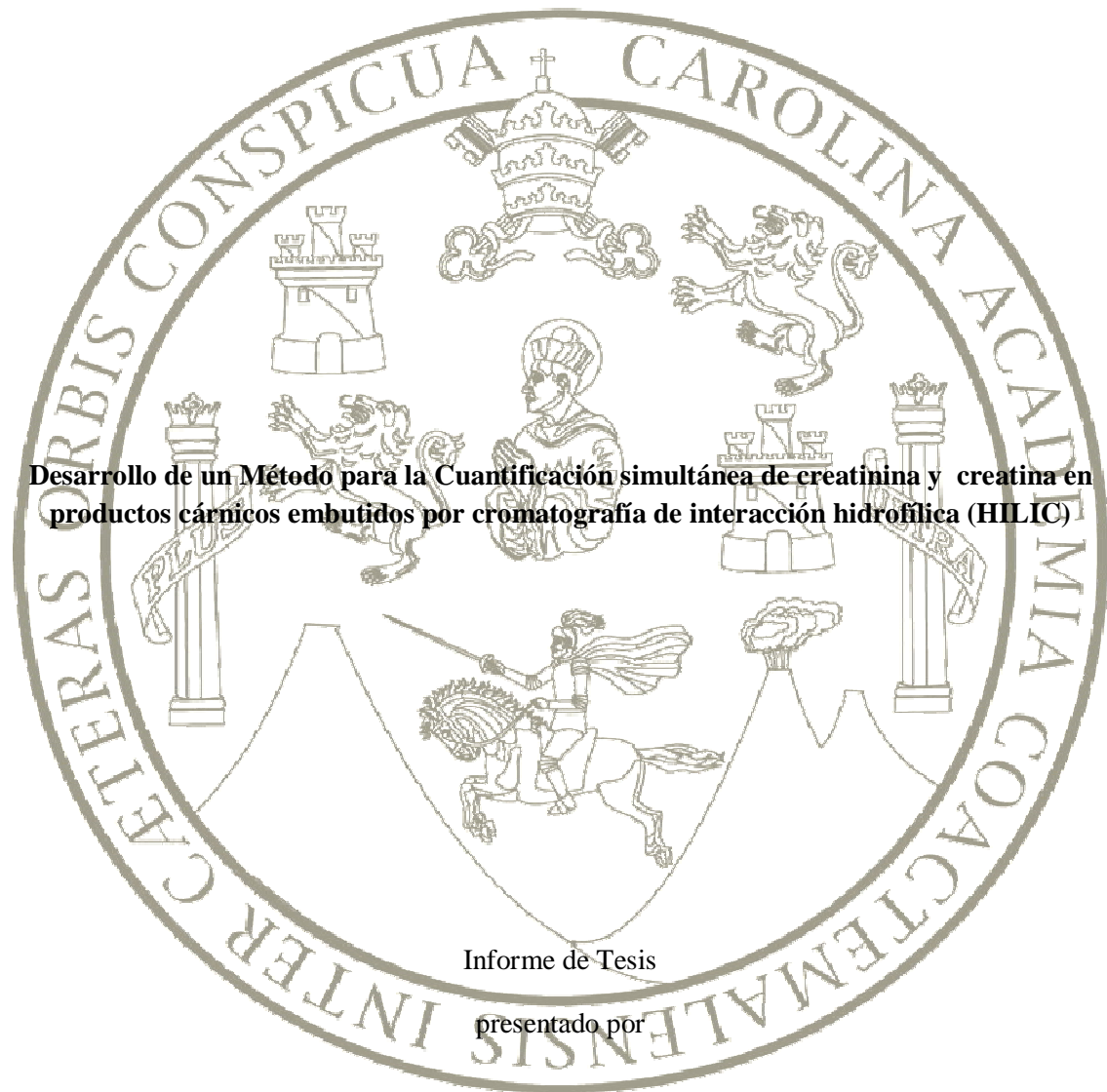


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Desarrollo de un Método para la Cuantificación simultánea de creatinina y creatina en productos cárnicos embutidos por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

Informe de Tesis

presentado por

Belma Regina Hurtarte Marín

para optar al título de

QUÍMICA

Guatemala, Julio de 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

DEDICATORIA

A mis padres, por apoyarme siempre, por sus consejos, por sus valores, por creer en mí, por la motivación constante que me ha permitido seguir adelante, pero más que nada, por su amor.

A Herbert, porque estoy convencida que sin ti, no hubiera llegado al final, tu paciencia y apoyo inagotable, y sobre todo tu amor, me dieron el valor necesario para no caer y avanzar sin mirar atrás, este es solo el primero de muchos otros triunfos que compartiremos.

A mis queridos hermanos, Juan y Mariel, porque con sus alegrías, cariño y apoyo constante hicieron de mis días grises, días soleados.

A Jorge Samuel, mi querido sobrino, porque llenas mi vida de esperanza y alegría, espero poder ser un ejemplo digno para ti.

A mis abuelos, por su amor incondicional, pero muy especialmente a mi abuelita Marta (QEPD) porque siempre estuvo pendiente de mi y al igual que yo esperaba con ansias este día y aunque hoy no está entre nosotros esta en mi corazón.

A doña Ana y a don Herbert por su apoyo incondicional y por permitirme formar parte de su familia.

Finalmente, a todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto, pero que forman parte importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a todas aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en todo momento.

A mis padres porque guiaron cada uno mis pasos y me acompañaron a lo largo del camino.

A Herbert, porque muchas páginas de este informe estarían en blanco sin tu ayuda, sin olvidar todo el apoyo que me brindaste a lo largo de estos años, por eso y mucho más, este trabajo también es tuyo.

De manera especial agradezco a mis asesores, el Licenciado Jorge García y el Licenciado Eduardo Robles.

A la empresa RGH, S.A. por facilitarme los recursos para llevar a cabo este trabajo.

Al Licenciado Alex López porque tus conocimientos y apreciables asesorías, aportaron grandes beneficios al desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

A mis maestros, gracias por su tiempo y por los conocimientos que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

Al departamento de Química General de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, porque me brindó la oportunidad de formar parte de su equipo colaborando con su labor en la formación de nuevos profesionales.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 La carne y sus principales productos	
3.1.1 Relevancia socio-económica: Producción y consumo	4
3.1.2 Definición de productos cárnicos	4
3.2 Características químicas de los embutidos en Guatemala	7
3.3 Principales cambios bioquímicos en los procesos de elaboración de los productos cárnicos embutidos	8
3.3.1 Proteólisis en los productos cárnicos	8
3.3.2 Lipólisis	10
3.3.3 Glucólisis	10
3.3.4 Transformación de nucleótidos	11
3.3.5 Otros cambios debidos a reacciones químicas	11
3.4 Creatina y creatinina y su potencial como marcadores bioquímicos de la calidad en carne y productos cárnicos	12
3.4.1 Creatina	12
3.4.2 Creatinina	14
3.5 Métodos analíticos para la determinación de creatina y creatinina compuestos bioquímicos en carne y productos cárnicos	15
3.5.1 Métodos de determinación tradicional para creatina y creatinina	15
3.5.2 Cromatografía de interacción hidrofílica	15
3.6 Validación de métodos	16
3.6.1 Exactitud	17
3.6.2 Precisión	17
3.6.3 Linealidad	18
3.6.4 Límite de detección	19
3.6.5 Límite de cuantificación	19
3.6.6 Robustez	19
3.6.7 Rango	19
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 General	21
5.2 Específicos	21
6. HIPÓTESIS	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Universo	23

7.2	Muestra	23
7.3	Recursos	23
7.3.1	Humanos	23
7.3.2	Materiales	23
7.4	Métodos	25
7.4.1	Implementación y afinación del método	25
7.4.2	Validación de la metodología	26
8.	RESULTADOS	31
8.1	Exactitud	31
8.2	Repetibilidad	32
8.3	Precisión Intermedia	33
8.4	Linealidad	35
8.5	Límite de Detección	37
8.6	Límite de Cuantificación	37
8.7	Robustez	38
8.8	Rango	39
9.	DISCUSIÓN	40
10.	CONCLUSIONES	44
11.	RECOMENDACIONES	45
12.	REFERENCIAS	46
13.	ANEXOS	48
Anexo No. 1:	Cromatograma base de Creatina y Creatina	49
Anexo No. 2:	Reporte de secuencia para Exactitud	50
	Cromatograma Muestra al 80%	51
	Cromatograma Muestra al 100%	52
	Cromatograma Muestra al 120%	53
Anexo No. 3:	Reporte de secuencia para Repetibilidad (Porcentaje)	54
	Reporte de secuencia para Repetibilidad (mg/kg)	55
	Cromatograma de estándar	56
	Cromatograma de muestra	57
Anexo No. 4:	Reporte de secuencia Precisión Intermedia (Día uno y dos)	58
	Cromatograma Muestra 1 Analista A	59
	Cromatograma Muestra 2 Analista A	60
	Cromatograma Muestra 1 Analista A (día dos)	61
	Cromatograma Muestra 2 Analista A (día dos)	62
Anexo No. 5:	Reporte de Linealidad	63
Anexo No. 6:	Reporte de secuencia Robustez (Temperatura de 25°C)	66
	Reporte de secuencia Robustez (Temperatura de 35 °C)	67
	Cromatograma Muestra 1 a 25 °C	68
	Cromatograma Muestra 1 a 35 °C	69

Anexo No. 7: Cromatograma Robustez (Flujo de 1 mL/min)	70
Anexo No. 8: Cromatograma Robustez (Cambio en la extracción)	71

1. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo desarrollar una metodología capaz de extraer y cuantificar simultáneamente creatinina y creatina en muestras de productos cárnicos embutidos utilizando cromatografía de interacción hidrofílica.

Durante la implementación y afinación del método se determinaron las condiciones de extracción y las condiciones cromatográficas más adecuadas (fase móvil, flujo, temperatura y tiempo por inyección) para poder separar y cuantificar simultáneamente los analitos.

Al evaluar la exactitud del método se obtuvieron porcentajes de recuperación promedio de 97.59% para creatinina y 94.29% para creatina. Para determinar la precisión del método se evaluó tanto la precisión del sistema como la precisión intermedia obteniéndose coeficientes de variación menores al 2%. El límite de cuantificación para creatinina es 3.78 mg/kg y para creatina de 9.48 mg/kg. Además, se evaluaron los parámetros: linealidad, límite de detección, robustez y rango.

Según el análisis estadístico de los resultados obtenidos para cada parámetro evaluado, se determinó que el método cumple con los criterios de aceptación de la Política de Selección y Validación de métodos de ensayo OGA-GEC-016, por lo cual el método se considera adecuado para la separación y cuantificación simultánea de creatinina y creatina en productos cárnicos embutidos.

2. INTRODUCCIÓN

En la industria alimenticia de productos cárnicos embutidos, los métodos analíticos están normados por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) y los controles de calidad están especificados en la política: COGUANOR NGO 34 130:94 (OGA, 2004; COGUANOR, 1994).

Los métodos COGUANOR NGO 34 130:94 utilizados para mediciones de la calidad de productos cárnicos embutidos son principalmente para: humedad, aglutinantes y aditivos conservadores (COGUANOR, 1994). Sin embargo, no se tienen controles ni métodos que permitan determinar sustancias bioquímicas del metabolismo post mortem, como creatina y creatinina, que pueden ser empleados como indicadores del tiempo de curado y temperatura de cocción, que son importantes para la calidad final del producto (Mora, 2008).

La creatina es un ácido orgánico nitrogenado que se sintetiza de forma natural en el organismo a partir de aminoácidos como la arginina, y constituye la fuente inmediata para regenerar ATP y proveer de energía a las células musculares (Lehninger, 2000).

La creatinina es un compuesto generado a partir de la degradación de la creatina que ocurre por vía no enzimática, influyendo factores físicos como el pH, la temperatura, el tiempo, y la concentración inicial de los precursores (Lehninger, 2000).

Una metodología empleada para la medición de creatina y creatinina, es el método colorimétrico de Folin, basado en la reacción de Jaffé, que consiste en la formación de un complejo de coloración amarillo-naranja, por reacción de la creatinina con picrato en medio alcalino. Existen otras metodologías para realizar la determinación de creatina y creatinina en la carne y productos cárnicos de forma simultánea, pero estas resultan costosas.

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés) se puede utilizar para optimizar la retención de compuestos muy polares con poca retención en

cromatografía de fase reversa, esto la convierte en una buena alternativa para la cuantificación de especies como la creatina y creatinina, ya que no implica derivatización, resultando rápida y confiable (Merck, 2011).

El presente estudio, tuvo como objetivo desarrollar un método para la cuantificación simultánea de creatina y creatinina, utilizando cromatografía de interacción hidrofílica. Para ello se sometió el método a los parámetros de validación: exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y rango. Dichos parámetros se evaluaron según la política OGA-GEC-016 de la Oficina Guatemalteca de Acreditación, obteniendo resultados positivos ya que cumple con los criterios de aceptación requeridos.

Este trabajo puede representar un apoyo a las entidades sanitarias y a la industria de productos cárnicos ya que puede implementarse como un control de calidad para ofrecer mejores productos a los consumidores a nivel nacional e internacional.

3. ANTECEDENTES

3.1 La carne y sus principales productos:

3.1.1 Relevancia socio-económica: Producción y consumo:

Los productos cárnicos embutidos, tienen gran importancia en la cultura gastronómica guatemalteca, principalmente en las festividades religiosas de noviembre, que es la temporada cuando se registra mayor demanda de los productos, llegando a triplicar las ventas (Dardon, 2010).

Según la hoja de balance de Alimentos HBA de 2008, la cantidad total de productos cárnicos embutidos disponible para consumo en Guatemala asciende a 36,236 TM, lo que corresponde al 18.88% del total de disponibilidad de carne de cerdo y res. Así mismo las exportaciones de productos cárnicos embutidos ascienden a 6,111 TM, representando un 80.08% del total de productos cárnicos (vacuno y porcino) exportados.

La información anterior muestra en parte, la relevancia socio-económica de los productos cárnicos embutidos en Guatemala, debido a que no se cuenta con información completa sobre la producción (INE, 2008).

3.1.2 Definición de productos cárnicos embutidos:

3.1.2.1 Carne: Son todas las partes sanas y limpias de los animales de abasto (bovinos, ovinos, caprinos u otros animales de consumo autorizado por el organismos competentes), que sirve para alimento del hombre. La concepción más amplia del término carne y productos cárnicos se halla contenida en el Código Alemán, en el que se entiende por carne todas las porciones de los animales de sangre caliente destinadas a consumo humano (Kirk, 1996; Prändl, 1994).

