

METABOLISMO DE HIDRATO DE CLORAL EN RATAS CON INSUFICIENCIA HEPÁTICA INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO

Luis Moreno E¹, Andrés Herrera C², Luz Oyola de Bardales³, Jorge Arroyo A⁴, Liliana Marrufo S⁵

RESUMEN

Objetivo: Determinar el metabolismo del hidrato de cloral en ratas bajo condiciones normales y en ratas con insuficiencia hepática inducida con tetracloruro de carbono. **Material y métodos:** Se usaron ratas macho de la cepa Holtzman. El proceso de inducción de la insuficiencia hepática se realizó durante 3 días consecutivos; este efecto fue confirmado a través de cortes histológicos del hígado, administrándose luego hidrato de cloral por vía oral en ambos grupos. Posteriormente, se realizó el dosaje en plasma de tricloroetanol - metabolito activo del hidrato de cloral - por el método de cromatografía gaseosa con un detector de ionización de llama, realizándose la validación de dicho método. **Resultados:** Se encontró una diferencia significativa en la cantidad de tricloroetanol entre los grupos con y sin insuficiencia hepática. Se reporta los períodos de latencia, duración e intensidad del efecto del hidrato de cloral, en todos los grupos en estudio. **Conclusiones:** El metabolismo del hidrato de cloral se encuentra alterado en los grupos con insuficiencia hepática, el nivel de alteración del metabolismo puede ser cuantificado a través del dosaje de tricloroetanol, el cual fue realizado optimizando un método existente.

Palabras clave: Hidrato de Cloral/metabolismo; Insuficiencia Hepática; Cromatografía de Gases; Ratas. (fuente: BIREME)

ABSTRACT

Objective: To determine the metabolism of chloral hydrate in normal rats and in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic impairment. **Material and methods:** Holtzman male rats were used; the process for hepatic impairment induction was performed for three consecutive days, and this condition was confirmed through histological examination of liver samples. After the aforementioned procedure, chloral hydrate was administered orally to both groups. Then, plasma trichloroethanol - an active metabolite of chloral hydrate - was determined using gas chromatography with a flame ionization detector, and this method was validated. **Results:** There was a significant difference on plasma levels of trichloroethanol in rats with and without hepatic impairment. Latency period, duration and intensity of chloral hydrate effects were recorded in both groups studied. **Conclusions:** Chloral hydrate metabolism is altered in rats with hepatic impairment; and the level of hepatic impairment may be quantified through trichloroethanol determination, a procedure performed optimizing an available method.

Key words: Chloral hydrate/metabolism; Liver Failure; Gas Chromatography; Rats. (source: BIREME)

INTRODUCCIÓN

El hidrato de cloral es un sedante hipnótico no barbitúrico, no benzodiazepínico, que es absorbido rápidamente en el tracto gastrointestinal, en el hígado y en los eritrocitos se convierte en metabolito activo tricloroetanol, el cual puede ser convertido a metabolitos inactivos. También es metabolizado directamente a metabolitos

inactivos. El inicio de la acción cuando su administración es por vía oral se presenta a los 30 minutos, y dura aproximadamente entre 4 y 8 h. Su eliminación es principalmente a través de la vía renal aproximadamente 40% de la dosis se excreta en 24 h. La vida media del metabolito activo, tricloroetanol, es entre 7 y 10 h. Aproximadamente, entre 35 y 41% se une a las proteínas plasmáticas¹.

En la presente investigación se ha estudiado el hidrato de cloral, medicamento utilizado principalmente en la población pediátrica como adyuvante de la anestesia y sedante hipnótico para ciertos procedimientos médicos y dentales. A pesar de las preocupaciones de la seguridad en el uso del hidrato de cloral, este sigue siendo usado en la población pediátrica. Recientemente se intentó desplazar al hidrato de cloral por el uso de benzodiazepinas

¹ División de Química, Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² División de Microbiología, Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

³ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

⁵ Laboratorio de Cromatografía, Dirección General de Salud Ambiental. Lima, Perú.

