

DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Autor: Gabriel Oscar Villegas

Grado por el que se opta: LICENCIADO EN BROMATOLOGÍA

Laboratorio de salud pública. Laboratorio de bromatología. Talcahuano 2194, Godoy Cruz. bromendoza@live.com.ar

Mendoza, noviembre de 2019

DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Autor: Gabriel Oscar Villegas

Grado por el que se opta: LICENCIADO EN BROMATOLOGÍA

Almirante Brown 358. San Martín. Mendoza.
gabrieloscar76@yahoo.com.ar
(261) 5750684

Directora: Mgter. Ing. Laura CÁNOVAS

Comité evaluador:
Dra. Claudia AMADÍO
Mgter. Daniela CONSOLI
Dra. Vanesa BERETTA

RESUMEN

La presencia de aditivos se ha tornado algo común en la industrialización de alimentos. Resulta positivo entonces, que existan herramientas que permitan su cuantificación y de esa manera poder controlar, por comparación con la legislación vigente, si los elaboradores respetan los valores máximos establecidos.

En el caso particular de los nitratos, además de su control como algo legislado, importa desde el punto de vista de la salud de las personas, por cuanto este anión combinado con aminos forma compuestos de reconocida naturaleza cancerígena.

El presente trabajo tiene como finalidad poner a punto la técnica espectrofotométrica UV-Visible para determinar la concentración de nitratos en productos derivados de origen animal. Posteriormente se realizará la validación de la misma a fin de confirmar si el procedimiento descrito es útil y confiable para el objetivo propuesto.

Previo al tratamiento de la muestra se realizó la curva de calibrado partiendo de un patrón de concentración conocida (nitrato de sodio proanálisis), donde se relacionan diferentes valores de concentración con valores de absorbancia obtenidos en distintas lecturas brindadas por el equipo.

El ensayo consiste en la desproteización de la muestra, filtrado, agregado de salicilato de sodio y evaporación en baño María. La muestra desecada se acidifica, se agrega el reactivo revelador tomando coloración amarilla en función de la concentración del anión en estudio, para finalmente leer valores de absorción por espectrofotometría a 415 nm de longitud de onda.

Para la validación del método propuesto se realizaron las siguientes pruebas: linealidad, sensibilidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación.

En función del análisis estadístico pudo comprobarse que para el rango de concentraciones estudiado, la técnica es confiable para cuantificar este aditivo en productos cárnicos.

Palabras clave: Nitratos, Productos cárnicos, Espectrofotometría, p-nitrosalicilato de sodio, validación.

SUMMARY

The presence of additives has become common in the industrialization of food. It is positive then, that there are tools that allow quantification and thus be able to control, by comparison with current legislation, whether the processors respect the maximum established values.

In the particular case of nitrates, in addition to their control as something legislated, it matters from the point of view of people's health, because this anion combined with amines forms compounds of recognized carcinogenic nature.

The purpose of this work is to develop the UV-Visible spectrophotometric technique to determine the concentration of nitrates in derived products of animal origin. Subsequently, it will be validated in order to confirm whether the procedure described is useful and reliable for the proposed purpose.

Prior to the treatment of the sample, the calibration curve was carried out based on a pattern of known concentration (sodium nitrate proanalysis), where different concentration values are related to absorbance values obtained in different readings provided by the team.

The test consists in the deproteinization of the sample, filtering, sodium salicylate aggregate and evaporation in a water bath. The dried sample is acidified, the developer reagent is added taking yellow coloration depending on the concentration of the anion under study, to finally read absorption values by spectrophotometry at 415 nm wavelength.

For the validation of the proposed method, the following tests were performed: linearity, sensitivity, accuracy, precision, detection limits and quantification.

Based on the statistical analysis, it was found that for the range of concentrations studied, the technique is reliable to quantify this additive in meat products.

Key words: Nitrates, Meat products, Spectrophotometry, sodium p-nitrosalicylate, validation.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, sobre todas las cosas, por regalarme cada día de vida.

A mis colegas y compañeras de trabajo, Belén Martínez y Claudia Crupi, por su cariño y gran paciencia.

A mi esposa Luz y mi hija Luana, por su bella compañía.

A mis padres Mónica y Oscar, y mi hermana Andrea, que siempre me alentaron en mi progreso.

A la profesora Laura Cánovas, por ser mi guía en esta tarea de alumno terminal.

Y a todos los seres que han cruzado mi camino y con ello sus enseñanzas...

ÍNDICE

RESUMEN.....	III
AGRADECIMIENTOS	V
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Validación.....	8
1.2 Estado de conocimiento sobre el tema	8
1.3 Salud	9
1.3.1 Aumento de metahemoglobinemia en niños.....	10
1.3.2 Formación de nitrosaminas en adultos	11
1.4 Codex Alimentarius	12
1.4.1 Código alimentario argentino	12
1.5 Espectrofotometría	13
2. HIPÓTESIS	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos particulares	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Preparación de reactivos.....	16
3.2 Procedimiento REALIZADO	17
4. RESULTADOS	19
4.1 PREPARACIÓN CURVA PATRÓN	19
4.2 Parámetros de validación.....	20
4.2.1 Linealidad	20
4.2.2 Sensibilidad.....	21
Límite de detección	22
Límite de cuantificación	23
4.2.3 Exactitud	23
Veracidad.....	23
Sesgo	23
4.2.4 Recuperación.....	24
4.2.5 Precisión	25
4.2.5.1 Repetibilidad.....	26
4.2.6 Aplicabilidad	27
5. Discusión	28
6. CONCLUSIÓN	28
Bibliografía.....	29
Anexo	32

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de aditivos, se refiere a sustancias agregados intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales durante el proceso de elaboración y/o envasado y/o acondicionado, almacenado, transporte o manipulación de un alimento (ANMAT, Aditivos en los alimentos).

La cantidad de un aditivo autorizado agregado a un producto alimenticio será siempre la mínima necesaria para lograr el efecto lícito deseado (artículo 1394, CAA 1995). Los valores están estipulados con suficiente margen de garantía para reducir al mínimo todo peligro para la salud en todos los grupos de consumidores. Respetando dichos valores no habría riesgo de provocar reacciones adversas para la salud.

Dentro de éstos, los conservantes tienen un rol protagónico en la vida útil del producto alimenticio. Se los define como sustancias que impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas (CAA, 1995).

Los conservantes utilizados en productos de origen animal son principalmente nitrito de sodio y nitrato de potasio. Tienen por finalidad evitar el crecimiento de *Clostridium botulinum* (bacteria productora de toxina botulínica) y de esta manera cuidar la salud del consumidor. También son usados para favorecer las reacciones químicas que desarrollan los colores característicos en estos productos.

El botulismo es una enfermedad grave, que afecta el sistema nervioso y muscular, pudiendo producir la muerte del individuo afectado sino se toman las medidas paliativas de modo urgente. En Estados Unidos provoca anualmente el deceso de 110 personas (medlineplus, 2019)

Tanto nitrato como nitrito se usan indistintamente en la industria cárnica, si bien se trata de sales diferentes. Ambos actúan inhibiendo la esporulación de *Clostridium* y fijando el color de los productos de origen animal. Nitrito tiene una toxicidad mayor que nitrato, de ahí que su límite máximo permitido sea la mitad de su homólogo (CAA, 1995).

