



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Ricardo Chihuailaf V.
INSTITUTO: Ciencias Clínicas Veterinarias
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Q.F. Alejandro Jerez M.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE β -HIDROXIBUTIRATO EN LECHE CRUDA BOVINA”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Químico Farmacéutico.

LILI ANDREA SALINAS TOLEDO

VALDIVIA – CHILE
2011

Dedicado a Francisca, motor de mi vida, a mis padres, por sus enseñanzas, a Alejandro, mi compañero de vida y a Matías, el pequeño ser que está creciendo dentro de mí.

Agradecimientos

Al Consorcio de la Leche por aportar el financiamiento para realizar esta tesis.

Al personal del Laboratorio Clínico del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, en especial a la Sra. Helga, Sra. Verónica y a Don Atilio por prestar toda la ayuda necesaria, las enseñanzas, consejos y paciencia durante la realización de este trabajo.

Al profesor Ricardo Chihuailaf, quién dedicó muchas horas para dirigir y corregir el proceso que derivó en el desarrollo de este trabajo. Le agradezco por ser un gran académico de la Universidad, por sus explicaciones pedagógicas, por su enorme paciencia, por acompañarme en este largo recorrido, por compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos y por su gran apoyo.

A la Escuela, por permitirme lograr terminar mi carrera profesional y a todos sus docentes porque de alguna manera forman parte de lo que soy ahora.

Al profesor Alejandro Jerez por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo sin cuyo apoyo no hubiera sido posible completar este trabajo.

A la profesora Adela Martínez por su alegría, por cada clase que nos dio en la que demuestra un gran amor por lo que hace, por su entrega y su ejemplo.

A mi madre gracias por todo tu esfuerzo, tu amor incondicional, tu apoyo, por la paciencia y la confianza que depositaste en mí. Gracias además porque, aunque lejos, has estado siempre a mi lado. Quiero que sepas que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también tuyos e inspirados por ti. Te amo.

A mi padre por tu comprensión, paciencia, apoyo y porque siempre creíste en mí, porque en todos tus actos trataste de dejarme una enseñanza y porque a pesar de la distancia siempre estuviste atento para saber cómo iba mi proceso y mi vida.

A Alejandro por ser un ejemplo de superación y lucha constante, por acompañarme en mi proceso universitario desde mechona, por darme dos hijos hermosos. Por lo que ha sido y será de nosotros. Mi amor, te mereces toda mi admiración, sabes que te llevo muy dentro de mi corazón, te amo.

A Francisca por su paciencia, porque muchas veces fuiste postergada para que mamá pudiese terminar sus cosas, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría y por darme el estímulo necesario para seguir adelante siempre. Te amo.

A mis hermanos porque han sido una gran compañía, por nuestros juegos y el amor que me han entregado. Los quiero mucho.

A mis sobrinos Celeste y Arrocito (que viene en camino), les agradezco también porque hacen aflorar todo el amor que hay en mi corazón.

A mi familia en general, gracias por el cariño y apoyo moral que siempre he recibido de ustedes, con el cual he logrado culminar mi esfuerzo, terminando así mi carrera profesional, que es para mí la mejor de las herencias. Por todos los valores entregados, sus consejos, por su amistad, su compañía, por su amor, su apoyo, por todos los momentos compartidos en especial a Norma, Sonia, Teresa, Karina y Rodrigo.

A mi tía Sonia y familia por todo el apoyo brindado, la confianza, la compañía y su amistad.

A mis abuelos, mami y papi, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue igualmente gracias a su gran apoyo.

Gracias por ser como padres para mi, siempre sentí que podría contar con su apoyo si es que estos hubiesen llegado a faltarme. Los quiero mucho.

A la familia de mi marido, en especial a mi suegra, Marta Angulo[†], y mi cuñada, Carolina Santana, siempre estuvieron pendientes de nosotros y apoyándonos en todo lo que concierne a nuestra hija, dándonos consejos y preocupándose de muchos detalles. Muchas gracias.

A mis amigos Beatriz, Tiare, Dahiana, Mario, Claudia M. y Claudia V. me gustaría agradecer su amistad, su apoyo incondicional, su ánimo y su compañía en las diferentes etapas de mi vida. Mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos. Por comprenderme y dar lo mejor de sí, sin esperar nada a cambio. Los quiero mucho.

A Evelyn Palma y familia, por su buena voluntad y toda la ayuda brindada para que pudiese terminar mi trabajo de laboratorio.

A todos los que he olvidado mencionar que de alguna forma u otra influyeron en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros por todos sus aportes en mi vida Universitaria y las horas compartidas en las salas de clases.

ÍNDICE

	Capítulo	Página
	ABREVIATURAS	10
	RESUMEN	11
	SUMMARY	12
1	INTRODUCCIÓN	
1.1	Características generales del bovino	13
1.2	Leche bovina	14
1.3	Cuerpos cetónicos	14
1.4	Cetosis bovina	16
1.5	β-hidroxibutirato	18
1.6	Validación	21
1.6.1	Exactitud	21
1.6.2	Precisión	22
1.6.3	Curva de calibración	22
1.6.4	Sensibilidad	23
1.5.4.1	Límite de cuantificación	24
1.5.4.2	Límite de detección	24
1.6.5	Estabilidad	25
1.7	Hipótesis de trabajo	26
1.8	Objetivo general	26
1.9	Objetivos específicos	26
2	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1	Materiales	27
2.1.1	Equipos	27
2.1.2	Reactivos	28

2.2	Métodos	29
2.2.1	Obtención de muestras	29
2.2.2	Preparación y tratamiento de la muestra	29
2.2.3	Determinación de β -hidroxibutirato	30
2.2.4	Preparación de la solución madre	30
2.2.5	Fortificación de las muestras	30
2.2.6	Validación	31
2.2.6.1	Curva de calibración	31
2.2.6.2	Sensibilidad	32
2.2.6.3	Exactitud	33
2.2.6.4	Precisión	33
2.2.6.5	Estabilidad	34
3	RESULTADOS	
3.1	Curva de calibración y linealidad	36
3.2	Sensibilidad	37
3.3	Precisión	38
3.3.1	Repetibilidad	38
3.3.2	Precisión Intermedia	39
3.4	Exactitud	39
3.6	Estabilidad	40
3.6.1	Frente al congelamiento y descongelamiento	40
3.6.2	Estabilidad a corto plazo	41
3.6.3	Estabilidad de la solución madre	41
4	DISCUSIÓN	43
5	CONCLUSIONES	49
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7	ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla N° 1	Media (\bar{X}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) de la diferencia (Δ) de absorbancia de seis concentraciones de β -hidroxibutirato (β -OHB) en muestras de leche cruda fortificadas y analizadas en sextuplicado.	36
Tabla N° 2	Media (\bar{X}), coeficiente de variación (CV) y criterios de aceptación para tres concentraciones de β -OHB obtenidas experimentalmente en quintuplicado, en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.	38
Tabla N° 3	Media (\bar{X}) y coeficiente de variación (CV), obtenidos en diferentes días, para tres concentraciones de β -OHB obtenidas experimentalmente en quintuplicado, en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.	39
Tabla N° 4	Media (\bar{X}), Porcentaje de recuperación y criterios de aceptación de tres concentraciones de β -OHB obtenidas experimentalmente en quintuplicado, en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.	39
Tabla N° 5	Diferencia (Δ) de absorbancia de leche sometida a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento comparada con leche fresca, utilizando tres concentraciones en triplicado.	40
Tabla N° 6	Diferencias (Δ) de absorbancia para tres concentraciones analizadas en triplicado de leche fortificada con β -OHB, sometidas a congelamiento-descongelamiento y almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente, comparadas con leche fortificada fresca.	41

Tabla N° 7	Media (\bar{X}) y porcentaje de concentración de las soluciones madre de β -hidroxibutirato almacenadas a distintos periodos de tiempo y analizadas en triplicado, respecto a un estándar de referencia* .	42
-------------------	--	-----------

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1	Curva de regresión entre la concentración de β -OHB y la diferencia de absorbancia en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.	37
---------------------	---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Estructura molecular de los cuerpos cetónicos acetoacetato, acetona y β -OHB (Garrett y Grishamt, 2010).	15
Figura N° 2	A) Estructura molecular del ácido R-3-Hidroxibutírico; B) Estructura molecular de la sal sódica de D- β -OHB.	19
Figura N° 3	Reacción catalizada por la enzima β -OHB deshidrogenasa (Garrett y Grishamt, 2010).	20

ABREVIATURAS

β -OHB	: β -hidroxibutirato
CV	: Coeficiente de Variación
DE	: Desviación estándar
FAO	: Food and Agriculture Organization
FDA	: Food and Drug Administration
LLOD	: Límite más Bajo de Detección
LLOQ	: Límite Inferior de Cuantificación
NAD ⁺	: Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada
NADH	: Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida
PABCO	: Plantel animal bajo control oficial
RMN	: Resonancia Magnética Nuclear
mM	: mili Molar
mL	: mili Litro
μ g	: micro Gramo
\bar{X}	: Media

RESUMEN

La necesidad de evaluar el estado de salud de bovinos ha llevado a la utilización de muestras biológicas, cuya obtención muchas veces es invasiva y requiere de un manejo del animal que le causa estrés. La búsqueda de métodos no invasivos ha llevado que la leche constituya una muestra biológica alternativa para evaluar la salud de la vaca.

