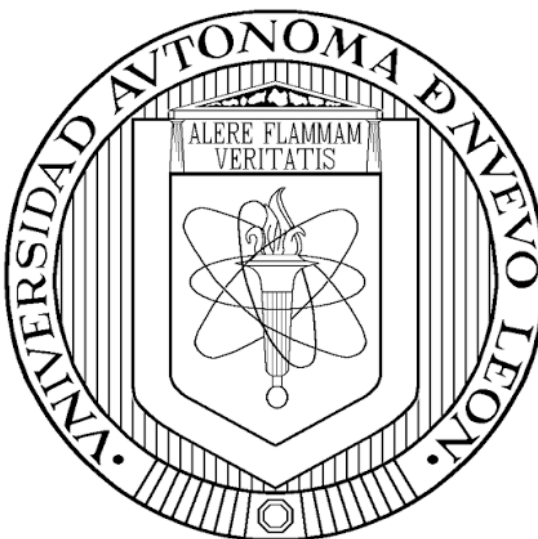


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC-FLD
PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE P-CRESOL SULFATO E
INDOXIL SULFATO EN SUERO.**

Por:

Q.C.B. ANGEL DANIEL MENDOZA MONTALVO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA

SEPTIEMBRE 2026

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC-FLD
PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE P-CRESOL SULFATO E
INDOXIL SULFATO EN SUERO.**

Aprobación de tesis:



Dra. C. Norma Cavazos Rocha

Director de tesis



Dr. C. Omar J. Portillo Castillo

Co-director de tesis



Dra. med. Giovanna Arteaga Muller

Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Q.C.B. Ángel Daniel Mendoza Montalvo
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Julio 2026

Título de estudio:

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC-FLD PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE P-CRESOL SULFATO E INDOXIL SULFATO EN SUERO.

Número de páginas: 105

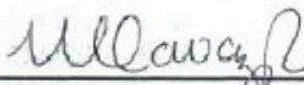
Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con orientación en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método del Estudio: Implementar y validar un método analítico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de IS y pCS en suero, con sensibilidad, precisión y exactitud adecuadas para su aplicación en muestras de pacientes con ERC. Se implementó un método por HPLC-FLD seleccionando las condiciones más adecuadas para la separación y detección de IS y pCS. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Atlantis T3 usando una fase móvil compuesta por ácido fórmico al 0.15 % - metanol (65:35), a un flujo de 0.15 mL/min. La preparación de las muestras se analizó realizando la precipitación proteica, seleccionándose el acetonitrilo. Posteriormente, el método fue validado en suero mediante la evaluación de selectividad, linealidad, exactitud, precisión intradía e interdía, estabilidad y límites de detección y cuantificación. Finalmente, se evaluó la aplicabilidad del método mediante la determinación de ambos analitos en muestras de suero de pacientes con ERC.

Contribuciones y Conclusiones: Las condiciones cromatográficas establecidas permitieron la separación y detección simultánea de IS y pCS mediante HPLC-FLD. El acetonitrilo presentó el desempeño más favorable como agente de precipitación proteica y fue seleccionado para el tratamiento de las muestras. El método mostró un desempeño adecuado en los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud, precisión y estabilidad, así como una capacidad de detección y cuantificación adecuada para la determinación de IS y pCS en los niveles de concentración requeridos. Finalmente, su aplicación en muestras de pacientes con ERC permitió cuantificar ambos analitos y evidenciar la variabilidad interindividual de sus concentraciones, demostrando la aplicabilidad del método para el análisis de IS y pCS en suero. El estudio aporta un método HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS rápido, económico, confiable, preciso y exacto, ya que, por un lado, la preparación de la muestra a través de una desproteinización por precipitación es un procedimiento rápido, económico y preciso, y, por otro lado, cumple con todos los criterios de aceptación para considerarse con un buen desempeño analítico. La aplicación en muestras de pacientes con ERC permitió comprobar la utilidad del método para determinar las concentraciones de IS y pCS en muestras clínicas reales.

Director



Dra. C. Norma Cavazos Rocha

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme permitido vivir esta experiencia llamada posgrado y que, gracias a Él, pude vivir para contarlo, así mismo dar gracias por todos esos desvíos antes de llegar a la meta, ya que esos pequeños momentos son los que hacen que la vida cobre sentido y valga la pena vivirla.

Agradezco a mi mamá Angélica Montalvo porque todos los días se preocupa por mí y que estuvo presente en todos los momentos difíciles y momentos buenos, en las batallas ganadas y las perdidas, que parte del estrés que sentí de alguna forma ella también lo sintió y aun así siempre mantuvo el espíritu para alentarme y motivarme en seguir adelante. Parte de mi motivación para seguir estudiando es verla feliz.

A mi hermana Karen Mendoza que a pesar de que ella es un desastre y que discutimos muy a menudo, en realidad nos llevamos bien y nos queremos mucho.

A mi familia: en especial a mi abuela Adela Valdes (†) que me cuido gran parte de mi infancia y a mi abuela Alejandra Ortega (†) que siempre me cocinaba comida rica cuando iba a visitarla, que me dejo vivir en su casa durante una parte de mi vida y me daba buenos consejos para la vida.

A mi abuelo Arturo José Mendoza por ser el abuelo más tierno del mundo, por ser gracioso, empático con los demás y siempre recibirme en su casa con una oración. Además, le gusta el pan que me daban en la cafetería de la facultad.

A mi abuelo Mario Montalvo por dejarme vivir en su casa y convivir con él durante estos dos años de maestría, lo quiero mucho (aunque se tome el refresco en la madrugada y lo deja mal cerrado) y me parece muy gracioso dándole alegría a la casa.

A mi tía Aida Mendoza por siempre escucharme sobre mis experiencias, aguantar mis largas historias quejándome de la maestría y de lo difícil que suele ponerse la vida a veces. Siempre tiene un consejo adecuado para cada situación y heredó el gusto por cocinar de mi abuela Alejandra.

A mi tía Diana Montalvo por apoyarme cuando a mis papas se les complicaba desde que tengo uso de razón y a siempre preocuparse por mí en todo momento.

A la Dra. Norma Cavazos que me dio la oportunidad de cambiar de la Química Orgánica a la Química Analítica y me demostró la complejidad que está detrás ese mundo, por ser la persona más paciente en este mundo y corregirme cuando fue necesario (casi siempre). Por quedarse conmigo hasta tarde cuando teníamos revisiones y que de alguna forma nunca dejó de creer en mí.

Al Dr. Omar Portillo por mostrarme el lado rudo de la Química Analítica, que compartió todo su conocimiento sobre cromatografía y demás técnicas para poder desempeñarme como un mejor químico cada día. Por quedarse hasta tarde conmigo en el cromatógrafo y apoyarme con el manejo del instrumento.

Al Dr. Alejandro Pérez. Por dejarme ingresar a la maestría y depositar su confianza en mí, por llamarme la atención constantemente para hacerme entrar en razón y darle la seriedad que se merece un posgrado.

A Iza y Alessandro por ser de mis mejores amigos y ser el alivio cómico del día, por hacer planes espontáneos que terminan escalando en cosas cada vez más locas, por jugar videojuegos conmigo cuando estoy estresado y hacer que la vida se vuelva más amena y menos fea.

A mi gymbro Oliver García por ser el amigo más leal que conozco, por acompañarme a todo tipo de plan sin decir que no, por inculcarme el ámbito de hacer ejercicio y contarnos todas nuestras batallas ganadas, pero también las pérdidas.

A Rolando Mata que siempre está conmigo en las buenas y en las malas, que lo veo hasta en el cereal, por ser compañeros de laboratorio desde la carrera, por ser el número de lista que va antes de mí, por sentarnos juntos en todas las clases, por tomar el mismo transporte de camino a casa, por demostrar su apoyo incondicional emocional y académicamente, aunque te haya tocado el lado fácil de la maestría siento una gran admiración por tus logros y claro por ser uno de mis mejores amigos.

A Carla Beltrán por ser de mis mejores amigas y acompañarme a casi todos lados durante mi estancia en la maestría, me gustaba darte consejos porque pensaba que te ayudaba a calmarte, pero me da risa que terminabas haciendo lo que querías.

A Devany Andrade por quedarte comiendo y platicando conmigo por casi horas en la cafetería de la facultad, por siempre contar chismes buenos y sobre todo por demostrar ser una buena amiga.

Como agradecimiento especial a mis compañeras del departamento y encargadas de las del almacén de pregrado: Judith Leura y Kathya Tovar. Que gracias a ustedes pude pasar la materia de LESM, ayudándome cuando se me olvidaba pedir algunos reactivos,

cuando necesitaba tiempo extra para trabajar en el laboratorio y por escucharme cuando no me salían los experimentos. Sin ustedes no hubiera podido avanzar de semestre y por ende no estaría escribiendo esta tesis.

A mis demás compañeros de generación que nos fragmentamos por algunas diferencias, pero al final siempre demostramos ser unido tomándonos una foto juntos al terminar nuestros seminarios de tesis.

A la T.L.C. Carolina Núñez por ayudarme con el manejo del cromatógrafo cuando mis asesores se encontraban ocupados y a echar chisme en el laboratorio mientras realizaba mis curvas de calibración.

A los miembros del departamento de Química Analítica: Dra. Verónica Rivas, Dra. Marsela, Dra. Rocío Castro, Dra. Blanca Alanís, Dra. Graciela Granados, Dr. Ricardo Lucio, Dr. David Paniagua, Dra. Magdalena Escobedo, Dra. Rocío Álvarez, Julieta Sotelo y Tania Reyna.

Y gracias a todos los que me acompañaron durante estos dos años de maestría.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1.	INTRODUCCIÓN.	1
1.1.	Enfermedad renal crónica.	1
1.2.	p-cresol sulfato e indoxil sulfato en la enfermedad renal.	4
1.3.	Técnicas para el análisis de pCS e IS.	9
1.4.	Naturaleza de la matriz y tratamiento de muestra para el análisis de pCS e IS.	10
1.5.	Precipitación proteica.	12
1.5.1.	Precipitación proteica utilizando disolventes orgánicos.	12
1.6.	Antecedentes	13
2.	JUSTIFICACIÓN.	15
3.	OBJETIVO GENERAL.	16
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	17
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.	18
5.1.	Reactivos.	18
5.2.	Equipos.	19
5.3.	Materiales.	20
5.4.	Métodos.	21
5.4.1.	Selección de las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para pCS e IS.	21
5.4.2.	Implementación de un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.	22
5.4.3.	Validación del sistema cromatográfico implementado para la determinación simultánea de pCS e IS.	24
5.4.4.	Selección el agente precipitante para la determinación de pCS e IS en suero.	27
5.4.5.	Evaluación el desempeño del método.	29
5.4.5.1.	Selectividad.	29
5.4.5.2.	Linealidad.	30
5.4.5.3.	Exactitud y precisión.	31
5.4.5.4.	Estabilidad.	32
5.4.5.5.	Límites de detección y cuantificación.	32
5.4.6.	Aplicabilidad del método.	33
6.	RESULTADOS.	34
6.1.	Selección de las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para pCS e IS.	34
6.2.	Implementación de un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.	37
6.3.	Validación del sistema cromatográfico implementado para la determinación simultánea de pCS e IS.	41

6.4.	Selección el agente precipitante para la determinación de pCS e IS en suero.	42
6.5.	Evaluación el desempeño del método.	46
6.5.1.	Selectividad.	46
6.5.2.	Linealidad.	51
6.5.3.	Exactitud y precision.	53
6.5.4.	Estabilidad.	54
6.5.5.	Límites de detección y cuantificación.	56
6.6.	Aplicabilidad del método.	58
7.	DISCUSIÓN.	61
7.1.	Selección de las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para pCS e IS.	61
7.2.	Implementación de un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.	64
7.3.	Validación del sistema cromatográfico implementado para la determinación simultánea de pCS e IS.	69
7.4.	Selección el agente precipitante para la determinación de pCS e IS en suero.	71
7.5.	Evaluación el desempeño del método.	74
7.5.1.	Selectividad.	74
7.5.2.	Linealidad.	76
7.5.3.	Exactitud y precision.	77
7.5.4.	Estabilidad.	80
7.5.5.	Límites de detección y cuantificación.	81
7.6.	Aplicabilidad del método.	83
7.7.	Comparación de método propuesto con algunos reportados en la literatura.	85
8.	CONCLUSIONES.	91
9.	PERSPECTIVAS.	93

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pagina
I. Propiedades fisicoquímicas del pCS e IS.	5
II. Concentraciones de pCS e IS en diferentes estadios de la ERC (3, 4 y 5) y en hemodiálisis (HD).	7
III. Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de tratamiento de muestra en matrices biológicas para la determinación de toxinas urémicas.	11
IV. Condiciones evaluadas en la implementación del sistema cromatográfico para la determinación de pCS e IS.	37
V. Condiciones cromatográficas seleccionadas para el análisis de pCS e IS.	40
VI. Validación del sistema cromatográfico para la determinación simultánea de IS y pCS.	41
VII. Análisis de varianza de un factor de las áreas cromatográficas obtenidas para IS y pCS con los diferentes agentes precipitantes.	43
VIII. Resultados de la evaluación de la linealidad del método para la determinación simultánea de IS y pCS.	52
IX. Resultados de la evaluación de la exactitud y precisión del método para la determinación de IS.	54
X. Resultados de la evaluación de la exactitud y precisión del método para la determinación de pCS.	54
XI. Análisis de varianza de un factor para la evaluación de la estabilidad del IS y pCS en muestras de suero de pacientes con ERC a temperatura ambiente durante 8 horas.	56
XII. Análisis de varianza de un factor para la evaluación de la estabilidad del IS y pCS en muestras de suero de pacientes con ERC durante ciclos de congelación/descongelación cada 24 horas.	56
XIII. Resumen de los resultados obtenidos durante la validación del método para la determinación simultánea de IS y pCS en suero.	57
XIV. Concentración (mg/L) de muestras de pacientes con ERC en estadio 5 con tratamiento de diálisis peritoneal durante diferentes periodos de toma de muestra.	59
XV. Comparación del método propuesto con otros métodos por HPLC-FLD. NR = no reportado	90

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Distribución geográfica global de la tasa de mortalidad por ERC.	2
2.	Tasa de mortalidad por insuficiencia renal en México.	3
3.	Estructura química del pCS e IS.	4
4.	Formación de las toxinas urémicas.	6
5.	Espectro de excitación y emisión del pCS a 5 mg/L empleando la mezcla de ácido fórmico 0.15 % y metanol (1:1) como disolvente.	35
6.	Espectro de excitación y emisión del IS a 5 mg/L empleando la mezcla de ácido fórmico 0.15 % y metanol (1:1) como disolvente.	36
7.	Cromatogramas obtenidos para una solución de (a) IS y (b) pCS a 5 mg/L con la Condición 1.	38
8.	Cromatogramas obtenidos para una solución de (a) IS y (b) pCS a 5 mg/L en la Condición 2.	39
9.	Cromatograma de una solución estándar en mezcla de IS y pCS a 10 mg/L en la Condición 2.	40
10.	Curvas de calibración de a) IS y b) pCS bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.	42
11.	Áreas cromatográficas promedio de IS y pCS obtenidas después de la precipitación proteica con acetonitrilo, metanol y acetonitrilo/metanol (1:1). Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).	43
12.	Cromatograma obtenido de la precipitación proteica de una muestra fortificada de 25 mg/L de pCS e IS utilizando acetonitrilo como agente precipitante.	44
13.	Cromatograma obtenido de la precipitación proteica de una muestra fortificada de 25 mg/L de pCS e IS utilizando metanol como agente precipitante.	44
14.	Cromatograma obtenido de la precipitación proteica de una muestra fortificada de 25 mg/L de pCS e IS utilizando la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1) como agente precipitante.	45
15.	Aspecto visual de los sobrenadantes obtenidos después de la precipitación proteica con (a) acetonitrilo, (b) metanol y (c) la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1).	45
16.	Cromatograma obtenido del análisis del <i>pool</i> de suero de sujetos sanos sin fortificar.	46

17.	Cromatograma obtenido del análisis del <i>pool</i> de suero de sujetos sanos fortificado a 3 mg/L de IS y pCS.	47
18.	Cromatograma obtenido del análisis del <i>pool</i> de suero de sujetos sanos fortificado a 30 mg/L de IS y pCS.	47
19.	Cromatograma obtenido del análisis del <i>pool</i> de suero de sujetos sanos fortificado a 60 mg/L de IS y pCS.	48
20.	Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de suero de un paciente con ERC.	48
21.	Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de suero fortificada a 60 mg/L de IS y pCS a) detector FLD y b) detector DAD.	49
22.	Cromatogramas obtenidos del análisis de suero de un paciente con ERC: a) detector FLD y b) detector DAD.	50
23.	Espectros de absorción UV de IS y pCS obtenidos mediante DAD para: a) una muestra de suero fortificada a 60 mg/L y b) una muestra de suero de un paciente con ERC.	51
24.	Curvas de calibración de a) IS y b) pCS realizada en matriz después de la precipitación proteica con acetonitrilo.	53
25.	Concentraciones de IS y pCS obtenidas durante la evaluación de la estabilidad bajo diferentes condiciones.	55
26.	Perfil cromatográfico de IS y pCS en una muestra de suero de un paciente con ERC estadio 5 bajo tratamiento de diálisis peritoneal.	58

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación.
λ_{em}	Longitud de onda de emisión.
DAD	Detector de arreglo de diodos.
% DER	Porcentaje de desviación estándar relativa.
EM	Efecto matriz.
ERC	Enfermedad renal crónica.
ERT	Enfermedad renal terminal.
FLD	Detector de fluorescencia.
FM	Fase móvil.
FR	Factor de respuesta.
HD	Hemodiálisis.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
HPLC-FLD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia.
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por espectrometría de masas.
ICH	Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para los Productos Farmacéuticos de Uso Humano.
IS	Indoxil sulfato.
LLE	Extracción líquido-líquido.
LOD	Límite de detección.
LOC	Límite de cuantificación.
MS	Espectrometría de masas.
mL/min	Mililitro por minuto.
mg/L	Miligramos por litro.
ng/L	Nanogramos por litro.
pCS	p-cresol sulfato.
SPE	Extracción en fase sólida.
R_s	Resolución.
t_R	Tiempo de retención.
TFA	Ácido trifluoroacético
TFG	Tasa de filtrado glomerular.
TGF- β /Smad	Factor de crecimiento transformante beta y las proteínas Smad.
UV	Ultravioleta visible.
w_b	Anchura del pico cromatográfico en la base

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.

1.1. Enfermedad renal crónica.

La enfermedad renal crónica (ERC) constituye un problema de salud pública global y se define clínicamente por la presencia de anormalidades en la estructura o función renal durante un periodo mínimo de tres meses con implicaciones para la salud. Entre los criterios para su diagnóstico se encuentran una tasa de filtración glomerular (TFG) <60 mL/min/1.73 m² o la presencia de uno o más marcadores de daño renal, como una relación albúmina/creatinina urinaria ≥ 30 mg/g, alteraciones del sedimento urinario o anomalías estructurales detectadas mediante estudios de imagen (KDIGO, 2024). Se estima que la ERC afecta al 9.1% de la población mundial, lo que corresponde a más de 788 millones de personas. De acuerdo con datos de 2023, la ERC es la novena causa de muerte a nivel mundial, con aproximadamente 1.48 millones de defunciones. Su

prevalencia continua en aumento debido al envejecimiento de la población y a la creciente incidencia de sus principales factores de riesgo, como la diabetes e hipertensión (GBD 2023 Chronic Kidney Disease Collaborators, 2025). En este contexto, como se observa en la Figura 1, México se encuentra entre los países con las tasas de mortalidad por ERC más elevadas, expresadas como el número de defunciones por cada 100 000 habitantes.

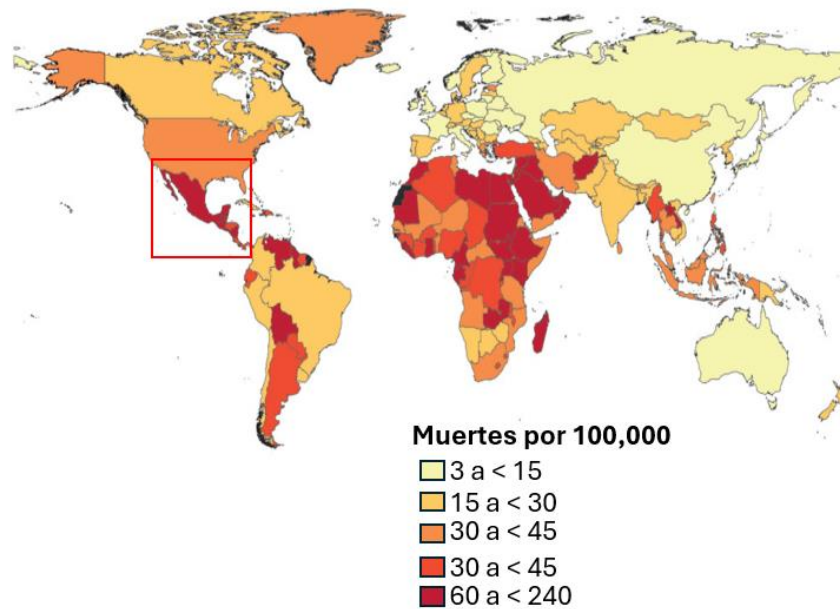


Figura 1. Distribución geográfica global de la tasa de mortalidad por ERC (GBD, 2025).

En México, la situación es especialmente preocupante. Como se muestra en la Figura 2, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta que la tasa de mortalidad por insuficiencia renal ha alcanzado su punto más alto en la última década durante 2024. Esto posiciona a la insuficiencia renal como la décima causa de muerte a nivel nacional, con más de 17,000 defunciones, de las cuales 78.9% son por ERC (INEGI, 2025). Además, gran parte de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas debido a la ausencia de síntomas específicos en fases iniciales. Esto implica que muchos ingresen

a programas de diálisis o requieran trasplante sin haber recibido un manejo preventivo oportuno (Gutiérrez-Peña et al., 2021).

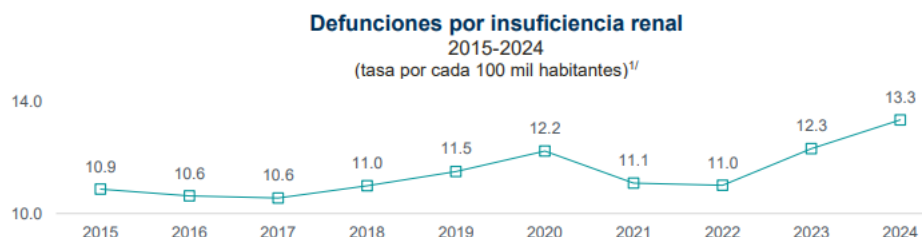


Figura 2. Tasa de mortalidad por insuficiencia renal en México (INEGI, 2025).

El incremento de la mortalidad asociada con la enfermedad renal crónica (ERC) representa un importante desafío para los sistemas de salud. Además, el tratamiento sustitutivo renal genera una elevada carga económica debido a los recursos necesarios para su atención, lo que limita la capacidad de los sistemas sanitarios para cubrir las necesidades de la población afectada (Cortés-Sanabria et al., 2017).

La carga de la ERC no se limita únicamente a la falla progresiva del riñón. Existe una estrecha relación entre la disfunción renal y la enfermedad cardiovascular, ya que los pacientes con ERC presentan un riesgo cardiovascular 2 a 3 veces mayor que la población general (Jha et al., 2013). Esta asociación se debe principalmente a la acumulación de toxinas urémicas (Barril et al., 2023), las cuales son sustancias que se acumulan en la sangre cuando los riñones no funcionan correctamente, provocando daño tisular, inflamación crónica, estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo mineral óseo, lo que conduce a calcificación vascular y disfunción endotelial (Vaziri et al., 2013).

En este contexto, la identificación y monitorización de biomarcadores que reflejen la carga tóxica acumulada y la actividad patogénica en ERC es esencial no solo para

comprender su fisiopatología, sino también para diseñar intervenciones terapéuticas más efectivas (Vanholder et al., 2003). Algunos de estos biomarcadores son: los solutos urémicos derivados del metabolismo intestinal, como: urea, creatina, ácido úrico, beta 2-microglobulina, hormona paratiroidea, p-cresol sulfato (pCS) e indoxil sulfato (IS), siendo estas dos últimas las principales toxinas urémicas asociadas a la progresión de la ERC y en el aumento del riesgo cardiovascular asociado.

1.2. p-cresol sulfato e indoxil sulfato en la enfermedad renal.

Dentro del amplio espectro de toxinas urémicas, los compuestos derivados de la fermentación bacteriana de aminoácidos aromáticos en el intestino se han posicionado como determinantes relevantes en la progresión de la enfermedad renal crónica. Entre ellos destacan el p-cresol sulfato (pCS), derivado del metabolismo de la tirosina y la fenilalanina, y el indoxil sulfato (IS), derivado del triptófano (Gryp et al., 2017). Ambos son solutos urémicos de bajo peso molecular con elevada unión a proteínas plasmáticas, característica que dificulta su eliminación mediante hemodiálisis convencional y favorece su acumulación y toxicidad (Duranton et al., 2012). En la Figura 3 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos y en la Tabla I se presentan sus principales propiedades fisicoquímicas.

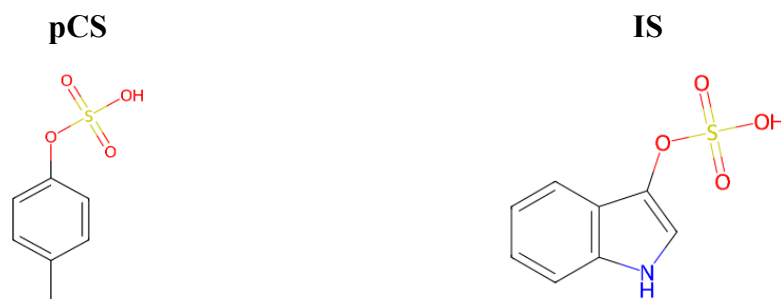


Figura 3. Estructura química del pCS e IS (Pubchem, 2026).