La mayoría de la gente no está expuesta a niveles de nitrato y/o nitrito que causen efectos adversos. Bebés menores de 6 meses resultaron ser especialmente sensibles a los efectos de nitrito sobre la hemoglobina luego de tomar fórmula preparada con agua potable que tenía niveles de nitrito más altos que el límite recomendado, algunos de estos bebés fallecieron (Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU., 2015).

Los bebés y niños de corta edad presentan inmadurez de los sistemas enzimáticos y del estómago (pH elevado) y mayor sensibilidad de la hemoglobina a la oxidación. En el organismo, los nitritos y nitratos estarían actuando como fuertes oxidantes (Pascale, A. et al., 2017).

En niños y adultos que han consumido alimentos (hortalizas de hoja, por ejemplo acelga) y líquidos que contenían niveles de nitrito inusualmente altos sufrieron caída de la presión sanguínea, aumento del pulso, reducción de la capacidad de la sangre para llevar oxígeno a los tejidos, dolor de cabeza, calambres abdominales, vómitos y aún la muerte (Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU., 2015).

De ahí la necesidad por parte de los laboratorios de control de alimentos de investigar la presencia de nitratos, especialmente en alimentos cárnicos industrializados.

Para la determinación de este agente químico, la norma ISO 3091 – 2005 recomienda la reducción de los nitratos presentes en la muestra de alimentos mediante el uso de una columna rellena con cadmio sólido y la posterior determinación de nitritos, es decir se trata de una técnica indirecta. El código alimentario argentino no recomienda ninguna técnica en particular.

La carencia de reactivos y material de vidrio específico para la cuantificación de anión nitrato llevó a estudiar y generar un método analítico confiable, combinando la técnica de determinación de nitratos empleada en productos cárnicos según la norma ISO 2918:2006 y la técnica empleada en aguas (Molina, 2001).

Por tratarse de una técnica de compleja realización y costosa (reducción de nitratos a nitritos usando una columna de cadmio), se propone la determinación de este anión por espectrofotometría UV-Visible, usando un equipo Spectrum SP 1102, a una longitud de onda de 415 nm.

1.1 VALIDACIÓN

Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (IRAM 32:1997). La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una validación prospectiva, generado a través de análisis de datos experimentales. Esta metodología se aplica cuando no se dispone de datos históricos y los mismos surgen a partir de los experimentos realizados en el laboratorio (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

El objetivo de la validación y la verificación es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado.

Las pruebas realizadas en el proceso de validación de este trabajo fueron: linealidad (obtención de curva de calibración, cálculo del coeficiente de correlación y determinación), sensibilidad (pendiente de la curva de calibración), límites de detección y cuantificación, exactitud (sesgo y porcentaje de recuperación) y precisión (repetibilidad).

1.2 ESTADO DE CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA

Los nitratos sirven como depósito para la generación de nitrito, especialmente en productos que requieren procesos largos de maduración, como los embutidos fermentados secos de larga maduración o el jamón seco curado (EFSA, 2003).

En Argentina el uso de nitratos está permitido en la elaboración de salazones y chacinados embutidos, dando un límite máximo de aplicación (ver numeral 1.5.1.).

Los nitratos son permitidos por algunos miembros del Codex en el queso madurado y productos cárnicos (por ejemplo, la Unión Europea, Australia y Nueva Zelandia, Canadá), productos de pescado en escabeche (por ejemplo, la Unión Europea), algunos ahumados, productos de pescado curados y huevas curadas de bacalao (por ejemplo, Estados Unidos) (European commission, 2008; FSANZ, 2011; Health Canada, 2012; CFR, 2015).

En la introducción se habla de la metahemoglobinemia como efecto provocado por una ingesta de alimentos con altas dosis de nitratos-nitritos.

Otro efecto importante en la salud de las personas es la aparición de cáncer a causa de la formación de nitrosaminas por reacciones químicas en las que intervienen los nitratos.

El Comité mixto de expertos en aditivos alimentarios (JECFA) evaluó los nitratos en 1995 en su 44ª reunión y llegó a la conclusión que el nitrato en sí tiene una toxicidad relativamente baja y no mostró actividad genotóxica, sino que la toxicidad debía considerarse a la luz del nitrito, que se puede formar en el cuerpo humano después de la reducción del nitrato.

El JECFA basó la evaluación de la seguridad del nitrato en sus efectos crónicos directos en el desarrollo y estableció una ingesta diaria admisible de 0-3,7 mg/kg de peso corporal, expresada como ion nitrato (JECFA, 1995).

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) concluyó en 2002 que hay suficiente evidencia en animales experimentales de la carcinogenia de los nitritos en combinación con aminos o amidas. Declaró que “la ingesta de nitrato o nitrito bajo condiciones que dan lugar a la nitrosación endógena es probablemente carcinógena para los seres humanos (grupo 2A: probablemente cancerígeno para el hombre, sin pruebas suficientes, pero sí en animales en experimentación).

El JECFA reconsideró los nitratos en 2002 en su 59ª reunión y llegó a la conclusión de que la IDA de 0-3,7 mg/kg de peso corporal, expresada como ion nitrato, podía mantenerse (JECFA, 2002).

El IARC, en el año 2010, llegó a la conclusión de que no hay pruebas adecuadas en los seres humanos de la carcinogenia de los nitratos en los alimentos y el agua potable. No hay evidencia adecuada en animales de experimentación de la carcinogenia del nitrato (IARC 2010).

1.3 SALUD

La principal preocupación derivada de la presencia de nitratos en alimentos o en agua potable tiene dos motivos: por un lado, los efectos tóxicos producidos por un exceso de nitratos en la dieta; por otra parte, pueden causar la formación endógena de N-nitrosocompuestos, de efectos cancerígenos (como las nitrosaminas).

Si la cantidad de nitratos presente en los alimentos o agua de bebida es elevada, parte podría convertirse en sus metabolitos perjudiciales para el ser humano (nitritos o nitrosaminas) por reducción bacteriana durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos. También en el propio organismo humano se puede dar esta reducción, por las bacterias presentes en la saliva y el tracto gastrointestinal.

Las N-nitrosaminas pueden surgir mediante formación exógena (en el producto, dependiendo de diversos factores que, en el caso de los alimentos, el más importante es el

tratamiento térmico aplicado: fritura, asado, cocción, etc.) y por síntesis endógena (en el organismo, fundamentalmente en la saliva y el estómago) (Huanca sucasaire et al., 2010).

En las personas existe un ciclo del nitrógeno endógeno activo que involucra a nitratos y nitritos que son intercambiables. Agentes nitrosantes que surgen del nitrito en condiciones gástricas ácidas reaccionan fácilmente con compuestos nitrosables, especialmente aminas y amidas secundarias, para generar compuestos N-nitrosos.

Estas condiciones nitrosantes son fomentadas tras la ingesta de nitrato, nitrito o compuestos nitrosables adicionales. Algunos de los compuestos N-nitrosos que podrían formarse en los seres humanos en estas condiciones son carcinógenos conocidos. Cabe señalar que el IARC llegó a una conclusión sobre los peligros de los nitratos y nitritos ingeridos y no sobre el riesgo, que combina el peligro y la exposición (IARC, 2002).