Una de las enfermedades frecuentes en vacas lecheras es la cetosis, que se caracteriza por un incremento de las concentraciones de cuerpos cetónicos por sobre el intervalo de referencia en los fluidos corporales, entre ellos el β -OHB. En general, el β -OHB es cuantificado en sangre, lo que motivó la selección de un método analítico que pueda ser implementado para su uso rutinario en el laboratorio utilizando muestras de leche cruda de vaca. La concentración de β -OHB en la muestra se calcula a través de una reacción catalizada por la enzima β -OHB deshidrogenasa que está acoplada a la reducción del NAD^+ a NADH. El NAD^+ se encuentra en una proporción estequiométrica en relación al β -OHB y se puede cuantificar espectrofotométricamente a 340 nm.

Para realizar la validación del método analítico se evaluaron los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, recuperación, sensibilidad, estabilidad de las muestras y del estándar. En los análisis se determinó que el método tiene una respuesta lineal en leche, con un LLOD de 0,16 mmol/L y un LLOQ de 0,30 mmol/L, además se estableció que el método es exacto, preciso, su recuperación es cercana al 100% y la solución madre es estable hasta por 3 meses; sin embargo, la matriz no demostró ser estable según los criterios de validación impuestos por la guía de validación para la Industria de la FDA para métodos bioanalíticos.

SUMMARY

To assess the health of cattle the biological samples has led. For obtaining these samples the animal is often managed with invasive and stressing procedures. The search for non-invasive methods has led to the use of milk as alternative biological samples.

A frequent disease in dairy cows is the ketosis, which is characterized by an increase in the concentration of ketone bodies, such as β -OHB, in body fluids. Generally, the β -OHB is quantified in blood, but not in milk. This fact has risen to come up with an analytical method to be used in the lab using samples of raw milk cow. The β -OHB concentration in the sample is calculated by a reaction coupled to the reduction of NAD^+ to NADH and catalyzed by the enzyme β -OHB dehydrogenase. The NAD^+ and β -OHB concentrations have a stoichiometric ratio, and can be quantified spectrophotometrically at 340 nm.

A selected analytical method was validated by means of the evaluation of linearity, accuracy, precision, recovery, sensitivity, and stability of samples and the standards. The assessment determined that this method has a linear response in milk, with a LLOD of 0,16 mmol/L and a LLOQ of 0,30 mmol/L. This method also proved to be exact, precise, having a recovery close to 100%. The stock solution remains stable for up to three months. The matrix, however, was not proved stable according to the validation criteria set by the FDA validation guide for bioanalytical methods.

1 - INTRODUCCIÓN

La ganadería es un área de la agricultura que se ha expandido en los últimos años a causa de la gran demanda de carne y leche. Según la FAO (2009), el ganado representa el 40 % del valor mundial de la producción agropecuaria y supone un apoyo a los medios de subsistencia y la seguridad alimentaria de casi mil millones de personas. Para responder a la demanda, la ganadería ha tenido que desarrollarse a gran velocidad e intensificarse, lo que ha llevado a problemas en la salud y bienestar animal en numerosas partes del mundo (FAO, 2009).

En los últimos tres años, la demanda y producción de carne y lácteos a nivel mundial han experimentado un alza (Echávarri *et al.*, 2010). En el mercado nacional, la producción de leche, y la exportación de productos lácteos, han aumentado considerablemente (Opitz *et al.*, 2010).

Con el objetivo de garantizar que los animales se encuentren en óptimas condiciones de salud o para pesquisar a tiempo los problemas que puedan presentar, es necesario el desarrollo de programas de monitoreo y de manejo preventivo de la salud del rebaño.

1.1 - CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BOVINO

El bovino, taxonómicamente, pertenece a la familia *Bovidae*, clasificado como mamífero ya que consta de glándula mamaria, pelos y pulmones. El suborden es *Ruminantia*, por su capacidad de masticar más de una vez el alimento que ya tuvo en su estómago, es herbívoro, posee 4 compartimentos estomacales y su dentición es incompleta, ya que presenta ausencia de incisivos superiores y colmillos. Además, se caracteriza por poseer sólo dos dedos en las patas (Gasque, 2008).

La madurez sexual del bovino comienza entre los 7 y 8 meses, su gestación dura aproximadamente 283 días y tiene, generalmente, una cría por parto (Gasque, 2008).

1.2 - LECHE BOVINA

La ubre es una glándula exocrina de los mamíferos que secreta leche. En el bovino tiene una ubicación ventral y se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen. Se encuentra constituida por cuatro glándulas mamarias, mejor conocidas como cuartos; cada uno de estos cuartos opera de forma independiente del otro y secretan leche por su propio canal (Gasque, 2008).

La leche se define como una emulsión de glóbulos de grasa en suspensión (Akpanyung, 2006), gracias a micelas de caseína (compuestas de proteínas, calcio y fósforo) que se encuentran suspendidas en una fase acuosa. Esta fase, además, contiene solubilizada lactosa, proteínas y sales minerales (Jensen, 1995).

Bioquímicamente, la leche cruda bovina está compuesta de agua (87,7 %), grasa (3,6 %), proteínas (3,3 %), carbohidratos (principalmente lactosa que constituye el 4,7 %), minerales (0,65 %) y vitaminas¹. Además, la leche tiene otros metabolitos, tales como la urea y el cuerpo cetónico β -hidroxibutirato o ácido 3-hidroxibutírico (β -OHB).

1.3 - CUERPOS CETÓNICOS

El término “cuerpos cetónicos” se refiere básicamente a tres moléculas: acetoacetato, β -OHB y acetona, que son metabolitos generados por la β -oxidación de los ácidos grasos cuando el organismo se encuentra en un balance energético negativo. El acetoacetato y el β -OHB

¹ http://www.cdr.wisc.edu/programs/dairyingredients/pdf/dairy_proteins.pdf

transportan energía desde el hígado a otros tejidos y la acetona es generada por la descarboxilación espontánea del acetoacetato. El β -OHB es un cuerpo cetónico producido principalmente en el hígado y es exportado a los tejidos periféricos para su uso como recurso energético (Guthrie y Jordan, 1972).

Los cuerpos cetónicos (β -OHB, acetona y acetoacetato) (Fig.1) son los metabolitos intermediarios de la oxidación de ácidos grasos, específicamente como resultado de la oxidación incompleta de los ácidos grasos a acetyl-CoA, cuando la llegada de ácidos grasos no esterificados al hígado excede la capacidad de éste para oxidarlos por completo para el suministro de energía. Los cuerpos cetónicos pueden ser utilizados por los músculos como fuente de combustible alternativo a la glucosa, también como ahorradores de glucosa para la producción de leche. Sin embargo, la producción de cetonas no resulta en un aumento de liberación de energía neta como en la oxidación completa de los ácidos grasos. Además, se cree que el aumento de las concentraciones de cetonas suprime el consumo de alimento (LeBlanc, 2010).

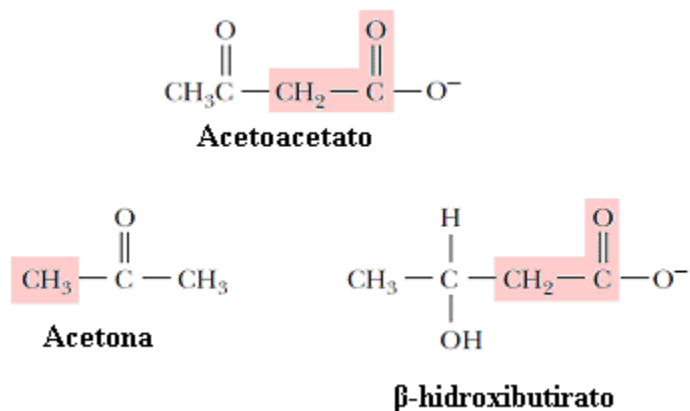


Figura 1: Estructura molecular de los cuerpos cetónicos acetoacetato, acetona y β -OHB (Garrett y Grishamt, 2010).

