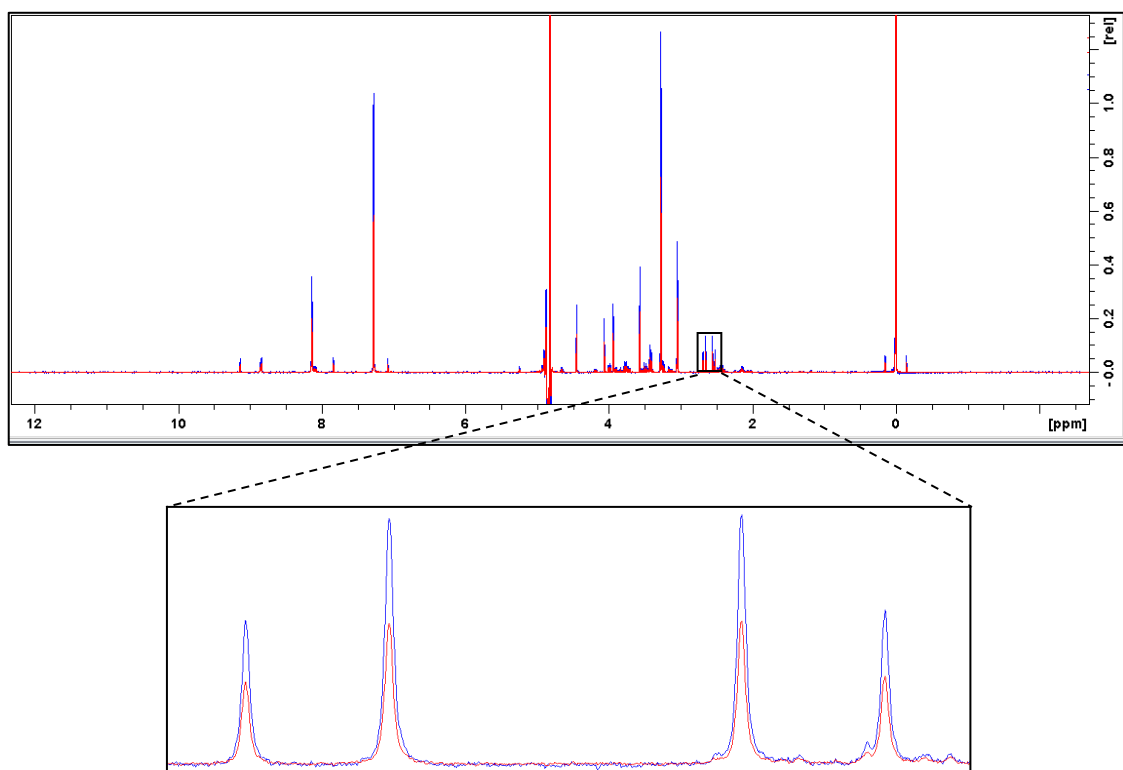


Figura 9. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN adquiridos con distintos valores de ganancia, a partir del nivel más bajo de concentración. El espectro en azul corresponde a un RG= 114 y el espectro en rojo corresponde a un RG= 64.

Por otro lado, en la figura 10 se presentan superpuestos los espectros obtenidos a partir de una disolución 5.00 mM de los 7MMA, 12.87 mM de citrato, 15.00 mM de glicina y 30.00 mM de creatinina. Aquí, el espectro en azul corresponde a una ganancia de 114, en tanto que el espectro mostrado en rojo corresponde a una ganancia de 64. Se optó por seleccionar el valor de RG= 64

para la obtención de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMNc para el desarrollo del método, ya que con este valor se evita la saturación de la señal en el detector y se reduce la posibilidad de generar distorsiones en la línea base de las señales.

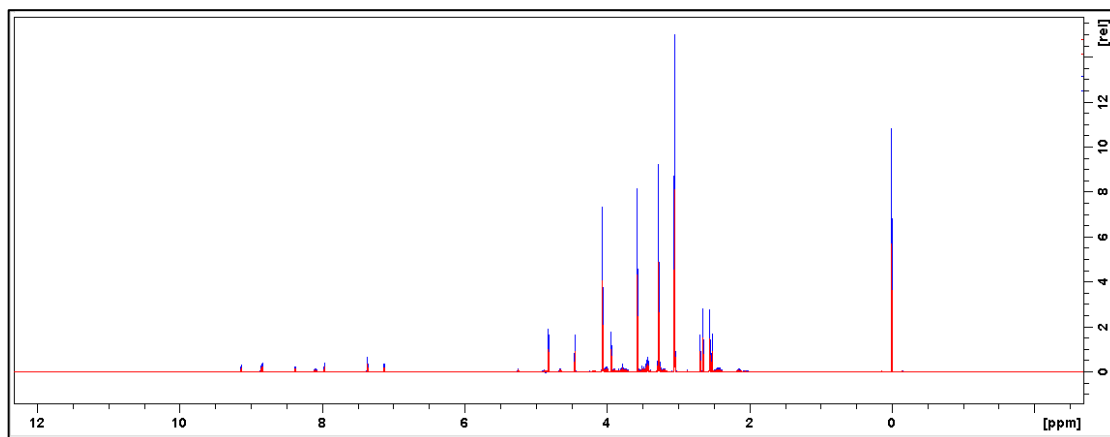


Figura 10. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN adquiridos con distintos valores de ganancia, a partir del nivel más alto de concentración.

### 3.2.2 Evaluación de la Espera Interpulso (D1)

Los espectros empleados para la evaluación de la espera interpulso, se adquirieron a partir de la disolución con menor concentración, utilizando valores de D1 de 5, 10 s y 15 s. En la figura 11 se muestra una señal aromática, representativa del espectro. Aquí, el espectro en azul corresponde a un D1= 5 s, el espectro en rojo es el correspondiente a un D1= 10 s, y el espectro en verde es el adquirido con un D1= 15 s.

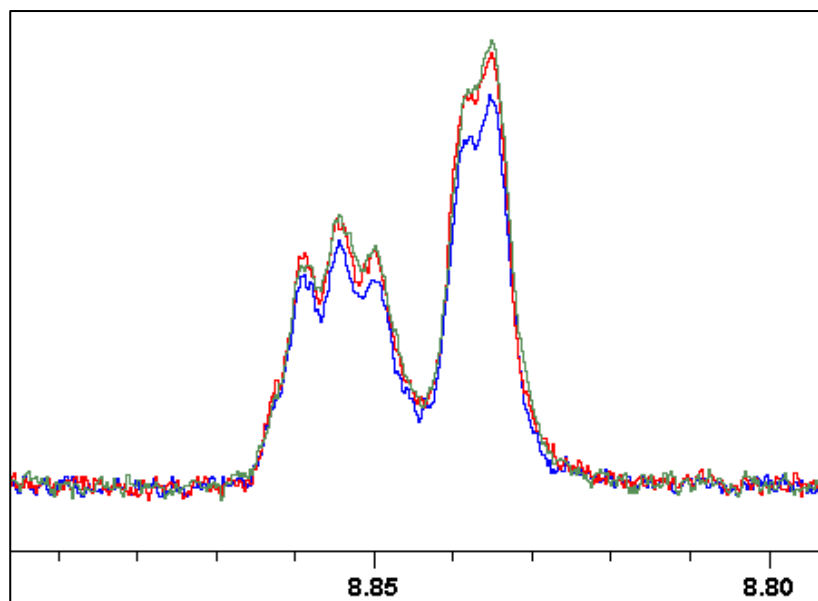


Figura 11. Señal representativa del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, adquirido con distintos valores de D1.

En dicha figura, se observa con claridad que el valor de D1 más corto genera una señal menos intensa. Mientras que con valores de D1 de 10 s y 15 s los espectros son de intensidad muy similar. Se seleccionó el valor de D1 de 10 s porque la intensidad de la señal es muy similar a la de 15 s, y porque reduce el tiempo de obtención de cada espectro.

### 3.2.3 Evaluación del Tiempo de Adquisición

De manera adicional, se evaluó el tiempo de adquisición utilizado para la obtención de los diferentes espectros. Se encontró que con un tiempo de adquisición de 5.45 s se tiene una relajación completa de la señal del FID, por

lo que se considera un valor adecuado. En la figura 12 se presenta el gráfico del FID para el nivel más alto de concentración en donde se observa el completo decaimiento de la señal al paso de 5.45 s.

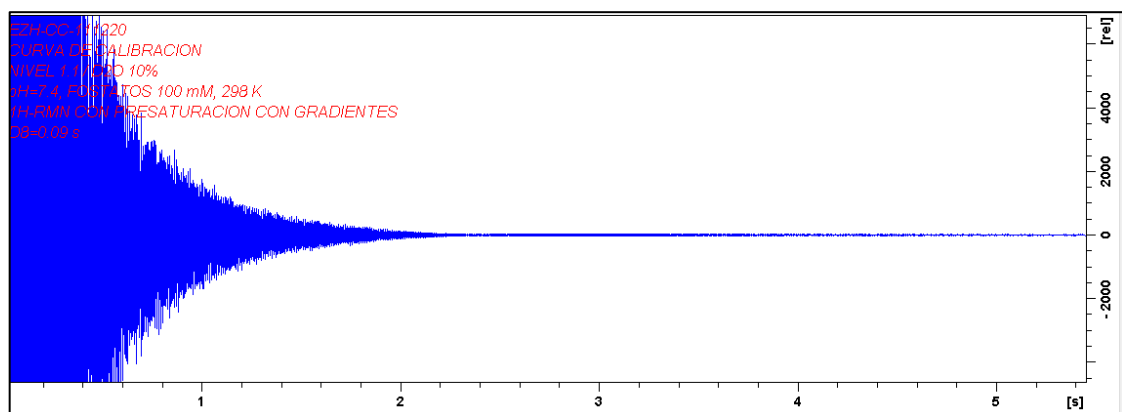


Figura 12. Gráfico del FID obtenido a partir del nivel más alto de concentración.

### 3.2.4 Evaluación de los Parámetros de Procesamiento

Para la evaluación de los parámetros de procesamiento se siguieron las recomendaciones de Gödecke y colaboradores (2013) en cuanto a funciones de ventana, ajuste de fase y corrección de la línea base mostradas en el apartado 2.3: multiplicación exponencial con factor de  $LB= 0.1$  Hz, ajuste de fase manual con corrección de orden 0, y corrección de la línea base con el comando ABSN. A este respecto, se consideró la intensidad y la resolución de los analitos, así como el aspecto de la línea base del espectro, para corroborar que las condiciones elegidas fueran satisfactorias. Lo anterior se confirmó al obtener el espectro de los 14 metabolitos y el estándar interno de imidazol (figura 13).

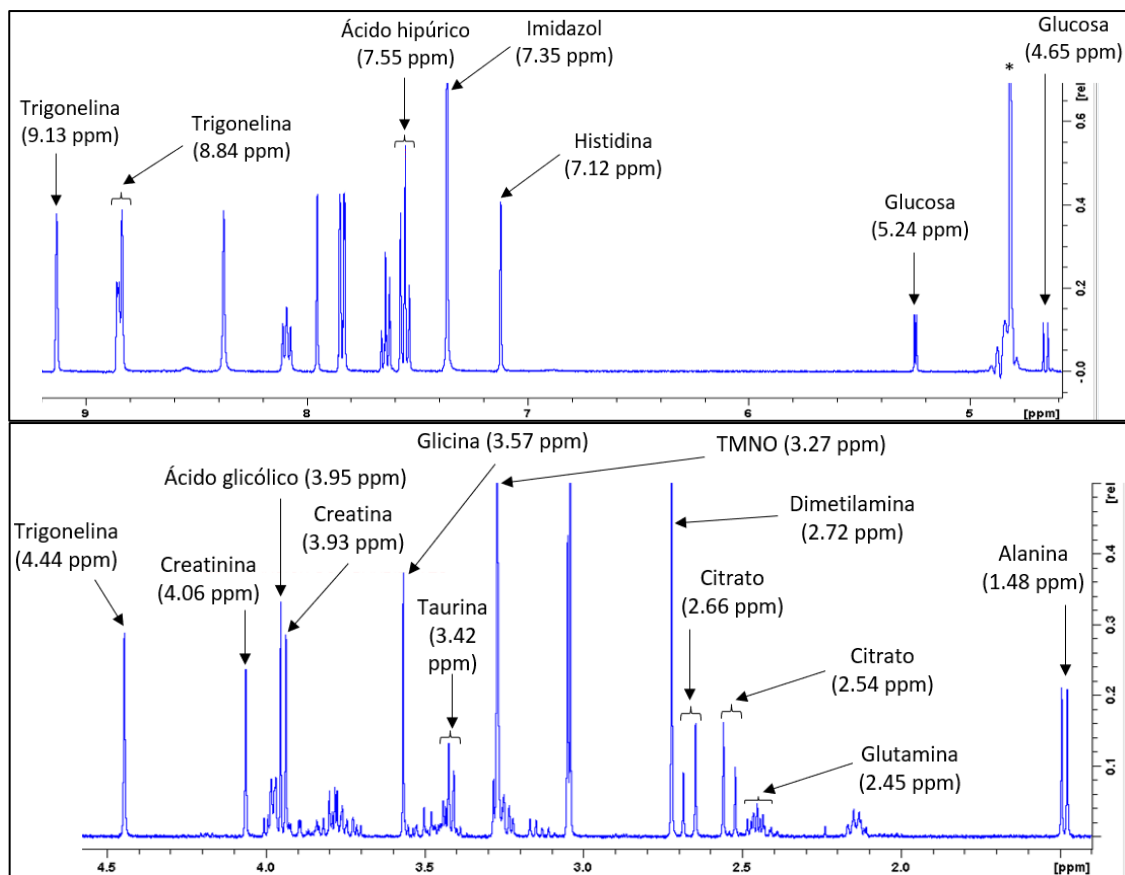


Figura 13. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de los 14 metabolitos seleccionados para el análisis y el estándar interno (imidazol). \* Señal residual del agua a 4.70 ppm.

En la figura 13 se muestra el desplazamiento químico de las señales factibles a evaluación para cada uno de los metabolitos y el imidazol. Se puede observar que la mayoría de los analitos cuentan con al menos una señal factible de ser evaluada. Para todos ellos se seleccionó una señal para evaluación, excepto para el citrato y la trigonelina, para los cuales se seleccionaron 2 y 3 señales para la evaluación, respectivamente. Asimismo, para la glucosa se consideró la suma de las 2 señales indicadas en el espectro (en 5.24 y 4.65 ppm).

### 3.3 Asignación de las Señales en los Espectros de RMN

La asignación de las señales mostradas en el espectro de los 14 metabolitos y el imidazol se realizó considerando diferentes datos espectrales de la HMDB (desplazamiento químico y la multiplicidad de las señales). Además, se tomaron en cuenta los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN 1D individuales de los metabolitos, depositados en la Base de Datos disponible en el laboratorio de RMN del DQA.

En la tabla 15 se presentan los desplazamientos químicos encontrados en la HMDB y experimentalmente (tanto de forma individual como en la mezcla), así como la multiplicidad de las señales correspondientes.

En la tabla se puede observar que la máxima diferencia de desplazamientos encontrada fue de 0.03 ppm, considerando los datos obtenidos en este trabajo y los presentados en la HMDB. La excepción es para la dimetilamina, en cuyo caso se encontró una diferencia de 0.22 ppm.

Asimismo, en la tabla es posible apreciar que las diferencias encontradas en los valores de  $\delta$  no fueron mayores a 0.02 ppm, tomando en cuenta los resultados de este trabajo y los obtenidos para los estándares individuales.

Tabla 15. Desplazamiento químico y multiplicidad de las señales de los metabolitos y el estándar interno.

Analito	$\delta$ en la HMDB (ppm)	$\delta$ en el estándar individual (ppm)	$\delta$ en la mezcla (ppm)	Multiplicidad
Ácido glicólico	3.93	-	3.95	s
Ácido hipúrico	7.54	7.54	7.55	m
Alanina	1.47	-	1.48	d
Citrato	2.53	2.53	2.54	d
	2.66	2.66	2.66	d
Creatina	3.92	3.93	3.93	s
Creatinina	4.05	4.06	4.06	s
Dimetilamina	2.50	-	2.72	s
Glicina	3.54	3.56	3.57	s
Glucosa	4.63	4.66	4.65	d
	5.22	5.25	5.24	d
Glutamina	2.44	-	2.45	m
Histidina	7.09	7.16	7.07 – 7.14	d
Taurina	3.42	3.41	3.42	t
TMNO	3.25	3.28	3.27	s
Trigonelina	4.43	4.44	4.44	s
	8.83	8.84	8.84	m
	9.11	9.15	9.13	s
Imidazol	7.28	-	7.25 – 7.38	sa

\* **s**= singulete; **d**= doblete; **t**= triplete; **m**= multiplate; **sa**= singulete ancho.

Adicionalmente, se corroboró la asignación empleando la base de datos del programa Chenomx NMR Suite, y mediante la obtención del espectro de  $^{13}\text{C}$ -

RMN 1D, así como espectros 2D (COSY, HSQC y TOCSY). En conjunto, los datos de los espectros bidimensionales permitieron identificar sin ambigüedad las señales de cada uno de los metabolitos en la mezcla. El espectro HSQC se muestra en la figura 16 (sección 3.6), mientras que el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, el COSY y el TOCSY se presentan en el apéndice A.

### **3.4 Determinación de los Intervalos de Concentración de los Metabolitos**

Los intervalos de concentración para las pruebas preliminares se determinaron con base en los datos de concentración relativa obtenidos a partir de distintos trabajos de RMNc aplicada a metabolómica de orina de sujetos sanos. En la tabla 16 se indican las concentraciones medias, mínimas y máximas, expresadas en mM, encontradas en los trabajos consultados.

Con base en los resultados obtenidos en este punto, se seleccionó un intervalo de concentración de 0.50 a 5.00 mM para el grupo de metabolitos denominado 7MMA (creatina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina), de 0.50 a 15.00 mM para el citrato y la glicina, y de 0.50 a 30.00 mM para la creatinina.

Posteriormente, se realizó un análisis de 3 muestras de orina de sujetos sanos, y se compararon las señales de estas muestras con las señales de los niveles inferior y superior de las curvas.



Tabla 16. Concentraciones reportadas de los metabolitos en distintos trabajos de metabolómica.

Metabolito	Trabajo				
	Saude et al., 2007		Shaykhutdinov et al., 2009	Proyecto HI19-00001 del DQA (2019 – 2021)	
	Concentración media (mM)	Concentración mínima/máxima (mM)	Concentración media (mM)	Concentración media (mM)	Concentración mínima/máxima (mM)
Ácido glicólico	-	-	-	0.87	0.05 – 3.12
Ácido hipúrico	1.83	0.26 – 5.72	3.21	1.33	0.07 – 2.63
Alanina	0.24	0.04 – 0.80	0.26	0.37	0.02 – 1.02
Citrato	2.54	0.05 – 9.50	1.66	2.80	0.45 – 7.36
Creatina	0.55	0.00 – 2.05	0.16	0.33	0.12 – 0.54
Creatinina	9.03	1.78 – 20.4	14.24	13.31	1.29 – 26.41
Dimetilamina	-	-	0.50	0.42	0.04 – 0.81
Glicina	-	-	0.99	2.86	0.11 – 14.65
Glucosa	-	-	0.43	0.44	0.13 – 0.81
Glutamina	-	-	0.47	0.81	0.06 – 2.02
Histidina	0.49	0.01 – 1.35	0.65	0.78	0.07 – 1.67
Taurina	-	-	0.80	0.78	0.14 – 1.15
TMNO	-	-	0.47	0.51	0.10 – 1.66
Trigonelina	-	-	0.22	0.17	0.01 – 0.55

A manera de ejemplo, la figura 14 muestra las señales del TMNO de la muestra 1 (azul), la muestra 2 (rojo), la muestra 3 (verde), el nivel de concentración inferior (morado) y el nivel de concentración superior (amarillo). En ella, se puede ver que tanto la señal de la muestra 2 como la señal de la muestra 3 poseen menor intensidad que la señal del nivel de concentración inferior (0.50 mM para TMNO), y, por lo tanto, la concentración de dicho metabolito es menor a 0.50 mM en estas muestras. Una situación similar ocurrió en el caso de la creatina, la glucosa y la trigonelina, y por esta razón se decidió cambiar el nivel inferior de todas las curvas a una concentración de 0.20 mM. De este modo, el intervalo de concentración final correspondió a 0.20 – 5.00 mM para los MMA, 0.20 – 15.00 mM para el citrato y la glicina, y 0.20 – 30.00 mM para la creatinina.

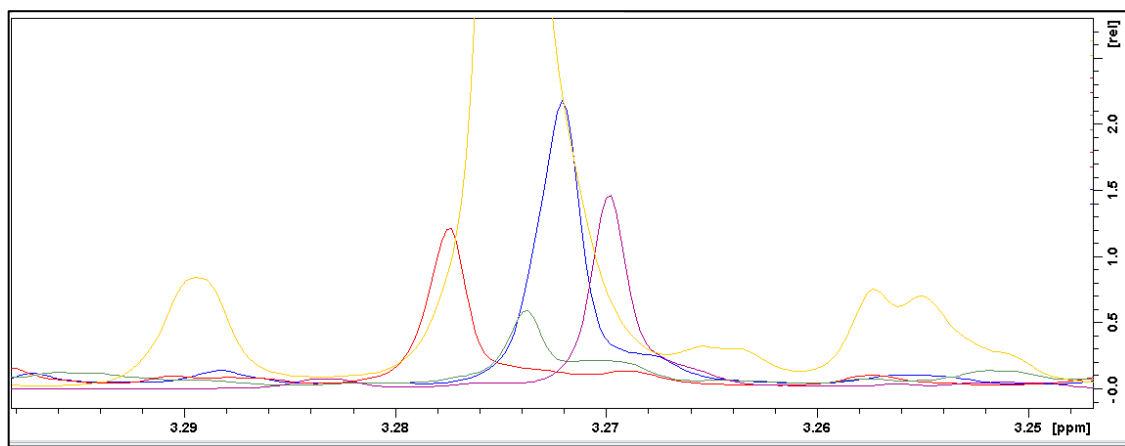


Figura 14 Comparación de las señales de TMNO de 3 muestras de orina (azul rojo, verde) y de los niveles de concentración inferior (morado) y superior (amarillo) de las curvas de calibración preliminares.

Cabe mencionar que la concentración del imidazol se estableció en 4.00 mM, para que la señal propia de este compuesto fuera comparable en

intensidad con las señales de los metabolitos, a todos los niveles de concentración de las curvas.

### 3.5 Evaluación del Imidazol como Estándar Interno

Los espectros de una muestra de orina representativa con (azul) y sin adición (rojo) de estándar de imidazol son mostrados en la figura 15. En la figura se puede observar que la señal del imidazol aparece en la región aromática del espectro, alrededor de 7.39 ppm para esta muestra en particular, Además, se puede ver que en ausencia del imidazol no aparece ninguna señal cerca de la zona en cuestión. Por lo anterior, se concluyó que el imidazol no se traslapa con las señales de los metabolitos urinarios, y por lo mismo, es factible que pueda ser empleado como estándar interno.

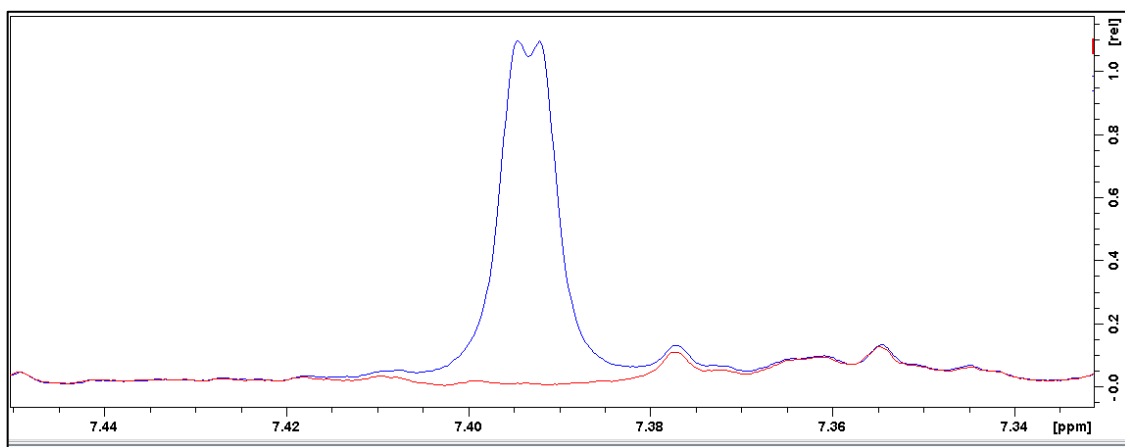


Figura 15. Señal del imidazol en la región aromática del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de una muestra de orina de un sujeto sano adicionada con el estándar correspondiente (azul). En el espectro original (rojo) de la muestra de orina no se observa ninguna señal en esta región.

### 3.6 Evaluación de la Especificidad de las Señales en la Mezcla de Analitos

La especificidad de las señales en la mezcla de metabolitos e imidazol se confirmó mediante la adquisición del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN 1D y los espectros 2D: COSY, HSQC y TOCSY, de acuerdo con el procedimiento sugerido por Gödecke y colaboradores (2013). Las señales de correlación en los espectros bidimensionales, la medición de constantes de acoplamiento y la integración de las señales permitieron identificar sin ambigüedad cada una de las señales utilizadas para la cuantificación de los distintos metabolitos.

En la figura 16, se muestra como ejemplo la correlación de las señales de la glicina en el espectro HSQC. Las flechas en la figura indican los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  unidos a un enlace de distancia, así, la señal singulete de los 2 protones del grupo metileno a 3.57 ppm (señal única), se encuentra correlacionada con la señal del carbono del mismo grupo metileno a 44.47 ppm (ver tabla 14 para la estructura química de la glicina). El resto de los espectros utilizados para evaluar la especificidad se presentan en el apéndice A.

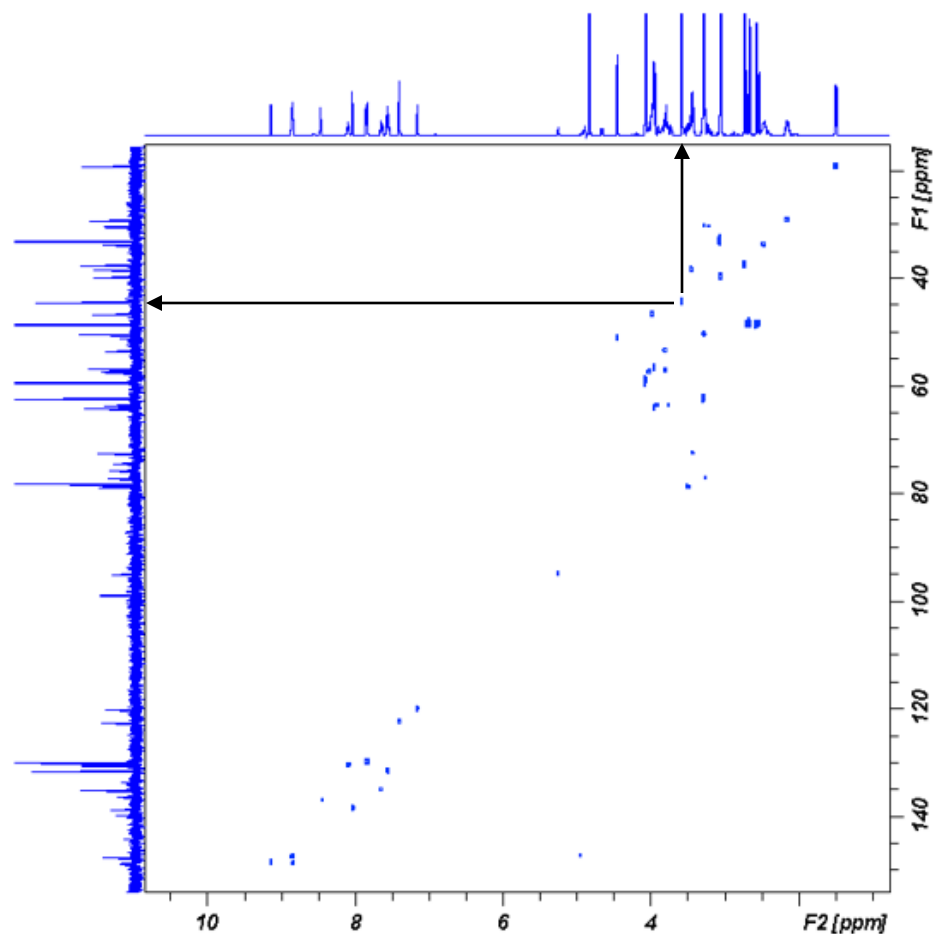


Figura 16. Espectro HSQC de la mezcla de los 14 metabolitos y el estándar interno (imidazol). Se indica la señal que muestra la correlación  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  en la glicina.

### 3.7 Validación del Método de $^1\text{H}$ -RMNc por Estándar Externo

Después de obtener y procesar los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, las señales de cuantificación de cada metabolito, así como del imidazol, fueron integradas manualmente y se obtuvieron los valores del área. A continuación, se realizaron las curvas de calibración por estándar externo, y, se evaluó y/o determinó la

linealidad, la precisión intradía, la precisión intermedia, la exactitud del sistema, los límites de detección, los límites de cuantificación, la exactitud del método y la robustez.

### 3.7.1 Evaluación de la Linealidad

Para la evaluación de la linealidad se realizó el análisis de regresión pertinente considerando la siguiente serie de parámetros: aspecto lineal de las curvas, distribución de los residuales,  $R^2$  y %DER de FR.

A continuación, se ejemplifica con los resultados obtenidos para la alanina. La figura 17 muestra la curva de calibración de la alanina, la cual posee un aspecto lineal (esta tendencia se mantuvo en el resto de las curvas). La figura 18, por otro lado, corresponde al gráfico de residuales de la alanina, el cual muestra una distribución aleatoria (esta tendencia fue similar en el resto de los gráficos de residuales). Las curvas de calibración y de los gráficos de residuales restantes son mostrados en el apéndice B.

