

Comunicación breve

Espectroscopía infrarroja aplicada al análisis de los calculos urinarios

RECIBIDO: 20/6/08

ACEPTADO: 3/9/08

Denner, S. • Sobrero, S. • Fernández, V. • Brissón, C. • Marsili, S. • Taher, H. • Perin, J.C. • Juriol, L. • Tomas, L.

Facultad de Bioquímica y Ciencias. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, Ciudad Universitaria-Paraje el Pozo-C.C: 242 (3000).Santa Fe. Tel: (0342) 4575215 (int:138) - Fax:(0342)4575221. Email: sdenner@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Determinar la composición química de los cálculos urinarios tiene valor predictivo de las anormalidades metabólicas subyacentes. En nuestro medio, se realiza el análisis químico semi-cuantitativo, considerado poco satisfactorio por la dificultad de resolver las mezclas complejas y la baja sensibilidad de las reacciones usadas. El objetivo de este trabajo es determinar la composición química de los cálculos urinarios aplicando espectroscopia infrarroja. Se obtuvieron los espectros de dos series de muestras. La Serie 1 (biblioteca espectral de referencia) conformada por sustancias patrones de los constituyentes más comunes de los cálculos. La Serie 2, con los mismos constituyentes pero obtenidos a partir de cálculos urinarios ya analizados. Cada espectro de la Serie 2 se comparó con los de la Serie 1 obteniéndose siempre un coeficiente de correlación mayor a 0.90 con el estándar de la biblioteca espectral de composición más próxima. El método se considera apto para complementar el análisis de rutina.

PALABRAS CLAVE: Urolitiasis, espectroscopía infrarroja.

SUMMARY: *Infrared spectroscopy in kidney stone analysis*

Determining the chemical composition of the kidney stones has a predictive value over the underlying metabolic diseases. Here, in our city, only the semi-quantitative chemical analysis is performed, which is considered little satisfactory because of the difficulty in solving the complex mixtures and the low sensitivity of the used reactions. The objective of this work is to determine the chemical composition of the kidney stones applying IR spectroscopy. The IR spectra of two series samples were obtained: Series 1 (reference spectral library) composed by standard substances of the more common constituents of the stones. Series 2 with the same constituents but obtained from kidney stones of known composition. Each spectrum of series 2 was compared with the ones of series 1. A correlation coefficient, always greater than 0.90, was obtained with the standard of the spectral library of the nearest composition. The method is considered to be competent to complement the routine analysis.

KEYWORDS: Urolithiasis, infrared spectroscopy.

Introducción

La litiasis urinaria se caracteriza por la alta frecuencia de recidiva (7% al año y 50% a los 10 años). Es además, responsable de un alto número de internaciones (13-20%) por complicaciones urológicas. A pesar de esto y del impacto económico que representa, una proporción importante de los enfermos no se somete a estudios metabólicos adecuados, tratándose sólo el episodio agudo (1).

Un elemento básico del tratamiento es conocer la naturaleza de la metabolopatía (2).

Si se dispone del cálculo, ya sea por eliminación espontánea o extracción quirúrgica, determinar la composición química tiene valor predictivo de las anomalías metabólicas subyacentes (3). El procedimiento utilizado para su estudio requiere una combinación apropiada de observación mediante técnicas macroscópicas y microscópicas convencionales con técnicas físicas como espectroscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido con microanálisis por dispersión con rayos X (4,5). En nuestro medio, se realiza solamente el análisis químico cualitativo y semi-cuantitativo, considerado poco satisfactorio por la imposibilidad de resolver las mezclas complejas que pueden formar los cálculos y la baja sensibilidad de las reacciones usadas (6,7).

El análisis por espectroscopía infrarroja proporciona los espectros de los componentes presentes en el fragmento de muestra que se analiza. El espectro puede corresponder a un compuesto puro o a una mezcla de varios. Los posibles compuestos que podemos encontrar en los cálculos renales son limitados por lo que disponiendo de una colección de patrones de los mismos, podemos identificar el componente presente en el cálculo, siendo más problemático cuando el cálculo es mixto .

Todos aquellos compuestos presentes en la muestra en proporciones inferiores al 5% no se podrán detectar con esta técnica debiendo para ello utilizar técnicas más sensibles (8).

Un aspecto que debe contemplarse es el efecto de la matriz proteica que constituye aproximadamente un 2% de la estructura de todos los cálculos.