(midazolam, diazepam, triazolam, temazepan, lorazepam), de ellas el midazolam es la de mayor uso; sin embargo, se ha demostrado que las benzodiazepinas no son grandes agentes hipnóticos en la población pediátrica²⁻⁴. La dosis pediátrica usual, como sedante hipnótico, es entre 30 y 50 mg/kg/peso hasta un máximo de 1 g como dosis única^{5,6}.

La razón de utilizar ratas con insuficiencia hepática es porque una de las contraindicaciones para el uso de este medicamento es el daño hepático severo. Con el presente trabajo se pretende obtener datos que ayuden a un mejor conocimiento y manejo de este medicamento, permitiendo realizar un dosaje en fluidos biológicos del metabolito activo, tricloroetanol, en el caso de una sobredosis por hidrato de cloral. El objetivo fue evaluar su metabolismo en ratas bajo condiciones normales y con insuficiencia hepática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Es un estudio experimental, controlado.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se usaron 56 ratas macho de 12 semanas de edad de la cepa Holtzman provenientes del Centro Nacional de Producción de Biológicos, todos los animales de cada grupo pertenecieron a la misma camada, con un peso promedio de 250 g.

Estas ratas fueron colocadas en jaulas individuales con una temperatura ambiental controlada que osciló entre 16°C y 21°C. El alimento basado en torta de soya proveniente de la Universidad Agraria La Molina y agua a discreción de los animales (*ad libitum*).

REACTIVOS QUÍMICOS

Hidrato de cloral (100%) (Carlo Erba), tricloroetanol (99%) (Aldrich), 2,2 dicloroetanol (99%) (Aldrich), acetona (Merck), eter dietílico (Merck), tetracloruro de carbono (Merck), ketamina (Abbott), kit de diagnóstico de transaminasas (Diagno Test), kit de diagnóstico de proteínas totales (Wiener Lab.), kit de diagnóstico de bilirrubina (Wiener Lab.), kit de diagnóstico de fosfatasa alcalina (Diagno Test).

EQUIPOS

Se usó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890, equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna Carbowax 30 m x 250mm, un integrador HP 3398A y un espectrofotómetro Spectronic 20D.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron 4 grupos, bajo el esquema de trabajo que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Grupos de trabajo del diseño experimental.

Grupo	Tratamiento	Nº Ratas	Período de latencia/ duración/ intensidad del efecto	Hidrato de cloral
1	Control sin insuficiencia hepática	8	—	Suero fisiológico
2	Control con insuficiencia hepática	8	—	No recibió
3	Con insuficiencia hepática más hidrato de cloral	8	X	Recibió
4	Sin insuficiencia hepática más hidrato de cloral	8	X	Recibió
Total		32		

Determinación de enzimas hepáticas y proteínas totales

En el grupo 1 se aplicó suero fisiológico (0,8 mL/kg/peso) por 3 días consecutivos. En los grupos 2 y 3 se indujo una insuficiencia hepática inyectándose por vía intraperitoneal tetracloruro de carbono (0,8 mL/kg/peso) durante 3 días consecutivos. En el cuarto día, a los grupos 3 y 4 se les administró por vía oral 50 mg/kg/peso de hidrato de cloral en solución¹. Ese mismo día y luego de 1 h de haber administrado el hidrato de cloral a los grupos 3 y 4; a todos los grupos se les aplicaron ketamina (45mg/kg/peso) vía IM, luego se les extrajo sangre por punción cardíaca⁷, la sangre fue colectada en tubos heparinizados y centrifugada a 3 000 g⁸. El plasma obtenido de los grupos 1 y 2 fue usado para realizar el perfil hepático que incluyeron las siguientes pruebas: Transaminasas (GOT/GPT) (Método enzimático con 2,4 dinitrofenilhidrazina)⁹, fosfatasa alcalina (Método enzimático con p-nitrofenil fosfato)¹⁰, proteínas totales (Método colorimétrico con EDTA/cobre)¹¹ y bilirrubina (Método colorimétrico con ácido sulfanílico/diazotado)¹².