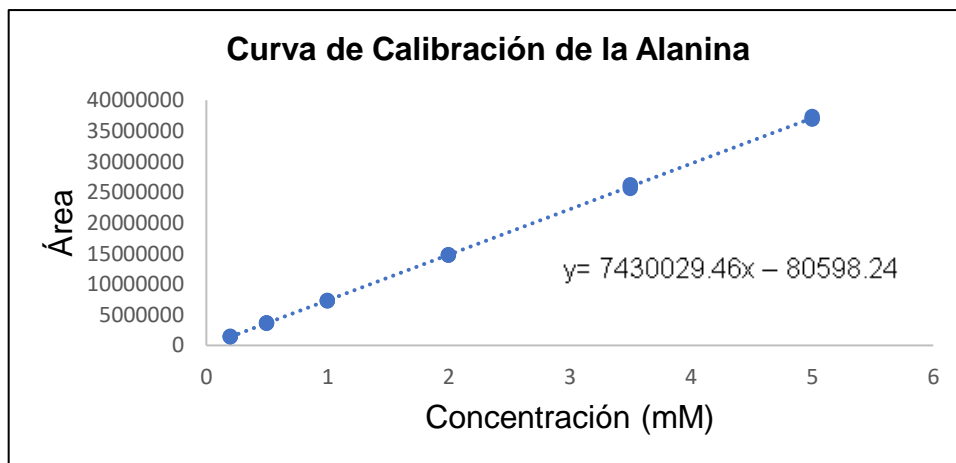


Figura 17. Curva de calibración de la alanina por estándar externo.

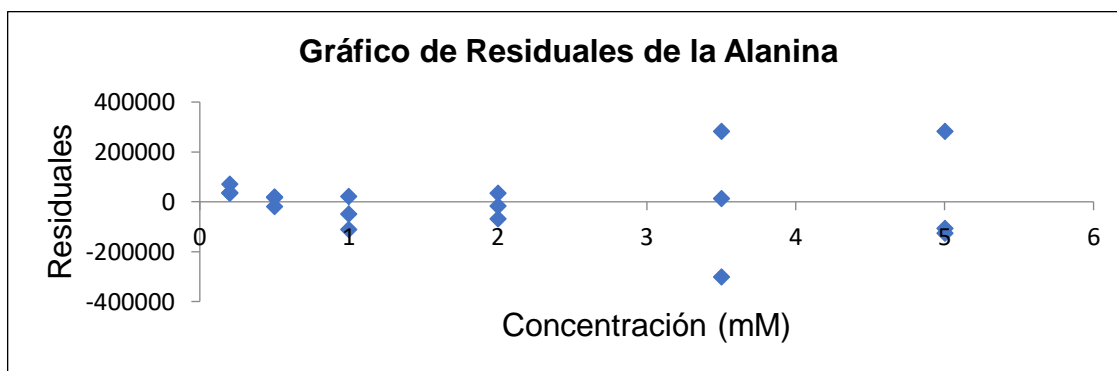


Figura 18. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la alanina por estándar externo.

En la tabla 17 se presentan los valores de R<sup>2</sup> y %DER de FR obtenidos para los 14 metabolitos.

Tabla 17. Valores de R<sup>2</sup> y %DER de FR obtenidos para cada uno de los 14 metabolitos por el método de estándar externo.

<b>Metabolito</b>	<b>Intervalo de concentración (mM)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>%DER de FR (n= 18)*</b>
Ácido glicólico	0.20 – 5.00	0.9996	4.76
Ácido hipúrico	0.20 – 5.00	0.9999	1.29
Alanina	0.20 – 5.00	0.9999	1.18
Citrato (2.54 ppm)	0.20 – 15.00	1.0000	1.73
Citrato (2.66 ppm)	0.20 – 15.00	1.0000	1.80
Creatina	0.20 – 5.00	0.9999	1.39
Creatinina	0.20 – 30.00	0.9999	1.20
Dimetilamina	0.20 – 5.00	0.9995	2.85
Glicina	0.20 – 15.00	0.9999	1.81
Glucosa	0.20 – 5.00	0.9996	5.73
Glutamina	0.20 – 5.00	0.9998	2.66
Histidina	0.20 – 5.00	0.9997	4.57
Taurina	0.20 – 5.00	0.9987	4.29
TMNO	0.20 – 5.00	0.9994	3.63
Trigonelina (4.44 ppm)	0.20 – 5.00	0.9998	1.52
Trigonelina (8.84 ppm)	0.20 – 5.00	0.9999	0.90
Trigonelina (9.13 ppm)	0.20 – 5.00	0.9999	1.41

\* El %DER se calculó considerando los 18 replicados de las curvas.



### 3.7.2 Evaluación de la Precisión

Para la evaluación de la precisión intradía se calculó el %DER de las respuestas para los niveles 1, 3 y 6 de las curvas. Los resultados en cuestión se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. %DER para la evaluación de la precisión intradía por el método de estándar externo.

Metabolito	%DER		
	Nivel 1 (n= 3)	Nivel 3 (n= 3)	Nivel 6 (n= 3)
Ácido glicólico	1.60	0.11	0.67
Ácido hipúrico	1.21	0.94	0.56
Alanina	1.42	0.90	0.62
Citrato (2.54 ppm)	1.75	0.80	0.43
Citrato (2.66 ppm)	3.53	0.72	0.30
Creatina	0.91	0.87	0.40
Creatinina	2.18	0.72	0.91
Dimetilamina	1.12	1.00	0.81
Glicina	0.99	0.62	0.30
Glucosa	10.11	2.27	0.29
Glutamina	1.95	0.70	1.05
Histidina	1.77	3.01	0.97
Taurina	1.98	1.23	0.54
TMNO	1.37	1.62	0.30
Trigonelina (4.44 ppm)	1.14	0.48	0.61
Trigonelina (8.84 ppm)	0.15	1.12	0.71
Trigonelina (9.13 ppm)	2.50	1.15	0.58

Por otro lado, para evaluar la precisión intermedia, se determinó el %DER de las respuestas, para los niveles 1, 3 y 6 de las curvas, a partir de disoluciones madre preparadas de forma independiente, durante 3 días no consecutivos. Los resultados correspondientes se indican en la tabla 19.

Tabla 19. %DER para la evaluación de la precisión intermedia por el método de estándar externo.

Metabolito	%DER		
	Nivel 1 (n= 9)	Nivel 3 (n= 9)	Nivel 6 (n= 9)
Ácido glicólico	1.65	1.15	0.99
Ácido hipúrico	1.54	1.02	0.90
Alanina	0.95	0.87	0.59
Citrato (2.54 ppm)	2.91	1.04	0.86
Citrato (2.66 ppm)	2.92	1.32	0.97
Creatina	1.20	0.70	0.86
Creatinina	2.31	1.24	0.65
Dimetilamina	1.76	1.57	1.52
Glicina	1.91	1.03	0.56
Glucosa	12.35	1.91	0.70
Glutamina	3.57	2.58	2.33
Histidina	3.50	2.86	1.78
Taurina	4.68	0.93	0.99
TMNO	2.48	2.41	1.50
Trigonelina (4.44 ppm)	2.53	1.50	1.00
Trigonelina (8.84 ppm)	2.11	1.83	1.11
Trigonelina (9.13 ppm)	3.17	1.96	1.09

### 3.7.3 Evaluación de la Exactitud del Sistema

La evaluación del sistema se llevó a cabo mediante el cálculo del porcentaje de error para 3 niveles de concentración adicionales (distintos a los empleados para la construcción de las curvas, pero dentro del intervalo de concentración). Los resultados pertinentes se indican en la tabla 20.

### 3.7.4 Determinación del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación

Para realizar la determinación tanto del límite de detección como del límite de cuantificación, se prepararon mezclas de los 14 metabolitos a concentraciones de 0.10, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 y 0.01 mM.

Una vez que los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN fueron adquiridos, se determinó el LD de cada metabolito, definido como la mínima concentración del compuesto que permitiera reconocer el patrón de señales característico sin ninguna ambigüedad.

Un ejemplo ilustrativo del procedimiento seguido para la determinación del LD se presenta para la alanina. La figura 19 muestra la superposición de las señales de este metabolito, a las concentraciones empleadas para la determinación del límite de detección. Como se puede observar en la figura, la mínima concentración a la cual es posible distinguir el doblete sin ninguna ambigüedad es 0.02 mM (azul), y, por lo tanto, corresponde al LD de la alanina.

Los LD del resto de metabolitos se determinaron de una manera similar y se indican en la tabla 21.

Tabla 20. Porcentajes de error para la evaluación de la exactitud del sistema por el método de estándar externo.

Metabolito	% error		
	Nivel E1* (n= 3)	Nivel E2 (n= 3)	Nivel E3 (n= 3)
Ácido glicólico	4.53	1.15	1.16
Ácido hipúrico	5.71	2.87	6.89
Alanina	0.64	0.45	0.95
Citrato (2.54 ppm)	1.94	1.94	0.59
Citrato (2.66 ppm)	2.63	1.93	0.37
Creatina	1.23	0.39	0.96
Creatinina	1.86	4.68	0.52
Dimetilamina	3.12	2.66	2.77
Glicina	5.71	3.17	1.25
Glucosa	6.26	1.07	0.80
Glutamina	4.84	1.86	2.00
Histidina	2.81	1.62	3.04
Taurina	9.38	9.88	0.77
TMNO	7.69	2.02	3.57
Trigonelina (4.44 ppm)	1.39	1.76	2.02
Trigonelina (8.84 ppm)	1.41	1.08	2.22
Trigonelina (9.13 ppm)	1.89	1.54	2.65

\* La letra "E" designa los niveles adicionales (diferentes a los de las curvas de calibración), para la evaluación de la exactitud del sistema.

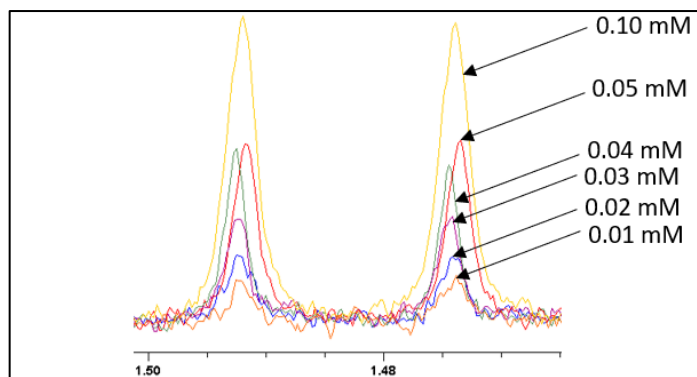


Figura 19. Señal de la alanina a las concentraciones empleadas para la determinación del límite de detección por el método visual.

Tabla 21. Límite de detección de los metabolitos cuantificados por RMN.

<b>Metabolito</b>	<b>LD (mM)</b>
Ácido glicólico	0.02
Ácido hipúrico	0.02
Alanina	0.02
Citrato (2.54 ppm)	0.02
Citrato (2.66 ppm)	0.02
Creatina	0.01
Creatinina	0.02
Dimetilamina	0.01
Glicina	0.01
Glucosa	0.10
Glutamina	0.05
Histidina	0.05
Taurina	0.03
TMNO	0.01
Trigonelina (4.44 ppm)	0.02
Trigonelina (8.84 ppm)	0.02
Trigonelina (9.13 ppm)	0.03

Los distintos límites de cuantificación se determinaron de manera independiente a los límites de detección. Para ello, se calculó tanto el %DER de como el % de error de las concentraciones calculadas, para las disoluciones a 0.10, 0.05 y 0.03 mM, las cuales fueron preparadas por triplicado. El LC correspondió a la mínima concentración que presentó un %DER y un % de error satisfactorios (ambos menores al 20%). A este respecto, en la tabla 22 se indican los LC de los 14 metabolitos, así como el %DER y el % de error encontrados a la concentración correspondiente.

#### 3.7.5 Evaluación de la Exactitud del Método

Para la evaluación de la exactitud, se preparó una mezcla de 3 muestras de orina de sujetos sanos, y la misma se adicionó a 3 niveles de concentración. Posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación y el %DER de las respuestas para cada nivel, y se obtuvo el promedio de ambos parámetros.

Los resultados del % de recuperación para la evaluación de la exactitud del método son mostrados en la tabla 23. Además, se presentan los %DER obtenidos para cada metabolito.

Tabla 22. Límites de cuantificación encontrados por el método de estándar externo.

<b>Metabolito</b>	<b>LC (mM)</b>	<b>%DER (n= 3)</b>	<b>% de error (n= 3)</b>
Ácido glicólico	0.20	1.17	19.52
Ácido hipúrico	0.03	1.01	2.91
Alanina	0.05	1.11	19.16
Citrato (2.54 ppm)	0.20	1.98	10.46
Citrato (2.66 ppm)	0.03	5.37	12.85
Creatina	0.10	1.34	10.61
Creatinina	0.05	4.28	13.65
Dimetilamina	0.20	0.89	16.74
Glicina	0.20	1.20	15.70
Glucosa	0.20	13.28	13.73
Glutamina	0.20	1.68	8.68
Histidina	0.20	1.45	9.17
Taurina	0.10	6.40	19.51
TMNO	0.20	1.78	17.19
Trigonelina (4.44 ppm)	0.20	1.01	9.22
Trigonelina (8.84 ppm)	0.03	1.68	18.32
Trigonelina (9.13 ppm)	0.05	8.06	12.80

Cabe destacar que el % de recuperación de las señales a 4.44 y 9.13 ppm para la trigonelina no fue calculado, pues la intensidad de estas señales en la mezcla de muestras fue menor a la intensidad de la señal establecida como el LC, para ambos casos.

Tabla 23. Porcentajes de recuperación para la evaluación de la exactitud del método de estándar externo.

<b>Metabolito</b>	<b>% de recuperación</b>	<b>%DER (n= 9)</b>
Ácido glicólico	97.52	1.30
Ácido hipúrico	95.95	0.52
Alanina	100.89	0.51
Citrato (2.54 ppm)	91.17	0.79
Citrato (2.66 ppm)	92.35	0.75
Creatina	91.25	1.07
Creatinina	87.01	0.59
Dimetilamina	97.70	0.71
Glicina	91.71	0.61
Glucosa	103.43	1.72
Glutamina	96.46	0.82
Histidina	96.02	0.53
Taurina	95.72	3.37
TMNO	94.74	0.43
Trigonelina (4.44 ppm)	-	-
Trigonelina (8.84 ppm)	92.82	0.65
Trigonelina (9.13 ppm)	-	-

### 3.7.6 Evaluación de la Robustez

Para llevar a cabo la evaluación de la robustez se generó un diseño de experimentos. Los resultados estadísticos (coeficientes de  $R^2$  y  $Q^2$ , significancia de la regresión (ANOVA) y gráfico de coeficientes) del efecto de los factores investigados ( $\mu\text{L}$  de buffer añadidos a las disoluciones de trabajo, la



temperatura de adquisición de los espectros y la espera interpulso), en la respuesta de la alanina, la creatina y la trigonelina se resumen en la tabla 24.

Tabla 24. Resultados de la evaluación de la robustez por el método de estándar externo.

Parámetro	Resultado		
	Alanina (1.48 ppm)	Creatina (3.93 ppm)	Trigonelina (8.84 ppm)
$R^2$	0.722	0.602	0.931
$Q^2$	-2.538	-1.627	0.908
ANOVA	p= 0.309	p= 0.521	p= 0.026
Gráfico de coeficientes	Ausencia de significancia	Ausencia de significancia	Presencia de significancia para el coeficiente del D1

En la figura 20 se muestra el diagrama de coeficientes obtenido para la trigonelina. En él se puede observar que el coeficiente de la espera interpulso es estadísticamente significativo, indicando que este factor tiene efecto en la respuesta de la trigonelina al variar su magnitud. Así, el método no se puede considerar robusto y por ello se debe seleccionar y controlar meticulosamente el valor de la espera interpulso. El resto de los gráficos obtenidos se presentan en el apéndice D.

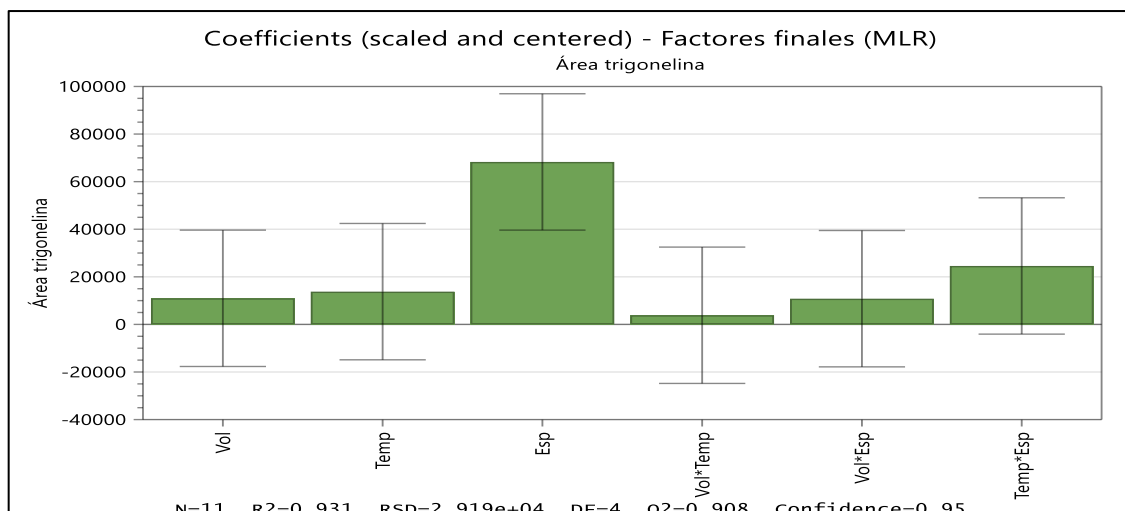


Figura 20. Gráfico de coeficientes para la trigonelina en función de las distintas variables.

### 3.8 Validación del Método de $^1\text{H-RMNC}$ por Estándar Interno

#### 3.8.1 Evaluación de la Linealidad

En la figura 21 se presenta la curva de calibración de la alanina, como ejemplo representativo de los diferentes analitos, cuyo aspecto es lineal. El gráfico de residuales de la alanina se muestra en la figura 22. Aquí, la distribución de los residuales es aleatoria (esta tendencia fue similar que para el resto de los metabolitos). Las curvas de calibración y gráficos de residuales se presentan en el apéndice C.

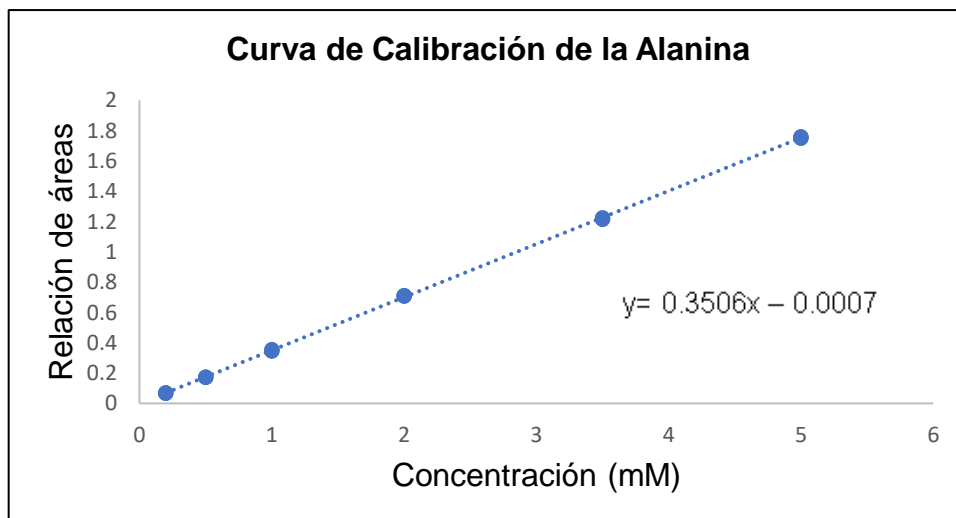


Figura 21. Curva de calibración de la alanina por estándar interno.

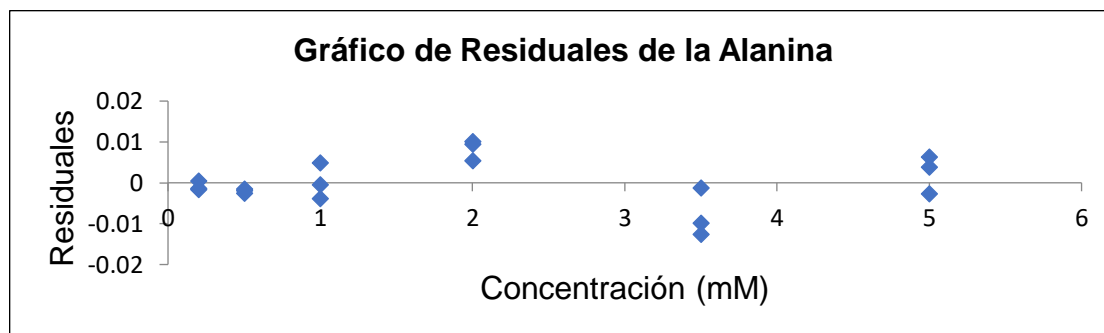


Figura 22. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la alanina por estándar interno.

En la tabla 25 se muestran los resultados de  $R^2$  y %DER de FR encontrados para los 14 metabolitos.

Tabla 25. Valores de  $R^2$  y %DER de FR obtenidos para cada uno de los 14 metabolitos por el método de estándar interno.

<b>Metabolito</b>	<b>Intervalo de concentración (mM)</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>%DER de FR (n= 18)*</b>
Ácido glicólico	0.20 – 5.00	0.9997	4.70
Ácido hipúrico	0.20 – 5.00	0.9998	1.82
Alanina	0.20 – 5.00	0.9999	1.38
Citrato (2.54 ppm)	0.20 – 15.00	0.9999	2.08
Citrato (2.66 ppm)	0.20 – 15.00	1.0000	1.99
Creatina	0.20 – 5.00	1.0000	1.49
Creatinina	0.20 – 30.00	0.9997	1.57
Dimetilamina	0.20 – 5.00	0.9997	2.65
Glicina	0.20 – 15.00	0.9999	2.04
Glucosa	0.20 – 5.00	0.9996	5.45
Glutamina	0.20 – 5.00	0.9998	2.75
Histidina	0.20 – 5.00	0.9997	4.68
Taurina	0.20 – 5.00	0.9981	4.89
TMNO	0.20 – 5.00	0.9994	3.86
Trigonelina (4.44 ppm)	0.20 – 5.00	0.9999	1.37
Trigonelina (8.84 ppm)	0.20 – 5.00	0.9999	1.15
Trigonelina (9.13 ppm)	0.20 – 5.00	0.9999	1.64

\* El %DER se calculó considerando los 18 replicados de las curvas.

### 3.8.2 Evaluación de la Precisión

Los resultados de %DER para la evaluación de la precisión intradía son mostrados en la tabla 26, en tanto que los %DER para la evaluación de la precisión intermedia se indican en la tabla 27.

Tabla 26. %DER para la evaluación de la precisión intradía por el método de estándar interno.

Metabolito	%DER		
	Nivel 1 (n= 3)	Nivel 3 (n= 3)	Nivel 6 (n= 3)
Ácido glicólico	1.58	0.47	0.51
Ácido hipúrico	1.37	1.31	0.25
Alanina	1.62	1.26	0.26
Citrato (2.54 ppm)	1.72	1.03	0.25
Citrato (2.66 ppm)	3.50	0.81	0.24
Creatina	0.92	1.23	0.25
Creatinina	1.99	0.56	1.25
Dimetilamina	0.97	1.38	0.40
Glicina	0.94	0.74	0.55
Glucosa	9.91	2.52	0.22
Glutamina	1.73	1.05	0.61
Histidina	1.56	3.38	0.67
Taurina	1.97	1.60	0.44
TMNO	1.54	1.86	0.60
Trigonelina (4.44 ppm)	0.93	0.80	0.26
Trigonelina (8.84 ppm)	0.30	1.49	0.37
Trigonelina (9.13 ppm)	2.67	1.51	0.36

Tabla 27. %DER para la evaluación de la precisión intermedia por el método de estándar interno.

Metabolito	%DER		
	Nivel 1 (n= 9)	Nivel 3 (n= 9)	Nivel 6 (n= 9)
Ácido glicólico	2.65	2.75	3.17
Ácido hipúrico	3.36	3.22	3.29
Alanina	3.71	3.16	3.47
Citrato (2.54 ppm)	4.40	3.16	4.05
Citrato (2.66 ppm)	4.76	3.89	4.15
Creatina	3.15	2.69	2.77
Creatinina	3.56	2.63	3.36
Dimetilamina	2.25	2.12	2.67
Glicina	3.14	2.56	3.31
Glucosa	11.76	3.78	3.39
Glutamina	5.33	4.37	4.48
Histidina	3.75	3.29	1.86
Taurina	5.24	3.23	3.00
TMNO	1.91	2.69	4.41
Trigonelina (4.44 ppm)	1.77	1.88	2.36
Trigonelina (8.84 ppm)	1.56	1.65	2.28
Trigonelina (9.13 ppm)	2.40	1.46	2.27

### 3.8.3 Evaluación de la Exactitud del Sistema

La evaluación del sistema se realizó de manera similar a como se hizo para el método de estándar externo, es decir, a través de la determinación del cálculo del % de error para los 3 niveles de concentración adicionales. Los resultados correspondientes se indican en la tabla 28.

Tabla 28. Porcentajes de error para la evaluación de la exactitud del sistema por el método de estándar interno.

Metabolito	%DER		
	Nivel E1* (n= 3)	Nivel E2 (n= 3)	Nivel E3 (n= 3)
Ácido glicólico	5.47	1.97	3.06
Ácido hipúrico	4.57	1.66	3.36
Alanina	1.81	1.58	3.18
Citrato (2.54 ppm)	2.37	2.40	2.89
Citrato (2.66 ppm)	2.12	2.38	2.46
Creatina	1.85	1.50	2.01
Creatinina	8.69	4.36	2.51
Dimetilamina	4.09	2.39	0.69
Glicina	5.68	3.63	3.57
Glucosa	5.61	1.68	3.03
Glutamina	4.04	2.15	1.20
Histidina	2.11	1.35	0.95
Taurina	8.58	10.23	2.79
TMNO	6.53	3.33	5.89
Trigonelina (4.44 ppm)	2.15	1.48	1.17
Trigonelina (8.84 ppm)	0.38	0.51	1.14
Trigonelina (9.13 ppm)	0.72	0.89	0.89

\* La letra "E" designa los niveles adicionales (diferentes a los de las curvas de calibración), para la evaluación de la exactitud del sistema.

#### 3.8.4 Determinación del Límite de Cuantificación

Los LC, así como el %DER y el % de error encontrados a estos niveles, se presentan en la tabla 29.

Tabla 29. Límites de cuantificación encontrados por el método de estándar interno.

<b>Metabolito</b>	<b>LC (mM)</b>	<b>%DER (n= 3)</b>	<b>% de error (n= 3)</b>
Ácido glicólico	0.20	1.20	15.41
Ácido hipúrico	0.05	3.31	14.96
Alanina	0.05	1.92	4.86
Citrato (2.54 ppm)	0.20	2.11	17.31
Citrato (2.66 ppm)	0.10	4.38	14.40
Creatina	0.05	1.35	6.94
Creatinina	0.20	2.39	16.86
Dimetilamina	0.20	0.80	12.55
Glicina	> 0.20	1.24*	22.60**
Glucosa	0.20	11.17	8.15
Glutamina	0.10	2.55	16.55
Histidina	0.20	1.33	4.89
Taurina	0.20	2.19	14.58
TMNO	> 0.20	2.11*	21.97**
Trigonelina (4.44 ppm)	0.10	4.81	17.37
Trigonelina (8.84 ppm)	0.05	2.8	9.76
Trigonelina (9.13 ppm)	0.05	8.95	5.93

\* %DER obtenidos a una concentración de 0.20 mM.

\*\* % de error obtenidos a una concentración de 0.20 mM.

### 3.9 Evaluación del Efecto Matriz

Una vez realizado el proceso de validación, se seleccionó el método de estándar externo para evaluar su aplicabilidad, ya que arrojó los mejores resultados. Asimismo, se seleccionó para realizar la evaluación del efecto



matriz la señal que aparece a 2.66 ppm, para el citrato, y la que se observa a 8.84 ppm, para la trigonelina.

En cuanto a resultados de la evaluación de la aplicabilidad del método de estándar externo, en la tabla 30 se muestra el porcentaje de efecto matriz obtenido para cada uno de los metabolitos, a partir de la ecuación 4 (sección 2.8). En todos los casos el %EM se encuentra entre  $\pm 25\%$ .

Tabla 30. Porcentajes de efecto matriz de los metabolitos cuantificados por RMN.

<b>Metabolito</b>	<b>%EM</b>
Ácido glicólico	- 6.02
Ácido hipúrico	- 8.84
Alanina	- 3.41
Citrato	- 9.21
Creatina	- 14.38
Creatinina	- 21.96
Dimetilamina	- 4.02
Glicina	- 10.36
Glucosa	6.45
Glutamina	- 8.70
Histidina	- 3.77
Taurina	- 1.57
TMNO	- 3.00
Trigonelina	- 7.09

### 3.10 Aplicación del Método al Análisis de Muestras de Orina

La aplicación del método de estándar externo involucró el análisis por triplicado de 3 muestras de orina de sujetos sanos. El espectro obtenido de una de las muestras se presenta en la figura 23.