Se ha estimado que aproximadamente el 5-7% del nitrato ingerido se transforma en nitrito en el organismo humano y, en 24 horas, la mayoría del nitrato ingerido (65-70%) es excretado vía urinaria sin acumularse en los tejidos (Elika, 2014).

Por otro lado, los nitritos, al pasar a la sangre oxidan la hemoglobina impidiendo que transporte el oxígeno a los tejidos, y generando la enfermedad conocida como metahemoglobinemia, enfermedad grave sobre todo para los bebés.

Con respecto a los nitratos, resultan ser más riesgosos en los niños menores de 1 año, debido a que el estómago a esa edad no produce suficiente cantidad de ácido, lo que favorece el asentamiento de bacterias en el intestino. Estas bacterias pueden transformar los nitratos en nitritos, los cuales al absorberse toman contacto con la hemoglobina y la transforman a metahemoglobina (Ministerio de agroindustria, 2014).

La metahemoglobina impide la liberación de oxígeno presente en los glóbulos rojos, lo cual provoca síntomas de asfixia y coloración azul en los labios del bebé (también conocido como Síndrome del bebé azul) con graves consecuencias:

- Cianosis: color azulado característico de piel y mucosas.
- Hipoxia tisular: falta de oxígeno en los tejidos que provoca dificultad respiratoria, taquicardia, náuseas, vómitos y en casos graves convulsiones y coma.

Los grupos de población más vulnerables son los bebés entre 0 y 18 meses de edad, debido a su mayor consumo de verduras (papillas), susceptibles de estar contaminadas de nitratos y su bajo peso corporal. De hecho, la incidencia de metahemoglobinemia es superior en bebés (2-3%) que en adultos (1%) (Elika, 2014).

1.3.1 AUMENTO DE METAHEMOGLOBINEMIA EN NIÑOS

Existe una especial susceptibilidad a los nitratos/nitritos en la población infantil debida principalmente a cuatro razones:

- Acidez gástrica disminuida, lo que favorece la proliferación de microorganismos reductores de nitratos a nitritos antes de su total absorción.
- La ingesta de agua en niños, según su peso, es 10 veces superior a la de los adultos por unidad de peso corporal.
- Hemoglobina fetal (60-80% en recién nacidos), que se oxida más fácilmente a metahemoglobina.

- Desarrollo incompleto del sistema NADH-metahemoglobina reductasa en recién nacidos y pequeños, que salvo casos raros de deficiencia enzimática hereditaria, parece desaparecer al cabo de los 3-4 meses de vida (DE FERNÍCOLA, 1989).

1.3.2 FORMACIÓN DE NITROSAMINAS EN ADULTOS

La mayoría de los compuestos N-nitroso de interés en toxicología alimentaria son probables o posibles carcinógenos en humanos.

En animales de experimentación son potentes carcinógenos, en todas las especies ensayadas, y tiene amplia organotropía, según donde se biotransforma para dar radicales libres alquilantes (alquildiazonio y alquilcarbonio). En los estudios epidemiológicos (Almudena et al., 2001) se ha sugerido su intervención en el desarrollo del cáncer nasofaríngeo, esofágico y gástrico.

Las nitrosaminas generadas ejercen sus efectos carcinógenos mediante este poder alquilante: la unión de los grupos alquilo (incluso los metilo, de pequeño tamaño) es suficiente para interferir en el apareamiento de las bases en la doble hélice de ADN. Este daño conlleva mutaciones y, con éstas, una probabilidad mayor de carcinogénesis (Almudena et al., 2001).

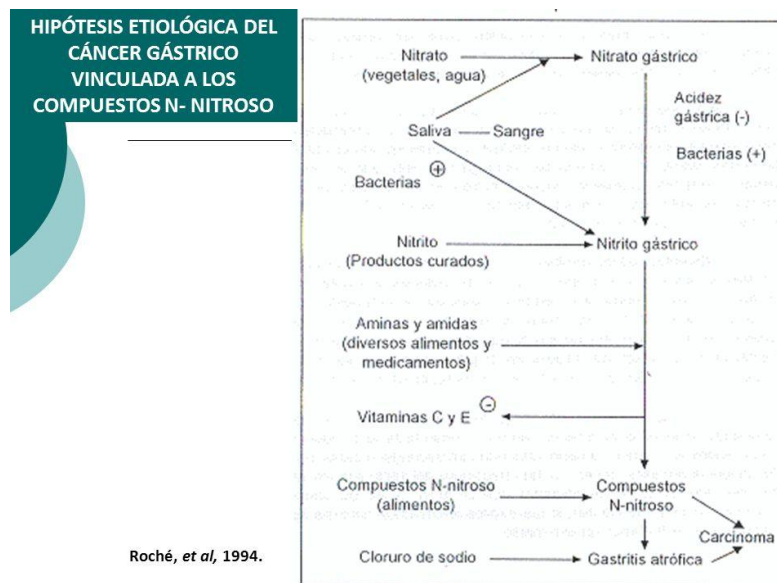


Figura 1: esquema de la hipótesis etiológica de generación de cáncer a partir de compuestos N-nitroso (tomado de Roche et al, 1994).

Existen evidencias de que la mayoría de las N-nitrosaminas analizadas (alrededor de 300) poseen actividad tóxica, mutagénica y cancerígena para un amplio número de especies animales, incluyendo primates. Entre las más potentes se encuentran las N-nitrosaminas volátiles dialquilo y heterocíclicas más simples. Por ello, y por ser las más frecuentes en los alimentos curados, son las que mayor atención han recibido (AMADO ,2007)

Las N-nitrosaminas volátiles se encuentran en los diversos productos cárnicos curados (adicionados de nitratos y nitritos) pero a valores muy bajos. En los productos que se consumen tras un tratamiento térmico (fritura, asado, horneado en microondas, etc.) las

cantidades son mayores porque este acelera los fenómenos implicados en la síntesis de estos compuestos (Ventanas, 2004).

En los productos cárnicos las nitrosaminas que adquieren más importancia son la N-nitrosopirrolidina (NPYR) que es la que surge en mayor cuantía al formarse por nitrosación de la prolina, seguida de la N-nitrosodimetilamina. La presencia de estas sustancias ha de considerarse, por una parte, en el contexto del efecto inhibidor de los nitritos sobre el crecimiento de *C. botulinum* y, por otra, atendiendo a las propiedades tecnológicas de los nitritos (fundamentalmente fijación del color y participación en el sabor de los productos curados), (Amado, 2007).

La adición de nitritos y nitratos a los alimentos puede traducirse en la formación de compuestos N-nitrosos durante la elaboración y el almacenamiento de los mismos (JECFA, 1995; SCF, 1995; FCEC, 2016).

1.4 CODEX ALIMENTARIUS

Disposiciones sobre los nitratos propuestas para su incorporación en la norma general del Codex para aditivos alimentarios junto con su aceptabilidad y la cantidad calculada de alimentos a consumir por un niño de 20 kg de peso y un adulto de 60 kg de peso para igualar o exceder la ingesta diaria aceptable (IDA) a la dosis máxima (DM) solicitada.