En el laboratorio Modelo de Química de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, existe un espectrómetro IR con transformada de Fourier.

El objetivo de este trabajo es usar este espectrómetro para determinar la composición química de los cálculos urinarios fijando las características analíticas pertinentes.

Materiales y Métodos

Se usó el equipo FTIR marca Perkin Elmer, Modelo RXI del laboratorio Modelo de Química de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

La técnica que se utilizó para este análisis es el de las pastillas de bromuro de potasio. En su preparación se partió de 1 mg de muestra y 100 mg de bromuro de potasio que se molieron y mezclaron en un mortero de ágata. Luego, la mezcla se comprimió en un molde a suficiente presión (10-15Tn) para producir una pastilla que se colocó en el correspondiente porta-muestras para la obtención del espectro infrarrojo en el rango 4400-400 cm^{-1} .

En una primera etapa se obtuvo el espectro de sustancias patrones de los constituyentes más comunes de los cálculos urinarios (oxalato de calcio, fosfato de calcio, ácido úrico, fosfato amónico-magnésico, carbonato de calcio, cistina) y de las combinaciones más habituales de estas sustancias en proporciones variables.

Se trabajó con testigos comerciales (ácido úrico Sigma U-0881, oxalato de calcio monohidratado Tetrahedron R.A, L-cistina Sigma C-6195, fosfato de calcio Sigma C-4006, carbonato de calcio Sigma C-4830) y otros sintetizados en el laboratorio (fosfato amónico-magnésico, fosfato de calcio, carbonato de calcio).

Esta primera serie de espectros (Serie1) constituyó una biblioteca espectral de referencia.

Para evaluar el desempeño de esta biblioteca, se analizó una nueva colección de muestras (Serie 2).

La Serie 2 estuvo constituida por cálculos de un sólo componente, según los resultados de la metodología convencional aplicada, y por mezclas artificiales de los mismos, simulando algunas de las presentaciones mixtas más frecuentes.

Las proporciones de ácido úrico en oxalato de calcio de las mezclas, de ambas series, fueron de 20, 30, 40, 50, 60 y 80%.

Las proporciones de fosfato amónico-magnésico, fosfato de calcio y carbonato de calcio de la mezcla fueron de 60%, 30% y 10%, respectivamente.

Los espectros de la Serie 2 se compararon con los de la Serie 1 usando el programa Specrum v3.01 del equipo FTIR Perkin Elmer, Modelo RXI que calcula el coeficiente de correlación de Pearson r . Este coeficiente se obtiene dividiendo la covarianza de (X,Y) por el producto de las desviaciones estándar de ambas variables:

$$r = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

donde X: Absorbancia del compuesto correspondiente a la Serie 1, Y: Absorbancia del compuesto correspondiente a la Serie 2, σ_{XY} la covarianza de (X,Y) y σ_x y σ_y son las

desviaciones típicas de las distribuciones marginales.

Resultados y Discusión

I. Las figuras 1 y 2 corresponden a los espectros de las sustancias puras y de dos combinaciones frecuentes (Serie 1).

II. Resultados de la comparación de los espectros de los cálculos urinarios (Serie 2) con la biblioteca espectral de referencia (Serie 1).

II-1. Comparación de los cálculos de un sólo componente

II-1.1. Comparación del espectro de un cálculo de oxalato de calcio

Se comparó el espectro de un cálculo de oxalato de calcio con los patrones puros de la biblioteca espectral de referencia. La figura 3 muestra los espectros correspondientes al cálculo y a los dos patrones más semejantes. En la tabla 1 se consignan los coeficientes de correlación, en orden decreciente, entre los espectros comparados.

Del análisis de estos coeficientes de correlación puede concluirse que existe prácticamente identidad entre la composición del cálculo y el patrón de oxalato de calcio de la Serie 1.

II-1.2. Comparación del espectro de un cálculo de ácido úrico

Se comparó el espectro de un cálculo de ácido úrico con los patrones puros de la biblioteca espectral de referencia. La figura 4 muestra los espectros correspondientes al cálculo y a los dos patrones más semejantes. En la tabla 2 se consignan los coeficientes de correlación, en orden decreciente, entre los espectros comparados.

Del análisis de estos coeficientes de correlación puede concluirse que existe prácticamente identidad entre la composición del cálculo y el patrón de ácido úrico de la Serie 1.