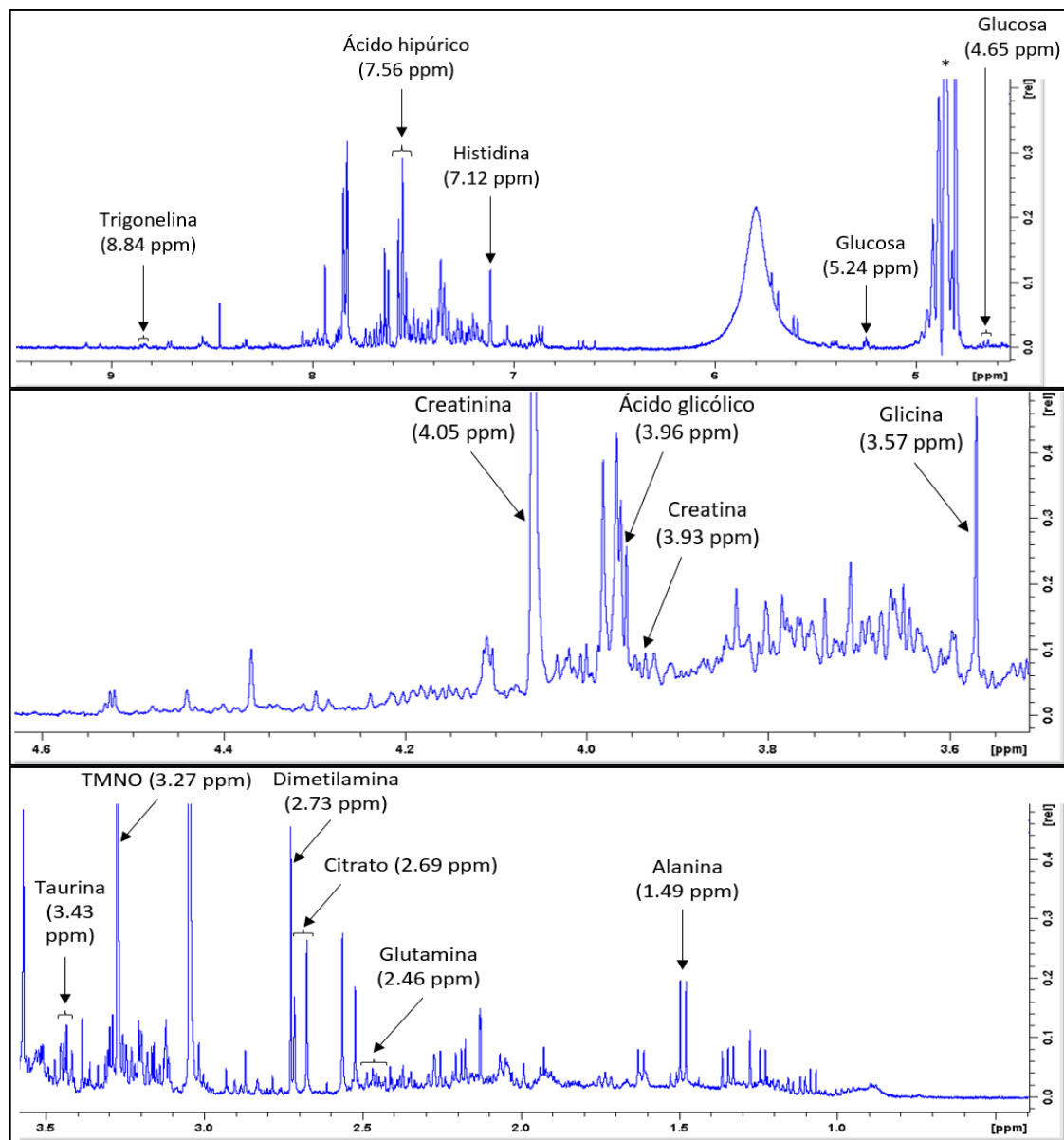


Figura 23 Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de una de las muestras de orina analizadas.

\* Señal residual del agua a 4.70 ppm.

En la figura 23 se señala la asignación de las señales esperadas, correspondientes a los 14 metabolitos analizados en este trabajo.

Los resultados de cuantificación de los 14 metabolitos en las 3 muestras de orina se presentan en la tabla 31. En ella se indican las concentraciones de los metabolitos cuantificados, así como el %DER de las respuestas obtenidas en cada caso.

Cabe mencionar que la concentración del TMNO en la muestra 3 es menor al LC ( $< 0.20$  mM), siendo éste el único caso en el que la concentración de un metabolito no se encuentra dentro del intervalo de trabajo. Además, el %DER correspondiente a la taurina, para las muestras 2 y 3, excedió al 15%.

Tabla 31. Resultados de la aplicación del método de estándar externo a muestras de orina de sujetos sanos.

Metabolito	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Concentración (mM)	%DER (n= 3)	Concentración (mM)	%DER (n= 3)	Concentración (mM)	%DER (n= 3)
Ácido glicólico	0.48	1.78	0.90	1.04	0.74	1.23
Ácido hipúrico	1.84	0.97	0.86	1.34	2.19	1.06
Alanina	0.67	2.72	0.40	1.30	0.27	1.52
Citrato	1.24	1.24	2.70	0.92	1.71	0.74
Creatina	0.26	2.19	0.63	2.15	0.51	1.98
Creatinina	7.62	0.95	11.14	1.12	7.49	0.38
Dimetilamina	0.26	1.52	0.56	0.87	0.29	1.68
Glicina	0.92	0.58	1.22	0.34	1.07	2.14
Glucosa	0.40	3.31	0.38	6.91	0.46	2.45
Glutamina	1.02	3.03	1.74	0.75	1.49	1.02
Histidina	1.10	1.00	1.29	5.69	1.90	0.55
Taurina	0.66	6.15	0.51	21.71	0.38	21.59
TMNO	0.69	1.48	0.33	2.87	< 0.20	-
Trigonelina	0.04	11.10	0.14	4.93	0.18	2.51

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

#### **4.1 Selección de los Metabolitos a Cuantificar**

Para el desarrollo del método de cuantificación de metabolitos urinarios por  $^1\text{H-RMN}$ , el criterio inicial de selección de los metabolitos correspondió a aquellos que tienen el 100% de ocurrencia, de acuerdo con el estudio del Metaboloma Urinario Humano (Bouatra et al., 2013); esto debido a que los metabolitos con mayor factibilidad de ser identificados en las muestras de orina de sujetos sanos son de nuestro interés. Asimismo, son los compuestos que poseen mayor viabilidad de ser utilizados en los estudios de metabolómica dirigida. Bajo este criterio, inicialmente fue seleccionado un conjunto de 92 metabolitos.

El segundo criterio de selección consistió en los metabolitos con mayor repetición de reporte ( $\geq 50\%$ ) en los artículos de metabolómica de orina consultados, que incluyen datos de sujetos sanos; así, los resultados de dicha búsqueda nos indican los metabolitos que son más fáciles de identificar y

potencialmente cuantificar en diferentes poblaciones y condiciones experimentales.

En esta etapa fue descartada la inclusión de la urea como metabolito a cuantificar en este método, dado que su porcentaje de reporte en la literatura fue menor al 50%. Si bien este metabolito es el que presenta la mayor concentración (junto a la creatinina) en los estudios en los que es cuantificado (Bouatra et al., 2013; Pietzner et al., 2015; Shaykhutdinov et al., 2009), en la mayoría de los trabajos es descartado, puesto que los protones que generan la única señal en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se intercambian con el deuterio en cierta proporción. Esta proporción es muy variable, ya que depende de la concentración del resto de compuestos con protones intercambiables en la muestra de orina (Delso et al., 2019; HMDB, 2020). Finalmente, en esta segunda etapa, fueron incluidos 27 metabolitos.

En la tercera etapa, se seleccionaron aquellos metabolitos que presentaron mayor abundancia y un alto porcentaje de ocurrencia ( $\geq 50\%$ ) en las muestras de los sujetos control (datos de sujetos sanos) del proyecto del metaboloma de la ERC del DQA. De esta manera, se analizarían los compuestos más factibles de ser cuantificados en nuestra población, bajo las condiciones experimentales empleadas por nuestro grupo de trabajo. En esta última etapa, se seleccionaron de manera definitiva 12 metabolitos de los 27 preseleccionados en la segunda etapa. Adicionalmente, se incluyeron el ácido glicólico y la glutamina, ya que presentaron una ocurrencia del 100% en el estudio del Metaboloma Urinario Humano (etapa 1). Además, estos metabolitos formaron parte de los más

abundantes en el estudio de la ERC realizado en el DQA y presentaron un 100% de ocurrencia en el mismo.

Por último, cabe mencionar que, si bien la trigonelina no formó parte de los metabolitos con mayor abundancia en el proyecto de ERC, se seleccionó para la cuantificación en este método debido a que es un compuesto característico de la orina, pues es un producto del metabolismo de la niacina (vitamina B3), cuya excreción se lleva a cabo en dicho biofluido (HMDB, 2020). Además, se eligió a la trigonelina por haber presentado un alto porcentaje de reporte en los trabajos consultados en la etapa 2 (% de reporte= 87.5%).

De modo que, bajo esta serie de criterios de selección de metabolitos a cuantificar, finalmente, se estableció un conjunto de 14 compuestos que son listados a continuación: ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, citrato, creatina, creatinina, dimetilamina, glicina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina.

#### **4.2 Evaluación de los Parámetros de Adquisición y Procesamiento**

Los parámetros de adquisición de espectros de  $^1\text{H-RMNC}$  que fueron evaluados correspondieron a la ganancia del receptor, la espera interpulso y el tiempo de adquisición, puesto que su modificación puede afectar significativamente los resultados (Gödecke et al., 2013).

La ganancia del receptor, por ejemplo, es un parámetro que frecuentemente se elige con el fin de maximizar la relación S/R. Así, para una sensibilidad óptima, un analito diluido necesita registrarse con una ganancia elevada. Por otro lado, al analizar un soluto concentrado, es necesario emplear un valor de RG bajo, para evitar la saturación del receptor (Mo et al., 2010).

Para la evaluación de dicho parámetro, se empleó el nivel de concentración más bajo, ya que fue necesario conocer si las ganancias probadas permitían la observación óptima de las señales provenientes de los metabolitos más diluidos, es decir, para evaluar si la sensibilidad era adecuada. En relación con esto, como puede observarse en la figura 9, tanto el espectro adquirido con un valor de RG= 114, como el obtenido con un valor de RG= 64, muestran señales intensas, si bien la intensidad obtenida con el primer valor es mucho mayor.

Además, se utilizó el nivel de concentración más alto para la evaluación de la ganancia, puesto que se deseaba descartar la saturación del detector. En la figura 10, se puede apreciar que no existe tal saturación con ninguno de los dos valores de RG probados, además de que la intensidad de las señales adquiridas con un valor de RG= 114 es mucho mayor, como era de esperarse.

Estos resultados indican que una ganancia del receptor de 114 sería un valor adecuado para la obtención de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMNc. Sin embargo, este valor de RG aplicado a la obtención de espectros de muestras de orina provoca una ligera distorsión en la línea base, lo que puede comprometer la calidad de las señales al ser analizadas con fines cuantitativos. Por esta razón se seleccionó un valor de RG= 64.



Respecto a la espera interpulso, el valor (tiempo) considerado para este parámetro se relaciona directamente con la sensibilidad, de modo que la relajación completa de los espines, antes de la aplicación del siguiente pulso de radiofrecuencia, permite la máxima relación S/R. A este respecto, el D1 debe ser 5 veces mayor al tiempo de relajación longitudinal más alto de todas las señales evaluadas, con el propósito de asegurar la recuperación completa de la magnetización en el eje z (EUROLAB, 2014; McGill, 2012).

Para medir el  $T_1$  de un compuesto existen distintos experimentos, siendo el de recuperación de la inversión el más empleado (Chen et al., 2017). La utilización de este experimento involucra el empleo de agua deuterada al 100%, con el objetivo de disminuir la contribución de las interacciones dipolares a la relajación de los protones. Lo anterior se explica por el hecho de que la constante giromagnética del deuterio (6.536 MHz/T) es aproximadamente 7 veces menor a la del protón (42.576 MHz/T), por lo que las interacciones dipolares son más débiles al emplear D<sub>2</sub>O como disolvente, en lugar de H<sub>2</sub>O. (Tadimalla & Momot, 2014). Sin embargo, debido a que las muestras fueron preparadas en un medio que contiene una mezcla de H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O, este procedimiento de medición del  $T_1$  no es factible de llevarse a cabo. Una forma alternativa de establecer el D1 óptimo, sin necesidad de medir los tiempos de relajación, es por la comparación de espectros obtenidos con distintos tiempos de espera interpulso, buscando que las señales tengan una intensidad máxima.

Así, en la figura 11 se presenta una señal selecta y representativa del espectro de la mezcla de metabolitos, en la que se observa que las

intensidades de las señales obtenidas con un tiempo de espera de 10 s son similares a las obtenidas con un tiempo de 15 s y mayores a las obtenidas con un D1 de 5 s. El hecho de que las intensidades conseguidas con 10 y 15 s sean similares indica que la relajación de los núcleos es completa a los 10 s. Este valor de D1 implica un menor tiempo de experimento (9 minutos y 20 segundos) respecto al tiempo correspondiente a un D1 de 15 s (12 minutos y 20 segundos), lo cual se traduce en una diferencia importante de tiempo de uso de equipo. Esto último es relevante, considerando que la aplicación prevista del método de  $^1\text{H-RMNC}$  desarrollado es para estudios de metabolómica de orina, los cuales implican un número considerable de muestras; por ello, es deseable minimizar el tiempo de análisis por muestra. Por los motivos anteriores se eligió una espera interpulso de 10 s.

Cabe mencionar que la señal mostrada en la figura 11 corresponde a una de las señales aromáticas de la trigonelina ( $\delta = 8.84$  ppm). Esto es importante puesto que se ha demostrado que los núcleos aromáticos poseen los tiempos de relajación longitudinal más largos (Parra, 2019). El hecho de que los núcleos aromáticos estén completamente relajados permite suponer que los núcleos que aparecen en la zona alifática y en la zona media del espectro también lo estén. Lo anterior fue confirmado de manera experimental para todas las señales, tal cual se describió en el párrafo anterior.

El tiempo de adquisición, por otro lado, debe elegirse de modo que se evite el truncamiento del FID (EUROLAB, 2014). El tiempo evaluado fue de 5.45 s y, como puede apreciarse en la figura 12, se obtuvo el decaimiento completo del

FID; indicando que se detectaron las señales completas de todos los metabolitos. La disolución de metabolitos empleada para la evaluación del tiempo de adquisición correspondió a la más concentrada, dado que la magnitud de la señal es directamente proporcional a la concentración (Gödecke et al., 2013); por lo tanto, es visualmente más sencillo confirmar la adquisición completa de la señal del FID.

Otros parámetros de adquisición críticos para el desarrollo de un método de  $^1\text{H-RMNC}$  son el ángulo de giro y el número de incrementos. El ángulo empleado fue de  $90^\circ$ , ya que con él se consigue la máxima intensidad de señal, pues un pulso menor o mayor a  $90^\circ$  deja parte de la posible señal en el eje z (o - z), y únicamente el componente del vector en el eje y genera una señal (Gödecke et al., 2013; Silverstein et al., 2005). También, se optó por utilizar un NS de 32, pues se demostró una buena intensidad de señal, inclusive para el nivel de concentración más bajo. Asimismo, se seleccionó este valor de NS porque una adquisición con NS= 64 aumenta considerablemente el tiempo de experimento, con la consecuente desventaja de incrementar el uso de equipo por muestra (Gödecke et al., 2013; Torres & Price, 2017; Watanabe et al., 2016).

Por otra parte, los parámetros de procesamiento empleados se establecieron considerando las recomendaciones de Gödecke y colaboradores. Como función de ventana se utilizó una multiplicación exponencial con un factor de LB de 0.1 Hz. Esta función mejora la sensibilidad, si bien la resolución de las señales puede estar comprometida. A este respecto, la guía de la EUROLAB sugiere el

empleo de factores de LB bajos (0.1 – 0.3 Hz) para  $^1\text{H}$ -RMNc, con los cuales se incrementa la relación S/R sin comprometer la resolución (EUROLAB, 2014; Gödecke et al., 2013). En el espectro de los 14 metabolitos y el estándar interno (figura 13) se confirman estos hallazgos.

El ajuste de fase se llevó a cabo de forma manual, debido a que se ha comprobado que realizarlo de manera automática puede no ser suficiente en algunos casos de RMNc; en parte porque los algoritmos de ajuste automático existentes generan resultados con exactitud insatisfactoria (Binczyk et al., 2015; EUROLAB, 2014). Además se realizó empleando corrección de orden 0, ya que no tiene ningún efecto perjudicial en el espectro; a diferencia de la corrección de primer orden, tiende a provocar la distorsión de la línea base (Marion, 2012). La ausencia de tal distorsión se puede corroborar en la figura 13.

Finalmente, la corrección de la línea base se efectuó de manera automática, empleando el algoritmo ABSN del software TopSpin. En el caso particular de metabolómica de orina, se recomienda utilizar métodos totalmente automáticos para este parámetro de procesamiento (a diferencia del ajuste de fase, en cuyo caso es preferible la corrección manual), ya que éstos eliminan cualquier sesgo del usuario en la corrección (Emwas et al., 2018). En la figura 13 se confirma que la línea base del espectro carece de artefactos, además, se puede observar que las regiones libres de señal consisten en líneas horizontales, completamente planas, y con intensidad de cero. Por todo lo anterior, la corrección de la línea base se realizó apropiadamente.

### 4.3 Asignación de las Señales en los Espectros de RMN

La comparación de los desplazamientos químicos reportados en la base de datos de la HMDB con los encontrados de forma experimental, usando la mezcla de los metabolitos (con imidazol), permitió la asignación de las señales en el espectro; esto, debido a que la máxima diferencia de desplazamientos encontrada fue muy pequeña (0.03 ppm). Para la dimetilamina, en cambio, se encontró una diferencia relativamente mayor (0.22 ppm), sin embargo, la señal fue asignada sin ambigüedad, ya que los cambios en el pH y la fuerza iónica son factores que pueden afectar el desplazamiento químico esperado. Por lo que la dimetilamina (presente en forma ionizada) muestra una señal que aparece entre 2.74 y 2.76 ppm, lo cual concuerda bastante con el desplazamiento encontrado experimentalmente (2.72 ppm). Ahora bien, la señal en cuestión es propia de los protones de los dos grupos metilo (ver tabla 14), los cuales son químicamente equivalentes. Dicha señal aparece a un mayor desplazamiento en el caso de la dimetilamina protonada, porque la adquisición de una carga positiva en el grupo amino implica decremento en la densidad electrónica de los grupos metilo, traduciéndose en un aumento del desplazamiento químico (Artikis & Brooks, 2019; Silverstein et al., 2005).

Cabe destacar que los desplazamientos químicos encontrados tanto para la histidina como para el imidazol (estándar interno) presentan variaciones menores, entre los distintos niveles de concentración; por ello, los valores de  $\delta$  para estos analitos se presentan en intervalos (tabla 15). Aquí es importante

mencionar que un aumento en la concentración de los estándares conlleva una disminución en el pH de la disolución (a pesar del empleo del buffer), lo cual fue demostrado de manera experimental en este trabajo. Lo anterior se atribuye al empleo de HCl durante la preparación de la disolución madre de algunos metabolitos para favorecer la solubilidad. De modo que es posible que el sistema de amortiguamiento empleado (a base de sales de fosfato, a concentración 100.00 mM) no sea suficiente para compensar las variaciones de pH, como se mencionó en el trabajo de Tredwell y colaboradores (Tredwell et al., 2016). Por este motivo, en futuras aplicaciones se sugiere utilizar una concentración mayor de buffer (150.00 o 200.00 mM).

El pH, en efecto, tiene un impacto en el corrimiento de los desplazamientos de los protones cercanos a grupos ionizables, particularmente situados en la cadena lateral de ciertos aminoácidos, como son el ácido aspártico, el ácido glutámico, la histidina, la cisteína, la tirosina, la lisina y la arginina. Dado que la ionización de la histidina ocurre en el grupo imidazol que la conforma (ver tabla 14 y figura 8, para la estructura química de la histidina y del imidazol, respectivamente), el pH también tiene un efecto en el desplazamiento químico de esta molécula (Artikis & Brooks, 2019; HMDB, 2020; Platzner et al., 2014). La razón por la cual los desplazamientos de las señales de la histidina y el imidazol son particularmente sensibles a los cambios en el pH es que poseen valores de pKa cercanos al pH de trabajo (pH= 7.4) (Emwas, et al., 2015).

Por otro lado, además de considerar los datos espectrales de la HMDB para la asignación, se tomaron en cuenta los desplazamientos obtenidos

experimentalmente a partir de disoluciones individuales de los analitos (ver tabla 15). De esta manera, se consideraron datos de espectros adquiridos en condiciones experimentales similares a las utilizadas en este trabajo. En relación con esto, las diferencias encontradas en los valores de  $\delta$  no fueron mayores a 0.02 ppm, lo cual permitió la asignación adecuada de las señales.

De manera adicional, se confirmó la asignación de todas las señales por medio del software Chenomx NMR Suite, el cual indica un intervalo de  $\delta$  para cada señal del espectro, a partir de una base de datos propia del sistema. Asimismo, se realizó la confirmación definitiva por medio del análisis de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en una dimensión, y diferentes espectros bidimensionales, en concreto, COSY, HSQC y TOCSY.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (apéndice A, figura A1) se identificó el número de señales y los desplazamientos químicos esperados para cada metabolito. Para la glicina, por ejemplo, se identificaron 2 señales, una a 175.36 ppm y la otra a 44.47 ppm, correspondientes al carbono carboxílico y al carbono del metileno, respectivamente (ver la estructura en la tabla 14). Estos desplazamientos coinciden con los mostrados en la HMDB: 175.12 ppm y 44.35 ppm, respectivamente (HMDB, 2020).

Para la alanina, por ejemplo, en el espectro COSY (apéndice A, figura A2) se observó la correlación  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  a 3 enlaces de distancia con un patrón de “picos cruzados”, que indica la interacción de los protones del grupo metilo (a 1.48 ppm) con el protón del grupo metino (a 3.78 ppm).

En el espectro HSQC (figura 16), se verificó la correlación  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a 1 enlace de distancia. Para la glicina, por ejemplo, el espectro muestra un pico que cruza por la señal de los protones del grupo metileno (3.57 ppm) y por la señal del carbono de este mismo grupo (44.47 ppm), indicando la correlación.

En el espectro TOCSY (apéndice A, figura A3), se corroboró la correlación de los protones pertenecientes a un mismo sistema de espín. Así, para la glucosa, por ejemplo, se observa la correlación de los protones del anómero  $\alpha$  en 5.24 ppm, y la correlación de los protones del anómero  $\beta$  en 4.65 ppm.

Una vez confirmada la asignación de las señales, se seleccionaron aquellas que fueran factibles de ser evaluadas, tomando como criterios la aparente ausencia de traslape (que puede afectar la exactitud de los resultados) y la intensidad (relacionada con la sensibilidad) (EUROLAB, 2014; Gödecke et al., 2013). Fue así como se eligió una señal por analito, excepto para el citrato y la trigonelina, en cuyos casos se escogieron 2 y 3 señales, respectivamente, debido a que cumplían con los criterios señalados, para todos los niveles de concentración.



#### **4.4 Determinación de los Intervalos de Concentración de los Metabolitos**

Con base en las concentraciones medias, mínimas y máximas encontradas en los distintos estudios revisados, se estableció el Intervalo de concentración para cada grupo de metabolitos. Como la mayoría de las concentraciones reportadas por cuantificación relativa (sobre todo las muestras control del estudio de ERC) se encontraron por encima de 0.50 mM, se decidió que éste fuera el límite inferior de las curvas de calibración preliminares. Respecto a las concentraciones máximas, éstas fueron menores a 5.00 mM para los 7MMA (en su mayoría), menores a 15.00 en el caso del citrato y la glicina, y menores a 30.00 para la creatinina; por tal motivo, dichas concentraciones se establecieron como los límites superiores correspondientes.

Con los intervalos definidos, se llevó a cabo una prueba de comparación de espectros (empleando para ello 3 muestras de orina de sujetos sanos), lo cual involucró la comparación de las señales de los metabolitos de las muestras y las señales del límite inferior y superior de las curvas, con el fin de ajustar cualquiera de los dos niveles.

Los resultados mostraron que, en al menos una muestra, el TMNO, la creatina, la glucosa y la trigonelina presentaron una señal con menor intensidad a la generada por el límite inferior correspondiente, por lo que habría que disminuir el mismo. Por otra parte, no se presentó ningún problema con los límites superiores, puesto que ninguna señal de las muestras sobrepasó en intensidad a las señales originadas por éstos.

Por lo anterior, se ajustó la concentración mínima de todas las curvas a 0.20 mM, esperando que a esa concentración la relación S/R fuera suficiente para llevar a cabo la cuantificación por RMN. Dicho esto, se definieron los intervalos finales como sigue: 0.20 a 5.00 mM para los MMA, 0.20 a 15.00 mM para el citrato y la glicina, y 0.20 a 30.00 mM para la creatinina. Por otro lado, se definió una concentración de 4.00 mM para el imidazol, con el fin de poder hacer una comparación de la señal del imidazol con las señales de todos los niveles de las curvas; esto último, con el objetivo de calcular las relaciones de áreas para la construcción de las curvas de calibración por EI.

#### **4.5 Evaluación del Imidazol como Estándar Interno**

En primera instancia, el imidazol se propuso como estándar interno debido a que cumple con los requisitos para ser empleado como tal en métodos de  $^1\text{H}$ -RMNc: posee una pureza conocida, puede ser pesado de manera precisa (al no ser higroscópico o volátil), es químicamente inerte con respecto al disolvente utilizado y la matriz analizada, y es poco probable que sus señales traslapen con las propias de los metabolitos urinarios (Bouatra et al., 2013; EUROLAB, 2014; HMDB, 2020). Además, su empleo como estándar interno en estudios que involucran a la  $^1\text{H}$ -RMNc ya ha sido reportado (Harvey et al., 2018).

Al realizar la comparación del espectro de una muestra de orina representativa a la que se le adicionó estándar de imidazol con el espectro de la misma muestra sin la adición del estándar (figura 15), se puede deducir que la señal de interés del imidazol no se traslapa con ninguna de las señales de los

metabolitos, pues en el espectro sin adicionar no aparece ninguna señal en la zona en la cual se observa la señal del imidazol. Por lo tanto, se confirmó la utilidad del imidazol como estándar interno. Este hallazgo era de esperarse, dado que la región aromática de un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de orina de un sujeto sano está relativamente libre de señales (Bouatra et al., 2013; Wojtowicz et al., 2017).

#### **4.6 Evaluación de la Especificidad de las Señales en la Mezcla de Analitos**

Una vez preparada la mezcla de los analitos, la especificidad de la señal de cada uno de los 14 metabolitos y del imidazol se confirmó por medio del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en una dimensión, así como los espectros COSY, HSQC y TOCSY en dos dimensiones. De este modo, se logró la distinción irrefutable de las señales en el espectro, lo cual constituye un requerimiento indispensable para los métodos de  $^1\text{H}$ -RMNc (Gödecke et al., 2013); (EUROLAB, 2014).

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (ventana espectral de 200 ppm aprox.) ofrece una ventaja de resolución significativa respecto al espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (ventana espectral de 10 ppm aprox.), y permite la distinción de las señales de manera más sencilla (Emwas et al., 2019). Cabe mencionar que la mayoría de los experimentos de RMN en 2 dimensiones pueden ayudar a resolver los picos superpuestos, por ello su utilidad para asegurar la especificidad de las señales en mezclas complejas (Emwas et al., 2019).

#### 4.7 Validación del Método de $^1\text{H}$ -RMNc por Estándar Externo

La validación tanto del sistema como del método de  $^1\text{H}$ -RMNc se realizó siguiendo las pautas marcadas en la guía de la EUROLAB, la cual es específica para métodos de cuantificación por RMN, así como la guía de la FDA, referente a la validación de métodos bioanalíticos (EUROLAB, 2014; FDA & CDER, 2018).

En primera instancia, se adquirieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y se realizó la integración manual de cada señal a ser evaluada. La integración se llevó a cabo de esta manera debido a que los desplazamientos químicos para la mayoría de los metabolitos eran ligeramente diferentes, entre los niveles de concentración.

En este punto, es conveniente mencionar que se integraron dos señales de la glucosa, una a 4.65 y la otra a 5.24 ppm, de modo que la suma de las áreas fue considerada para realizar la calibración. Para explicar la razón de haber procedido de esta manera es necesario aclarar algunos detalles.

En primer lugar, la glucosa en disolución acuosa se encuentra en equilibrio formando dos anómeros,  $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -glucosa, cuyas proporciones dependen de distintos factores, como son el tiempo para alcanzar el equilibrio de mutarotación, el pH y la temperatura, entre otros (Oliva et al., 2019).

En segundo lugar, el protón enlazado al carbono anomérico genera dos señales (dobletes), dado que posee un distinto entorno químico en cada una de las formas anoméricas. Estas señales fueron las seleccionadas para la

evaluación, puesto que el resto de las señales presentaron un traslape notable, y por lo mismo, fueron descartadas (Brown et al., 2018).

Ahora bien, aunque la temperatura de análisis (25.0° C) es una condición constante, la composición química de la mezcla, la fuerza iónica y el pH no lo son, por lo que la proporción de los anómeros podría variar. Por estas razones no se considera apropiado tomar la integración de una sola de las señales, aun cuando la señal a 5.24 ppm posee una intensidad mayor, sino que lo más adecuado es sumar las áreas correspondientes a las dos señales del mismo protón.

Otro caso peculiar fue el de la taurina, ya que, para este metabolito, la única señal factible de ser evaluada con fines cuantitativos es un triplete que aparece a 3.42 ppm, el cual presenta un problema evidente de traslape. Para resolverlo, se recurrió a la deconvolución de las señales (utilizando el programa TopSpin), proceso mediante el cual fue posible calcular el porcentaje de contribución de la señal de la taurina en el conjunto total de señales. Con ello, se pudo obtener el área correspondiente al metabolito, y, por consiguiente, realizar las curvas de calibración.

Una vez realizada la integración de las señales de los 14 metabolitos, se construyeron las curvas de calibración por estándar externo.

El primer parámetro evaluado fue la linealidad. A este respecto, se encontró que todas las curvas presentaron un aspecto lineal, como el que se aprecia en la curva de calibración de la alanina (figura 17). Asimismo, se obtuvieron y

evaluaron los gráficos de residuales de cada metabolito, los cuales mostraron la distribución aleatoria requerida (figura 18) (Crook & Powers, 2020; Moosavi & Ghassabian, 2018).

Los valores de  $R^2$  oscilaron entre 0.9987 y 1.0000, lo que indica una excelente correlación de la respuesta del detector en los intervalos de concentración estudiados, la cual está dada por valores  $\geq 0.9950$ , como es el caso (Maniara et al., 1998). Asimismo, otros estudios de  $^1\text{H-RMNC}$  muestran resultados de  $R^2 > 0.99$ , como los presentados aquí (Dikmen & Uslu, 2021; Ge, 2014); (Peez & Imhof, 2020). Si bien los valores de  $R^2$  no indican linealidad directamente, evalúan la correlación y apoyan la idea de linealidad cuando por inspección visual se observa la línea recta. Por lo anterior, se deduce que el método es lineal.