3.1.2.2 Productos cárnicos: “Se incluyen en esta categoría todas los productos y platos que contienen carne, ensaladas, bocados, comidas congeladas que contienen carne, embutidos o productos similares para la preparación de emparedados, procesados industrialmente o preparados a nivel artesanal con carnes procesadas industrialmente.

3.1.2.3 Embutidos: Son aquellos productos elaborados en base a una mezcla homogénea o heterogénea de carne animal permitida para el consumo humano, adicionado o no de complementos cárnicos como: grasa de cerdo, condimentos, especias y aditivos alimentarios, uniformemente mezclados, con agregado o no de sustancias aglutinantes y/o agua, introducida en tripas naturales o en fundas artificiales y sometidos o no a uno o más de los procesos de curado, cocción, deshidratación y ahumado (Potter, 1978).

3.1.2.3.1 Embutidos crudos: Los que en su procedimiento se someten a las temperaturas menores de 35°C excepto cuando se someten al ahumado (Kirk, 1996).

3.1.2.3.2 Embutidos cocidos: Son los que en su procedimiento se someten a una temperatura interna mínima de 66 °C por un mínimo de 15 ^{min} minutos, en el caso de embutidos con diámetro no mayor de 60 mm y no menor de 70°C en el caso de diámetro mayor de 60 mm (Kirk, 1996).

3.1.2.3.3 Tipos de Embutidos:

- **Salami:** embutido elaborado de carne de res o una mezcla de carnes como principal, y carne de cerdo. La carne podría reemplazarse por corazón de res hasta un 20%. También conlleva la adición de aditivos alimentarios adicionando o

no condimentos y sometido a curado, cocción, deshidratación y ahumado (Potter, 1978).

- **Mortadela:** Embutido elaborado en base a una mezcla de carne de res(principal), carne de cerdo, grasa de cerdo, aglutinantes, especias o aditivos alimenticios que permanecen distribuidos en la mezcla y sometida a proceso de curado, cocción y ahumado o no (Potter, 1978).
- **Salchichón:** Embutido elaborado en base a una mezcla de carne de res como constituyente principal, especias y aditivos y sometida al proceso de curado. Adicionalmente puede o no someterse a cocción (deshidratación y ahumado) (Potter, 1978).
- **Chorizo:** embutido elaborado en base a mezcla de carne de cerdo, especias, y aditivos, sometida a uno o más procesos de curado, deshidratación y ahumado (Potter, 1978).
- **Jamones:** Elaborado en base a mezcla de carne de cerdo y res, grasa de cerdo, aglutinantes, agua o hielo, y aditivos. Es adicionado o no de trozos de carne de cerdo y sometida a cocción, puede o no ser ahumada (Potter, 1978).
- **Paté:** embutido elaborado en base a una mezcla de hígado de aves o cerdo, adicionada o no de grasa de cerdo, especias, y aditivos, y sometida a cocción; puede o no ser ahumada (Potter, 1978).

- **Salchicha:** embutido elaborado en base de carne fresca (res, cerdo, aves) y despojos comestibles que no ha sufrido estacionamiento, su diámetro es de 2 cm aproximadamente; puede ser embutida en una tripa única o en algunos casos separada por ataduras o estrangulaciones de la misma tripa (Potter, 1978).

3.2 Características químicas de los embutidos en Guatemala:

En la siguiente tabla se presentan las principales características de los embutidos producidos en Guatemala:

Tabla No. 1

Características Químicas de los embutidos en Guatemala

CONSTITUYENTE	MAXIMO	MINIMO
Humedad en % en masa (m/m)		
a) Embutidos frescos	60	35
b) Embutidos secos	35	--
Aglutinantes, productos lácteos, almidón de maíz y harinas vegetales; 1 solo de estos o ingesta de 2 o más en % en masa (m/m)	--	5
a) Sal común.	--	4
b) Jarabe de maíz	--	2
c) Azúcar	Cantidad limitada por prácticas correctas de fabricación.	
Otros aditivos en mg/Kg en el producto final:		
a) Ácido ascórbico, isoascórbico y sus sales sódicas, solos o mezclados; expresados como ácido ascórbico (antioxidante)	--	600
b) Nitrato de potasio y/o sodio; como NaNO ₃ (conservador)	--	500
c) Nitritos de sodio y/o potasio (NaNO ₂ o KNO ₂) como nitritos de sodio (NaNO ₂) conservadores.	--	125*

Continúa en página 8

Continuación de la Tabla No. 1: **Características Químicas de los embutidos en Guatemala**

CONSTITUYENTE	MAXIMO	MINIMO
a) Ácido ascórbico, isoascórbico y sus sales sódicas, solos o mezclados; expresados como ácido ascórbico (antioxidante)	--	600
b) Nitrato de potasio y/o sodio; como NaNO ₃ (conservador)	--	500
c) Nitritos de sodio y/o potasio (NaNO ₂ o KNO ₂) como nitritos de sodio (NaNO ₂) conservadores.	--	125*
d) Fosfato añadido(mono di y poli fosfatos de sodio y potasio) solos o mezclados; P ₂₀₅ (buffer)	-	3000
e) Glutamato monosódico; como Ac. Glutámico(acentuador del sabor)	--	2000
f) Ácido sórbico y sales de Na ⁺ , K ⁺ o Ca ⁺² (como conservador)	--	100

Fuente: Norma COGUANOR NGO 34 130:94

3.3 Principales cambios bioquímicos en los procesos de elaboración de los productos cárnicos embutidos:

Las reacciones bioquímicas más importantes que tienen lugar en los productos cárnicos durante su procesamiento son fundamentalmente de tipo enzimático; destacan la hidrólisis de las proteínas musculares (proteólisis), la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos (lipólisis), la hidrólisis de glúcidos (glucólisis), así mismo, las reacciones de transformación de nucleótidos. También tienen lugar reacciones químicas como son las reacciones de Maillard, las degradaciones de Strecker o las reacciones oxidativas. Estos tipos de reacciones favorecen al desarrollo del sabor y aroma del producto final, ocurriendo de forma simultánea y con mayor o menor intensidad dependiendo de las características de cada proceso (Flores, 1998).

3.3.1 Proteólisis en productos cárnicos:

La proteólisis constituye uno de los grupos de reacciones bioquímicas más importantes en la generación del aroma y sabor durante el procesamiento de los productos cárnicos. La proteólisis tiene un gran impacto sobre la calidad de los

productos curado ya que influye directamente sobre la textura por ser responsable de la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y, además, contribuye en la generación de péptidos y aminoácidos libres que influyen directamente en el aroma y sabor del producto final, actuando también como sustratos en reacciones posteriores (Toldrá, 1998).

La evolución de la proteólisis depende del tipo de producto, la cantidad de enzimas musculares endógenas y las condiciones específicas del proceso. La primera etapa de la proteólisis consiste en la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas por la acción de las endopeptidasas musculares (catepsinas, calpaínas, proteasoma y caspasas) para generar grandes polipéptidos, los cuales son posteriormente degradados en péptidos más pequeños y aminoácidos libres por la acción de exopeptidasas como las dipeptidasas, aminopeptidasas, y carboxipeptidasas (Toldrá, 1998).

En los productos cárnicos curados, el tiempo de maduración y procesado es mucho más largo que el de maduración de la carne, llegando hasta los 12 meses e incluso hasta los 24 meses en algunos casos. Esto hace que la rotura de la estructura miofibrilar sea mucho más intensa y completa, produciéndose cambios estructurales muy importantes como la degradación de las cadenas pesadas y ligeras de la miosina, las troponinas C e I, etc., dando lugar a la aparición de una gran cantidad de aminoácidos libres y péptidos pequeños, menores de 1200 Da, que se relacionan con el aroma y sabor típicos de estos productos (Aristoy, 1995).

En los embutidos cocidos, la proteólisis no tiene tanta influencia sobre el sabor y aroma del producto final como en el caso del jamón curado. Durante el proceso de producción del jamón cocido se produce un importante aumento en el contenido de aminoácidos libres en general, aunque algunos de ellos se degradan durante el proceso (Toldrá, 1998).

Los aminoácidos libres y péptidos pequeños generados durante esta intensa proteólisis son responsables en gran medida, junto a otros compuestos, del característico aroma y sabor tanto de productos crudos o cocidos (Toldrá, 1998).

3.3.2 Lipólisis:

La fracción lipídica muscular está constituida fundamentalmente por triglicéridos y fosfolípidos. La lipólisis consiste en la hidrólisis enzimática de los lípidos musculares o del tejido adiposo y se traduce en la generación de ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos liberados van a servir de sustratos para una sucesión de reacciones oxidativas que en último lugar darán origen a una serie de compuestos aromáticos de gran importancia para el desarrollo del aroma y sabor característico de productos curados (Lehninger, 2000).

3.3.3 Glucólisis:

La glucólisis es la secuencia de reacciones que transforman la glucosa en piruvato. Esta vía metabólica se encarga de oxidar o fermentar la glucosa para obtener energía de la célula. Además, la glucólisis también tiene su papel en la función anabólica formando precursores (moléculas de tres átomos de carbono) para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos. Durante el periodo postmortem y en ausencia de oxígeno, la glucólisis anaeróbica es la única fuente de energía de las células del músculo para mantener la homeostasis. En estas condiciones de hipoxia, el NADH no puede ser reoxidado a NAD⁺, siendo este último el aceptor de electrones imprescindible para la oxidación del piruvato. En esta situación, el piruvato se reduce a lactato, aceptando los electrones del NADH y regenerando así el NAD⁺ necesario para la continuación de la glucólisis. En esta vía se generan 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Por último, el piruvato puede convertirse en etanol y CO₂ por medio de la fermentación alcohólica. El ácido láctico generado al final del ciclo de la glucólisis en condiciones anaerobias es el principal responsable de la disminución de pH de la carne postmortem (Lehninger, 2000).

3.3.4. Transformación de nucleótidos:

El adenosíntrifosfato (ATP) es la principal fuente de energía del músculo empleada en las reacciones bioquímicas. Inmediatamente después del sacrificio del animal, hay un periodo de aparente estabilidad del ATP debido a su regeneración a partir de la fosfocreatina y de la glucólisis anaeróbica (Prändl, 1994).

3.3.5. Otros cambios debidos a reacciones químicas:

3.3.5.1 Reacciones de Maillard:

Se trata de una de las principales rutas de generación de compuestos responsables del aroma de la carne y productos cárnicos. Esta reacción se produce entre aminoácidos y grupos reductores como los de los azúcares y otros compuestos carbonílicos. Las reacciones de Maillard, también reconocidas como de pardeamiento no enzimático, requieren cierto aporte de calor o almacenamientos prolongados a temperatura ambiente. Las condiciones ambientales durante las fases finales de la maduración de productos curados son favorables para la formación de este tipo de compuestos según disminuye la actividad de agua del producto (Ventanas, 1992).

El conjunto de reacciones de oxidación y de Maillard generan un gran número de compuestos volátiles que se pueden agrupar en carbonilos (aldehídos y cetonas), furanos, ácidos grasos, pirazinas y compuestos azufrados (sulfuros, tiazoles, tioles y tiofenos) y contribuyen a la formación de compuestos del aroma y sabor en muchos alimentos. La importancia de estas reacciones durante el curado dependerá de las condiciones del proceso, existiendo una correlación entre el aumento en los productos derivados de las reacciones de Maillard y la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Ventanas, 1992). En los embutidos cocidos, la generación de los productos derivados de las reacciones de Maillard dependerán también del pH y de la disponibilidad de oxígeno (Mora, 2010).

3.3.5.2 Reacciones de Strecker:

La degradación de Strecker es una de las vías de las reacciones de Maillard consistente en la desaminación oxidativa y posterior descarboxilación de un aminoácido en presencia de determinados compuestos como pueden ser azúcares reductores o productos de oxidación lipídica. Los compuestos generados a partir de la degradación de Strecker poseen características aromáticas intensas y pueden contribuir al desarrollo del aroma final característico de los embutidos curados. Se trata de una ruta de formación de compuestos volátiles tales como el 2-metil propanal, 2-metil butanal y 3-metil butanal procedentes de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina, respectivamente. También se forman compuestos volátiles azufrados a partir de aminoácidos ricos en azufre como la metionina, cisteína y cistina (Mora, 2010).

3.4 Creatina y Creatinina y su potencial como marcadores bioquímicos de calidad en carne y productos cárnicos:

3.4.1 Creatina:

La creatina (Cr) es un ácido orgánico nitrogenado que se sintetiza de forma natural en el hígado, el páncreas y los riñones a partir de aminoácidos como la arginina, la glicina y la metionina a razón de un gramo de creatina por día, aunque también puede obtenerse a través de complementos dietéticos o de alimentos como la carne o el pescado (Mora, 2010).

3.4.1.1 Participación de la creatina en el metabolismo energético muscular:

En mamíferos, la Creatina se encuentra principalmente presente en el músculo esquelético y es un componente fundamental en el metabolismo energético del músculo. La Creatina proporciona al músculo la energía necesaria para su mecanismo de contracción-relajación y se ha demostrado

que mejora el rendimiento en ejercicios de alta intensidad. En el músculo esquelético, la Cr coexiste en equilibrio con la fosfocreatina; la conversión de creatina en fosfocreatina es catalizada por la enzima creatina quinasa y consiste en la transferencia del grupo γ -fosfato de la adenosina trifosfato (ATP) al grupo guanidino de la Cr (ver **Figuras 1 y 2**). La reacción inversa, por tanto, proporciona un camino alternativo a la glucólisis para la regeneración del ATP. La existencia de este almacén de reserva mantiene los niveles de ATP/ADP lo suficientemente altos para actuar en caso de demanda de energía muscular anaeróbica urgente (Mora, 2010).