Los precursores de cetonas también pueden existir en concentraciones altas en alimentos, como las leguminosas y ensilajes mal fermentados que contienen altas concentraciones de ácido butírico. Éstos pueden acrecentar el riesgo de cetosis aumentando el suministro de los precursores de cetonas para el ganado².

Las altas concentraciones de ácido butírico y otros compuestos que contienen nitrógeno (poliaminas como la cadaverina, putrescina y triptamina) presente en algunos ensilajes, pueden también reducir la palatabilidad y el consumo de ensilaje, disminuyendo así el balance de energía y aumentar el riesgo de cetosis².

1.4 - CETOSIS BOVINA

La cetosis es un trastorno metabólico que se produce en el ganado lechero, cuando la demanda por energía es superior a la ingesta de energía, dando lugar a un balance energético negativo. Esto ocurre más comúnmente en vacas con ingesta reducida o vacas recién paridas de alto nivel de producción. Las vacas que suelen tener hipoglucemia (baja concentración de azúcar en la sangre) utilizan una gran cantidad de grasa corporal como fuente de energía para apoyar la producción de leche, generando una alta producción de cuerpos cetónicos que no pueden ser metabolizados por la vaca. Estos cuerpos cetónicos aumentan su concentración en todos los fluidos corporales y el resultado es la presentación del cuadro clínico o subclínico de cetosis², siendo el β -OHB el cuerpo cetónico más predominante en este estado (Guthrie y Jordan, 1972).

Todas las vacas lecheras en lactancia temprana (primeras 6 semanas después del parto) corren el riesgo de cetosis. La incidencia en la lactancia se estima en 16,5%, pero ésta varía considerablemente en rebaños individuales. La cetosis se produce en todos los partos (aunque

² <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/80900.htm&word=ketosis>

parece ser menos común en las primíparas) y no parece tener una predisposición genética, además de estar asociadas a las razas lecheras. Las vacas con excesivo tejido adiposo (condición corporal $\geq 3,75$ en una escala del 1 al 5) en el parto tienen un mayor riesgo de cetosis, en comparación con aquellas con baja condición corporal. Las vacas lactantes con hipercetonemia tienen un mayor riesgo de desarrollar cetosis clínica, en comparación con las vacas con menores concentraciones séricas de β -OHB³.

La cetosis subclínica (β -OHB $> 1400 \mu\text{mol} / \text{L}$ en sangre) en la primera o segunda semana después del parto se asocia con: 3 a 8 veces más de riesgo de desplazamiento de abomaso izquierdo; 3 veces mayor riesgo de metritis; 4 a 6 veces más de riesgo de cetosis clínica (Duffield *et al.*, 2009); mayor probabilidad de endometritis subclínica en la cuarta semana después del parto (Hammon *et al.*, 2006); y aumento de la duración y severidad de la mastitis (Suriyasathaporn *et al.*, 2000). Las vacas con β -OHB $> 1800 \mu\text{mol} / \text{L}$ en suero durante la primera semana tenían una producción de 300 kg más bajo de lo proyectado para totalidad de la lactancia (Duffield *et al.*, 2009).

La cetosis causa grandes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción de leche, alteración de la fertilidad y el aumento de riesgo de desplazamiento de abomaso (Geishauser *et al.*, 2001).

Cuando hay un aumento de cuerpos cetónicos en el animal, sin producir signos, hablamos de cetosis subclínica. Consecuentemente, $1400 \mu\text{mol}$ de β -OHB/L de sangre (Duffield *et al.*, 2009), $100 \mu\text{mol}$ de acetoacetato/L de leche, $100 \mu\text{mol}$ de β -OHB/L de leche ó $250 \mu\text{mol}$ de acetona / L de leche, se pueden utilizar como puntos de corte para distinguir entre las vacas con o sin cetosis subclínica (Geishauser *et al.*, 2001). Durante una evaluación metabólica, la literatura

³ <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/80900.htm&word=ketosis>

señala que el biomarcador de elección es el β -OHB, ya que es el cuerpo cetónico que presenta mayores ventajas analíticas (Laffel, 1999). Los tres cuerpos cetónicos principales están presentes en la sangre, leche y la orina y se pueden medir, pero el acetato y el acetoacetato son volátiles e inestables, y relativamente difíciles de medir, por lo que, comúnmente, no son utilizados para evaluar la cetosis. El β -OHB es el cuerpo cetónico predominante en la sangre, donde es estable (LeBlanc, 2010). Las concentraciones de β -OHB en leche reflejan la concentración en el suero, pero son a lo más el 10 a 15% de lo presente en sangre (Duffield, 2000).

El diagnóstico de la cetosis subclínica se puede realizar en muestras de leche, sangre y orina, siendo la leche la más aventajada ya que es la muestra más fácil de obtener.

1.5 - β -HIDROXIBUTIRATO

Químicamente, la molécula β -hidroxibutirato (β -OHB), también conocida como ácido 3-hidroxibutírico (Fig. 2), es un compuesto orgánico de cuatro carbonos, que tiene los grupos funcionales hidroxilo y carboxilo. Esta molécula tiene una imagen especular no superponible gracias a su centro quiral que corresponde al tercer carbono poseedor del grupo hidroxilo. El enantiómero reconocido por la enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa, necesaria para su cuantificación, es la forma dextro (D o R). Su fórmula química es $C_4H_8O_3$, su peso molecular es 104,10 g/mol, su fórmula lineal es $CH_3CH(OH)CH_2COOH$ y su nombre IUPAC es ácido 3-hidroxibutanoico⁴. La sal sódica de β -OHB (Fig. 2), es un polvo blanco, inodoro, muy hidrosoluble y su peso molecular es de 126,09 g/mol.

⁴http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=166898|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPECi

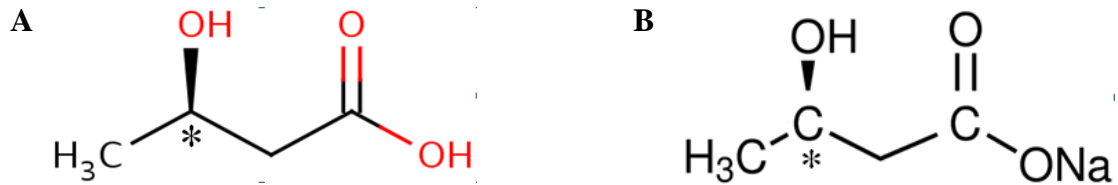


Figura 2: **A)** Estructura molecular del ácido R-3-Hidroxibutírico⁵; **B)** Estructura molecular de la sal sódica de D-β-OHB⁶. * indica el carbono quiral.

Existen diferentes formas de detectar y cuantificar el β-OHB. Últimamente, se han sugerido métodos como espectroscopia gas-masa (Hassan y Cooper, 2009) y HPLC (Takashi, 2010). Los métodos más conocidos y de amplio uso para su determinación son: 1) las tiras reactivas, que es un método semicuantitativo de detección en leche que, por una reacción colorimétrica, presenta rangos de concentraciones de β-OHB de < 50, 50 a 99, 100 a 199, 200 a 499, 500 a 999, y >1000 mmol/L de leche; y 2) la técnica cinética, que contiene la enzima β-OHB deshidrogenasa para formar NADH. La formación de este sustrato puede ser leído en un espectrofotómetro a 340 nm, y mediante una relación lineal se obtiene la concentración de β-OHB. Esta prueba es cuantitativa para la determinación de β-OHB (Geishauser *et al.*, 1998; Enjalbert *et al.*, 2001).

La muestra biológica más utilizada en este método es la sangre, sin embargo, existe un interés cada vez mayor en utilizar muestras obtenidas por vías no invasivas, como la utilización de muestras de leche.

⁵ <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00011> .

⁶ http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=298360|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&cm_sp=Customer_Favorites-_-Detail_Page-_-Text-298360 .

La reacción utilizada para determinar el β -OHB, está acoplada a la reducción del NAD^+ a NADH . El NAD^+ se encuentra en una proporción estequiométrica en relación al β -OHB. Esta reacción es catalizada por la enzima β -OHB deshidrogenasa (Fig. 3).