Cortes histológicos

Una vez realizado el perfil hepático, se sacrificaron a los animales del grupo 1 y 2 por el método de desnucamiento, se les extrajo el hígado y se realizaron cortes histológicos de los hígados con y sin insuficiencia hepática. Para su estudio se usó la tinción de hematoxilina-eosina.

Determinación de tricloroetanol-metabolito activo- (Modificado por Humbert, 1994)¹³

El plasma obtenido de los grupos 3 y 4 se usó para el dosaje del metabolito activo tricloroetanol (TCE) por cromatografía gaseosa¹³, realizándose modificaciones al método, las cuales se validaron utilizando los siguientes parámetros: precisión, linealidad, sensibilidad y límite de detección¹⁴, siguiendo los lineamientos del Internacional Conference Harmonization (ICH), para la validación de procedimientos analíticos¹⁵. El análisis se realizó a una temperatura del horno entre 90°C y 180°C en rampa, según el esquema de la figura 1.

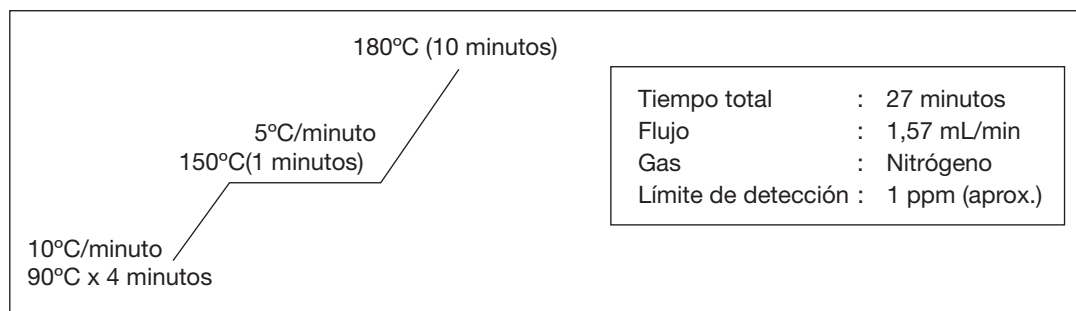


Figura 1. Programación de la temperatura.

El tricloroetanol puede ser medido en el plasma después de una extracción con éter dietílico usando 2,2 dicloroetanol como estándar interno, el cual fue agregado tanto al estándar como a las muestras desconocidas, para realizar el análisis cromatográfico final.

Antes de iniciar los análisis, se realizaron modificaciones (Figura 2) a las condiciones de trabajo señaladas para asegurar la robustez del método:

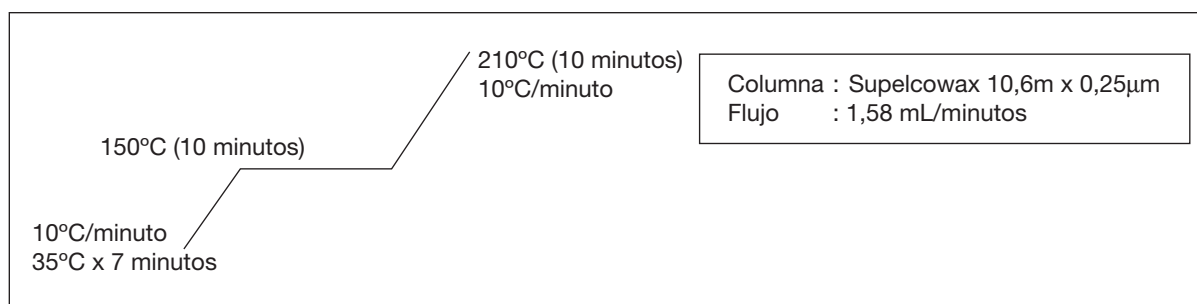


Figura 2. Modificaciones a las condiciones de trabajo.

Manteniéndose tiempos similares de retención del estándar y de la muestra lo cual demuestra la robustez del método

para detectar el metabolito, aún cuando se introduzcan modificaciones al método (Figura 3 y 4).