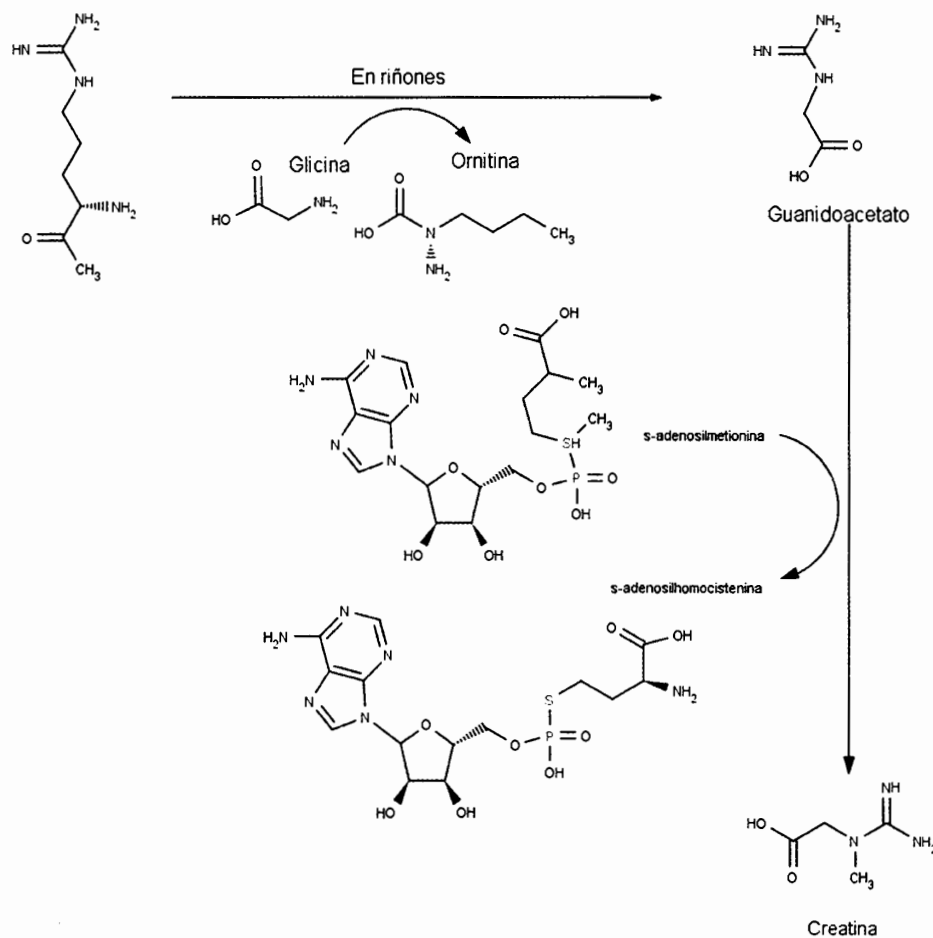


Figura 1: proceso bioquímico de formación de Creatina.

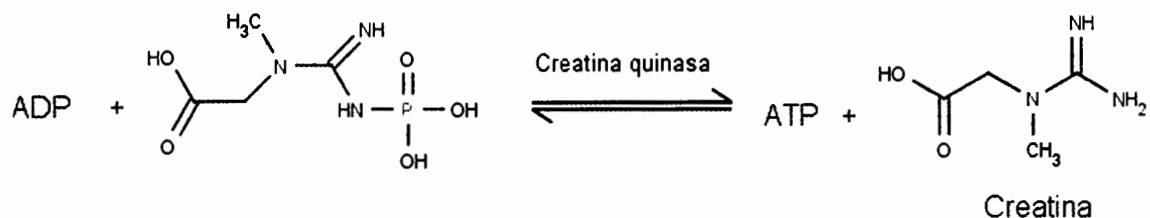


Figura 2: conversión de fosfocreatina en creatina.

3.4.2 Creatinina:

3.4.2.1 Generación de creatinina por tratamientos de calor:

La creatinina (Cn) es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina. Se ha estudiado que la formación de creatinina a partir de creatina o fosfocreatina ocurre por vía no enzimática (ver **Figura 3**), influyendo sólo factores físicos como el pH, la temperatura, el tiempo, y la concentración inicial de los precursores (Fuller, 1988).

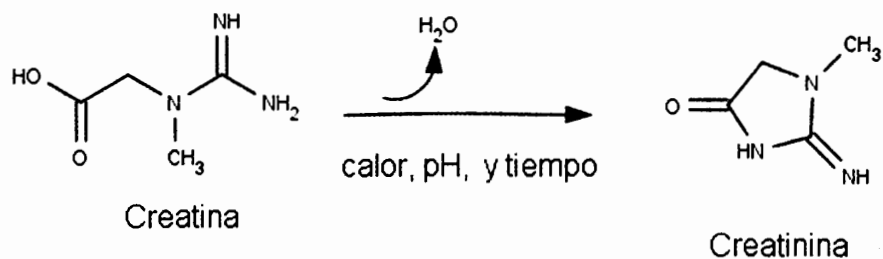


Figura 3: formación de creatinina a partir de creatina.

La creatinina es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que normalmente se produce en una tasa muy constante (dependiendo de la masa muscular). La creatinina es filtrada por los riñones y, si el filtrado del riñón es deficiente, los niveles en sangre se elevan; por ello su medida en suero se usa como indicador de la función renal. Por otro lado, la velocidad de excreción de creatinina también ha sido utilizada para

calcular la masa muscular en humanos y como índice del estado nutricional, basándose en el hecho de que la velocidad de producción de creatinina diaria es constante por la presencia constante de una reserva de los precursores creatina y fosfocreatina en el músculo esquelético (Mora, 2010).

3.5 Métodos analíticos para la determinación de creatina y creatinina compuestos bioquímicos en carne y productos cárnicos:

3.5.1 Métodos de determinación tradicional para creatina y creatinina:

No existe un método oficial para determinar creatina y creatinina, sin embargo algunas investigaciones usualmente emplean el método de Folin, basado en la reacción de Jaffé. También se ha realizado la determinación simultánea de creatina y de creatinina, en la carne y productos cárnicos, por reacción entre la creatina con 1-naftol y biacetil, a través de metodologías de inyección de flujo. Otras técnicas alternativas son: cromatografía en fase reversa con emparejamiento de iones, método capilar isotacoforético y ensayos espectrofotométricos con sistemas a base de enzimas, sin embargo estas metodologías resultan costosas, además de requerir una elevada inversión de tiempo (Mora, 2010).

3.5.2 Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC):

Como se ha comentado anteriormente, tanto la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa como de intercambio iónico han sido durante décadas los métodos elegidos para el análisis de péptidos. Sin embargo, la cromatografía de fase reversa presenta algunas limitaciones en el análisis de compuestos polares debido a la baja retención de los mismos. En la cromatografía de intercambio iónico el uso de fases móviles de pH bajos puede alterar la estructura de los analitos, como en el caso de la creatina que a pH bajos se convierte en creatinina. En este sentido, la cromatografía de interacción hidrofílica constituye una alternativa interesante a estos tipos de cromatografía por muchas razones. Esta técnica utiliza fases móviles similares a las empleadas en fase reversa, con la consecuente ventaja

sobre la solubilidad del analito, sin embargo, no precisa del uso de agentes derivatizantes o pares iónicos para aumentar la retención, generalmente necesarios en RP-HPLC. Por otro lado, se trata de una cromatografía líquida perfectamente compatible con espectrometría de masas, eliminando el paso de desalado que es necesario cuando se utiliza la cromatografía líquida de intercambio iónico (Merck, 2011).

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es complementaria a la cromatografía de fase reversa. Compuestos que presentan poca o ninguna retención en fase reversa suelen presentar una fuerte retención en columnas HILIC, las cuales requieren fases móviles con un alto contenido en componente orgánico con el fin de promover las interacciones hidrofílicas entre el analito y la fase estacionaria. El tiempo de retención en este tipo de cromatografía aumenta con la polaridad del péptido, la polaridad de la fase estacionaria, y con la concentración en disolvente orgánico de la fase móvil utilizada para la elución, al contrario de lo que ocurre en fase reversa. Aunque sí se han descrito estudios sobre el uso de este tipo de cromatografía en la separación de péptidos, no existen prácticamente registros sobre su aplicación en el análisis de alimentos (Mora, 2010; Merck, 2011).

3.6 Validación de métodos:

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de estudios de laboratorio, que las características del método cumplen con los parámetros establecidos para las aplicaciones analíticas. Las características con las que debe cumplir un método analítico típico son: Exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y rango (OGA, 2004).

3.6.1 Exactitud:

Grado de concordancia entre el valor aceptado como un valor verdadero convencional, o un valor de referencia, y el valor encontrado por el procedimiento instrumental. Puede determinarse en base al porcentaje de recuperación del analito y a la relación lineal entre la cantidad presente del analito (OGA, 2004).

3.6.2 Precisión:

Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. La precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia. Dicho de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de la media, que puede ser expresada en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (parámetros de dispersión) (OGA, 2004).

3.6.2.1 Repetibilidad:

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas en las mismas condiciones de medición. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento, analista/observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto período de tiempo.

La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación). A la repetibilidad también se le conoce como precisión intraensayos o intracalibraciones (OGA, 2004).

3.6.2.2 Reproducibilidad:

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición. Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del análisis o calibración. Estos cambios pueden incluir: el principio en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo.

Se determina en los casos en que se quiere normalizar un método, para transferirlo de un laboratorio a otro o para incluirlo en una farmacopea, y por ello se necesita conocer la precisión entre laboratorios. En el caso más común, que es el de la transferencia directa del método, del laboratorio de origen al laboratorio destino, ambos laboratorios deben analizar el mismo lote de muestras homogéneas trabajando bajo el mismo diseño experimental (OGA, 2004).

3.6.2.3 Precisión intermedia:

Se evalúa de acuerdo a un diseño experimental específico que responda a las circunstancias bajo las cuales será utilizado el método y minimice el número de experimentos que se necesite efectuar; dicho diseño puede incluir las variaciones que globalmente se dan de día a día, y las variaciones en analista y en equipo (OGA, 2004).

Si se evalúa la precisión intermedia, no es necesario evaluar la reproducibilidad y viceversa.

3.6.3 Linealidad:

Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango. Se representa matemáticamente por medio de una ecuación de

línea recta $y = mx + b$. Usualmente puede expresarse en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la ecuación de regresión de la respuesta instrumental, obtenida por el análisis de muestras con diferentes concentraciones del analito (OGA, 2004).

3.6.4 Límite de detección:

Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

3.6.5 Límite de cuantificación:

Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada por el método instrumental con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas.

3.6.6 Robustez:

Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.

3.6.7 Rango:

Intervalo entre el valor máximo y mínimo de la concentración del analito el parámetro de la muestra, para el cual ha sido demostrado que el nivel de precisión, exactitud y linealidad del método de análisis es adecuado (OGA, 2004).

4. JUSTIFICACIÓN

Según el Instituto Nacional de Estadística, en Guatemala, se estima que existe una disponibilidad de productos embutidos crudos y curados de 36,361 toneladas promedio anual (INE, 2008), lo que representa un importante nivel de consumo de estos productos por la población. Sin embargo, los controles de calidad que exige la legislación guatemalteca (COGUANOR NGO 34 130:94) se limitan a control microbiológico y de aditivos químicos, sin atender al tiempo de curado y las temperaturas de cocción, que son un factor importante en el proceso y que se ve reflejado en la calidad final del producto.

La creatina y la creatinina son compuestos bioquímicos presentes en la carne y embutidos (curados y cocidos), que pueden ser utilizados como indicadores de la calidad del producto, ya que se ha señalado la relación directa entre el tiempo de curado y la temperatura de cocción con la relación de concentraciones (creatinina/creatina) (Mora, 2008). Sin embargo la metodología de Folin, para la cuantificación de creatina y creatinina, basada en la reacción de Jaffé, y otras metodologías, implican derivatización, resultando costosas, además de requerir una elevada inversión de tiempo (Mora, 2010).

El empleo de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es una buena alternativa, para la cuantificación de especies como la creatina y creatinina, ya que no implica derivatización y resulta rápido y confiable. Sin embargo, no se cuenta con una metodología validada para realizar la cuantificación simultánea de estos compuestos.

El objetivo del presente trabajo se enfocó en el desarrollo de una metodología HILIC, la cual es fundamental para realizar investigaciones que permitan estudiar la relación de concentraciones (creatinina/creatina), como potencial marcador de calidad en el proceso de elaboración de embutidos en Guatemala. Con esto se lograría la implementación de nuevos controles de calidad que permitan a las industrias de productos cárnicos y a las entidades de salud, contar con métodos que aseguren la calidad de los alimentos que contienen carne.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Desarrollar un método, según los parámetros establecidos por la Oficina Guatemalteca de Acreditación, para la cuantificación simultánea de creatina y creatinina en productos cárnicos embutidos por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC).

5.2 Específicos

5.2.1 Diseñar un método de análisis selectivo para la cuantificación simultánea de Creatina y creatinina en productos cárnicos embutidos por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), utilizando como referencia productos cárnicos embutidos disponibles comercialmente.

5.2.2 Evaluar el cumplimiento del método desarrollado por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), con los parámetros de exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y rango, aplicada a productos cárnicos disponibles comercialmente, según la política OGA-GEC-016 de la Oficina Guatemalteca de Acreditación.

6. HIPÓTESIS

Es factible cuantificar creatina y creatinina simultáneamente por la técnica de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) y obtener resultados aceptables de exactitud, precisión, linealidad, robustez y rango según la política OGA-GEC-016 de la oficina guatemalteca de acreditación.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo:

Productos cárnicos embutidos.

7.2 Muestra:

Debido a que se desarrollará un método y se evaluará siguiendo los parámetros de validación, el muestreo se limita a obtener 20 fracciones de 10 gramos de un producto cárnico embutido.