Se mencionan productos cárnicos, de aves de corral y caza elaborados, (fermentados y sin tratar térmicamente/ tratados térmicamente/ congelados) en piezas enteras o en cortes; para los cuales a una Dosis Máxima de 300 ppm, un niño de 20 kg tendría que consumir 250 g de alimento para exceder la IDA y para un adulto de 60 kg serían 750 g (FAO, 2017).

1.4.1 CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO

La legislación nacional vigente, Código Alimentario Argentino (CAA), en su artículo 323 bis, estipula un contenido máximo de nitratos en productos cárnicos de 300 ppm.

Artículo 323 bis - (Resolución Conjunta SPyRS N° 056/2000 y SAGPyA N° 250/2000)
"Se permitirá en chacinados: frescos; embutidos o no, secos; curados y/o madurados o no; cocidos; embutidos o no embutidos el uso de los siguientes aditivos alimentarios en las condiciones que se detallan a continuación:

Cuadro N° 1: cantidades permitidas de nitrato en productos cárnicos, según CAA.

INS	CONSERVADOR	g%
249	Potasio, nitrito de	0,015
250	Sodio, nitrito de	0,015
251	Sodio, nitrato de	0,03
252	Potasio, Nitrato de	0,03

El decreto 4238/68, en su capítulo XVIII, aditivos, define en el numeral 18.5 "conservantes" a los nitratos y da las mismas recomendaciones en cuanto a cantidad a usar en productos de origen animal (máximo 300 ppm) (Resolución ex - SENASA N° 231/95).

1.5 ESPECTROFOTOMETRÍA

Las técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. A través de esta interacción las moléculas pueden pasar de un estado energético, m , a otro estado energético distinto, l , absorbiendo una cantidad de energía radiante igual a la diferencia energética existente entre los dos niveles: $E_l - E_m$ (GONZALEZ et al., 2018).

Debido a la existencia de diferentes tipos de energía: de los electrones en sí, de los movimientos vibracionales de las moléculas, de la rotación de las mismas, etc., las moléculas pueden interactuar con radiaciones electromagnéticas de un rango muy amplio de longitudes de onda, dando lugar a distintos tipos de espectroscopías según las diferentes regiones.

La espectroscopía UV-Visible (espectros electrónicos) se debe a la transición de los electrones más externos de los átomos de las moléculas, desde niveles fundamentales a niveles más altos de energía.

La medida de la absorbancia se lleva a cabo con la ayuda de un espectrofotómetro, que en esencia consta de un monocromador (prisma o red de difracción) que controla la longitud de onda de la radiación que se hace incidir sobre la muestra (figura N° 2). La radiación no absorbida se detecta y mide convenientemente. La absorbancia de la muestra se compara con la de una “referencia” que consta estrictamente de disolvente.

Las cubetas empleadas en el espectrofotómetro (1.00 cm de espesor) deben estar bien limpias y deben tomarse siempre por sus caras esmeriladas u opacas.

No es conveniente secarlas o limpiarlas con papel ordinario por el carácter abrasivo de éste sino con un papel suave.

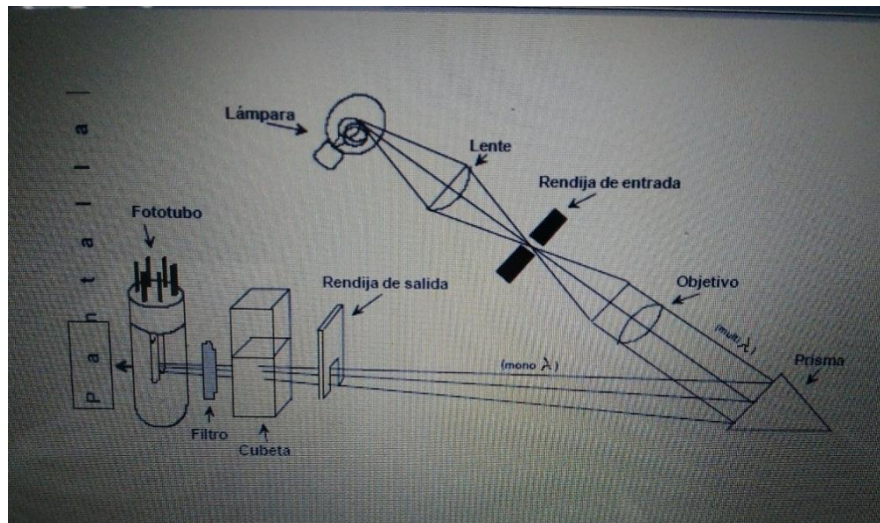


Figura N° 2: esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro (Spectrometric Analysis, 2000).

2. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar una técnica de determinación de Nitratos por espectrofotometría de absorción molecular usando salicilato de sodio como desarrollador de color que cumpla los parámetros mínimos requeridos para validar una técnica de laboratorio.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica analítica nueva, que sirva para determinar la concentración de nitratos en productos alimenticios de origen animal.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Realizar la curva de calibración para nitratos, usando concentraciones conocidas de la droga proanálisis.

Validar la técnica de análisis propuesta (método del salicilato de sodio).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Uno de los métodos más utilizados para la cuantificación de nitratos es el método de reducción cadmio-cobre, que utiliza una columna de vidrio donde se filtra la muestra a analizar a través de gránulos de cadmio tratados con sulfato de cobre.

En presencia de cadmio, el nitrato se reduce a nitrito y este se determina por diazotación con sulfanilamida y diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, que es fácilmente cuantificable en un espectrofotómetro UV-Visible.

El método de reducción cadmio-cobre presenta algunas desventajas como:

- i) los riesgos asociados al uso de cadmio, por ser una sustancia altamente tóxica por inhalación aún en pequeñas concentraciones y que además puede causar cáncer y afectar la fertilidad,
- ii) requiere un relativo alto consumo de reactivos,
- iii) presenta un limitado rango de calibración lineal y,
- iv) demanda largo tiempo para su aplicación ya que cada análisis requiere preparar la columna, realizar curvas de calibración, preparar estándares y tratar o procesar las muestras antes y después de su filtración a través de la columna (Londoño May at al., 2016).

Ante las desventajas citadas anteriormente, es que se decidió combinar las técnicas mencionadas en la introducción y lograr un método más ágil y directo (se lee directamente la concentración de anión nitrato).

Las técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Las distintas longitudes de onda en que se divide el espectro de luz, pueden ser detectadas y traducidas por los equipos llamados espectrofotómetros.

Las instrucciones generales de manejo de un espectrofotómetro son:

1.- Encendido de lámparas

1.1. Lámpara de tungsteno (zona del Visible, 900 a 340 nm), encendido instantáneo.

1.2. Lámpara de Deuterio (zona del UV, 340 a 200 nm aproximadamente), necesita un calentamiento previo.

2.- Adaptación del espejo a la lámpara adecuada, atendiendo al rango de longitud de onda de trabajo (sólo en los espectrofotómetros no automáticos).

3.- Selección del valor de longitud de onda con el mando correspondiente.

4.- Ajuste del cero de transmitancias (tapa levantada) con ayuda del mando "Ajuste del cero", hasta que aparezca CERO en la pantalla.

5.- Ajuste del 100% de transmitancia (0 de absorbancia) con la referencia, que normalmente es el disolvente de la muestra, utilizando para ello el mando "**A-T**".