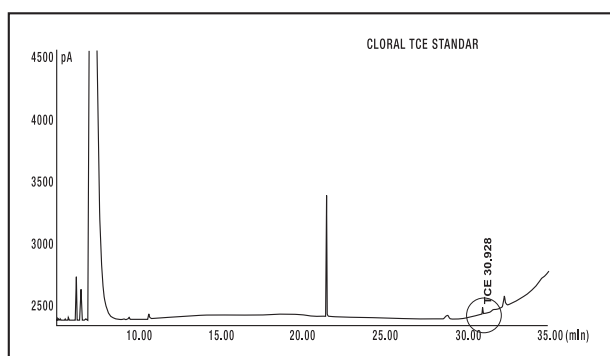


Figura 3. Cromatograma del estándar. Tiempo de retención 30,928 minutos.

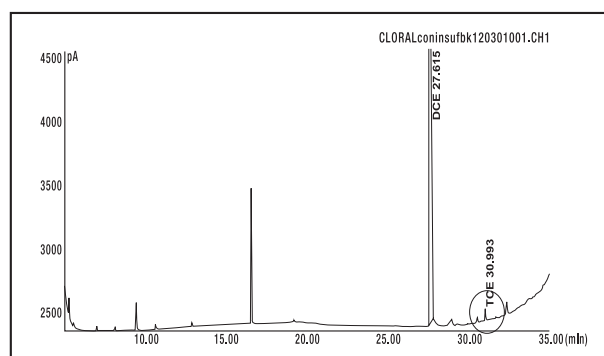


Figura 4. Cromatograma de la muestra. Tiempo de retención 30,993 minutos.

Una vez evaluada la robustez del método, se procedió a determinar otros parámetros para la validación de la técnica: precisión, linealidad, sensibilidad y límite de detección. **Precisión.** Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación y la varianza¹⁴.

En cromatografía gaseosa los elementos más importantes son: el área del pico y el tiempo de retención. La desviación estándar relativa de las áreas de los picos no deberá exceder el 2% y la desviación estándar relativa de los tiempos de retención no debe sobrepasar el 1%¹⁶ (Tabla 2).

Tabla 2. Áreas y tiempos de retención del estándar de tricloroetanol.

Parámetros	Áreas	Concentración del estándar	Tiempo de retención (minutos)
A1	187	0,0025344 mg/mL	30,923
A2	189	idem	30,928
A3	192	idem	30,945
Promedio	189,33	---	30,932
D.S. Absoluta	2,52	D.S. Absoluta	0,012
D.S. Relativa	1,33	D.S. Relativa	0,037
C.V.	1,33%	C.V.	0,037%

Linealidad. La linealidad del área del pico (y) / concentración de TCE mg/mL (x) de las diluciones fue 0,006 para un área del pico 141, 0,06 para 1266, 0,13 para 2536 y 0,32 para un área de 6 977.

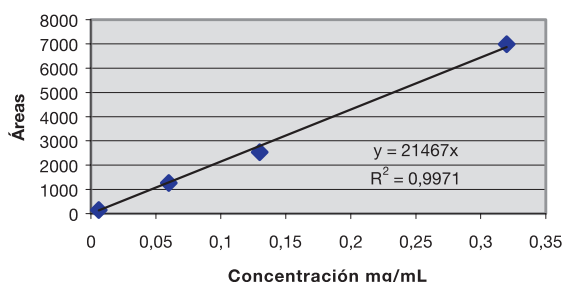


Figura 5. Curva de calibración de tricloroetanol.

La concentración y la señal de medición en el ámbito comprobado están en una relación lineal, ya que todos los puntos están en una recta y el coeficiente de correlación es $r = 0,9971$ (Figura 5).

Sensibilidad. Por definición, la sensibilidad de calibración, según la International Union of Pure and Applied Chemists (IUPAC), es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.

$$S = 0,997$$

Límite de detección. Cantidad mínima posible de ser detectada fue obtenida a través de la siguiente fórmula:

$$S_m = \bar{S}_{st} + K S_{st}$$

$$C_m = \frac{S_m - \bar{S}_{st}}{m}$$

Donde:

S_m = Mínima señal analítica distinguible

$\bar{S}_{st}$ = Señal media del estándar

$K = 3$ (nivel de confianza de la detección mínimo 89%)

S_{st} = Desviación estándar del estándar.