7.3 Recursos:

7.3.1 Humanos:

7.3.1.1 **Autor:** Belma Regina Hurtarte Marín

7.3.1.2 **Asesor:** Licenciado Jorge García

7.3.1.3 **Co-asesor:** Lic. Eduardo Robles

7.3.1.4 Personal de Empresa RGH, S.A.

7.3.2 Materiales:

7.3.2.1 Recursos Institucionales:

7.3.2.1.1 Empresa RGH, S.A.

7.3.2.1.2 Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3.2.2 Instrumentos y Equipo:

7.3.2.2.1 Balanza analítica Sartorius (0.0001)

7.3.2.2.2 Centrifugadora

7.3.2.2.3 Refrigeradora

7.3.2.2.4 Equipo de filtración para solventes y filtros de membrana

7.3.2.2.5 Cromatógrafo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución HITACHI modelo Lachrom Elite.

Bomba: HITACHI modelo Lachrom Elite L-2130
 Automuestreador: HITACHI modelo Lachrom Elite L-2200
 Detector: HITACHI modelo Lachrom Elite L-2400
 Horno: HITACHI modelo LachromElite L-2350
 Columna: SeQuantZic-HILIC 150 x 4.6mm, 5µm, 200 Å

7.3.2.3 Cristalería:

Tabla No. 2

Cristalería

Descripción	Capacidad	Material
Balones aforados	100, 50, 25 mL	vidrio
Tubos de ensayo con rosca	10 mL	vidrio
Embudos	--	vidrio
Erlenmeyers	100, 50 mL	vidrio
Beackers	250 mL	vidrio
Micropipetas	--	vidrio
Equipo para filtración	1000 mL	vidrio
Viales con septum	10 mL	vidrio
Espátulas	--	Acero inoxidable

7.3.2.3 Reactivos:

- 7.3.2.3.1 Ácido clorhídrico fumante 37% p.a. (Merck)
- 7.3.2.3.2 Acetonitrilo HPLC Isocraticolichrosolv® (Merck)
- 7.3.2.3.3 Acetato de amonio p.a. (Merck)
- 7.3.2.3.4 Ácido acético glacial 100% p.a. (Merck)
- 7.3.2.3.5 Ácido fórmico 98-100% p.a. (Merck)
- 7.3.2.3.6 Agua para cromatografía Lichrosolv
- 7.3.2.3.7 Creatina monohidrato para síntesis (Merck)

7.3.2.3.8 Creatinina para fines bioquímicos (Merck)

7.4 Métodos:

7.4.1 Implementación y afinación del método:

7.4.1.1 Extracción de la muestra y preparación de estándares:

Las muestras se extraen y desproteinizan de la siguiente forma: se pesan 5 gramos de la muestra y se homogenizan con 20 mL de ácido clorhídrico 0.01N y agitación magnética durante 8 min. Posteriormente se centrifuga en frío (5 °C) a 6,000 rpm durante 40 min. Filtrar el sobrenadante con filtros de Nylon de 0.20 µm y 1 mL de esta solución se desproteinizan por adición de 5 mL de acetonitrilo, dejar reposar por 4 min a 5°C, finalmente, la muestra se centrifuga a 6,000 rpm durante 18 min. El sobrenadante es directamente analizado.

7.4.1.2 Condiciones cromatográficas:

Fase Móvil: Buffer de acetato de amonio 0.65 mM, pH 5.5/acetonitrilo (25:75)

Columna: SeQuantZic-HILIC 150 x 4.6 mm, 5 µm, 200 Å

Detector: ultravioleta a 214 nm para creatina y 236 nm para creatinina

Volumen de inyección: 20 µL

Flujo: 0.7 mL/min

Temperatura del horno: 25 °C

Tiempo de retención: creatinina 4.73 min y creatina 10.04 min

6.4.2 Validación de la metodología:

7.4.2.1 Exactitud:

Preparar soluciones estándar con concentraciones de 80, 100 y 120% de la concentración esperada para las muestras disolviendo con fase móvil. Inyectar cada una de las soluciones por triplicado y obtener el porcentaje de recuperación para cada una de las nueve inyecciones y la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (RDS) de todas las mediciones. Para obtener la RDS utilizar la siguiente fórmula:

$$RSD = \frac{s * 100}{x}$$

Donde s es la desviación estándar de todas las mediciones y x es el promedio de todas las mediciones.

Se escoge el valor de t_{tablas} utilizando los grados de libertad $(n-1)=8$ y un nivel de confianza del 95%, siendo este valor $t_{\text{tablas}} = 2.306$. El intervalo de confianza para la media de la muestra de las mediciones realizadas se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$IC = x \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

Donde x corresponde a la media de las mediciones, t es 2.306, s es la desviación estándar y n corresponde al número de mediciones (Skoog, 2001).

7.4.2.2 Repetibilidad:

Utilizar un estándar de concentración conocida dentro del rango analítico evaluado (creatinina de 3.78 - 210 mg/Kg y para creatina de 9.48 a 77 mg/Kg) y medir la concentración del analito por lo menos 10 veces, realizar las mediciones bajo las mismas condiciones. Calcular el promedio y

desviación estándar, con estos datos la repetibilidad puede establecerse por medio del coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor a un porcentaje preestablecido, según se indica en la Tabla No.3:

Tabla No. 3
Coeficiente de variación permitido

TIPO DE METODO	PORCENTAJE
Métodos cromatográficos	2%
Métodos químicos y espectrofotométricos	3%
Métodos microbiológicos	5%

Fuente: Política OGA-GEC-016

El valor máximo de coeficiente de variación puede establecerse a priori por el investigador.

7.4.2.3 Precisión intermedia:

Se pueden evaluar de la siguiente forma:

Empleando el mismo aparato, la misma columna, el mismo analista, en el transcurso de 2 días alternos:

Preparar un estándar de concentración 100 %, e inyectarlo por lo menos 5 veces.

Análisis estadístico: se determina el coeficiente de variación para los datos obtenidos por el mismo analista en distintos días. También se realiza un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

7.4.2.4 Linealidad:

Se preparan cinco soluciones estándar que tengan concentraciones de 60, 80,100, 120 y 140% de la concentración esperada para las muestras, utilizando fase móvil como solvente. Hacer tres inyecciones de cada

solución. Obtener el área de las inyecciones de cada solución y graficar contra la concentración de cada una, obteniendo así la curva de calibración. Luego determinar la pendiente y el intercepto de la curva de calibración así como el coeficiente de determinación r^2 mediante un análisis de regresión lineal simple. Para que sea aceptable se debe evaluar dos parámetros, el valor de r^2 y el análisis de varianza. El valor r^2 establece la cantidad de variación explicada por el modelo lineal en función de la variabilidad total y ese valor debe ser mayor a 0.990 para ser aceptado. Se debe realizar un análisis de varianza sobre los datos obtenidos utilizando una herramienta de análisis de datos y se debe obtener los valores de grados de libertad, suma de cuadrados, promedio de los cuadrados, valor de F, y el valor de F crítico para la regresión, los residuos y el total. El análisis de varianza se utiliza para determinar si la ecuación lineal obtenida anteriormente es significativa.

7.4.2.5 Límite de detección:

El cálculo del límite de detección puede realizarse utilizando los valores obtenidos de la curva de calibración en el cálculo de la linealidad de la metodología. Primero se debe obtener el error estadístico $S_{y/x}$, que estima los errores aleatorios de los valores de y en la curva de calibración. El valor del error estadístico se determina con el siguiente modelo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

En donde y son los valores promedio de las áreas obtenidas para cada punto en la curva de calibración y donde \hat{y} es el valor corregido de y obtenido de la curva de calibración. El valor de cada \hat{y} se obtiene despejando la variable y en la ecuación de la curva de calibración, y sustituyendo el valor x de cada concentración correspondiente. Por último

el valor n corresponde al número de puntos de la calibración. El cálculo del valor de y en el límite de detección viene dado por $a + 3S_{y/x}$ donde a corresponde al valor de la ordenada en el origen (o valor del blanco) obtenido de la curva de calibración y donde $S_{y/x}$ es el error estadístico. Con esta ecuación se obtiene el valor de y en el límite de detección por lo que solo se sustituye este valor de la curva de calibración (obtenida al calcular la linealidad) y se obtiene la concentración del límite de detección (Miller, 2002).

7.4.2.6 Límite de cuantificación:

El límite de cuantificación se calcula de forma similar al límite de detección. La única diferencia radica en la forma de obtener el valor de y en el límite de cuantificación, ya que está dado por $a + 10 S_{y/x}$ en lugar de $3s_{y/x}$, luego se calcula de la misma forma la concentración del límite de cuantificación.

7.4.2.7 Robustez:

Se escogen tres parámetros principales como el cambio de flujo, cambio en la temperatura de la columna durante el análisis y cambio en el tiempo de extracción-análisis de muestras.

7.4.2.9.1 Cambio de flujo: preparar una muestra por triplicado estableciendo el flujo 0.7mL/min. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar el flujo subiendo este a 1.0 mL/min. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de flujo, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2%.

7.4.2.9.2 Cambio en la temperatura: preparar una muestra por triplicado estableciendo la temperatura del horno a 25 °C. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar la temperatura del horno subiendo esta a 35 °C. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de temperatura, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores de temperatura obtenidos debe ser menor al 2%.

7.4.2.9.2 Cambio en la forma de extracción: Preparar una muestra y analizarla por triplicado utilizando las condiciones normales de la metodología. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego preparar una muestra filtrando en lugar de centrifugar. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de extracción, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2%.

7.4.2.8 Rango:

Para determinar el rango de una metodología primero se determina el límite de cuantificación y este se toma como el inicio del rango del método. El límite superior del rango será aquella concentración máxima que cumpla con los requisitos de linealidad y repetibilidad, evaluándose con una prueba F a un nivel de confianza del 95%.

8. RESULTADOS

8.1 Exactitud:

Tabla No. 4
Porcentaje de Recuperación para Creatinina y Creatina

No. de Inyección	Concentración (%)	% de Recuperación Creatinina	% de Recuperación Creatina
1	80	98.88	95.21
2	80	98.97	95.09
3	80	99.19	95.65
4	100	97.08	93.83
5	100	97.06	94.00
6	100	97.4	94.46
7	120	96.65	93.43
8	120	96.52	93.41
9	120	96.58	93.54
	Media	97.59	94.29
	Desviación Estándar	1.10	0.85
	Coefficiente de Variación (%)	1.13	0.90
	Intervalo de confianza	96.72 - 98.42	93.63 - 94.94

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

8.2 Repetibilidad:

Tabla No. 5

Repetibilidad de Creatinina y Creatina

No. de inyección	Creatinina		Creatina	
	Porcentaje	Concentración (mg/kg)	Porcentaje	Concentración (mg/kg)
1	100.11	15.02	100.68	55.37
2	100.25	15.04	100.91	55.5
3	100.19	15.03	100.99	55.54
4	100.19	15.03	101.04	55.57
5	100.12	15.02	101.12	55.62
6	100.23	15.04	101.18	55.65
7	100.16	15.02	101.12	55.61
8	100.14	15.02	101.16	55.64
9	100.04	15.01	101.27	55.7
10	100.14	15.02	101.13	55.62
Mínimo	100.04	15.01	100.68	55.37
Máximo	100.25	15.04	101.27	55.7
Media	100.16	15.03	101.06	55.58
Desviación Estándar	0.06	0.010	0.17	0.09
Coefficiente de variación (%)	0.06	0.065	0.17	0.17

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

8.3 Precisión Intermedia:

Tabla No. 6
Precisión intermedia Día Uno

No. de muestra	Creatinina (mg/kg)	Creatina (mg/kg)
1	10.24	38.53
1	10.2	38.52
1	10.21	38.5
1	10.15	37.6
1	10.25	37.98
2	10.2	38.39
2	10.19	38.47
2	10.2	38.45
2	10.03	37.76
2	10.01	38.01
Media	10.17	38.22
Desviación Estándar	0.083	0.35
Coefficiente de Variación (%)	0.81	0.92

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No. 7
Precisión intermedia día Dos

No. de muestra	Creatinina (mg/kg)	Creatina (mg/kg)
1	10.1	38
1	9.99	37.68
1	10.06	37.99
1	10.29	38.79
1	10.19	38.35
2	10.06	37.88
2	10.04	37.87
2	10.08	38.03
2	10.09	38.07
2	10.19	38.5
Media	10.109	38.116
Desviación Estándar	0.09	0.33
Coefficiente de Variación (%)	0.88	0.88

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No. 8
ANOVA

Factor	Creatinina		Creatina	
	Valor de F	Valor p	Valor de F	Valor p
Día	2.57	0.13	0.45	0.51
Muestra	2.57	0.13	0.11	0.75

Fuente: Tabla No. 6 y No. 7

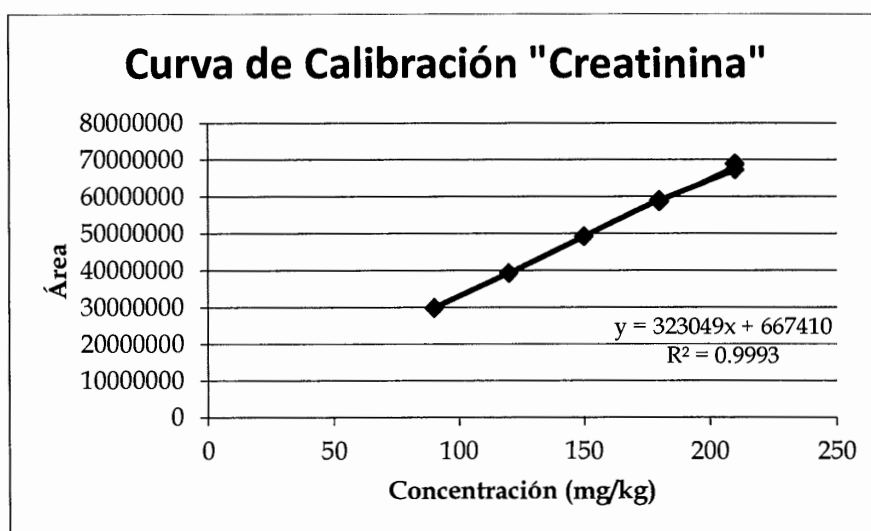
8.4 Linealidad:

Tabla No. 9
Linealidad Creatinina

Concentración (mg/kg)	Área Repetición 1	Área Repetición 2	Área Repetición 3	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
90	29727682	29769419	29844636	59270.30225	0.20
120	39294486	39310406	39186201	67584.47757	0.17
150	49187001	49257280	49319859	66466.17842	0.13
180	59072444	58667790	58990965	214019.3791	0.36
210	67375523	69027844	68840493	904746.943	1.32

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Gráfica No. 1



Fuente: Tabla No. 9

Tabla No. 10

Análisis de varianza Creatinina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	P
Regresión	1	2.81774E+15	2.81774E+15	18806.2655	6.2011E-22
Residuos	13	1.94779E+12	1.4983E+11		
Total	14	2.81969E+15			