Cabe mencionar que todos los valores de  $R^2$  fueron mayores o iguales a 0.9994, excepto para la taurina, en cuyo caso fue de 0.9987 (tabla 17). La explicación de que el  $R^2$  fuera menor para este metabolito es atribuible al proceso de deconvolución; sin embargo, el resultado es satisfactorio.

Por otra parte, los %DER de FR se encontraron entre 0.90 y 5.73% (tabla 17), siendo valores satisfactorios, puesto que el criterio de aceptación considerado corresponde a un valor  $< 15\%$  (FDA & CDER, 2018). Cabe resaltar que, para este método, todos los %DER fueron menores a 5%, excepto para la glucosa (5.73%). Este ligero incremento en el %DER se atribuye a que la relación S/R en este metabolito es la más pequeña de todas, pues, aunado a que únicamente se detecta un protón, la intensidad total proveniente de éste se

divide en 2 señales por el equilibrio derivado de la mutrorotación, lo que hace que disminuya la intensidad de cada una de ellas. Por esto, a bajas concentraciones ocurre una ligera sobreestimación de la intensidad (sobre todo en el primer nivel de concentración), y con ello, una mayor variabilidad en los FR; sin embargo, el %DER de los mismos es satisfactorio.

En cuanto a la precisión intradía, se obtuvieron %DER entre 0.15 y 10.11% para el nivel 1, entre 0.11 y 3.01% para el nivel 3, y entre 0.29 y 1.05% para el nivel 6. Todos ellos son considerados aceptables, dado que son menores al criterio establecido por la FDA: %DER < 15% (FDA & CDER, 2018). Cabe mencionar que el criterio de aceptación para la precisión es el definido en la guía de la FDA, debido a que el método en cuestión posee un fin bioanalítico, orientado al análisis de muestras de orina. Además, Mutlib sugiere la consideración de dicho criterio para los métodos de cuantificación de metabolitos en diversas matrices biológicas por <sup>1</sup>H-RMN (Mutlib, 2014).

El %DER más alto de todos fue el obtenido para el nivel 1 de la glucosa (10.11%), aunque este porcentaje es alto comparado con los demás (%DER ≤ 3.53%), es satisfactorio (< 15%). Esto se atribuye a la baja relación S/R, la cual es menor en los primeros niveles de concentración. Por otro lado, de manera general, se puede apreciar que el %DER disminuye conforme aumenta el nivel de concentración de cada metabolito (tabla 18), precisamente por el incremento en la relación S/R.

Respecto a la precisión intermedia, la evaluación involucró la preparación de distintas mezclas a partir de disoluciones madre independientes, porque era

necesario evaluar el método completo, desde la preparación de los estándares, hasta la preparación de las disoluciones, la cual puede tener diversas causas de variación (manipulación, aforación, etcétera).

Los resultados de %DER de precisión intermedia fluctuaron entre 0.95 y 12.35% para el nivel 1, entre 0.70 y 2.86% para el nivel 3, y entre 0.56 y 2.33% para el nivel 6. Todos estos valores son menores al 15%, y, por lo tanto, son aceptables, según las guías de validación en que nos basamos (FDA & CDER, 2018). Nuevamente, el %DER más alto de todos es el de la glucosa en el nivel 1 de concentración (12.35%), por la razón mencionada en la precisión intradía. Los demás %DER para el nivel 1 resultaron ser  $\leq 4.68\%$ .

Referente a la exactitud del sistema, se encontraron porcentajes de error entre 0.64 y 9.38% para el nivel 1, entre 0.39 y 9.88% para el nivel 2, y entre 0.37 y 6.89% para el nivel 3. Estos porcentajes son aceptables, pues cumplen con el criterio definido por la FDA: % de error < 15% (FDA & CDER, 2018). De manera similar que para el criterio de precisión, Mutlib sugiere considerar el criterio de exactitud establecido en la guía de la FDA, por el tipo de aplicación que implica el método (Mutlib, 2014). De estos resultados, cabe mencionar que los porcentajes de error más altos corresponden a los encontrados para la taurina en los niveles 1 y 2 de concentración (9.38 y 9.88% respectivamente), pero por debajo del criterio de aceptación (15%). Los porcentajes relativamente altos se asocian al proceso de deconvolución. Por ejemplo, en el primer nivel, la deconvolución de las señales seleccionadas permite distinguir el patrón adecuado de la taurina; sin embargo, se calculó una concentración promedio de



0.3645 mM, cuando el valor real es de 0.40 mM, es decir, se subestimó la concentración. Por otra parte, en el segundo nivel se calculó una concentración promedio mayor a la esperada (2.7470 mM respecto a 2.50 mM), debido a la sobreestimación de la intensidad de la señal. Aun así, ambos porcentajes de error son satisfactorios.

Respecto a los límites de detección, éstos resultaron entre 0.01 y 0.10 mM, correspondiendo a aquellas concentraciones mínimas que permitieron distinguir el patrón de señales del metabolito respectivo sin ambigüedades (EUROLAB, 2014). Los metabolitos con el LD de 0.01 mM fueron la creatina, la dimetilamina, la glicina y el TMNO.

Para la creatina, la obtención de tal valor de LD se debe a que las 2 señales generadas integran para 2 y 3 protones, de modo que la relación S/R es buena, y por lo mismo, se puede hacer la comparación visual de la proporción de intensidades de manera sencilla. Para la glicina, el límite de 0.01 mM encontrado se explica porque la única señal generada integra para 2 protones (buena relación S/R) y se aprecia en una zona donde aparece una cantidad relativamente pequeña de señales. En el caso de la dimetilamina y el TMNO se obtuvo un LD bajo dado que las únicas señales que presentan estos metabolitos integran para 6 y 9 hidrógenos, respectivamente, resultando en una relación S/R excepcionalmente alta, lo que facilita el reconocimiento de las señales sin ningún problema.

Por otra parte, el LD más alto (0.10 mM) fue el de la glucosa, ya que, a esta concentración, el doblete cuyo  $\delta = 4.65$  ppm apenas es distinguido del ruido (si

bien el doblete con  $\delta = 5.24$  ppm se puede distinguir), recalando que la relación S/R es muy baja para las señales de la glucosa, puesto que la intensidad total es generada por un solo protón y se divide en 2 señales, las cuales a su vez por el acoplamiento se dividen en dos picos, haciendo complicado el reconocimiento de cada señal. El LD se confirmó con la concentración de 0.05 mM, en cuyo caso fue imposible distinguir la señal de la glucosa del ruido.

En relación con los límites de cuantificación, éstos oscilaron entre 0.03 y 0.20 mM. El criterio para la definición de los LC fue la obtención de un %DER y un % de error menores al 20%, según lo establece la guía de la FDA (FDA & CDER, 2018).

El LC más bajo correspondió al ácido hipúrico, el citrato (señal a 2.66 ppm) y la trigonelina (señal a 8.84 ppm). Las señales que presentaron el LC más alto (0.20 mM) fueron las correspondientes al ácido glicólico, el citrato (a 2.54 ppm), la dimetilamina, la glicina, la glucosa, la glutamina, la histidina y el TMNO.

En lo que respecta a la exactitud del método, se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con la fórmula empleada por Calderón y Tioffi (ver ecuación 3), en sus respectivos trabajos (Calderón Tobar et al., 2014; Tioffi et al., 2012). Los porcentajes de recuperación promedio se encontraron entre 87.01 y 103.43%, siendo todos ellos satisfactorios, puesto que el criterio de aceptación definido por la FDA abarca el intervalo de 85 a 115%. Los %DER promedio, por otro lado, resultaron entre 0.43 y 3.37%, indicando que el método es preciso (%DER < 15%) (FDA & CDER, 2018).

Ahora bien, el hecho de que algunos de los resultados se encuentren relativamente alejados del 100% de recuperación, se debe a que hay subestimación (en aquellos porcentajes menores al 100%) o sobreestimación (en el caso de los porcentajes mayores al 100%) de la intensidad de las señales, por el problema de traslape que afectó a las mismas. Aquí, es conveniente recalcar que el traslape de señales en las muestras de orina es mucho mayor al presentado en la mezcla de los estándares (debido a la compleja composición química de la orina). Como consecuencia de ello, fue necesario realizar una integración manual muy cuidadosa (Khakimov et al., 2020). En la mayoría de los casos, el resultado de la integración de señales fue una subestimación de la intensidad, y con ello, un % de recuperación menor al 100%.

En particular, para la alanina y la glucosa, se obtuvieron porcentajes mayores al 100% (100.89 y 103.43%, respectivamente), lo que indica una adecuada integración de las señales de estos metabolitos. Aunque no se descarta la posibilidad de que el traslape con otras señales pueda provocar una sobreestimación de la intensidad, y con esto, un % de recuperación mayor al 100%.

En este punto, es importante mencionar que no pudo ser calculado el % de recuperación para las señales de la trigonelina a 4.44 y 9.13 ppm, pues las concentraciones calculadas en la mezcla de muestras, empleando estas dos señales, se encontraron por debajo del LC. Este hallazgo fue el que permitió elegir a estas señales para la cuantificación de la trigonelina en las muestras de

orina. Después de evaluar el % de recuperación para ambas, se seleccionó únicamente la señal a 8.84 ppm para tal fin.

Con respecto a la evaluación de la robustez, se analizó la influencia de algunos factores en la respuesta de ciertos metabolitos. El primer factor planteado fue el volumen de buffer añadido a las disoluciones de trabajo, ya que, en teoría, un ligero cambio en el volumen de buffer podría repercutir en el pH de la disolución, lo cual ocasiona un cambio en los valores de  $\delta$ ; entonces, se quería comprobar si este hallazgo afectaba indirectamente la intensidad de las señales (Artikis & Brooks, 2019). El segundo factor propuesto correspondió a la temperatura de adquisición de los espectros, debido a que la temperatura afecta la diferencia de poblaciones (basal y excitada) de los espines nucleares, además de los equilibrios ácido-base, y se quiso corroborar si ello afectaba la intensidad de señal de manera significativa (Silverstein et al., 2005). El tercer factor elegido para evaluar la robustez fue la espera interpulso, pues al estar directamente relacionada con la relajación de los núcleos, se quería confirmar si a su vez afectaba la magnitud de las respuestas (Mcgill, 2012).

Las respuestas consideradas para la evaluación de la robustez fueron las áreas correspondientes a la alanina ( $\delta= 1.48$  ppm), la creatina ( $\delta= 3.93$  ppm) y la trigonelina ( $\delta= 8.84$  ppm), de modo que se evaluaran los núcleos en la región alifática, la región de protones enlazados a grupos electronegativos, y la región aromática, respectivamente; esto, con la finalidad de evaluar el efecto en una región amplia del espectro.

En lo que concierne a los resultados de la evaluación de la robustez (que involucró la realización de un diseño de experimentos), tanto para la alanina como para la creatina se encontraron valores de  $R^2$  y  $Q^2$  relativamente bajos, un valor de  $p > 0.05$  para el ANOVA, y ausencia de la significancia en el gráfico de coeficientes.

Cabe aclarar aquí que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es definido como la proporción de la varianza en los datos que es explicada por el modelo, e indica bondad de ajuste, mientras que el coeficiente de predicción ( $Q^2$ ) se define como la proporción de la varianza en los datos que es predecible por el modelo, e indica la bondad de predicción o predictibilidad (Gougeon et al., 2018).

Las magnitudes relativamente bajas de ambos coeficientes ( $R^2$  y  $Q^2$ ) se traducen en una nula correlación de las respuestas y los factores evaluados. Esto es lo esperado, pues indica que el modelo generado no es lineal, y por lo mismo, que la magnitud de las respuestas de la alanina y la creatina no son directamente proporcionales al valor de los factores. Por otro lado, un resultado de  $p > 0.05$  para la prueba de ANOVA indica la ausencia de significancia en el modelo de regresión, es decir, se descarta una tendencia lineal (resultado deseado). En el gráfico de coeficientes, por otra parte, se puede apreciar que ninguno de ellos, tanto para factores individuales como para los combinados, posee significancia estadística pues todos los intervalos de confianza incluyen el 0. Este resultado también es idóneo, ya que muestra que ningún factor tiene relevancia en las respuestas al variar su valor (Umetrics AB, 2000). De estos

resultados se deduce que ninguno de los factores estudiados afecta la respuesta de la alanina ni la de la creatina.

Por lo que se refiere a los resultados de la trigonelina, los coeficientes  $R^2$  y  $Q^2$  obtenidos fueron relativamente altos, indicando una buena correlación de la respuesta con alguno (o algunos) de los factores; el valor de  $p$  para el ANOVA fue menor a 0.05, de modo que existe significancia en el modelo de regresión; y el gráfico de coeficientes (figura 20), mostró que el coeficiente de la espera interpulso posee significancia estadística, si bien el coeficiente del resto de factores y combinaciones carecieron de la misma. Estos resultados sugieren que la respuesta de la trigonelina se ve afectada por la espera interpulso. La razón de tal efecto es que los núcleos aromáticos (como el evaluado para la trigonelina), generalmente presentan mayores tiempos de relajación longitudinal (respecto a los núcleos de las demás zonas del espectro); por ello, una ligera disminución en el tiempo de D1 puede causar una disminución en la intensidad de la señal. Como conclusión de esto, al momento de aplicar el método al análisis de muestras de orina, el valor de la espera interpulso debe ser controlado de forma meticulosa.

#### **4.8 Validación del Método de $^1\text{H-RMNC}$ por Estándar Interno**

Para este proyecto, se propuso el desarrollo de un método de  $^1\text{H-RMNC}$  por estándar interno, puesto que algunos autores han sugerido que los resultados

obtenidos por este método (exactitud y precisión) son mejores a los encontrados por el método de EE, ya que tanto el analito como el estándar interno están sujetos a condiciones experimentales idénticas (Gödecke et al., 2013; Watanabe et al., 2016).

La validación del este método comprendió la evaluación de la linealidad, la precisión intradía, la precisión intermedia y la exactitud del sistema, además de la determinación del límite de cuantificación. La integración se llevó a cabo de forma manual, por las mismas razones que para el método de estándar externo.

Los resultados de la evaluación de la linealidad mostraron un aspecto lineal de todas las curvas de calibración, una distribución aleatoria de los residuales, valores de  $R^2$  entre 0.9981 y 1.0000, y %DER de FR entre 1.14 y 5.45%, cumpliendo todos ellos con los requerimientos ( $R^2 \geq 0.9950$ , %DER de FR < 15%) (FDA & CDER, 2018; Maniara et al., 1998; Moosavi & Ghassabian, 2018).

El  $R^2$  más bajo fue el de la taurina ( $R^2= 0.9981$ ), el resto fueron valores de  $R^2 \geq 0.9994$ . En cuanto a los %DER de FR, el mayor valor encontrado fue de 5.45%, para la glucosa, el resto de los porcentajes fueron menores al 5%. Las razones por las cuales el  $R^2$  de la taurina es el menor y el %DER de FR de la glucosa es el más alto ya se han comentado (en la sección anterior).

En cuanto a la precisión intradía, se encontraron como resultados valores de %DER que oscilaron entre 0.92 y 9.91% para el nivel 1, entre 0.47 y 3.38% para el nivel 3, y entre 0.22 y 1.25% para el nivel 6. Todos los resultados de %DER son aceptables, según el criterio (%DER < 15%) (FDA & CDER, 2018). El

%DER más alto de todos fue el de la glucosa en el primer nivel de concentración (9.91%), por la baja relación S/R a una concentración de 0.20 mM. Los demás valores de %DER para este nivel fueron  $\leq 3.50\%$ .

Con respecto a la precisión intermedia, se obtuvieron %DER entre 1.56 y 11.76% para el nivel 1, entre 1.46 y 4.37% para el nivel 3, y entre 1.86 y 4.48% para el nivel 6. Todos los valores son menores al 15% y cumplen con el criterio (FDA & CDER, 2018). El %DER más alto fue el correspondiente a la glucosa para el nivel 1, por la misma causa que en el caso de la precisión intradía. El resto de los %DER para el nivel 1 fueron  $\leq 5.33\%$ .

Relacionado a la exactitud del sistema, los porcentajes de error resultaron entre 0.38 y 8.69% para el nivel 1, entre 0.51 y 10.23% para el nivel 2, y entre 0.69 y 5.89% para el nivel 3. Todos los resultados cumplen con el criterio de aceptación (% error < 15%) (FDA & CDER, 2018). El porcentaje más alto fue el de la taurina al nivel 2 de concentración (10.23%), explicado por la sobreestimación de la intensidad de la señal, atribuida a la deconvolución. Los demás resultados de % de error para el nivel 2 fueron  $\leq 4.36\%$ .

Referente a los LC, éstos se encontraron entre 0.05 y 0.20 mM, excepto para la glicina y el TMNO. En estos dos casos, el límite inferior de las curvas (0.20 mM) presentó % de error mayores al 20% (22.60 y 21.97%, respectivamente). Por lo tanto, la concentración de 0.20 mM no puede ser considerada el LC.



#### 4.9 Comparación de los Métodos de $^1\text{H-RMNC}$

Una vez realizada la validación de ambos métodos (correspondiente a la evaluación de linealidad, la precisión intradía, la precisión intermedia, la exactitud del sistema y los límites de cuantificación), se llevó a cabo la comparación de éstos, pues en este punto ya era posible seleccionar a un método sobre el otro. Aquí resulta conveniente mencionar que los discretos corrimientos en el desplazamiento químico, asociados a las variaciones menores en el pH no afectan los resultados cuantitativos, puesto que los 2 métodos evaluados presentaron muy buena linealidad, precisión y exactitud.

En relación con la linealidad, los resultados de  $R^2$  obtenidos por los 2 métodos fueron muy similares, excepto para la taurina, en cuyo caso se obtuvo un mayor valor con el método de estándar externo (0.9987 respecto a 0.9981). Asimismo, de manera global, los %DER de FR encontrados por ambos métodos fueron muy parecidos, si bien los obtenidos por el método de EE fueron ligeramente inferiores.

En torno a la precisión, los %DER para la evaluación de la precisión intradía fueron muy semejantes. En cambio, los %DER para evaluar la precisión intermedia fueron evidentemente mejores (en la gran mayoría de los casos) con el método de EE. Respecto a la exactitud del sistema, los resultados de % de error obtenidos por los 2 métodos fueron similares.

Ahora bien, de manera general, los LC correspondientes al método de EE fueron inferiores a los obtenidos por el método de EI. Por este último método no

fue posible determinar el LC para la glicina y el TMNO, ya que, en ambos casos, el límite inferior de la curva de curva de calibración presentó un % de error mayor al aceptable (% de error < 20%).

Por otra parte, se comparan los porcentajes obtenidos por ambos métodos para la concentración 0.20 mM de glicina (15.70% por EE y 22.60% por EI), así como para la concentración 0.20 mM de TMNO (17.19% por EE y 21.97% por EI), resulta evidente que la exactitud es mayor con el método de estándar externo.

Finalmente, se seleccionó el método de estándar externo sobre el de estándar interno, puesto que el primero presenta mejor precisión intermedia, y porque de manera general, los límites de cuantificación son menores; por esta razón, no se evaluó la exactitud del método ni la robustez por EI, pues en este punto fue posible dirigir la selección hacia el método de EE. Además de ello, el método de estándar interno implica un mayor tiempo de preparación de estándares y muestras, por el empleo del imidazol, y por lo mismo un costo más alto.

Una vez que se seleccionó el método de EE, fueron elegidas también las señales de citrato y trigonelina que serían utilizadas para la evaluación de la aplicabilidad. Así, para el citrato se seleccionó la señal a 2.66 ppm, debido a que su LC fue casi 7 veces menor al encontrado con la señal a 2.54 ppm (0.03 mM respecto a 0.20 mM). Los demás parámetros ( $R^2$ , %DER de FR, %DER para precisión intradía e intermedia, % de error, LOD y 5 de recuperación) fueron similares para ambas señales.

Para la trigonelina, se escogió la señal a 8.84 ppm, ya que con ella se obtuvo el menor LC, justo por lo cual fue posible calcular la concentración del metabolito en la mezcla de muestras, y con ello, el porcentaje de recuperación. Asimismo, la señal en cuestión presentó mejor %DER de FR y LC comparada con la señal a 4.44 ppm, dado que esta última se ve afectada por aparecer cerca de la zona de supresión del agua. Los valores de  $R^2$ , %DER para precisión intradía e intermedia, % de error y LD fueron similares. Comparando con la señal a 9.13 ppm, la señal a 8.84 mostró mejores resultados de %DER de FR, %DER para precisión intradía e intermedia, % de error, LD y LC, pues la relación S/R es mayor (la señal a 8.84 integra para 2 protones, mientras que la señal a 9.13 integra para uno). El  $R^2$  fue semejante para ambas señales.

#### **4.10 Evaluación del Efecto Matriz**

La guía de la FDA sugiere la evaluación del efecto matriz, de modo que se asegure su ausencia durante la aplicación del método (FDA & CDER, 2018). Esto es importante puesto que dicho efecto repercute en la exactitud, la precisión y la sensibilidad. Así, un efecto matriz mínimo puede llegar a afectar significativamente el rendimiento del método durante el análisis de las muestras, debido a la variación sujeto-sujeto de la matriz biológica (Kadian et al., 2016).

Ahora bien, existen diferentes formas de evaluar el efecto matriz. En una aproximación se calcula el factor matriz, el cual corresponde a la relación de la respuesta del analito en una matriz adicionada con el mismo y la respuesta obtenida para el analito en el disolvente empleado (Kadian et al., 2016; Rudzki et al., 2018).

Otro enfoque para realizar la evaluación se basa en la comparación de las pendientes de distintas curvas de calibración, mediante el cálculo del porcentaje de efecto matriz (%EM) (ecuación 4), el cual involucra la comparación de la pendiente de la curva de calibración realizada en la matriz de la muestra (por adición estándar) con la pendiente de la curva realizada en el disolvente (por estándar externo) (Wang et al., 2021). Cabe mencionar que existen otras maneras de llevar a cabo la evaluación, además de las descritas (Cortese et al., 2020; Ghosh, 2019; Rudzki et al., 2018).

En este trabajo, se realizó la evaluación del efecto matriz por el método de comparación de pendientes, dada la mayor factibilidad respecto al método de comparación de las áreas empleando la matriz y el disolvente.

En cuanto a los resultados, los %EM abarcaron el intervalo de -21.96 a 6.45%. Puesto que lo ideal es que las pendientes de las curvas sean muy similares (por ausencia de efecto matriz), se esperaría que el cociente de ellas fuera cercano a 1, de modo que el %EM estuviera cerca del 100%. A este respecto, el intervalo de aceptación de %EM para métodos bioanalíticos es  $\pm 25\%$ , de manera que todos los resultados obtenidos con la cuantificación de los metabolitos en orina son satisfactorios (GTFCh, 2009).

Ahora bien, todos los porcentajes, excepto uno, son negativos, lo que quiere decir que las respuestas en la mezcla de orina son menores a las obtenidas en la mezcla de los 14 metabolitos. Esto puede ser explicado por el hecho de que el traslape que se presenta en las muestras de orina es mayor al apreciado en los estándares, de modo que en el “pool” de muestras la integración se delimita a una parte de la señal de los metabolitos, subestimando su intensidad.

Finalmente, la glucosa fue el único metabolito que mostró un %EM positivo (6.45%), debido a que existe una o más señales que no se pueden descartar durante la integración, de modo que la intensidad de la señal es sobreestimada y se presenta un efecto matriz positivo. También por esta razón es que el % de recuperación de la glucosa fue mayor al 100%.

#### **4.11 Aplicación del Método al Análisis de Muestras de Orina**

Un hecho relevante para poder lograr la cuantificación de los metabolitos en las muestras de orina es confirmar la asignación de las señales, y dejar de lado cualquier ambigüedad. Para esto, se emplearon distintas estrategias de identificación de señales por RMN que se resumen a continuación:

- a) Se utilizó el programa Chenomx NMR Suite 8.0, el cual contiene una base de datos de  $^1\text{H}$ -RMN de más de 350 metabolitos, y además ha sido ampliamente empleado en estudios de metabolómica de biofluidos, incluyendo la orina (Bezabeh et al., 2019).

- b) Para la confirmación de la asignación de las señales en la mezcla de metabolitos se recurrió a la obtención de distintos espectros de RMN 2D (Gödecke et al., 2013), y se verificaron las correlaciones debidas al acoplamiento  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  y  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ .
- c) Finalmente, se utilizó la información disponible en la base de datos del Laboratorio de RMN del DQA que contiene espectros 1D y 2D de cerca de 60 metabolitos.

Cabe mencionar que la detección del ácido glicólico es relativamente difícil en muestras de orina, dado que la única señal que presenta este compuesto en un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de orina típico corresponde a un singulete, el cual aparece en una región saturada de otras señales (3.95 ppm), provocando que en ciertos casos pueda presentarse cierta ambigüedad en la asignación (Bouatra et al., 2013). Sin embargo, como se demostró previamente, en las condiciones experimentales de nuestro método, la asignación de este metabolito fue inequívoca, pues quedó verificada a través del método de adición estándar.

Respecto a la glutamina, la baja repetición de reporte (en los artículos consultados en la etapa 2) puede ser explicada porque la señal que comúnmente se emplea para la cuantificación es un multiplete complejo que aparece alrededor de 2.44 ppm; adicionalmente, este número tan grande de picos implica una posibilidad de traslape muy alta (Bouatra et al., 2013; HMDB, 2020). En el método desarrollado en este proyecto de tesis, las señales de la

glutamina pudieron asignarse sin ambigüedad, mediante el método de adición estándar.

Por otra parte, en cuanto a los resultados de cuantificación de la aplicación del método a muestras de orina de sujetos sanos, éstos muestran que los intervalos de trabajo establecidos fueron satisfactorios, ya que la concentración calculada para todos los metabolitos se encontró dentro del intervalo acotado entre el LC y el límite superior de la curva, excepto para el TMNO. Ya que, en una de las muestras de orina analizadas la intensidad de señal de este metabolito fue menor a la intensidad correspondiente al LC; por lo anterior, no fue posible cuantificar el TMNO a ese nivel.

Además, se presentó una muy buena precisión de los resultados, pues todos los %DER de las respuestas fueron menores al 15%, excepto para la taurina en 2 de las muestras, en donde los porcentajes se encontraron alrededor del 22%. La razón de esta variación se atribuye al proceso de deconvolución y a la complejidad del patrón de señales en la zona donde aparece la taurina (a causa del traslape).

Otro punto para destacar es el hecho de que el desplazamiento químico de cada metabolito es ligeramente variable, dependiendo de la muestra analizada (en la figura 14 se ilustra un ejemplo de ello, para las señales del TMNO, en las orinas empleadas para la evaluación del imidazol como estándar interno). Entre las posibles causas de tal corrimiento, están las diferencias en el pH; sin embargo, en este trabajo se empleó un buffer para contrarrestar dichas diferencias. El buffer utilizado correspondió a una mezcla de fosfatos, a una

concentración de 100.00 mM y un pH igual a 7.4, como se recomienda para estudios de metabolómica de orina basados en RMN (Bezabeh et al., 2019; Emwas et al., 2015; Ghini et al., 2019; Tredwell et al., 2016).

Ahora bien, el pH no es el único factor responsable de los cambios en los valores de  $\delta$ , pues la concentración de sales también tiene un papel importante. Así, por ejemplo, algunos carboxilatos polivalentes (tales como el citrato o el oxalato), son particularmente buenos para quelar cationes metálicos, de manera que los compuestos que presentan estos grupos exhiben cambios significativos en el desplazamiento, a medida que varía la concentración de sal. A este respecto, los iones divalentes son los principales contribuyentes (después del pH) a la variabilidad de los desplazamientos químicos (Emwas et al., 2015; Tredwell et al., 2016).



## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- La revisión de la información disponible en la literatura y de datos experimentales obtenidos en el laboratorio de RMN del DQA permitió seleccionar un conjunto de metabolitos con potencialidad de ser cuantificados en muestras de orina de sujetos sanos.
- Se estableció una serie de parámetros instrumentales y de procesamiento necesarios para la obtención de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para la llevar a cabo la cuantificación de metabolitos urinarios.
- Se desarrolló y validó un método de cuantificación por estándar externo mediante  $^1\text{H}$ -RMNc para ácido glicólico, ácido hipúrico, alanina, citrato, creatina, creatinina, dimetilamina, glicina, glucosa, glutamina, histidina, taurina, TMNO y trigonelina, con excelentes parámetros de desempeño.
- El método validado se aplicó satisfactoriamente para la cuantificación simultánea de dichos metabolitos en muestras de orina de sujetos sanos, y podría ser utilizado posteriormente en estudios de metabolómica de orina.

- Los resultados analíticos encontrados en este trabajo de tesis no pueden ser comparados con los obtenidos en estudios de  $^1\text{H}$ -RMNc aplicada a metabolómica de orina de sujetos sanos, debido a que la gran mayoría de ellos emplean cuantificación de tipo relativa.