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas del pCS e IS (Drug Bank, 2022)

Propiedad fisicoquímica	Compuesto químico	
	pCS	IS
Peso molecular	188.20 g/mol	213.21 g/mol
Log P	1.23	1.29
Solubilidad	1.58 g/L (Agua a 25 °C)	0.787 g/L (Agua a 25 °C)
pKa	-2	-1.8

La formación de ambas toxinas se inicia en el intestino a partir del metabolismo bacteriano de sus respectivos aminoácidos precursores. La tirosina y la fenilalanina son metabolizadas por la microbiota intestinal para producir p-cresol, el cual es absorbido y posteriormente conjugado mediante reacciones de sulfatación y glucuronidación, dando lugar principalmente a pCS y p-cresol glucurónido. De estos metabolitos, el pCS presenta una elevada afinidad por proteínas séricas, particularmente por la albúmina (Liabeuf et al., 2010). De manera similar, el triptófano es metabolizado por la microbiota intestinal para formar indol, que tras su absorción es metabolizado principalmente en el hígado y convertido en IS. Este último se ha relacionado con la activación de vías proinflamatorias y prooxidantes asociadas con la progresión de la enfermedad renal (Niwa et al., 2010; Watanabe et al., 2013). En la Figura 4 se representa el eje intestino-riñón y las principales rutas involucradas en la formación de estas toxinas urémicas ligadas a proteínas.

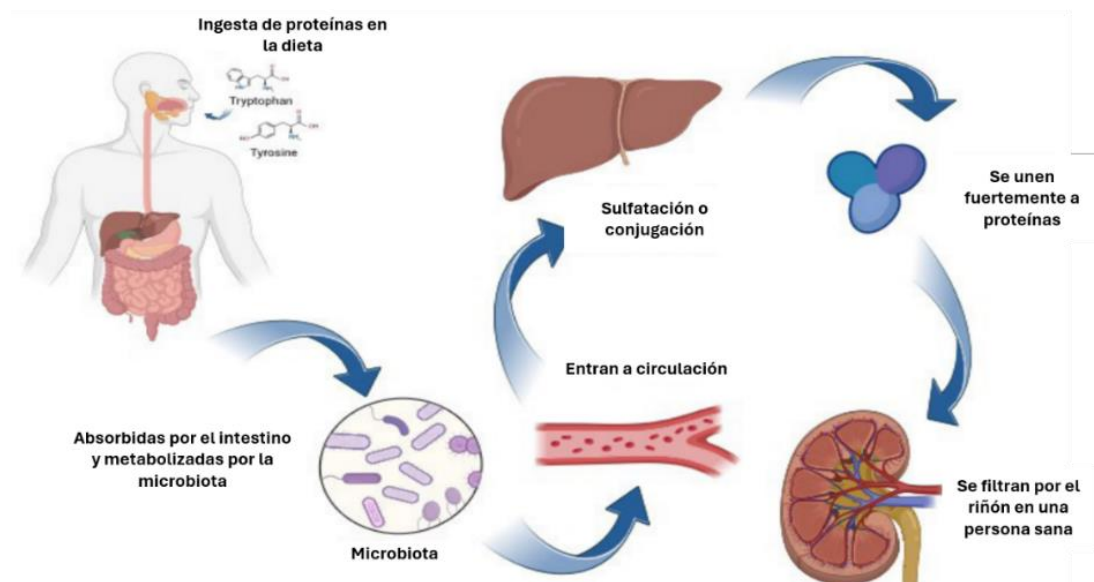


Figura 4. Formación de las toxinas urémicas. (Jelani et al., 2022).

La enfermedad renal crónica también induce alteraciones significativas en la barrera intestinal. La uremia se asocia con disbiosis de la microbiota, ocasiona una reducción de bacterias productoras de butirato y aumento de especies proteolíticas, lo que favorece la producción de precursores de toxinas como indol y p-cresol (Vaziri et al., 2013). Además, la acumulación de toxinas urémicas y el estrés oxidativo sistémico aumentan la permeabilidad intestinal al comprometer la integridad de las uniones estrechas en el epitelio intestinal (Evenepoel et al., 2009). Este incremento en la permeabilidad permite un mayor paso de metabolitos bacterianos hacia la circulación portal, potenciando la generación y acumulación de compuestos como pCS e IS. De esta manera, la disfunción renal deteriora la homeostasis intestinal y, a su vez, el intestino contribuye a la carga urémica y a la progresión de la enfermedad. (Arteaga-Muller et al., 2024).

Diversos estudios clínicos han demostrado que los niveles plasmáticos elevados de pCS e IS se asocian con un mayor riesgo de progresión a enfermedad renal terminal (ERT), eventos cardiovasculares y mortalidad en pacientes con ERC (Lin et al., 2020).

Estos solutos contribuyen al estrés oxidativo, disfunción endotelial y fibrosis renal mediante la activación de receptores de aril-hidrocarburos, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno y estimulando la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta y las proteínas Smad (TGF- β /Smad) (Schroeder et al., 2010). Además, ambos metabolitos pueden alterar la viabilidad y proliferación de células tubulares renales, así como modular la expresión de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión en células endoteliales (Sun et al., 2012).

En la práctica clínica, la cuantificación de pCS e IS en suero o plasma ha adquirido interés debido a su posible utilidad como biomarcadores asociados con el deterioro de la función renal, la progresión de la ERC y al riesgo cardiovascular. Como se observa en la Tabla II, las concentraciones séricas de ambas toxinas aumentan progresivamente conforme avanza el estadio de la enfermedad. El IS total incrementa de 1.03 ± 0.85 mg/L en el estadio 1 a 18.21 ± 15.06 mg/L en el estadio 5, mientras que el pCS total aumenta de 2.69 ± 4.34 a 27.00 ± 17.66 mg/L (Lin et al. 2011).

Tabla II. Concentraciones de pCS e IS en diferentes estadios de la ERC (3, 4 y 5) y en hemodiálisis (HD). (Lin et al. 2011).

Analito	Estadio 3 (n = 24)	Estadio 4 (n = 21)	Estadio 5 (n = 22)	Estadio 5 HD (n = 36)
IS (mg/L)	3.2 ± 3.0	5.4 ± 3.6	19.9 ± 10.5	42.5 ± 15.6
pCS (mg/L)	4.8 ± 4.3	5.9 ± 5.6	12.4 ± 7.9	21.8 ± 12.4

Los resultados presentados en la Tabla II muestran que las concentraciones séricas de pCS e IS aumentan conforme avanza el estadio de la ERC y disminuye la función renal, observándose concentraciones menores en los estadios iniciales y una mayor acumulación en los estadios avanzados (Lin et al., 2011). Esta tendencia refleja la disminución

progresiva de la capacidad renal para eliminar estos solutos y evidencia una asociación entre su acumulación sérica y el deterioro de la función renal. Por lo tanto, la cuantificación de pCS e IS puede proporcionar información sobre el grado de acumulación de toxinas urémicas en pacientes con diferentes estadios de ERC y constituir un indicador complementario del deterioro de la función renal. Asimismo, este comportamiento sustenta la importancia de disponer de métodos analíticos sensibles y confiables para la determinación simultánea de ambas toxinas en muestras de suero.

Se ha reportado que concentraciones séricas altas de pCS se correlacionaban con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes en diálisis (Liabeuf et al., 2020). De manera similar, se demostró que niveles elevados de IS pueden predecir eventos cardiovasculares y muerte independientemente de otros factores de riesgo tradicionales (Barreto et al., 2009). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la acumulación de toxinas urémicas ligadas a proteínas contribuye de forma activa a la alta morbilidad observada en la ERC, más allá de únicamente actuar como marcadores de disminución de la función renal.

Por otra parte, se han propuesto estrategias terapéuticas dirigidas a disminuir la generación y las concentraciones circulantes de pCS e IS mediante la modulación de la microbiota intestinal, entre ellas el uso de prebióticos, probióticos y adsorbentes intestinales, aunque los resultados clínicos han sido variables (Nakabayashi et al., 2011). Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar al pCS e IS no solo como biomarcadores asociados con la progresión de la ERC y sus complicaciones, sino también como posibles objetivos de estrategias terapéuticas dirigidas a disminuir su generación o acumulación. En este contexto, la cuantificación de pCS e IS permite evaluar los cambios en sus concentraciones y la respuesta a estas intervenciones (Meijers et al., 2010). Por lo tanto, se requieren métodos analíticos adecuados para su determinación y para evaluar la eficacia de estrategias dirigidas a disminuir su acumulación.

1.3. Técnicas para el análisis de pCS e IS.

La cuantificación de pCS e IS en matrices biológicas representa un desafío analítico debido a su elevada unión a proteínas plasmáticas. Para favorecer la liberación de estas toxinas de su unión proteica se han empleado procedimientos de desnaturalización y precipitación de proteínas mediante la adición de ácidos o disolventes orgánicos. Una vez formado el precipitado proteico, este puede separarse de la fase líquida mediante centrifugación, recuperándose el sobrenadante que contiene los analitos para su posterior análisis cromatográfico (Polson et al., 2003). Para la determinación de pCS e IS se han desarrollado diferentes metodologías analíticas basadas principalmente en técnicas de separación cromatográfica acopladas a distintos sistemas de detección, entre ellos fluorescencia, ultravioleta y espectrometría de masas, con el propósito de alcanzar una determinación selectiva, sensible y reproducible.

Los primeros intentos de cuantificación de pCS e IS se realizaron mediante técnicas colorimétricas y espectrofotométricas (Caggiano et al., 2023). Sin embargo, estas metodologías carecen de especificidad, ya que otros compuestos aromáticos presentes en suero podían interferir con la señal analítica (De Smet et al., 1998). Posteriormente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detección ultravioleta (UV) se convirtió en una de las técnicas más empleadas, gracias a su mayor selectividad y capacidad de separación (Filosa et al., 2024). A pesar de ello, la sensibilidad limitada (mg/L) y la interferencia de compuestos endógenos en la matriz biológica representan limitaciones significativas (Meijers & Evenepoel et al., 2011).

En años recientes, el acoplamiento de las técnicas cromatográficas con los detectores de espectrometría de masa (HPLC-MS), han permitido identificar con alta especificidad al pCS e IS, en niveles bajos (ng/mL) y en presencia de interferencias séricas (Filosa et al., 2024). No obstante, el elevado costo de los equipos, el mantenimiento especializado y la necesidad de personal altamente capacitado limitan su disponibilidad

en muchos laboratorios clínicos y de investigación, particularmente en países en desarrollo.

Una alternativa ha sido el uso la cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). Esta técnica combina la sensibilidad de la fluorescencia con la capacidad de separación de la cromatografía líquida, ofreciendo límites de detección bajos (ng/mL) y menor susceptibilidad a interferencias en comparación con la detección UV convencional (Silva et al., 2022). Además, estudios comparativos han mostrado que HPLC-FLD puede proporcionar resultados equiparables a HPLC-MS en la cuantificación de pCS e IS en suero o plasma, con la ventaja de una mayor accesibilidad económica (Mutsaers et al., 2013).

1.4. Naturaleza de la matriz y tratamiento de muestra para el análisis de pCS e IS.

La elección del procedimiento de tratamiento de muestra para el análisis de pCS e IS, depende en gran medida de la naturaleza de la matriz. En el caso del suero o plasma, este presenta múltiples interferencias por parte de los compuestos endógenos entre los que destacan proteínas, lípidos, sales y otras moléculas (Ingle et al., 2022). Además, el hecho de que estas toxinas urémicas se encuentran fuertemente unidas a proteínas, hace que sea necesario seleccionar un procedimiento de tratamiento de muestra que permita reducir las interferencias de la matriz, liberar a los analitos de la unión proteica y mantenerlos en solución con concentraciones adecuadas a la sensibilidad del método (Niu et al., 2018).

Entre las principales estrategias utilizadas para el tratamiento de muestras biológicas, se han implementado diferentes técnicas de extracción y/o separación como la precipitación proteica con ácidos orgánicos (ácido perclórico, ácido tricloroacético) o solventes orgánicos (acetonitrilo, metanol), ultrafiltración, dilución, extracción en fase

solida (SPE) y extracción liquido-liquido (LLE) (Fernandes et al., 2023). Sin embargo, algunas de estas técnicas implican múltiples pasos de preparación, requieren reactivos o materiales especializados, mayor tiempo total de análisis y un alto costo (Shu et al., 2016).

Como se muestra en la Tabla III, entre las técnicas anteriormente mencionadas, la precipitación proteica destaca por ser un procedimiento sencillo y ampliamente utilizado para el tratamiento de muestras biológicas previo al análisis cromatográfico (Polson et al., 2003). En la determinación de toxinas urémicas como pCS e IS, la precipitación con solventes orgánicos, principalmente acetonitrilo y metanol, se utiliza para remover las proteínas de muestras de suero o plasma y obtener un sobrenadante que pueda emplearse en el análisis cromatográfico (Alquadeib et al., 2024).

Tabla III. Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de tratamiento de muestra en matrices biológicas para la determinación de toxinas urémicas.

Técnica	Ventajas	Limitaciones
Precipitación proteica	• Libera a los analitos de la unión proteica. • Tiempo corto de análisis. • Económica. • Simple de realizar.	• Dilución de la muestra.
Ultrafiltración	• Separa las toxinas urémicas en sus fracciones totales.	• Dispositivos específicos. • Mayor tiempo de análisis. • Costoso.
Extracción en fase sólida	• Buena selectividad y eliminación de interferencias.	• Cartuchos costosos. • Mayor tiempo de análisis.
Dilución	• Técnica rápida y sencilla. • Económica.	• Baja selectividad y eliminación de interferencias.

1.5. Precipitación proteica.

La precipitación de proteica, también denominada desproteinización, es una de las técnicas más utilizadas para el tratamiento de muestras de suero y plasma antes del análisis cromatográfico. Su finalidad principal es remover las proteínas presentes en la matriz mediante su conversión de una fase soluble a una fase precipitada que posteriormente puede separarse mediante centrifugación o filtración (Bravo-Veyrat & Hopfgartner, 2022).

Las proteínas deben eliminarse antes de su introducción al cromatógrafo debido a que pueden precipitar al entrar en contacto con los componentes orgánicos de la fase móvil, ocasionando obstrucciones en el inyector o deterioro de la columna cromatográfica (Bravo-Veyrat & Hopfgartner, 2022).

El fundamento de la precipitación proteica consiste en modificar las condiciones fisicoquímicas del medio, de manera que disminuya la solubilidad de las proteínas. Los agentes precipitantes utilizados pueden clasificarse, de manera general, en disolventes orgánicos, ácidos y sales. La adición de estos agentes altera las interacciones entre las proteínas y el medio acuoso, favoreciendo su desnaturalización, agregación y posterior separación de la fase líquida (Bravo-Veyrat & Hopfgartner, 2022).

1.5.1. Precipitación proteica utilizando disolventes orgánicos.

Entre los agentes precipitantes más utilizados se encuentran disolventes orgánicos como acetonitrilo, metanol y etanol. Cuando estos se adicionan a una solución acuosa que contiene proteínas, modifican las propiedades del medio y disminuyen la solubilidad proteica. Este proceso se relaciona con cambios en la hidratación de las proteínas y en las

interacciones proteína-solvente y proteína-proteína, lo que favorece su agregación y precipitación. Posteriormente, las proteínas precipitadas pueden separarse de la fase líquida mediante centrifugación (Du et al., 2022; Akyüz, 2024).

1.6. Antecedentes.

Anteriormente se ha reportado la precipitación proteica, utilizando como agente precipitante diferentes disolventes orgánicos como acetonitrilo, metanol y mezclas, para el tratamiento de muestra en matrices biológicas para la determinación de toxinas urémicas.

En el 2020, Fabrese y colaboradores utilizaron metanol como agente precipitante para determinar pCS e IS con recuperaciones de 87 a 92% (Fabrese et al., 2020). En el 2012, Al za abi y colaboradores utilizaron acetonitrilo como agente precipitante para determinar IS con recuperaciones de 93.4 a 102.5 % (Al za abi., 2012). En el 2016, De loor y colaboradores utilizaron una mezcla de metanol con acetonitrilo en proporción 1:1 como agente precipitante para determinar pCS e IS con recuperaciones de 83 a 100 % (De loor et al., 2016).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el empleo de disolventes orgánicos como agentes precipitantes para el tratamiento de muestras destinadas a la determinación de pCS e IS, obteniéndose recuperaciones entre 83 y 102.5 % para ambos analitos. Estos antecedentes respaldan el uso de la precipitación proteica con disolventes orgánicos como una alternativa sencilla para la preparación de muestras, ya que permite la eliminación de las proteínas precipitadas y la recuperación de los analitos en el sobrenadante para su posterior análisis cromatográfico. Asimismo, en comparación con procedimientos que requieren etapas adicionales de tratamiento de muestra, la precipitación proteica puede

simplificar el procedimiento, disminuir el número de reactivos empleados y reducir el tiempo de preparación de las muestras.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN.

La determinación de p-cresol sulfato e indoxil sulfato en fluidos biológicos es clave para la comprensión de la fisiopatología, del manejo clínico y complicaciones cardiovasculares de la enfermedad renal crónica. La preparación de muestras constituye un reto en el análisis de estas toxinas, ya que estos compuestos se encuentran fuertemente unidos a proteínas plasmáticas. Entre las diferentes estrategias de preparación de muestra, la precipitación proteica destaca por ser un procedimiento sencillo, rápido y ampliamente utilizado para eliminar proteínas y obtener extractos compatibles con el análisis cromatográfico. La implementación y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia para la determinación simultánea de p-cresol sulfato e indoxil sulfato permitirá disponer de una metodología con potencial aplicación clínica en muestras de pacientes obtenidas del Centro Regional de Enfermedades Renales del Hospital Universitario. "Dr. José Eleuterio González."

CAPÍTULO 3

OBJETIVO GENERAL.

Implementar y validar un método analítico para la determinación simultánea de p-cresol sulfato e indoxil sulfato en suero por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Implementar un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.
2. Seleccionar el agente precipitante adecuado para la determinación de pCS e IS en suero.
3. Evaluar el desempeño del método.
4. Aplicar el método en la medición de pCS e IS en muestras de suero de pacientes con ERC en diálisis obtenidas del Centro Regional de Enfermedades Renales del Hospital Universitario. "Dr. José Eleuterio González.”.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y METODOS.

5.1. Reactivos.

Sal potásica de p-cresol sulfato (p-tolil sulfato de potasio) ($\geq 95\%$), Sigma Aldrich.

Sal potásica de indoxil sulfato ($\geq 98\%$), Sigma Aldrich.

Acetonitrilo grado HPLC, Tedia.

Metanol grado HPLC, J.T. Baker.

Ácido fórmico (98-100%), Sigma Aldrich.

5.2. Equipos.

Balanza analítica, OHAUS 3510.

Baño de ultrasonido, Branson 3510.

Agitador tipo vórtex, Scientific Industries Genie 2.

Microcentrífuga, Eppendorf 5415 C.

Sistema de purificación de agua modelo Simplicity marca Merck Millipore.

Bomba de vacío, GAST, modelo: 1 HA B-25-M1100X.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, Waters Alliance 2695, equipado con una bomba de cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador, horno de columna, detector de arreglo de diodos 2996 y detector de fluorescencia (FLD) 2475 con longitud de onda programable.

Espectrofluorómetro FL 8500 con software Spectrum FL 21 CFR de Perkin Elmer.

5.3. Materiales.

Columna Atlantis T3 (150×2.1 mm, 3 μ m; Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.).

Sistema de filtración, Pall Corporation.

Membranas para filtración para disolventes de Nylon 0.45 μ m, Millipore.

Frascos reservorios para la fase móvil de 250 y 500 mL con tapa rosca.

Celda de cuarzo de 1 cm para el espectrofluorímetro.

Viales de vidrio ámbar de 2 mL con tapón de rosca y septum de teflón/silicón.

Viales de vidrio ámbar de 2 mL con inserto de 250 μ L con tapón de rosca y septum de teflón/silicón.

Viales de vidrio ámbar de 10 mL.

Microespátulas.

Bulbo para pipeta Pasteur.

Pipetas Pasteur.

Pipetas automáticas de 2 a 20 μ L, de 20 a 200 μ L y de 100 a 1000 μ L, Eppendorf.

Puntillas para pipeta automática.

Jeringas de plástico.

Filtros para jeringa de Nylon 25 mm de 0.22 μ m, Thermo Scientific

Matraces volumétricos de 1,5,10, 25, 250 y 500 mL.

Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 250 mL.

Tubos Eppendorf 1.5 mL.

Papel Parafilm M.

Programa Excel, Microsoft 365[®], versión 2509 de 64 bits.

5.4. Métodos.

5.4.1. Selección de las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para pCS e IS.

Con el propósito de determinar las longitudes de onda de máxima excitación y emisión del pCS e IS, se prepararon soluciones estándar individuales de cada analito a una concentración de 5 mg/L, empleando como disolvente una mezcla de solución acuosa de ácido fórmico al 0.15 % y metanol en proporción 1:1. Las mediciones se realizaron en un Espectrofluorómetro PerkinElmer FL 8500 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de trayectoria óptica, la cual se llenó aproximadamente hasta la mitad de su capacidad. Previo al análisis de las soluciones estándar, se registró el espectro correspondiente al blanco, constituido por la mezcla de ácido fórmico al 0.15 % y metanol.

Para la obtención de los espectros de emisión, se realizaron barridos espectrales manteniendo fija la longitud de onda de excitación en 270 nm para pCS y 280 nm para IS. Posteriormente, para la obtención de los espectros de excitación, se mantuvo fija la longitud de onda de emisión en 290 nm para pCS y 380 nm para IS. Los barridos se realizaron en el intervalo espectral de 250 a 500 nm. Cada medición se efectuó por triplicado con la finalidad de corroborar la reproducibilidad de los máximos espectrales obtenidos. A partir de estos espectros se determinaron las longitudes de onda de máxima excitación y emisión de cada analito, las cuales fueron utilizadas posteriormente para establecer las condiciones de detección mediante HPLC-FLD.

5.4.2. Implementación de un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.

Para el análisis simultáneo de pCS e IS se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters Alliance 2695 equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador, horno de columna, detector de arreglo de diodos 2996 y detector de fluorescencia 2475 con longitud de onda programable.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna de fase inversa Atlantis T3 (150 × 2.1 mm, 3 μ m; Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). Se empleó una FM compuesta por metanol como modificador orgánico y una solución acuosa de ácido fórmico al 0.15 %. En todos los experimentos se mantuvo un flujo constante de 0.15 mL/min, se programó una elución isocrática y se probaron diferentes composiciones de la FM. El volumen de inyección fue de 5 μ L y la detección de fluorescencia del IS se realizó utilizando una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 280 nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 380 nm. Para el pCS, se seleccionaron λ_{exc} de 270 nm y λ_{em} de 290 nm. El tiempo de análisis por corrida fue de 15 min.

Se prepararon soluciones madre individuales de pCS e IS en metanol a una concentración de 1000 mg/L. A partir de estas soluciones se prepararon, de manera independiente, soluciones estándar individuales de cada analito a 5 mg/L en FM, las cuales se utilizaron inicialmente para identificar la respuesta cromatográfica y establecer los t_R correspondientes a cada compuesto. Posteriormente, se preparó directamente a partir de las soluciones madre una solución estándar en mezcla que contenía pCS e IS, cada uno a una concentración de 10 mg/L en FM, con la finalidad de evaluar simultáneamente la retención y separación de ambos analitos durante la implementación del sistema cromatográfico.

Para la preparación de las soluciones empleadas en el sistema cromatográfico se utilizó agua desionizada obtenida mediante el sistema de purificación de agua (Merck Millipore). Se prepararon 500 mL de solución acuosa de ácido fórmico al 0.15 %, utilizada como componente acuoso de la fase móvil; 500 mL de metanol, utilizado como componente orgánico; y 500 mL de una mezcla metanol:agua 80:20, utilizada como solución de lavado de sellos del sistema cromatográfico. Todas las soluciones preparadas se filtraron a través de membranas de 0.45 μm y posteriormente se sonicaron durante 15 min para su desgasificación. La filtración tuvo como finalidad eliminar partículas presentes en las soluciones antes de su introducción al sistema cromatográfico. Por su parte, la sonicación se realizó para disminuir la presencia de gases disueltos y prevenir la formación de burbujas que pudieran afectar el funcionamiento del sistema y la estabilidad de la señal.

La selección de las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de pCS e IS se realizó mediante ensayos en los que se modificó la proporción de los componentes de la fase móvil, manteniendo constantes las demás condiciones cromatográficas. Se evaluó inicialmente una proporción 70:30 (ácido fórmico al 0.15 % - metanol) y posteriormente 65:35. Para estos ensayos se utilizaron las soluciones estándar individuales de 5 mg/L de cada analito para identificar sus t_R y una solución estándar en mezcla de IS y pCS, cada uno a una concentración de 10 mg/L, para evaluar su resolución.

Los cromatogramas obtenidos bajo cada condición fueron comparados considerando la separación de las señales correspondientes al IS y pCS, la forma de los picos, la ausencia de coelución, los t_R , el tiempo total de análisis y la resolución cromatográfica (R_s). Asimismo, se evaluó la reproducibilidad de los t_R y de las áreas cromatográficas mediante análisis por triplicado de la solución estándar en mezcla para ambos analitos. La condición seleccionada fue aquella que proporcionó una resolución mayor de 1.5, t_R reproducibles y una reducción del tiempo de análisis, sin comprometer la resolución cromatográfica.

5.4.3. Validación del sistema cromatográfico implementado para la determinación simultánea de pCS e IS.

Para la validación del sistema cromatográfico los parámetros que se evaluaron fueron la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación. Esto tomando en cuenta lo que estipula la guía de la ICH (2023). Para realizar la validación, se preparó una solución estándar mezcla de pCS e IS a una concentración de 100 mg/L de cada uno, en FM ácido fórmico al 0.15 % - metanol (65:35) como disolvente. A partir de esta solución, se prepararon las soluciones de trabajo para cada nivel de concentración, utilizando la FM ácido fórmico al 0.15 % - metanol (65:35) como disolvente.

- Linealidad.

