



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS FOCALIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE NITRITOS  
EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

**TESIS**

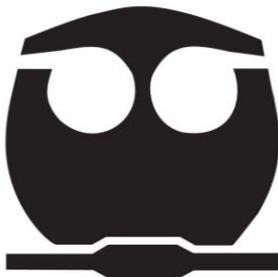
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Jorge de Jesús Cristóbal Hernández**

**ASESOR**

**Dra. María del Pilar Cañizares Macías**



**Ciudad Universitaria, CDMX. 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: ROJO CALLEJAS FRANCISCO**

**VOCAL: Profesora: CAÑIZARES MACÍAS MARÍA DEL PILAR**

**SECRETARIO: Profesora: MINA CETINA ALEIDA**

**1er. SUPLENTE: Profesor: GARCÍA CANO ISRAEL**

**2° SUPLENTE: Profesor: GODÍNEZ RODRIGUEZ JOSÉ LUIS**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 211, EDIFICIO F2, FACULTAD DE QUÍMICA**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS**

## **SUSTENTANTE:**

**JORGE DE JESÚS CRISTÓBAL HERNÁNDEZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9029) por el financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

## ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>4</b>
<b>I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE CARNE .....</b>	<b>5</b>
1.1.1 VALOR NUTRIMENTAL .....	5
<b>1.2 PRODUCCIÓN Y CONSUMO A NIVEL MUNDIAL .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 CONSUMO DE PRODUCTOS CÁRNICOS EN MÉXICO .....	8
<b>1.3 PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS.....	9
1.3.1.1 Color.....	10
1.3.1.2 Inhibición bacteriana.....	11
1.3.1.3 Oxidación de lípidos .....	11
1.3.1.4 Sabor.....	11
1.3.2 IMPORTANCIA DE LOS NITRITOS EN LA ACTUALIDAD .....	12
1.3.2.1 Nitrosaminas.....	12
1.3.2.2 Carcinogenicidad de nitrosaminas .....	14
<b>1.4 ANÁLISIS DE NITRITOS Y NITRATOS EN CARNE.....</b>	<b>16</b>
1.4.1 EXTRACCIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS.....	16
1.4.1.1 Ultrasonidos focalizados como método de extracción.....	17
1.4.1.1.1 Mecanismo de extracción.....	18
1.4.2 CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS EN CARNE .....	19
1.4.2.1 Análisis por Inyección en Flujo .....	19
1.4.2.1.1 Descripción de FIA .....	20
<b>II. METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 REACTIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA (EDTA 0.0003 M/NH <sub>4</sub> Cl 1.58 M pH 8.5) .....	23
2.3.2 REACTIVO PARA DESARROLLO DEL COLOR (NED 0.008 M/SULFANILAMIDA 0.023 M).....	23
2.3.3 REACTIVO DE CARREZ I .....	24

2.3.4 REACTIVO DE CARREZ II .....	24
2.3.5 DISOLUCIÓN CUPERIZANTE (CUSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.008 M/EDTA 0.1 M) .....	24
<b>2.4 ELABORACIÓN DE LA MINI COLUMNA DE CADMIO CUPERIZADO</b>	<b>24</b>
2.4.1 CUPERIZACIÓN DE LOS GRÁNULOS DE CADMIO .....	24
2.4.2 EMPACADO DE LA COLUMNA.....	25
<b>2.5 CONFIGURACIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 DATOS DE LAS MUESTRAS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.7 PROCEDIMIENTO .....</b>	<b>28</b>
2.7.1 PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	28
2.7.2 EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDOS FOCALIZADOS.....	29
2.7.3 EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO OFICIAL AOAC 973.31 NITRITES IN CURED MEAT (AOAC, 2012) MODIFICADO CON UN PASO DE CLARIFICACIÓN PREVIO AL ANÁLISIS DE MUESTRA.....	30
2.7.4 REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.....	30
2.7.4.1 Repetibilidad .....	30
2.7.4.2 Reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio.....	31
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN.....</b>	<b>31</b>
3.1.1 NITRITOS .....	31
3.1.1.1 Límite de detección de nitritos .....	32
3.1.2 NITRATOS.....	33
3.1.2.1 Nitratos (0.1-0.6 mg/L).....	35
3.1.3 CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS CON LA COLUMNA DE CADMIO CUPERIZADO .....	36
<b>3.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....</b>	<b>40</b>
3.2.1 CLARIFICACIÓN DEL EXTRACTO .....	40
3.2.1.1 Efecto del reactivo de Carrez en la determinación de nitritos....	41
3.2.2 COMPARACIÓN ENTRE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO ULTRASONIDOS FOCALIZADOS Y EL MÉTODO OFICIAL AOAC 973.31.....	42
3.2.2.1 Evaluación de la temperatura en la extracción de nitritos utilizando ultrasonidos focalizados .....	44
3.2.2.2 Evaluación del tiempo de agitación en la extracción de nitritos sin el uso de ultrasonidos focalizados .....	44
3.2.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS CON EXTRACTOS CLARIFICADOS .....	47
3.2.4 REPETIBILIDAD DE LA EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDOS FOCALIZADOS.....	49