## **CAPÍTULO 6**

### **PERSPECTIVAS**

- Aplicar el método a muestras de orina con el fin de realizar estudios de metabolómica en sujetos sanos.
- Evaluar si el método desarrollado puede ser aplicado al estudio metabolómico de orina de pacientes afectados por alguna patología, como por ejemplo la enfermedad renal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Artikis, E., & Brooks, C. L. (2019). Modeling pH-Dependent NMR Chemical Shift Perturbations in Peptides. *Biophysical Journal*, 117(2), 258–268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.06.003>
- Barnes, S., Benton, H. P., Casazza, K., Cooper, S. J., Cui, X., Du, X., Engler, J., Kabarowski, J. H., Li, S., Pathmasiri, W., Prasain, J. K., Renfrow, M. B., & Tiwari, H. K. (2016). Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 51(7), 461–475. <https://doi.org/10.1002/jms.3782>
- Barrios, C., Spector, T. D., & Menni, C. (2016). Blood, urine and faecal metabolite profiles in the study of adult renal disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 589, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.10.006>
- Bezabeh, T., Capati, A., & Ijare, O. B. (2019). NMR-Based Urinary Metabolomics Applications. En G. A. Nagana Gowda, & D. Raftery (eds.), *NMR-Based Metabolomics: Methods and Protocols*, Vol. 2037, (p. 215–229). Springer.
- Binczyk, F., Tarnawski, R., & Polanska, J. (2015). Strategies for optimizing the phase correction algorithms in Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Biomedical Engineering Online*, 14(Supl 2), S5. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-14-S2-S5>
- Bingol, K. (2018). Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. *High-Throughput*, 7(2), 9. <https://doi.org/10.3390/ht7020009>
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., & Wishart, D. S. (2013). The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, 8(9), e73076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>
- Branco, F. S. C., Silva, B. V., Do Rio, G. F., Santana, M. J., Júnior, L. H., Pinto, A. C., Boechat, N., & Lião, L. M. (2015). Nuclear magnetic resonance of

- organofluorine compounds: A challenge in the teaching of spectroscopy. *Química Nova*, 38(9), 1237–1246. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150139>
- Brown, G. D., Bauer, J., Osborn, H. M. I., & Kuemmerle, R. (2018). A Solution NMR Approach To Determine the Chemical Structures of Carbohydrates Using the Hydroxyl Groups as Starting Points. *ACS Omega*, 3(12), 17957–17975. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02136>
- Calderón Tobar, Á., Sánchez, M., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., & Silva, J. (2014). Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 36(1), 19–27. [www.ueb.edu.ec](http://www.ueb.edu.ec)
- Cambiaghi, A., Ferrario, M., & Masseroli, M. (2017). Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in Bioinformatics*, 18(3), 498–510. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw031>
- Cassiède, M., Nair, S., Dueck, M., Mino, J., McKay, R., Mercier, P., Quémerais, B., & Lacy, P. (2017). Dataset of urinary metabolites measured by (1)H NMR analysis of normal human urine. *Data in Brief*, 10, 227–229. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.11.101>
- Chen, H., Cai, S., & Chen, Z. (2017). A method for longitudinal relaxation time measurement in inhomogeneous fields. *Journal of Magnetic Resonance*, 281, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2017.05.013>
- Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Magnoni, F., Censi, R., & Di Martino, P. (2020). Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules*, 25(13), 3047. <https://doi.org/10.3390/molecules25133047>
- Crook, A. A., & Powers, R. (2020). Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. *Molecules*, 25(21), 5128. <https://doi.org/10.3390/molecules25215128>
- Cullen, C. H., Ray, G. J., & Szabo, C. M. (2013). A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: Internal, external, and electronic referencing. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51(11), 705–713. <https://doi.org/10.1002/mrc.4004>
- Da Silva, L., Godejohann, M., Martin, F. P. J., Collino, S., Bürkle, A., Moreno-Villanueva, M., Bernhardt, J., Toussaint, O., Grubeck-Loebenstein, B., Gonos, E. S., Sikora, E., Grune, T., Breusing, N., Franceschi, C., Hervonen, A., Spraul, M., & Moco, S. (2013). High-Resolution Quantitative Metabolome Analysis of Urine by Automated Flow Injection NMR. *Analytical Chemistry*, 85(12), 5801–5809. <https://doi.org/10.1021/ac4004776>
- del Campo, G., Zuriarrain, J., Zuriarrain, A., & Berregi, I. (2016). Quantitative

- determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by (1)H NMR. *Food Chemistry*, 196, 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.036>
- Delso, I., Lafuente, C., Muñoz-Embid, J., & Artal, M. (2019). NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111236. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111236>
- Dikmen, G., & Uslu, O. (2021). The application of qNMR for the determination of rosuvastatin in tablet form. *Turkish Journal of Chemistry*, 45(1), 132–142. <https://doi.org/10.3906/kim-2007-7>
- Emwas, A.-H., Luchinat, C., Turano, P., Tenori, L., Roy, R., Salek, R. M., Ryan, D., Merzaban, J. S., Kaddurah-Daouk, R., Zeri, A. C., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Wang, Y., Brennan, L., & Wishart, D. S. (2015). Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics*, 11(4), 872–894. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0746-7>
- Emwas, A.-H. M., (2015). The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. En J. T. Bjerrum, *Metabolomics: Methods and Protocols*, Vol. 1277, (p. 161–193). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13)
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Ryan, D., Brennan, L., Tenori, L., Luchinat, C., Gao, X., Zeri, A. C., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Steinbeck, C., Salek, R. M., & Wishart, D. S. (2016). Recommendations and Standardization of Biomarker Quantification Using NMR-Based Metabolomics with Particular Focus on Urinary Analysis. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 360–373. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00885>
- Emwas, A.-H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., Dos Santos, V. A. P. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, 14(3), 31. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7), 123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical laboratories (EUROLAB). (2014). *Guide to NMR Method Development and Validation – Part I: Identification and Quantification* (Reporte Técnico No. 01/ 2014). Bélgica: Autor.
- Fei, Q., Wang, D., Jasbi, P., Zhang, P., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., &

- Gu, H. (2019). Combining NMR and MS with Chemical Derivatization for Absolute Quantification with Reduced Matrix Effects. *Analytical Chemistry*, 91(6), 4055–4062. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05611>
- Food and Drug Administration (FDA), & Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2018). *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. Maryland: Autor.
- Ge, W. (2014). *NMR-Based Metabolic Profiling: Methods and Application in Cancer Biomarker Discovery*. [Tesis doctoral, Universidad de Michigan].
- Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) (2009). *Guidelines for quality assurance in forensic-toxicological analyses: Requirements for the validation of analytical methods*. Alemania: Autor.
- Ghini, V., Quaglio, D., Luchinat, C., & Turano, P. (2019). NMR for sample quality assessment in metabolomics. *New Biotechnology*, 52, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.004>
- Ghosh, C. (2019). Relative matrix effects: A step forward using standard line slopes and ANOVA analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1378–1386. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.019>
- Gödecke, T., Napolitano, J. G., Rodríguez-Brasco, M. F., Chen, S.-N., Jaki, B. U., Lankin, D. C., & Pauli, G. F. (2013). Validation of a generic quantitative (1)H NMR method for natural products analysis. *Phytochemical Analysis*, 24(6), 581–597. <https://doi.org/10.1002/pca.2436>
- González-Peña, D., & Brennan, L. (2019). Recent Advances in the Application of Metabolomics for Nutrition and Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 479–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121715>
- Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P. L., Guyon, F., & Richard, T. (2018). Wine Analysis and Authenticity Using 1H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3425–3434. <https://doi.org/10.1007/S12161-018-1310-2>
- Harvey, A. J., O'Brien, C., Lamshead, J., Sheedy, J. R., Rathjen, J., Laslett, A. L., & Gardner, D. K. (2018). Physiological oxygen culture reveals retention of metabolic memory in human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 13(3), e0193949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193949>
- Human Metabolome Database*. (s.f.). Recuperado el 24 de Septiembre de 2020, de <https://hmdb.ca/>
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (1995). *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Methodology*. Londres: Autor.
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell*

- Biology*, 17(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Kadian, N., Raju, K. S. R., Rashid, M., Malik, M. Y., Taneja, I., & Wahajuddin, M. (2016). Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 126, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.052>
- Karu, N., Deng, L., Slae, M., Guo, A. C., Sajed, T., Huynh, H., Wine, E., & Wishart, D. S. (2018). A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica Chimica Acta*, 1030, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031>
- Khakimov, B., Mobaraki, N., Trimigno, A., Aru, V., & Engelsen, S. B. (2020). Signature Mapping (SigMa): An efficient approach for processing complex human urine 1H NMR metabolomics data. *Analytica Chimica Acta*, 1108, 142–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.02.025>
- Liu, X., & Locasale, J. W. (2017). Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>
- Maniara, G., Rajamoorthi, K., Rajan, S., & Stockton, G. W. (1998). Method Performance and Validation for Quantitative Analysis by 1H and 31P NMR Spectroscopy. Applications to Analytical Standards and Agricultural Chemicals. *Analytical Chemistry*, 70(23), 4921–4928. <https://doi.org/10.1021/ac980573i>
- Marion, D. (2012). Timing and Related Artifacts in Multidimensional NMR. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research*, 40 A(6), 326–340. <https://doi.org/10.1002/CMR.A.21250>
- Mcgill, N. W. (2012). *Application of Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Chemical Warfare Agents*. Australia: Human Protection and Performance Division.
- Miller, I. J., Peters, S. R., Overmyer, K. A., Paulson, B. R., Westphall, M. S., & Coon, J. J. (2019). Real-time health monitoring through urine metabolomics. *NPJ Digital Medicine*, 2(1), 109. <https://doi.org/10.1038/s41746-019-0185-y>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (4a ed.). Prentice Hall.
- Mo, H., Harwood, J. S., & Raftery, D. (2010). Receiver gain function: the actual NMR receiver gain. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(3), 235–238. <https://doi.org/10.1002/mrc.2563>
- Moosavi, S. M., & Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. En M. T. Stauffer, *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*, (p. 109–127). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72932>



- Mutlib, A. E. (2014). Application of Quantitative NMR in Drug Metabolism Studies. En P. Lee, H. Aizawa, L. Gan, C. Prakash, & D. Zhong (eds.), *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*, (p. 1–31). John Wiley & Sons, Inc <https://doi.org/10.1002/9781118541203.xen0030>
- Nagana Gowda, G. A., & Raftery, D. (2017). Recent Advances in NMR-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 89(1), 490–510. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04420>
- Oliva, L., Fernandez-Lopez, J. A., Remesar, X., & Alemany, M. (2019). The Anomeric Nature of Glucose and Its Implications on Its Analyses and the Influence of Diet: Are Routine Glycaemia Measurements Reliable Enough? *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 9(3), 63–70. <https://doi.org/10.14740/jem555>
- Parra-Naranjo, A. S. (2019). *Desarrollo y validación de un método por resonancia magnética nuclear para la cuantificación de hepatodamianol en extractos estandarizados de Turnera diffusa*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León].
- Peez, N., & Imhof, W. (2020). Quantitative <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy as an efficient method for identification and quantification of PVC, ABS and PA microparticles. *The Analyst*, 145(15), 5363–5371. <https://doi.org/10.1039/d0an00879f>
- Pereira Braga, C., & Adamec, J. (2019). Metabolome Analysis. En S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, Vol. 3, (p. 463–475). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9>
- Pietzner, M., Homuth, G., Budde, K., Lehmpful, I., Völker, U., Völzke, H., Nauck, M., Köhrle, J., & Friedrich, N. (2015). Urine Metabolomics by (1)H-NMR Spectroscopy Indicates Associations between Serum 3,5-T2 Concentrations and Intermediary Metabolism in Euthyroid Humans. *European Thyroid Journal*, 4(Supl 1), 92–100. <https://doi.org/10.1159/000381308>
- Platzer, G., Okon, M., & McIntosh, L. P. (2014). pH-dependent random coil (1)H, (13)C, and (15)N chemical shifts of the ionizable amino acids: a guide for protein pKa measurements. *Journal of Biomolecular NMR*, 60(2–3), 109–129. <https://doi.org/10.1007/s10858-014-9862-y>
- Rhodes, C. J. (2017). Magnetic Resonance Spectroscopy. *Science Progress*, 100(3), 241–292. <https://doi.org/10.3184/003685017X14993478654307>
- Rudzki, P. J., Gniazdowska, E., & Buś-Kwaśnik, K. (2018). Quantitative evaluation of the matrix effect in bioanalytical methods based on LC-MS: A comparison of two approaches. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.052>
- Saucedo, A. L., Perales-Quintana, M. M., Paniagua-Vega, D., Sanchez-

- Martinez, C., Cordero-Perez, P., & Minsky, N. W. (2018). Chronic Kidney Disease and the Search for New Biomarkers for Early Diagnosis. *Current Medicinal Chemistry*, 25(31), 3719–3747. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180307110908>
- Saude, E. J., Adamko, D., Rowe, B. H., Marrie, T., & Sykes, B. D. (2007). Variation of metabolites in normal human urine. *Metabolomics*, 3(4), 439–451. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0091-1>
- Shaykhutdinov, R. A., MacInnis, G. D., Dowlatabadi, R., Weljie, A. M., & Vogel, H. J. (2009). Quantitative analysis of metabolite concentrations in human urine samples using  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectroscopy. *Metabolomics*, 5(3), 307–317. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0155-5>
- Silva, C. L., Olival, A., Perestrelo, R., Silva, P., Tomás, H., & Câmara, J. S. (2019). Untargeted Urinary  $^1\text{H}$  NMR-Based Metabolomic Pattern as a Potential Platform in Breast Cancer Detection. *Metabolites*, 9(11), 269. <https://doi.org/10.3390/metabo9110269>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (7a ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Suarez-Diez, M., Adam, J., Adamski, J., Chasapi, S. A., Luchinat, C., Peters, A., Prehn, C., Santucci, C., Spyridonidis, A., Spyroulias, G. A., Tenori, L., Wang-Sattler, R., & Saccenti, E. (2017). Plasma and Serum Metabolite Association Networks: Comparability within and between Studies Using NMR and MS Profiling. *Journal of Proteome Research*, 16(7), 2547–2559. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00106>
- Sun, S., Jin, M., Zhou, X., Ni, J., Jin, X., Liu, H., & Wang, Y. (2017). The Application of Quantitative  $^1\text{H}$ -NMR for the Determination of Orlistat in Tablets. *Molecules*, 22(9), 1517. <https://doi.org/10.3390/molecules22091517>
- Tadimalla, S., & Momot, K. I. (2014). Effect of Partial  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{D}_2\text{O}$  Replacement on the Anisotropy of Transverse Proton Spin Relaxation in Bovine Articular Cartilage. *PLoS One*, 9(12), e115288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115288>
- Tiossi, R. F.J., Da Costa, J. C., Miranda, M. A., Praça, F. S. G., Bentley, M. V. L. B., Bastos, J.K., & McChesney, J.D. (2012). A validated HPLC analytical method for the analysis of solasonine and solamargine in in vitro skin penetration studies. *Química Nova*, 35(11), 2312–2316.
- Torres, A. M., & Price, W. S. (2017). Common problems and artifacts encountered in solution-state NMR experiments. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research*, 45A(2), e21387. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.21387>
- Tredwell, G. D., Bundy, J. G., De Iorio, M., & Ebbels, T. M. D. (2016). Modelling the acid/base  $^1\text{H}$  NMR chemical shift limits of metabolites in human urine.

*Metabolomics*, 12(10), 152. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1101-y>

- Tynkkynen, T., Wang, Q., Ekholm, J., Anufrieva, O., Ohukainen, P., Vepsäläinen, J., Männikkö, M., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Holmes, M. V., Goodwin, M., Ring, S., Chambers, J. C., Kooner, J., Järvelin, M.-R., Kettunen, J., Hill, M., Davey Smith, G., & Ala-Korpela, M. (2019). Proof of concept for quantitative urine NMR metabolomics pipeline for large-scale epidemiology and genetics. *International Journal of Epidemiology*, 48(3), 978–993. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy287>
- Umetrics AB. (2000). *Design of Experiments, Principles and Applications*. Learnways AB.
- Urine Metabolome*. (s.f.). Recuperado el 25 de Septiembre de 2020, de <https://urinemetabolome.ca/>
- Wang, J., Zhang, M., Chen, L., Qiao, Y., Ma, S., Sun, D., Si, J., & Liao, Y. (2021). Determination of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids in Traditional Chinese Herbal Medicines by UPLC-MS/MS and Accompanying Risk Assessment for Human Health. *Molecules*, 26(6), 1648. <https://doi.org/10.3390/molecules26061648>
- Watanabe, R., Sugai, C., Yamazaki, T., Matsushima, R., Uchida, H., Matsumiya, M., Takatsu, A., & Suzuki, T. (2016). Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Based on PULCON Methodology: Application to Quantification of Invaluable Marine Toxin, Okadaic Acid. *Toxins*, 8(10), 294. <https://doi.org/10.3390/toxins8100294>
- Wishart, D. S. (2016). Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(7), 473–484. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.32>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wojtowicz, W., Zabek, A., Deja, S., Dawiskiba, T., Pawelka, D., Glod, M., Balcerzak, W., & Mlynarz, P. (2017). Serum and urine <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics in the diagnosis of selected thyroid diseases. *Scientific Reports*, 7(1), 9108. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09203-3>
- Wu, J., & Gao, Y. (2015). Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. *Expert Review of Proteomics*, 12(6), 623–636. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1094380>
- Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*, 9(23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>

## APÉNDICES

### APÉNDICE A: ESPECTROS EMPLEADOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD

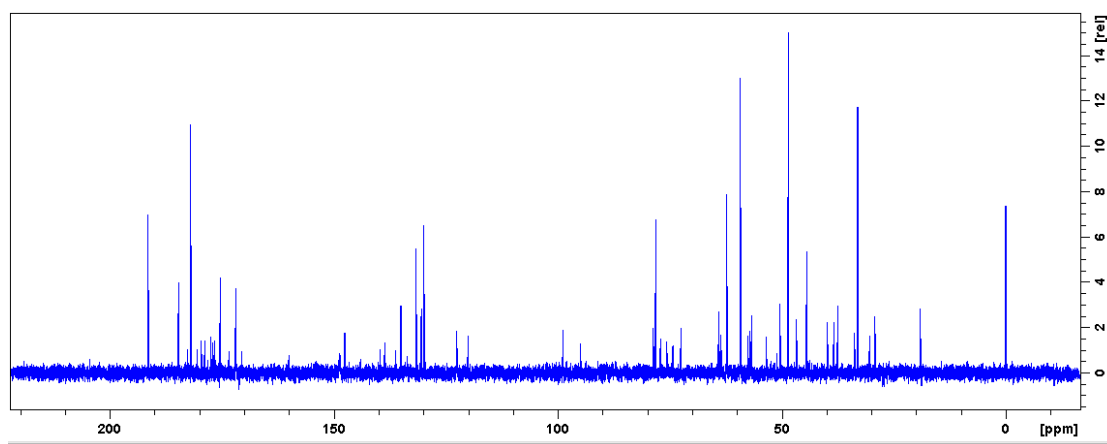


Figura A1. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los 14 metabolitos y el estándar interno (imidazol).

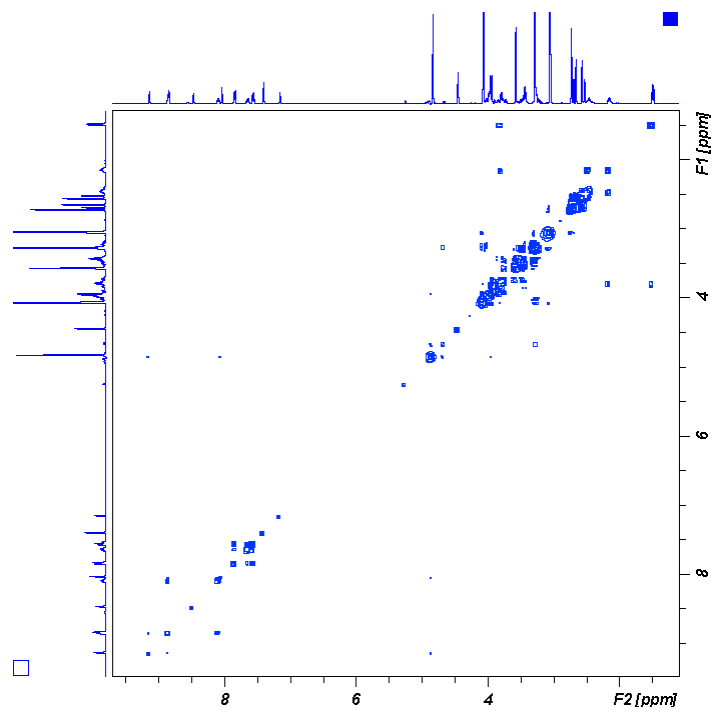


Figura A2. Espectro COSY de los 14 metabolitos y el imidazol.

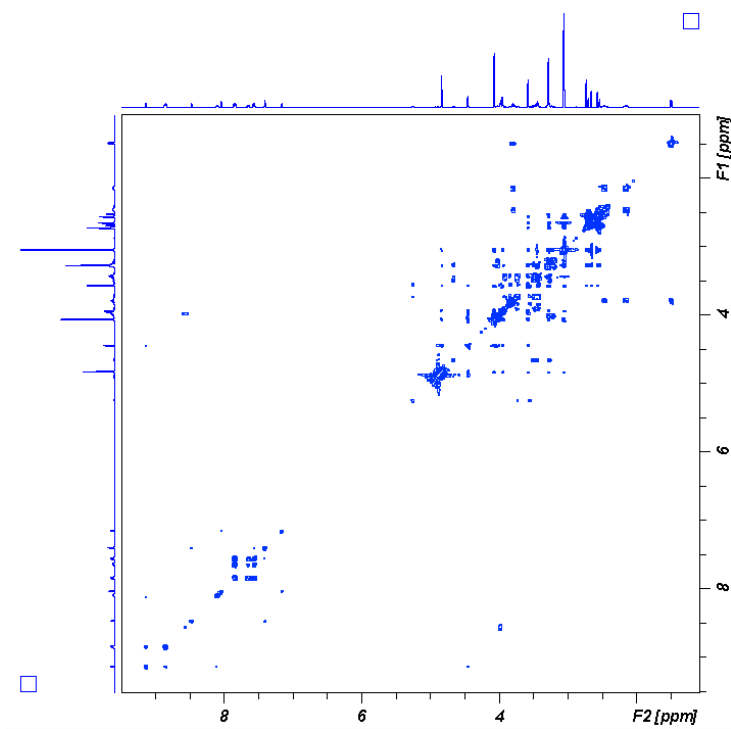


Figura A3. Espectro TOCSY de los 14 metabolitos y el imidazol.

**APÉNDICE B: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD POR EL MÉTODO DE ESTÁNDAR EXTERNO**

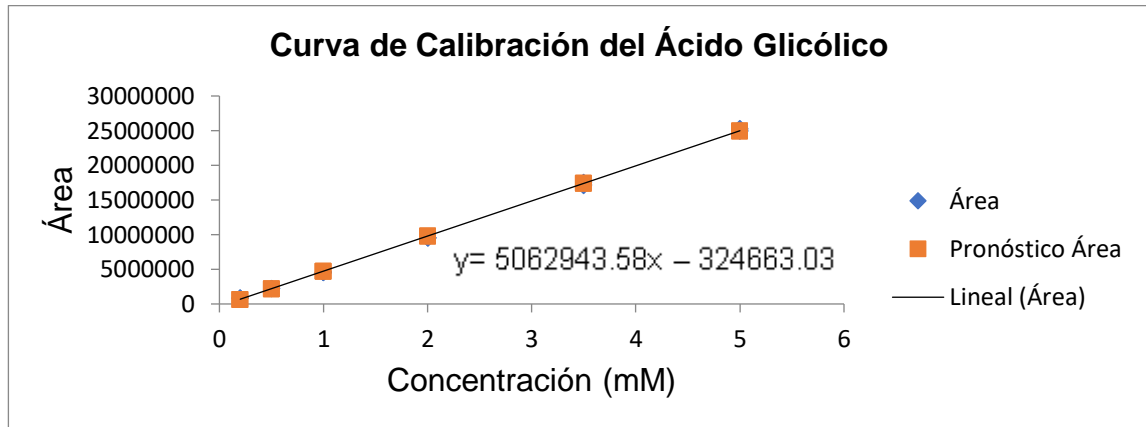


Figura B1. Curva de calibración del ácido glicólico por estándar externo.

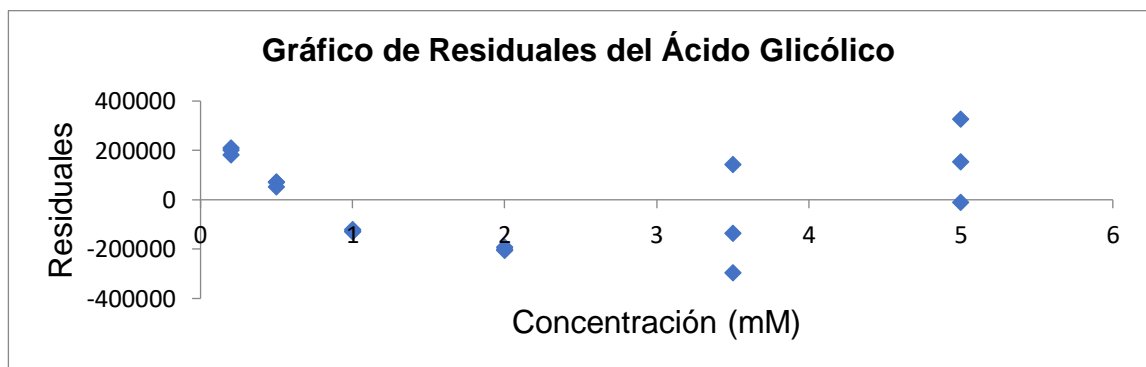


Figura B2. Gráfico de residuales para la curva de calibración del ácido glicólico por estándar externo.

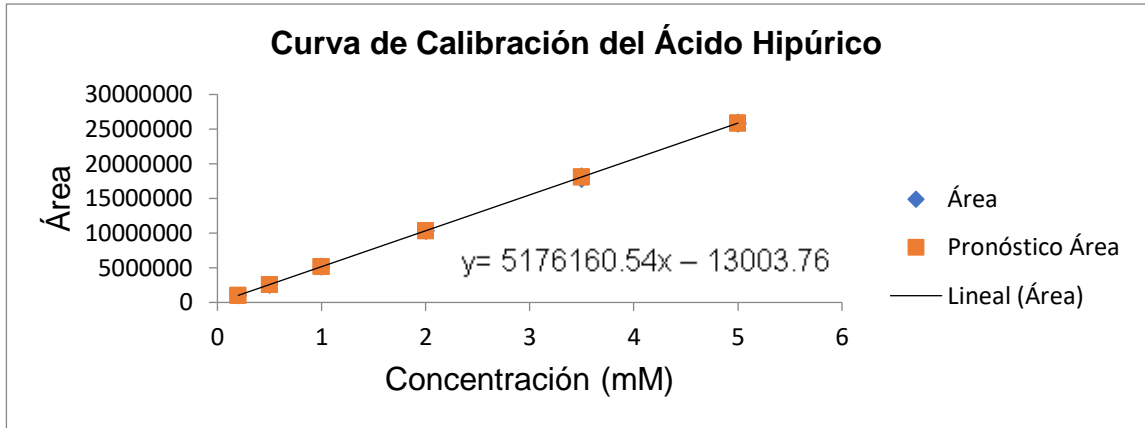


Figura B3. Curva de calibración del ácido hipúrico por estándar externo.

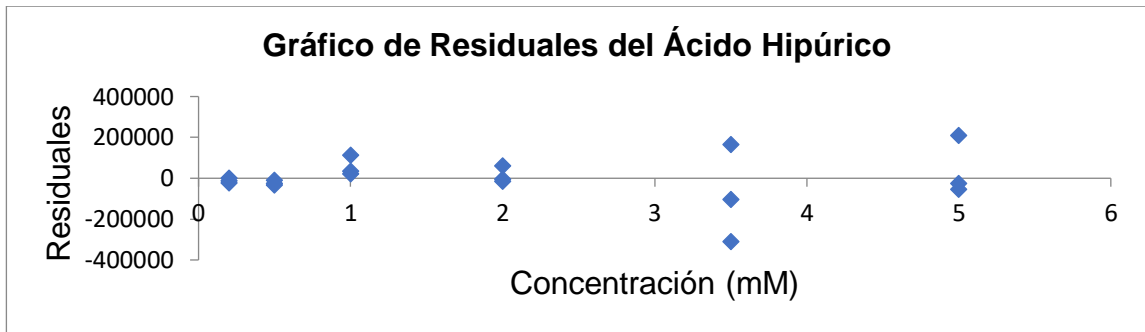


Figura B4. Gráfico de residuales para la curva de calibración del ácido hipúrico por estándar externo.

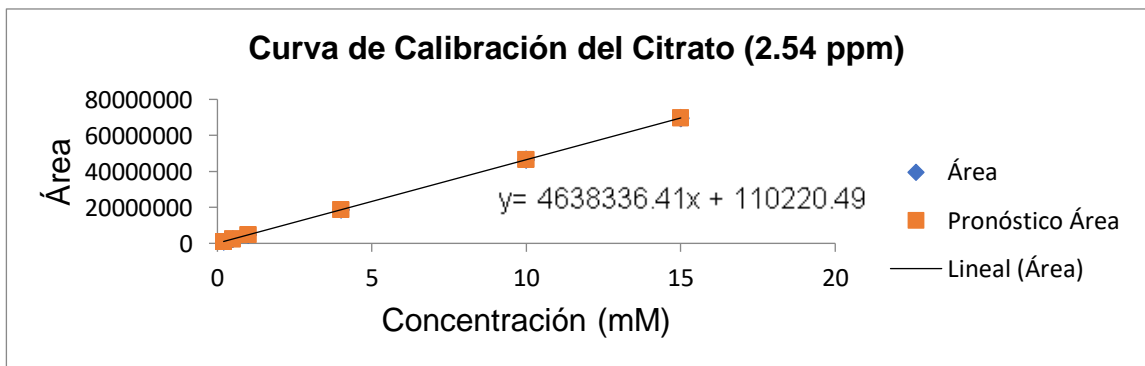


Figura B5. Curva de calibración del citrato (señal a 2.54 ppm) por estándar externo.

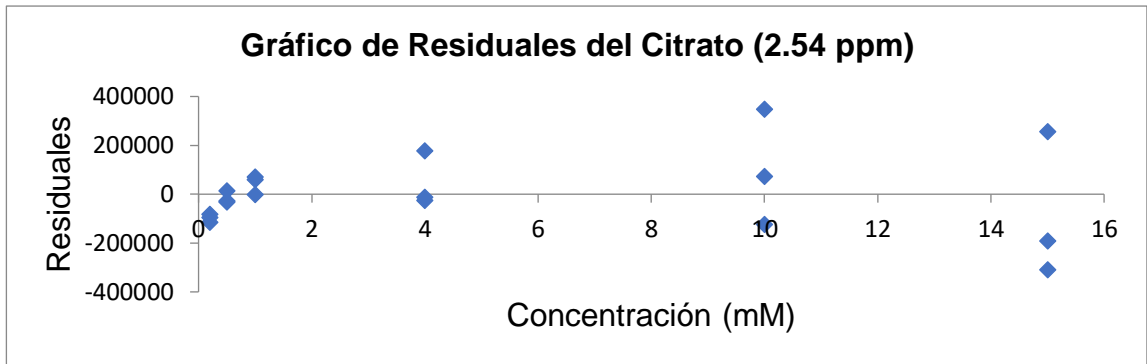


Figura B6. Gráfico de residuales para la curva de calibración de citrato (señal a 2.54 ppm) por estándar externo.