Figura 1: Espectros IR de los patrones de las sustancias puras. a) Oxalato de calcio, b) Ácido Úrico, c) Cistina, d) Fosfato-amónico-magnésico, e) Fosfato de calcio, f) Carbonato de calcio

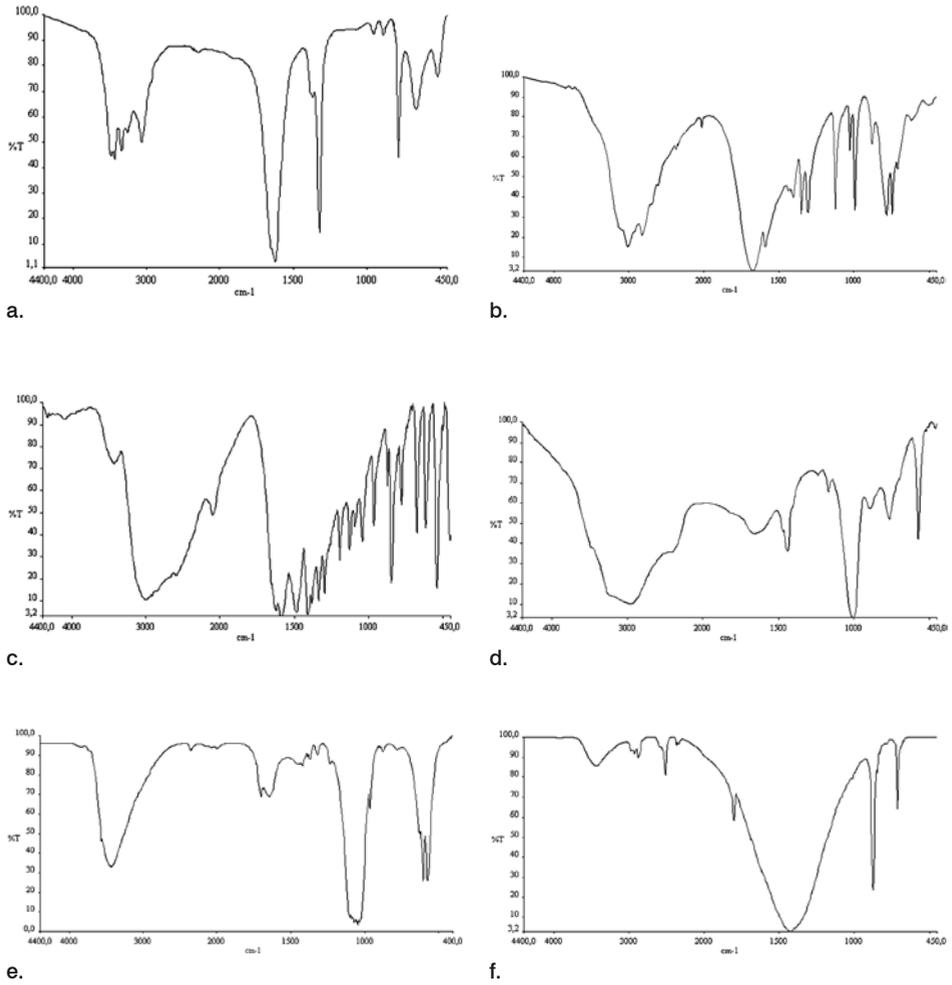
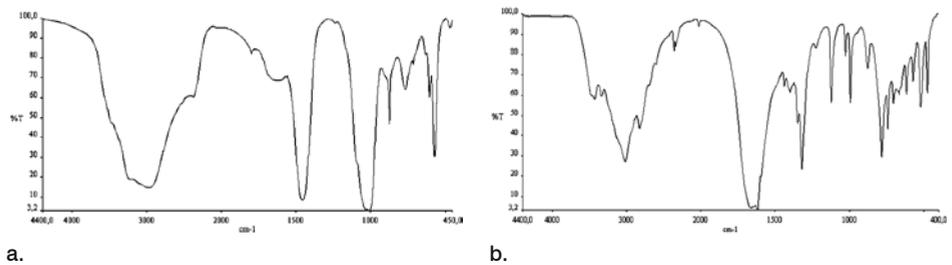


Figura 2: Espectros IR de dos patrones correspondientes a combinaciones habituales. a) Fosfato amónico-magnésico (60%), fosfato de calcio(30%) y carbonato de calcio(10%), b) 50% oxalato de calcio y 50% ácido úrico