3.2.5 REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD INTRALABORATORIO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NITRITOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS CON ULTRASONIDOS FOCALIZADOS .....	50
3.2.6 EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS CONTINUOS .....	53
<b>3.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS .....</b>	<b>54</b>
3.3.1 DETERMINACIÓN DE NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> EN PRODUCTOS CÁRNICOS .....	54
3.3.2 RECOBROS DE NITRITOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS .....	56
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>63</b>

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

ABS	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
CCAYAC	Comisión de Control Analítico Y Ampliación de Cobertura
CDR	Consumo Diario Recomendado
CV	Coefficiente de varianza
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico
FIA	Análisis por Inyección en Flujo
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
LOD	Límite de detección
NED	Clorhidrato de N-1-naftiletildiamina

## INTRODUCCIÓN

La carne es un producto pecuario de gran valor nutrimental, contiene proteínas, aminoácidos, minerales, grasas, vitaminas y también posee carbohidratos aunque en mínimas cantidades. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, las cuales contienen todos los aminoácidos indispensables, así como minerales y vitaminas que son altamente biodisponibles (FAO, 2016).

La carne y los productos cárnicos son altamente perecederos debido a que contienen nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos. El desarrollo de bacterias, hongos y levaduras son responsables del deterioro de estos productos alimenticios, limitando su estabilidad con efectos significativos en la calidad del producto y seguridad alimentaria. Ante esto, varios procedimientos de preservación son usados para proteger la carne del deterioro microbiano, incluyendo el uso de aditivos que son conocidos como conservadores. Los conservadores son compuestos químicos adicionados a productos alimenticios los cuales prolongan su vida de anaquel gracias a la protección (por prevención o inhibición) del deterioro causado por microorganismos y, de esta manera, aumentando la seguridad alimentaria (Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero, 2008).

Dentro de los conservadores, los nitritos y nitratos han sido usados en carne procesada debido al efecto que ejercen en características organolépticas como el sabor y color de la carne, aunado a la inhibición de microorganismos tales como *Clostridium botulinum*, sin embargo el actual interés en los nitritos está principalmente centrado la formación de nitrosaminas, los cuales son compuestos carcinogénicos dañinos a la salud.

Aunque varios métodos han sido reportados para la extracción y cuantificación de nitritos residuales en productos cárnicos, la mayoría de éstos son tediosos y no son muy económicos ya que implican el uso de grandes volúmenes de reactivos tóxicos; consumen gran cantidad de tiempo e involucran una gran manipulación del operario (Andrade *et al.*, 2003).

Para el presente trabajo, se realizó la extracción de nitritos y nitratos en carne mediante el uso de ultrasonidos focalizados debido a que se tenía la hipótesis de que aplicando ultrasonidos en carne, las extracciones de nitritos podrían ser completadas en minutos, a diferencia del método oficial AOAC 973.31 *Nitrites in cured meat* en donde el tiempo de extracción del conservador es de dos horas.