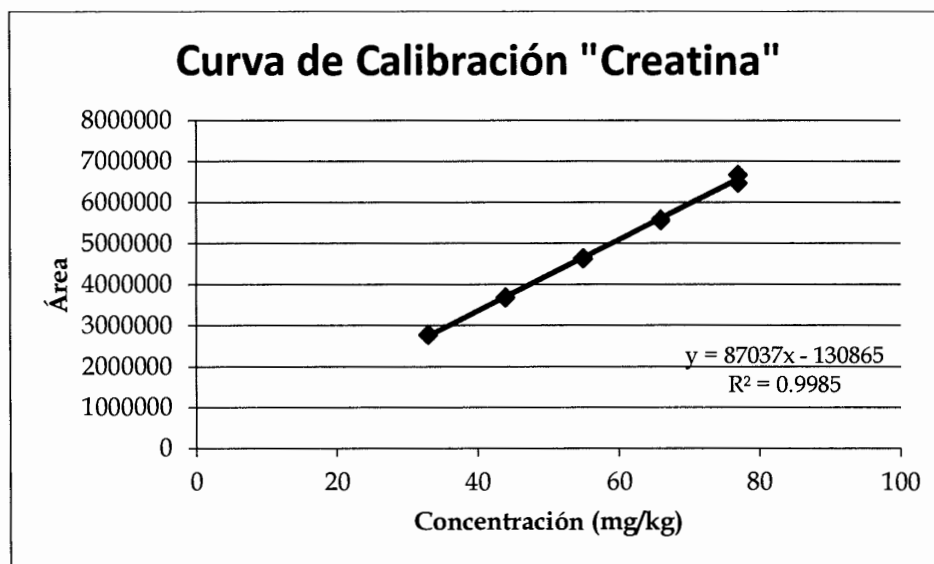
Fuente: Tabla No. 9

Tabla No.11
Linealidad Creatina

Concentración (mg/kg)	Área Repetición 1	Área Repetición 2	Área Repetición 3	Desviación Estándar	Coficiente de Variación (%)
33	2762098	2770999	2783810	10914.51989	0.39
44	3682542	3689783	3672541	8657.738793	0.23
55	4629907	4631781	4646517	9097.194366	0.20
66	5594407	5556808	5593110	21343.23552	0.38
77	6474740	6680679	6672873	116710.8186	1.76

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Gráfica No. 2



Fuente: Tabla No. 11

Tabla No. 12
Análisis de varianza Creatina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	P
Regresión	1	2.74989E+13	2.74989E+13	8675.408321	9.42816E-20
Residuos	13	41206758638	3169750664		
Total	14	2.75401E+13			

Fuente: Tabla No. 11

8.5 Límite de Detección:

Tabla No. 13

Límite de Detección Creatinina

Sy/x	122175.95
Intercepto	667410
Y	1033937.84
Límite de detección	1.13 mg/kg

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No. 14

Límite de Detección Creatina

Sy/x	56300.54
Intercepto	130865
Y	299766.62
Límite de detección	4.95 mg/kg

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

8.6 Límite de Cuantificación:

Tabla No. 15

Límite de Cuantificación Creatinina

Sy/x	122175.95
Intercepto	667410
Y	1889169.46
Límite de cuantificación	3.78 mg/kg

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No. 16

Límite de Cuantificación Creatina

Sy/x	56300.54
Intercepto	130865
Y	693870.39
Límite de cuantificación	9.48 mg/kg

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

8.7 Robustez:

8.7.1 Cambio de temperatura:

Tabla No. 17

Robustez a 25 °C

Muestra	Creatinina (mg/kg)	Creatina (mg/kg)
1 (repetición 1)	10.15	50.37
1 (repetición 2)	10.18	50.58
1 (repetición 3)	10.21	50.59
Mínimo	10.15	50.37
Máximo	10.21	50.59
Promedio	10.18	50.52
Desviación Estándar	0.03	0.12
Coefficiente de Variación (%)	0.28	0.24

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 18

Robustez a 35 °C

Muestra	Creatinina (mg/kg)	Creatina (mg/kg)
1 (repetición 1)	10.27	51.25
1 (repetición 2)	10.25	51.32
1 (repetición 3)	10.12	50.63
Mínimo	10.12	50.63
Máximo	10.27	51.32
Promedio	10.21	51.07
Desviación Estándar	0.08	0.38
Coefficiente de Variación (%)	0.78	0.74

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

8.8 Rango:

Tabla No. 19

Prueba F para Creatinina

Intervalo de Concentraciones	Promedio de Áreas	Varianza	Prueba F	F crítico	P
90 mg/kg	29780579	3512968729	13.04	19.00	0.07
180 mg/kg	58910399.67	45804294630			

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No. 20

Prueba F para Creatina

Intervalo de Concentraciones	Promedio de Áreas	Varianza	Prueba F	F crítico	P
33 mg/kg	2772302.33	119126744.3	3.82	19.00	0.21
66 mg/kg	5581441.67	455533702.3			

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No. 21

Rango Lineal para cuantificación Simultánea de Creatinina y Creatina

	Límite Inferior (mg/kg)	Límite Superior (mg/kg)
Creatinina	3.78	180
Creatina	9.48	66

Fuente: Datos experimentales, Laboratorio RGH, S.A.

9. DISCUSIÓN

Para el desarrollo de este método simultáneo de cuantificación de creatinina y creatina, se llevaron a cabo diferentes etapas, comenzando por la optimización y afinación tanto de la extracción de los analitos como de las condiciones cromatográficas más adecuadas para la separación e identificación de los mismos. Con estas condiciones se determinó un tiempo de retención para creatinina de 4.73 minutos y de 10.04 minutos para creatina, obteniéndose una separación adecuada de los picos, siendo factible la cuantificación simultánea de los mismos (Anexo No. 1).

Para determinar la validez del método desarrollado se evaluaron ciertos criterios de validación requeridos por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA). Al evaluar la exactitud del método se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio para creatinina de 97.59% y para creatina de 94.29%, con un coeficiente de variación de 1.13 y 0.90 respectivamente. Para el porcentaje de recuperación de cada analito se determinó el intervalo de confianza (Tabla No. 3), encontrándose ambos dentro del rango sugerido en la política OGA-GEC-016, que indica que para productos no regulados el porcentaje de recuperación puede estar comprendido entre el 90% y 110% (Anexo No. 2).

La repetibilidad o precisión del sistema se avaluó inyectando una muestra 10 veces y determinando el coeficiente de variación para cada analito, el cual fue de 0.06% para creatinina y 0.17% para creatina, los cuales se consideran válidos, ya que el criterio indica que para un método analítico el coeficiente de variación debe ser menor al 2% (Anexo No. 3).

La precisión intermedia se evaluó preparando dos muestras por un mismo analista dos días distintos, determinándose coeficientes de variación para creatinina de 0.81% para el día uno y 0.88% para el día dos. Los coeficientes de variación obtenidos para creatina son, para el día uno 0.92% y para el segundo día 0.88%. En todos los casos los porcentajes de variación obtenidos son válidos ya que se encuentran por debajo del 2% según lo especificado por la OGA (Anexo No. 4). Adicionalmente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los factores (días y muestras), encontrándose que, tanto para creatinina como para creatina, no existe diferencia significativa entre muestras ni entre días (Tabla No. 8).

La linealidad del método se determinó realizando una curva de calibración de 5 diferentes concentraciones inyectando cada una por triplicado. Los valores de coeficiente de variación obtenidos para cada punto de calibración fueron menores al 2%, y el coeficiente de determinación (r^2) obtenido de la regresión lineal es de 0.9993 para creatinina y de 0.9985 para creatina, los cuales superan el valor de 0.99 utilizado como uno de los criterios de aceptación. También se realizó un análisis de varianza para determinar el valor "p", el cual es en ambos casos < 0.00001 , lo que nos indica que la ecuación de regresión lineal obtenida tanto para creatinina como para creatina es significativa, por lo que el método desarrollado posee un linealidad adecuada para cuantificar muestras que contengan creatinina y creatina (Anexo No. 5).

El límite de detección indica la mínima concentración que puede detectarse en el método desarrollado. Este se determinó a partir de los datos de la curva de calibración y esta definido por $a + 3S_{y/x}$, donde $S_{y/x}$ corresponde al error estadístico de la curva de calibración. El valor de $S_{y/x}$ para creatinina es de 122175.95 y para creatina es de 56300.54, los cuales corresponden a límites de detección para creatinina de 1.13 mg/kg y para creatina de 4.95 mg/kg. El límite de cuantificación establece la concentración mínima que puede cuantificarse por el método desarrollado. Se determinó de forma similar al límite de

detección, cambiando únicamente el multiplicador de del error estadístico por 10. Para creatinina se obtuvo un límite de cuantificación de 3.78 mg/kg y para creatina de 9.48 mg/kg. Para el límite de detección y cuantificación no existe un valor aceptable o rechazable, pero proporcionan información importante ya que determinan el alcance que el método desarrollado puede tener para la cuantificación de muestras con concentraciones mucho más bajas de analito. En este caso no se encuentran valores promedio para los analitos en los diferentes productos cárnicos embutidos, debido a que las concentraciones varían de un producto a otro y dependen de procesos como curado, cocción, deshidratación y ahumado (Potter, 1978), tipo de carne, y factores como pH, temperatura, y humedad.

En la robustez se determina la capacidad que tiene la metodología de proporcionar resultados estadísticamente iguales con pequeñas variaciones en las condiciones metodológicas. Para evaluar este parámetro, primero se utilizó una variación en la temperatura. Se preparó una muestra, la cual se inyectó por triplicado a la temperatura establecida en la metodología (25 °C), y se inyectó tres veces más a una temperatura de 35 °C, obteniéndose en ambos casos concentraciones muy similares, siendo estas para creatinina 10.18 mg/kg y 10.21 mg/kg a 25 °C y 35 °C respectivamente, con un coeficiente de variación de 0.28% y 0.78%, y para creatina concentraciones de 50.52 mg/kg y 51.07 mg/kg a 25 °C y 35 °C respectivamente, con coeficiente de variación de 0.24% y 0.74%, con lo cual se determina que el método es robusto para variaciones en la temperatura de análisis. También es importante destacar que no existe ningún cambio en los tiempos de retención de los analitos y tampoco se ve afectada la separación de los mismos con la variación de temperatura en el rango evaluado (Anexo No. 6).

La segunda variación para comprobar la robustez fue el cambio de flujo, donde se determinó que pequeñas variaciones en el flujo afectan la separación de los componentes de la muestra, por lo que el método no es robusto para cambios de flujo, como se observa en el Anexo No. 7 donde el flujo de análisis corresponde a 1 mL/min.

La última variación para evaluar la robustez del método, fue cambios en la forma de extracción de los analitos. Se prepararon dos muestras, una siguiendo el procedimiento descrito en la metodología y otra muestra se preparó omitiendo el proceso de centrifugación. El cromatograma obtenido de la muestra sin centrifugar muestra que durante el proceso de centrifugación se eliminan componentes que interfieren en la separación de los analitos (Anexo No. 8). Por lo que el método no es robusto para cambios en el procedimiento de extracción de la muestra.

El rango, determina el intervalo de concentraciones que pueden ser cuantificadas con precisión y exactitud empleando el método desarrollado. El límite inferior del rango está dado por el límite de cuantificación. El límite superior se determina evaluando la homoscedasticidad de la curva lineal con una prueba F, encontrándose que el límite superior para creatinina corresponde a una concentración de 180 mg/kg y para creatina a 66 mg/kg, para ambas pruebas se obtuvo un valor "p" superior a 0.05, lo que indica que las varianzas de las concentraciones del rango lineal evaluado para cada analito son iguales (estadísticamente) para un nivel de confianza del 95% (Tabla No. 19 y Tabla No. 20).

El cumplimiento de los parámetros anteriormente descritos indica que el método desarrollado es adecuado para la cuantificación simultánea de creatinina y creatina en productos cárnicos embutidos, aportando así, una herramienta útil para realizar nuevas investigaciones e implementar nuevos controles de calidad en alimentos que contienen carne.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método desarrollado para la cuantificación simultánea de Creatinina y Creatina cumple con los parámetros de exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y linealidad, aplicado a productos cárnicos disponibles comercialmente, según la política OGA-GEC-016 de la Oficina Guatemalteca de Acreditación.
- 10.2 La metodología desarrollada tiene un rango lineal para cuantificación de creatinina en muestras de productos cárnicos embutidos de 3.78 mg/kg a 180.00 mg/kg y de 9.48 mg/kg a 66.00 mg/kg para creatina.
- 10.3 Para la metodología desarrollada se obtiene un límite de detección para creatinina de 1.13 mg/kg y 4.95 mg/kg para creatina.
- 10.4 El límite de cuantificación del método desarrollado para creatinina corresponde a 3.78 mg/kg y 9.48 mg/kg para creatina.
- 10.5 El método desarrollado es robusto para variaciones de temperatura
- 10.6 Pequeñas variaciones de flujo o cambios en la forma de extracción impiden la separación y cuantificación de los analitos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Evaluar la metodología empleando otras matrices, por ejemplo carne cruda, y así determinar la eficiencia en la cuantificación de creatinina y creatina, ya que esta matriz no posee aditivos que puedan actuar como interferentes.
- 11.2 Emplear esta metodología para plantear un estudio sobre la relación creatina/creatinina en productos cárnicos embutidos, ya que dicha relación puede utilizarse para implementar controles de calidad en estos productos.
- 11.3 Realizar lavados periódicos con cloruro de sodio 0.5M a la columna SeQuantZic-HILIC, para que la presión se mantenga constante durante los análisis, y así prolongar la vida útil de la misma.
- 11.4 Verificar robustez de la metodología cambiando equipo y analista.
- 11.5 Validar la metodología desarrollada para la cuantificación simultánea de creatinina y creatina.