6.- Lectura del valor de Absorbancia/Transmitancia de la muestra.

Se trabajó con una longitud de onda próxima a los 415 nm, que es en donde tiene mayor absorción el color amarillo desarrollado por esta técnica.

Las concentraciones de nitrato a utilizadas corresponden al rango de 2,5 a 10 ppm (partes por millón), valores que pueden esperarse encontrar en los productos a analizar, considerando las diluciones a realizar en la muestra.

Las muestras usadas para la experiencia serán salchichas envasadas por 6 unidades, de una marca comercial. Se usará a razón de un paquete por cada parámetro de validación realizado.

Las pruebas que se realizarán en el proceso de validación serán: linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, exactitud y precisión.

Para ello se calcularán coeficientes de correlación, regresión y variación, desviaciones estándares, pruebas t de Student y coeficiente de variación de Horwitz.

3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todos los reactivos a utilizar deben ser de calidad analítica. Agua destilada exenta de materiales en suspensión y materia orgánica.

Soluciones para precipitación de proteínas

Estas soluciones tienen por finalidad desdoblar las proteínas de la matriz del producto, cambiar su configuración y lograr la coagulación de las mismas, dejando de esta manera libre los nitritos y nitratos que pudieran estar presentes en la muestra.

Solución de Bórax: disolver 50 g de tetraborato disódico decahidratado en 1000 mL de agua tibia y enfriar a temperatura ambiente.

Solución de Ferrocianuro de potasio: disolver 106 g de ferrocianuro de potasio trihidratado en agua y diluir a 1000 mL.

Solución de Acetato de zinc: disolver 220 g de acetato de zinc dihidratado en agua, agregar 30 mL de ácido acético glacial y diluir a 1000 mL.

Solución estándar de nitrato de sodio

Esta solución se utilizará para fabricar las diluciones que formarán parte de la curva de calibración. Por medio de ésta se podrá conocer la concentración de este aditivo en las muestras a analizar posteriormente.

Se disuelven 1,000 g de nitrato de sodio (NaNO_3) en agua y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico. Pipetear 5 mL de esta solución en un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen.

Se preparan una serie de soluciones estándares a partir de esta solución (figura N° 3), pipeteando 5 mL, 10 mL, 20 mL y 25 mL a matraces volumétricos de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. Estas soluciones estándares contienen respectivamente 2.5 ppm; 5.0 ppm; 10.0 ppm y 12.5 ppm de nitrato de sodio.



Figura N° 3: patrones de nitrato de sodio para curva de calibración.

Las soluciones estándares y la solución patrón de nitrato de sodio deben ser recientemente preparadas, de preferencia en el día de uso.

La curva de calibración debe realizarse cada año nuevamente, a fin de mantener los datos actualizados y confiables.

Soluciones para desarrollo de color

Estos reactivos son los que se usarán para llevar adelante la reacción generadora de color (figura N° 4). El fundamento de la reacción colorimétrica se explica en el siguiente apartado (3.2).

Salicilato de sodio (5%): pesar 5 g, disolver y diluir a 100 mL (mantener refrigerado a 4°C aproximadamente para una mejor conservación).

Ácido sulfúrico puro (densidad 1.84)

Hidróxido de Sodio (25%): pesar 25 g, disolver y diluir a 100 mL (dejar enfriar antes de usar).

Tartrato doble de Sodio y Potasio (4.5%): pesar 4,5 g y disolver en 100 mL de la solución anterior.



Figura N° 4: reactivos para desarrollo de color, salicilato de sodio (izquierda), tartrato de sodio y potasio (derecha).

3.2 PROCEDIMIENTO REALIZADO

En la preparación de la muestra para el ensayo se homogeneizó un paquete de salchichas pasándola por procesadora y mezclando bien la masa obtenida. De no usar en el momento, guardar en un envase cerrado herméticamente y bajo refrigeración. Analizar la muestra de ensayo tan pronto como sea posible, siempre dentro de las 24 horas.

Porción de trabajo

Se pesaron 10 g de la muestra de ensayo con una aproximación de 0,001 g.

Desproteínización

Transferir la porción de ensayo cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer ó vaso de precipitados de 500 mL y adicionar sucesivamente 5 mL de solución saturada de bórax y 100 mL de agua a una temperatura no menor a 70 °C.

Calentar el contenedor por 15 minutos en baño de agua hirviente o a la llama del mechero (con doble tela de amianto) y agitar repetidamente. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Adicionar sucesivamente 2 mL de Ferrocianuro de potasio y 2 mL de Acetato de zinc. Mezclar completamente después de cada adición. Transferir el contenido a un matraz volumétrico de 200 mL, llevar a volumen y homogeneizar. Dejar en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente.

Decantar cuidadosamente el líquido sobrenadante y filtrar a través de papel de filtro a fin de obtener una solución límpida.

El método espectrofotométrico del salicilato de sodio está basado en la formación de iones nitronio (NO_2^+), a partir de la nitración del salicilato bajo condiciones de acidez (sulfúrico), figura N° 5.

Estos iones sufren reacciones de diazotación con hidróxido de sodio y tartrato doble de sodio y potasio, dando lugar a la formación de paranitrosalicilato de sodio que puede leerse por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm (Molina, 2010)

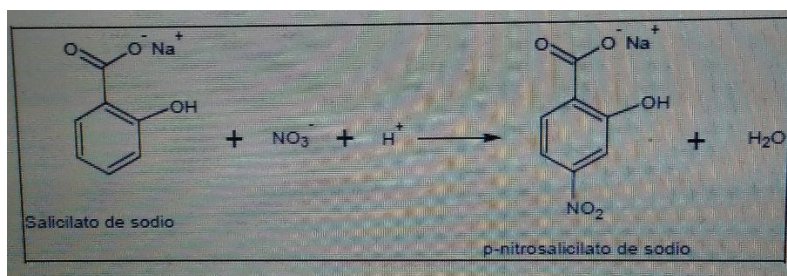


Figura N° 5: reacción entre una molécula de salicilato de sodio y un grupo nitrato en medio ácido, con formación de paranitrosalicilato de sodio (Molina, S. 2010).

Dado que el método involucra el calentamiento de la muestra hasta sequedad total, debe tenerse un control apropiado de la temperatura (uso de baño termostatzado) y evitar proyecciones y salpicaduras en las paredes de los vasos contenedores (uso de un volumen reducido de agua destilada en el equipo).

Lectura y acondicionamiento

Tomar 10 mL de la muestra tratada con pipeta doble aforo y colocar en un vaso de precipitado pequeño (capacidad 100 mL). Agregar 1 mL de solución de Salicilato de Sodio al 5%.

Evaporar en baño María a sequedad (temperatura del agua, 95 °C). Enfriar a temperatura ambiente. Agregar 2 mL de Ácido Sulfúrico concentrado. Esperar 10 minutos.

Agregar 15 mL de agua destilada lentamente (con mucho cuidado). Agregar 15 mL de solución de Hidróxido de Sodio - Tartrato de Sodio y Potasio (con mucho cuidado).

Trasvasar cuantitativamente a matraz de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. Leer absorbancia en espectrofotómetro a 415 nm de longitud de onda, usar como blanco una mezcla de los reactivos y agua destilada. Color desarrollado: Amarillo. Se utilizó un espectrofotómetro marca Spectrum modelo 1102 (figura N°6).