Asimismo el análisis y cuantificación de nitritos y nitratos fue realizado mediante análisis por inyección en flujo (FIA por sus siglas en inglés) puesto que, entre las metodologías de análisis, aquellas basadas en flujo continuo han tomado un crecimiento significativo en años recientes debido a varias de sus ventajas tales como su rapidez en el análisis de un gran número de muestras, alta precisión, precio accesible, mínima intervención del operador, entre otras ventajas (Ruiz-Capillas y Jiménez Colmenero, 2008).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Implementar un método de extracción de nitritos en productos cárnicos por medio de ultrasonidos focalizados y determinarlos por un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar las condiciones óptimas de extracción de nitritos en productos cárnicos utilizando ultrasonidos focalizados.
- Reducir el tiempo de extracción de nitritos en muestras cárnicas con respecto a los métodos convencionales de extracción por agitación.
- Elaborar la curva de calibración para nitritos utilizando el método FIA.
- Evaluar la extracción de nitratos en productos cárnicos utilizando ultrasonidos focalizados.
- Construir una minicolumna de cadmio cuperizado, para la reducción de nitratos a nitritos, acoplado a la configuración FIA utilizada para determinar nitritos.
- Elaborar la curva de calibración de nitratos por FIA.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1.1 IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE CARNE**

La carne puede formar parte de una dieta balanceada aportando nutrimentos beneficiosos para la salud. La carne y los productos cárnicos contienen importantes niveles de proteínas, vitaminas y minerales que son esenciales para el crecimiento y el desarrollo. El procesamiento de la carne ofrece la oportunidad para añadir valor, reducir los precios, fomentar la inocuidad alimentaria y ampliar la vida útil del producto. Esto a su vez puede generar un aumento de los ingresos del hogar y una mejora de la nutrición (FAO, 2014).

Por otro lado, se estima que más de 2000 millones de personas tienen deficiencias en vitaminas y minerales fundamentales a la salud, particularmente en vitamina A, yodo, hierro y zinc. Dichas carencias ocurren cuando las personas tienen un acceso limitado a alimentos ricos en micronutrientes como carne, pescado, frutas y hortalizas. La mayor parte de las personas con deficiencias en micronutrientes viven en países de bajos ingresos y generalmente presentan carencias de más de un micronutriente (FAO, 2014).

#### **1.1.1 VALOR NUTRIMENTAL**

El alto valor nutrimental de la carne radica en la concentración de nutrientes por kilocaloría, la variedad de nutrientes presentes en los tejidos y la excelente biodisponibilidad de los mismos hacen de la carne una fuente nutritiva muy importante para los consumidores (Strasburg *et al.*, 2008).

La composición de la carne es completamente variable. Los principales factores que afectan su composición son: especie, raza, sexo, edad, estado nutricional y grado de actividad del animal. Además, incluso para un mismo animal, la localización anatómica del corte, las manipulaciones *post-mortem*, el almacenamiento y la cocción del mismo, contribuyen significativamente a la variabilidad de la composición de la carne (Strasburg *et al.*, 2008).

A continuación se muestra la composición aproximada de diversos tipos de carne (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 1. Composición aproximada de la carne de diversas especies (porcentaje en peso de la composición comestible)

	<b>Carnes rojas</b>			<b>Aves</b>		<b>Pescados</b>	
	Vacuno	Cerdo	Cordero	Pollo	Pavo	Bacalao	Atún
<b>Agua</b>	70.62	72.34	73.42	74.76	74.12	81.22	68.09
<b>Proteínas</b>	20.78	21.07	20.29	23.09	24.60	17.81	23.33
<b>Lípidos</b>	6.16	5.88	5.25	1.24	0.65	0.67	4.90
<b>Cenizas</b>	1.02	1.04	1.06	1.02	1.02	1.16	1.18

*Fuente:* Adaptado de Strasburg *et al.* (2008).

Tabla 2. Contenido aproximado de minerales y vitaminas en la carne de diversas especies

	<b>Carnes rojas</b>			<b>Aves</b>		<b>Pescados</b>		<b>IDR</b>
	Vacuno	Cerdo	Ovino	Pollo	Pavo	Bacalao	Atún	CDR
<b>Minerales (mg/100g)</b>								
Potasio	356	380	280	255	293	413	252	4700
Fósforo	199	211	189	196	206	203	254	700
Sodio	63	57	66	65	49	54	39.0	1500
Magnesio	22	23	26	28	28	32	50.0	420
Calcio	6	16	10	11	10	16	8.0	1000
Zinc	4.33	2.08	4.06	0.8	1.24	0.45	0.60	11
Hierro	2.13	0.91	1.77	0.72	1.17	0.38	1.02	8
<b>Vitaminas (µg/100g)</b>								
B1	110	966	130	70	40	76	241	1200
B2	180	273	230	92	118	65	251	1300
B3	3590	4829	6000	11194	6255	2063	8654	16000
B5	360	788	700	819	717	153	1054	5000
B6	440	500	160	550	580	245	455	1300
B9	7.0	5.0	23.0	4.0	8.0	7	2.0	400
B12	3.25	0.67	2.62	0.38	0.47	0.91	9.43	2.4

*Fuente:* Adaptado de Strasburg *et al.* (2008).