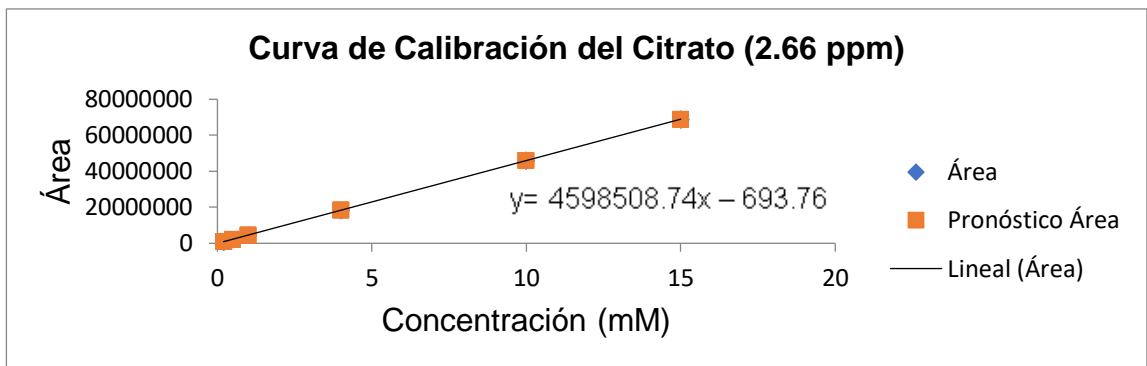


Figura B7. Curva de calibración del citrato (señal a 2.66 ppm) por estándar externo.

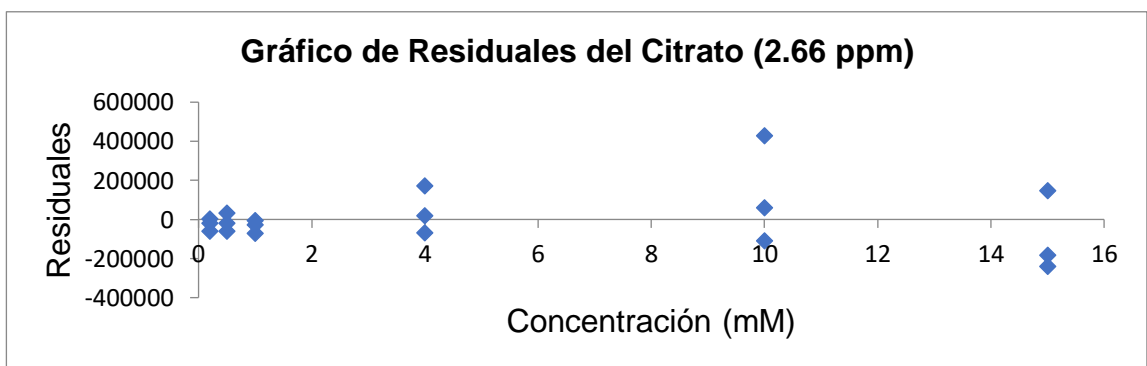


Figura B8. Gráfico de residuales para la curva de calibración del citrato (señal a 2.66 ppm) por estándar externo.



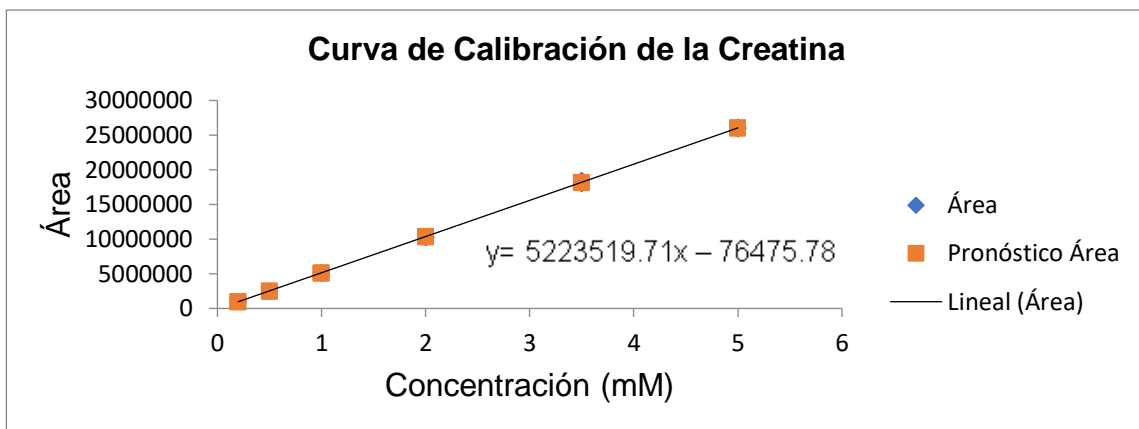


Figura B9. Curva de calibración de la creatina por estándar externo.

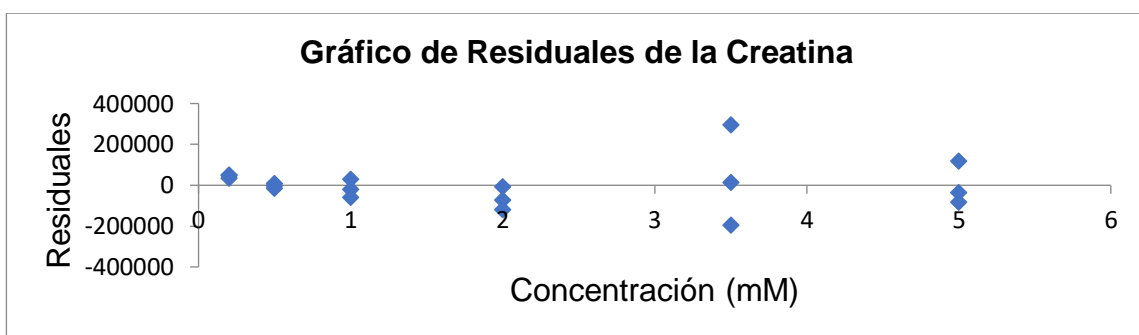


Figura B10. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la creatina por estándar externo.

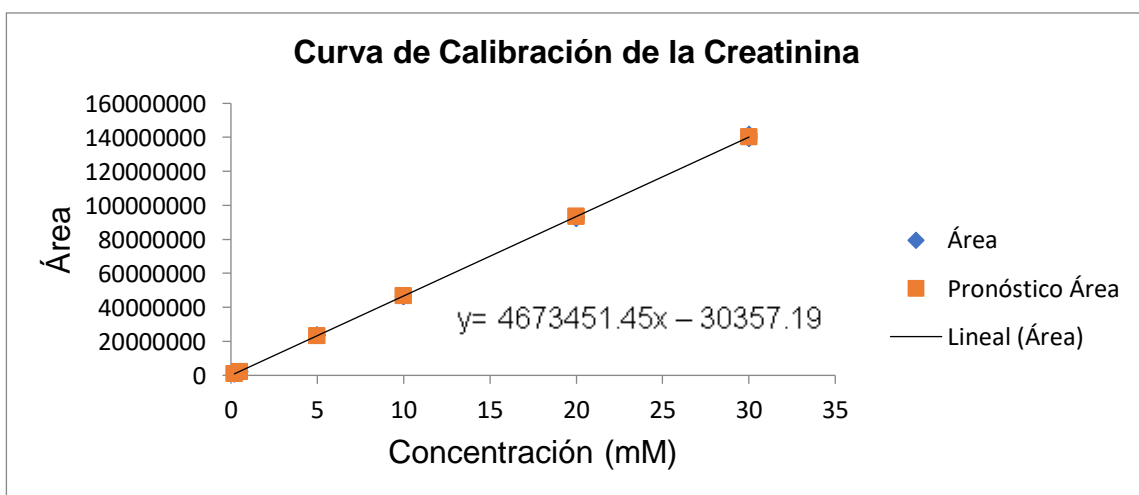


Figura B11. Curva de calibración de la creatinina por estándar externo.

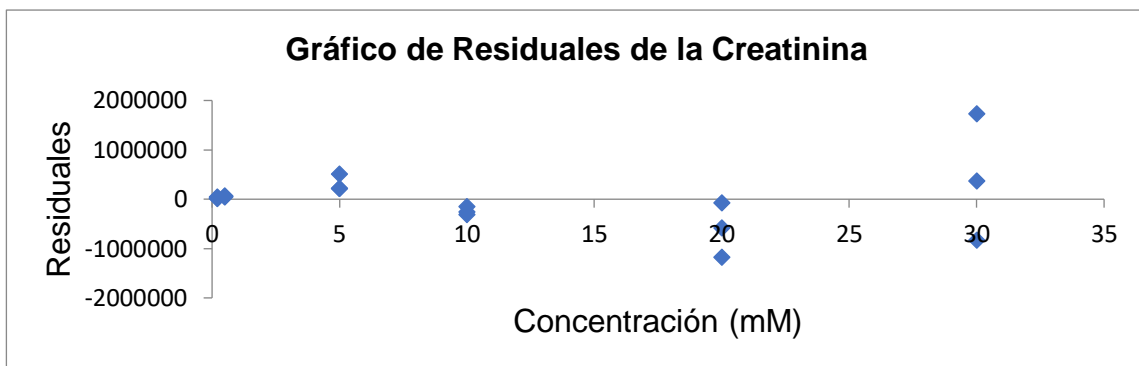


Figura B12. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la creatinina por estándar externo.

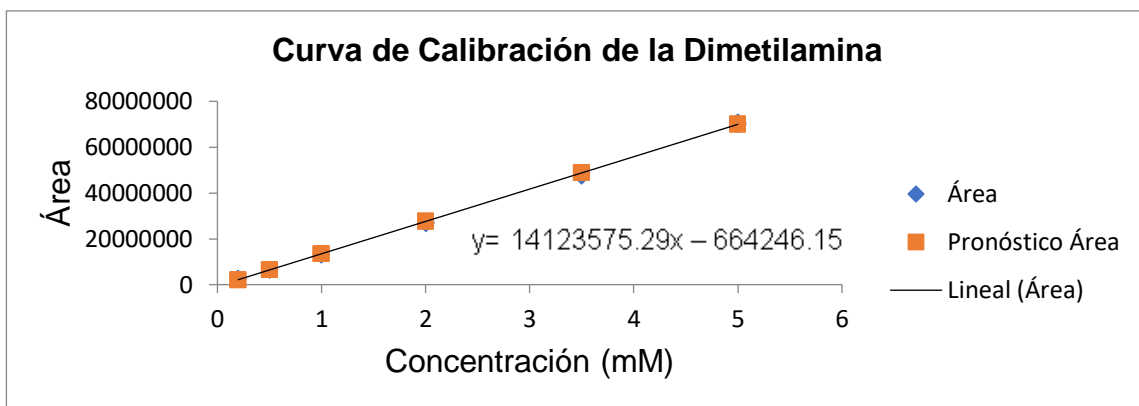


Figura B13. Curva de calibración de la dimetilamina por estándar externo.

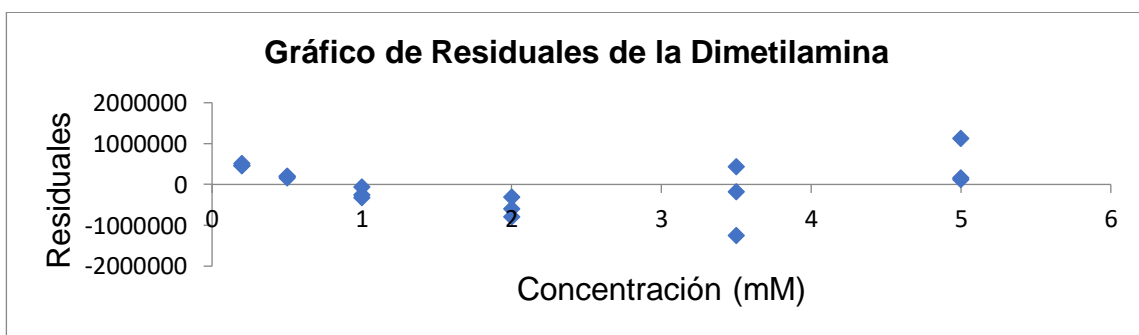


Figura B14. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la dimetilamina por estándar externo.

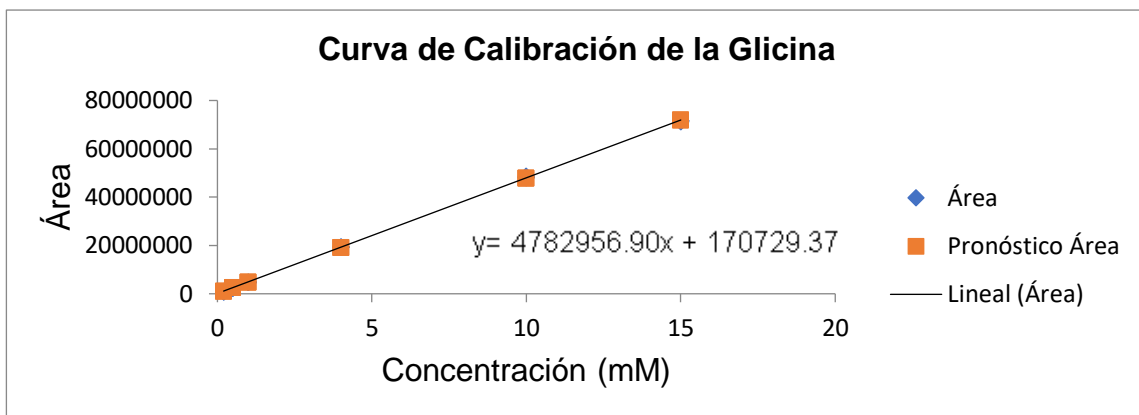


Figura B15. Curva de calibración de la glicina por estándar externo.

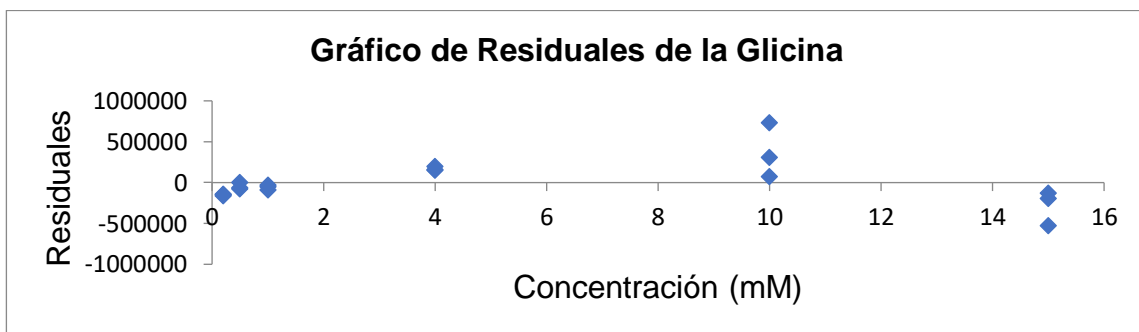


Figura B16. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la glicina por estándar externo.

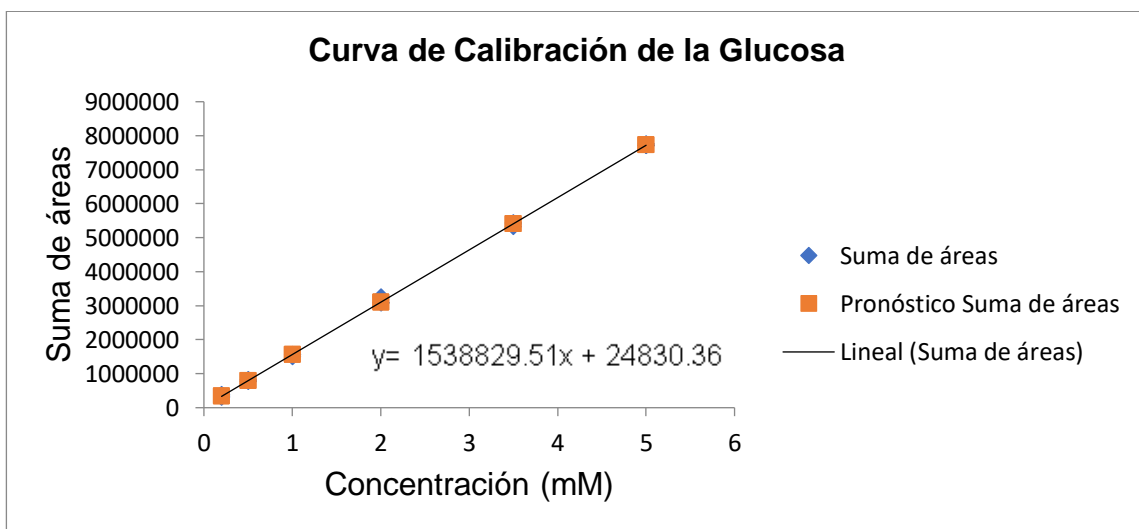


Figura B17. Curva de calibración de la glucosa por estándar externo.

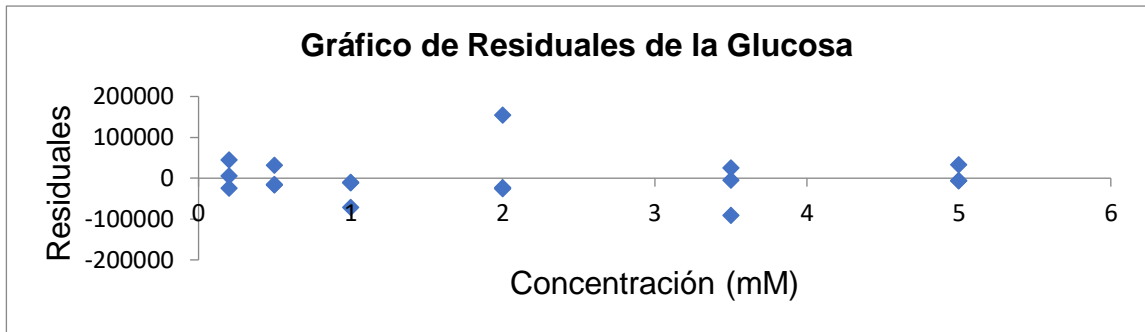


Figura B18. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la glucosa por estándar externo.

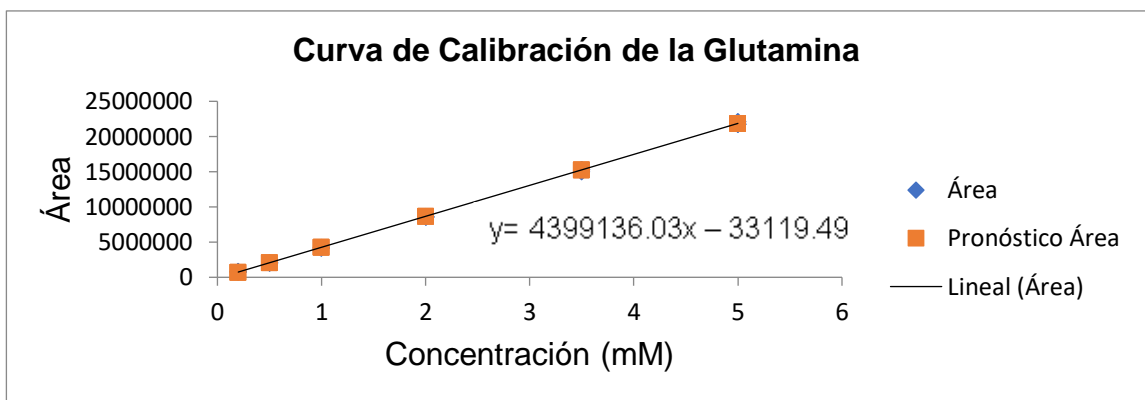


Figura B19. Curva de calibración de la glutamina por estándar externo.

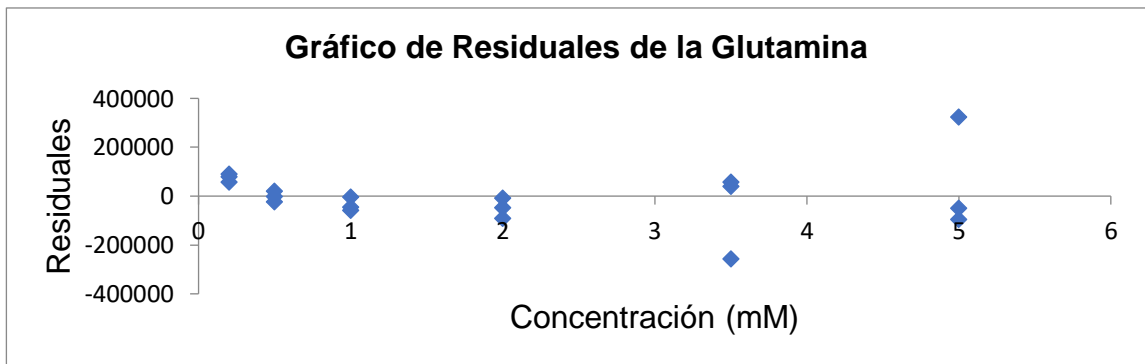


Figura B20. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la glutamina por estándar externo.

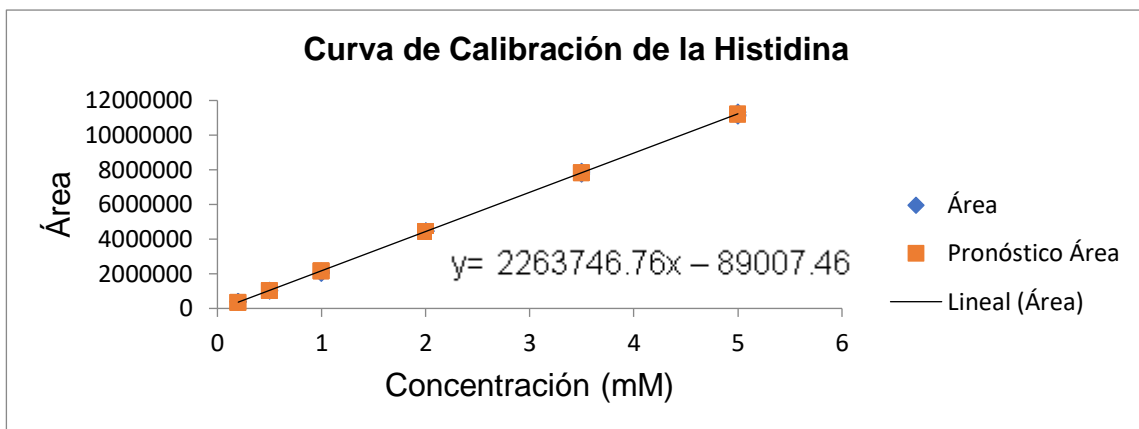


Figura B21. Curva de calibración de la histidina por estándar externo.

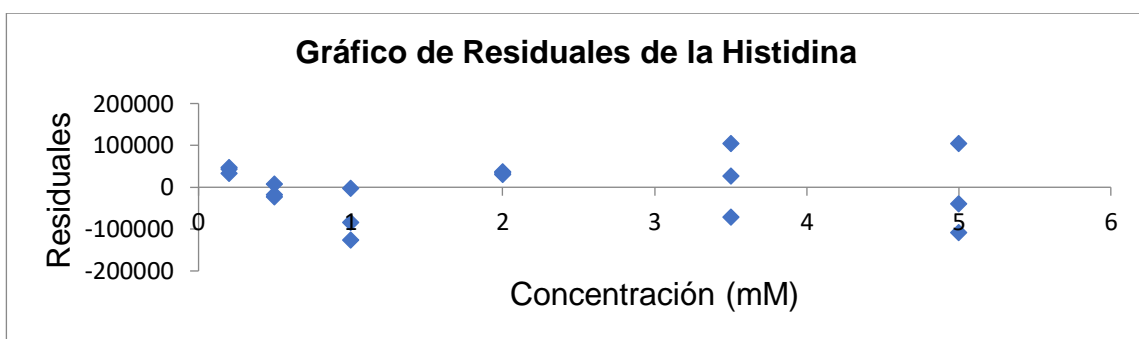


Figura B22. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la histidina por estándar externo.

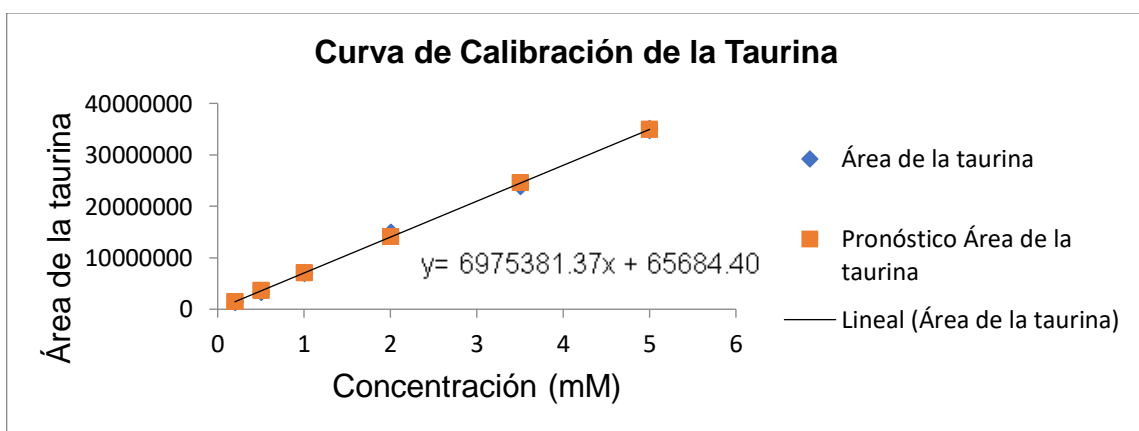


Figura B23. Curva de calibración de la taurina por estándar externo.

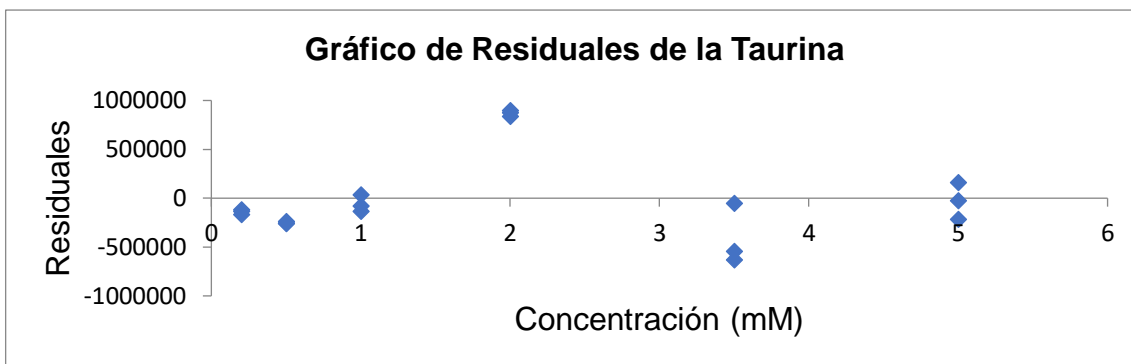


Figura B24. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la taurina por estándar externo.

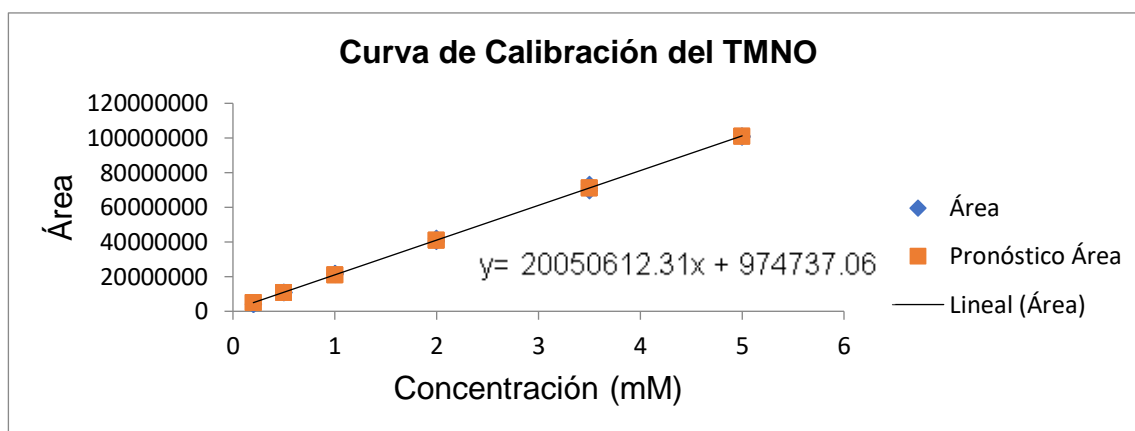


Figura B25. Curva de calibración del TMNO por estándar externo.

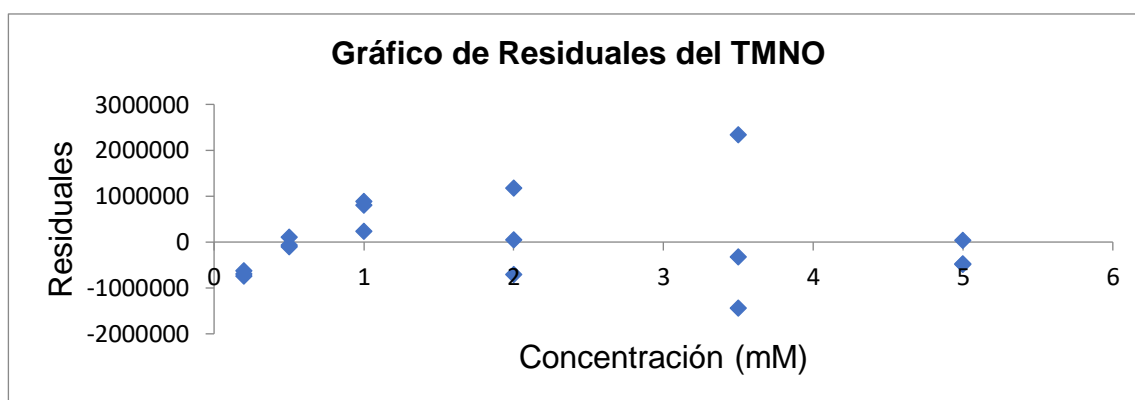


Figura B26. Gráfico de residuales para la curva de calibración del TMNO por estándar externo.

