



**Ácido Oxálico (Oxalato)** Cat. N° 755699.  
Adaptación por Lic. Noel Silva. Junio de 2003.

**ULTIMA REVISION: FEBRERO DE 2006 POR LIC. NOEL SILVA D.**

**RENDIMIENTO CONDICIONADO A LA INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA:**

**Rendimiento por Tests del Kit de Oxalic Acid Cat. N° 755699.**

Dependiendo del volumen mínimo necesario que sea capaz de leer el espectrofotómetro a utilizar, se obtendrá el siguiente rendimiento del kit:

Volumen final (Vf): **2,4 mL\***

Rendimiento: 10 determinaciones de muestra y 10 de Blanco.

Volumen Final (Vf): **1,2 mL\***

Rendimiento: 20 determinaciones de muestra y 20 de Blanco.

Volumen final (Vf): **0.48 mL.\* (más recomendada).**

Rendimiento: 50 determinaciones de muestra y 50 de Blanco

*\*Nota importante: el factor de calculo puede variar dependiendo del volumen final y la longitud de onda, escogida para el ensayo.*

#### **Principio:**

El oxalato fue confirmado como un constituyente normal de la orina en 1951, pero solo recientemente se ha reconocido la relación existente del mismo, con la cristaluria de oxalato de calcio y la formación de cálculos en el tracto urinario.

La formación de los cristales pocos solubles de oxalato o sales de calcio está considerado como un factor primordial en la urolitiasis.

El Oxalato en orina se puede encontrar incrementado ya sea como intermediario o producto final del metabolismo o proveniente de la dieta.

Una excreción disminuida de oxalato en orina está relacionada con hiper-glicemia o hiper-glucosuria..

Un aumento en la excreción de oxalato puede ser atribuido a un incremento en la ingestión de comidas ricas en oxalato o en sus precursores, la formación de oxalato originado por defectos en el metabolismo tales como: hiperoxaluria primaria y la mala absorción de oxalato en cierto número de trastornos gastrointestinales. En estas últimas se puede incluir a los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, retracción iliaca, divergencia biliar, insuficiencia pancreática, estenosis del intestino delgado con sobre crecimiento bacterial, después de un bypass jejunio-ileal o rechazo de tratamiento de la obesidad.

El oxalato puede ser determinado por ensayos enzimáticos tal como la que se presenta a continuación:

El ácido oxálico es clivado por la enzima oxalato descarboxilasa a pH 5.0, formando ácido fórmico (formato) y CO<sub>2</sub>.(1)

(1) Oxalato  $\xrightarrow{\text{oxalato descarboxilasa}}$  Formato + CO<sub>2</sub>

El formato producido en la reacción anterior conjuntamente con NAD (nicotinamida-adenina- dinucleotido) es oxidado cuantitativamente a bicarbonato, NADH + H<sup>+</sup>, en la presencia de la enzima formato deshidrogenasa (FDH) a pH 7.5 (2).

(2) Formato + NAD<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{FDH}}$  bicarbonato + NADH + H<sup>+</sup>

La cantidad de NADH formada durante la reacción (2) es estequiometricamente proporcional a la cantidad de ácido oxálico presente en el ensayo. El NADH es determinado midiendo el cambio de absorción de luz a 334, 340 o 365 nm.

#### **Determinación de Oxalato en Orina usando el kit de Ácido Oxálico de r-biopharm:**

Para usar este kit para la determinación de ácido oxálico (oxalato) en orina se debe proceder de la siguiente manera:

Para prevenir la precipitación del oxalato de calcio agregar 0.5 g de EDTA por cada litro de orina.

Medir el pH de la muestra (usando un papel indicador), el mismo debe estar cercano a 5.0 do no ser así, ajustar el pH agregando ácido clorhídrico (1 mol/L) en hasta llevarlo a aprox. 5.0.