C_m = Límite de detección.

m = Pendiente de la curva de calibración.

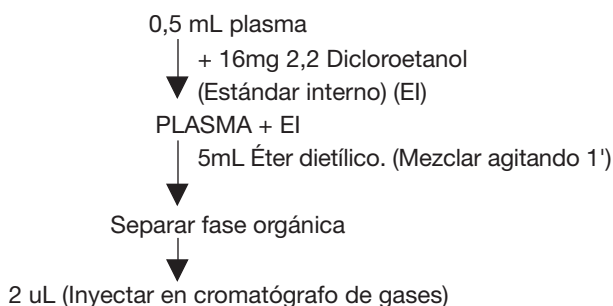
Entonces:

$$S_m = 189,33 + 3 (2,52) = 196,89$$

$$C_m = \frac{196,89 - 189,33}{0,9976} = 7,58 \text{ ppm}$$

$$(0,00758 \text{ mg/mL})$$

Una vez validado el método, las muestras de plasma de los grupos 3 y 4, se mantuvieron congeladas a -20°C , para la determinación de tricloroetanol se procesaron a través del siguiente flujo:



Cálculos

$$\text{Concentración de Tricloroetanol (mg/mL)} = \frac{A_m}{A_s} \times \frac{C_s}{V_m} \times D$$

Donde: A_m (área del pico de tricloroetanol en la muestra), A_s (área del pico de tricloroetanol en el estándar), C_s (Concentración de tricloroetanol en el estándar, mg/mL), D (Factor de dilución), V_m (Volumen de la muestra, mL).

Determinación del período de latencia, duración del efecto e intensidad (Leve, moderado y severo)

Luego de administrar el hidrato de cloral a los grupos 3 y 4 se registró el período de latencia, la duración y la intensidad del efecto, considerándose 3 grados de intensidad: leve, cuando el animal presentó ataxia; moderado, ataxia y salivación excesiva y, severa: ataxia, salivación excesiva y pérdida de movimiento.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE ENZIMAS HEPÁTICAS Y PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de la inducción de insuficiencia hepática es condición previa necesaria para la comparación del

metabolismo en ambos grupos, las tablas 3 y 4 muestran los resultados del dosaje de las enzimas hepáticas y proteínas totales en los grupos 1 y 2 (sin y con insuficiencia hepática), en el grupo con insuficiencia hepática se observa una alteración significativa de transaminasas y fosfatasa alcalina.

Tabla 3. Resultados del grupo 1. Sin insuficiencia hepática.

Grupo 1 S/INSF Hepática (n = 8)	Aspartato Amino-transferasa UI/L	Alanina Amino-transferasa UI/L	Bilirrubina total mg/dL	Proteínas totales g/dL	Fosfatasa alcalina UI/L
*Valores normales	46 – 81	18 - 30	0,3 - 1,3	4,7 - 8,2	0,8 - 3,0
Promedio	78	31,75	0,92	5,93	1,74
Desv.St.	3,02	2,25	0,13	0,43	0,09

Tabla 4. Resultados del grupo 2. Con insuficiencia hepática.

Grupo 2 C/INSF Hepática (n = 8)	Aspartato Amino-transferasa UI/L	Alanina Amino-transferasa UI/L	Bilirrubina total mg/dL	Proteínas totales g/dL	Fosfatasa alcalina UI/L
*Valores normales	46 – 81	18 - 30	0,3 - 1,3	4,7 - 8,2	0,8 - 3,0
Promedio	151	86,38	1,30	6,50	4,06
Desv. St.	2,51	2,67	0,11	0,45	0,58

*Fuente: Guide to the care and use of experimental animals Vol. 1 - Canadian Council on Animal Care 1984¹⁷

DETERMINACIÓN DE TRICLOROETANOL

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos en las muestras ensayadas. Los resultados muestran un mayor metabolismo del hidrato de cloral en las ratas normales frente a las ratas con insuficiencia hepática, evidenciado por la mayor concentración del metabolito activo en el plasma.

DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE LATENCIA, DURACIÓN E INTENSIDAD DEL EFECTO

En la tabla 6 se presenta un resumen de las observaciones realizadas a los grupos de trabajo 3 y 4, luego de la administración del hidrato de cloral.

Tabla 5. Concentración de TCE en las muestras según grupos de experimentación.

Muestras	Concentración TCE mg/mL
Grupo 3	
Muestra sin insuficiencia hepática más hidrato de cloral	0,0989
Grupo 4	
Muestra con insuficiencia hepática más hidrato de cloral	0,0852

Tabla 6. Resultados en los grupos 3 y 4 luego de la administración de hidrato de cloral.

Grupos (n=8)	Edad (meses)	Sexo	Peso (g)	Dosis de hidrato de cloral	Período de latencia (minutos)	Duración del efecto (minutos)	Intensidad medida
				50 mg/kg/peso(mL)			
3	3	M	251,3	1,26	16	12,5	++
4	3	M	249,1	1,25	13,4	15,8	++

Intensidad de efecto: Leve (+) Moderado (++) Severo (+++)

CORTES HISTOLÓGICOS (COLORACIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA)

Se realizaron cortes histológicos de los hígados de las ratas sin y con insuficiencia hepática, notándose una diferenciación celular de los hepatocitos entre los hígados sanos y enfermos. En la figura 6, se muestra el hígado sano (control), la figura 7 muestra las células con esteatosis. Estos resultados confirman los resultados de las pruebas bioquímicas y permiten afirmar que las ratas presentaban insuficiencia hepática al momento de dosar el tricloroetanol.



Figura 6. Corte histológico de hígado de rata, muestra células normales que rodean tanto a la vena periportal (VP) como a la vena central (VC). Coloración con hematoxilina 115X.



Figura 7. Corte histológico de hígado de rata, muestra la esteatosis a nivel central, inducido por tetracloruro de carbono. Coloración con hematoxilina 115X.

DISCUSIÓN

Con respecto al dosaje de enzimas hepáticas y proteínas totales, los niveles séricos de transaminasas glutámico pirúvica (TGO) y transaminasas glutámico oxalacética (TGP) en las ratas sin insuficiencia hepática, se encuentran en el límite superior de los valores normales, y en las ratas con insuficiencia hepática, se encuentran aumentados, esto ocurre con sustancias como la D-galactosamina que induce insuficiencia hepática²⁰.

Los valores de bilirrubina total en ambos grupos estuvieron dentro de los valores normales, pero se observa una diferencia significativa entre el grupo sin insuficiencia

hepática y con insuficiencia hepática, esto tal vez se deberá a que el daño que provoca el tetracloruro de carbono involucra principalmente a los hepatocitos y no a los conductos biliares, presentándose éste último caso con otro tipo de sustancias como, por ejemplo, el paraquat¹⁸.

En el caso de proteínas totales no hubo diferencia significativa en ambos grupos. El nivel sérico de fosfatasa alcalina se incrementó en el grupo con insuficiencia hepática, con respecto al grupo sin insuficiencia hepática como fue reportado por Verschoyle y colaboradores¹⁹ con el 1-Nitronaftaleno.

Se ha observado que usando diclorobenceno como inductor de insuficiencia hepática produce un aumento de transaminasas, bilirrubina, incremento en el peso del hígado además de alteraciones renales²².

En nuestro estudio el incremento significativo de transaminasas, bilirrubina total y fosfatasa alcalina, demuestra una alteración de la función hepática, hecho que es corroborado con los cortes histológicos realizados.

Los exámenes de rutina a la función hepática: transaminasas, fosfatasa alcalina, bilirrubina, proteínas, asociados a los cortes histológicos permiten dar un diagnóstico diferencial en enfermedades hepáticas. El incremento de las transaminasas es indicativa de daño hepatocelular y es consistente con varias formas de hepatitis incluyendo la esteatohepatitis. La elevación de bilirrubina es indicativa entre otros de la reacción a medicamentos¹⁸. El aumento de los principales parámetros hepáticos es concordante con estudios realizados en ratas^{19, 21-22}.