Para evaluar la linealidad y el rango de trabajo, se construyó una curva de calibración por estándar externo por triplicado en tres ensayos independientes. Se utilizaron 5 niveles de concentración (1, 5, 10, 25 y 50 mg/L) para el pCS y 6 niveles de concentración (0.1, 1, 5, 10, 25 y 50 mg/L) para el IS. Utilizando las áreas de las señales obtenidas en los cromatogramas se construyó un gráfico de concentración en función de las respuestas (área de pico cromatográfico).

Para la evaluación de este parámetro se realizó una inspección visual de la curva de calibración obtenida y posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta y observar la relación de linealidad mediante el coeficiente de determinación R^2 (ICH, 2023). Además, se calcularon los factores de respuesta obtenidos en cada nivel de concentración de la curva de calibración de acuerdo con la ecuación 1 y se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER). (Portillo et al, 2022).

Donde:

$$FR = \frac{\text{Área de la señal}}{\text{Concentración del estándar}}$$

Ecuación 1.

FR = factor de respuesta

- Precisión.

Se evaluó mediante el % DER de las respuestas para cada nivel de concentración de los estándares de la curva de calibración, de acuerdo con la Ecuación 2. La precisión también se evaluó con el porcentaje de desviación estándar relativa de los t_R de cada analito.

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}}$$

Ecuación 2.

Donde:

$\%DER$ = Porcentaje de desviación estándar relativa

s = Desviación estándar

$\bar{x}$ = Promedio

- Exactitud.

La exactitud del sistema cromatográfico se evaluó mediante la concordancia entre las concentraciones nominales de los estándares de calibración y las concentraciones calculadas experimentalmente. Para cada nivel de concentración, la respuesta cromatográfica obtenida se sustituyó en la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración correspondiente a cada analito, obteniéndose así la concentración calculada. Posteriormente, se construyó una gráfica de la concentración calculada (y) en función de la concentración nominal (x) y los datos se ajustaron mediante regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. A partir de la ecuación resultante se evaluaron la pendiente (m) y el coeficiente de determinación (R^2), considerando como criterios de aceptación una pendiente cercana a 1 y un $R^2 \geq 0.99$ (Burke, 2001; Swartz & Krull, 2015)

- Límite de cuantificación y límite de detección.

El límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOC), se determinaron mediante la relación señal ruido, tomando como base el procedimiento descrito por la Guía para la Validación de procedimientos analíticos ICH Q2 (2023), mediante las ecuaciones 3 y 4.

El LOD se determinó mediante la relación señal/ruido, considerando como criterio una relación S/N de aproximadamente 3. La señal (S) correspondió a la altura del pico cromatográfico del analito y el ruido (N) a la amplitud del ruido de la línea base en una región representativa del cromatograma. La concentración del analito que produjo una relación S/N cercana a 10 se estableció como el LOC y se expresó en mg/L.

$$LOD = 3 (S/N)$$

Ecuación 3

Donde:

LOD = Límite de detección

S= Altura de la señal del analito, medida desde la línea base hasta el máximo del pico cromatográfico.

N= Altura que abarca representativamente el ruido en la línea base del analito.

$$LOC = 10 (S/N)$$

Ecuación 4

Donde:

LOC = Límite de cuantificación

S= Altura de la señal del analito, medida desde la línea base hasta el máximo del pico cromatográfico.

N= Altura que abarca representativamente el ruido en la línea base del analito.

5.4.4. Selección el agente precipitante para la determinación de pCS e IS en suero.

Para seleccionar el agente precipitante adecuado para el tratamiento de las muestras para la determinación de pCS e IS en suero, se realizó el procedimiento de precipitación proteica reportada por el trabajo de Wu y colaboradores (Wu et al., 2010) con algunas modificaciones, la metodología consistió en que se obtuvieron 3 mL de muestra de sangre venosa de diferentes sujetos sanos (no padecían ERC), se dejaron reposar 30 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se separó el suero con una pipeta desechable, se recolectó en un tubo de plástico de 50 mL y se realizó un *pool* de suero de sujetos sanos.

Después, se preparó por triplicado una muestra de suero fortificada para tener una concentración de 25 mg/L de ambos analitos añadiendo la cantidad correspondiente de una solución estándar en mezcla de pCS e IS a un matraz volumétrico de 1 mL y se aforó con el *pool* de suero de sujetos sanos. Para el proceso de precipitación, se tomaron 200 μ L de esta muestra fortificada con una pipeta automática y se colocaron en un tubo Eppendorff y se le agregaron 600 μ L del agente precipitante. Se agitó el tubo en el vórtex durante 1 minuto para facilitar la precipitación de las proteínas. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm para lograr la sedimentación del botón proteico en el fondo del tubo, se tomó el sobrenadante con una jeringa y se filtró a través de una membrana de nylon de 0.22 μ m, se colocó directamente en los viales de HPLC con insertos 250 μ L y se inyectaron 5 μ L al cromatógrafo. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los 3 diferentes agentes precipitantes (metanol, acetonitrilo y una mezcla acetonitrilo/metanol (1:1)).

La selección del agente precipitante se realizó mediante la evaluación de la señal cromatográfica comparando las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a IS y pCS obtenidas después del tratamiento de las muestras con los diferentes agentes precipitantes evaluados. Los datos se analizaron Excel mediante una prueba estadística de análisis de varianza de un factor para buscar si existía diferencia significativa en las áreas obtenidas con cada agente precipitante; adicionalmente, se inspeccionó visualmente el extracto obtenido de la precipitación proteica, con la finalidad de observar con cuál agente precipitante se obtenía un sobrenadante más claro y menos turbio, indicando una precipitación proteica más eficaz. De igual forma, se revisaron los cromatogramas obtenidos en los experimentos para evaluar el ruido cromatográfico en cada uno de ellos.

5.4.5. Evaluación del desempeño del método.

La validación del método se llevó a cabo evaluando los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, estabilidad, límite de detección y límite de cuantificación (ICH, 2023). Para evaluar el desempeño del método se realizaron los ensayos correspondientes a cada parámetro de validación, aplicando el procedimiento de precipitación proteica descrito en la sección 5.4.4., con el agente precipitante seleccionado y el posterior análisis mediante HPLC-FLD con el sistema cromatográfico previamente implementado y validado.

5.4.5.1. Selectividad.

Para evaluar la selectividad del método se analizaron diferentes tipos de muestras de suero: un *pool* de sueros de sujetos sanos sin fortificar, el mismo *pool* de sueros de sujetos sanos fortificado con una solución estándar en mezcla de pCS e IS a concentraciones de 3, 30 y 60 mg/L y muestras de pacientes con ERC. A todas las muestras se les aplicó el procedimiento de precipitación proteica con el agente precipitante seleccionado y posteriormente se analizaron mediante HPLC-FLD con el sistema cromatográfico previamente validado. La selectividad se evaluó verificando la ausencia de interferencias provenientes de los componentes endógenos de la matriz en los t_R correspondientes a las moléculas de estudio. Adicionalmente, se compararon los espectros de absorción UV obtenidos mediante el detector DAD del sistema cromatográfico y los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos mediante el detector FLD para todas las señales o picos cromatográficos obtenidos con el propósito de corroborar la identidad de las señales atribuidas al pCS e IS.

5.4.5.2. Linealidad.

La linealidad se evaluó mediante una curva de calibración en matriz, utilizando seis niveles de concentración (1, 5, 10, 25, 50 y 75 mg/L) para ambos analitos. El procedimiento fue el siguiente: mediante la adición de una solución estándar en mezcla de ambos analitos a un *pool* de suero de sujetos sanos se preparó una muestra fortificada a 75 mg/L de IS y pCS. A partir de esta preparación, se tomó el volumen correspondiente y se completó a 200 μ L con el mismo pool de suero sin fortificar para obtener cada nivel de concentración de la curva de calibración: 1, 5, 10, 25 y 50 mg/L. Para la construcción de la curva de calibración, además de la medición de los estándares previamente preparados, se midieron 200 μ L de la muestra fortificada a una concentración de 75 mg/L. A todas las preparaciones se les aplicó el procedimiento de precipitación proteica con el agente precipitante seleccionado y posteriormente se analizaron mediante HPLC-FLD con el sistema cromatográfico validado. Debido a que el IS y el pCS son compuestos endógenos presentes en el suero, el *pool* sin fortificar se analizó por triplicado y se calculó el promedio de las áreas obtenidas para cada analito. Esta respuesta basal de la matriz se sustrajo de las áreas correspondientes a cada nivel de concentración tal como lo reporta (Silva et al., 2022). Cada nivel de concentración se analizó por triplicado y el ensayo se realizó en tres ocasiones independientes. Para cada ensayo se realizó un análisis de regresión lineal de las áreas cromatográficas corregidas en función de la concentración de cada analito.

La evaluación de los parámetros de linealidad de las curvas de calibración se realizó como se menciona en la sección 5.4.3.

5.4.5.3. Exactitud y Precisión.

Para evaluar la exactitud y precisión del método, se prepararon muestras fortificadas a partir del *pool* de suero de sujetos sanos, en tres niveles de concentración de IS y pCS: bajo (3 mg/L), medio (30 mg/L) y alto (60 mg/L). Cada nivel se preparó y analizó por triplicado. Todas las muestras fueron preparadas de acuerdo con el procedimiento de precipitación proteica con el agente precipitante seleccionado y posteriormente se analizaron mediante HPLC-FLD mediante el sistema cromatográfico validado.

La precisión se evaluó mediante dos enfoques, precisión intradía e interdía. La precisión intradía se evaluó mediante el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER), calculado de acuerdo con la ecuación 2, tanto para las concentraciones obtenidas en los niveles de concentración adicionados considerando la concentración basal de IS y pCS presente en el *pool* de suero sin fortificar, como para los t_R para cada analito en las réplicas analizadas durante un mismo día. La precisión interdía se evaluó mediante el mismo procedimiento en tres días diferentes.

Por otra parte, la exactitud se determinó mediante el porcentaje de recuperación, calculado de acuerdo con la ecuación 5, para cada nivel de concentración adicionado, considerando la concentración basal de IS y pCS presente en el *pool* de suero sin fortificar.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración de la muestra fortificada} - \text{concentración basal}}{\text{Concentración de la muestra adicionada}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

5.4.5.4. Estabilidad.

Para evaluar la estabilidad de los analitos en la matriz, se analizaron muestras de suero de pacientes con ERC, las cuales fueron sometidas a dos condiciones distintas: trabajo a temperatura ambiente durante 8 horas (Muestra: M1 P6) y ciclos de congelación/descongelación (Muestra: M1 P7). Para esta última condición se realizó un ciclo de congelación/descongelación cada 24 horas y ambas condiciones se analizaron por triplicado durante tres días consecutivos. En cada condición evaluada, las muestras fueron sometidas al procedimiento de precipitación proteica con el agente precipitante seleccionado y posteriormente analizadas mediante HPLC-FLD con el sistema cromatográfico previamente validado. La estabilidad del pCS e IS en suero se evaluó mediante la comparación de las concentraciones, los t_R obtenidos bajo las diferentes condiciones evaluadas con respecto a la condición inicial y la aparición de nuevas señales en los cromatogramas. Los datos fueron procesados mediante Microsoft Excel y analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor, con el propósito de determinar la existencia de diferencias significativas entre las condiciones evaluadas.

5.4.5.5. Límites de detección y cuantificación.

El LOD y LOQ se determinaron tomando como base en la reacción señal ruido de los cromatogramas mediante las ecuaciones 3 y 4 (ICH, 2023).

5.4.6. Aplicabilidad del método.

Para la aplicabilidad del método, se recibieron 79 muestras de suero pertenecientes a pacientes con ERC en diálisis provenientes del Centro Regional de Enfermedades Renales del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" bajo lo establecido en el protocolo que tiene como registro NF25-00008 ante la Subdirección de Investigación de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las muestras fueron sometidas al procedimiento de precipitación proteica con el agente precipitante seleccionado y, posteriormente analizadas mediante HPLC-FLD con el método validado. La concentración de pCS e IS en cada muestra se calculó a partir del área de la señal cromatográfica correspondiente a cada analito, utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida de su respectiva curva de calibración. Para ello, se despejó x de la ecuación de la recta $y = mx + b$, donde x es la concentración, y corresponde a la respuesta obtenida o área cromatográfica, m a la pendiente de la recta de regresión y b a la ordenada al origen de la misma recta. Las concentraciones obtenidas correspondieron directamente a las concentraciones de IS y pCS presentes en las muestras de suero y se expresaron en mg/L; por lo tanto, no se realizó una sustracción de una concentración basal.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS.

6.1. Selección de las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para pCS e IS.

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de detección por fluorescencia, se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de los analitos en estudio. Para ello, se prepararon soluciones estándar individuales de pCS e IS a una concentración de 5 mg/L en una mezcla de ácido fórmico 0.15 % - metanol (1:1) y se realizó un barrido espectral en el intervalo de 250 a 500 nm utilizando el Espectrofluorómetro FL 8500 Perkin Elmer.

El pCS presentó longitudes de onda máximas de excitación y emisión en 270 nm y 290 nm, respectivamente. Por su parte, el IS exhibió máximos de excitación y emisión en 280 nm y 380 nm, respectivamente.

Los espectros de barrido se observan en la Figura 5 para el pCS y en la Figura 6 para el IS. Estos valores fueron utilizados para la selección de las longitudes de onda de trabajo en el sistema HPLC-FLD.

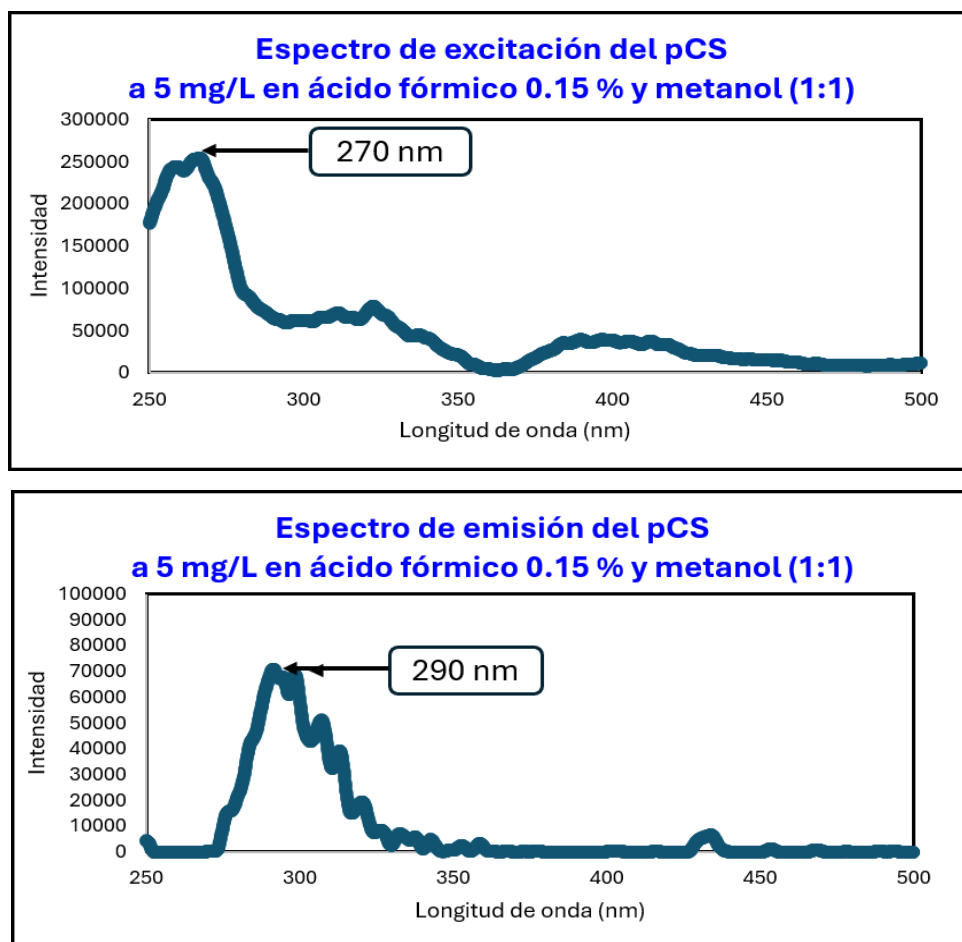


Figura 5. Espectro de excitación y emisión del pCS a 5 mg/L empleando la mezcla de ácido fórmico 0.15 % y metanol (1:1) como disolvente.

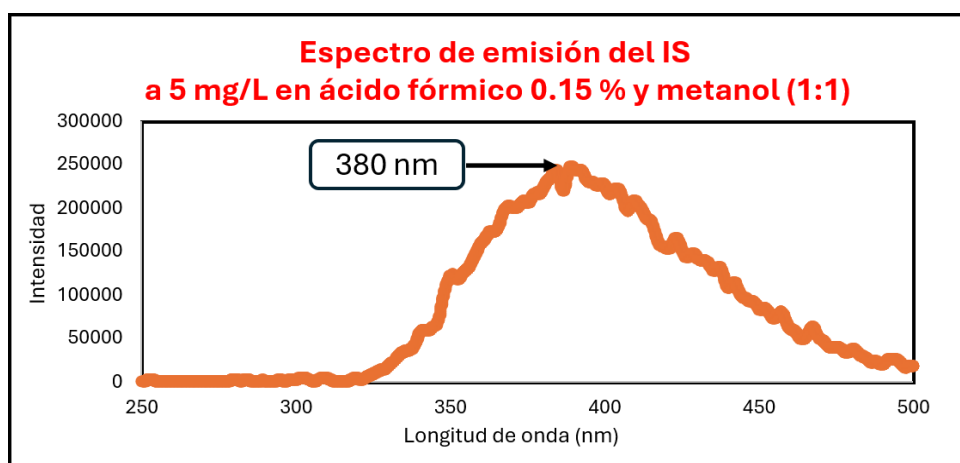
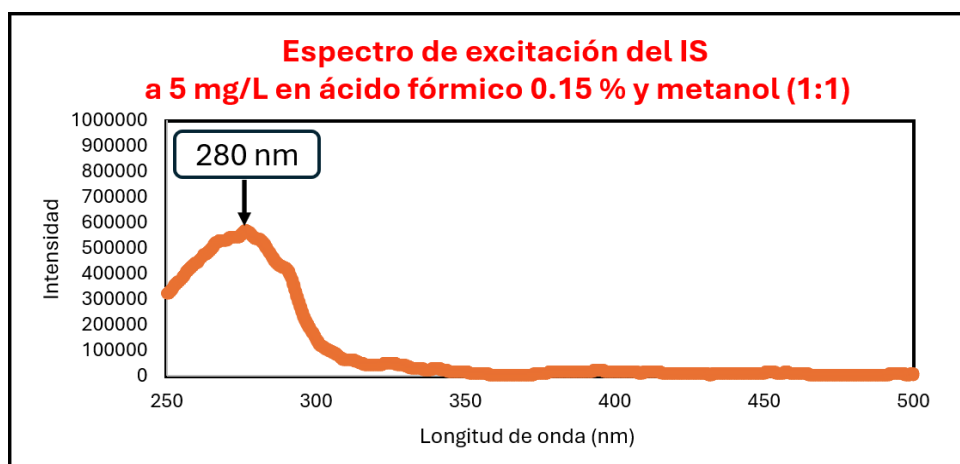


Figura 6. Espectro de excitación y emisión del pCS a 5 mg/L empleando la mezcla de ácido fórmico 0.15 % y metanol (1:1) como disolvente.

6.2. Implementación de un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.

Se seleccionó una columna Atlantis T3 (150 x 2.1 mm, 3 μ m) como fase estacionaria. La fase móvil estuvo compuesta por una solución acuosa de ácido fórmico 0.15 % (fase A) y metanol (fase B), el flujo fue de 0.15 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C, el volumen de inyección fue de 5 μ L y se mantuvieron constantes en todos los casos. En la Tabla IV se muestran las condiciones cromatográficas que se probaron para la implementación del sistema cromatográfico, en las Figuras 7, 8 y 9 se muestran como cromatogramas representativos obtenidos bajo las condiciones evaluadas.

Tabla IV. Condiciones evaluadas en la implementación del sistema cromatográfico para la determinación de pCS e IS.

Condición	Fase móvil		λ_{exc}		λ_{em}	
	Fase A	Fase B	IS	pCS	IS	pCS
1	70	30	280 nm	270 nm	380 nm	290 nm
2	65	35				

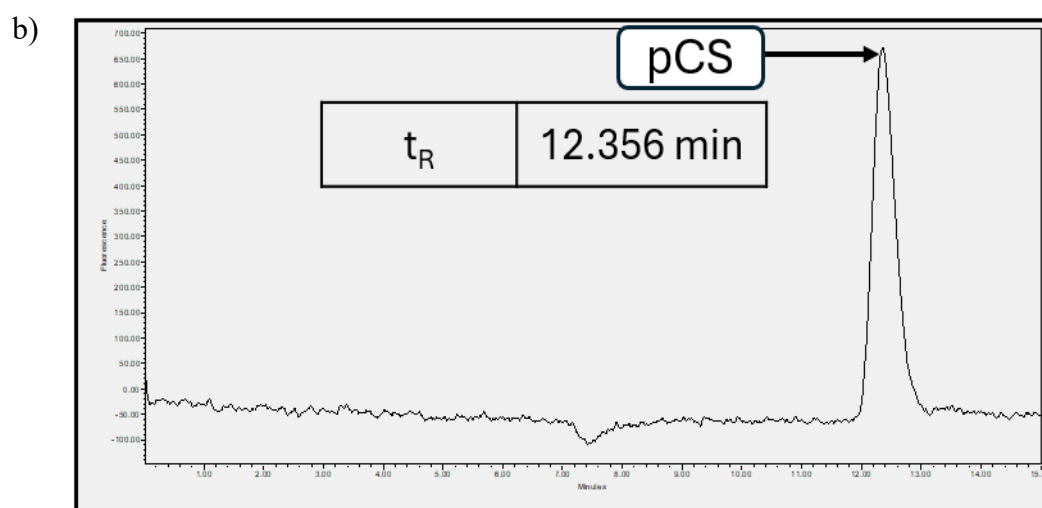
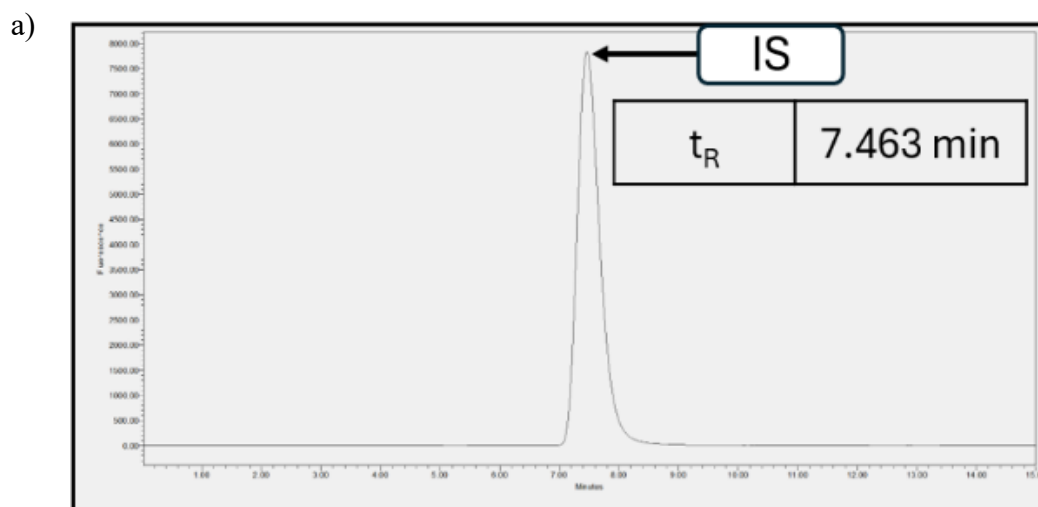


Figura 7. Cromatogramas obtenidos para una solución de (a) IS y (b) pCS a 5 mg/L con la Condición 1.

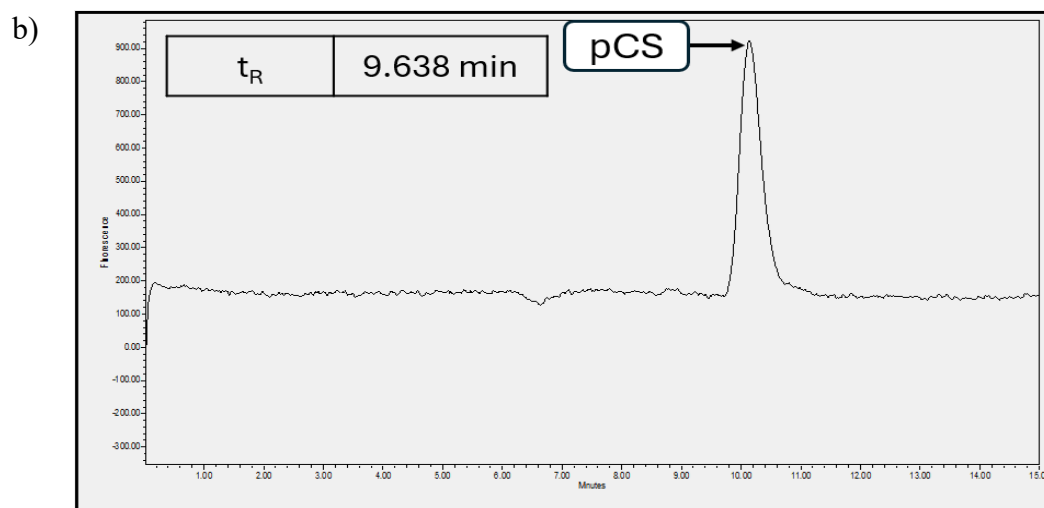
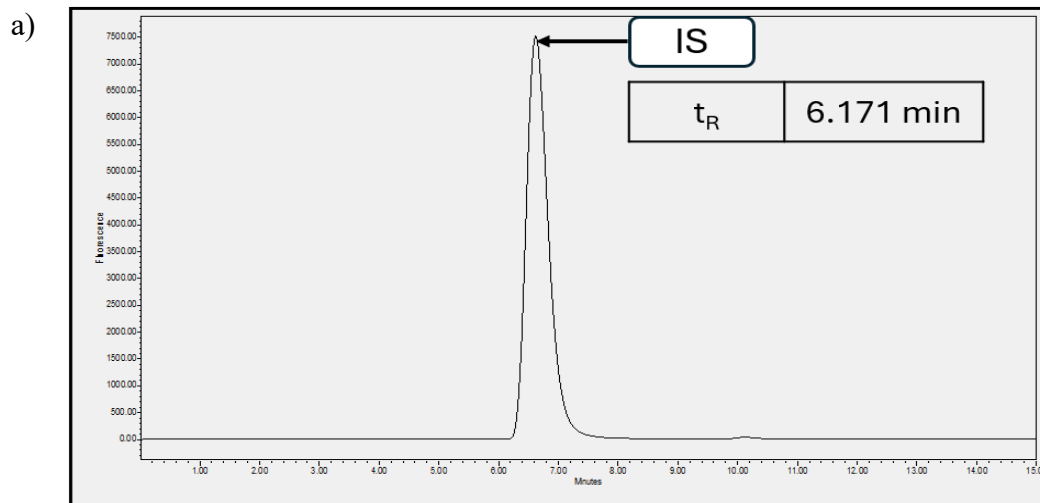


Figura 8. Cromatogramas obtenidos para una solución de (a) IS y (b) pCS a 5 mg/L en la Condición 2.