#### **Contenido del Kit:**

1. Botella 1 con aprox. 3 mL de solución, la cual consiste en: búfer fosfato potasio (PBS), búfer fosfato/citrato, pH 5.0 y estabilizadores.
2. Botella 2 con aprox. 0.5 mL de suspensión de oxalato descarboxilasa, aprox. 8U.
3. Botella 3 con aprox. 45 mL de solución, la cual consiste en PBS 0.1 mol/L. PH 9.5.
4. Botella 4 con aprox. 420 mg de NAD liofilizado, sal de litio.
5. Botella 5 con un liofilizado de formato deshidrogenasa, 80 U.
6. Solución estándar de ácido oxálico para ensayos de control de calidad. (su uso no es requerido para el calculo de resultados).

#### Preparación de las soluciones:

1. Usar los contenidos de las botellas 1 y 2 tal cual como vienen en el kit.
2. Disolver el contenido de la botella 4 con la solución búfer de la botella 3, mezclando con un agitador magnético, esta mezcla en adelante, se denominará la mezcla de reactivos 4.
3. Disolver el contenido de la botella 5 con 1.2 mL de agua bidestilada. esto en adelante, se denominará Solución 5.

#### Estabilidad de los reactivos:

La solución de la botella 1 es estable por un año luego de abierta, siempre y cuando se mantenga refrigerada a +4°C.

Antes de usar, llevar la solución a temperatura ambiente.

La solución de la botella 2 es estable por un año luego de abierta, siempre y cuando se mantenga refrigerada a +4°C.

Antes de usar, llevar la solución a temperatura ambiente.

La solución de la botella 3 y 4 son estables por un año luego de abiertas, siempre y cuando se mantenga refrigerada a +4°C.

Antes de usar, llevar la solución a temperatura ambiente.

La solución de la botella 5 es estable por un año luego de abierta, siempre y cuando se mantenga refrigerada a +4°C.

La solución 5 es estable por 5 días a 4°C por 6 semanas a -20°C, respectivamente.

#### Preparación de la muestra (En el caso de Orina de 24 Horas):

La muestra de Orina de 24 horas debe ser recolectada en un envase de vidrio o plástico que contenga 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se deberá registrar el volumen total recolectado en Litros.

El oxalato en la orina acidifica es estable hasta 7 días almacenado en el refrigerador o en el congelador.

La vitamina C (ácido ascórbico) puede interferir a un alta concentración (>16 mmol/L). Se recomienda que los pacientes eviten la ingesta de vitamina C o de comida rica en la misma, por lo menos 48 horas antes de la recolección de la orina.

De ser el caso, se puede remover el exceso de ácido ascórbico añadiendo 17 U de ascorbato oxidasa por cada mL de muestra o usando una espátula de ascorbato-oxidasa.

Sustancias reductoras presentes en la muestra pueden interferir con el ensayo, debido a que retrasan la tasa de reacción de la formato deshidrogenasa. Para reducir por completo el efecto reductor del SO<sub>2</sub> (dióxido de sulfuro), se puede añadir 10 µL de peróxido de hidrogeno (30% V/V) a la cubeta.

#### Valores esperados de Oxalato en Orina de 24 horas:

**Cada Laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia para el ensayo.**

En estudio realizado con 108 pacientes adultos clínicamente sanos y 12 niños (entre 7-14 años) con dietas no restringidas, se obtuvieron los siguientes resultados:

	<b>Mg/24 hr</b>	<b>mmol/24 hr</b>
<b>Hombres Adultos</b>	7-44	0.08-0.49
<b>Mujeres adultas</b>	4-31	0.04-0.32
<b>Niños</b>	13-38	0.14-0.42

En otros estudios realizados en diferentes universidades en España, sin discriminar edad y sexo del paciente, solo la condición de que estuviesen sanos, los valores obtenidos fueron:

**0-50 Mg/24 hr**

#### Procedimiento para la determinación de Oxalato en Orina de 24 Horas:

Tomar un tubo de ensayo y colocar el volumen de muestra de Orina dependiendo del Volumen final (Vf) escogido.