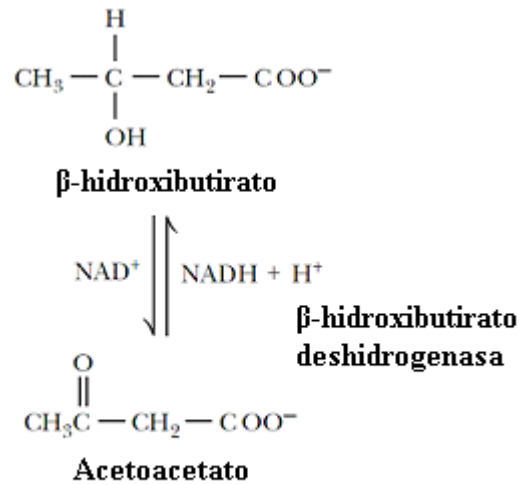


Figura 3: Reacción catalizada por la enzima β -OHB deshidrogenasa (Garrett y Grishamt, 2010).

La relación estequiométrica entre la oxidación de β -OHB y la formación de NADH en la reacción catalizada por la enzima β -OHB deshidrogenasa es utilizada para la cuantificación del analito. El NADH formado absorbe luz a los 340 nm, pudiendo determinarse la concentración de β -OHB mediante diferencia de absorbancia entre una primera y una segunda lectura.

Para usar esta técnica es necesario realizar pre tratamientos a la matriz con la cual se trabajará para eliminar los interferentes que contenga la matriz (grasa, proteínas, otros.).

1.6 - VALIDACION

La Validación es el proceso mediante el cual se establece, con estudios de laboratorio, que las características de los resultados del método van a ser consecuentes con las aplicaciones previstas, reuniendo los requerimientos y especificaciones que se establecen en la guía de validación utilizada (FDA, 2001). En ésta, se deben incluir todos los procedimientos requeridos que demuestren que el método utilizado para determinar cuantitativamente la concentración de un metabolito en una matriz biológica es confiable. Los parámetros analizados son:

1.6.1 - EXACTITUD

La exactitud de un método analítico describe la proximidad entre los datos obtenidos por el método y la concentración (valor real) de la sustancia analizada. La exactitud es determinada por análisis repetidos de muestras que contengan cantidades conocidas del analito; para ello se utiliza un mínimo de 5 mediciones por concentración y tres concentraciones contenidas en el rango de concentración de la curva de calibración. El valor medio no debe diferir en más de un 15% del valor real, excepto en el Límite Inferior de cuantificación (LLOQ), donde no debe diferir en más de un 20% (FDA, 2001). El porcentaje de recuperación de un analito sirve como medida de exactitud (ICH, 2005).

La recuperación de un analito en un análisis es la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad de analito añadido y extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta del detector para obtener la concentración real del estándar (FDA, 2001).

1.6.2 - PRECISIÓN

Ésta describe la proximidad con que un método analítico puede medir las distintas concentraciones de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de un solo volumen homogéneo de la matriz biológica. La precisión se medirá con un mínimo de 5 determinaciones por concentración y un mínimo de tres concentraciones dentro del rango de la curva de calibración. La precisión determinada, para cada concentración, no debe superar un CV del 15 %, a excepción del LLOQ, donde no debe superar el 20 % (FDA, 2001). La precisión se subdivide en:

a)- Repetibilidad: expresa la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento durante un corto intervalo de tiempo (ICH, 2005).

b)- Precisión Intermedia: expresa variaciones dentro del laboratorio (diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.) (ICH, 2005).

c)- Reproducibilidad: expresa la precisión entre laboratorios (estudios en colaboración, por lo general se aplica a la estandarización de la metodología) (ICH, 2005).

1.6.3 - CURVA DE CALIBRACIÓN

Una curva de calibración es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. La curva se debe generar para cada analito en la muestra. Un número suficiente de estándares debe ser usado para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta; además, debe ser preparada en la matriz biológica con la

intención de fijar la matriz con concentraciones conocidas de analito. El número de estándares usados para construir una curva de calibración estará en función del rango anticipado de valores analíticos y de la naturaleza de la relación analito-respuesta. Las concentraciones de los estándares deben ser elegidas en base a una variedad de concentraciones que se espera en el estudio en particular. Una curva de calibración debe contener una muestra blanco (muestra de matriz procesada sin estándar interno), una muestra cero (muestra de matriz procesada con estándar interno), y 6 a 8 muestras distintas de cero que cubra el rango esperado, incluyendo el LLOQ (FDA, 2001).

Se debe utilizar el modelo más simple que describa la concentración analito-respuesta y a la vez reunir las siguientes condiciones en el desarrollo de una curva de calibración:

a)- El coeficiente de variación (CV) de la concentración del estándar en el LLOQ debe estar dentro del 20%.

b)- Los CV de las concentraciones de los estándares que no sean el LLOQ deben estar dentro del 15%.

Si la respuesta del método es directamente proporcional a la concentración de la muestra, se esperará, generalmente, una respuesta lineal que debe verificarse calculando la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación para tales resultados, el que deberá ser cercano a 1 (ICH, 2005).

1.6.4 - SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir, al evaluar la sensibilidad de un método, son el LLOD y el LLOQ (FDA, 2001).

1.6.5.1 - LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LLOQ)

Es la concentración más baja de analito en una muestra que es cuantificada con precisión y exactitud aceptables. Se debe analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo y se considera que el punto tiene validez si su valor promedio cae dentro de $\pm 20\%$ del valor nominal con un CV no mayor de 20% (FDA, 2001).

El estándar más bajo en la curva de calibración debe ser aceptado como el límite de cuantificación si reúne las siguientes condiciones:

- a)- La respuesta del analito del LLOQ debe ser por lo menos 5 veces la respuesta comparada con el blanco.
- b)- La respuesta del analito debe ser identificable, discreta y reproducible con una precisión del 20% y una exactitud del 80-120%.

Es muy importante que el LLOQ no se determine por extrapolación por debajo del menor estándar analizado.

1.6.5.2 - LÍMITE DE DETECCIÓN (LLOD)

La concentración más baja de analito en una muestra que es detectada, aunque no necesariamente cuantificada.

Se preparan muestras de concentración conocida y se van diluyendo. Se establece la concentración mínima a la cual el analito puede ser detectado. Se comparan muestras de concentraciones conocidas muy bajas con las señales de muestras blanco (FDA, 2001). El límite de detección aceptado estará en una relación 3:1 con la respuesta del blanco, basado en la relación señal ruido (ICH, 2005).

1.6.5 - ESTABILIDAD

La estabilidad de un metabolito en un fluido biológico está en función de sus condiciones de almacenamiento, sus propiedades químicas, la matriz y el envase. La estabilidad de un analito en una matriz en particular o en un envase es relevante sí sólo se mantienen las condiciones en la que fueron validadas y no son extrapolados a otras matrices, envases, etc. Los procedimientos de estabilidad deben evaluar la estabilidad de un analito durante la recolección y el manejo, después de un almacenamiento a largo plazo (a la temperatura de congelación) y de corto plazo (a la temperatura ambiente) y después de pasar por ciclos de congelación y descongelación. Estas condiciones, deben simular, las situaciones que puedan surgir durante el manejo real de una muestra y el análisis. También se debe analizar el estándar en la solución madre (FDA, 2001).

Todas las determinaciones deben utilizar un conjunto de muestras preparadas desde una solución madre recién preparada de la sustancia analizada, en el caso de analito libre, sin interferencia de sustancias biológicas. Estas soluciones madres deben estar preparadas en un disolvente apropiado a concentraciones conocidas (FDA, 2001).

1.7 - HIPÓTESIS DE TRABAJO.

El β -hidroxibutirato es cuantificable en leche cruda de vaca mediante una técnica espectrofotométrica UV visible validada.

1.8 - OBJETIVO GENERAL.

Validar un método espectrofotométrico para cuantificar β -hidroxibutirato en muestras de leche cruda de vaca.

1.9 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Implementar un método espectrofotométrico para cuantificar β -hidroxibutirato en leche.
- Establecer los parámetros de validación: exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), linealidad, sensibilidad y estabilidad, de acuerdo a lo especificado en la guía de validación para la Industria de la FDA para métodos bioanalíticos.

2 - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 - MATERIALES

2.1.1 - EQUIPOS

- Espectrofotómetro Thermo Scientific. Modelo Evolution 300_{uv-vis}.
- Centrífuga Thermo IEC. Modelo Centra CL3R, rotor 243.
- Balanza Analítica Precisa Gravimetrics AG. Modelo XT220A.
- Balanza Granataria Sartorius. Modelo MC1.
- Agitador Térmico Sybron Thermoline type 1000 stir plate.
- Agitador Vortex.
- pH-metro Schott. Modelo pH-meter CG 825.
- Tubos cónicos de centrifuga plásticos de 50 mL.
- Matraz volumétrico de 25 mL.
- Baño termoregulado.
- Micropipetas.