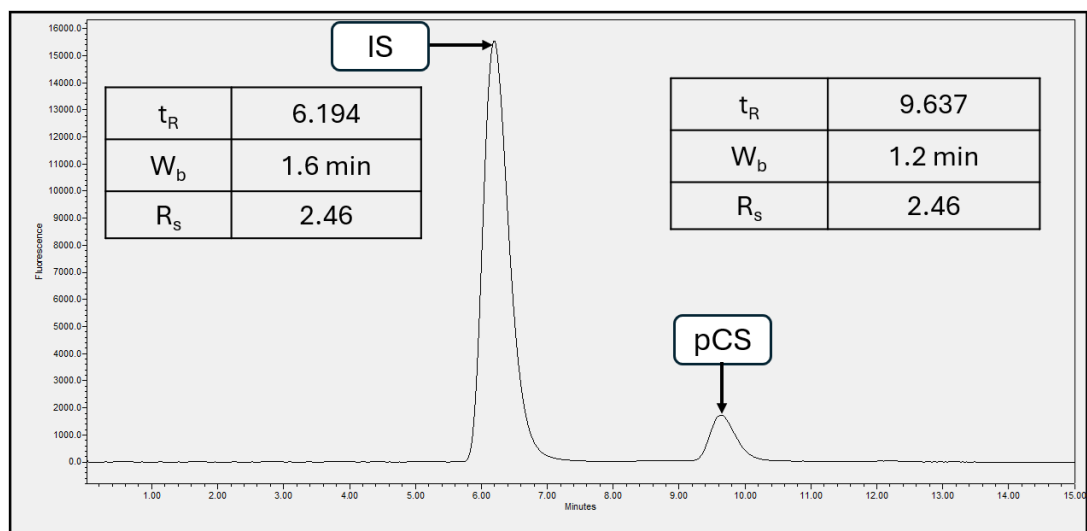


Figura 9. Cromatograma de una solución estándar en mezcla de IS y pCS a 10 mg/L en la Condición 2.

Se seleccionó la condición 2 debido a que se obtuvo una disminución en el t_R del IS y pCS a 6.194 min y 9.637 min, respectivamente. En la Tabla V se resumen las condiciones cromatográficas seleccionadas como las más adecuadas para el análisis de los analitos.

Tabla V. Condiciones cromatográficas seleccionadas para el análisis de pCS e IS.

Condiciones cromatográficas		
Columna	Atlantis T3 (3 μ m, 150 x 2.1 mm)	
Fase móvil	Ácido fórmico 0.15 % - metanol (65:35)	
Volumen de inyección	5 μ L	
Flujo	0.15 mL/min	
Temperatura de la columna	45°C	
Longitud de onda de excitación	IS: 280 nm	pCS: 270 nm
Longitud de onda de emisión	IS: 380 nm	pCS: 290 nm

6.3. Validación del sistema cromatográfico implementado para la determinación simultánea de pCS e IS.

El sistema cromatográfico fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. Los resultados de la validación se presentan en la Tabla VI. Las curvas de calibración resultantes se muestran en la Figura 10.

Tabla VI. Validación del sistema cromatográfico para la determinación simultánea de IS y pCS.

Parámetro \ Analito		IS	pCS
Tiempo de retención (tr)		6.169 ± 0.021 min	9.575 ± 0.072 min
Rango lineal (mg/L)		0.1 - 50 mg/L	1 - 50 mg/L
Linealidad	Ecuación de regresión	$y = 3.978 \times 10^7 x - 1.109 \times 10^7$	$y = 3.707 \times 10^6 x + 2.982 \times 10^6$
	R ²	0.9995	0.9945
	%DER de los factores de respuestas	6.62	5.97
Precisión	%DER de las respuestas de cada nivel de concentración	0.45 - 4.28	0.31 - 2.45
	% DER de tr	0.34	0.75
Exactitud	Pendiente	0.9994	0.9945
	R ²	0. 0.9995	0.9995
Límite de detección		0.04 mg/L	0.33 mg/L
Límite de cuantificación		0.13 mg/L	1.08 mg/L

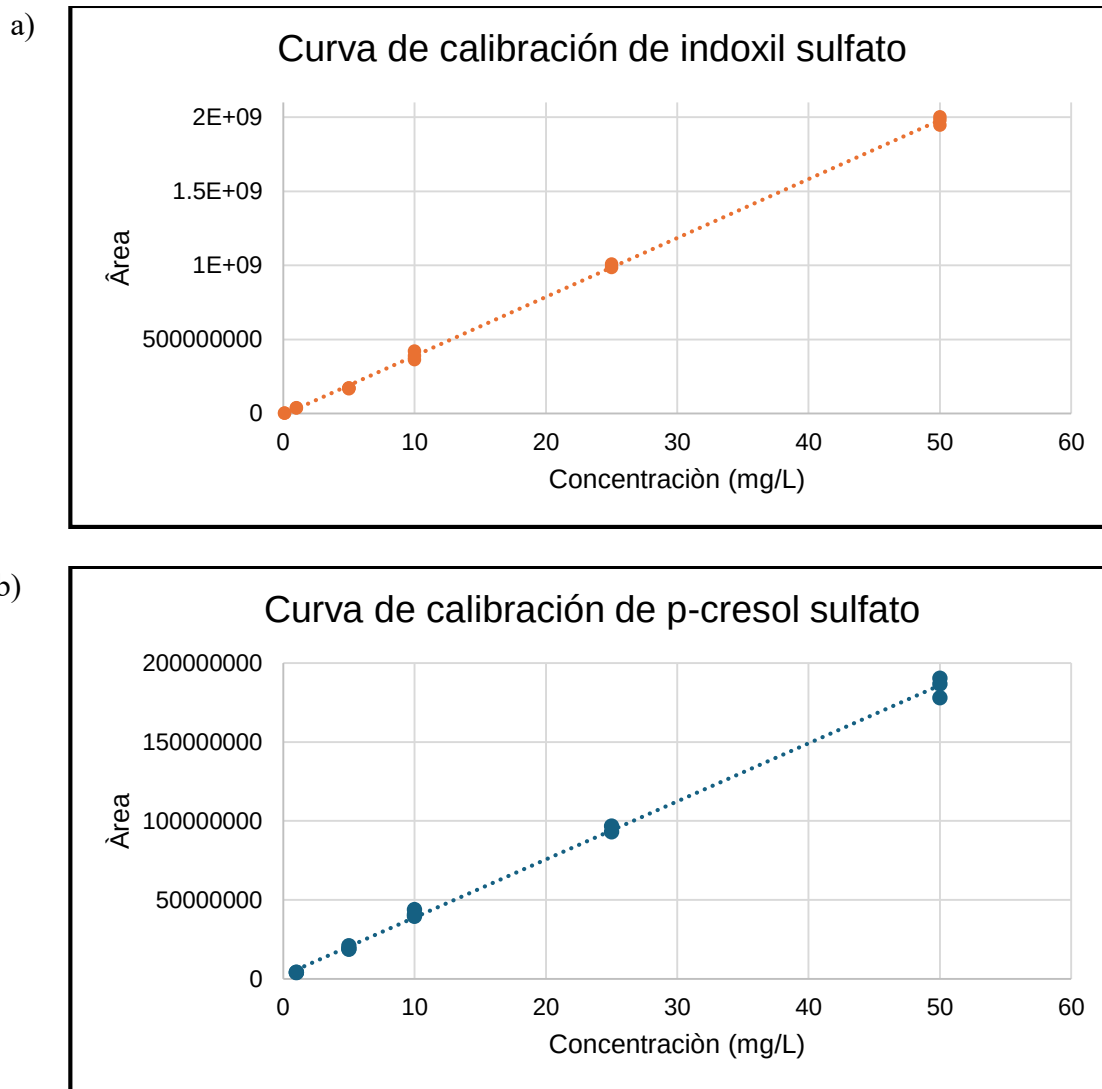


Figura 10. Curvas de calibración de a) IS y b) pCS bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

6.4. Selección el agente precipitante para la determinación de pCS e IS en suero.

Como se muestra en la Figura 11, se encontró una mayor respuesta cromatográfica (mayor área) para ambos analitos cuando se empleó acetonitrilo como agente precipitante. Esta tendencia fue consistente con las observaciones realizadas durante el tratamiento de las muestras.

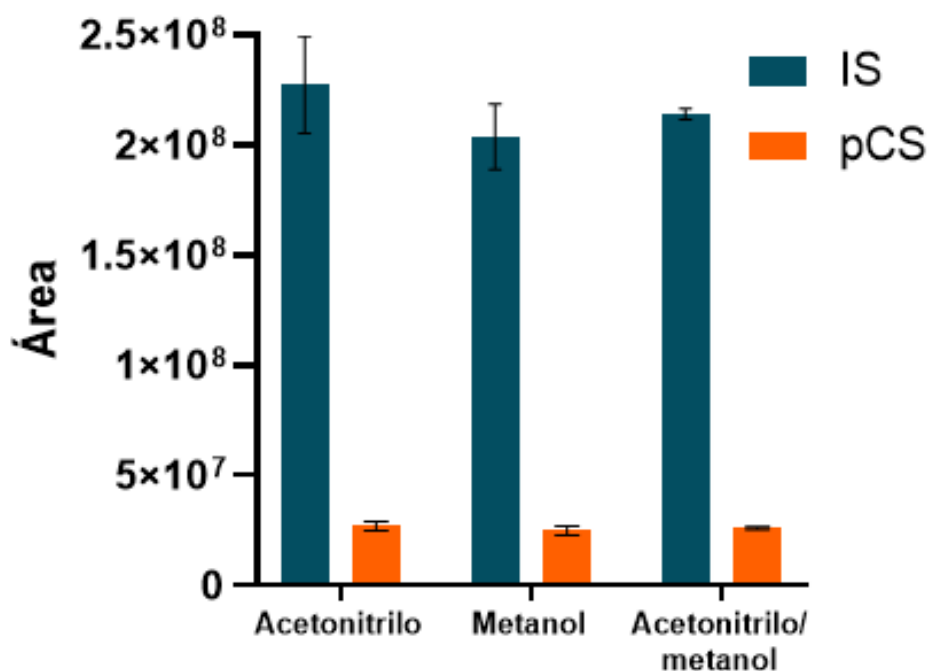


Figura 11. Áreas cromatográficas promedio de IS y pCS obtenidas después de la precipitación proteica con acetonitrilo, metanol y acetonitrilo/metanol (1:1) como agentes precipitantes. Las barras de error representan la desviación estándar ($n = 3$).

Sin embargo, como puede verse en la Tabla VII de los resultados del análisis de varianza de un factor aplicado a las áreas cromatográficas obtenidas con los distintos agentes precipitantes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, al obtenerse un valor de F calculada menor que F crítica.

Tabla VII. Análisis de varianza de un factor de las áreas cromatográficas obtenidas para IS y pCS con los diferentes agentes precipitantes.

	Area $\bar{x}$	F crítica	F Calculada
IS	215106589	5.143	1.751
pCS	25997366	5.143	1.167

En las Figuras 12, 13 y 14 se presentan los cromatogramas obtenidos después del tratamiento de las muestras con los diferentes agentes precipitantes. Al comparar los cromatogramas, puede verse que, el uso de acetonitrilo como agente precipitante, produjo una mayor respuesta cromatográfica para el pCS e IS, así como una línea base más limpia, en comparación con el metanol y la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1).

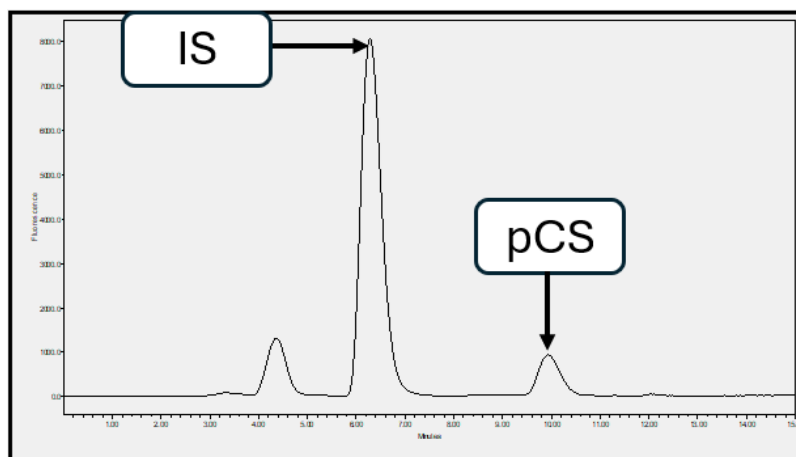


Figura 12. Cromatograma obtenido de la precipitación proteica de una muestra fortificada de 25 mg/L de pCS e IS utilizando acetonitrilo como agente precipitante.

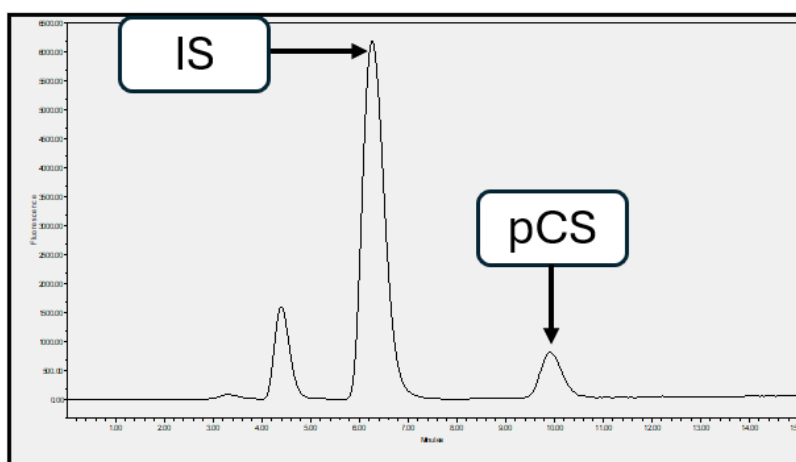


Figura 13. Cromatograma obtenido de la precipitación proteica de una muestra fortificada de 25 mg/L de pCS e IS utilizando metanol como agente precipitante.

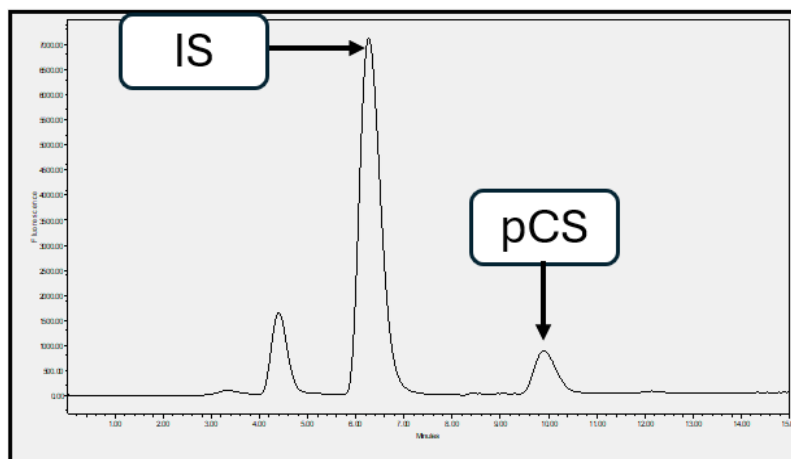


Figura 14. Cromatograma obtenido de la precipitación proteica de una muestra fortificada de 25 mg/L de pCS e IS utilizando la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1) como agente precipitante.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 15, el acetonitrilo produjo un sobrenadante más claro que el obtenido con metanol y con la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1), lo que sugiere una mayor eliminación de los componentes precipitados de la matriz. Con base en la mayor respuesta cromatográfica, la menor interferencia observada en los cromatogramas y las características visuales del sobrenadante, se seleccionó el acetonitrilo como agente precipitante para el tratamiento de las muestras en los ensayos posteriores.

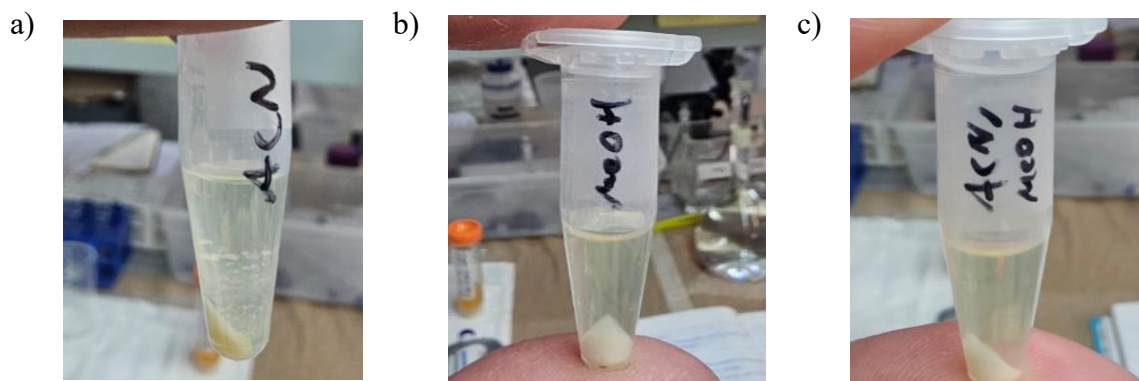


Figura 15. Aspecto visual de los sobrenadantes obtenidos después de la precipitación proteica con (a) acetonitrilo, (b) metanol y (c) la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1).

6.5. Evaluación el desempeño del método.

Una vez establecidas las condiciones para el tratamiento de las muestras, se evaluó el desempeño del método desarrollado para la determinación simultánea de IS y pCS en suero. Los resultados obtenidos para los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, estabilidad, límite de detección y límite de cuantificación, se presentan a continuación.

6.5.1. Selectividad.

Como se muestra en la Figura 16, en el cromatograma del *pool* de suero de sujetos sanos sin fortificar se observan las señales correspondientes a ambos analitos en sus respectivos t_R , sin presencia de interferencias cromatográficas que coeluyeran con el IS y pCS.

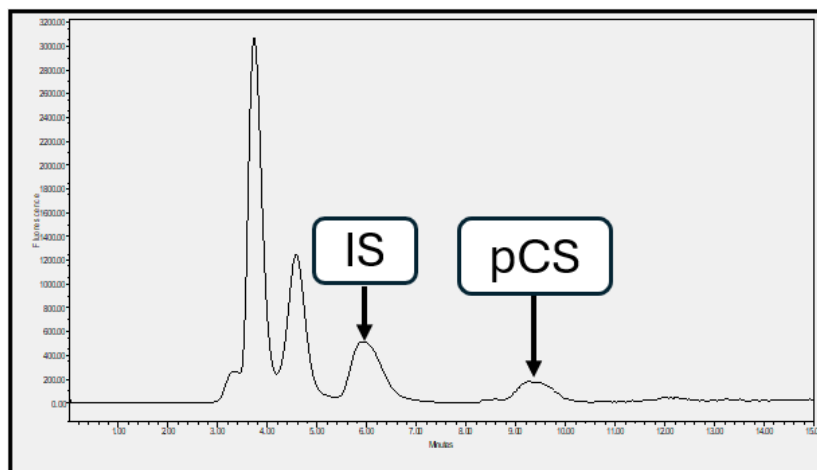


Figura 16. Cromatograma obtenido del análisis del *pool* de suero de sujetos sanos.

Al analizar los cromatogramas de las muestras de suero fortificadas a 3, 30 y 60 mg/L mostrados en las figuras 17, 18 y 19, se observó un incremento en la respuesta cromatográfica de ambos analitos conforme aumentó la concentración adicionada, manteniéndose sus t_R y sin observarse alteraciones evidentes en la forma de los picos ni señales interferentes en las regiones cromatográficas correspondientes a los analitos.

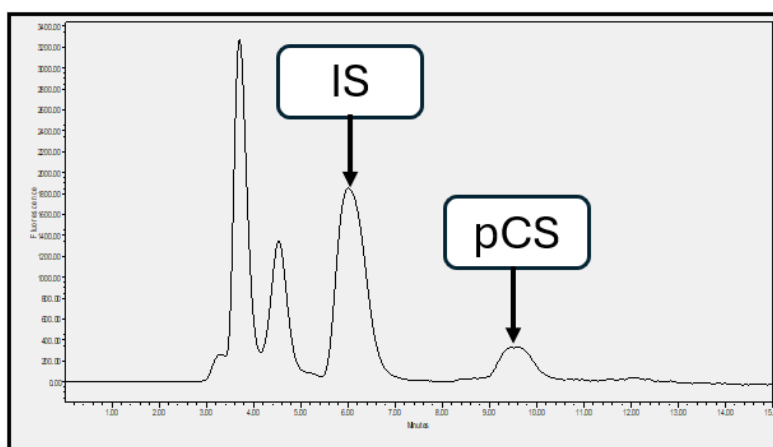


Figura 17. Cromatograma obtenido del análisis del *pool* de suero de sujetos sanos fortificado a 3 mg/L de IS y pCS.

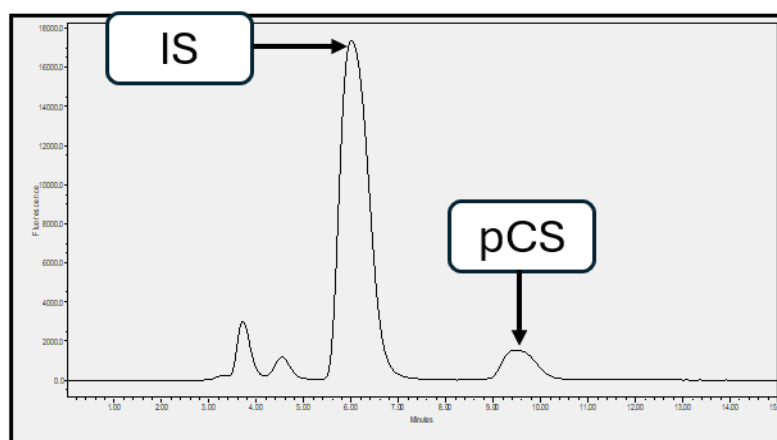


Figura 18. Cromatograma obtenido del análisis del *pool* de suero de sujetos sanos fortificado a 30 mg/L de IS y pCS.

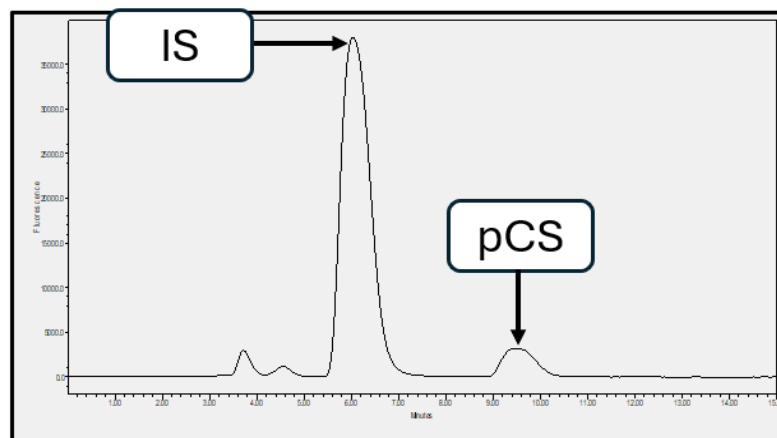


Figura 19. Cromatograma obtenido del análisis del *pool* de suero de sujetos sanos fortificado a 60 mg/L de IS y pCS.

Asimismo, en el cromatograma de la muestra de un paciente con ERC, figura 20, fue posible identificar las señales del IS y pCS en sus respectivos t_R , no se observaron interferencias cromatográficas que impidieran su diferenciación.

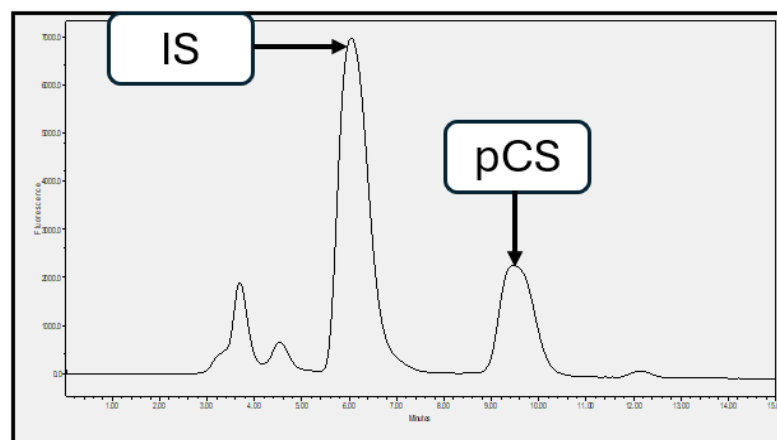


Figura 20. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de suero de un paciente con ERC.