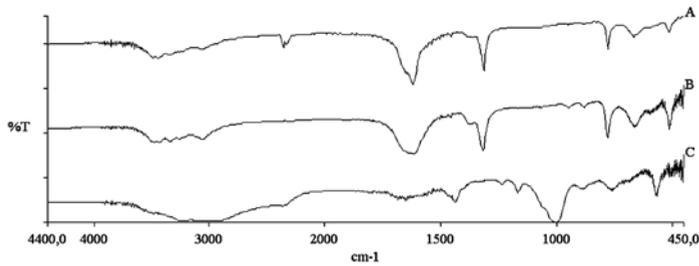


Figura 3: Espectros del cálculo de oxalato de calcio (A) y de los patrones de oxalato de calcio (B) y fosfato-amónico-magnésico (C)

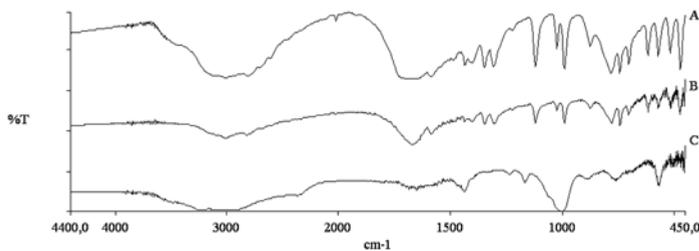


Figura 4: Espectros del cálculo de ácido úrico (A) y de los patrones de ácido úrico (B) y fosfato-amónico-magnésico (C)

Patrón Serie 1	Coefficiente de correlación r
Oxalato de calcio	0.9622
Fosfato-Amónico-Magnésico	0.1172
Ácido úrico	0.0193
Cistina	0.0164

Tabla 1: Coeficientes de correlación entre el cálculo de oxalato de calcio y los patrones de la Serie 1.

Patrón Serie 1	Coefficiente de correlación r
Ácido úrico	0.9545
Fosfato-Amónico-Magnésico	0.1441
Cistina	0.1294
Oxalato de calcio	0.1088

Tabla 2: Coeficientes de correlación entre el cálculo de ácido úrico y los patrones de la Serie 1

II-1.3. Comparación del espectro de un cálculo de fosfato amónico-magnésico:

Se comparó el espectro de un cálculo de fosfato amónico-magnésico con los patrones puros de la biblioteca espectral de referencia. La figura 5 muestra los espectros correspondientes al cálculo y a los dos patrones más semejantes. En la tabla 3 se

consignan los coeficientes de correlación, en orden decreciente, entre los espectros comparados

Del análisis de estos coeficientes de correlación puede concluirse que existe prácticamente identidad entre la composición del cálculo y el patrón de fosfato amónico-magnésico de la Serie 1.

II-1.4. Comparación del espectro de un cálculo de cistina y los patrones de la Serie 1.

Se comparó el espectro de un cálculo de cistina con los patrones puros de la biblioteca espectral de referencia. La figura 6 muestra los espectros correspondientes al cálculo y a los dos patrones más semejantes. En la tabla 4 se consignan los coeficientes de correlación, en orden decreciente, entre los espectros comparados.

Del análisis de estos coeficientes de correlación puede concluirse que existe prácticamente identidad entre la composición del cálculo y el patrón de cistina de la Serie 1.

II-2. Comparación de las mezclas artificiales de cálculos

II-2.1. Comparación del espectro de una mezcla artificial de cálculos con 80% úrico y 20% oxalato calcio y los patrones de la Serie 1 (puros o sus mezclas).

Se comparó el espectro de una mezcla artificial conteniendo 80% de un cálculo de ácido úrico y 20% de uno de oxalato de calcio con los espectros de patrones puros y sus mezclas. La figura 7 muestra los espectros de la mezcla artificial de cálculo y el de los patrones más semejantes. En la tabla 5 se consignan los coeficientes de correlación, en orden decreciente, entre los espectros comparados.