2.1.2 - REACTIVOS

- Nitrógeno gaseoso, Lynde AGA.
- Metanol grado HPLC, Merck. Lote: K40351807 934.
- Sal sódica de DL-3- hidroxibutirato, Sigma-Aldrich. Lote: 109H2604.
- β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, Sigma-Aldrich. Lote: 038K7002.
- 3-hydroxybutyrate dehydrogenase 25mg/5mL, Roche. Lote: 11976029.
- Tris C (trishidroximetil metano) 100%, Winkler. Lote: R7691.
- $MgCl_2 \times H_2O$, Merck. Lote: A597733.
- Ácido Oxálico, Merck. Lote: 843481.
- HCl, Winkler.
- $(NH_4)SO_4$, Merck. Lote: A460817.
- Solución Calibradora de β -hidroxibutirato 50 mg/dL, Sigma Diagnostics. Lote: 093H62664.

2.2 - MÉTODOS

2.2.1 - OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se utilizó leche de 4 vacas, clínicamente sanas, pertenecientes a un rebaño experimental del Hospital Veterinario de la Universidad Austral, tenían aproximadamente 65 días de lactancia al iniciar el estudio y no estaban recibiendo tratamiento farmacológico. Las muestras fueron obtenidas en la ordeña de la mañana. Las vacas se seleccionaron considerando la menor diferencia de absorbancia obtenida al analizar el β -OHB en las muestras de leche mediante el método que utiliza la enzima β -OHB deshidrogenasa para formar NADH, el que fue leído en un espectrofotómetro a 340 nm.

2.2.2 - PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- En un tubo de ensayo, limpio y seco, colocar 1 mL de leche cruda fortificada con β -OHB y añadir 6 mL de metanol.
- Agitar el tubo vigorosamente por varios segundos.
- Reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 10 minutos a 1246 G.
- Extraer con una pipeta Pasteur la totalidad del sobrenadante y descartar el precipitado.
- Evaporar el sobrenadante a sequedad en una corriente de nitrógeno y en un baño maría a 37°C.
- Disolver y reconstituir la muestra con 1 mL de agua destilada (muestra reconstituida).
- Agitar la muestra y mezclar por unos minutos.
- Medir en espectrofotómetro a 340 nm.

2.2.3 - DETERMINACIÓN DE β - HIDROXIBUTIRATO

La determinación enzimática de β -OHB consiste en medir el cambio en la absorbancia (Δ abs.) a 340 nm debido a la reducción de NAD^+ a NADH que utiliza β -OHB deshidrogenasa. La cantidad de NAD^+ reducido es directamente proporcional al β -OHB en la solución (FAO-IAEA, 1993).

Para ello, una alícuota de 25 μL de la muestra reconstituida como se explica en la sección 2.2.2 se colocó sobre 1,25 mL de tampón Tris y posteriormente se le adicionó 50 μL de NAD^+ . Se agitó fuertemente por aproximadamente 7 segundos en forma manual y se dejó reposar 10 minutos, posteriormente se leyeron las soluciones en un espectrofotómetro a 340 nm. Luego, se agregaron 10 mL de tampón fosfato que contiene la enzima β -OHB deshidrogenasa en una proporción 1:1, se agitó manualmente y se leyó a los 45 minutos desde la adición de la enzima (FAO-IAEA, 1993).

2.2.4 - PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE

En un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó 126,09 mg del isómero de la sal sódica D- β -OHB, pero como se utilizó una mezcla racémica de esta sal en una proporción 1:1 y al 98% de pureza, se pesaron 257,3 mg en una balanza analítica, para luego completar hasta el aforo con agua destilada, obteniendo una concentración final de 40 mM.

2.2.5 - FORTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras de leche fueron fortificadas mediante la adición de alícuotas de la solución madre de β -OHB 40 mM. Se prepararon alícuotas con 0,1875; 0,3125; 0,4688; 0,6250; 0,9375 y 1,2500 mL que luego se completaron hasta el aforo con leche cruda en un matraz de 25 mL. Las

muestras entonces quedaron fortificadas a las concentraciones de 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 mM para su posterior utilización en las diferentes etapas de validación.

2.2.6 - VALIDACIÓN

2.2.6.1 - CURVA DE CALIBRACIÓN

Para construir la curva de calibración se utilizaron muestras de leche cruda fortificada con β -OHB. Cada concentración se preparó en sextuplicado. Las muestras fueron tratadas y leídas en un espectrofotómetro según lo descrito en la sección 2.2.2. Las lecturas de las muestras fortificadas fueron analizadas contra las lecturas de muestras de leche sin fortificar (muestra blanco). Se realizaron diferentes curvas de calibración con distintos rangos de concentración del analito para obtener una respuesta lineal y pesquisar el LLOQ de modo de disminuir al máximo los errores relativos del método. Las concentraciones fueron:

a)- Primera curva de calibración: La leche se fortificó con las concentraciones 0,01; 0,03; 0,05; 0,075; 0,1; 0,3 mM de β -OHB, pero en los primeros puntos no se obtuvo respuesta.

b)- Segunda curva de calibración: Se aumentó la concentración del β -OHB en leche, fortificándose a 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM de β -OHB.

c)- Tercera curva de calibración: Se acotó la concentración del β -OHB a las siguientes concentraciones 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 mM.

Obteniendo la ecuación de la recta, $y = bx \pm a$, donde “a” es el intercepto en “y”, “b” es la pendiente, “y” es la absorbancia y “x” es la concentración de β -OHB. La linealidad de la curva

fue evaluada por regresión y R^2 (coeficiente de determinación) que debe ser lo más similar a 1 para considerar la respuesta lineal.

2.2.6.2 - SENSIBILIDAD

Límite Inferior de Detección

Esta determinación se efectuó por comparación de leche fortificada a bajas concentraciones de β -OHB con leche sin fortificar (blanco), siendo positiva cuando la señal de la muestra fortificada con β -OHB superó en una relación de 3 es a 1 la señal emitida por el blanco (método basado en la relación señal ruido).

Límite Inferior de Cuantificación

En leche fortificada con β -OHB se determinó la menor concentración que el método puede detectar con precisión y exactitud. El punto de menor concentración en la curva de calibración que fue aceptado como el límite de cuantificación es el que cumplió con las siguientes condiciones:

- La respuesta generada por β -OHB en el LLOQ fue al menos 5 veces comparada con la respuesta del blanco (leche sin fortificar).
- La respuesta del analito fue identificable, discreta y reproducible con una precisión del CV menor al 20 % y exactitud dentro del 80-120 %.

Se realizaron 5 determinaciones de la concentración más pequeña de la curva de calibración, y con ellas se realizaron los cálculos de exactitud, precisión y CV.

2.2.6.3 - EXACTITUD

La exactitud se determinó por análisis repetidos de muestras de leche fortificada con concentraciones 0,3; 1,0; 2,0 mM, de β -OHB en muestras de leche cruda de vaca. Se realizó la medición usando cinco determinaciones por concentración, correspondiendo la menor concentración al LLOQ. Posteriormente, se calculó la media de la concentración experimental y su porcentaje de recuperación respecto de la concentración real.

Para afirmar que el método es exacto, la media de cada concentración de β -OHB debe estar entre un 85 y un 115% del valor real, excepto en LLOQ, donde la media debe estar entre un 80 y un 120 %. En el porcentaje de recuperación corresponde a:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración real}} \times 100$$

2.2.6.4 - PRECISIÓN

Repetibilidad

Para determinar si el método utilizado es preciso en condiciones de repetibilidad, se utilizaron muestras de leche fortificada con β -OHB en tres concentraciones distintas, 0,3; 1,0; 2,0 mM. Cada una de ellas se procesó 5 veces con el método analítico completo durante el mismo día, obteniéndose un total de 15 determinaciones. Posteriormente, con los resultados se calculó la media y CV. Según la guía de la FDA (2001) el método se considera preciso si para cada concentración el CV es inferior a un 15 % y a un 20% en el LLOQ.

Precisión Intermedia

El estudio de precisión intermedia se realizó con muestras fortificadas de leche cruda a concentraciones de 0,3; 1,0; 2,0 mM, que al igual que en la repetibilidad se realizaron en base a 5 muestras de las distintas concentraciones. Este proceso se efectuó de la misma manera durante 3 días consecutivos, para luego obtener promedio y CV.