Si desea prevenir la precipitación a cristales de oxalato de calcio añadir EDTA en relación de 0.5 g/L.

Luego agregar 10 µL de peróxido de hidrogeno (30% V/V).

#### Preparación de la muestra:

**La muestra de Orina se debe diluir en una relación 1:10**, se recomienda (dado las características particulares de la muestra), preparar esta dilución usando por lo menos 1 mL de Orina (previamente mezclar bien el envase de recolección de la orina de 24 horas, y verificar que el pH esta ácido, si no acidificar con ácido clorhídrico y luego tomar la muestra para preparar la dilución 1:10).

**Otra forma (para evitar el factor de error introducido por la dilución 1:10) es válido colocar la muestra de Orina pura y luego dividir el resultado obtenido en la formula (C) entre 10.**

**El control incluido en el kit no se debe diluir, se debe colocar puro.**

Concentración de oxalato en orina entre 20-100 mg/L.

Pipetear en la cubeta	Blanco (mL)			Muestra (mL)		
	Vf=2.4	Vf=1.2	Vf=0.48	Vf=2.4	Vf=1.2	Vf=0.48
Solución 1	0.100	0.050	0.020	0.100	0.050	0.020
Muestra de Orina (pH 5.0)	0.200	0.100	0.040	0.200	0.100	0.040
Suspensión 2	-	-	-	0.050	0.025	0.010
<b>Mezclar e incubar a 20-25 °C por 30 min., luego agregar:</b>						
Mezcla de reactivos 4	2.000	1.000	0.400	2.000	1.000	0.400
Agua Bidestilada	0.050	-	-	-	-	-
<b>Mezclar y leer absorbancias de la(s) solución(es) luego de dos min. (A<sub>1</sub>). Comenzar la reacción con la adición de:</b>						
Solución 5	0.050	0.025	0.010	0.050	0.025	0.010
<b>Mezclar en rotador e incubar a 25°C por 40 min. Leer las absorbancias de la(s) solución(es) inmediatamente un después de otra (A<sub>2</sub>)</b>						

Determinar la diferencia de absorbancia (A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub>) para ambos, blanco y muestra. Substraer la diferencia de las absorbancias del blanco a la diferencia de absorbancias de la muestra.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

Calculo de los resultados:

$$C = \frac{1.080 \times \Delta A}{\epsilon} \quad (\text{g de oxalato/muestra})$$

(si desea pasar de gramos (g) a miligramos (mg), deberá multiplicar por 1000).

$$C = \frac{12.00 \times \Delta A}{\epsilon} \quad (\text{mmol de oxalato/muestra})$$

Longitud de Onda	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
$\epsilon$ (g/L)	0.3177	0.1714	0.1748
$\epsilon$ (mmol/L)	3.529	1.905	1.948

Para obtener el Volumen excretado en la muestra de Orina de 24 horas:

Multiplicar C por el Volumen total de orina recolectado en 24 horas.

Concentración de oxalato en orina entre < 20 mg/L.

Preparación de la muestra:

La muestra de Orina se debe diluir en una relación 1:10, se recomienda (dado las características particulares de la muestra), preparar esta dilución usando por lo menos 1 mL de Orina (previamente mezclar bien el envase de recolección de la orina de 24 horas, y verificar que el pH esta ácido, si no acidificar con ácido clorhídrico y luego tomar la muestra para preparar la dilución 1:10).

Otra forma (para evitar el factor de error introducido por la dilución 1:10) es válido colocar la muestra de Orina pura y luego dividir el resultado obtenido en la formula (C) entre 10.

El control incluido en el kit no se debe diluir, se debe colocar puro.