La identificación de las señales correspondientes al IS y pCS se complementó mediante la comparación de los resultados obtenidos con los detectores de FLD y DAD. Como se muestra en las Figuras 21 y 22, los cromatogramas obtenidos mediante ambos sistemas de detección para la muestra fortificada a 60 mg/L y la muestra del paciente con ERC presentaron señales correspondientes al IS y pCS en t_R similares.

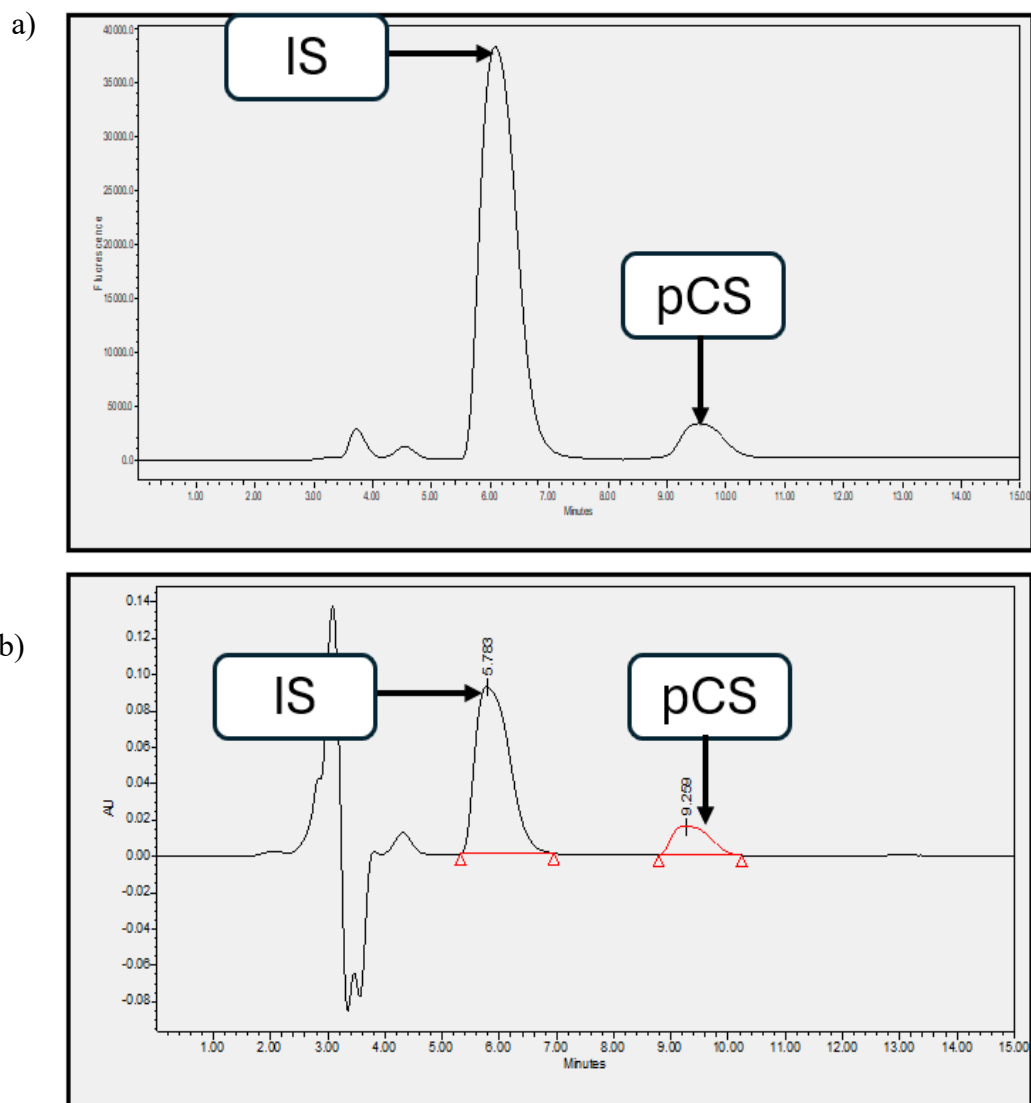


Figura 21. Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de suero fortificada a 60 mg/L de IS y pCS a) detector FLD y b) detector DAD.

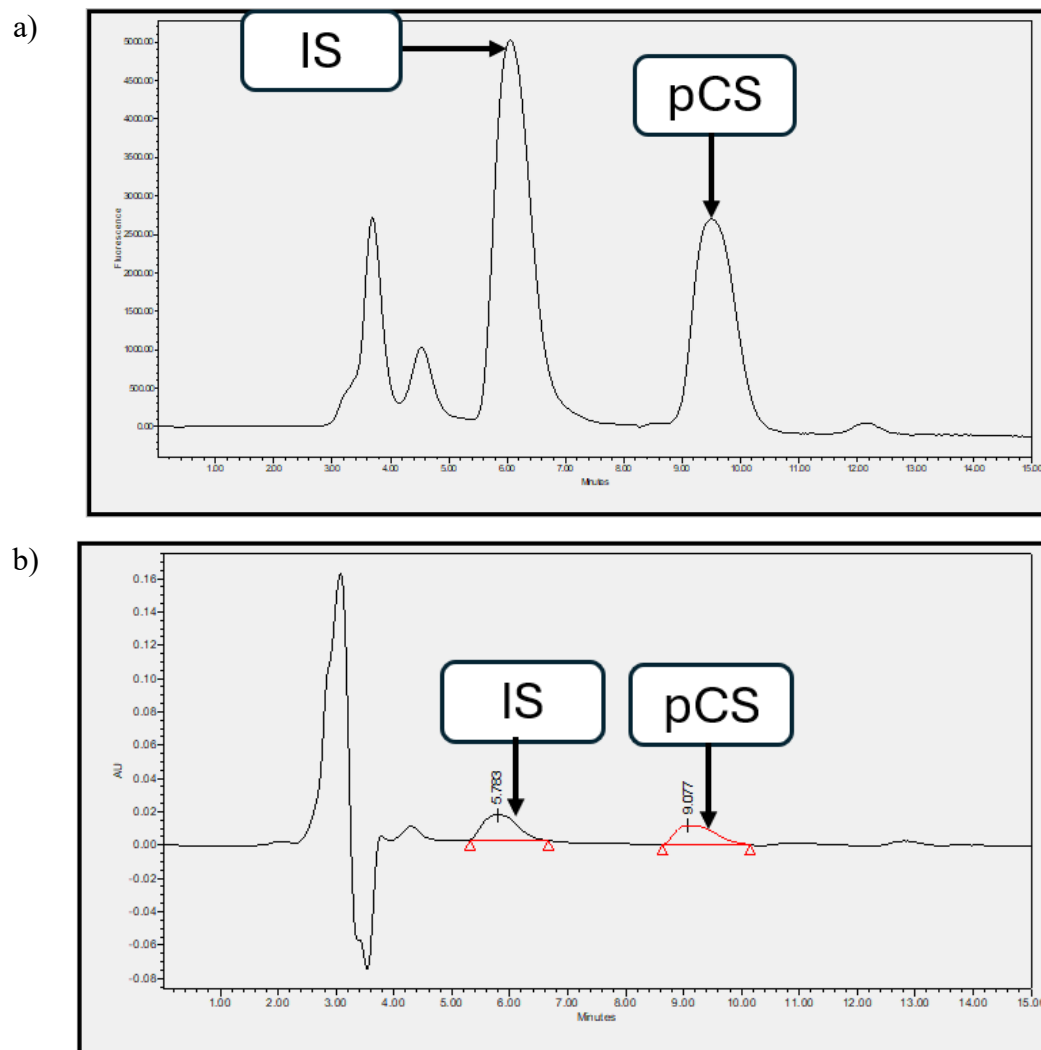


Figura 22. Cromatogramas obtenidos del análisis de suero de un paciente con ERC: a) detector FLD y b) detector DAD.

Adicionalmente, en la Figura 23 se presenta la comparación de los espectros de absorción UV obtenidos mediante el detector DAD para ambos analitos en las dos muestras analizadas.

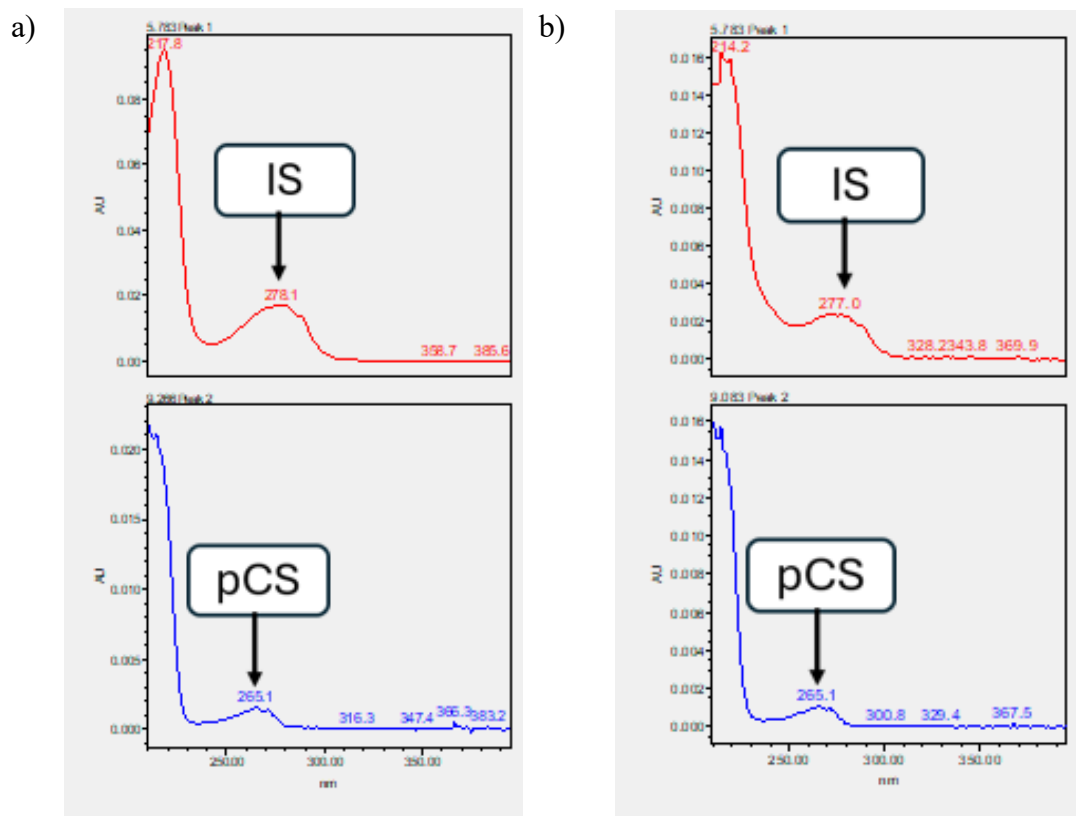


Figura 23. Espectros de absorción UV de IS y pCS obtenidos mediante DAD para: a) una muestra de suero fortificada a 60 mg/L y b) una muestra de suero de un paciente con ERC.

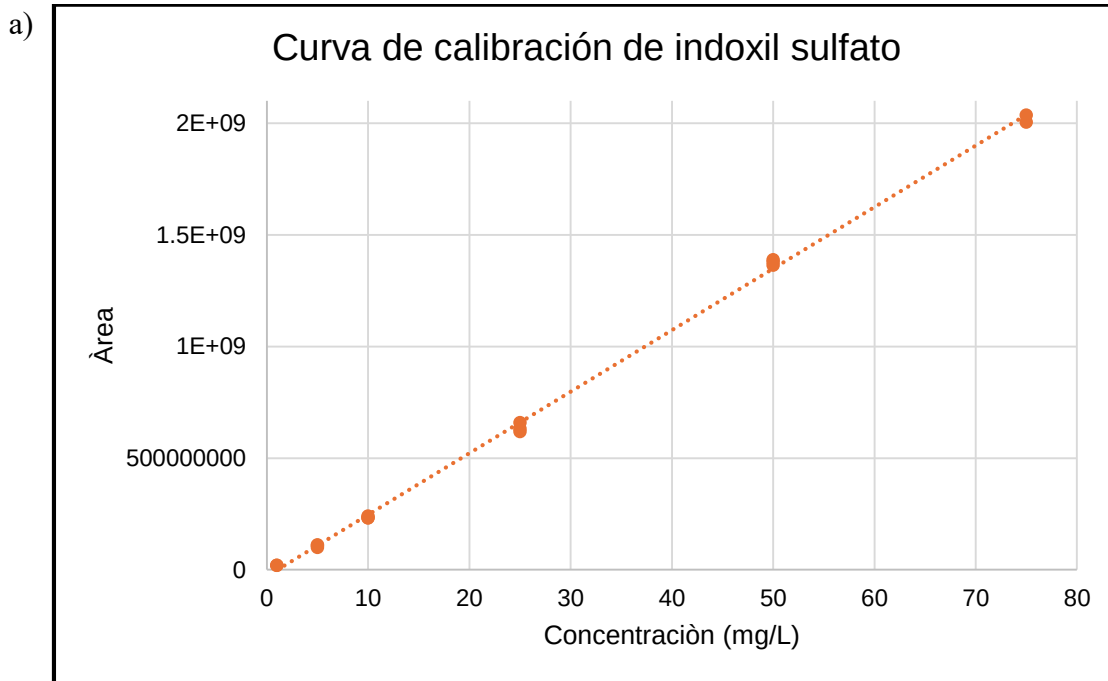
6.5.2. Linealidad.

Los resultados de la validación de la curva de calibración en matriz después de la precipitación proteica con acetonitrilo se presentan en la Tabla VIII.

La curva de calibración obtenida para ambos analitos se muestra en la Figura 24.

Tabla VIII. Resultados de la evaluación de la linealidad del método para la determinación simultánea de IS y pCS.

Analito Parámetro		IS	pCS
Tiempo de retención (tr)		5.966 ± 0.026	9.378 ± 0.064
Área en el blanco (suero sin fortificar)		22818435 ± 2422479	7253740 ± 611405
Rango lineal (mg/L)		1 - 75 mg/L	
Linealidad	Ecuación de regresión	$y = 2.763 \times 10^7 x - 3.261 \times 10^7$	$y = 2.627 \times 10^6 x - 3.511 \times 10^6$
	R ²	0.9990	0.9960
	%DER de los factores de respuestas	11.76	5.94



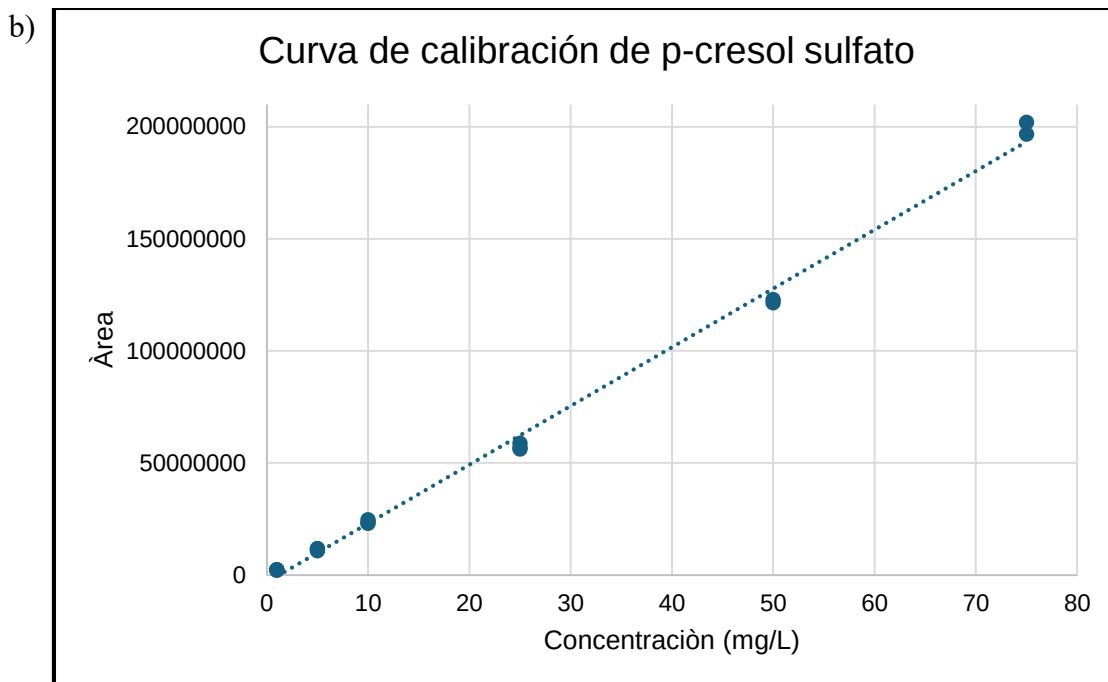


Figura 24. Curvas de calibración de a) IS y b) pCS realizada en matriz después de la precipitación proteica con acetonitrilo.

6.5.3. Exactitud y precisión.

En las Tablas IX y X, las recuperaciones obtenidas para ambos analitos en los tres niveles de concentración se encontraron dentro del intervalo de aceptación establecido de 85 - 115 % (ICH, 2022). Asimismo, los valores de % DER obtenidos para las concentraciones determinadas durante los ensayos de precisión intradía e interdía fueron inferiores al criterio de aceptación de 15 % (ICH, 2022). Por lo tanto, los resultados obtenidos cumplieron con los criterios establecidos para la exactitud y precisión del método.

Tabla IX. Resultados de la evaluación de la exactitud y precisión del método para la determinación de IS.

Nivel adicionado (mg/L)	Concentración obtenida (mg/L)	Exactitud	Precisión			
			Intradía (n=3)		Interdía (n=9)	
		% Recuperación	% DER		% DER	
		($\bar{x}$)	tr	Concentración	tr	Concentración
3	3.41 ± 0.23	113.61 %	0.038 %	1.190 %	0.515 %	5.301 %
30	28.66 ± 0.41	95.54 %	0.179 %	0.953 %	0.653 %	3.118 %
60	59.62 ± 1.39	99.36 %	0.202 %	0.468 %	0.603 %	1.798 %

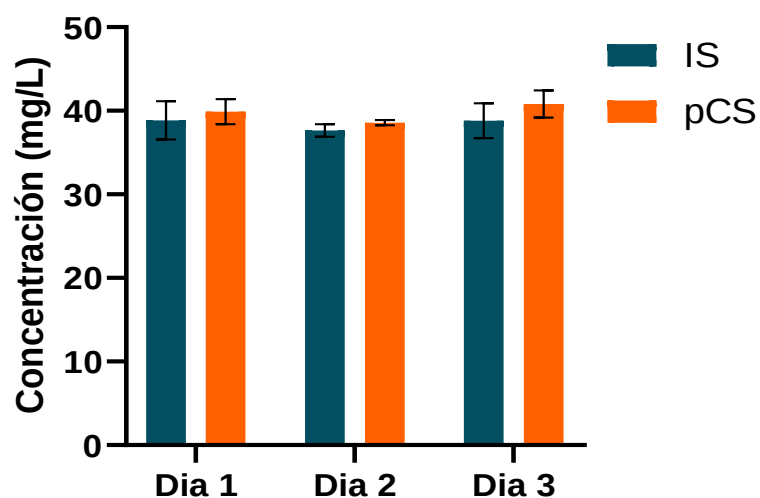
Tabla X. Resultados de la evaluación de la exactitud y precisión del método para la determinación de pCS.

Nivel adicionado (mg/L)	Concentración obtenida (mg/L)	Exactitud	Precisión			
			Intradía (n=3)		Interdía (n=9)	
		% Recuperación	% DER		% DER	
		($\bar{x}$)	tr	Concentración	tr	Concentración
3	3.28 ± 0.07	109.43 %	0.528 %	0.426 %	1.417 %	1.387 %
30	30.39 ± 0.39	101.31 %	0.178 %	1.319 %	0.753 %	3.627 %
60	56.94 ± 2.11	93.24 %	0.185 %	1.347 %	0.496 %	2.695 %

6.5.4. Estabilidad.

Como se muestra en la Figura 25, las concentraciones de IS y pCS se mantuvieron constantes respecto a la concentración inicial bajo las condiciones de estabilidad evaluadas. La estabilidad a temperatura ambiente se evaluó durante 8 horas en tres días distintos por triplicado, mientras que la estabilidad frente a ciclos de congelación/descongelación se evaluó mediante tres ciclos realizados a intervalos de 24 horas.

a)



b)

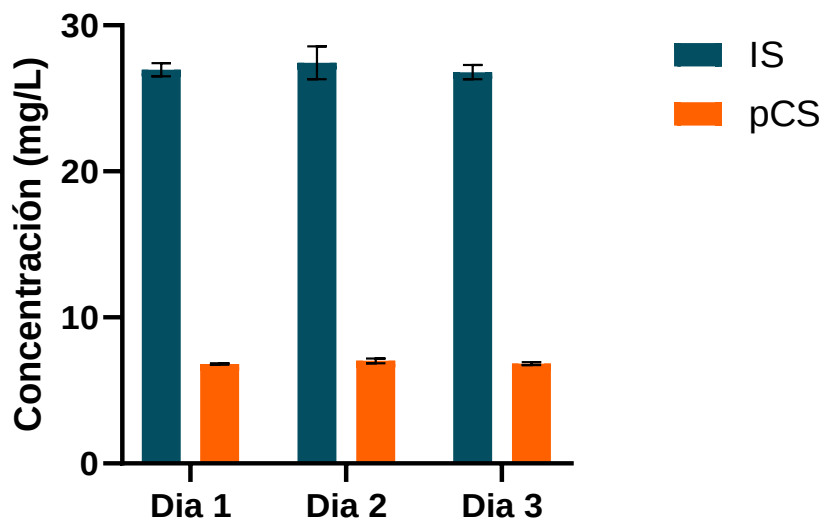


Figura 25. Concentraciones de IS y pCS obtenidas durante la evaluación de la estabilidad bajo diferentes condiciones: a) ciclos de congelación/descongelación cada 24 horas y b) permanencia a temperatura ambiente durante 8 horas. Las barras de error representan la desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado ($n = 3$).

En las Tablas XI y XII se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, en los cuales, para ambos analitos, los valores de F calculada fueron menores que los valores de F crítica, tanto para las concentraciones determinadas como para los t_R en las condiciones evaluadas.

Tabla XI. Análisis de varianza de un factor para la evaluación de la estabilidad del IS y pCS en muestras de suero de pacientes con ERC a temperatura ambiente durante 8 horas.

	Concentración mg/L $\bar{x}$	<i>F</i> crítica	<i>F</i> calculada	t_R $\bar{x}$	<i>F</i> crítica	<i>F</i> Calculada
IS	38.44	5.143	0.412	6.053	5.143	0.099
pCS	39.76	5.143	2.292	9.561	5.143	0.359

Tabla XII. Análisis de varianza de un factor para la evaluación de la estabilidad del IS y pCS en muestras de suero de pacientes con ERC durante ciclos de congelación/descongelación cada 24 horas.

	Concentración mg/L $\bar{x}$	<i>F</i> crítica	<i>F</i> calculada	t_R $\bar{x}$	<i>F</i> crítica	<i>F</i> Calculada
IS	27.07	5.143	0.598	6.057	5.143	1.663
pCS	6.89	5.143	3.256	9.518	5.143	2.647

De igual forma, en los cromatogramas no se observó la aparición de señales cromatográficas que no correspondieran a los picos cromatográficos de los analitos.

6.5.5. Límites de detección y cuantificación.

Los LOD y LOC se evaluaron mediante la relación señal ruido de los cromatogramas. Para el IS se obtuvo un LOD de 0.07 mg/L y un LOC de 0.25 mg/L, mientras que para el pCS los valores fueron de 0.09 mg/L y 0.29 mg/L, respectivamente.

En la Tabla XIII, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en la validación del método propuesto.

Tabla XIII. Resumen de los resultados obtenidos durante la validación del método para la determinación simultánea de IS y pCS en suero.

Parámetro	Resultado	
Selectividad	No hay señales interferentes.	
Linealidad	Inspección visual: tendencia lineal para ambos analitos	
	Coeficiente de determinación (R^2): > 0.99 para ambos analitos	
Precisión (% DER de la concentración)	Intradía	IS: 0.47 a 1.19 % pCS: 0.43 a 1.35 %
	Interdía	IS: 1.79 a 5.30 % pCS: 1.39 a 3.63 %
Exactitud (% Recuperación)	IS: 95.54 a 113.61 % pCS: 93.24 a 109.43 %	
Estabilidad	Las muestras de pacientes con ERC se mantuvieron estables durante tres ciclos de congelación/descongelación cada 24 horas y durante 8 horas a temperatura ambiente durante tres días distintos.	
LOD	IS=0.07 mg/L pCS= 0.09 mg/L	
LOC	IS= 0.25 mg/L pCS= 0.29 mg/L	

6.6. Aplicabilidad del método.

Como parte de la aplicabilidad del método validado, se determinaron las concentraciones de IS y pCS en 79 muestras de suero de 47 pacientes con ERC estadio 5 bajo tratamiento de diálisis peritoneal. En la Figura 26 se muestra, como ejemplo, el cromatograma obtenido para una muestra de suero de un paciente con ERC, en el cual se muestra el perfil cromatográfico de un paciente con ERC, donde se identificaron las señales correspondientes al IS y pCS en sus respectivos t_R , además de la presencia de señales secundarias correspondientes a los compuestos endógenos de la matriz y otras que podrían estar relacionadas con otras toxinas urémicas que no están siendo evaluadas en este estudio.