Del análisis de estos coeficientes de correlación puede concluirse que existe prác-

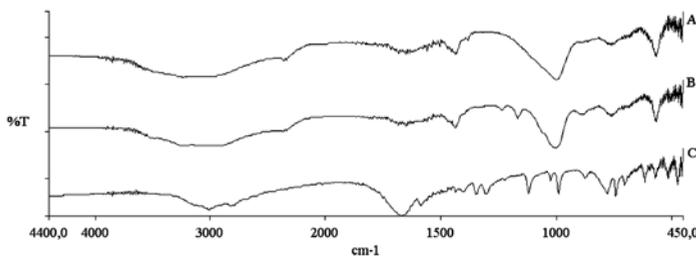


Figura 5: Espectros del cálculo de fosfato amónico-magnésico (A) y de los patrones de fosfato-amónico-magnésico (B) y ácido úrico (C)

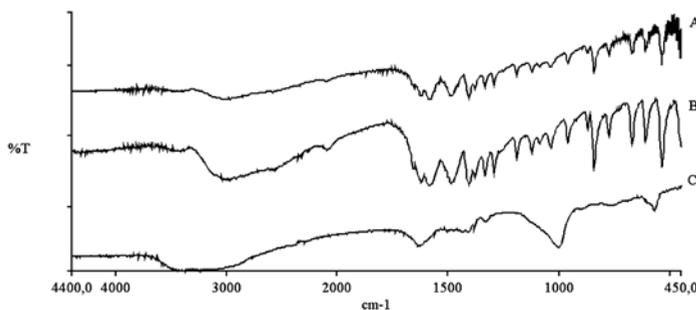


Figura 6: Espectros del cálculo de cistina (A) y de los patrones de cistina (B) y fosfato amónico-magnésico (C)

Patrón Serie 1	Coefficiente de correlación <i>r</i>
Fosfato amónico-magnésico	0.8847
Ácido úrico	0.1438
Oxalato de calcio	0.0533
Cistina	0.0262

Tabla 3: Coeficientes de correlación entre un cálculo de fosfato amónico-magnésico y los patrones de la Serie 1.

Patrón Serie 1	Coefficiente de correlación r
Cistina	0.9786
Fosfato amónico-magnésico	0.1669
Ácido úrico	0.1599
Oxalato de calcio	0.0837

Tabla 4: Coeficientes de correlación entre el cálculo de cistina y los patrones de la Serie 1.

Patrón Serie 1	Coefficiente de correlación r
Acido úrico 80% + Oxalato de calcio 20%	0.8994
Acido úrico 50% + Oxalato de calcio 50%	0.8095
Ácido úrico	0.4937
Oxalato de calcio	0.3710
Cistina	0.1503
Fosfato-Amónico-Magnésico	0.0899

Tabla 5: Coeficientes de correlación entre la mezcla artificial de cálculos 80% úrico - 20% oxalato calcio y los patrones de la Serie 1 (puros o sus mezclas).

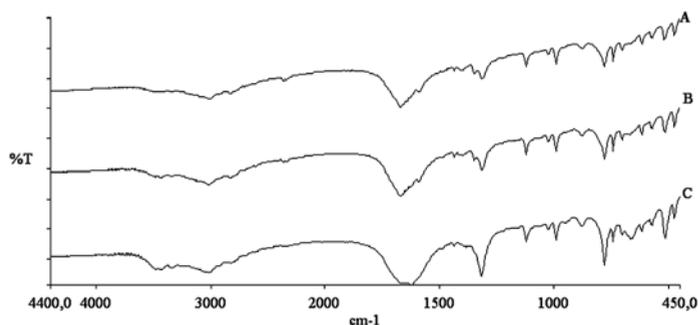


Figura 7: Espectros de la mezcla artificial de cálculos con 80% úrico - 20% oxalato calcio (A) y las mezclas de los patrones 80% úrico - 20% oxalato calcio (B) y 50% úrico - 50% oxalato calcio (C)

ticamente identidad entre la composición de la mezcla artificial que simula un cálculo mixto y la mezcla patrón con composición más próxima (Acido úrico 80% + Oxalato de calcio 20%) de la Serie 1.

II-2.2. Comparación del espectro de una mezcla artificial de cálculos con 20% úrico - 80% oxalato calcio y los patrones de la Serie 1 (puros o sus mezclas)

Se comparó el espectro de una mezcla artificial conteniendo 20% de un cálculo de ácido úrico y 80% de uno de oxalato de calcio con los espectros de patrones puros y

sus mezclas. La figura 8 muestra los espectros de la mezcla artificial de cálculo y el de los patrones más semejantes. En la tabla 6 se consignan los coeficientes de correlación, en orden decreciente, entre los espectros comparados.