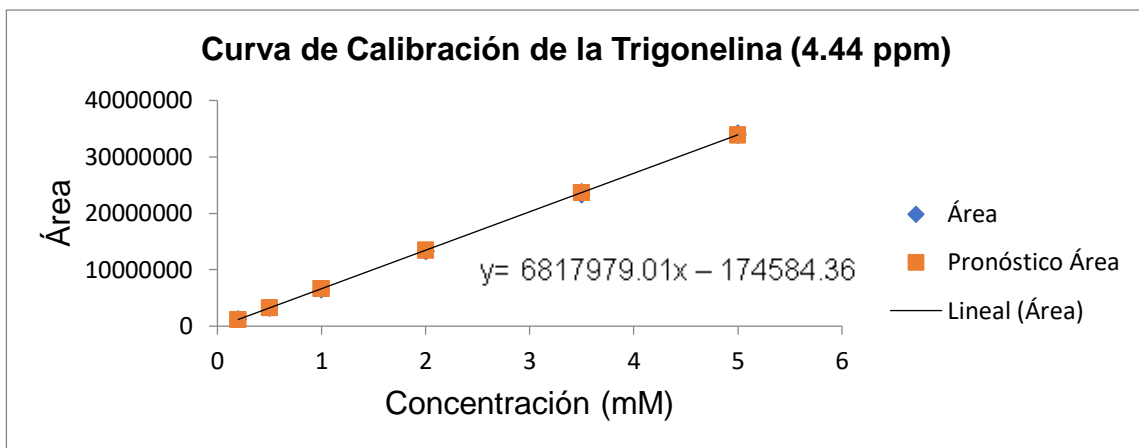


Figura B27. Curva de calibración de la trigonelina (señal a 4.44 ppm) por estándar externo.

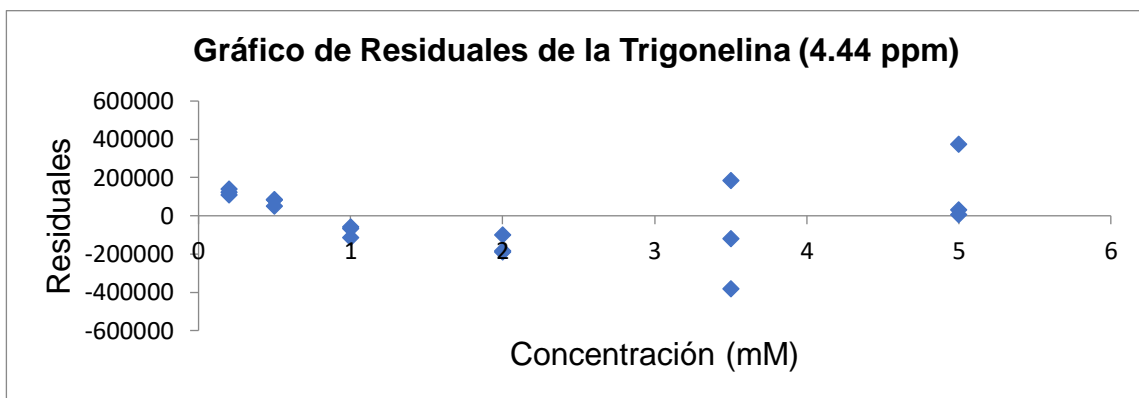


Figura B28. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la trigonelina (señal a 4.44 ppm) por estándar externo.

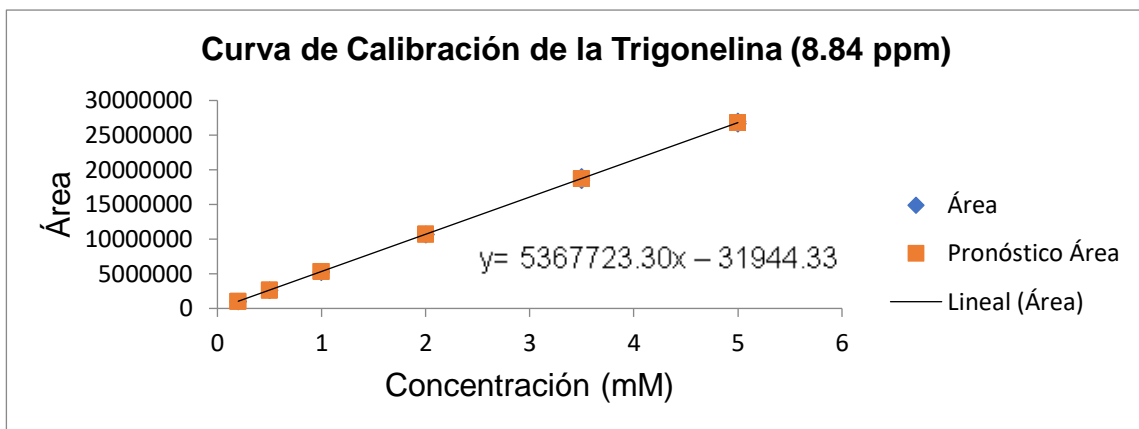


Figura B29. Curva de calibración de la trigonelina (señal a 8.84 ppm) por estándar externo.

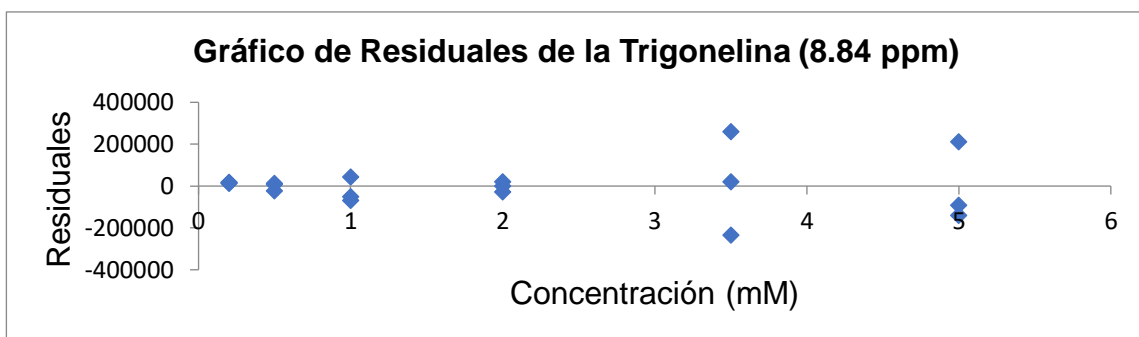


Figura B30. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la trigonelina (señal a 8.84 ppm) por estándar externo.

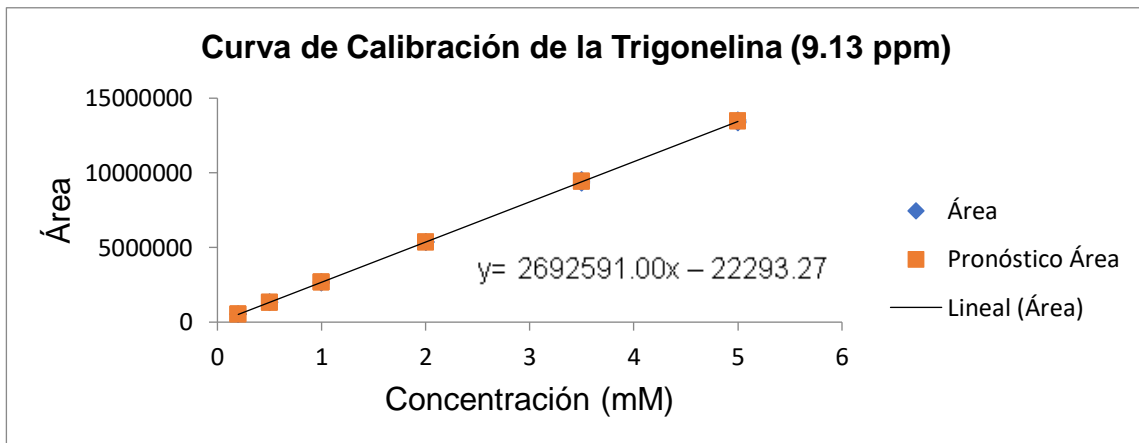


Figura B31. Curva de calibración de la trigonelina (señal a 9.13 ppm) por estándar externo.



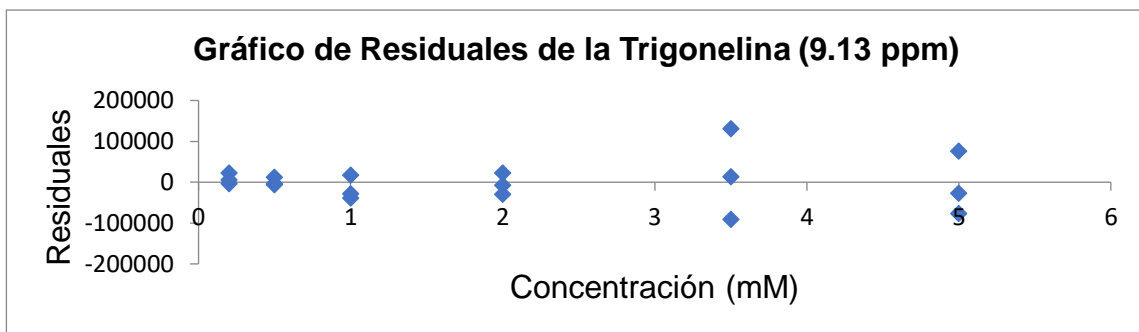


Figura B32. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la trigonelina (señal a 9.13 ppm) por estándar externo.

**APÉNDICE C: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD POR  
EL MÉTODO DE ESTÁNDAR INTERNO**

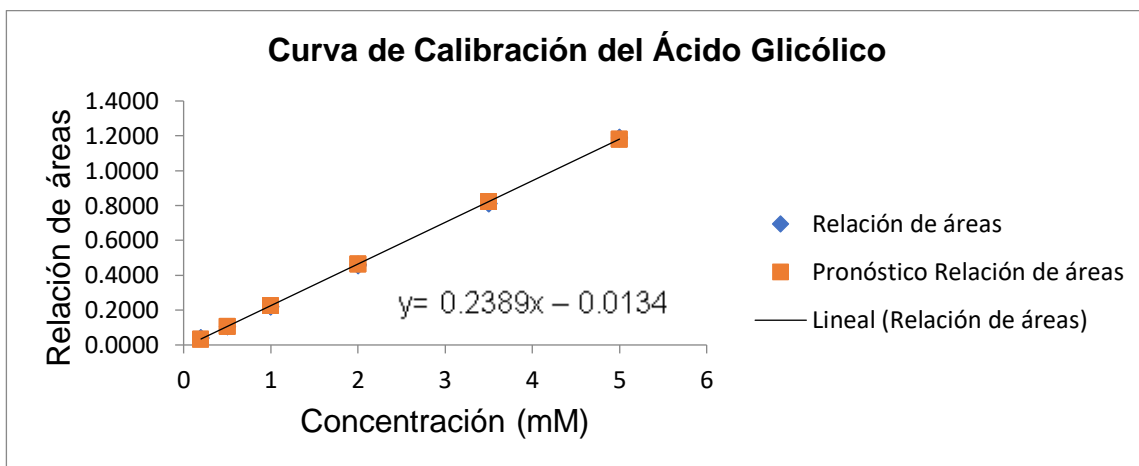


Figura C1. Curva de calibración del ácido glicólico por estándar interno.

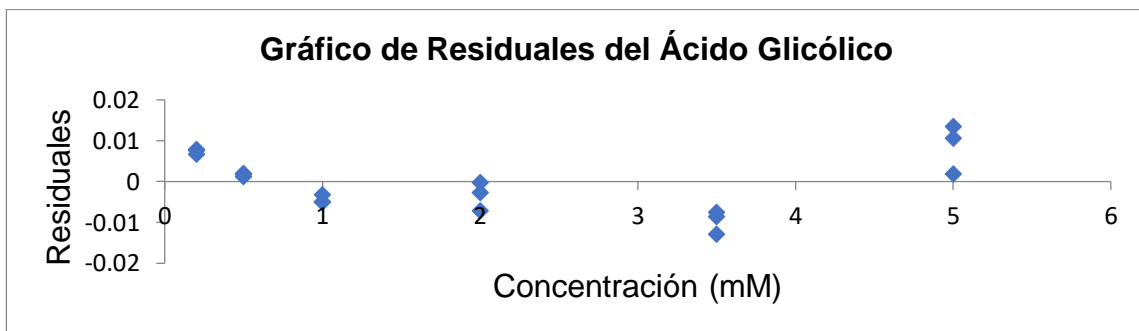


Figura C2. Gráfico de residuales para la curva de calibración del ácido glicólico por estándar interno.

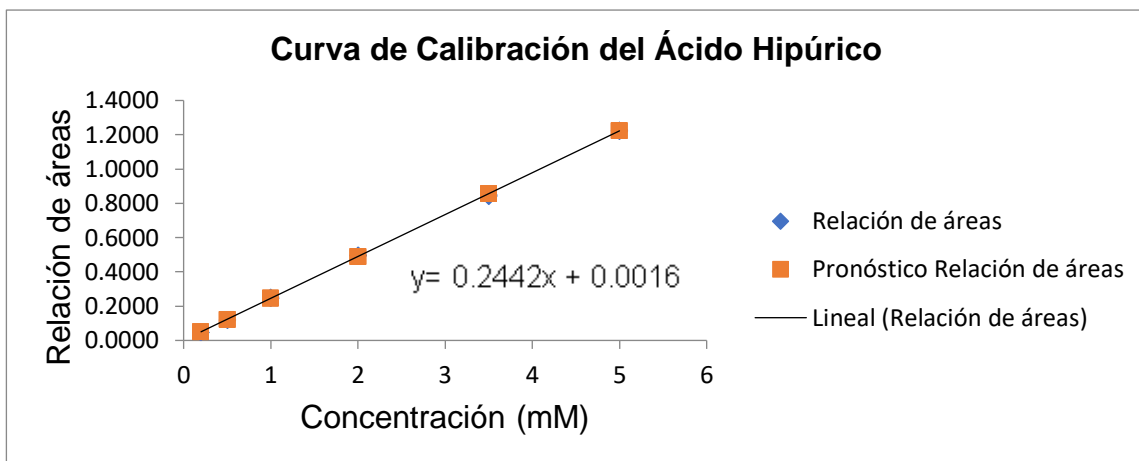


Figura C3. Curva de calibración del ácido hipúrico por estándar interno.

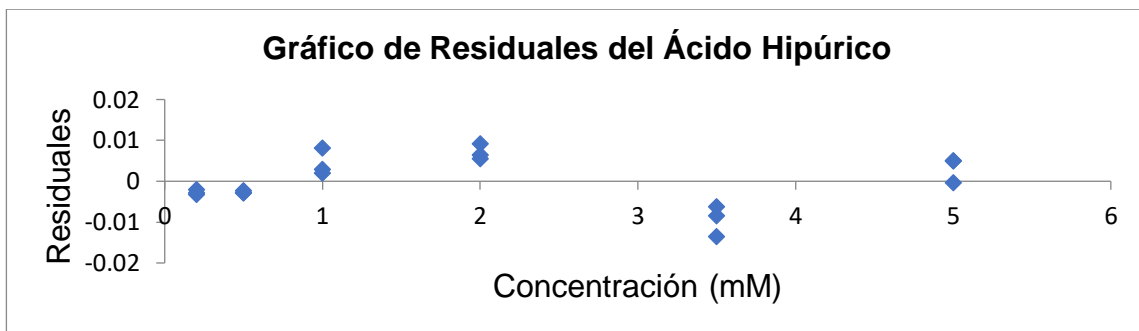


Figura C4. Gráfico de residuales para la curva de calibración del ácido hipúrico por estándar interno.

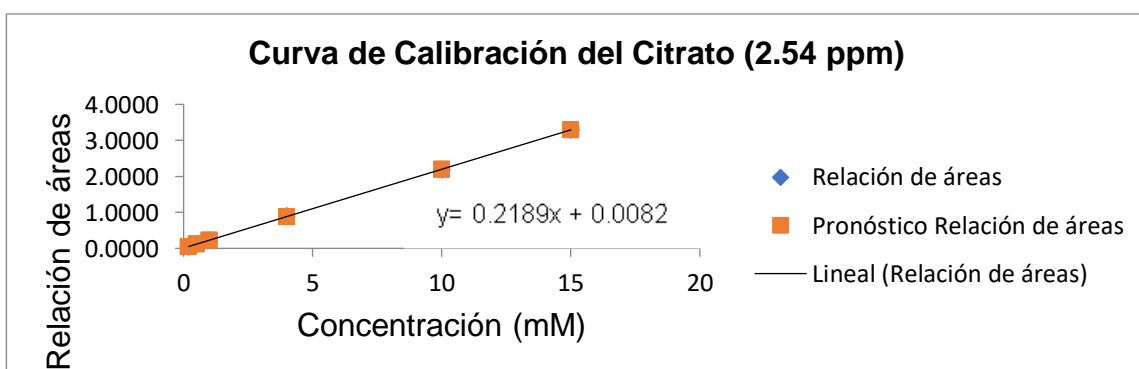


Figura C5. Curva de calibración del citrato (señal a 2.54 ppm) por estándar interno.

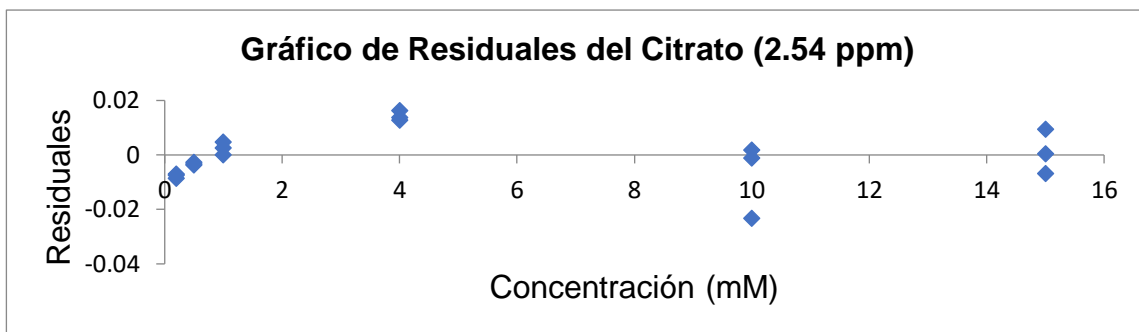


Figura C6. Gráfico de residuales para la curva de calibración del citrato (señal a 2.54) por estándar interno.

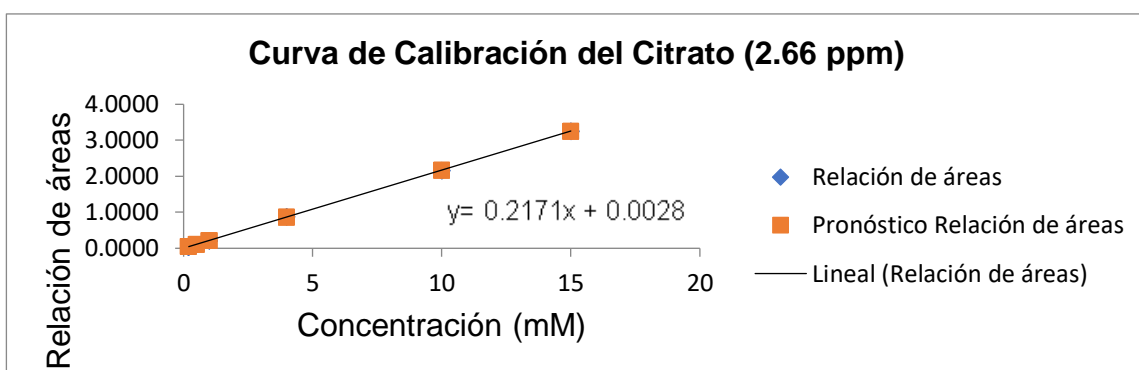


Figura C7. Curva de calibración del citrato (señal a 2.66 ppm) por estándar interno.

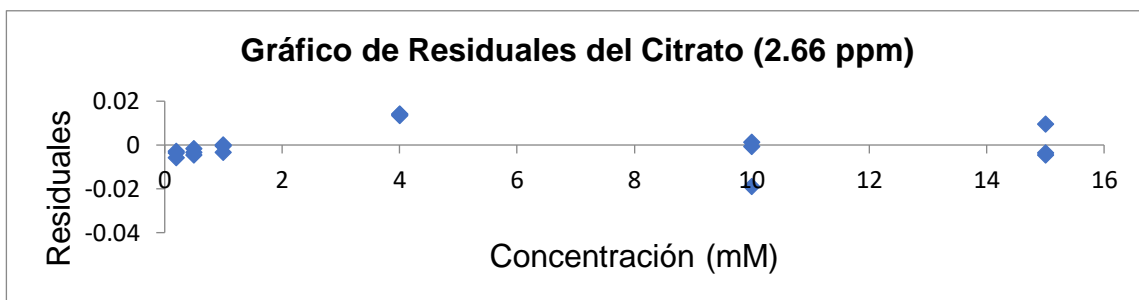


Figura C8. Gráfico de residuales para la curva de calibración del citrato (señal a 2.66) por estándar interno.

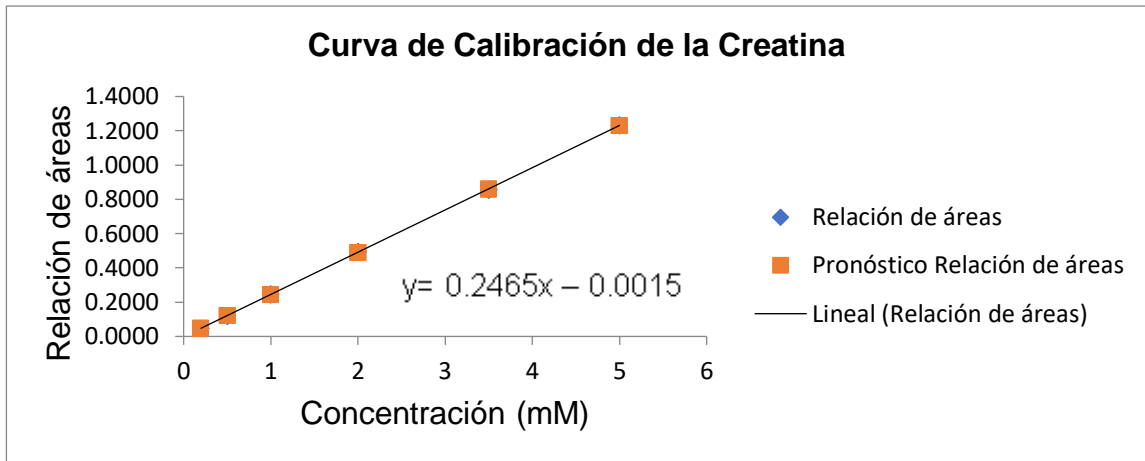


Figura C9. Curva de calibración de la creatina por estándar interno.

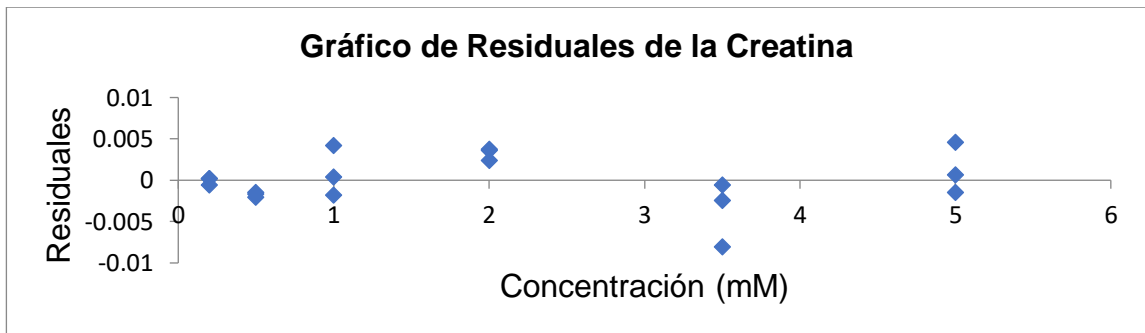


Figura C10. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la creatina por estándar interno.

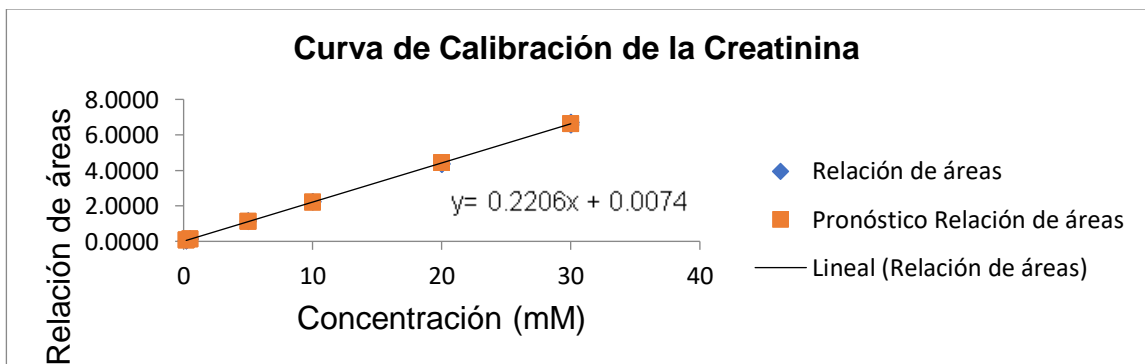


Figura C11. Curva de calibración de la creatinina por estándar interno.

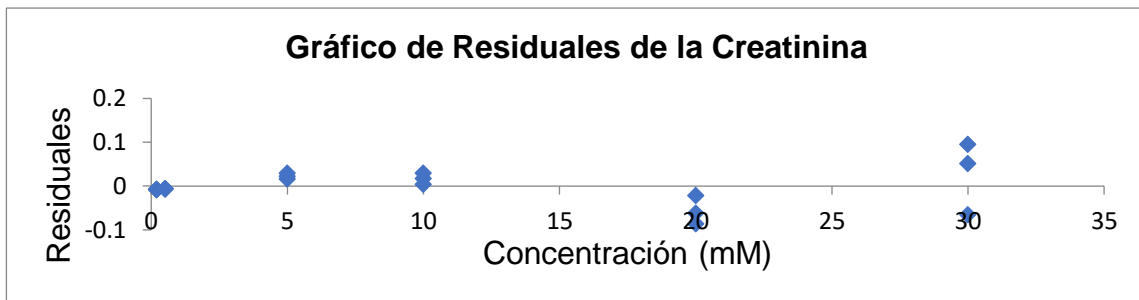


Figura C12. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la creatinina por estándar interno.

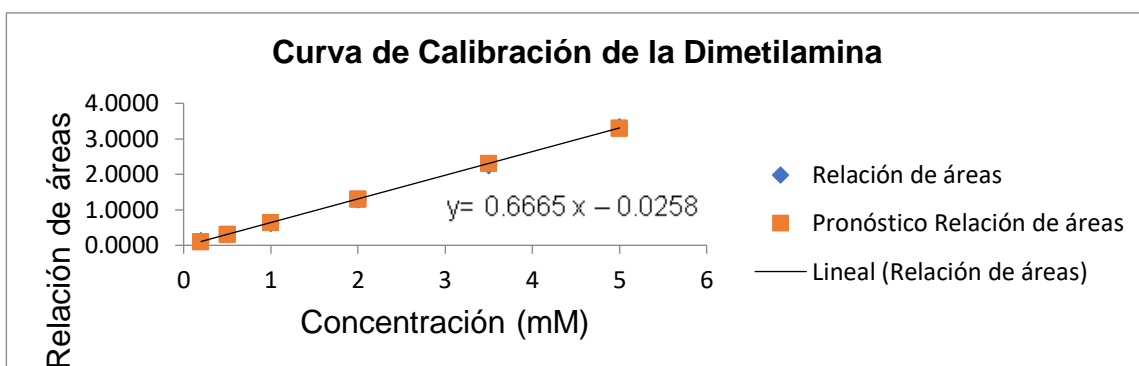


Figura C13. Curva de calibración de la dimetilamina por estándar interno.

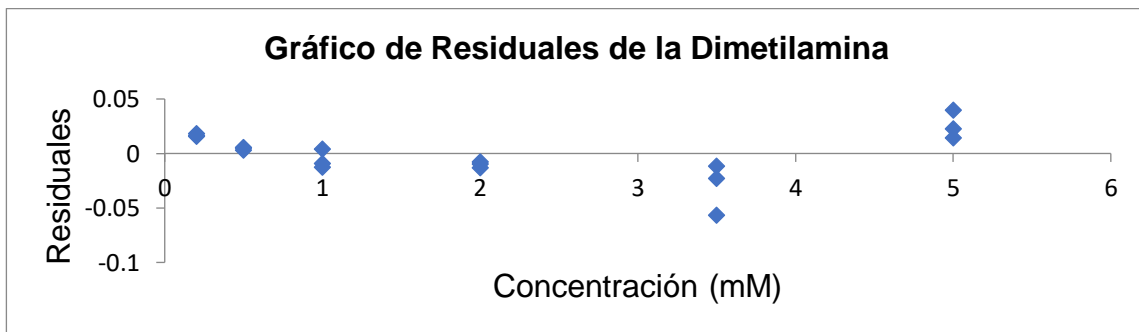


Figura C14. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la dimetilamina por estándar interno.

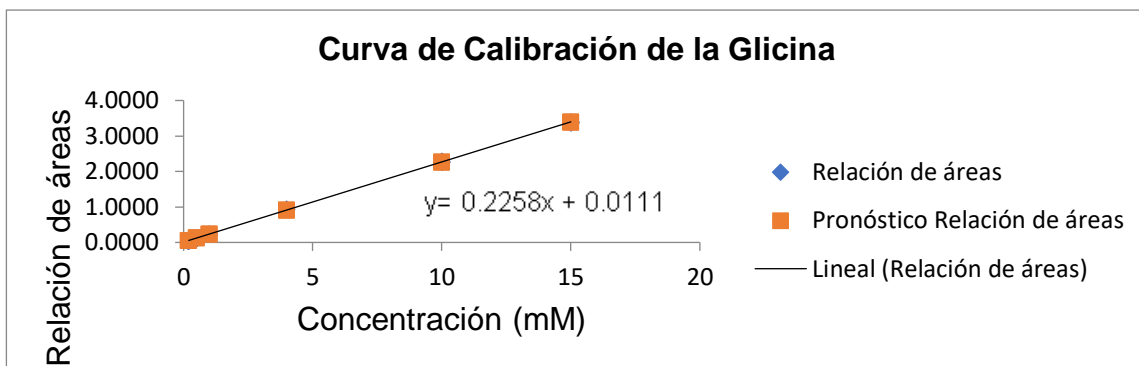


Figura C15. Curva de calibración de la glicina por estándar interno.