## 1.2 PRODUCCIÓN Y CONSUMO A NIVEL MUNDIAL

Datos estadísticos obtenidos del Consejo Mexicano de la Carne (COMECARNE) muestran algunos de los principales países productores de carne así como algunos de los principales países consumidores de la misma. De manera general, entre los principales países productores de carne se encuentran Estados Unidos, China, Brasil y la Unión Europea (Figura 1 y Figura 2).

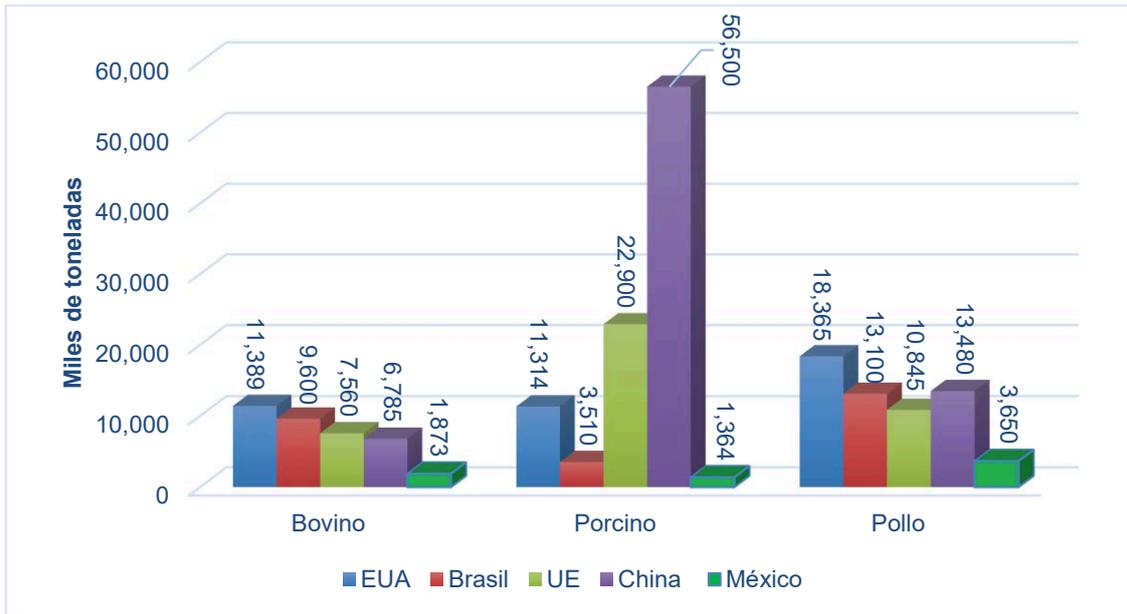


Figura 1. Principales países productores de carne, comparativa con México. Datos estimados del año 2016.