2.2.6.5 - ESTABILIDAD

Congelamiento y descongelamiento

Muestras en triplicado con concentraciones de 0,3; 1,0; 2,0 mM de β -OHB fueron congeladas a $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después de 24 horas se descongelaron a temperatura ambiente. Este ciclo se repitió tres veces. Al terminar el último ciclo de congelamiento y descongelamiento se procedió a analizar cada muestra mediante el método bioanalítico y calcular Δ absorbancia que fue comparada con los valores obtenidos en leche fresca (muestra recién obtenida) a las mismas concentraciones.

Estabilidad a corto plazo

Se fortificó leche cruda a las concentraciones 0,3; 1,0; 2,0 mM de β -OHB en triplicado. Se congelaron a $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego descongeladas y mantenidas por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las 9 muestras en total fueron analizadas con el método bioanalítico y se calculó

la Δ absorbancia, para luego comparar estos resultados con los obtenidos en muestras de leche fresca fortificada a las mismas concentraciones.

Estabilidad de la solución madre

La solución madre (40 mM de β -OHB) preparada fue guardada en un refrigerador a temperatura entre 0 y 5 °C. De esta solución se tomaron alícuotas para preparar estándares a 1,0 mM de β -OHB. Este procedimiento se realizó también con una solución madre fresca preparada el mismo día de este análisis. Luego se compararon los resultados de la solución fresca con las almacenadas, según el periodo de tiempo transcurrido desde su preparación hasta el día en que se realizó el análisis. La concentración de los estándares se obtuvo por medio de un estándar de referencia a la misma concentración.

3 - RESULTADOS

3.1 - CURVA DE CALIBRACIÓN Y LINEALIDAD

En la Tabla N°1 se muestra los resultados del \bar{X} , DE y CV de la Δ Absorbancia para cada concentración de leche cruda fortificada con β -OHB. Se observa que el \bar{X} de lecturas es directamente proporcional a la concentración y que el CV disminuye a medida que la concentración aumenta. Con los datos de la tabla se construye la curva de calibración mostrada en el gráfico N° 1 para leche cruda fortificada con β -OHB.

Tabla N°1: Media (\bar{X}), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) de la diferencia (Δ) de absorbancia de seis concentraciones de β -hidroxibutirato (β -OHB) en muestras de leche cruda fortificadas y analizadas en sextuplicado.

Concentración β -OHB (mM)	Δ Absorbancia (x 100)		
	\bar{X}	DE	CV
0,30	1,946	0,146	7,49
0,50	3,069	0,224	7,30
0,75	4,578	0,247	5,39
1,00	6,169	0,326	5,29
1,50	9,403	0,452	4,81
2,00	12,328	0,297	2,41

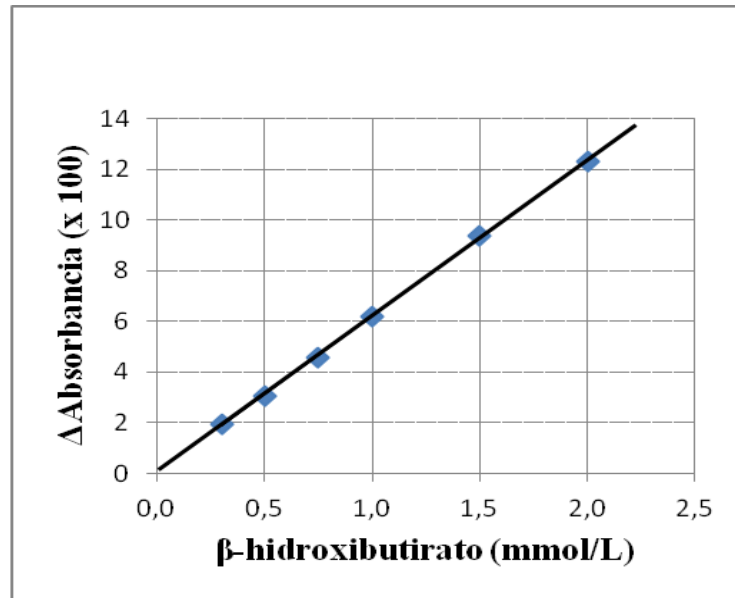


Gráfico N°1: Curva de regresión entre la concentración de β -OHB y la diferencia de absorbancia en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.

La curva de calibración del gráfico N° 1 muestra la relación concentración (mmol/L)/respuesta (Δ absorbancia x 100) del β -OHB. Con ella se puede estimar la concentración de una muestra de leche con β -OHB utilizando su ecuación de la recta $y = 6,1768 x + 0,0206$. Se observa que las concentraciones de β -OHB utilizadas tienen respuesta lineal, en relación a la concentración de β -OHB, con un R^2 de 0,9996.

3.2 - SENSIBILIDAD

Se calculó la \bar{X} de los resultados de una muestra de leche sin fortificar (blanco) analizada en sextuplicado de la cual se obtuvo un Δ absorbancia, amplificada por 100, de $0,341 \pm 0,05$ nm. Ya que el LLOD corresponde a 3 veces el valor del blanco, la concentración equivale a una concentración de 0,16 mM; mientras que el LLOQ, que debe ser 5 veces el valor de éste, y

corresponde a una concentración de 0,27 mM, el que fue aproximado a 0,3 mM para la curva de calibración, obteniéndose para este último una precisión con un CV de 6,3 % y una exactitud con un porcentaje de recuperación del 100,6 %.

3.3 - PRECISIÓN

3.3.1 - REPETIBILIDAD

Según curva de calibración, se calculó \bar{X} y CV que se muestran en la Tabla N°2. Se observa que para las concentraciones 0,3; 1,0; 2,0 mM de β -OHB los CV fueron 6,3%, 3,9% y 1,2% respectivamente. Se observa que el CV disminuye conforme la concentración de β -OHB aumenta.

Tabla N°2: Media (\bar{X}), coeficiente de variación (CV) y criterios de aceptación para tres concentraciones de β -OHB obtenidas experimentalmente en quintuplicado, en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.

Concentración real de β -OHB (mM)	\bar{X} Concentración experimental de β -OHB (mM)	CV (%)	Criterios de aceptación
0,3	0,302	6,3	< 20%
1,0	0,991	3,9	< 15%
2,0	2,071	2,4	< 15%

3.3.2 – PRECISIÓN INTERMEDIA

En la Tabla N°3 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de precisión intermedia, en ellas se identifican la media y el CV obtenido para cada día.

Tabla N°3: Media (\bar{X}) y coeficiente de variación (CV), obtenidos en diferentes días, para tres concentraciones de β -OHB obtenidas experimentalmente en quintuplicado, en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.

Concentración real de β -OHB (mM)	Día 1		Día 2		Día 3	
	\bar{X} Concentración experimental de β -OHB (mM)	CV (%)	\bar{X} Concentración experimental de β -OHB (mM)	CV (%)	\bar{X} Concentración experimental de β -OHB (mM)	CV (%)
0,3	0,31	7,57	0,30	6,29	0,32	8,08
1	1,00	5,31	0,99	3,95	1,02	6,60
2	1,99	2,42	2,02	2,40	1,96	3,65

3.4 - EXACTITUD

En la Tabla N°4 se observa que el porcentaje de recuperación con respecto al valor real es semejante para las tres concentraciones, en ellas permanece siempre dentro del rango del criterio de aceptación de la Guía de la FDA (2001).

Tabla N°4: Media (\bar{X}), porcentaje de recuperación y criterios de aceptación de tres concentraciones de β -OHB obtenidas experimentalmente en quintuplicado, en muestras de leche cruda fortificada con β -OHB.

Concentración real de β -OHB (mM)	\bar{X} Concentración experimental de β -OHB (mM)	% de recuperación	Criterios de aceptación
0,3	0,302	100,6	> 80% y < 120%
1,0	0,991	99,1	> 85% y < 115%
2,0	2,071	101,1	> 85% y < 115%

3.5 - ESTABILIDAD

3.5.1 - CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO

Se calculó el Δ absorbancia, entregando los resultados en la Tabla N°5. La Δ absorbancia resulta negativa debido a que las muestras que fueron sometidas a los ciclos de congelamiento y descongelamiento tuvieron muy baja absorbancia en la segunda lectura en comparación con la primera, por lo que no se observa coincidencia entre las muestras de leche fortificadas y la leche fresca fortificada.

Tabla N°5: Diferencia (Δ) de absorbancia de leche sometida a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento comparada con leche fresca, utilizando tres concentraciones en triplicado.