12. REFERENCIAS

1. Aristoy, M. y Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In Food flavors: Generation, analysis and process influence (Ed G. Charalambous). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science. pp. 1323-1344
2. Comisión Guatemalteca de Normas. (1994). Política: COGUANOR NGO 34 130:94. Diario de Centroamérica Agosto de 1994.
3. Dardon B. 2010. Sección economía. Prensa Libre. Edición Impresa 25/10/2010).
4. Flores, M., Spanier, A., Toldrá, F. (1998b). Flavour analysis of dry-cured ham. In Flavor of meat, products and seafood (Ed F. Shahidi). London, UK: Blackie A&P. Chapman & Hall. pp. 320-341.
5. Fuller, N. y Elia, M. (1988). Factors influencing the production of creatinine - Implications for the determination and interpretation of urinary creatinine and creatine in man. Clinica Chimica Acta 175(3), 199-210.
6. Instituto Nacional de Estadística- INE-. (2008). Hoja de Balance de alimentos. Guatemala. pp. 25
7. Kirk, R., Egan, H., Sawyer, R. (1996). Composición y análisis de Alimentos de Pearson. 2da. Ed. Compañía editorial continental, S. A. de CV. México. Pp518-555.
8. Lehninger, A., Lee, D., Cox, M. (2000). Principles of Biochemistry. Third Edition. (Eds D. L. Nelson & M. M. Cox). New York. Worth publishers. pp. 521-559
9. Merck. Columnas HILIC. Disponible en: http://www.merck-chemicals.com.gt/columnas-zic-hilic-hplc/c_TcGb.s1OJfQAAAEaFMlf.ck9?-CountryName=Guatemala. Fecha de Revision: 20/5/2011.
10. Miller, N. y Miller, J. (2002). "Estadística y Quimiometría para Química Analítica". 4ª Edición, Pearson Educación, S.A. Madrid. pp11-125
11. Mora, L. y Santandreu, M. (2008). Effect of cooking conditions on creatinine formation in cooked ham. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56 (23), ACS publications. pp 11279-11284

12. Mora, L. (2010). Determinación de compuestos Bioquímicos para el control de calidad en la elaboración de jamón cocido y jamón curado. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 282
13. Oficina Guatemalteca de Acreditación. (2004). POLÍTICA OGA-GEC-016 "Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo".
14. Potter, N. (1978). La ciencia de los Alimentos. Yates A. Trad. Edutex, S.A. México DF. Pp 431-449.
15. Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H. (1994). Tecnología e higiene de la Carne. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España. Pp 5-24.
16. Quattrocchi, O. (1992). Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. Editorial Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires, Argentina. Pp 301-327
17. Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (2001). Química Analítica. Editorial McGraw-Hill. Séptima Edición. México DF. Pp 107-183.
18. Toldrá, F. y Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(4), 331-352.
19. Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., Asensio, M. (1992). Hydrolysis and maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science* 57(4), 813-815.

13. ANEXOS

Anexo No. 1

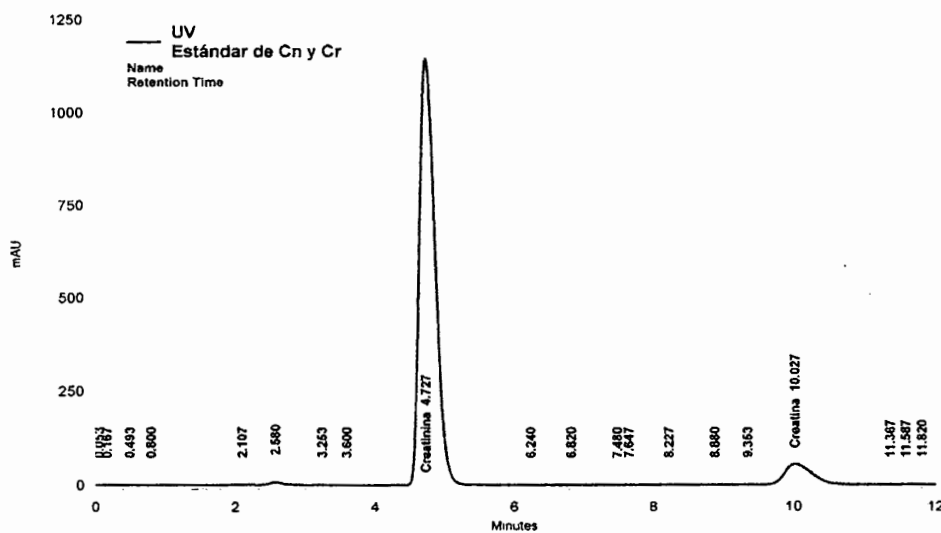
Cromatograma base de Creatinina y Creatina

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Estándar de Cn y Cr
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 07/03/2012 01:37:08 p.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Estándar de Creatinina y Creatina para determinar
 tiempos de retención. Solución preparada al 100% (150ppm de Cn y 55ppm de Cr)
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.727	70505726	4585178	150.000 CAL
Creatina	10.027	5792587	216512	55.000 CAL
Totals		76298313	4801690	205.000 CAL

Anexo No. 2

Reporte de secuencia para Exactitud

RGH, S.A.
EZChrom Elite
Sequence Summary Report

Sequence name:

Exactitud Creatinina y Creatina.seq

Analyst:

System

UV**Data Filename**

Exactitud001-Rep1.dat
 Exactitud001-Rep2.dat
 Exactitud001-Rep3.dat
 Exactitud002-Rep1.dat
 Exactitud002-Rep2.dat
 Exactitud002-Rep3.dat
 Exactitud003-Rep1.dat
 Exactitud003-Rep2.dat
 Exactitud003-Rep3.dat

Creatinina**ESTD****Creatina****ESTD**

	98.88	95.21
	98.97	95.09
	99.19	95.65
	97.08	93.82
	97.06	94.00
	97.40	94.46
	96.65	93.43
	96.52	93.41
	96.58	93.54
Min:	96.52	93.41
Max:	99.19	95.65
Mean:	97.59	94.29
Std Dev:	1.10	0.85
%RSD:	1.13	0.90

Cromatograma de Muestra al 80%

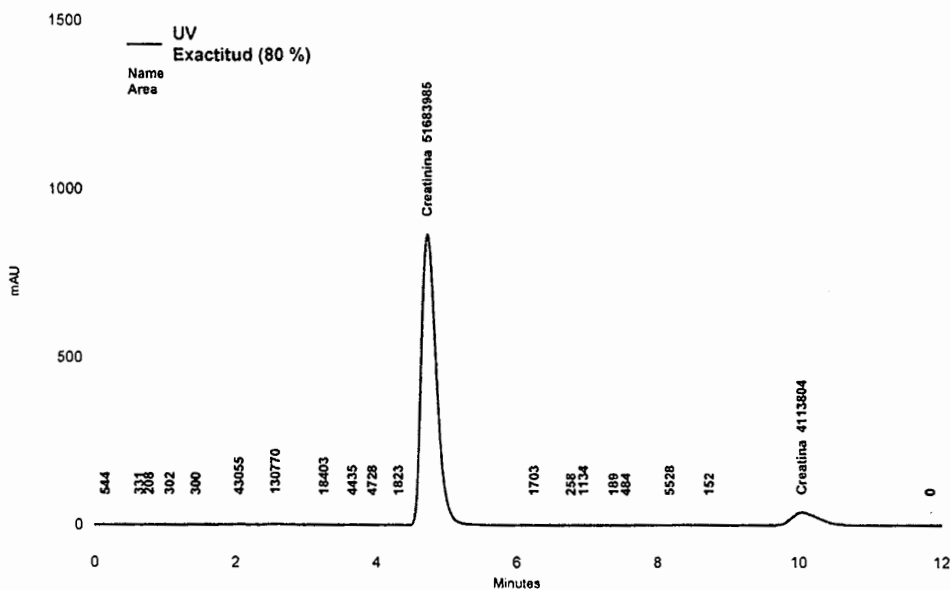
Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud (80 %)
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 26/03/2012 02:05:01 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Exactitud 80 %

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.727	51683985	3451851	98.879
Creatina	10.040	4113804	153247	95.213

Totals		55797789	3605098	194.093
--------	--	----------	---------	---------

Cromatograma de Muestra al 100%

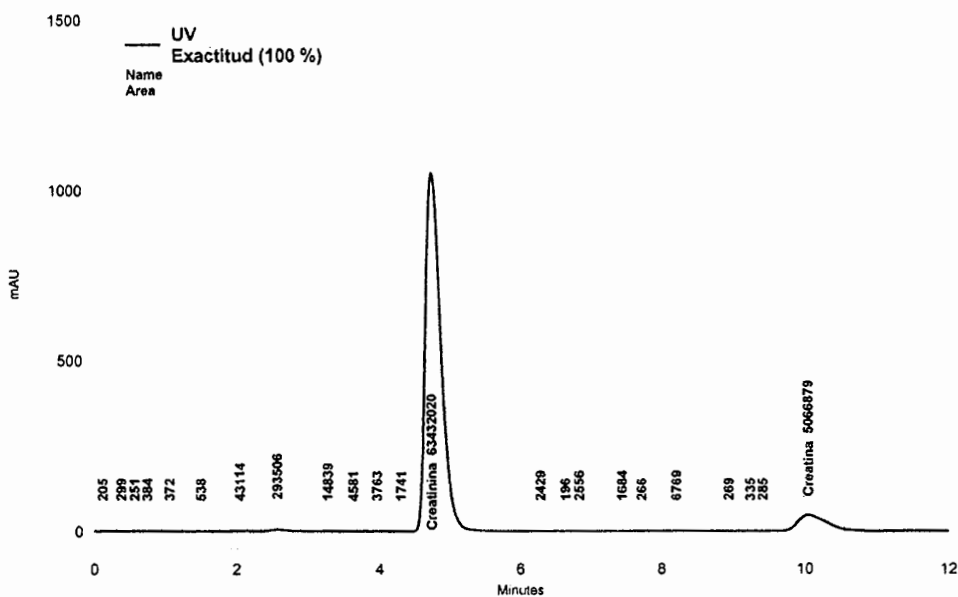
Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud (100 %)
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 26/03/2012 02:45:09 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 100 %

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results
Name

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.733	63432020	4195681	97.084
Creatina	10.047	5066879	187206	93.818

Totals		68498899	4382887	190.902
--------	--	----------	---------	---------

Cromatograma de Muestra al 120%

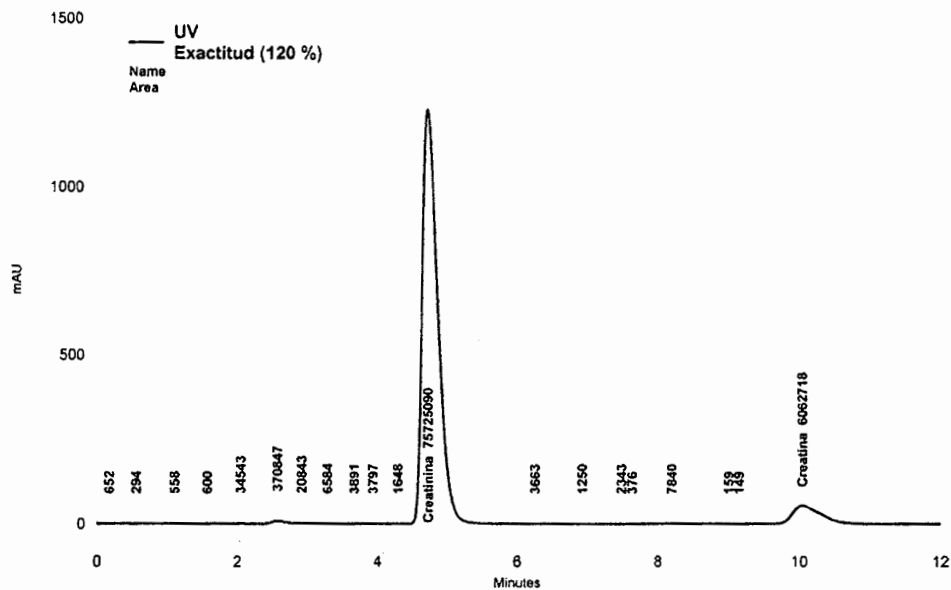
Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud (120 %)
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 26/03/2012 03:52:17 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Exactitud 120 %

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.733	75725090	4909667	96.579
Creatina	10.047	6062718	220121	93.543
Totals		81787808	5129788	190.122

Anexo No. 3

Reporte de secuencia para Repetibilidad (%)

RGH, S.A.
EZChrom Elite
Sequence Summary Report

Sequence name: Repetibilidad Creatinina y creatin...
Analyst: System

UV	Creatinina	Creatina
Data Filename	ESTD	ESTD
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep1.dat	100.11	100.68
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep2.dat	100.25	100.91
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep3.dat	100.19	100.99
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep4.dat	100.19	101.04
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep5.dat	100.12	101.12
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep6.dat	100.23	101.18
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep7.dat	100.16	101.12
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep8.dat	100.14	101.16
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep9.dat	100.04	101.27
Repetibilidad creatinina y creatina-Rep10.dat	100.14	101.13
Min:	100.04	100.68
Max:	100.25	101.27
Mean:	100.16	101.06
Std Dev:	0.06	0.17
%RSD:	0.06	0.17

Reporte de secuencia para Repetibilidad (mg/kg)

RGH, S.A. Reporte de secuencia

UV Sample ID	Creatinina ESTD Concentration	Creatina ESTD Concentration	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.02	55.37	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.04	55.50	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.03	55.54	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.03	55.57	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.02	55.62	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.04	55.65	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.02	55.61	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.02	55.64	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.01	55.70	
Repetibilidad creatinina y creatina	15.02	55.62	
	Min:	15.01	55.37
	Max:	15.04	55.70
	Mean:	15.02	55.58
	Std Dev:	0.01	0.09
	%RSD:	0.06	0.17

Cromatograma de estándar

Page 1 of 1



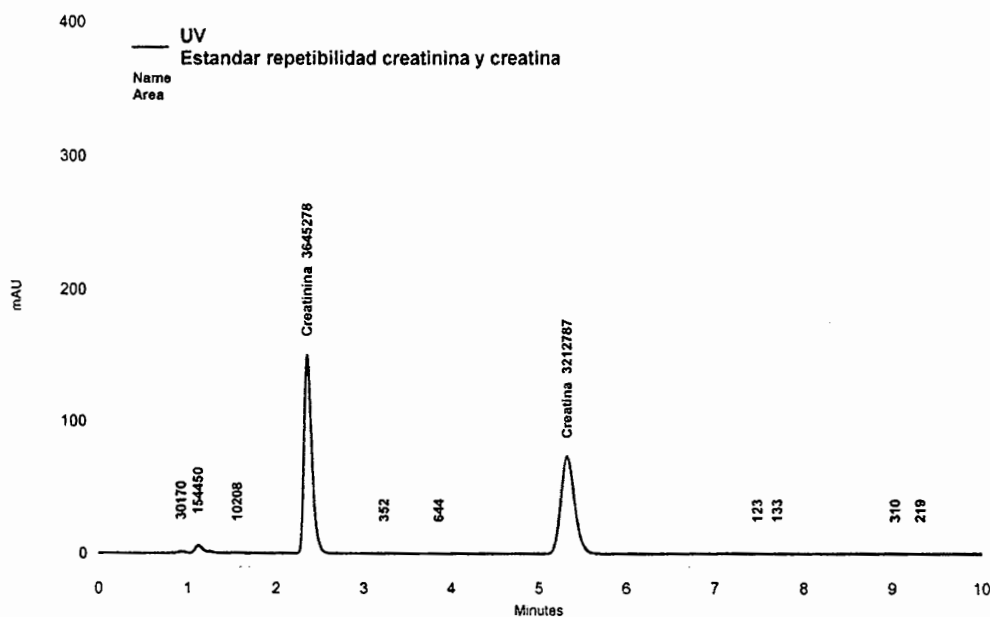
REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Estándar repetibilidad creatinina y creatina