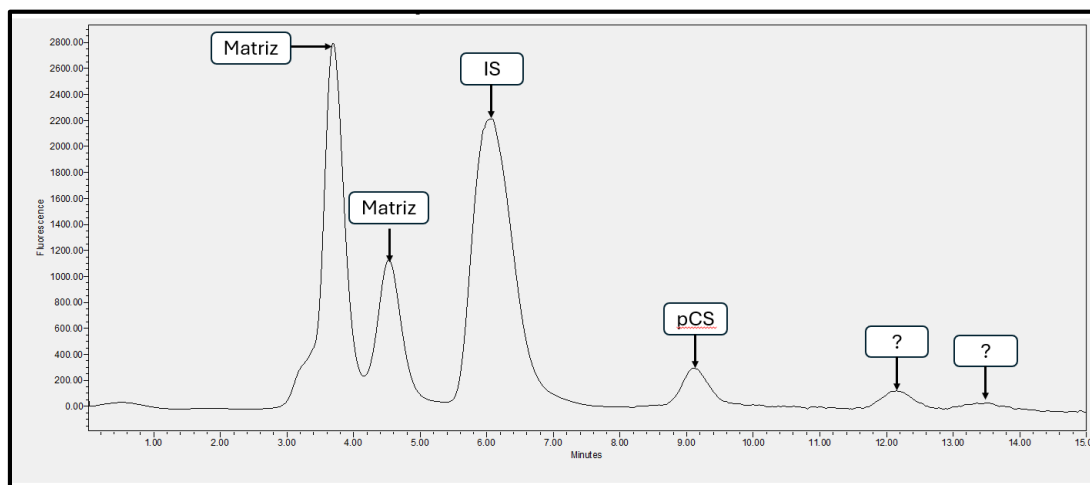


Figura 26. Concentración (mg/L) de muestras de pacientes con ERC en estadio 5 con tratamiento de diálisis peritoneal durante diferentes periodos de toma de muestra.

Las concentraciones obtenidas para IS y pCS en las muestras analizadas se presentan en la Tabla XIV. Los pacientes se agruparon de acuerdo con el tiempo de permanencia en diálisis peritoneal, y se identificaron mediante un código de colores: 1 a 3 meses (naranja), 4 a 6 meses (amarillo), 7 a 9 meses (verde) y 10 a 12 meses o más (azul).

Tabla XIV. Concentración (mg/L) de muestras de pacientes con ERC tipo 5 con tratamiento de diálisis peritoneal durante diferentes periodos de toma de muestra. ND= no detectado.

Paciente	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	IS	pCS	IS	pCS	IS	pCS
1	7.49	48.40	8.32	45.59	8.91	51.00
2	10.44	34.58	-	-	-	-
3	27.45	5.51	-	-	-	-
4	9.34	4.73	32.98	8.56	24.27	*ND
5	32.74	7.54	25.02	9.18	10.12	4.32
6	38.87	39.89	11.91	22.13	-	-
7	26.96	6.81	21.70	16.17	-	-
8	13.17	5.60	-	-	-	-
9	6.87	14.10	-	-	-	-
10	8.86	24.54	-	-	-	-
11	83.36	17.28	-	-	-	-
12	20.18	8.48	17.67	2.68	14.32	6.05
13	31.31	9.44	50.27	17.75	-	-
14	19.45	6.01	-	-	-	-
15	20.76	7.21	19.61	9.16	17.07	ND
16	26.62	22.23	25.94	17.14	34.10	25.52
17	8.94	7.87	29.01	9.37	-	-
18	11.33	14.22	11.23	5.74	-	-
19	10.23	4.10	-	-	-	-
20	53.00	32.03	21.50	17.61	-	-

21	22.85	30.89	40.48	26.05	30.41	10.68
22	9.95	46.13	12.17	43.39	-	-
23	46.04	19.27	47.16	34.05	-	-
24	12.07	5.01	24.11	2.93	-	-
25	18.37	8.74	27.71	3.37	-	-
26	28.06	7.37	-	-	-	-
27	12.80	6.74	9.17	5.66	-	-
28	35.31	16.85	49.67	16.96	-	-
29	29.56	9.79	19.70	4.45	-	-
30	2.42	4.04	34.31	4.23	-	-
31	34.09	6.57	-	-	-	-
32	34.12	12.37	12.42	33.68	-	-
33	36.41	26.77	40.93	13.47	-	-
34	12.92	11.98	-	-	-	-
35	24.58	6.62	-	-	-	-
36	24.75	7.36	-	-	-	-
37	28.53	10.64	-	-	-	-
38	70.26	6.12	-	-	-	-
39	19.73	80.64	34.72	63.00	-	-
40	25.69	16.78	-	-	-	-
41	22.08	14.28	30.50	16.87	-	-
42	54.64	22.79	-	-	-	-
43	15.84	19.67	-	-	-	-
44	55.71	13.08	-	-	-	-
45	15.42	27.27	-	-	-	-
46	15.34	8.96	-	-	-	-
47	25.14	27.73	-	-	-	-

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN.

7.1. Selección de las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para pCS e IS.

Se observó una diferencia entre las longitudes de onda máximas de excitación y emisión para ambos analitos, correspondiente a aproximadamente 20 nm para pCS (270/290 nm) y 100 nm para IS (280/380 nm). Esta separación espectral puede describirse en términos del desplazamiento de Stokes, fenómeno característico de la fluorescencia en el cual la emisión ocurre generalmente a una longitud de onda mayor y, por lo tanto, a menor energía que la excitación. Este comportamiento se debe a la pérdida parcial de energía del estado excitado mediante procesos de relajación no radiantes antes de que ocurra la emisión de fluorescencia. (Lakowicz, 2006). Las diferencias entre las longitudes de onda de excitación y de emisión, pueden atribuirse a sus distintas estructuras

moleculares y sistemas cromóforos: el pCS posee un anillo fenólico sustituido, mientras que el IS presenta un sistema indólico conjugado, por lo que ambos compuestos presentan diferentes transiciones electrónicas y procesos de relajación del estado excitado (Lakowicz, 2006). De manera consistente, se han reportado diferentes longitudes de onda de excitación y emisión para la detección por fluorescencia de ambos analitos (Pretorius et al., 2013). En el presente estudio, los máximos determinados experimentalmente permitieron establecer condiciones específicas de detección para cada compuesto durante el análisis cromatográfico.

Las longitudes de onda seleccionadas experimentalmente mostraron concordancia general con las utilizadas previamente para la determinación de estas toxinas urémicas mediante HPLC-FLD. Para el pCS, De Loor et al. (2009) utilizaron $\lambda_{exc}=260$ nm y $\lambda_{em}=288$ nm para su determinación en suero. Asimismo, Natarajan et al. (2014) emplearon 264/290 nm para pCS, mientras que Crespo-Salgado et al. (2016) utilizaron 260/288 nm. Por lo tanto, las longitudes de onda obtenidas experimentalmente en el presente trabajo para pCS (270/290 nm) presentan una longitud de onda de emisión similar a la reportada en la literatura (288 - 290 nm), mientras que la longitud de onda de excitación mostró una mayor diferencia respecto a los valores empleados en otros métodos (260 - 265 nm). No obstante, estos resultados muestran una concordancia general con las condiciones de detección por fluorescencia reportadas para pCS.

Para el IS, De Loor et al. (2009) emplearon 280/390 nm, condiciones que también han sido utilizadas posteriormente para su determinación mediante HPLC-FLD. Wu et al. (2010), por ejemplo, determinaron IS en suero utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm y una longitud de onda de emisión de 390 nm. Por su parte, Natarajan et al. (2014) utilizaron 272/374 nm. En comparación, los valores obtenidos experimentalmente en este trabajo para IS (280/380 nm) presentan una longitud de onda de emisión cercana a las condiciones de 374 - 390 nm descritas previamente, mientras que la longitud de onda de excitación obtenida coincide prácticamente con las longitudes reportadas en varios métodos publicados.

Las pequeñas diferencias entre las longitudes de onda obtenidas experimentalmente y las reportadas en la literatura no necesariamente representan una discrepancia, ya que las propiedades espectrales de fluorescencia pueden verse influenciadas por las características del medio, particularmente por la polaridad y las interacciones entre el fluoróforo y el solvente, lo que puede producir desplazamientos en los máximos espectrales (Homocianu, 2024). En el presente trabajo, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron seleccionadas a partir de barridos espectrales realizados directamente a soluciones individuales de pCS e IS preparadas en una mezcla de ácido fórmico al 0.15 % y metanol (1:1). Como puede verse, las condiciones del medio en las que se determinaron los máximos de fluorescencia difieren de las empleadas en otros métodos reportados en la literatura, los cuales utilizan composiciones de fase acuosa, sistemas amortiguadores de formiato o fosfato y diferentes proporciones de modificador orgánico. Las variaciones entre los máximos espectrales obtenidos en el presente trabajo y los reportados por otros autores pueden estar relacionadas con las condiciones del medio, ya que las interacciones entre el fluoróforo y el solvente pueden producir desplazamientos en los máximos espectrales de fluorescencia (Zacharioudaki et al., 2022).

En este sentido, la selección experimental de 270/290 nm para pCS y 260/380 nm para IS permitió establecer condiciones específicas de detección para cada analito en el sistema desarrollado. El empleo de longitudes de onda próximas a los máximos de excitación y emisión permite obtener una mayor intensidad de fluorescencia, debido a que la excitación se realiza en una región de elevada absorción del fluoróforo y la emisión se registra en una región de máxima intensidad. Como consecuencia, se incrementa la respuesta del analito respecto al ruido de fondo, mejorando la relación señal/ruido y facilitando la detección de las señales cromatográficas, aspecto particularmente relevante para la determinación de analitos en matrices biológicas complejas (Perucho et al., 2015). En conjunto, la concordancia de las condiciones obtenidas para pCS con las reportadas en la literatura y la proximidad de la longitud de onda de emisión seleccionada para IS con los valores descritos en otros métodos HPLC-FLD respaldan las condiciones de detección establecidas experimentalmente para el desarrollo posterior del método.

7.2. Implementación de un sistema cromatográfico por HPLC-FLD para la determinación simultánea de pCS e IS.

La implementación del sistema cromatográfico para la determinación simultánea de pCS e IS se realizó tomando como referencia las condiciones cromatográficas reportadas en la literatura para el análisis de estas toxinas urémicas mediante HPLC-FLD.

Los métodos reportados para el análisis de los compuestos diana, presentan diferentes condiciones de separación, aunque generalmente emplean columnas de fase reversa y fases móviles constituidas por una fase acuosa, en combinación con modificadores orgánicos como metanol o acetonitrilo. De Loor et al. (2009), por ejemplo, emplearon una fase móvil basada en ácido trifluoroacético 0.2 % como fase A y acetonitrilo como fase B en proporción 92:8 para la determinación simultánea de IS y pCS en condiciones isocráticas. Por su parte, Pretorius et al. (2013) utilizaron formiato de amonio 50 mmol/L (pH 5.0) como fase A y acetonitrilo como fase B, mediante un gradiente que inició en una proporción 95:5 y cambio en 2.1 min a 75:25. Al Za'abi et al. (2013) emplearon una solución amortiguadora de acetato de sodio (pH 4.5) como fase A y acetonitrilo como fase B en proporción 10:90, bajo condiciones isocráticas. Estas diferencias muestran que la composición de la fase acuosa y la proporción del modificador orgánico varían entre los métodos empleados para la separación cromatográfica de estas toxinas urémicas.

Considerando estos antecedentes, se seleccionó como fase móvil una solución acuosa de ácido fórmico al 0.15 % y metanol. El ácido fórmico se incorporó para establecer condiciones ácidas y reproducibles de la fase móvil durante la separación cromatográfica. Debido al carácter fuertemente ácido de los grupos sulfato presentes en IS y pCS, no se espera que la acidificación empleada modifique sustancialmente su estado de ionización. Sin embargo, el pH de la fase móvil puede modificar las interacciones entre los analitos y la fase estacionaria y, por lo tanto, influir en su retención y selectividad

cromatográfica (Ganesh et al., 2023). Adicionalmente, el empleo de una fase acuosa acidificada permitió mantener una composición sencilla de la fase móvil y evitar inicialmente el uso de soluciones amortiguadoras constituidas por sales. En estas últimas, debe considerarse la solubilidad de las sales al aumentar la proporción de disolvente orgánico, debido al riesgo de precipitación en el sistema cromatográfico (Stoll, 2024). El metanol se seleccionó como modificador orgánico debido a la experiencia previa del grupo de trabajo con este disolvente y a su adecuado desempeño en el sistema cromatográfico utilizado.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Atlantis T3, una fase reversa C18 diseñada específicamente para favorecer la retención de compuestos polares, los cuales generalmente presentan una baja retención en fases C18 convencionales. Su tecnología de enlace C18 trifuncional, menor densidad de ligando y proceso de endcapping favorecen la retención de analitos polares y su compatibilidad con fases móviles altamente acuosas (Alden et al., 2006). Estas características hicieron de la fase T3 una alternativa adecuada para el desarrollo del método, debido a la naturaleza aromática y polar del pCS e IS, con valores de log P de 1.23 y 1.29, respectivamente (Drug Bank, 2022), los cuales reflejan una polaridad relativamente similar entre ambos analitos y a la necesidad de obtener una retención suficiente que permitiera separar sus señales tanto entre sí como de los componentes de la matriz que pudieran eluir próximos al tiempo muerto. Asimismo, el empleo de una fase estacionaria C18 es consistente con diferentes procedimientos reportados en la literatura para la separación cromatográfica de IS y pCS, en los cuales se ha utilizado ampliamente la cromatografía de fase reversa (Al-Dajani et al., 2024); las características particulares de la fase T3 proporcionaron una alternativa para conseguir una retención adecuada de ambos analitos bajo las condiciones desarrolladas.

Se evaluaron diferentes proporciones de ácido fórmico al 0.15 % y metanol. Inicialmente se empleó una proporción 70:30, con la cual fue posible obtener la separación de ambos analitos. Bajo estas condiciones, el IS presentó un tiempo de retención de 7.463 min, mientras que pCS eluyó a 12.356 min. Los cromatogramas obtenidos mostraron

señales diferenciadas para ambos analitos, sin observarse solapamiento entre sus picos; posteriormente, la proporción de metanol se incrementó hasta establecer una composición 65:35. El aumento del contenido de modificador orgánico disminuyó la retención de ambos analitos. Bajo estas condiciones, el IS y pCS presentaron tiempos de retención de 6.194 y 9.637 min, respectivamente, inferiores a los obtenidos con la proporción 70:30, permitiendo reducir el tiempo total de análisis de 15 min a 10 min. Asimismo, se obtuvo una resolución (R_s) de 2.46 entre IS y pCS, valor superior al criterio de $R_s \geq 1.5$ establecido para considerar una separación cromatográfica a línea base, lo que confirmó una adecuada separación entre las señales de ambos analitos (European Pharmacopoeia, 2025). Este comportamiento es consistente con el mecanismo de separación en cromatografía de fase reversa, en el cual la proporción de modificador orgánico en la fase móvil constituye una variable que influye en la retención de los analitos; en términos generales, el incremento de su proporción favorece una disminución de la retención (Ganesh et al., 2023). Por lo tanto, la composición 65:35 representó un equilibrio entre la resolución de los analitos y la duración del análisis.

La temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C durante la implementación del método. El control de la temperatura constituye un factor importante para mantener condiciones reproducibles durante la separación cromatográfica, debido a su influencia sobre la retención, selectividad y eficiencia (Dolan, 2002). Asimismo, el incremento de la temperatura disminuye la viscosidad de la fase móvil y, consecuentemente, la contrapresión del sistema, además de favorecer la difusión de los analitos y los procesos de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria (Guillarme et al., 2004). Sin embargo, debido a que la temperatura de la columna puede modificar tanto la retención como la selectividad cromatográfica de los analitos, esta variable se mantuvo constante a 45 °C durante la elección de la composición de la fase móvil. El empleo de 45 °C es además comparable con las condiciones utilizadas por Pretorius et al. (2013) para la determinación simultánea de IS y pCS mediante UPLC-FLD.

El flujo de la fase móvil se estableció en 0.15 mL/min, valor seleccionado con el propósito de mantener una adecuada separación cromatográfica y una presión de operación compatible con las características de la columna y el sistema cromatográfico utilizado. En cromatografía líquida, el flujo de la fase móvil influye en el tiempo de análisis y en la eficiencia cromatográfica, debido a su efecto sobre los fenómenos de difusión longitudinal y transferencia de masa. A velocidades bajas de la fase móvil aumenta la contribución de la difusión longitudinal al ensanchamiento de las bandas, mientras que a velocidades elevadas adquiere mayor importancia la resistencia a la transferencia de masa entre las fases móvil y estacionaria (Desmet et al., 2022). De acuerdo con la relación descrita por la ecuación de van Deemter, existe una velocidad lineal óptima en la que se minimiza la altura equivalente a un plato teórico; a velocidades elevadas puede incrementarse el ensanchamiento de banda asociado a las limitaciones de transferencia de masa, mientras que velocidades bajas aumentan el tiempo de análisis y favorecen la contribución de la difusión longitudinal (Gritti & Guiochon, 2013). Bajo las condiciones evaluadas, el flujo de 0.15 mL/min permitió obtener una separación adecuada de IS y pCS, manteniendo una resolución satisfactoria y un consumo reducido de fase móvil. Además, el empleo de un flujo relativamente bajo contribuyó a disminuir el consumo de reactivos de los componentes de la fase móvil por análisis, lo que representa una ventaja en términos de costo y generación de residuos frente a métodos que emplean flujos mayores.

El volumen de inyección se estableció en 5 μ L, considerando las características del procedimiento de preparación de muestra empleado posteriormente. La precipitación proteica con disolventes orgánicos puede producir una dilución de la muestra y, consecuentemente, disminuir la concentración de los analitos en el sobrenadante destinado al análisis cromatográfico (Bravo-Veyrat & Hopfgartner, 2022). En el procedimiento desarrollado en este trabajo, la proporción de muestra y acetonitrilo utilizada produjo una dilución de cuatro veces respecto a la concentración inicial de los analitos. Por esta razón, se seleccionó un volumen de inyección de 5 μ L con el propósito de obtener una respuesta cromatográfica adecuada después del tratamiento de las muestras y evitar una pérdida

importante de sensibilidad asociada con dicha dilución. Este volumen permitió mantener una respuesta suficiente para ambos analitos sin comprometer las características cromatográficas de los picos bajo las condiciones establecidas.

En la Tabla V, se muestran las condiciones seleccionadas para el análisis de pCS e IS, bajo estas condiciones se obtuvo la mejor resolución entre los analitos, además de tiempos de retención suficientemente alejados del tiempo muerto. Esta última característica resultó particularmente importante considerando la posterior aplicación del método a muestras de suero, ya que una mayor separación respecto a la región inicial del cromatograma disminuye la probabilidad de interferencias ocasionadas por componentes de la matriz con escasa retención.

En conjunto, las condiciones seleccionadas proporcionaron un equilibrio adecuado entre resolución, sensibilidad y tiempo de análisis, además de un menor consumo de disolventes por el bajo flujo de trabajo, disminuyendo costos y generación de residuos, por lo que fueron establecidas como las condiciones finales para la posterior validación del sistema cromatográfico.

7.3. Validación del sistema cromatográfico implementado para la determinación simultánea de pCS e IS.

La Tabla VI muestra los resultados de la validación del sistema cromatográfico. El intervalo lineal se estableció de 0.1 a 50 mg/L para IS y de 1 a 50 mg/L para pCS. La selección de diferentes límites inferiores se realizó considerando la distinta sensibilidad de detección observada experimentalmente para ambos analitos. El IS presentó una respuesta de fluorescencia de mayor intensidad que permitió incluir concentraciones más bajas dentro de su intervalo de calibración, estableciéndose 0.1 mg/L como límite inferior. Por su parte, debido a la menor respuesta de fluorescencia observada para pCS, se estableció 1 mg/L como límite inferior del intervalo evaluado para la linealidad. Para ambos analitos se utilizó 50 mg/L como límite superior del intervalo evaluado.

La linealidad se evaluó mediante inspección visual de las curvas de calibración y análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados, considerando el coeficiente de determinación (R^2), la pendiente y la ordenada al origen, de acuerdo con las recomendaciones de la guía ICH Q2 (R2). Para el presente estudio se estableció como criterio de aceptación un valor de $R^2 \geq 0.99$ corresponde a una curva de calibración lineal. De manera complementaria, se evaluó la constancia de los factores de respuesta obtenidos de la respuesta de cada uno de los niveles de concentración de la curva de calibración mediante el cálculo de % DER, considerando como criterio de aceptación de linealidad un valor $\leq 15\%$, de acuerdo con U.S. EPA (2010). En cuanto a la inspección visual, se observó una tendencia lineal para la curva del pCS y para el IS. El coeficiente de determinación fue mayor a 0.99 para ambos analitos, por lo tanto, la curva de calibración es lineal. Por último, los % DER de los factores de respuesta obtenidos en cada nivel fueron menores al 15%, lo cual significa que existe relación lineal entre la concentración y la respuesta. Debido a los resultados anteriores, se considera que el sistema cromatográfico es lineal para ambos analitos en el rango de concentraciones propuesto.

La precisión fue evaluada como el % DER de los factores de respuesta de las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración y de los t_R para ambos analitos. Para esto se tomaron en cuenta los criterios de aceptación para la validación de un método analítico establecidos en la AOAC, siendo el % DER menor de un 5.3% (AOAC, 1995). Como puede verse en la tabla VI, los valores de % DER encontrados para el IS fueron de 0.45 - 4.28 % y para el de pCS 0.31 - 2.45 %. En el caso del % DER de los t_R encontrados para el IS fue de 0.34 % y 0.75 % para el pCS. En todos los casos se encontró un porcentaje menor al 5.3%, por lo que se cumple con el criterio de aceptación, lo cual indica que el sistema cromatográfico es preciso.

La exactitud del sistema cromatográfico se evaluó mediante la concordancia entre las concentraciones calculadas y las concentraciones nominales de los estándares de calibración. Para cada analito, se realizó un análisis de regresión lineal de la concentración calculada en función de la concentración nominal, a partir del cual se obtuvo la ecuación de regresión correspondiente y se determinaron la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2). Como criterios de aceptación se consideraron una pendiente igual o lo más cercana a 1 y un $R^2 \geq 0.99$ (Burke, 2001; Swartz & Krull, 2015). Para IS se obtuvo una pendiente de 0.9994 y un R^2 de 0.9994, mientras que para pCS se obtuvo una pendiente de 0.9945 y un R^2 de 0.9945. En ambos analitos, la pendiente fue cercana a 1 y el R^2 cumplió con el criterio establecido, indicando una adecuada concordancia entre las concentraciones nominales y las calculadas.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOC) se determinaron mediante la relación señal/ruido (S/N), considerando como criterios relaciones S/N de aproximadamente 3 y 10, respectivamente. A partir de estos criterios se establecieron las concentraciones correspondientes a cada límite, expresadas en mg/L. Para IS se obtuvo un LOD de 0.04 mg/L y un LOC de 0.13 mg/L, mientras que para pCS se obtuvieron valores de 0.33 mg/L y 0.98 mg/L, respectivamente.

7.4. Selección el agente precipitante para la determinación de pCS e IS en suero.

La precipitación proteica constituye una etapa crítica en la preparación de muestras para la determinación de IS y pCS debido a la elevada afinidad de ambos analitos por la albúmina sérica humana; por ello, la selección del precipitante debe considerar no solo la eliminación proteica, sino también la recuperación de los analitos y la compatibilidad del sobrenadante con el sistema cromatográfico (Viaene et al., 2013).

De Loor et al. (2009) demostraron que la liberación de IS y pCS de su unión a albúmina es un aspecto determinante para su cuantificación total en suero, mientras que otros métodos han mostrado que la precipitación con disolventes orgánicos puede proporcionar recuperaciones adecuadas para estas toxinas. Pretorius et al. (2013) emplearon precipitación proteica con etanol y obtuvieron recuperaciones de 98.4 - 101.6 % para IS y de 99.8 - 102.3 % para pCS. Por su parte, Al Za'abi et al. (2013) utilizaron acetonitrilo para la precipitación de proteínas en muestras de plasma destinadas a la determinación de IS y reportaron una recuperación de extracción superior al 89 %. Asimismo, Silva et al. (2023) emplearon etanol en un procedimiento de desproteinización asistido por salting-out para la determinación de toxinas urémicas en plasma, con valores de recuperación comprendidos entre 93.5 y 112 %. Estos antecedentes muestran el uso de los disolventes orgánicos como agentes precipitantes en la preparación de muestras para la determinación de toxinas urémicas.

En la Figura 11, se muestra una gráfica en donde se comparan resultados de la precipitación proteica utilizando diferentes agentes precipitantes, tales como el acetonitrilo, metanol y la mezcla de acetonitrilo/metanol (1:1). En esta figura se puede ver que, aunque en el análisis de varianza de un factor no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las áreas cromatográficas obtenidas con los tres tratamientos, el acetonitrilo produjo la mayor respuesta para ambos analitos y los cromatogramas obtenidos bajo esta condición mostraron una línea base visualmente más limpia. Este

comportamiento concuerda con la elevada capacidad del acetonitrilo para provocar la precipitación de proteínas plasmáticas. La adición de acetonitrilo modifica las interacciones hidrofóbicas y la hidratación de los grupos presentes en la superficie proteica, promoviendo cambios conformacionales que disminuyen la solubilidad de las proteínas (Gekko et al., 1998). Asimismo, el tipo de disolvente orgánico puede influir en las características físicas del precipitado proteico. Se ha observado que el acetonitrilo favorece la formación de un precipitado con mayor tendencia a formar un pellet y menor viscosidad que el obtenido con metanol, lo que puede facilitar la separación del sobrenadante después de la precipitación (Rice & Belani, 2024) Este comportamiento concuerda con lo reportado por Polson et al. (2003), quienes compararon diferentes agentes precipitantes en plasma y encontraron al acetonitrilo entre los agentes con mayor eficiencia de eliminación proteica.

Al realizar una inspección visual de los sobrenadantes recuperados bajo las tres condiciones evaluadas (Figura 15), se pudo ver que el sobrenadante obtenido con el acetonitrilo fue el visualmente más claro, en comparación con el metanol y la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1). La mayor claridad del sobrenadante obtenido con acetonitrilo puede interpretarse como una evidencia cualitativa de una mayor eliminación de componentes precipitados de la matriz y no como una medición directa de la cantidad de proteína removida (Polson et al., 2003). Sin embargo, esta observación adquiere relevancia cuando se considera junto con la menor presencia de interferencias cromatográficas y la mayor señal obtenida para los analitos.