En los métodos para la determinación de tricloroetanol por cromatografía gaseosa descritos por Ogata y Saeki²³ y Breimer²⁴ no se usó el estándar interno, mientras que Garret y Lambert²⁵ usaron dos estándares internos simultáneamente. El método empleado requiere un estándar interno, se basa en la extracción con éter dietílico, la inyección directa de la capa orgánica y la detección con el detector de llama (Flame Ionization Detector FID), que lo convierte en uno de los métodos más prácticos para ser implementados en los laboratorios analíticos. Otros métodos usan la técnica cromatográfica head - space²⁴ o requieren varias extracciones con éter dietílico²³ o también éter²⁵.

El procedimiento fue específico, no hubo interferencia de picos en la misma región. El límite de detección para tricloroetanol se encuentra muy cercano al reportado por Ogata y Saeki²³. El procedimiento es rápido y suficientemente sensible para medir en plasma los niveles de tricloroetanol luego de la administración de hidrato de cloral. También puede ser aplicado a la medición de los metabolitos de tricloroetileno, en el caso de una intoxicación aguda. El ensayo de cromatografía gaseosa (GC) muestra buena sensibilidad, reproducibilidad y selectividad. Tiene la ventaja de ser conveniente, rápido y sensible al usar un detector de tipo universal - responde a todos los compuestos.

Este método puede ser aplicado a los análisis de muestras de pacientes intoxicados con hidrato de cloral o tricloroetileno, además puede ser aplicable a estudios farmacocinéticos en humanos.

Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa en los niveles de tricloroetanol en los grupos sin insuficiencia hepática y con insuficiencia hepática, lo cual puede deberse a un mejor metabolismo en el primer grupo de animales.

El período de latencia, duración del efecto e intensidad el promedio de duración del efecto de hidrato de cloral fue ligeramente superior en el grupo sin insuficiencia hepática con respecto al grupo con insuficiencia hepática. La intensidad moderada del efecto fue similar en ambos grupos. El promedio del período de latencia fue más corto en el grupo sin insuficiencia hepática frente al grupo con insuficiencia hepática. Entonces podemos afirmar que en el grupo sin insuficiencia hepática el metabolismo del hidrato de cloral es el más óptimo y rápido.

El tetracloruro de carbono (TCC) provoca daño al hígado desde un simple cambio graso a cirrosis. La manifestación más temprana y común es un cambio graso macrovesicular reversible. El cambio más importante es el esteatohepatitis no alcohólica (NASH). El tetracloruro de carbono provoca una esteatosis, acumulación de grasa, que tiende principalmente a ser centrilobular, en oposición a una localización periportal en proceso como cirrosis biliar primaria u obstrucción biliar. El predominio central o centrilobular del daño hepatocelular con tricloroetanol puede originar una fibrosis centrilobular, y finalmente una cirrosis¹⁸.