Concentración de β -OHB (mM)	Δ absorbancia x 100 de las muestras	Δ absorbancia x 100 leche fresca
0,3	-12,38	1,89
	-11,01	2,18
	-11,64	1,93
1,0	-10,35	6,71
	-10,06	6,32
	-10,44	5,88
2,0	-9,37	12,01
	-9,43	12,64
	-9,52	11,78

3.5.2 - ESTABILIDAD A CORTO PLAZO

Se calculó el Δ absorbancia de cada concentración de las muestras de leche cruda fortificada con β -OHB, comparándolas con muestras de leche fresca, tal como se indica en la Tabla N°6, apreciándose que estos resultados no coinciden con los resultados en leche fresca.

Tabla N°6: Diferencias (Δ) de absorbancia para tres concentraciones analizadas en triplicado de leche fortificada con β -OHB, sometidas a congelamiento-descongelamiento y almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente, comparadas con leche fortificada fresca.

Concentración de β -OHB (mM)	Δ absorbancia x 100 de las muestras	Δ absorbancia x 100 leche fresca
0,3	-7,47	1,89
	-7,77	2,18
	-7,65	1,93
1,0	-9,05	6,71
	-8,95	6,32
	-8,83	5,88
2,0	-9,43	12,01
	-9,52	12,64
	-9,71	11,78

3.5.3 - ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN MADRE

Se puede apreciar que la solución que fue almacenada por 120 días no tiene una variación importante en relación a la solución que no fue almacenada, al contrario de la que lleva el periodo más largo de almacenamiento (Tabla N°7).

Tabla N°7: Media (\bar{X}) y porcentaje de concentración de las soluciones madre de β -hidroxibutirato almacenadas a distintos periodos de tiempo y analizadas en triplicado, respecto a un estándar de referencia*.

Fecha	Tiempo	\bar{X}	%
17-12-2010	0 días	0,995	99,72
19-08-2010	120 días	0,994	99,55
20-01-2010	331 días	0,868	86,79

*Lab. Randox, ensayo realizado el 17-12-2010.

4 - DISCUSIÓN

Existen diversas guías de validación, pero en este trabajo se seleccionó una guía orientada a validar métodos analíticos para ser utilizados en muestras biológicas, ya que este tipo de muestras son complicadas de validar, debido a que las matrices biológicas sufren variaciones entre los diferentes organismos vivos, en una misma especie e incluso en un mismo organismo. Los parámetros estudiados para validar este estudio están basados en el documento “Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation” de la FDA (2001).

La guía de validación de la FDA indica que para realizar estudios de validación se deben evaluar entre los fundamentales la selectividad, que es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra. Cada muestra blanco debe ser la prueba de interferencias, y la selectividad debe estar garantizada en el LLOQ. Las sustancias potencialmente interferentes son componentes endógenos en la matriz, metabolitos o productos exógenos (medicamentos, suplementos alimentarios, etc.). Para la selectividad, debe haber evidencia de que la sustancia que se cuantifica es el analito deseado.

En la literatura se indica que los métodos espectroscópicos (UV, IR, etc.) frecuentemente adolecen de selectividad y que los métodos cromatográficos se consideran selectivos (Castillo y González, 1996). Lamentablemente, no se dispuso de un método de separación para poder apartar, en relación al tiempo, la lectura del NADH con los otros componentes de la matriz que pudiesen interferir a 340 nm, de esta forma, se puede considerar el tiempo de retención una forma de selectividad (Quattrochi *et al.*, 1992) porque los interferentes tendrían otros tiempos de retención en la separación.

El empleo de técnicas enzimáticas para la transformación de analitos, consistentes en la incubación de la muestra en presencia de la enzima apropiada, en condiciones adecuadas de

temperatura y pH, pueden brindar un gran apoyo, debido a la selectividad propia de la enzima (Quattrochi *et al.*, 1992). Por lo que el método usado en este trabajo ve muy incrementada su selectividad por el hecho de tener acoplada una reacción enzimática, con el objetivo de detectar indirectamente la concentración de β -OHB mediante la absorción de NADH formado en la reacción.

Por otra parte, el documento sugiere que entre los parámetros se debe evaluar la precisión intermedia, ésta expresa variaciones dentro del laboratorio y se realiza con el objetivo de obtener la variación de respuesta del método entre diferentes equipos, días y analistas. El análisis de precisión intermedia no fue determinado de manera completa, debido a que no se contaba con los suficientes analistas que dominen la técnica, ni con otros espectrofotómetros disponibles. Para el análisis entre distintos días, el método se muestra preciso, ya que cumple con los criterios de la guía de la FDA (2001) durante os tres días en que se realizó este análisis; donde el CV no supera el 15% en las diferentes concentraciones, ni tampoco sobrepasa el 20% para el LLOQ.

El LLOQ es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud. Este límite, no representa niveles en los que la cuantificación es imposible; es simplemente una región en que la magnitud de las incertidumbres asociadas es de valor semejante al resultado real. Debido a que no existe un acuerdo, hay diferentes formas para determinar el LLOQ, hay algunas más exigentes y otras que lo son bastante menos. La guía de validación de la FDA (2001) exige en forma moderada indicando que el LLOQ debe ser 5 veces la respuesta del blanco; de acuerdo a ello, en este estudio el valor fue 0,3 mmol/L. Este criterio también es el mismo para otras Guías más actuales de validación para métodos bioanalíticos (EMA, 2011), por lo que obtendríamos el mismo valor para el LLOQ,

considerando esto, valores por bajo este punto no tendrían una precisión ni exactitud adecuadas (ICH, 2005).

El método utilizado se ve limitado por el LLOQ, ya que la concentración de β -OHB en la leche corresponde entre un 10 a 15 % de lo presente en sangre (Duffield, 2000). Por lo tanto, para cuantificar el metabolito en leche, se requiere de métodos analíticos que posean una mayor sensibilidad. Pero esta cantidad de analito se verá modificada dependiendo del periodo de lactancia, la raza y el estado metabólico de la vaca.

El porcentaje de recuperación es levemente variable, oscilando desde un 99% hasta más de un 101%, aproximadamente. Estas pequeñas variaciones pueden deberse a los cambios en las concentraciones basales de β -OHB en la vaca, y también a pérdidas que pueden producirse en el tratamiento de las muestras, pero este valor oscila muy cercano a una recuperación del 100% del β -OHB adicionado a la leche cruda.

En cuanto a la estabilidad de la muestra, a pesar que el método estudiado mostró ser muy eficaz para la extracción de β -hidroxibutrato en leche cruda, los análisis deben realizarse con leche recién obtenida, ya que al estar almacenada, sufriría modificaciones que alterarían los resultados del método. La muestra no es estable en condiciones de almacenamiento a corto plazo, ni al ser sometida a los ciclos de congelamiento-descongelamiento, ya que en ambos casos no se registra concordancia respecto de los valores conseguidos en leche recién obtenida. Por otra parte, la Guía de validación indica que si en el estudio de estabilidad en condiciones de congelamiento y descongelamiento no cumple con los criterios de aceptación, se debe realizar otro estudio, congelando las muestras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual no se realizó, por no contar con este equipamiento.

Es preciso considerar el horario de obtención de muestras ya que la vaca sufre variaciones diurnas en las concentraciones de β -OHB. En el plasma, las concentraciones aumentan durante la noche, mientras que la leche sufre modificaciones durante el día aumentando la concentración de β -OHB entre ordeñas y disminuyendo durante las ordeñas (Nielsen *et al.*, 2003). Todos los análisis fueron realizados con leche de la ordeña de la mañana de modo de evitar que las concentraciones de β -OHB estén aumentadas, lo que permite obtener una curva de calibración más lineal, ya que considerando las bajas concentraciones de leche en sangre y esto último, se pueden conseguir muestras de leche que contengan concentraciones basales escasas y constantes de β -OHB para generar la curva.

En la literatura se describen diferentes pre-tratamientos para separar la grasa y las proteínas del sobrenadante, que es donde está contenido el β -OHB. Es posible utilizar ácido perclórico 0,7 M (Enjalbert *et al.*, 2001); Sin embargo, el problema es que la muestra se diluye, sin considerar las bajas concentraciones de β -OHB existentes en leche. Por otra parte, el uso de ácidos modifica las propiedades del método cuantitativo, que requiere pH 9, disminuyendo el pH de la solución, por lo que antes de analizar la muestra, se debe aumentar el pH diluyendo aún más la concentración del analito en ésta. El método de separación propuesto en este trabajo utiliza metanol, el sobrenadante es extraído y evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para finalmente reconstituir con agua. Esto permite obtener una muestra, sin grasa y proteínas, con la misma concentración que tenía antes de pre tratar la leche.