Del análisis de estos coeficientes de correlación puede concluirse que existe prácticamente identidad entre la composición de la mezcla artificial que simula un cálculo mixto y la mezcla patrón con composición más próxima (Acido úrico 20% + Oxalato de calcio 80%) de la Serie 1.

Patrón Serie 1	Coefficiente de correlación r
Acido úrico 20% + Oxalato de calcio 80%	0.8550
Acido úrico 50% + Oxalato de calcio 50%	0.8357
Oxalato de calcio	0.8063
Ácido úrico	0.2619
Cistina	0.1176
Fosfato-Amónico-Magnésico	0.0647

Tabla 6: Coeficientes de correlación entre la mezcla artificial de cálculos con 20% úrico - 80% oxalato calcio y los patrones de la Serie 1 (puros o sus mezclas)

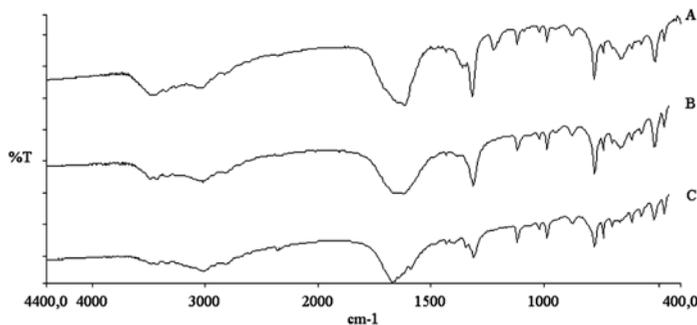


Figura 8: Espectros de la mezcla artificial de cálculos 20% úrico - 80% oxalato calcio (A) y las mezclas de los patrones 20% úrico - 80% oxalato calcio (B) y 50% úrico - 50% oxalato calcio (C)

Conclusiones

El método resulta efectivo cuando se analizan cálculos de un sólo componente o mixtos con composición próxima a las mezclas patrones o estándares consideradas.

En ningún caso se evidenció interferencia de la matriz proteica.

Será necesario incorporar otras mezclas para cubrir el espectro de combinaciones que pueden presentarse y determinar con mayor precisión la sensibilidad en nuestras condiciones de trabajo.

En próximas etapas se incorporarán a la biblioteca los espectros de estándares de las variantes con que pueden aparecer el oxalato de calcio y el ácido úrico según el grado de hidratación.

Por otro lado, será posible obtener estándares secundarios a partir de los cálculos disponibles usando como referencia los

espectros del National Institute of Standards and Technology (NIST) u otros similares (9).

La incorporación de espectros de nuevos cálculos a la biblioteca espectral de referencia permitirá la resolución de muestras más complejas.

Por lo tanto, se considera estar en condiciones para aplicar la espectroscopía infrarroja al estudio de los cálculos urinarios, sumando una herramienta más a la metodología diagnóstica disponible en nuestro medio.

Bibliografía

1. Toblli, J.E.; Ghirlanda, J.M.; Gigler, C., 1996. "Litiasis Renal". El Ateneo. (Buenos Aires).
2. García, E., 1993. "Tratamiento médico de la litiasis". Prous Editores.(Barcelona).
3. Pack, C.Y.C.; Pearle, M.S.; 2003. Predictive

value of kidney stone composition in the detection of metabolic abnormalities. *Am. J. Medicine* **115**, 11: 26-32.

4. Cifuentes, D., 1984. "Composición y estructura de los cálculos renales". Salvat Editores S.A (Barcelona).

5. Conte, A.; Grases F., 1996. "Manual para el estudio de los cálculos renales". Editorial CEGE.(Barcelona).

6. Daudon, M.; Bader, C.A.; Jungers, P., 1993. Urinary Calculi: Review of classification methods and correlations with etiology. *Sc. Micros.* **7**, 3: 1081-1106.

7. Grases, F.; Sohnel, O.; García, F.; Costa Bauzá, A., 1995. A study on calcium oxalate monohydrate renal uroliths II. Fine inner structure. *Scand J. Urol. Nephrol.* **29**:421-428.

8. Khalid, A., 1984. Infrared spectroscopic studies of renal stones. *Brit. J. Urol.* **56**:135-41.

9. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, National Institute of Standards and Technology (2005, U.S.) Base de Datos de Referencia del NIST. N° 69.