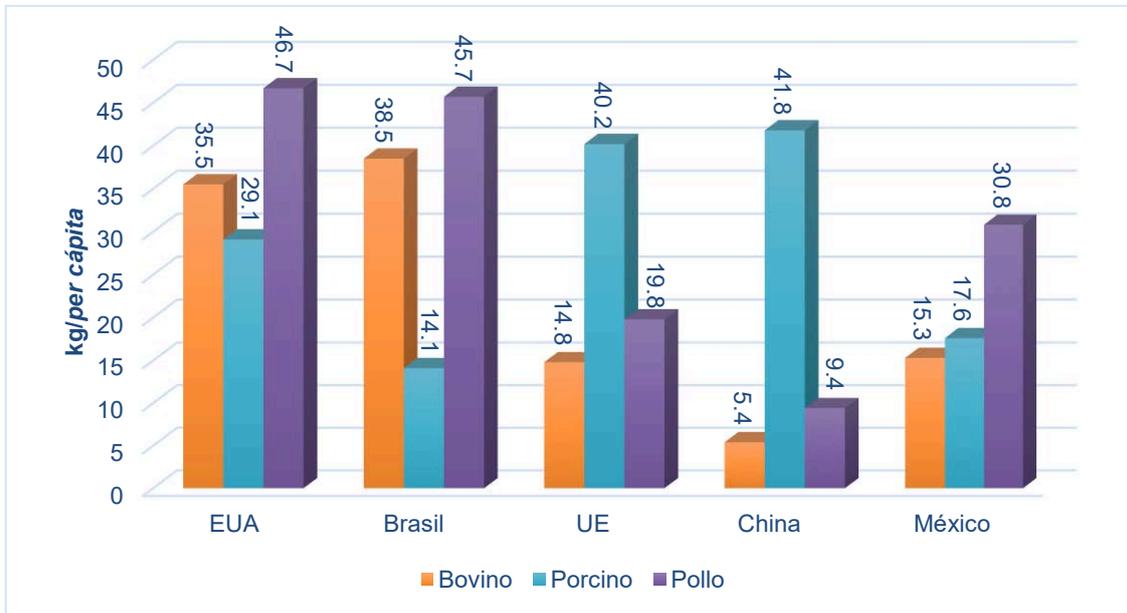


Figura 2. Principales países consumidores de carne *per cápita*, comparativa con México. Datos preliminares del año 2015.

### 1.2.1 CONSUMO DE PRODUCTOS CÁRNICOS EN MÉXICO

Con base en información obtenida del Consejo Mexicano de la Carne (2015); la familia mexicana tiene preferencia por la carne de bovino, seguidas por el pollo, la carne de cerdo y en menor medida por la carne procesada, esto se deduce del gasto que ejercen en la compra de carne. Dentro de la adquisición de carne de bovino, el tipo de corte preferido por la mayoría de la población mexicana es el bistec, seguido de la carne molida y en menor medida el chamorro. En cuanto a carne de cerdo se refiere, la costilla y chuleta; seguidos del bistec son los productos más consumidos por la población mexicana. Mientras que de la carne de ave, el pollo entero o en piezas es la forma más consumida por el pueblo mexicano.

Por otra parte, el consumo de carne procesada ha ido en aumento en los últimos años (Figura 3), siendo el jamón, salchicha, chorizo, mortadela entre otros productos cárnicos, los de mayor consumo a nivel nacional (COMECARNE, 2015).

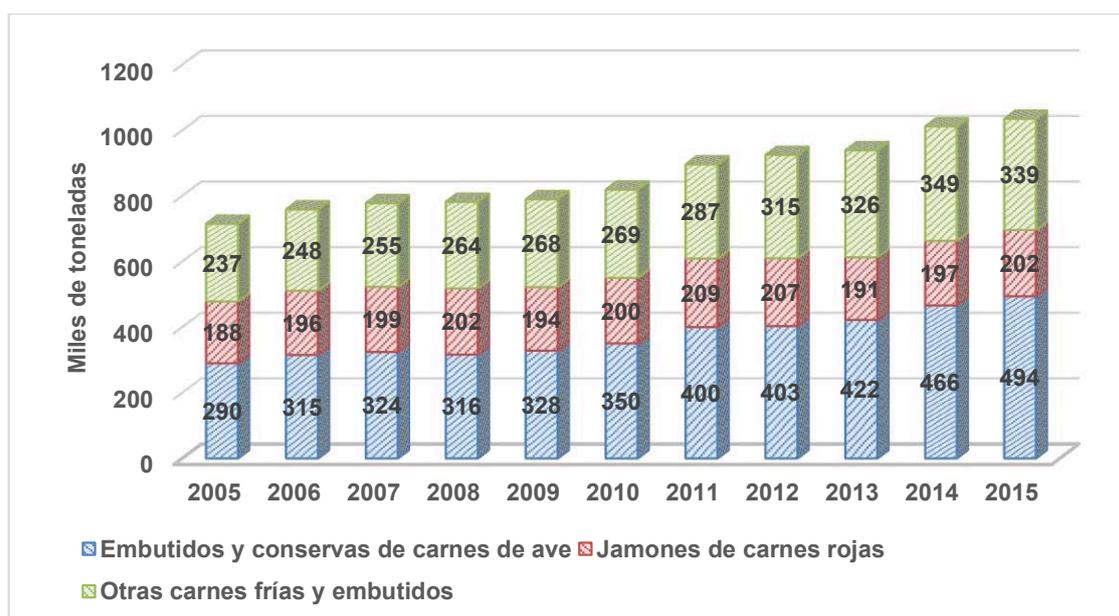


Figura 3. Producción de productos cárnicos procesados (2005-2015)

Adaptado de COMERCARNE: *Compendio estadístico 2015 de la industria cárnica mexicana*.