Previo a la lectura de los patrones y de la muestra se coloca el equipo a cero absorbancia. Esto puede lograrse colocando en la cubeta agua destilada, leyendo al aire (sin la cubeta) o colocando los productos de reacción menos el nitrato de sodio.

Es importante que entre cada lectura se efectúe un enjuague de la cubeta con agua destilada a fin de sacar los restos de reactivo de la lectura anterior.



Figura N° 6: espectrofotómetro marca “Spectrum”.

4. RESULTADOS

4.1 PREPARACIÓN CURVA PATRÓN

Una vez cumplido el procedimiento, se leyeron las absorbancias de los patrones ya coloreados. Los resultados arrojados por el mismo se muestran a continuación.

Los valores mostrados en la tabla N° 1 corresponden al promedio de tres mediciones realizadas.

Tabla N° 1: lectura de absorbancias de los patrones en función de la concentración de nitratos.

Concentración (ppm)	Absorbancia	Concentración/Absorbancia
2,5	0,34	7,35
5	0,68	7,35
7,5	1,03	7,28
10	1,37	7,3
		Promedio 7,32

A partir de las lecturas de absorbancia-concentración de patrones (tabla N°1), pudo construirse la recta de regresión (curva de calibración), que muestra la relación que existe entre las concentraciones conocidas de nitratos y las lecturas de absorbancias dadas por el espectrofotómetro.

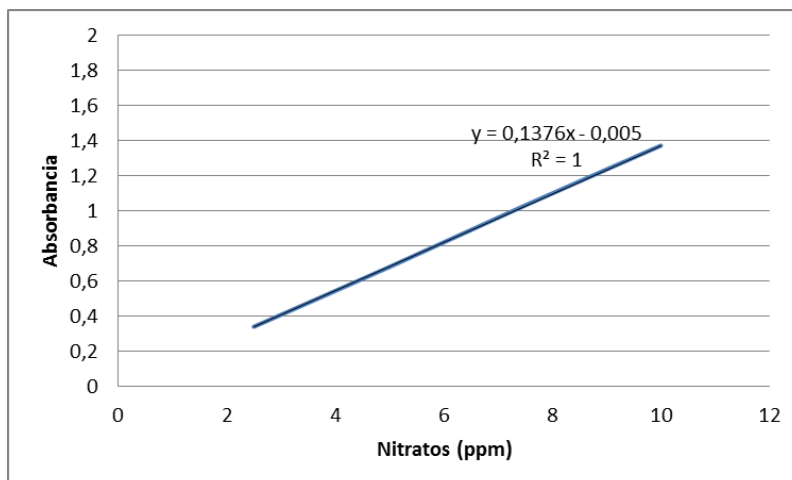


Figura N°8: absorción vs concentración de nitratos en ppm

La figura N°8, con la recta de regresión, muestra que por cada ppm de anión nitrato presente en la muestra, la lectura de absorción se incrementará en 0,1376 unidades.

El valor de R^2 (0,999) indica que existe una alta relación entre las variables consideradas, casi el total de la variación queda explicado por este modelo y que la recta se ajusta al comportamiento de los puntos en el segmento considerado (2,5 a 10 ppm).

Para obtener la concentración de nitratos se multiplica la lectura de absorción por la dilución realizada y el promedio resultante de la relación concentración/absorbancia ó despejando "x" a partir de la recta de calibración y multiplicando por la dilución correspondiente.

Concentración de NO_3^- (ppm) = Absorbancia * 200 * 7,32

Concentración de NO_3^- (ppm) = valor de x * dilución

4.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

4.2.1 LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Se realizaron tres curvas de calibración, obteniendo para este trabajo los valores correspondientes a la curva media. Se trabajó con una solución patrón de nitrato de sodio de concentración conocida, que fue diluida para obtener las diferentes concentraciones (2,5; 5; 7,5 y 10 ppm)

Los valores de las columnas A, B y C de la tabla N° 2, corresponden al promedio de tres mediciones realizadas de cada concentración.

Tabla N° 2: valores de absorbancia en función de las concentraciones de nitrato preparadas.

Concentración (ppm)	Absorbancias (A)	Absorbancias (B)	Absorbancias (C)	Promedio
2,5	0,34	0,34	0,32	0,33
5	0,69	0,68	0,66	0,68
7,5	1,03	1,03	1,04	1,03
10	1,38	1,37	1,33	1,36

Tabla N° 3: valores usados para la construcción de la recta de calibrado.

Concentración (ppm)	Absorbancia	Concentración/Absorbancia
2,5	0,34	7,35
5	0,68	7,35
7,5	1,03	7,28
10	1,37	7,30
		Promedio 7,32

La tabla N° 2 muestra los valores de absorbancia leídos en distintas pruebas realizadas, en tanto que la tabla N° 3 resume el promedio de estas curvas de calibración.

Los valores obtenidos para los coeficientes de correlación y determinación (cálculos en anexo), son 0,999 y 1 respectivamente.

Esto implica que, para el intervalo de concentraciones considerado (2,5 a 10 ppm), existe una alta asociación lineal entre las concentraciones de nitrato preparadas y las lecturas de absorbancia dadas por el equipo.

Este modelo lineal explicaría el 99% de la variación de las lecturas producidas en esta prueba.

4.2.2 SENSIBILIDAD

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición.

En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.

Para el caso considerado, el valor numérico de esta prueba es 0,137. Por tratarse de un valor bajo, cada pequeño cambio que se produzca en la concentración del analito en estudio cambiará significativamente el valor correspondiente a la lectura del equipo.

Por lo tanto puede considerarse a esta técnica como sensible para el rango de estudio aplicado.

Límite de detección

El límite de detección es la concentración o cantidad más pequeña de analito que puede detectarse (distinguirse del blanco o del ruido de fondo) con una certeza estadística razonable.

Para un resultado analítico que es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito.

Para propósitos de validación es suficiente proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática. Para este propósito la aproximación “blanco + 3s” usualmente será suficiente.

Para esta prueba se prepararon 9 blancos de reactivo (tabla N°4) con la menor concentración trabajada (2,5 ppm), se leyeron las absorbancias respectivas y se calculó el límite de detección basándose en la fórmula siguiente:

$$LD = 3,29.s$$

s: desviación estándar

Tabla N° 4: valores leídos a partir de una concentración de 2,5 ppm de NO₃.

Lectura	Valor leído	Concentración
1	0,35	2,59
2	0,34	2,52
3	0,33	2,45
4	0,33	2,45
5	0,34	2,52
6	0,34	2,52
7	0,32	2,37
8	0,31	2,30
9	0,32	2,37
Media		2,45
Desvío		0,088

Para la situación en estudio el límite de detección fue 0,29.

Un criterio de aceptación adecuado es $LD < LMP$. En general también se sugiere, para un $LMP > 0,1$ ppm un $LD < 1/10 LMP$.
LMP: límite máximo permitido.

Considerando que el CAA permite un máximo de 300 ppm de nitratos en productos cárnicos, se cumple el criterio de aceptación recomendado ($0,29 < 30$).

La prueba indica que este método permitiría detectar hasta 0,29 ppm de anión nitrato (concentraciones por debajo de este valor corresponderían al blanco).