Por lo tanto, aunque las diferencias entre las áreas cromatográficas obtenidas con los agentes precipitantes no fueron estadísticamente significativas, la mayor respuesta de IS y pCS, la menor interferencia cromatográfica y la claridad del sobrenadante respaldaron la selección del acetonitrilo como agente precipitante para el tratamiento de las muestras. El empleo de un tratamiento sencillo basado en precipitación proteica reduce el número de etapas de manipulación en comparación con procedimientos que incorporan etapas adicionales de tratamiento de muestra. Esto representa una ventaja práctica al simplificar

la preparación previa al análisis cromatográfico, ya que disminuye el tiempo de preparación y el número de operaciones que pueden generar error o variabilidad al análisis (Fernandes et al., 2023),

7.5. Evaluación el desempeño del método.

La preparación de los estándares directamente en el *pool* de suero de sujetos sanos y la corrección de la respuesta basal constituyen además una fortaleza del diseño del método. La preparación de la curva de calibración en matriz permite que los estándares experimenten condiciones de tratamiento de muestra y efectos de matriz semejantes a los de las muestras reales. La denominada estrategia de substracción del fondo (*background subtraction*), la cual se llevó a cabo durante todo el proceso de validación, es una de las alternativas descritas para cuantificar analitos endógenos cuando no se dispone de una matriz completamente libre del compuesto (Wang et al., 2016). Silva et al. (2023) aplicaron precisamente una estrategia de calibración en plasma con sustracción del fondo para la cuantificación de toxinas urémicas mediante HPLC-FLD de igual forma que se desarrolló en este trabajo.

7.5.1. Selectividad.

En cuanto a la selectividad, los resultados obtenidos demostraron que el método fue capaz de distinguir las señales correspondientes al IS y pCS en una matriz biológica compleja. Esta evaluación es particularmente importante porque ambos analitos son compuestos endógenos, por lo que un *pool* de suero de sujetos sanos no constituye un blanco analítico verdadero. La cuantificación de sustancias endógenas presenta una dificultad adicional debido a la imposibilidad de obtener una matriz biológica idéntica completamente libre del analito; por esta razón, estrategias como la sustracción de la respuesta basal, el fortificado de la matriz y la comparación de perfiles cromatográficos constituyen enfoques ampliamente utilizados para abordar este tipo de analitos (Wakamatsu et al., 2018).

En el *pool* de suero sin fortificar se observaron señales correspondientes a IS y pCS, sin detectarse interferencias cromatográficas atribuibles a componentes endógenos de la matriz en sus respectivos tiempos de retención (t_R), como se muestra en la Figura 16. La presencia de ambos analitos en el suero sin fortificar es esperada, debido a que se originan a partir del metabolismo de compuestos producidos por la microbiota intestinal y pueden encontrarse en circulación en individuos sanos, aunque en concentraciones inferiores a las observadas en pacientes con deterioro de la función renal. Pretorius et al. (2013) establecieron en individuos sanos intervalos de referencia séricos de 0.15 - 1.34 mg/L para IS total y de 0 - 7.23 mg/L para pCS total. En este estudio, en un *pool* de suero de sujetos sanos, se determinaron concentraciones de 2.01 ± 0.09 mg/L para IS y 4.10 ± 0.23 mg/L para pCS. Asimismo, se observó que las concentraciones séricas de ambos compuestos aumentan conforme disminuye la función renal, como se muestra en la Tabla II. Por lo tanto, las señales observadas en el *pool* de suero sin fortificar pueden atribuirse a las concentraciones basales de IS y pCS presentes de manera endógena en la matriz y no a interferencias cromatográficas.

La selectividad se evaluó en muestras de suero fortificadas a 3, 30 y 60 mg/L sometidas al proceso de precipitación, estas muestras de suero fortificadas corresponden a los niveles bajo, medio y alto establecidos para la validación del método. La evaluación de tres niveles de concentración permitió verificar que la identificación de IS y pCS no se viera comprometida por componentes endógenos de la matriz a diferentes concentraciones de los analitos, particularmente en el nivel bajo, donde una posible interferencia podría representar una mayor proporción de la respuesta analítica. Como puede verse en las Figuras 17, 18 y 19, en los tres niveles evaluados, la señal de los picos correspondientes a IS y pCS aumentó conforme se incrementó la concentración adicionada, sin observarse desplazamientos apreciables en los t_R ni cambios importantes en la forma de los picos. Asimismo, no se detectaron señales atribuibles a componentes de la matriz que coeluyeran con los analitos en sus respectivos t_R , lo que proporcionó evidencia de la selectividad del método dentro de las condiciones evaluadas.

Por otra parte, se compararon los cromatogramas obtenidos mediante los detectores de FLD y DAD y los espectros de UV obtenidos con el detector DAD. La comparación se realizó de la muestra de suero fortificada a 60 mg/L contra la muestra de un paciente con ERC. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 21 y 22, se observa coincidencia en los tiempos de retención mediante los dos sistemas de detección probados y la similitud de los perfiles espectrales UV obtenidos con el detector DAD se observa en la figura 23, esta información proporciona evidencia adicional de la identidad del pCS e IS, ya que la identificación no se sustentó exclusivamente en la posición del pico cromatográfico. Este enfoque es concordante con la guía de validación de la ICH Q2(R2), que contempla la comparación de espectros como herramienta complementaria para descartar interferencias en procedimientos cromatográficos (ICH, 2023).

En conjunto, la ausencia de coeluciones relevantes, la reproducibilidad de los tiempos de retención, la respuesta de las muestras fortificadas y la concordancia de los espectros UV sustentan que el método presenta una selectividad adecuada para la determinación simultánea de IS y pCS en suero.

7.5.2. Linealidad.

La linealidad se evaluó mediante la inspección visual de una curva de calibración en matriz (*pool* de suero de sujetos sanos) y posterior precipitación con acetonitrilo en un intervalo de trabajo de 1 a 75 mg/L. En todos los casos se observó la tendencia lineal en ambas curvas de calibración, tal como puede verse en la Figura 24. Como se evidencia en la Tabla VIII, en todos los casos, se obtuvieron valores de R^2 mayores a 0.99 para ambos analitos, por lo que el método cumple con los criterios de aceptación de R^2 , por lo tanto, se considera lineal. Estos valores muestran una elevada asociación entre la concentración adicionada y la respuesta cromatográfica dentro del intervalo evaluado. El modelo de calibración debe evaluarse a lo largo del intervalo reportable, considerando la relación

entre la concentración y la respuesta mediante los parámetros de regresión y el análisis de las desviaciones respecto al modelo seleccionado (ICH, 2023).

La evaluación del coeficiente de determinación se complementó con el análisis del % DER de los factores de respuesta, obteniéndose valores de 11.76 % para IS y 5.94 % para pCS, ambos inferiores al criterio de aceptación del 15 % establecido para evaluar la constancia del factor de respuesta (U.S. EPA, 2010). El IS, a pesar de presentar una respuesta de fluorescencia considerablemente mayor que el pCS, mostró una mayor variabilidad de sus factores de respuesta. Este comportamiento indica que, en el caso de estos analitos, una mayor intensidad de señal no necesariamente se relaciona con una mayor constancia de la respuesta analítica a lo largo del intervalo de concentración. Por lo tanto, el % DER obtenido para IS sugiere una mayor variación de esta relación entre los diferentes niveles de la curva de calibración en comparación con pCS. No obstante, esta variabilidad permaneció por debajo del criterio de aceptación del 15 %, por lo que la respuesta se consideró suficientemente constante dentro del intervalo evaluado.

En conjunto, los coeficientes de determinación obtenidos y la variabilidad de los factores de respuesta respaldaron el comportamiento lineal de ambos analitos dentro del intervalo de concentración estudiado.

7.5.3. Exactitud y precisión.

La evaluación de la exactitud y precisión se llevó a cabo mediante el análisis de muestras del *pool* de sueros de sujetos sanos adicionadas a un nivel bajo (3 mg/L), medio (30 mg/L) y alto (60 mg/L) por triplicado.

En cuanto a la exactitud, las recuperaciones obtenidas para IS fueron de 113.61, 95.54 y 99.36 % en los niveles de 3, 30 y 60 mg/L, respectivamente, mientras que para pCS fueron de 109.43, 101.31 y 93.24 %. Como puede verse en la Tabla IX y X, todos los valores se encontraron dentro del intervalo de 85 - 115 % establecido como criterio de aceptación para la exactitud, lo que indica una adecuada concordancia entre las concentraciones adicionadas y las determinadas experimentalmente. En ambos analitos, la mayor diferencia respecto al valor nominal se presentó en el nivel de 3 mg/L, con recuperaciones superiores al 100 %, particularmente para IS (113.61 %). Este comportamiento es consistente con la mayor variabilidad relativa que puede presentarse en concentraciones próximas al límite inferior de cuantificación; de hecho, las guías de validación bioanalítica contemplan criterios de aceptación más amplios para la exactitud y precisión en el límite inferior de cuantificación que para los demás niveles del intervalo analítico (ICH, 2022). En los niveles de 30 y 60 mg/L, las recuperaciones fueron más cercanas al valor nominal, confirmando un desempeño adecuado de la exactitud del método en los tres niveles de concentración evaluados.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para IS y pCS son comparables con los reportados en la literatura. Como ya se había comentado en la sección 7.4., Pretorius et al. (2013) emplearon precipitación proteica con etanol y obtuvieron recuperaciones de 98.4 - 101.6 % para IS y de 99.8 - 102.3 % para pCS. Por su parte, Al Za'abi et al. (2013) utilizaron acetonitrilo para la precipitación de proteínas en muestras de plasma destinadas a la determinación de IS y reportaron una recuperación de extracción superior al 89 %. Asimismo, Silva et al. (2023) emplearon etanol en un procedimiento de desproteinización asistido por salting-out para la determinación de toxinas urémicas en plasma, con valores de recuperación comprendidos entre 93.5 y 112 %. En comparación con estos estudios, las recuperaciones obtenidas en el presente trabajo (95.54 - 113.61 % para IS y 93.24 - 109.43 % para pCS) abarcaron un intervalo ligeramente más amplio, principalmente por las recuperaciones observadas en el nivel bajo de concentración. Por tanto, el intervalo de recuperación obtenido se encuentra dentro del desempeño observado en métodos previamente validados para estas toxinas.

Respecto a la precisión, los valores de %DER de las concentraciones obtenidas tanto en los ensayos intradía (el mismo día) como interdía (tres días consecutivos distintos) fueron inferiores al criterio de aceptación de 15 % establecido para la precisión de métodos bioanalíticos (ICH, 2022).

En los ensayos intradía se observó una adecuada precisión para ambos analitos. Para IS, el % DER de las concentraciones determinadas varió entre 0.47 y 1.19 %, mientras que para pCS se encontró entre 0.43 y 1.35 %. Asimismo, los t_R presentaron valores de % DER inferiores a 0.6 %, indicando una adecuada repetibilidad de la retención cromatográfica durante los ensayos intradía. En conjunto, los bajos valores de % DER obtenidos para las concentraciones determinadas y los t_R indican una adecuada repetibilidad del método bajo las mismas condiciones analíticas.

La precisión interdía presentó una variación ligeramente mayor que la observada en los ensayos intradía, lo cual puede atribuirse a que la evaluación en diferentes días incorpora fuentes adicionales de variación relacionadas con la preparación de las muestras y las condiciones instrumentales (ICH, 2023). Para IS, el % DER de las concentraciones determinadas se encontró entre 1.80 y 5.30 %, mientras que para pCS varió entre 1.39 y 3.63 %. Los t_R presentaron valores máximos de % DER de 0.65 % para IS y 1.42 % para pCS, indicando una adecuada precisión intermedia del comportamiento cromatográfico. Estos resultados son comparables o incluso menores que los reportados para métodos previos que emplearon diferentes procedimientos de preparación de muestra. De Loor et al. (2009), quienes utilizaron precipitación con acetona y octanoato de sodio como agente competidor para desplazar IS y pCS de su unión a la albúmina para la preparación de muestras de suero, reportaron valores de % DER intra e interdía inferiores al 6 %. Por su parte, Al Za'abi et al. (2013) emplearon precipitación proteica con acetonitrilo para la preparación de muestras de plasma y obtuvieron valores de precisión intra e interdía inferiores al 10.1 %. Asimismo, Silva et al. (2023) utilizaron una desproteínización de plasma con etanol asistida por salting-out mediante la adición de NaCl y reportaron valores de % DER ≤ 14.3 %.

La combinación de recuperaciones próximas al 100 % y bajos valores de % DER indica que el método presenta un desempeño reproducible y con bajo sesgo dentro de los niveles evaluados.

7.5.4. Estabilidad.

Se realizaron pruebas de estabilidad de los analitos en matriz bajo condiciones de laboratorio (25 °C durante 8 horas) evaluadas en tres días distintos y por triplicado, así como bajo condiciones de congelación/descongelación, mediante tres ciclos realizados a cada 24 horas a - 20 °C por triplicado.

Los cromatogramas obtenidos bajo estos estudios no mostraron diferencia en las señales de ambos analitos a simple vista durante los 3 días evaluados, además, no aparecieron señales adicionales en los cromatogramas.

Como se muestra en la Figura 25, no se aprecian diferencias en las concentraciones obtenidas de los analitos en las muestras de suero de pacientes con ERC sometidas a los distintos tratamientos durante los diferentes días evaluados respecto a su concentración inicial, se realizó un análisis de varianza de un factor al comparar la concentración inicial con la obtenida después de los distintos tratamientos. Como puede verse en la Tabla XI y XII, en ambas condiciones, los valores de F calculada fueron inferiores a F crítica tanto para las concentraciones como para los tiempos de retención, lo que indica que las concentraciones determinadas de IS y pCS no presentaron variaciones estadísticamente significativas después de la permanencia de las muestras de suero a temperatura ambiente durante 8 horas ni después de ciclos de congelación/descongelación realizados cada 24 horas.

No se observaron cambios significativos en los tiempos de retención de IS y pCS bajo las condiciones evaluadas. Asimismo, las concentraciones determinadas permanecieron sin diferencias estadísticamente significativas respecto a las condiciones iniciales, lo que indica que la permanencia de las muestras a 25 °C durante 8 horas y los tres ciclos de congelación/descongelación a - 20 °C no afectaron significativamente la cuantificación de los analitos. Estos resultados sustentan la estabilidad de IS y pCS en las muestras de suero bajo las condiciones específicas de manipulación y almacenamiento evaluadas (ICH, 2022).

7.5.5. Límites de detección y cuantificación.

Mediante el criterio de relación señal/ruido (S/N), se establecieron como LOD las concentraciones correspondientes a una relación S/N de aproximadamente 3 y como LOC aquellas correspondientes a una relación S/N de aproximadamente 10. Para IS, las concentraciones correspondientes al LOD y LOC fueron de 0.07 mg/L y 0.25 mg/L, respectivamente, mientras que para pCS fueron de 0.09 mg/L y 0.29 mg/L. La proximidad entre los valores obtenidos para ambos analitos indica que, bajo las condiciones analíticas establecidas, fue posible detectar y cuantificar IS y pCS a concentraciones similares.

En comparación con la literatura, De Loor et al. (2009) reportaron un LOC de 0.68 mg/L para IS y 0.60 mg/L para pCS, mientras que Al Za'abi et al. (2013) obtuvieron un LOC de 0.43 mg/L para IS. En el presente trabajo, el LOC obtenido para IS (0.13 mg/L) fue inferior a los valores reportados por estos autores, mientras que para pCS el LOC obtenido (0.98 mg/L) fue superior al informado por De Loor et al. (2009). Por otra parte, Pretorius et al. (2013) alcanzaron límites de detección inferiores mediante UPLC-FLD, y Silva et al. (2023) reportaron un LOC de 2.00 mg/L para pCS y ≤ 0.20 mg/L para la mayoría de los demás analitos incluidos en su método. Estas diferencias evidencian que el desempeño en términos de límites de detección y cuantificación depende tanto del

analito como de las condiciones analíticas empleadas. En conjunto, los valores obtenidos en el presente trabajo permitieron la detección y cuantificación de IS y pCS a concentraciones compatibles con el intervalo de trabajo establecido para el método.

7.6. Aplicabilidad del método.

La aplicación del método propuesto al análisis de 79 muestras de 47 pacientes con ERC estadio 5 bajo tratamiento con diálisis peritoneal demostró un desempeño adecuado. El perfil cromatográfico obtenido del análisis de la Muestra M2P30, mostrado en la Figura 26 presenta señales claramente identificables de IS y pCS en sus respectivos tiempos de retención, lo que constituye una evidencia práctica de la aplicabilidad del método. En la Tabla XIV, se resumen los resultados encontrados y las diferencias en las concentraciones se pueden deber a las condiciones intrínsecas de cada paciente.

Las concentraciones observadas presentaron una elevada variabilidad interindividual. Esta dispersión es esperable porque las concentraciones de estas toxinas no dependen únicamente de la modalidad o duración de la diálisis; también están influenciadas por la función renal residual, la producción intestinal, la dieta, la unión a albúmina y el aclaramiento tubular residual. Estudios realizados en pacientes en diálisis peritoneal han mostrado que la función renal residual constituye uno de los principales determinantes de las concentraciones séricas de estas toxinas (Viaene et al. 2014).

De hecho, la literatura muestra que el comportamiento puede ser más complejo. Viaene et al. (2014) monitorearon pacientes desde el inicio de la diálisis peritoneal y encontraron que las concentraciones séricas de IS y pCS aumentaron con el tiempo en paralelo con la pérdida de función renal residual, aun cuando el aclaramiento peritoneal tendió a aumentar. Los autores concluyeron que la diálisis peritoneal no compensó completamente la pérdida del aclaramiento renal. Esto es congruente con la fuerte unión de IS y pCS a albúmina, que limita su remoción mediante técnicas dialíticas convencionales. Meijers et al. (2011) demostraron que ambas toxinas presentan una eliminación dialítica limitada precisamente por su unión proteica, y Xie et al. observaron que, dentro de pacientes en diálisis peritoneal, una mejor función renal residual se asociaba con concentraciones menores de IS.

La aplicación del método validado en muestras de suero de pacientes con ERC permitió demostrar su utilidad para la determinación cuantitativa de IS y pCS en muestras clínicas reales. La obtención de concentraciones cuantificables de ambos analitos en la población estudiada confirmó que el procedimiento analítico puede utilizarse para generar información sobre los niveles séricos de estas toxinas urémicas en pacientes con ERC. Estos resultados adquieren relevancia debido a que pueden servir como base analítica para estudios posteriores orientados a correlacionar las concentraciones de IS y pCS con diferentes variables clínicas, como el tipo, duración y efectividad del tratamiento, las características de la diálisis peritoneal y otros parámetros incluidos en distintos protocolos de investigación. De esta manera, la principal aportación de esta etapa del estudio radica en demostrar la aplicabilidad del método en muestras clínicas y en su potencial como herramienta analítica para futuras investigaciones relacionadas con estas toxinas urémicas.

7.7. Comparación de método propuesto con algunos reportados en la literatura.

Con el propósito de contextualizar el desempeño analítico del método propuesto, en la Tabla XV, se presenta una serie de métodos reportados previamente en la literatura para la determinación de toxinas urémicas mediante HPLC-FLD y su comparación con el método propuesto en este trabajo. En términos generales, el método propuesto presentó un desempeño comparable con los procedimientos descritos en la literatura, particularmente en cuanto a recuperación y sensibilidad, aunque se observaron diferencias importantes relacionadas con la preparación de la muestra, el número de analitos determinados, el consumo de fase móvil y el tiempo total de análisis.

Una de las principales ventajas del método propuesto corresponde a la simplicidad del tratamiento de la muestra, el cual se basa en una precipitación proteica con acetonitrilo previa al análisis cromatográfico. Este aspecto resulta relevante considerando que la unión de IS y pCS a la albúmina sérica es muy fuerte, por lo que esto constituye una de las principales dificultades para la determinación de sus concentraciones.

Algunos procedimientos descritos en la literatura han incorporado estrategias adicionales para favorecer la liberación de estas toxinas de su unión proteica. Por ejemplo, De Loor et al. (2009) utilizaron octanoato de sodio como competidor de la unión no covalente de IS y pCS a la albúmina antes de su determinación mediante HPLC-FLD. Este procedimiento permitió obtener recuperaciones de 99 - 102 % para IS y de 103 - 105 % para pCS, con valores de %DER inferiores al 6 %, lo que demostró un desempeño analítico adecuado. Sin embargo, el procedimiento requiere la incorporación de un reactivo específico y una etapa adicional durante el tratamiento de la muestra, lo que incrementa el número de operaciones, el tiempo requerido para su preparación y el tiempo total de análisis (1 hora). En contraste, el procedimiento desarrollado en este trabajo permitió obtener recuperaciones de 95.54 - 113.61 % para IS y 93.24 - 109.43 % para pCS

utilizando únicamente precipitación proteica con acetonitrilo, lo que simplifica la preparación de las muestras.

La simplificación de la preparación de muestra constituye una característica favorable para el procesamiento de muestras de rutina, debido a que disminuye el número de operaciones requeridas antes del análisis cromatográfico. En este sentido, la precipitación proteica constituye una de las estrategias más simples y rápidas para el tratamiento de matrices biológicas. No obstante, la selección del procedimiento de preparación debe considerar también la eliminación de componentes de la matriz y la recuperación de los analitos, de manera que la simplificación del tratamiento no comprometa el desempeño analítico del método (Panuwet et al., 2020). En el presente método, las recuperaciones obtenidas para ambos analitos se encontraron dentro de los criterios de aceptación establecidos durante la validación, lo que demuestra que la precipitación directa con acetonitrilo permitió simplificar la preparación de la muestra sin comprometer la recuperación de IS y pCS. El empleo de acetonitrilo como agente de precipitación proteica también ha sido reportado en la preparación de muestras biológicas para la determinación cromatográfica de IS, con recuperaciones adecuadas del analito (Al Za'abi et al., 2013).

Otra característica relevante del método desarrollado fue el empleo de un flujo de fase móvil de 0.15 mL/min, inferior a los utilizados por De Loor et al. (2009), Wu et al. (2010), Al Za'abi et al. (2013) y Silva et al. (2023), cuyos flujos fueron de 0.60, 1.00, 1.30 y 2.00 mL/min, respectivamente. Considerando únicamente el tiempo de corrida cromatográfica reportado para cada método, el consumo teórico de fase móvil fue de aproximadamente 36 mL para De Loor et al. (2009), 19 mL para Wu et al. (2010), 13 mL para Al Za'abi et al. (2013) y 66 mL para Silva et al. (2023). En comparación, el método desarrollado, con un tiempo de corrida de 10 min y un flujo de 0.15 mL/min, presentó un consumo aproximado de 1.5 mL de fase móvil por análisis. Por lo tanto, las condiciones cromatográficas establecidas permiten reducir considerablemente el consumo de fase móvil y el volumen de residuos generados durante el análisis cromatográfico.

Por otra parte, Pretorius et al. (2013) desarrollaron un método mediante UPLC-FLD para la determinación simultánea de IS y pCS, con límites de detección de 0.004 mg/L y 0.009 mg/L, respectivamente. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en el presente trabajo; sin embargo, esta diferencia no puede atribuirse únicamente al empleo de UPLC. El límite de detección depende de la relación entre la respuesta del analito y el ruido de fondo, por lo que factores como la eficiencia de detección por fluorescencia, las condiciones espectroscópicas seleccionadas, la preparación de la muestra y las características de la separación cromatográfica pueden influir en su valor. En el método de Pretorius et al. (2013) se empleó una columna HSS T3 con partículas de 1.8 μm y dimensiones reducidas. El uso de partículas de menor tamaño puede favorecer una mayor eficiencia cromatográfica y reducir la dispersión de las bandas, características que pueden contribuir a mejorar la relación señal/ruido y, en conjunto con las condiciones de detección empleadas, influir en los límites de detección alcanzados. Asimismo, las diferencias en las condiciones instrumentales y de detección pueden contribuir a explicar los menores límites de detección reportados por Pretorius et al. (2013). Sin embargo, aunque dicho método alcanzó límites de detección inferiores para ambos analitos, su procedimiento involucró un tratamiento de muestra más complejo y un mayor número de reactivos y etapas previas al análisis cromatográfico. En contraste, el método desarrollado en el presente trabajo empleó una preparación de muestra basada únicamente en la precipitación proteica con acetonitrilo, seguida de centrifugación y recuperación del sobrenadante, lo que disminuyó el número de operaciones y reactivos requeridos. Por lo tanto, aunque el método de Pretorius et al. (2013) presentó una mayor capacidad para detectar concentraciones bajas de IS y pCS, el método desarrollado en este trabajo ofrece como ventaja una preparación de muestra más sencilla, manteniendo límites de detección y cuantificación que permitieron la determinación de ambos analitos en las muestras de suero analizadas.

Estudios como el de Al Za'abi et al. (2013) desarrollaron un método HPLC-FLD con adecuada sensibilidad y reproducibilidad para IS. Aunque este procedimiento presentó un desempeño analítico satisfactorio, estuvo dirigido exclusivamente a la cuantificación

de IS. En contraste, el método desarrollado en el presente trabajo permite determinar simultáneamente IS y pCS en una misma corrida cromatográfica. La determinación simultánea representa una ventaja analítica al permitir obtener información de dos toxinas urémicas a partir de una misma preparación de muestra.

Por otra parte, Wu et al. (2010) desarrollaron un método HPLC-FLD para la determinación de IS con un tiempo de análisis de 19 min, similar a los 21 min establecidos en el presente trabajo. Sin embargo, dicho procedimiento estuvo dirigido únicamente a la determinación de IS, mientras que el método desarrollado permite cuantificar simultáneamente IS y pCS.

Estudios como el de Wu et al. (2010) emplearon una fase móvil constituida por acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético (15:85:0.2) a un flujo de 1.0 mL/min, lo que corresponde a un consumo teórico aproximado de 19 mL de fase móvil por corrida, frente a los 1.5 mL requeridos aproximadamente por el presente método. Otra desventaja del procedimiento de estos autores, es el empleo de ácido trifluoroacético (TFA), reactivo que presenta mayores consideraciones de peligrosidad y manejo, mientras que el método desarrollado utiliza ácido fórmico al 0.15 % como componente de la fase acuosa. Asimismo, reportaron un LOC de 0.5 mg/L para IS, superior al obtenido en el presente método (0.25 mg/L). En conjunto, aunque ambos procedimientos presentan tiempos de análisis similares, el método desarrollado en este trabajo permite la determinación simultánea de IS y pCS, presenta un menor LOC para IS, reduce considerablemente el consumo de fase móvil y evita el empleo de reactivos peligrosos tales como el TFA.