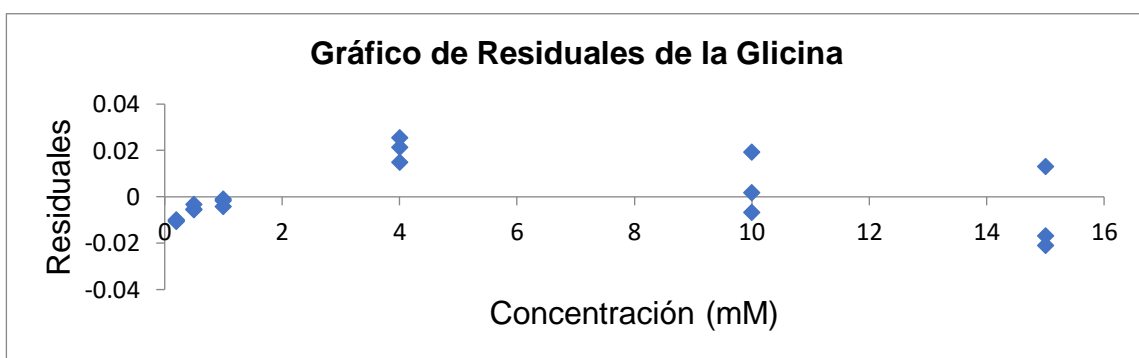


Figura C16. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la glicina por estándar interno.

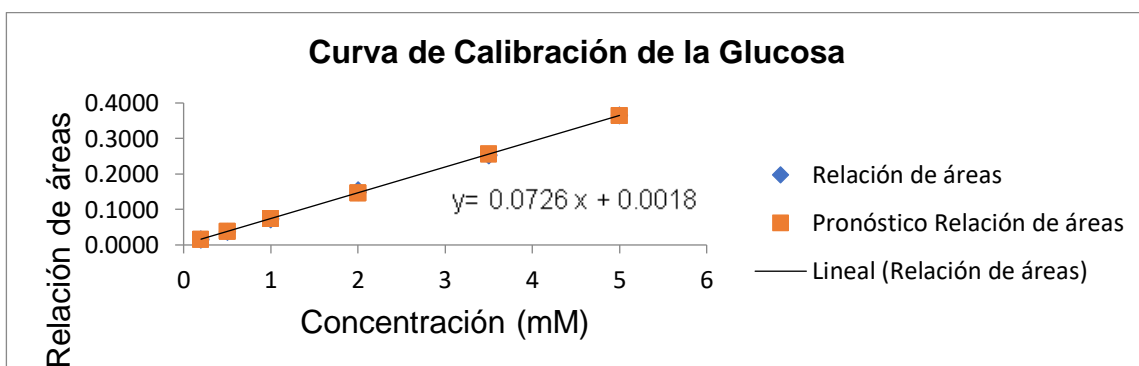


Figura C17. Curva de calibración de la glucosa por estándar interno.

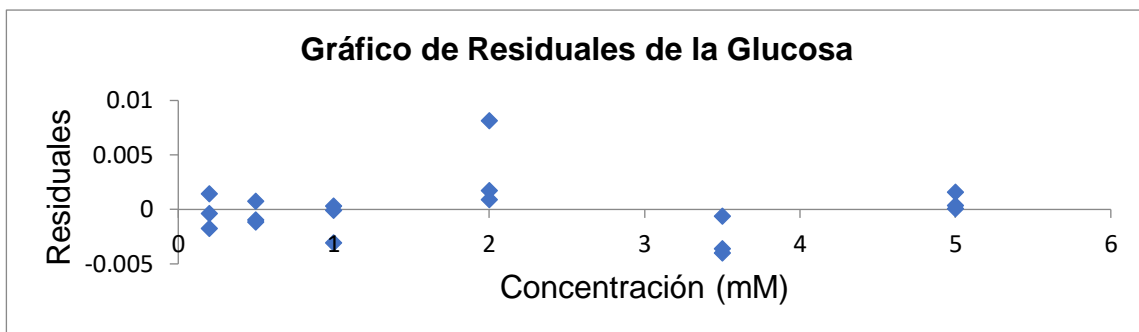


Figura C18. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la glucosa por estándar interno.

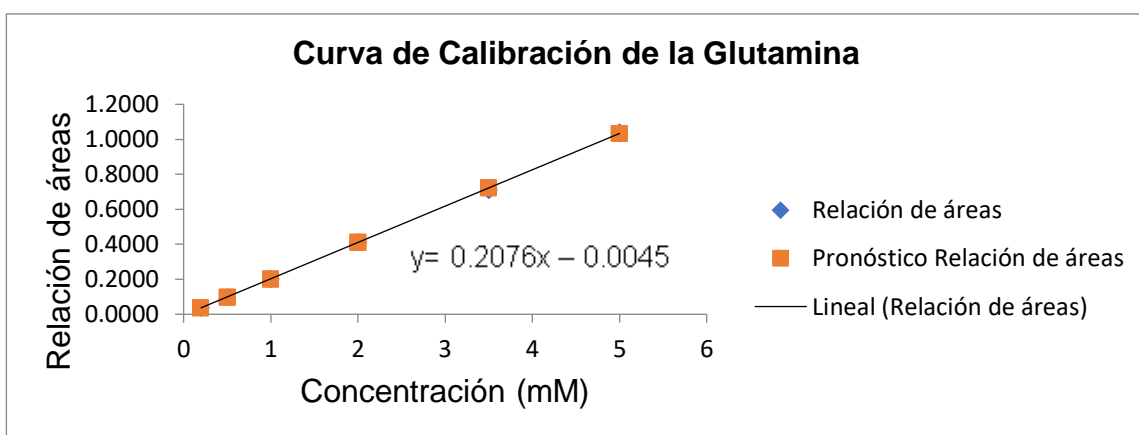


Figura C19. Curva de calibración de la glutamina por estándar interno.

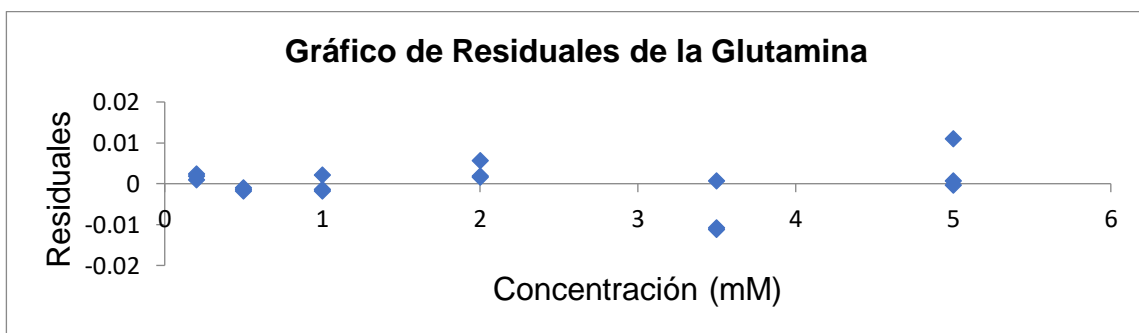


Figura C20. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la glutamina por estándar interno.



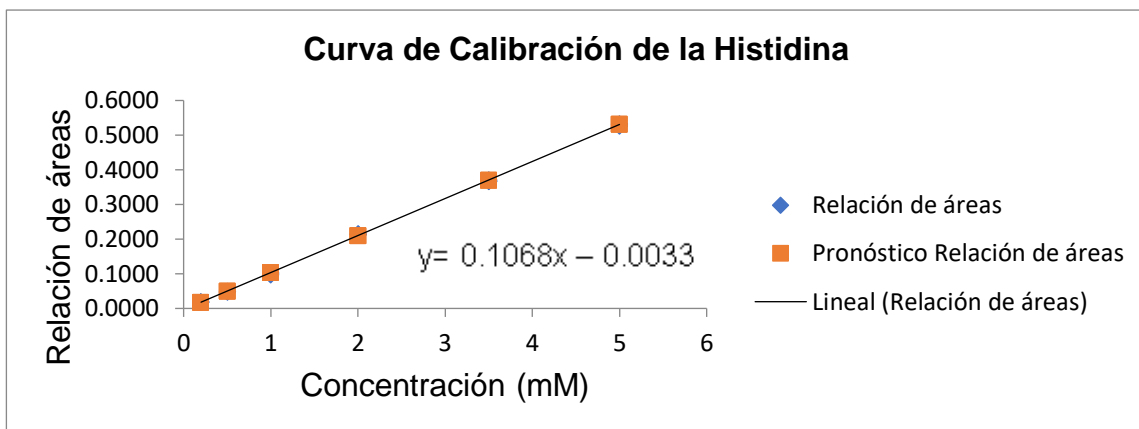


Figura C21. Curva de calibración de la histidina por estándar interno.

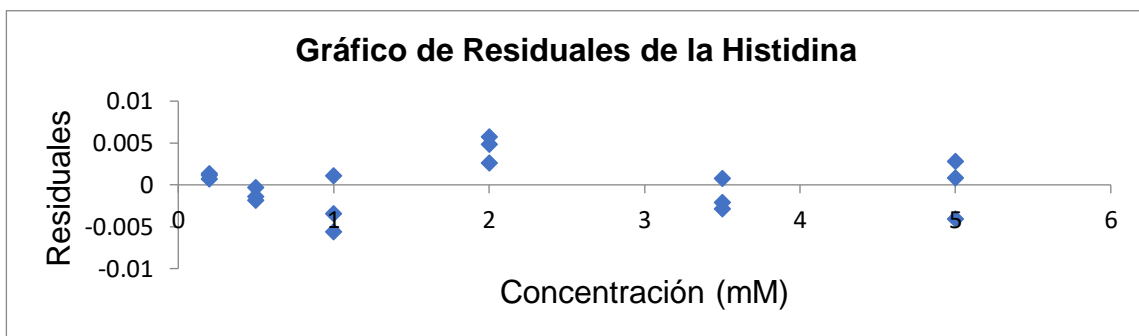


Figura C22. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la histidina por estándar interno.

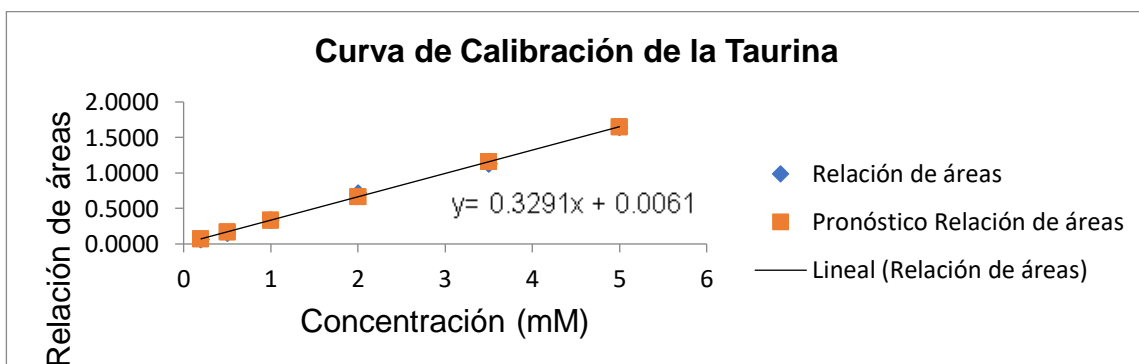


Figura C23. Curva de calibración de la taurina por estándar interno.

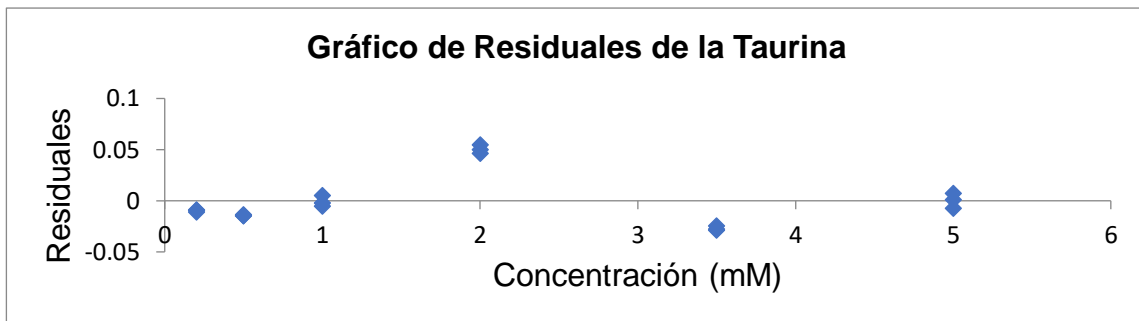


Figura C24. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la taurina por estándar interno.

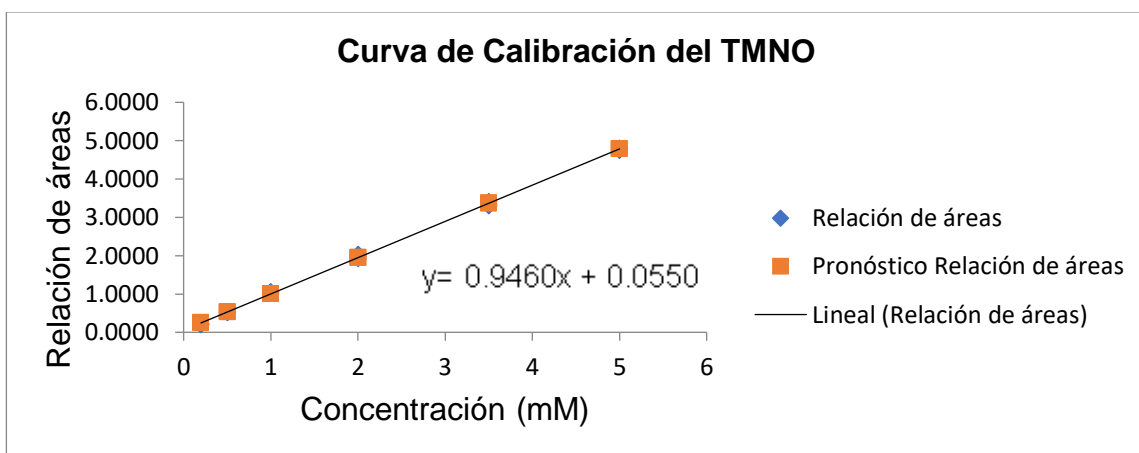


Figura C25. Curva de calibración del TMNO por estándar interno.

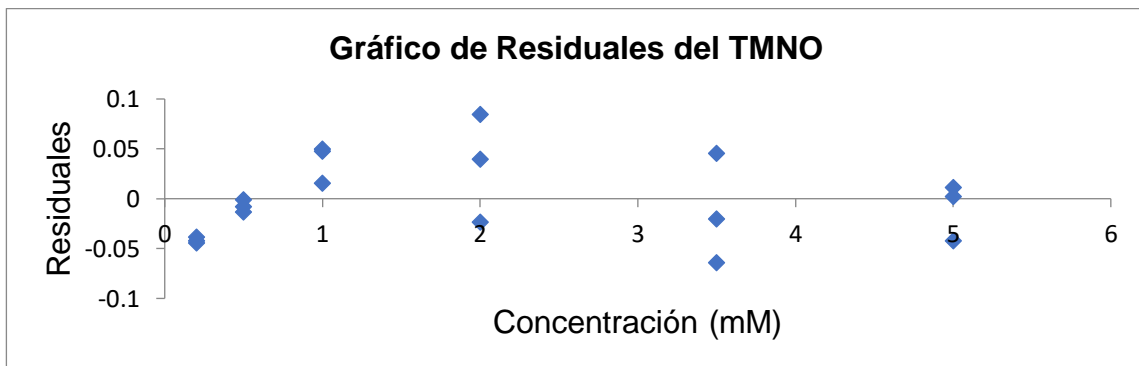


Figura C26. Gráfico de residuales para la curva de calibración del TMNO por estándar interno.

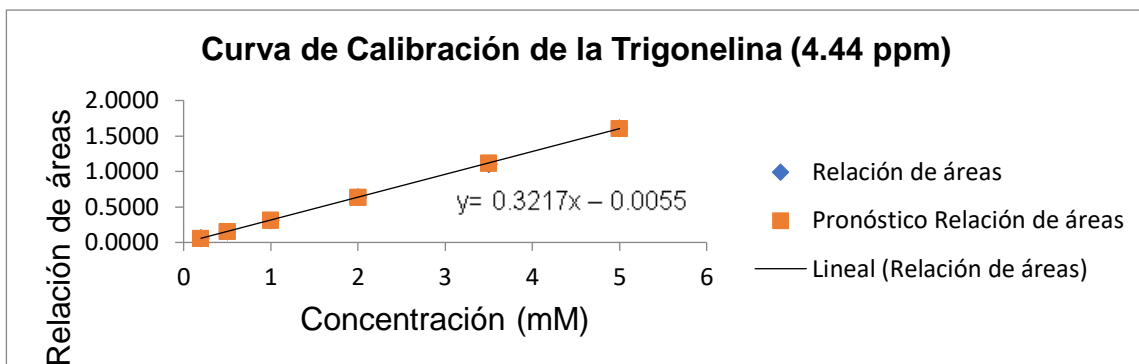


Figura C27. Curva de calibración de la trigonelina (señal a 4.44 ppm) por estándar interno.

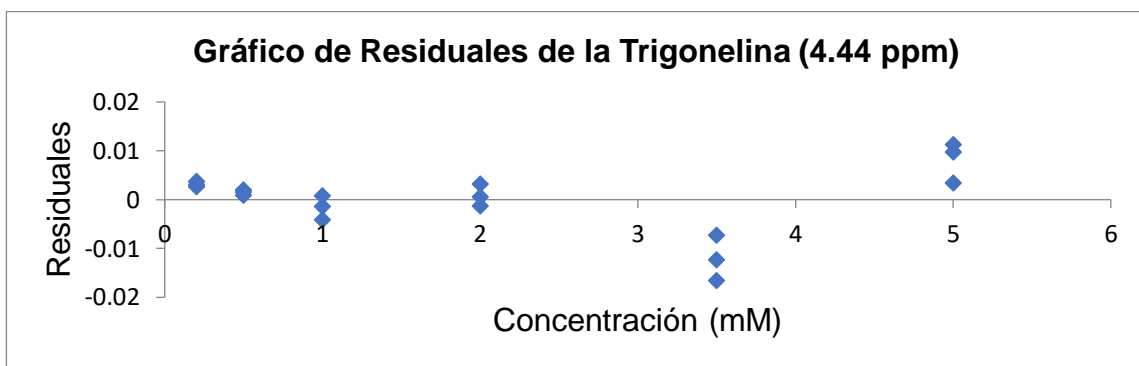


Figura C28. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la trigonelina (señal a 4.44 ppm) por estándar interno.

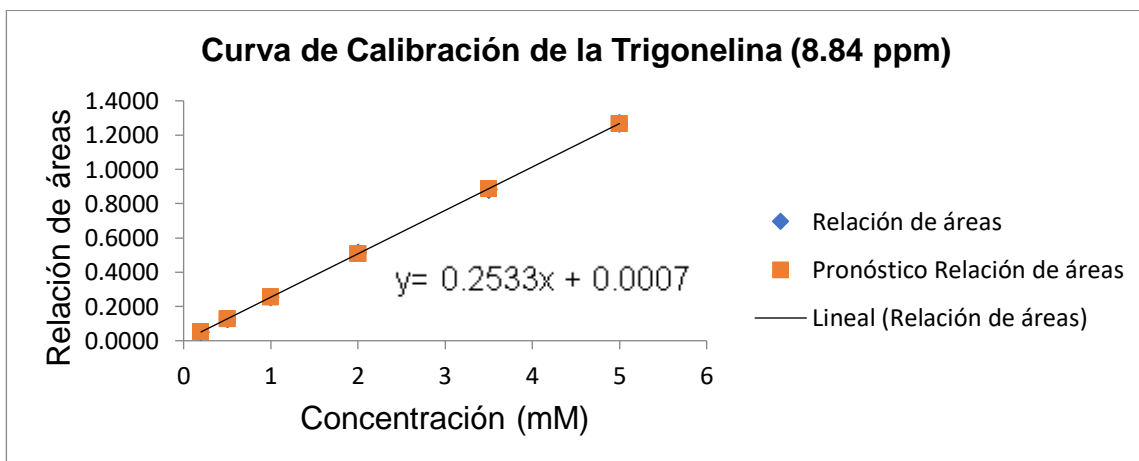


Figura C29. Curva de calibración de la trigonelina (señal a 8.84 ppm) por estándar interno.

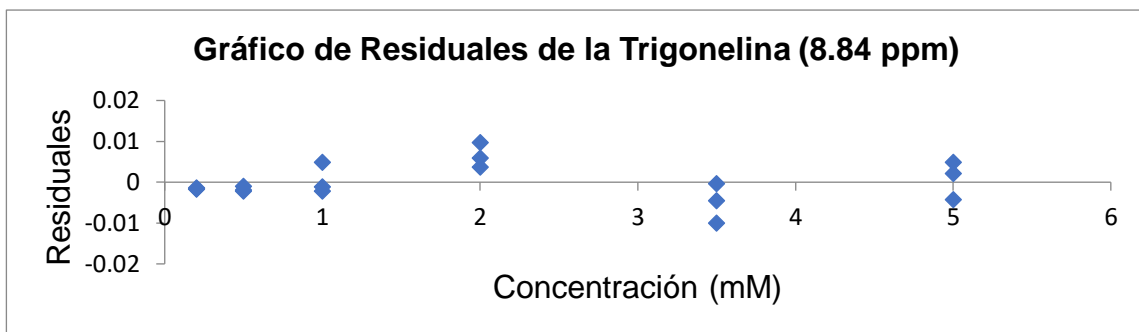


Figura C30. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la trigonelina (señal a 8.84 ppm) por estándar interno.

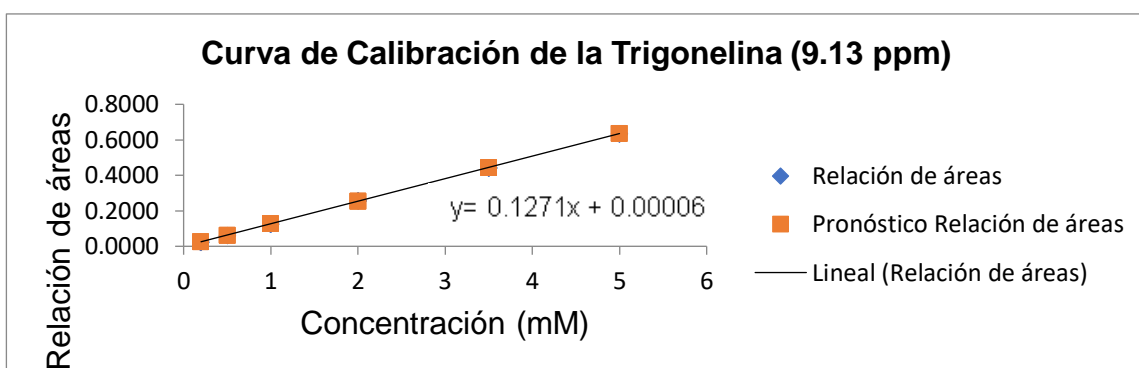


Figura C31. Curva de calibración de la trigonelina (señal a 9.13 ppm) por estándar interno.

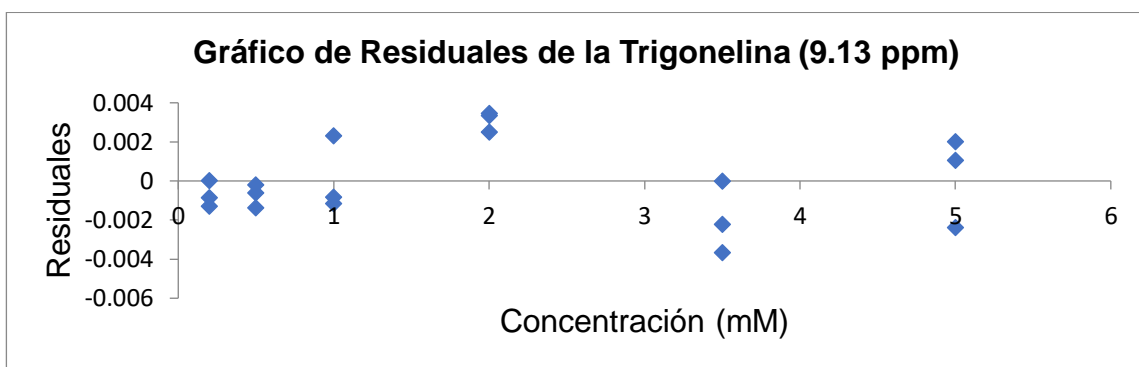


Figura C32. Gráfico de residuales para la curva de calibración de la trigonelina (señal a 9.13 ppm) por estándar interno.

## APÉNDICE D: DIAGRAMAS EMPLEADOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ

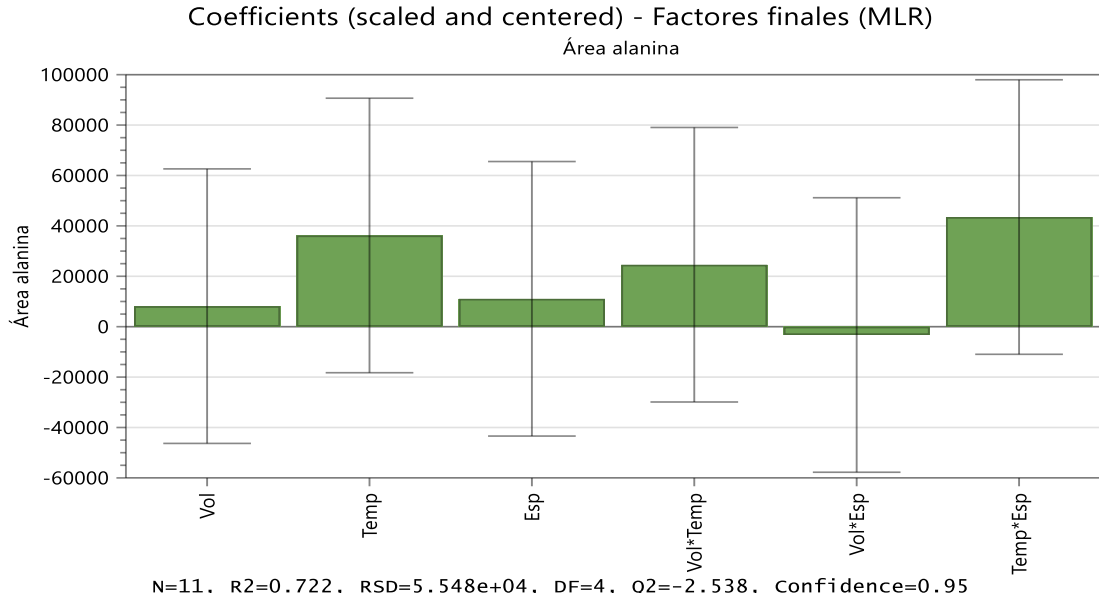


Figura D1. Gráfico de coeficientes para la alanina en función de las distintas variables. En la parte inferior se muestran los valores de  $R^2$  y  $Q^2$ .

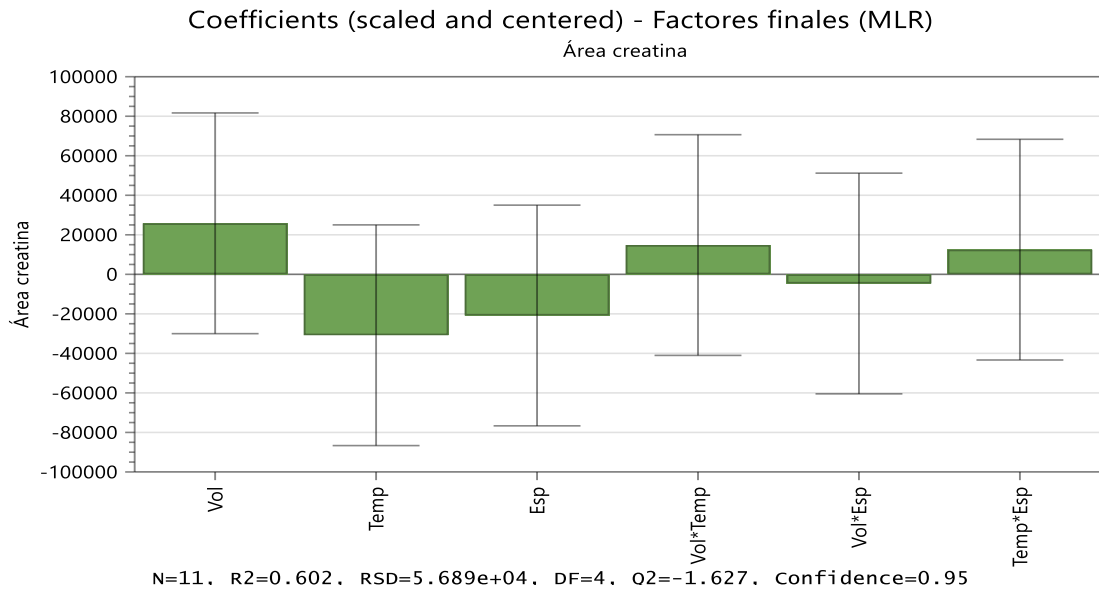


Figura D2. Gráfico de coeficientes para la creatina en función de las distintas variables. En la parte inferior se muestran los valores de  $R^2$  y  $Q^2$ .

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Eduardo Antonio Zul Hernández

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

**Tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN LA ORINA HUMANA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO.**

Campo de Estudio: Química Analítica

### **Biografía:**

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 10 de Julio de 1996, hijo de Juan Zul Pachuca e Irma Hernández Cedillo.

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Clínico Biólogo en 2018 con mención honorífica, primer lugar de la generación.