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza.

Para esta prueba se prepararon 9 blancos de reactivo, se leyeron las absorbancias respectivas y se calculó el límite de cuantificación basándose en la fórmula siguiente:

$$LC = 10 \cdot s$$

s: desviación estándar

Para la situación en estudio el límite de cuantificación fue 0,88.

Un criterio de aceptación adecuado es $LD \ll LC < LMP$. En general también se sugiere, para un $LMP > 0,1$ ppm un $LC < 1/5 LMP$.

Considerando que el CAA permite un máximo de 300 ppm de nitratos en productos cárnicos, se cumple el criterio de aceptación recomendado ($0,88 < 60$).

La prueba indica que este método permitiría cuantificar hasta 0,88 ppm de anión nitrato.

4.2.3 EXACTITUD

El manual del Codex Alimentarius define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia.

Veracidad

La veracidad determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. Esta cualidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

Sesgo

El sesgo corresponde a la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido.

$$S = X - X_a$$

S = sesgo

X = lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a = valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

Se preparó un patrón con 5 ppm de nitrato de sodio y se realizaron cinco lecturas consecutivas de la misma, obteniendo los valores que se presentan en la tabla N° 5.

Tabla N° 5: valores de sesgo para lecturas de 5 ppm.

Lectura	Resultado (ppm)	X-X _a	Sesgo
1	5,07	5,07-5	0,07
2	4,93	4,93-5	-0,07
3	5,07	5,07-5	0,07
4	5,07	5,07-5	0,07
5	5,07	5,07-5	0,07
Promedio	5,04		
Desviación estándar	0,056		

Prueba t de Student para el sesgo

$$t_{\text{calculado}} = [X_a - X] / (s \times \sqrt{n})$$

X_a = Valor esperado

X = Promedio de valores leídos

s = Desviación estándar

n = Número de lecturas o valores observados

$$t_c = (5,04 - 5) / (0,056 / \sqrt{5}) = 0,32$$

t_{crítico} = 2,7765 (para α = 0,05 y 4 grados de libertad)

El valor del t calculado es menor que el valor de t obtenido de tablas.

Se puede observar que para la medición de Nitratos en productos cárnicos el sesgo obtenido para el método utilizado es confiable y por lo tanto su veracidad es aceptable.

4.2.4 RECUPERACIÓN

La recuperación es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación está intrínsecamente relacionada con las características de la matriz de la muestra.

Se usó como matriz para la adición de este conservante un embutido cocido (salchicha). El agregado se hizo durante la primera parte de la técnica de análisis (al momento de calentar la muestra en agua con el tetraborato de sodio).

Se realizaron seis (6) lecturas de la adición trabajada (100,14 ppm), obteniendo los porcentajes de recuperación mostrados en la tabla N° 6 (la concentración referida corresponde a la masa pesada de nitrato de sodio y su correspondiente lectura de absorbancia).

Tabla N° 6: porcentajes de recuperación en muestras adicionadas de nitrato.

Concentración nominal Nitratos (ppm)	Concentración leída (ppm)	Recuperación (%)
100,14	91,241	91,11
	105,839	105,69
	98,54	98,40
	98,54	98,40
	98,54	98,40
	98,54	98,40
Media		98,40
Desvío		4,21
Coeficiente de variación (%)		4,28

Prueba t de Student para porcentaje de recuperación

$$t_{\text{calculado}} = [100 - \%R]/(s \times \sqrt{n})$$

R= Recuperación (promedio)

s= Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación

n= N° de lecturas o valores observados

$$t_{\text{calculado}} = (100-98,4)/(4,21 \cdot \sqrt{6}) = 0,1552$$

$$t_{\text{critico}} = 2,5706$$

Como el valor calculado de t es menor que el valor obtenido por tabla, puede decirse que para el nivel de probabilidad estudiado, no existen diferencias significativas y por lo tanto no deberán hacerse correcciones en los resultados reportados.

Esta prueba confirma, junto a la prueba de sesgo, que la técnica en estudio cumple el requisito de exactitud.

4.2.5 PRECISIÓN

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

4.2.5.1 REPETIBILIDAD

La repetibilidad es la prueba, bajo condiciones de repetición, donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método, en ítems de análisis idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador y utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

En esta prueba se usaron las lecturas espectrofotométricas obtenidas en la determinación de sesgo (ver tabla N° 7)

Tabla N° 7: valores de concentración de nitratos en la prueba de repetibilidad.

N° de lectura	Concentración (ppm)
1	5,07
2	5
3	5,07
4	5,07
5	5,07
6	4,93
Media	5,035
Desvío	0,053
CV(%)	1,05

Criterio de aceptación

El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base al coeficiente de variación de Horwitz :

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5)\log C}$$

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10.

En este sentido se establece para la repetibilidad que el CV_r% obtenido debe ser < (CV_h%/2).

$$CV_h\% = (2^{0,5 \log 0,000005})/2.100 = 7,96$$

Dado que el coeficiente de variación para la repetibilidad tiene un valor menor que el respectivo de Horwitz, el método considerado tiene una precisión aceptable.

Esto indica que repetido el experimento sucesivas veces, bajo las mismas condiciones, los valores obtenidos serían iguales.

4.2.6 APLICABILIDAD

El presente estudio se ha basado en la determinación y cuantificación del ión nitrato en productos cárnicos (chacinados).

Se ha trabajado en un rango de concentraciones que van de 2,5 a 10 ppm. La matriz sobre las que se hicieron las pruebas fueron salchichas cocidas envasadas.

Esta matriz se usó en la prueba de recuperación, en tanto que para las demás pruebas de validación se trabajó con soluciones preparadas a partir de la droga patrón.

En la tabla N° 8 pueden observarse los valores obtenidos para las distintas pruebas de validación realizadas en este estudio.

Tabla N° 8: Valores de parámetros obtenidos de la prueba de validación para nitratos

Prueba	Valor
Recta de regresión	$Y=0,137.X-0,005$
Coefficiente de determinación	$R^2=1$
Coefficiente de correlación	$r=0,999$
Exactitud (porcentaje de recuperación)	98,40 %
Precisión (coeficiente de variación)	1,05 %
Límite de detección	0,29 ppm
Límite de cuantificación	0,88 pm

5. DISCUSIÓN

Si bien la determinación de Nitratos en aguas puede considerarse rutinaria en los laboratorios, no sucede lo mismo con la cuantificación de este anión en productos cárnicos, ya que se trata de matrices complejas, con todo lo que eso implica al momento de estudiar un componente en particular.

El procesamiento estadístico de los datos de linealidad, presentó resultados satisfactorios, ya que la ecuación de regresión, tuvo elevados coeficientes de correlación lineal y de determinación, el intercepto no fue diferente de cero y el $CV < 5\%$. Estos resultados indican que la metodología desarrollada es confiable, en el rango analizado.

La tabla N° 7 muestra los resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad. Aquí, el valor obtenido del coeficiente de variación fue de 1,05%, mucho menor al 5% establecido por lo general en la bibliografía (Instituto de salud pública de Chile, 2010). Esto da como resultado una precisión aceptable para el método propuesto.