La comparación con métodos más recientes también muestra que la simplificación y sostenibilidad del procedimiento constituyen aspectos relevantes en el desarrollo de metodologías para toxinas urémicas. Silva et al. (2023), por ejemplo, desarrollaron un método HPLC, donde plantearon específicamente como objetivo reducir el consumo de recursos al disminuir el tiempo de corrida y mejorar la sostenibilidad del procedimiento

analítico para la determinación simultánea de IS y pCS en plasma. Sin embargo, su método operaba a un flujo de 2 mL/min, por lo que, la ventaja en términos de consumo de reactivo se vio afectada por el elevado flujo utilizado en la corrida cromatográfica. En este contexto, el bajo flujo empleado (0.15 mL/min) en el que opera el método propuesto y la utilización de una preparación de muestra basada principalmente en precipitación proteica representan características favorables desde el punto de vista del consumo de disolventes y reactivos.

En conjunto, la comparación presentada en la Tabla XV demuestra que el método propuesto presenta múltiples ventajas como que el método opera a un bajo flujo de fase móvil, la simplicidad del tratamiento de muestra y la posibilidad de determinar simultáneamente IS y pCS mediante HPLC-FLD. Estas características, respaldan su aplicabilidad para el análisis de ambas toxinas urémicas en muestras de suero.

Tabla XV. Comparación del método propuesto con otros métodos por HPLC-FLD. NR=no reportado.

Referencia	Analitos	Volumen de muestra	Preparación de muestra	Número de reactivos	Columna	Flujo (mL/min)	Fase móvil	Tiempo total de análisis	LOD (mg/L)	LOC (mg/L)	Recuperación (%)
Método propuesto	IS y pCS	200 µL	Precipitación con acetonitrilo	3	Atlantis T3 3 µm, 150 x 2.1 mm	0.15	Ácido fórmico 0.15% - metanol 65:35	21 min	IS=0.07 pCS= 0.09	IS= 0.25 pCS= 0.29	IS: 95.54 a 113.61 % pCS: 93.24 a 109.43 %
De Loor et al., (2009)	IS y pCS	200 µL	Competencia con octanoato de sodio Precipitación con acetona y extracción líquido-líquido	7	SunFire C18 (3.5 µm, 150 × 3.0 mm) con precolumna SunFire C18 (3.5 µm, 20 × 3.0 mm)	0.6	Ácido trifluoroacético 0.2 % - acetonitrilo 92:8	1 hora	IS= 0.08 pCS=0.17	IS= 0.68 pCS= 0.60	IS:99 a 102 % pCS: 103 a 105 %
Wu et al., (2010)	IS	100 µL	Precipitación con acetonitrilo	2	Spherisorb ODS-2 C18 5 µm, 250 × 4.6 mm	1	Acetonitrilo - agua - ácido trifluoroacético 15:85:0.2	19 min	NR	0.50	IS: 92.8 a 111.14 %
Al Za'abi et al., (2013)	IS	250 µL	Precipitación con acetonitrilo	4	Spherisorb ODS-2 C18 5 µm, 250 × 4.6 mm	1.3	Acetato de sodio pH 4.5 - acetonitrilo 10:90	10 min	0.04	0.43	IS: 93.4 a 102.5 %
Pretorius et al., (2013)	IS y pCS	100 µL	Precipitación con etanol y extracción líquido-líquido	6	Acquity HSS T3 1.8 µm, 50 × 2.1 mm con precolumna Acquity BEH C18 (1.7 µm, 5 × 2.1 mm)	NR	Formiato de amonio pH 5 - acetonitrilo 95:5, luego 75:25	37 min	IS= 0.004 pCS=0.009	IS= 0.21 pCS=0.19	IS:98.4 a 101.6 % pCS: 99.8 a 102.3 %
Silva et al., (2023)	pCS e IS	50 µL	Precipitación con etanol asistida con salting out	6	Hypersil BDS C18 100 × 4.6 mm	2	Fosfato de sodio pH 5 con TBAI - acetonitrilo 80:20	33 min	NR	IS= 0.20 pCS=2.00	93.5 a 112 %

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES.

Se implementó y validó un método para el análisis simultáneo de las toxinas urémicas pCs e IS en suero humano mediante precipitación de proteínas con acetonitrilo y posterior análisis por HPLC-FLD. El método hace uso de 200 μ L muestra y un tiempo de corrida cromatográfica de 15 min. Se logró un análisis rápido sin comprometer la separación eficiente de los analitos diana y las posibles interferencias de la matriz.

El método propuesto resultó ser selectivo y lineal. El método fue preciso, ya que presentó %DER menores al 5.301 % y resultó ser exacto, ya que se obtuvieron recuperaciones en un rango de 93.24 - 113.61 %. El método presentó límites de detección y cuantificación de 0.09 y 0.29 mg/L para pCS, y de 0.07 y 0.25 mg/L para IS, respectivamente. Asimismo, el método mostró un desempeño comparable al de procedimientos previamente reportados en la literatura, con ventajas asociadas a la

simplicidad del tratamiento de muestra, el menor consumo de reactivos y la reducción del tiempo de análisis.

El método propuesto se aplicó satisfactoriamente en el análisis de las toxinas diana en muestras de suero de pacientes con ERC las cuales se mantuvieron estables durante los ciclos de congelación-descongelación y bajo condiciones de temperatura ambiente. Finalmente, el método implementado demostró ser una alternativa analítica sencilla, confiable y de utilidad para el monitoreo de toxinas urémicas en el laboratorio clínico de rutina.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS.

- Explorar el uso de otras técnicas de extracción para el pCS e IS.
- Aplicar el método a una población más amplia de pacientes con ERC para establecer la relación entre las concentraciones de pCS e IS y los diferentes estadios de la enfermedad.
- Evaluar la factibilidad del método propuesto para la determinación simultánea de otras toxinas urémicas presentes en el suero como, por ejemplo, el ácido indolacético, ácido hipúrico, quinurenina o el p-cresol.
- Evaluar la aplicación del método a distintas matrices biológicas, como plasma, orina y saliva.

BIBLIOGRAFÍA.

- Adesso, S., Magnus, T., Cuzzocrea, S., et al. (2017). Indoxyl sulfate affects glial function increasing oxidative stress and neuroinflammation in chronic kidney disease: *Interaction between astrocytes and microglia*. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 370. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00370>.
- Akyüz, A., Tekin, İ., Aksoy, Z., & Ersus, S. (2024). Plant protein resources, novel extraction and precipitation methods: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 47(10), e14758. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14758>.
- Al Za'abi, M., Ali, B., & Al Toubi, M. (2013). HPLC–Fluorescence method for measurement of the uremic toxin indoxyl sulfate in plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 51(1), 40–43. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms103>.
- Al-Dajani, A. R., Hou, Q. K., & Kiang, T. K. L. (2024). Liquid chromatography-mass spectrometry analytical methods for the quantitation of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in human matrices: Biological applications and diagnostic potentials. *Pharmaceutics*, 16(6), 743. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060743>.
- Alden, B. A., Boissel, C., Swanson, D., Xia, F., Hong, P., Diehl, D. M., Iraneta, P. C., Mazzeo, J. R., Wyndham, K., Lawrence, N., Walter, T., & McCabe, D. R. (2006). *Improvements in reversed-phase HPLC columns designed for polar compound retention: Introducing Atlantis T3 columns*. Waters Corporation.
- Alquadeib, B. T., et al. (2024). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analytical Methods for the Quantitation of p-Cresol Sulfate and Indoxyl Sulfate in Human Matrices: Biological Applications and Diagnostic Potentials. *Pharmaceutics*, 16(6), 743. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060743>.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (16th ed.).
- Arteaga-Muller, G. Y., Flores-Treviño, S., Bocanegra-Ibarias, P., Robles-Espino, D., Garza-González, E., Fabela-Valdez, G. C., & Camacho-Ortiz, A. (2024).

Changes in the progression of chronic kidney disease in patients undergoing fecal microbiota transplantation. *Nutrients*, 16(8), 1109. <https://doi.org/10.3390/nu16081109>.

- Barreto, F. C., Barreto, D. V., Liabeuf, S., Meert, N., Glorieux, G., Temmar, M., Choukroun, G., Vanholder, R., & Massy, Z. A. (2009). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(10), 1551–1558. <https://doi.org/10.2215/CJN.03980609>.
- Bravo-Veyrat, S., & Hopfgartner, G. (2022). Mass spectrometry based high-throughput bioanalysis of low molecular weight compounds: Are we ready to support personalized medicine? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(1), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03583-2>.
- Burke, S. (2001). *Regression and Calibration* (LC GC Europe Online Supplement, Ed.).
- Caggiano, G., Amodio, L., Stasi, A., Colabufo, N. A., Colangiulo, S., Pesce, F., & Gesualdo, L. (2023). Gut-Derived Uremic Toxins in CKD: An Improved Approach for the Evaluation of Serum Indoxyl Sulfate in Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5142. <https://doi.org/10.3390/ijms24065142>.
- Cantwell, H. (Ed.). (2025). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (3rd ed.). Eurachem.
- Corradi, V., Caprara, C., Barzon, E., Mattarollo, C., Zanetti, F., Ferrari, F., Husain-Syed, F., Giavarina, D., Ronco, C., & Zanella, M. (2024). A possible role of p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate as biomarkers in the prediction of renal function according to the GFR (G) categories. *Integrative Medicine in Nephrology and Andrology*, 11(3), e24-00002. <https://doi.org/10.1097/IMNA-D-24-00002>.
- Crespo-Salgado, J., Vehaskari, V. M., Stewart, T., Ferris, M., Zhang, Q., Wang, G., & Blanchard, E. E. (2016). Intestinal microbiota in pediatric patients with end stage renal disease: A Midwest Pediatric Nephrology Consortium study. *Microbiome*, 4, 50. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0195-9>.

- De Loor, H., Meijers, B. K. I., Meyer, T. W., Bammens, B., Verbeke, K., Dehaen, W., & Evenepoel, P. (2009). Sodium octanoate to reverse indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate albumin binding in uremic and normal serum during sample preparation followed by fluorescence liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(22), 4684–4688. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.015>.
- De Loor, H., Poesen, R., De Leger, W., Dehaen, W., Augustijns, P., Evenepoel, P., & Meijers, B. (2016). A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method to measure a selected panel of uremic retention solutes derived from endogenous and colonic microbial metabolism. *Analytica Chimica Acta*, 936, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.057>.
- De Smet, R., David, F., Sandra, P., Van Kaer, J., Lesaffer, G., Dhondt, A., Lameire, N., & Vanholder, R. (1998). A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. *Clinica Chimica Acta*, 278(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00124-7).
- Desmet, G., Broeckhoven, K., Deridder, S., & Cabooter, D. (2022). Review of recent insights in the measurement and modelling of the B-term dispersion and related mass transfer properties in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 1214, 339955. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339955>.
- Dolan, J. W. (2002). Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 965(1–2), 195–205. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01321-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01321-8).
- Du, M., Hou, Z., Liu, L., Xuan, Y., Chen, X., Fan, L., Li, Z., & Xu, B. (2022). Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1028691. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691>,
- Duranton, F., Cohen, G., De Smet, R., Rodriguez, M., Jankowski, J., Vanholder, R., & Argilés, A. (2012). Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(7), 1258–1270. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011121175>.

- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2025). *European Pharmacopoeia* (12th ed.), General chapter 2.2.46: Chromatographic separation techniques. Council of Europe.
- Evenepoel, P., Meijers, B. K. I., Bammens, B. R. M., & Verbeke, K. (2009). Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney International*, 76(Suppl. 114), S12–S19. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.402>.
- Fabresse, N., Uteem, I., Lamy, E., Massy, Z., Larabi, I. A., & Alvarez, J.-C. (2020). Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: Comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta*, 507, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.032>.
- Fernandes, S. R., Meireles, A. N., Marques, S. S., Silva, L., Barreiros, L., Sampaio-Maia, B., Miró, M., & Segundo, M. A. (2023). Sample preparation and chromatographic methods for the determination of protein-bound uremic retention solutes in human biological samples: An overview. *Journal of Chromatography B*, 1215, 123578. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123578>.
- Filosa, C., Leopoldo, M., & Colabufo, N. A. (2024). LC-MS and HPLC-UV for detecting uremic toxins: Two validated methods with simultaneous sensitivity and specificity evaluation. *IgMin Research*, 2(4), 266–272. <https://doi.org/10.61927/igmin175>.
- Ganesh, V., Poorna Basuri, P., Sahini, K., & Nalini, C. N. (2023). Retention behaviour of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography—A review. *Biomedical Chromatography*, 37(7), e5482. <https://doi.org/10.1002/bmc.5482>.
- GBD 2023 Chronic Kidney Disease Collaborators. (2025). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease in adults, 1990–2023, and its attributable risk factors: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2023. *The Lancet*. Advance online publication.
- Gekko, K., Ohmae, E., Kameyama, K., & Takagi, T. (1998). Acetonitrile-protein interactions: Amino acid solubility and preferential solvation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387(1–2), 195–205. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00121-6).

- Gritti, F., & Guiochon, G. (2013). The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1302, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.032>
- Gryp, T., De Paepe, K., Vanholder, R., Kerckhof, F. M., Van Biesen, W., Van de Wiele, T., Verbeke, F., Speeckaert, M., Joossens, M., Couttenye, M. M., Vaneechoutte, M., & Glorieux, G. (2020). Gut microbiota generation of protein-bound uremic toxins and related metabolites is not altered at different stages of chronic kidney disease. *Kidney International*, 97(6), 1230–1242. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.01.028>.
- Guillarme, D., Heinisch, S., & Rocca, J. L. (2004). Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1052(1–2), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.052>.
- Gutiérrez-Peña, M., Zuñiga-Macias, L., Marin-Garcia, R., et al. (2021). High prevalence of end-stage renal disease of unknown origin in Aguascalientes Mexico: Role of the registry of chronic kidney disease and renal biopsy in its approach and future directions. *Clinical Kidney Journal*, 14(4), 1197–1206. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa229>.
- Homocianu, M. (2024). Exploring solvatochromism: A comprehensive analysis of research data. *Microchemical Journal*, 198, 110166. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110166>.
- Ingle, R. G., Zeng, S., Jiang, H., & Fang, W.-J. (2022). Current developments of bioanalytical sample preparation techniques in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(4), 517–529. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.03.001>.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2025). *Estadísticas de Defunciones Registradas (EDR) 2024*.
- International Council for Harmonisation (ICH). (2023). *ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures*.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2022). *ICH harmonised guideline M10: Bioanalytical method validation and study sample analysis*. ICH.

- Jelani, A. F., Ahmad Narihan, M. Z., Froemming, G. R. A., & Awang Hamsin, D. E. Z. (2025). Toxic effects of *p*-cresyl sulfate and indoxyl sulfate on bone: A systematic review. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 21(4), 302–313. <https://doi.org/10.47836/mjmhs.21.4.37>.
- Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A. Y. M., & Yang, C. W. (2013). Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382(9888), 260–272. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60687-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X).
- KDIGO Chronic Kidney Disease Guideline Work Group. (2024). *KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney International.
- Kovesdy, C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: An update 2022. *Kidney International Supplements*, 12(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>,
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- Lee, C. T., Kuo, C. C., Chen, Y. M., Hsu, C. Y., Lee, W. C., Tsai, Y. C., Ng, H. Y., Kuo, L. C., Chiou, T. T. Y., Yang, Y. K., Cheng, B. C., & Chen, J. B. (2010). Factors associated with blood concentrations of indoxyl sulfate and *p*-cresol in patients undergoing peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International*, 30(4), 456–463. <https://doi.org/10.3747/pdi.2009.00092>.
- Levey, A. S., & Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *The Lancet*, 379(9811), 165–180. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5).
- Li, Q., Zhang, S., Wu, Q. J., Xiao, J., Wang, Z. H., Mu, X. W., et al. (2022). Serum total indoxyl sulfate levels and all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis patients: A prospective cohort study. *BMC Nephrology*, 23(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12882-022-02862-z>.
- Liabeuf, S., Barreto, D. V., Barreto, F. C., Meert, N., Glorieux, G., Schepers, E., Temmar, M., Choukroun, G., Vanholder, R., & Massy, Z. A. (2010). Free *p*-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic

kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(4), 1183–1191. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp592>.

- Lin, T. J., Hsu, B. G., Wang, J. H., Lai, Y. H., Dongoran, R. A., & Liu, C. H. (2020). Serum indoxyl sulfate as a potential biomarker of aortic arterial stiffness in coronary artery disease. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 30(12), 2320–2327. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.07.035>,
- Liu, W. C., Tomino, Y., & Lu, K. C. (2018). Impacts of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate on chronic kidney disease and mitigating effects of AST-120. *Toxins*, 10(9), 367. <https://doi.org/10.3390/toxins10090367>.
- Cortés-Sanabria, L., Álvarez-Santana, G., Orozco-González, C. N., Soto-Molina, H., Martínez-Ramírez, H. R., & Cueto-Manzano, A. M. (2017). Impacto económico de la enfermedad renal crónica: Perspectiva del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(Supl. 2), S124–S132.
- Meijers, B. K. I., & Evenepoel, P. (2011). The gut–kidney axis: Indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(3), 759–761. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq818>.
- Meijers, B. K. I., Claes, K., Bammens, B., de Loor, H., Viaene, L., Verbeke, K., Kuypers, D., Vanrenterghem, Y., & Evenepoel, P. (2010). p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(7), 1182–1189. <https://doi.org/10.2215/CJN.07971109>.
- Mu, L., Xie, F., Li, S., & Yu, P. (2014). Determination of Strong Acidic Drugs in Biological Matrices: A Review of Separation Methods. *Chromatography Research International*, 2014, 469562. <https://doi.org/10.1155/2014/469562>.
- Nakabayashi, I., Nakamura, M., Kawakami, K., Ohta, T., Kato, I., Uchida, K., & Yoshida, M. (2011). Effects of synbiotic treatment on serum level of p-cresol in haemodialysis patients: A preliminary study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(3), 1094–1098. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq624>.
- Natarajan, R., Pechenyak, B., Vyas, U., Ranganathan, P., Weinberg, A., Liang, P., Mallappallil, M. C., Norin, A. J., Friedman, E. A., & Saggi, S. J. (2014).

Randomized controlled trial of strain-specific probiotic formulation (Renadyl) in dialysis patients. *BioMed Research International*, 2014, 568571. <https://doi.org/10.1155/2014/568571>.

- Niu, Z., Zhang, W., Yu, C., Zhang, J., & Wen, Y. (2018). Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 123–146. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- Niwa, T. (2010). Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. *Journal of Renal Nutrition*, 20(5 Suppl.), S2–S6. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2010.05.002>.
- Opdebeeck, B., Maudsley, S., Azmi, A., De Maré, A., De Leger, W., Meijers, B., Verhulst, A., Evenepoel, P., D’Haese, P. C., & Neven, E. (2019). Indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate promote vascular calcification and associate with glucose intolerance. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(5), 751–766. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018060609>.
- Osuna-Padilla, I. A., & Leal-Escobar, G. (2017). Alteraciones en el eje intestino-riñón durante la enfermedad renal crónica: causas, consecuencias y propuestas de tratamiento. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 21(2), 174–183. <https://doi.org/10.14306/renhyd.21.2.244>.
- Panuwet, P., Hunter, R. E., Jr., D’Souza, P. E., Chen, X., Radford, S. A., Cohen, J. R., Marder, M. E., Kartavenka, K., Ryan, P. B., & Barr, D. B. (2016). Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: Advancing biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(2), 93–105. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.980775>.
- Perucho, J., Gonzalo-Gobernado, R., Bazán, E., Casarejos, M. J., & Jiménez-Escrig, A. (2015). Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids*, 47, 963–973. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1925-1>.
- Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvanan, V., & Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Journal of Chromatography B, 785(2), 263–275. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5).

- Portillo Castillo, O. J., Castro Ríos, R., Chávez Montes, A., González Horta, A., Cavazos Rocha, N., Granados Guzmán, G., Waksman de Torres, N., & Garza Tapia, M. (2022). Fabrication and Characterization of a Laboratory–Made New Coating Based on 1-Decyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate for SPME Fibers, an Exploration to its Application in Extractions by Direct-Immersion Mode. 158 *Journal of the Mexican Chemical Society*, 66(2). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v66i2.1693>.
- Pretorius, C. J., McWhinney, B. C., Sipinkoski, B., Johnson, L. A., Rossi, M., Campbell, K. L., & Ungerer, J. P. J. (2013). Reference ranges and biological variation of free and total serum indoxyl- and p-cresyl sulphate measured with a rapid UPLC fluorescence detection method. *Clinica Chimica Acta*, 419, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.008>.
- Rice, S. J., & Belani, C. P. (2024). Characterization of effective, simple, and low-cost precipitation methods for depleting abundant plasma proteins to enhance the depth and breadth of plasma proteomics. *Proteomics*, 24(15), e2400071. <https://doi.org/10.1002/pmic.202400071>.
- Schroeder, J. C., DiNatale, B. C., Murray, I. A., Flaveny, C. A., Liu, Q., Laurenzana, E. M., Lin, J. M., Strom, S. C., Omiecinski, C. J., Amin, S., & Perdew, G. H. (2010). The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry*, 49(2), 393–400. <https://doi.org/10.1021/bi901786x>.
- Shafi, T., Meyer, T. W., Hostetter, T. H., Melamed, M. L., Parekh, R. S., Hwang, S., Banerjee, T., Coresh, J., & Powe, N. R. (2015). Free levels of selected organic solutes and cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients: Results from the Retained Organic Solutes and Clinical Outcomes (ROSCO) investigators. *PLOS ONE*, 10(5), e0126048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126048>.
- Shu, C., Chen, X., Xia, T., Zhang, F., Gao, S., & Chen, W. (2016). LC-MS/MS method for simultaneous determination of serum p-cresyl sulfate and indoxyl

sulfate in patients undergoing peritoneal dialysis. *Biomedical Chromatography*, 30(11), 1782–1788. <https://doi.org/10.1002/bmc.3753>.

- Silva, L. A. P., Campagnolo, S., Fernandes, S. R., Marques, S. S., Barreiros, L., Sampaio-Maia, B., & Segundo, M. A. (2023). Rapid and sustainable HPLC method for the determination of uremic toxins in human plasma samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(4), 683–694. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04458-w>.
- Stoll, D. R. (2024). Mobile phase buffers in liquid chromatography: A review of essential ideas. *LCGC International*, 1(10), 6–11. <https://doi.org/10.56530/lcgc.int.ug8880n3>.
- Sun, C. Y., Chang, S. C., & Wu, M. S. (2012). Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney International*, 81(7), 640–650. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.445>.
- Swartz, M., & Ira Krull. (2015). *Analytical Method Validation: Accuracy in Quantitation* (LCGC North America, Ed.).
- U.S. Environmental Protection Agency. (2010). Technical Assistance Document for Assessment and Development of Calibration Curves. Office of Resource Conservation and Recovery.
- Vanholder, R., Baurmeister, U., Brunet, P., Cohen, G., Glorieux, G., & Jankowski, J. (2008). A bench to bedside view of uremic toxins. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(5), 863–870. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007121377>.
- Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argilés, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Deyn, P. P., Deppisch, R., Descamps-Latscha, B., Henle, T., Jörres, A., Lemke, H. D., Massy, Z. A., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M., Stegmayr, B., Stenvinkel, P., Tetta, C., Wanner, C., & Zidek, W. (2003). Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney International*, 63(5), 1934–1943. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x>.

- Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Nagler, E. V., & Glorieux, G. (2014). The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: A systematic review. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(9), 1897–1907. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101062>.
- Vaziri, N. D., Yuan, J., & Norris, K. (2013). Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *American Journal of Nephrology*, 37(1), 1–6. <https://doi.org/10.1159/000345969>.
- Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2016). Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.02.006>.
- Viaene, L., Annaert, P., de Loor, H., Poesen, R., Evenepoel, P., & Meijers, B. (2013). Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 34(3), 165–175. <https://doi.org/10.1002/bdd.1834>.
- Viaene, L., Meijers, B. K. I., Bammens, B., Vanrenterghem, Y., & Evenepoel, P. (2014). Serum concentrations of p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, but not inflammatory markers, increase in incident peritoneal dialysis patients in parallel with loss of residual renal function. *Peritoneal Dialysis International*, 34(1), 71–78. <https://doi.org/10.3747/pdi.2012.00276>.
- Wakamatsu, A., Ochiai, S., Suzuki, E., Yokota, Y., Ochiai, M., Kotani, Y., et al. (2018). Proposed selection strategy of surrogate matrix to quantify endogenous substances by Japan Bioanalysis Forum DG2015-15. *Bioanalysis*, 10(17), 1349–1360. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0105>.
- Watanabe, I., Tatebe, J., Namba, S., Koizumi, M., Yamazaki, J., & Morita, T. (2013). Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation Journal*, 77(1), 224–230. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0647>.

- Wu, C., Shi, C.-G., Li, M., Pan, B.-Y., Xing, X.-M., Feng, Z.-Q., & Xie, Z.-Y. (2010). Determination of indoxyl sulfate in human serum by HPLC-FLU and its application in hemodialysis patients. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 15(8), 906–910.
- Xie, T., Bao, M., Zhang, P., Jiao, X., Zou, J., Ding, X., Cao, X., & Yu, X. (2019). Serum concentration of indoxyl sulfate in peritoneal dialysis patients and low-flux hemodialysis patients. *Kidney & Blood Pressure Research*, 48(2), 183–190. <https://doi.org/10.1159/000499749>.
- Zacharioudaki, D.-E., Fitis, I., & Kotti, M. (2022). Review of fluorescence spectroscopy in environmental quality applications. *Molecules*, 27(15), 4801. <https://doi.org/10.3390/molecules27154801>.