Se demostró insuficiencia hepática en las ratas al administrárseles tetracloruro de carbono por vía intraperitoneal durante 3 días evidenciado por un perfil hepático alterado y por lesiones histológicas. Se observó que existe diferencia en el metabolismo del hidrato de cloral en las ratas con y sin insuficiencia hepática, notándose mayores niveles séricos de tricloroetanol - metabolito activo del hidrato de cloral - en las ratas normales. Los períodos de latencia más cortos y la duración del efecto más prolongado son característicos de las ratas normales. La intensidad del efecto fue la misma en las ratas con y sin insuficiencia hepática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **United States Pharmacopeia Dispensing Information (USP DI).** Drug information for the health care professional Vol. 1. 13th ed. Englewood (US): Micromedex, Inc; 1993.
2. **Steinberg AD.** Should chloral hydrate be banned? *Pediatrics* 1993; 92(3): 442-6
3. **Malis DJ, Burton DM.** Safe pediatric outpatient sedation: the chloral hydrate debate revisited. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 116 (1): 53-7
4. **Mc Carver-May DG, Kang J, Aouthmany A, Elton RE, Mowery JL, Slovis TL, et al.** Comparison of Chloral hydrate and midazolam for sedation of neonates for neuroimaging studies. *J Pediatr* 1996; 128(4): 573-6.
5. **United States Pharmacopeia Dispensing Information (USP DI).** Approved drug products and legal requirements Vol. 3. 19th ed. Englewood (US): Micromedex, Inc; 2000.
6. **American Academy of Pediatrics Committee on Drugs and Committee on Environmental Health.** Use of chloral hydrate for sedation in children. *Pediatrics* 1993; 92(3): 471-3
7. **Working Group European Associations on Animal Health in the Laboratory.** Blood extraction in mammals and birds in the laboratory. United Kingdom: FELASA; 1995.
8. **Lynch MJ, Rápale SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MJH.** Métodos de laboratorio. 3a ed. México, D.F: Interamericana; 1991.
9. **Bishop M, Duben-von Laufen J, Fody E.** Clinical chemistry: principles, procedures, correlations. Philadelphia: J.B Lippincott Co; 1985.
10. **Bauer J.** Clinical laboratory methods. Saint Louis: Mosby Co; 1982.
11. **Doumas BT, Watson WA, Biggs HG.** Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31(1): 87-96.
12. **Botwell J.** Bilirubin quantification. *Clin Chem* 1964; 10(3): 197
13. **Humbert L.** Determination of chloral hydrate and its metabolites (trichloroetanol and trichloroacetic acid) in human plasma and urine using electron capture gas chromatography. *Biomed Chromatogr* 1994; 8(6): 273-7
14. **Skoog L.** Análisis Instrumental. 4a ed. Madrid. Mc Graw Hill; 1994.
15. **International Conference on Harmonization.** Harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: Methodology topic Q 2B. CPMP/ICH/281/95 Adopted december 1996; Step 4, Consensus Guideline.
16. **Colin F, Sheila A.** Contemporary practice of Chromatography. 2a ed. Madrid: Mc Graw Hill; 1995.
17. **Canadian Council on Animal Care.** Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 2 2nd ed. Ontario: CCAC; 1993.
18. **Sternberg S.** Non neoplastic liver disease. Philadelphia. J.B Lippincott Co; 1999.
19. **Verschöyle R, Carthew P, Wolf C, Dindsdale D.** 1-Nitronaphthalene toxicity in rat lung and liver: effects of inhibiting and inducing cytochrome P450 activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 122(2): 208-13.
20. **Maezono K, Mawatari K, Kajiwara K, Shinkai A, Maki T.** Effect of alanine on D-galactosamine - induced acute liver failure in rats. *Hepatology* 1996; 24(5): 1211-6.
21. **Valentovic MA, Lo H, Brown P, Rankin G.** 3,5-Dichloroaniline toxicity in Fischer 344 rats pretreated with inhibitors and inducers of Cytochrome P450. *Toxicol Lett* 1995; 78(3): 207-14.
22. **Valentovic MA, Ball JG, Anestis D, Madan E.** Modification of p450 activity and its effect on 1,2 - dichlorobenzene toxicity in Fischer 344 rats. *Toxicology* 1993; 24; 79(3): 169-80.
23. **Ogata M, Saeki T.** Measurement of chloral hydrate, trichloroethanol, trichloroacetic acid and monochloroacetic acid in the serum and the urine by gas chromatography. *Int Arch Arbeitsmed* 1974; 33(1): 49-58.
24. **Breimer DD, Ketelaars HCJ, van Rossum JM.** Gas chromatographic determination of chloral hydrate, trichloroethanol and trichloroacetic acid in blood and in urine employing head-space analysis. *J Chromatogr* 1974; 88: 55-63.
25. **Garrett ER, Lambert HJ.** Gas chromatographic analysis of trichloroethanol, chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol glucuronide. *J Pharm Sci* 1966; 55(8): 812-7.

Correspondencia: Luis Moreno E. Centro Nacional de Control de Calidad. Instituto Nacional de Salud.
Dirección: Av. Defensores del Morro 2268 (ex Huaylas), Chorrillos, Lima, Perú.
Telf: (0511) 4676696 Fax: (0511) 4671216.
Correo electrónico: lemoreno70@hotmail.com