Esta analítica permite, por medio de la espectrofotometría UV-Visible, cuantificar la concentración de este tipo de conservante, usado en la industria alimentaria de productos cárnicos.

6. CONCLUSIÓN

La curva de calibración obtenida presenta linealidad para concentraciones comprendidas entre 2,5 y 10 ppm de anión nitrato.

Los resultados obtenidos a través del análisis estadístico de los datos confirman, la validez de esta técnica, para el rango de concentraciones trabajado.

El cumplimiento de las exigencias establecidas para la validación de la técnica analítica propuesta, garantizó que el método fuera suficientemente específico, lineal, preciso y exacto para la cuantificación del anión nitrato, en el rango de 2,5 a 10 ppm.

En función de lo anterior podría ponerse a consideración de los laboratorios oficiales el uso de la misma para sus trabajos de control, previa autorización de los entes reguladores de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

AMADO, JESÚS CAMPOS. 2007. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN, en relación con el riesgo de la posible presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura. [<http://www.dialnet.unirioja.es>], [consulta: 19 de setiembre de 2018].

ALMUDENA, ANTÓN Y LIZASO, JESÚS. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Fundación ibérica para la seguridad alimentaria. Ronda de Poniente, 9 – Tel. 91 807 54 10 Fax: 91 803 38 87 – 28760 Tres cantos (Madrid). [<http://www.academia.edu>], [consulta: 19 de setiembre de 2018]

ANMAT. Aditivos en los alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. [<http://www.anmat.gov.ar/alimentos.pdf>], [consulta: 17 de julio de 2019].

BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA DE LOS EE. UU. Enciclopedia médica. Botulismo. [<http://www.medlineplus.gov>], [consulta: 8 de noviembre de 2019].

CFR. 2015. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption. Subpart B--Food Preservatives Sec. 172.170 Sodium nitrate. Code of Federal Regulations Title 21. Food and drugs. Chapter I. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. Subchapter B Food for Human Consumption (Continued). Part 172. [<http://www.fao.org>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. Actualizado mayo de 2019. Capítulo VI. Alimentos cárneos y afines. [<http://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>], [consulta: 17 de julio de 2019].

DE FERNÍCOLA, NILDA A. G. G. 1989. Metahemoglobinemia infantil causada por nitratos. [<http://www.hist.library.paho.org>], [consulta: 22 de julio de 2019].

DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS DE LOS EE.UU. Resumen de salud pública. Nitrato y Nitrito. 2015. Servicio de Salud Pública. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. División de Toxicología y Ciencias de la Salud. [Consulta: 22 de julio de 2019].

EFSA. 2003. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal, 14:1-31. [<http://www.fao.org>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

ELIKA. 2014. Nitratos. Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. [<http://www.elika.net>], [consulta: 22 de julio de 2019].

EUROPEAN COMMISSION. 2008. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. Official Journal of the European Union L354:16-33. [<http://www.fao.org>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

FAO/OMS. Comité del codex sobre aditivos alimentarios. 2017. Documento de debate sobre el uso de nitratos (sin 251, 252) y nitritos (sin 249, 250). 49ª reunión. Macao SAR, China, 20-24 de marzo. [<http://www.fao.org>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

FCEC. Study on the monitoring of the implementation of Directive 2006/52/EC as regards the use of nitrites by industry in different categories of meat products. Food Chain Evaluation Consortium. 2016. [consulta: 17 de octubre de 2018].

FSANZ. Survey of nitrates and nitrites in food and beverages in Australia. 2011. [<http://www.foodstandards.gov.au/consumer/additives/nitrate/Pages/default.aspx>] [consulta: 17 de octubre de 2018].

GONZALEZ, DAVID; VAREA, RUBÉN. Apuntes de espectroscopia. [<http://www.laboescuela.com>], [consulta: 19 de agosto de 2018].

HEALTH CANADA. 2012. [<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/list/11-preserv-conserv-eng.php>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

HUANCA SUCASAIRES, D.; SOLÍS MEDINA, R. 2010. Determinación de nitritos y nitratos en hot dogs de consumo directo por estudiantes del 5º y 6º grado de educación primaria del distrito de Villa el Salvador. Lima, Perú. P. 42-45.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 94. 2010. [consulta: 17 de octubre de 2018].

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of iarc monographs volumes 1 to 42. Supplement 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2002. [consulta: 17 de octubre de 2018].

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Santiago.

ISO 3091:2005.
ISO 2918:2006.

JECFA. 1995. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives, WHO technical report series 859.29-35. [<http://www.fao.org>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

JECFA. 2002. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives. WHO Technical Reports series 913. 20-32. [<http://www.fao.org>], [consulta: 17 de octubre de 2018].

LONDOÑO MAY, ERIKA PAOLA; LONDOÑO RAMÍREZ, LILIANA MARÍA; BARRERA ZAPATA, ROLANDO. Determinación analítica de nitratos en aguas usando el método de ion selectivo. <https://www.researchgate.net/publication/317766392>, [consulta: 12 de noviembre de 2019]

MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2014. Nutrición y educación alimentaria. Ficha N° 25. Nitratos y nitritos: Útiles en su justa medida. [<http://www.alimentosargentinos.gob.ar>], [consulta: 19 de setiembre de 2018].

MOLINA, S. 2010. Estandarización de métodos de análisis para determinación de nitratos. Universidad Industrial de Santander. P. 64, 85-98.

NORMA IRAM 32: Metrología. Vocabulario VIM. 1997. [<http://www.oaa.org.ar>], [consulta: 14 de noviembre de 2019].

PASCALE, ANTONIO et al. Archivos de pediatría del Uruguay. 2017. [<http://www.scielo.edu.uy>], [consulta: 22 de julio de 2019]

Resolución ex - SENASA N° 231 (20/09/95).

Resolución GMC N° 083/93

Incorporada por Resolución MSyAS N° 003 del 11.01.95, Capítulo XVIII, CAA.

SCF. Opinions of the scientific committee for food on: Nitrates and Nitrite. Reports of the Scientific Committee for food. 1995. [consulta: 17 de octubre de 2018].

SPECTOMETRIC ANALYSIS. Práctica de espectrofotometría UV-Visible (Cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer y análisis de mezclas). 2000. [consulta: 19 de junio de 2018].

VENTANAS, SONIA; MARTÍN, DIANA; ESTÉVEZ, MARIO; RUIZ, JORGE.

2004. Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (I).

Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. [<http://www.researchgate.net>], [consulta: 19 de setiembre de 2018].

VENTANAS, SONIA; MARTÍN, DIANA; ESTÉVEZ, MARIO; RUIZ, JORGE.

2004. Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (II). Estrategias de actuación y métodos de análisis de nitrosaminas.

Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. [<http://www.researchgate.net>], [consulta: 19 de setiembre de 2018].

ANEXO

Cálculo del coeficiente de correlación (r).

	Concentración (ppm)	Absorbancia	X.Y	X ²	Y ²
	2,5	0,34	0,85	6,25	0,1156
	5	0,68	3,4	25	0,4624
	7,5	1,03	7,725	56,25	1,0609
	10	1,37	13,7	100	1,8769
Totales	25	3,42	25,675	187,5	3,5158
Medias	6,25	0,855			
	7,81	2,80			
	0,148	0,38			
	1,075				
r	1,000				