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 29/09/2011 01:50:58 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Estándar al 100% para determinar repetibilidad.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	2.353	3645278	600094	100.000 CAL
Creatina	5.327	3212787	292023	100.000 CAL

Totals		6858065	892117	200.000 CAL
--------	--	---------	--------	-------------

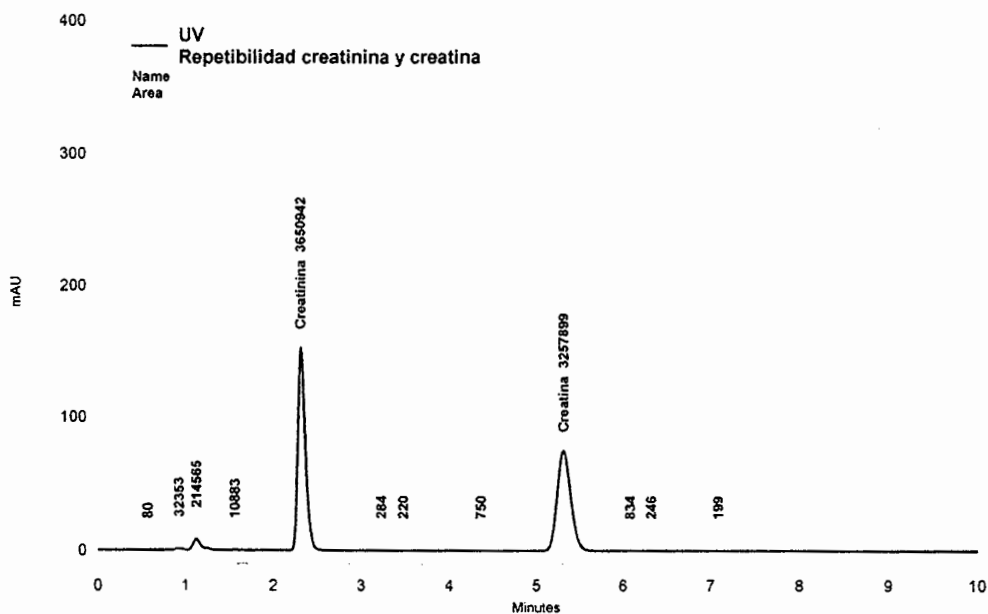
Cromatograma de muestra

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad creatinina y creatina
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 29/09/2011 03:55:30 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: {Data Description}
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	2.313	3650942	611033	100.144
Creatina	5.313	3257899	299018	101.132

Totals		6908841	910051	201.277
--------	--	---------	--------	---------

Anexo No. 4

Reporte de secuencia Precisión Intermedia (Día uno y dos)

RGH, S.A.
EZChrom Elite
Sequence Summary Report

Sequence name: Precisión Intermedia Día uno y do...
 Analyst: System

UV	Creatinina	Creatina
Data Filename	ESTD	ESTD
Precisión Intermedia Analista A Muestra 1001-Rep1.dat	10.24	38.53
Precisión Intermedia Analista A Muestra 1001-Rep2.dat	10.20	38.52
Precisión Intermedia Analista A Muestra 1001-Rep3.dat	10.21	38.50
Precisión Intermedia Analista A Muestra 1001-Rep4.dat	10.15	37.60
Precisión Intermedia Analista A Muestra 1001-Rep5.dat	10.25	37.98
Precisión Intermedia Analista A Muestra 2002-Rep1.dat	10.20	38.39
Precisión Intermedia Analista A Muestra 2002-Rep2.dat	10.19	38.47
Precisión Intermedia Analista A Muestra 2002-Rep3.dat	10.20	38.45
Precisión Intermedia Analista A Muestra 2002-Rep4.dat	10.03	37.76
Precisión Intermedia Analista A Muestra 2002-Rep5.dat	10.01	38.01
precisión intermedia muestra 001-rep1.dat	10.10	38.00
precisión intermedia muestra 001-rep2.dat	9.99	37.68
precisión intermedia muestra 001-rep3.dat	10.06	37.99
precisión intermedia muestra 001-rep4.dat	10.29	38.79
precisión intermedia muestra 001-rep5.dat	10.19	38.35
precisión intermedia muestra 002-rep1.dat	10.06	37.88
precisión intermedia muestra 002-rep2.dat	10.04	37.87
precisión intermedia muestra 002-rep3.dat	10.08	38.03
precisión intermedia muestra 002-rep4.dat	10.09	38.07
precisión intermedia muestra 002-rep5.dat	10.19	38.50
Min:	9.99	37.60
Max:	10.29	38.79
Mean:	10.14	38.17
Std Dev:	0.09	0.34
%RSD:	0.87	0.89

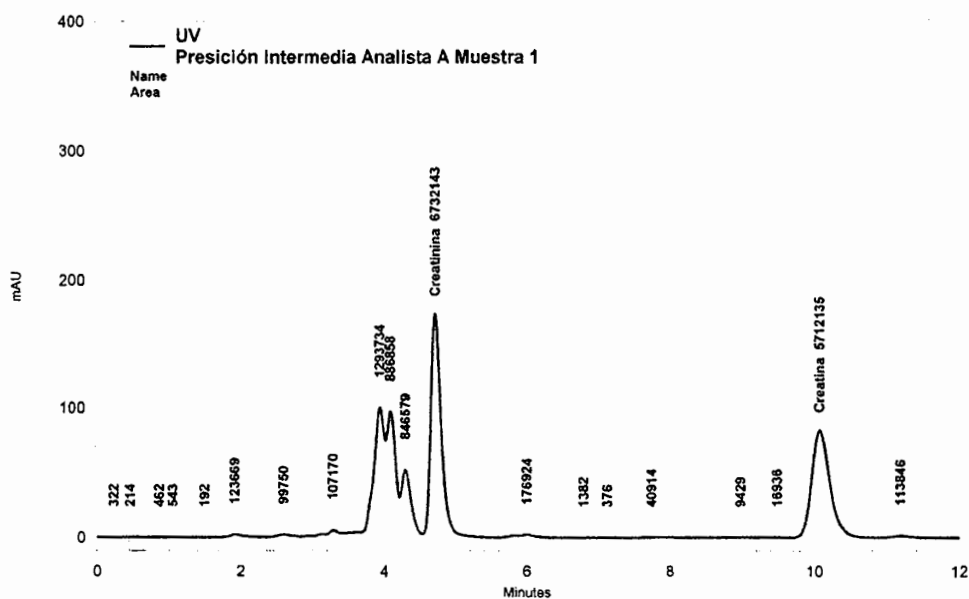
Cromatograma Muestra 1 Analista A

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Presición Intermedia Analista A Muestra 1
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 21/03/2012 11:58:41 a.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Presición Intermedia Analista A.
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results
Name

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.713	6732143	684166	10.238
Creatina	10.073	5712135	330252	38.533
Totals		12444278	1014418	48.770

Cromatograma Muestra 2 Analista A

Page 1 of 1



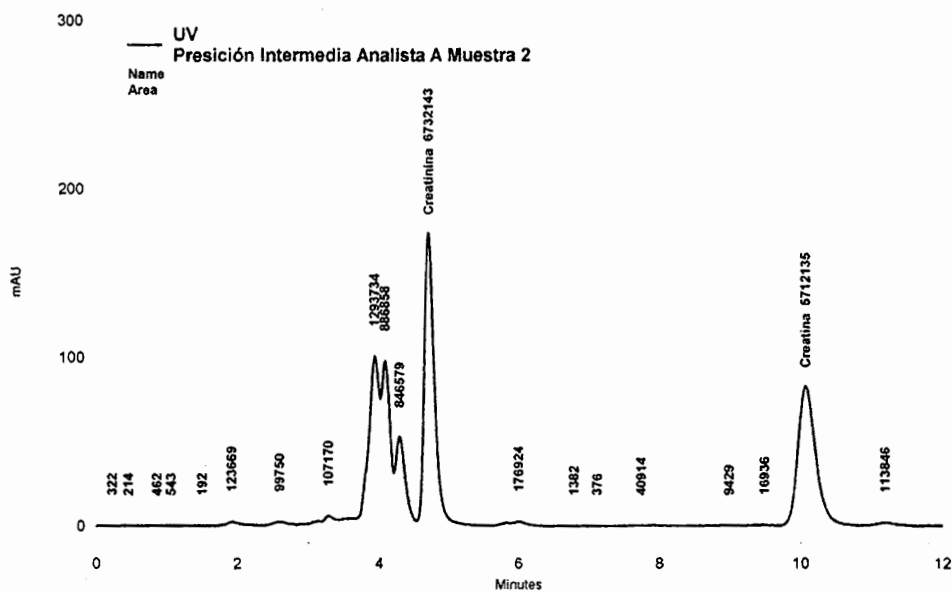
REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Presición Intermedia Analista A Muestra 2

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 21/03/2012 12:53:44 a.m.

DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Presición Intermedia Analista A.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.713	6732143	684166	10.199
Creatina	10.073	5712135	330252	38.386

Totals		12444278	1014418	48.585
--------	--	----------	---------	--------

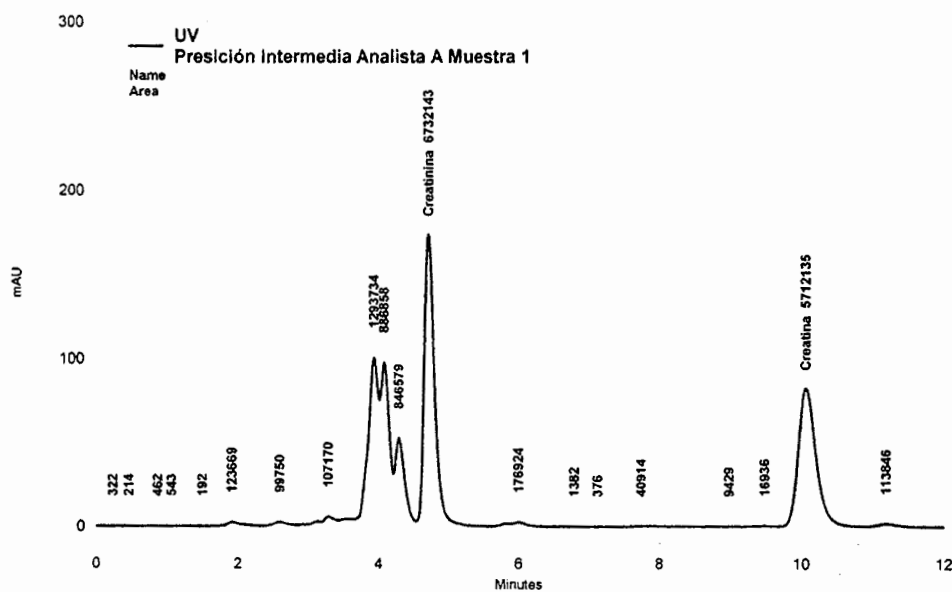
Cromatograma Muestra 1 Analista A (día dos)

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Presición Intermedia Analista A Muestra 1
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 23/03/2012 12:58:51 p.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Presición Intermedia Analista A, día dos.
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

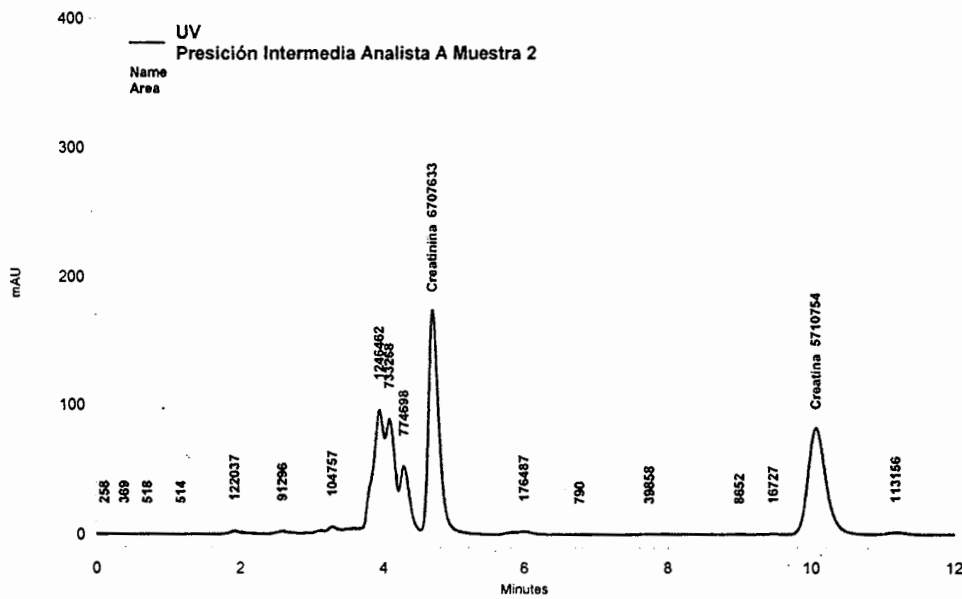
Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.713	6732143	684166	10.096
Creatina	10.073	5712135	330252	37.998
Totals		12444278	1014418	48.093

Cromatograma Muestra 2 Analista A (día dos)



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Presición Intermedia Analista A Muestra 2
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 23/03/2012 02:38:31 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Presición Intermedia Analista A, día dos.
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results
Name

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.700	6707633	683661	10.195
Creatina	10.067	5710754	329577	38.501