La técnica más utilizada, para la cuantificación de β -OHB en plasma o suero indica que el método es lineal entre 0 a 8 mmol/L, la precisión tiene un CV de 3,4 % para una concentración de 0,56 mmol/L y 2,2 % para 1,47 mmol/L. La sensibilidad fue calculada considerando 2 DE de la precisión, con lo que se obtiene como LLOD un valor de 0,064 mmol/L. La recuperación fue

variable entre 95.5 % y 103 % en suero dependiendo de la especie utilizada (ganado, ovejas, cabras y camellos) (FAO-IAEA, 1993). Este trabajo se realizó aplicando este método, pero usando una matriz diferente. Se trabajó con concentraciones más bajas en otros estudios (FAO-IAEA, 1993; McMurray *et al.*, 1984), ya que lo que interesa medir son concentraciones de β -OHB muy bajas; tal como se presentan en leche de vaca. Se obtuvo una buena respuesta lineal a partir de 0,3 mmol/L; sin embargo, no se obtuvieron resultados tan precisos como lo indicado para el suero o plasma. La sensibilidad fue de 0,16 mmol/L para el LLOD, por lo que el método se afectó negativamente en este sentido, en contraposición a la recuperación que estuvo entre 99 % y 101 %. Todos los análisis fueron realizados inmediatamente luego de la obtención de la muestra; ya que pasadas unas horas se comenzaban a tener variaciones considerables en los resultados del método.

Este mismo método de determinación enzimática en plasma o suero fue utilizado por otros investigadores (McMurray *et al.*, 1984), quienes evaluaron linealidad, en la que obtiene un coeficiente de correlación de 0,994 con una ecuación lineal $y = 1,36 x + 0,190$ usando concentraciones desde 0,3 mmol/L hasta 10 mmol/L de β -OHB. En precisión, obtiene un CV que varía desde 10 % para la concentración más baja (0,3 mmol/L de β -OHB) hasta 1 % para las concentraciones más altas (6 - 9 mmol/L de β -OHB). La recuperación analítica en ese estudio varió desde 99% para 2 mmol/L a 91% para 9,5 mmol/L. Las muestras para el análisis las guardaron por no más de 7 días, para posteriormente realizar los análisis.

Si se comparan los análisis con el método anteriormente descrito, se puede observar que los parámetros de linealidad, recuperación y CV varían en forma positiva para este estudio. Por otro lado, los análisis para suero o plasma consideran concentraciones mayores (hasta 8 ó 10 mmol/L) en la curva de calibración; lo que les debiera favorecer, porque el método tiene una

respuesta lineal hasta 10 mmol/L y a mayores concentraciones mejores son los resultados de los parámetros de validación. En este estudio, debido a la baja concentración del analito en leche, se consideró 2 mmol/L de β -OHB como punto de corte en la curva de calibración, lo que debiera ser desfavorable.

Últimamente se han descrito otros métodos para cuantificar β -OHB en leche. Uno de ellos utiliza una técnica fluorométrica que es más sensible que los métodos convencionales para determinar β -OHB (Hassan y Cooper, 2009), lamentablemente, los equipos para este método son muy costosos lo que perjudica su utilización. Por otra parte, para determinar la concentración de β -OHB en plasma de ratas se ha propuesto recientemente un método en HPLC, en el que se observa una alta correlación con el método espectrofotométrico, pero que este nuevo método tiene una sensibilidad extraordinariamente aumentada y requiere pequeños volúmenes de muestra (Takashi, 2010).

En general, se logró obtener un método más exacto y preciso, y que permite cuantificar en leche las concentraciones de β -OHB. Sin embargo, debe tenerse presente que si el interés es usar este método para identificar vacas con cetosis subclínica, este método no resulta apropiado, debido a que el LLOQ no alcanza a cuantificar el β -OHB presente en este tipo de vacas, por lo que se sugiere seguir perfeccionando este método para aumentar su sensibilidad.

5 - CONCLUSIONES

- El método espectrofotométrico para cuantificar β -OHB en leche bovina cumple con los criterios de validación exactitud, linealidad y precisión de acuerdo a la Guía de Validación de la FDA (2001).
- El método implementado es lineal en el rango de 0,3 a 2 mmol/L de β -OHB en leche bovina.

6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpanyung E (2006). Major and trace element levels in powdered milk. *Pakistan J Nutr* 5: 198-202.

Castillo B, González R (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev Cubana Farm* 30: 1-7.

Duffield T (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; 16: 231–253.

Duffield T, Lissemore K, McBride B, Leslie K (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci* 92: 571–580.

Echávarri V, Muñoz K, Amunátegui R (2010). Carne bovina: Tendencias de producción, precios y comercio exterior. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – ODEPA, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. *Boletín* – Julio 2010.

EMA, European Medicines Agency (2011). Guideline on bioanalytical method validation. *Committee for medicinal products for human use, EMA, Londres*. 22 pág.

Enjalbert F, Nicot M, Bayourthe C, Moncoulon R (2001). Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J Dairy Sci* 84:583–589.

FAO, Food and Agriculture Organization (2009). “El estado mundial de la agricultura y la alimentación”. La ganadería a examen. Subdivisión de Políticas y Apoyo en Materia de Publicación Electrónica. *División de Comunicación, FAO, Italia*. 184 pág.

FAO-IAEA, Joint Food and Agriculture Organization – International Atomic Energy Agency, Programme, (1993). β -Hydroxybutyrate Kit Protocols. En: Nutritional Metabolite Kit Protocols. *Joint FAO/IAEA*. Austria. 17 pág.

FDA, Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. *U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM)* Estados Unidos. 22 pág.

Garrett R, Grisham C (2010). Biochemistry, 4th Ed. *Cengage Learning* Boston, Canada. Pagina 718.

Gasque R (2008). Enciclopedia bovina. Universidad Nacional Autónoma de México. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Mexico. 433 pág.

Geishauser T, Leslie K, Kelton D, Duffield T (1998). Evaluation of five cowside tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 81:438-43.

Geishauser T, Leslie K, Kelton D, Duffield D (2001). Monitoring subclinical ketosis in dairy herd. *Compendium*. 23, 65- 71.

Guthrie J, Jordan F (1972). Amine-catalyzed decarboxylation of acetoacetic acid. The rate constant for decarboxylation of β -imino acid. *J Am Chem Soc* 94, 9136-9141.

Hammon D, Evjen I, Dhiman T, Goff J, Walters J (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Ve Immunol Immunopath* 113: 21–29.

Hassan H, Cooper G (2009). Determination of β -hydroxybutyrate in blood and urine using gas chromatography–mass spectrometry. *J Analyt Toxicol* 33: 502-507.

ICH, International Conference on Harmonisation (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *EMA, European Medicines Agency*. European Union, Japan and USA. Pág. 5 y 11.

Jensen R (1995). Handbook of Milk Composition. *Academic Press*, New York. 944 pág.

Laffel L (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412-46.

LeBlanc S (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Develop* 56: S29-S35.

McMurray C, Blanchflower W, Rice D (1984). Automated kinetic method for d-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. *Clin Chem* 30: 421-425.

Nielsen N, Ingvarsen K, Larsen T (2003). Diurnal variation and the effect of feed restriction on plasma and milk metabolites in TMR-fed dairy cows. *J Vet Med A* 50, 88–97.

Opitz R., Guerrero A, Esnaola V, Amunátegui R (2010). Leche: producción, recepción, precios y comercio exterior. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – *ODEPA*, *Ministerio de Agricultura, República de Chile*. Boletín – agosto 2010.

Quattrochi O, Abelaira de Andrizzi S, Laba R (1992). Introducción a HPLC aplicación y práctica. *Artes gráficas Farró S.A.* Buenos Aires, Argentina. Página 311.

Suriyasathaporn W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen E, Schukken Y (2000). Hyperketonemia and udder defense: a review. *Vet Res* 31: 397–412.

Takashi I (2010). Enzymatic-HPLC method to analyze D-3-hydroxybutyric acid in rat serum. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1578-1582.

7 - ANEXOS

a) **Preparación del tampón Tris.**

En un vaso de precipitado de 500 mL con 200 mL de agua destilada, disolver 6,25 g de TRIS C [Tris (hidroximetil) aminometano], 225 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y 350 mg de ácido oxálico. Ajustar el pH con una solución 1 M de HCl hasta $\text{pH } 9,0 \pm 0,1$ y transferir la solución a un matraz aforado. Diluir hasta la marca con agua destilada.

b) **Preparación de la solución NAD^+**

Disolver 0,25 g de sal NAD^+ en 25 mL de agua destilada