Pipetear en la cubeta	Blanco (mL)			Muestra (mL)		
	Vf=2.6	Vf=1.3	Vf=0.520	Vf=2.6	Vf=1.3	Vf=0.520
Muestra de Orina (pH 5.0)	0.500	0.250	0.100	0.500	0.250	0.100
Suspensión 2	-	-	-	0.050	0.025	0.010
<b>Mezclar e incubar a 20-25 °C por 30 min., luego agregar:</b>						
Mezcla de reactivos 4	2.000	1.000	0.400	2.000	1.000	0.400
Agua Bidestilada	0.050	0.025	0.010	-	-	-
<b>Mezclar y leer absorbancias de la(s) solución(es) luego de dos min. (A<sub>1</sub>). Comenzar la reacción con la adición de:</b>						
Solución 5	0.050	0.025	0.010	0.050	0.025	0.010
<b>Mezclar en rotador e incubar a 25°C por 40 min. Leer las absorbancias de la(s) solución(es) inmediatamente un después de otra (A<sub>2</sub>)</b>						

Determinar la diferencia de absorbancia (A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub>) para ambos, blanco y muestra. Substraer la diferencia de las absorbancias del blanco a la diferencia de absorbancias de la muestra.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

**Calculo de los resultados:**

$$C = \frac{0.4682 \times \Delta A}{\epsilon} \text{ (g de oxalato/muestra)}$$

(si desea pasar de gramos (g) a miligramos (mg), deberá multiplicar por 1000).

$$C = \frac{5.200 \times \Delta A}{\epsilon} \text{ (mmol de oxalato/muestra)}$$

Longitud de Onda	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
$\epsilon$ (g/L)	0.3177	0.1714	0.1748
$\epsilon$ (mmol/L)	3.529	1.905	1.948

**Para obtener el Volumen excretado en la muestra de Orina de 24 horas:**

Multiplicar C por el Volumen total de orina recolectado en 24 horas.

**Otros:**

Si desea variar los volúmenes de la reacción utilice la siguiente formula para obtener los resultados:

$$C = \frac{V \times MW^*}{C \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/L)}$$

V= Volumen final (mL)

V= volumen de muestra (mL)

MW = Peso molecular de la sustancia ensayada (g/mol)

D = recorrido de la Luz (cm)

C = coeficiente de extinción molar del NADH a determinada longitud de onda (ver cuadro de arriba).

\*Para reportar en mmol/L no incluir en la formula a MW (peso molecular). Entonces las unidades de reporte serian (mol/L).

**SOLUCIÓN CONTROL DE OXALATO**

Concentración: dirijase a la etiqueta de la botella.

El kit posee una solución acuosa de valores conocidos de oxalato. Este no debe ser diluido para ninguno de los procedimientos seleccionados para la determinación de oxalato.

**Referencias**

- 1.1 Beutler, H.-O., Becker, J., Michal, G. & Walter, E. (1980) Rapid Method for the Determination of Oxalate, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **301**, 186-187
- 1.2 Höpner, T. & Knappe, J. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U. Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1596-1600, Verlag Chemie, Weinheim, and (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1551-1555, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 2.1 Brautechnische Analysenmethoden, Band **111**, S. 576-580 (1982) *Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK)*, herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 3.1 Drawert, F., Paul, H. & Hagen, W. (1981) Enzymatische Bestimmung von Oxalsäure und Ameisensäure im Bier, *Brauwissenschaft* **34**, 57-61
- 3.2 Lagemann, M., Graef, V. & Anders, D. (1985) Bestimmung des Oxalsäuregehaltes von Kakao und Kakaoprodukten mit der Oxalat-Decarboxylase Methode, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **81**, 140-141
- 3.3 Lagemann, M., Anders, D., Graef, V. & Bödeker, R. H. (1985) Einfluß von Kakao auf die Ausscheidung von Oxalat, Citrat, Magnesium und Calcium im Urin von Kindern, *Monatsschr. Kinderheilkd.* **133**, 754-759