Totals		12418387	1013238	48.696
--------	--	----------	---------	--------

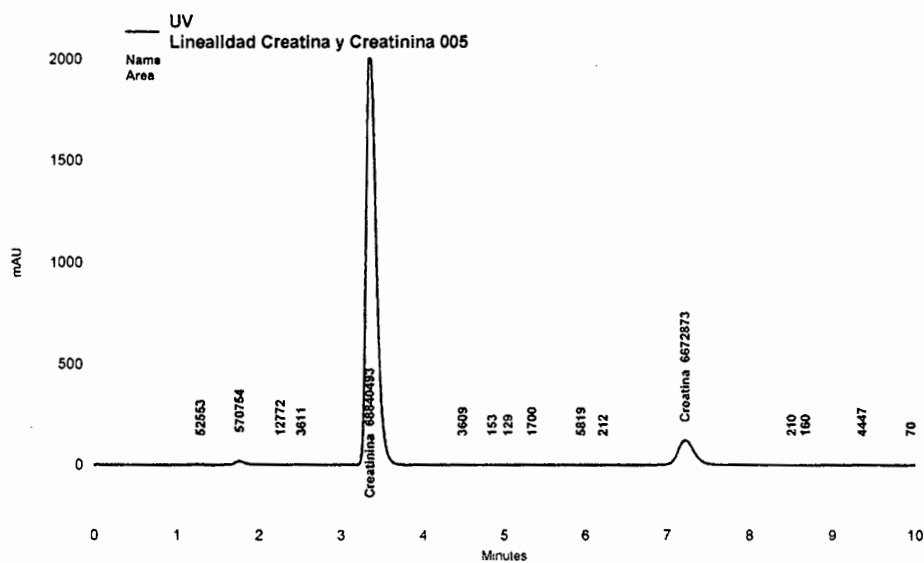
Anexo No. 5
Reporte de Linealidad

Page 1 of 4



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

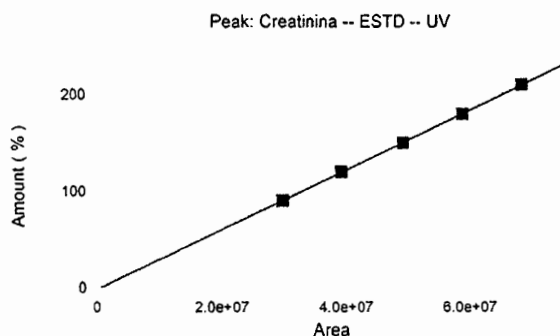
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Linealidad Creatina y Creatinina 005
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 15/02/2012 02:05:50 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Linealidad Creatina y Creatinina 140%
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	3.347	68840493	7999876	210.000 CAL
Creatina	7.220	6672873	493600	77.000 CAL

Totals		75513366	8493476	287.000 CAL
--------	--	----------	---------	-------------

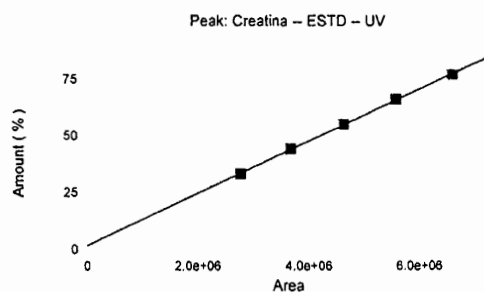


	Level 1	Level 2	Level 3
Amount	90	120	150
Area	29780579	39263698	49254713
RF	3.0221037676937e-006	3.05625825205646e-006	3.04539382829961e-006
Last Area			
Residual	-0.124024	0.522975	-0.402113
Rep StDev	59270.3	67584.5	66466.2
Rep %RSD	0.199023	0.17213	0.134944
Rep 1 Area	29727682	39294486	49187001
Rep 2 Area	29769419	39310406	49257280
Rep 3 Area	29844636	39186201	49319859

	Level 4	Level 5
Amount	180	210
Area	58910400	68414620
RF	3.05548767311877e-006	3.06951935127316e-006
Last Area		
Residual	-0.289261	0.292423
Rep StDev	214019	904747
Rep %RSD	0.363296	1.32245
Rep 1 Area	59072444	67375523
Rep 2 Area	58667790	69027844
Rep 3 Area	58990965	68840493

Creatinina (UV)
 Average RF: 3.04975e-006 RF StDev: 1.76734e-008 RF %RSD: 0.579503
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)

Fit Type: Linear
 $y = 3.09529e-006x - 2.05550$
 Goodness of fit (r^2): 0.999931



	Level 1	Level 2	Level 3
Amount	33	44	55
Area	2772302	3681622	4636068
RF	1.19034636313716e-005	1.19512540939836e-005	1.18635007177418e-005
Last Area			
Residual	-0.365367	0.191879	0.230885
Rep StDev	10914.5	8657.74	9097.19
Rep %RSD	0.393699	0.235161	0.196226
Rep 1 Area	2762098	3682542	4629907
Rep 2 Area	2770999	3689783	4631781
Rep 3 Area	2783810	3672541	4646517

	Level 4	Level 5
Amount	66	77
Area	5581442	6609431
RF	1.1824901869738e-005	1.16500200824156e-005
Last Area		
Residual	0.374086	-0.431483
Rep StDev	21343.2	116711
Rep %RSD	0.382396	1.76582
Rep 1 Area	5594407	6474740
Rep 2 Area	5556808	6680679
Rep 3 Area	5593110	6672873

Creatina (UV)
 Average RF: 1.18386e-005 RF StDev: 1.15400e-007 RF %RSD: 0.974772
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)

Fit Type: Linear
 $y = 1.14841e-005x + 1.52786$
 Goodness of fit (r^2): 0.999546

Anexo No. 6

Reporte de secuencia Robustez (Temperatura de 25 °C)

RGH, S.A.
EZChrom Elite
Sequence Summary Report

Sequence name:

Robustez (tempratura 25 C).seq

Analyst:

System

UV	Creatinina	Creatina
Data Filename	ESTD	ESTD
Muestra 1 (25 C)-rep1.dat	10.15	50.37
Muestra 1 (25 C)-rep2.dat	10.18	50.58
Muestra 1 (25 C)-rep3.dat	10.21	50.59
Min:	10.15	50.37
Max:	10.21	50.59
Mean:	10.18	50.52
Std Dev:	0.03	0.12
%RSD:	0.28	0.24

Reporte de secuencia Robustez (Temperatura de 35 °C)

RGH, S.A.
EZChrom Elite
Sequence Summary Report

Sequence name: Robustez (temperatua 35 C).seq
Analyst: System

UV	Creatinina	Creatina
Data Filename	ESTD	ESTD
muestra 1-rep1.dat	10.27	51.25
muestra 1-rep2.dat	10.25	51.32
muestra 1-rep3.dat	10.12	50.63
	Min:	50.63
	Max:	51.32
	Mean:	51.07
	Std Dev:	0.38
	%RSD:	0.74

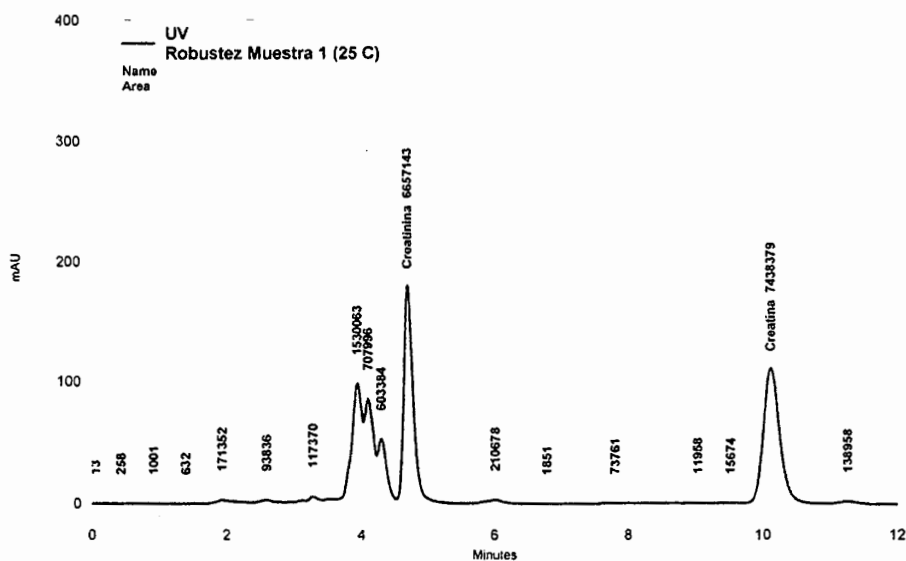
Cromatograma Muestra 1 a 25 °C

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Robustez Muestra 1 (25 C)
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 19/03/2012 12:29:39 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Muestra 1 a 25 C
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.693	6657143	706280	10.208
Creatina	10.120	7438379	440105	50.594

Totals		14095522	1146385	60.802
--------	--	----------	---------	--------

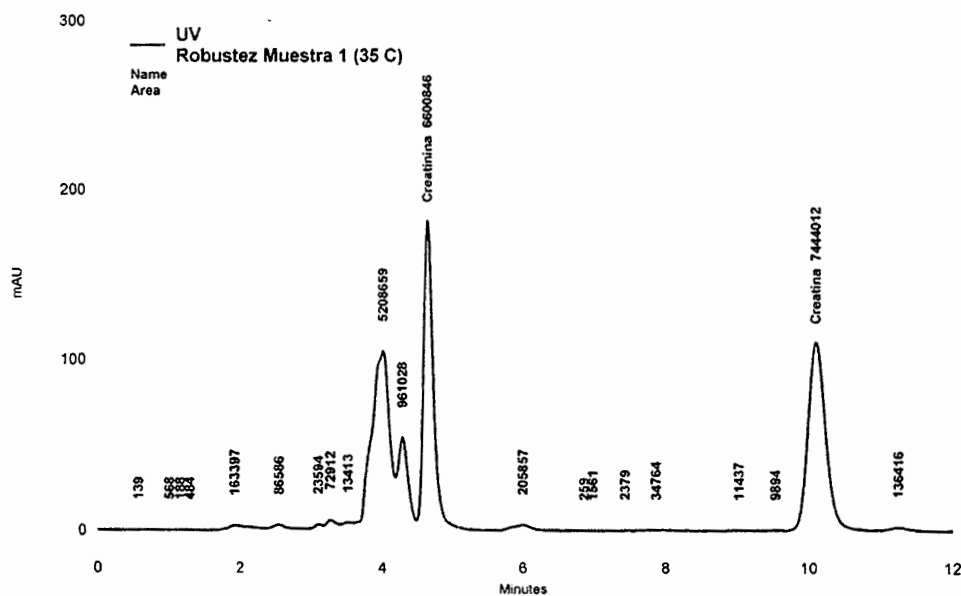
Cromatograma Muestra 1 a 35 °C

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Robustez Muestra 1 (35 C)
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 19/03/2012 10:48:05 a.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Muestra 1 a 35 C
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	4.647	6600846	708214	10.121
Creatina	10.100	7444012	442217	50.632
Totals		14044858	1150431	60.754

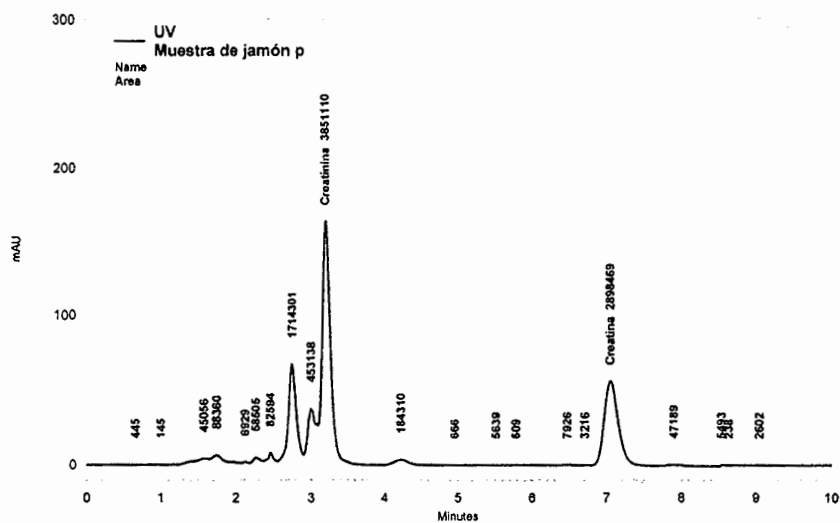
Anexo No. 7
Cromatograma Robustez (Flujo de 1 mL/min)

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Muestra a flujo 1.0 ml/min
FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 19/03/2012 15:30:28 p.m.
DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Inyección de muestra a flujo 1.0 ml/ min
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	3.193	3851110	576742	8.202
Creatina	7.047	2898469	224432	27.381
Totals		6749579	801174	35.583

Anexo No. 8

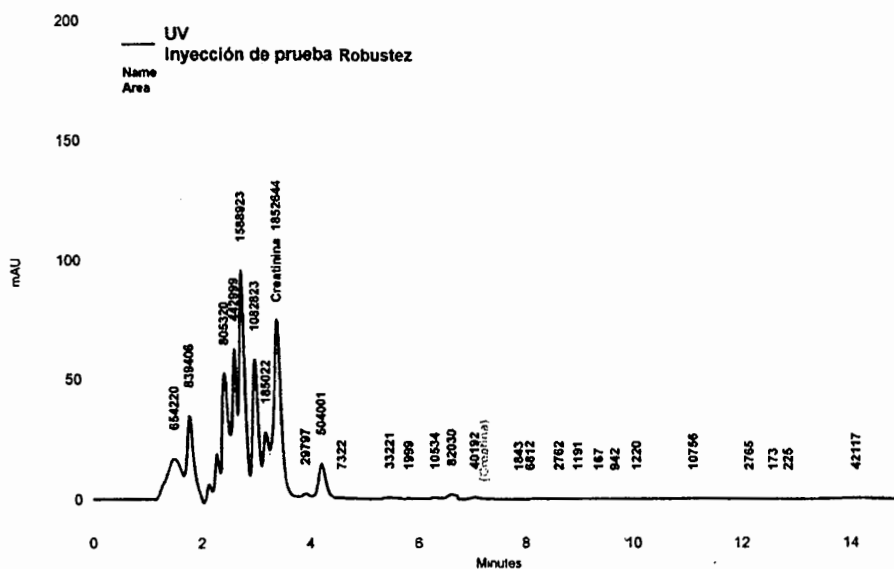
Cromatograma Robustez (Cambio en la extracción)

Page 1 of 1



REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC
Creatinina y Creatina

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Inyección de prueba muestra Robustez
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 17/03/2012 11:37:04 a.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA Muestra: Inyección de prueba Robustez (cambio en la extracción)
 VOLUMEN DE INYECCION: 20 µL



UV Results Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration
Creatinina	3.400	1852644	245565	50.812
Creatina				0.000 BDL
Totals		1852644	245565	50.812



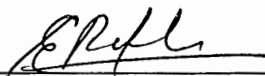
Belma Regina Hurtarte Marín

Autora



Licenciado Jorge Lionel García González

Asesor



Licenciado Eduardo Robles Aguirre

Co-asesor



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Director de Escuela



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

Decano