### 1.3 PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS

Se entiende por carne procesada a aquella que ha sido tratada física, química y térmicamente para incrementar la variedad de productos, facilitar su consumo y aumentar la vida de anaquel de la carne (Strasburg *et al.*, 2008).

#### 1.3.1 PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

Se conoce como *curado* al tratamiento que tiene la carne al adicionarla con sales de nitritos y/o nitratos para la preservación y obtención del color rosáceo característico de la carne curada. Entre estos productos se encuentran el jamón, tocino, salchichas entre otros productos *listos para su consumo* (Strasburg *et al.*, 2008).

El nitrito es un aditivo multifuncional, induce y estabiliza el color rosáceo de la carne, contribuye al sabor característico de la carne curada, inhibe el crecimiento y la producción de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* y retarda el desarrollo de la rancidez oxidativa (Davidson *et al.*, 2002; Strasburg *et al.*, 2008). Belitz *et al.* (2009), menciona que 5-20 mg de nitrito por kg son considerados suficientes para enrojecer la carne, 50 mg/kg para la producción del sabor característico y 100 mg/kg para los efectos antimicrobianos deseables.

Algunos autores difieren en cuanto a la dosis letal de nitritos en humanos, por ejemplo Davidson *et al.* (2002); menciona que es de 32 mg/kg de peso corporal, en cambio Kantor (2000); sugiere que la dosis letal de nitritos es de alrededor de 22 mg/kg de peso corporal. Sin embargo este último también señala que es prácticamente imposible para adultos o niños consumir la cantidad suficiente de nitritos en carne curada para tener un efecto tóxico de gravedad. Por otro lado se ha observado que la ingestión prolongada de nitrito o nitrato de sodio causa metahemoglobinemia, que es la producción excesiva de hemoglobina anormal (Davidson *et al.*, 2002).

El Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado los efectos en la salud de nitratos y/o nitritos y confirmó una Ingesta Diaria Admisible (IDA) del ion nitrato de 0-3.7 mg por kg de peso corporal por día y ha establecido un IDA del ion nitrito de 0-0.06 mg/kg de peso corporal (WHO, 1995 citado en WHO, 2010). Sin embargo, se ha notificado que esta IDA no aplica a infantes de menos de 3 meses de edad (WHO, 2010).

#### 1.3.1.1 Color

El atributo organoléptico de la carne que más influye directamente en la elección del consumidor es la apariencia visual. Esto es debido a que representa la primera característica de impacto en el usuario y actúa como un fuerte filtro de selección, siendo percibida como preferencial ante otras cualidades tales como aroma, sabor o textura (Castigliego *et al.*, 2012).

El color rojo-rosáceo característico de la carne curada cocida resulta de la reacción de la mioglobina con el óxido nítrico para formar el pigmento nitrosomioglobina. El óxido nítrico es derivado del nitrito en la presencia de compuestos reductores tales como el ácido eritórico. También, parte del nitrito disuelto en agua puede formar ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) que bajo condiciones de reducción se descompone en óxido nítrico. Cuando el óxido nítrico se enlaza al hierro hémico, cambia la distribución de electrones en la estructura hemo, resultando en la producción del color rosáceo. Al calentarse, la nitrosomioglobina es convertida a nitrosohemocromo, el cual es más estable debido a la desnaturalización de la globina (Strasburg *et al.*, 2008).

La reacción general propuesta por Martin (2012) es la siguiente:

Mioglobina (rojo-morado) + NO → Nitrosomioglobina (rojo oscuro) + Calor → Nitrosohemocromo (rosa brillante, típicamente conocido como *color de la carne curada*).

#### 1.3.1.2 Inhibición bacteriana

Actuales investigaciones han sugerido posibles mecanismos de inhibición por los cuales el nitrito inhibe *C. botulinum*. Éstas incluyen la formación de una sustancia inhibitoria del nitrito y otros componentes de la carne; el nitrito o intermediarios actúan como oxidantes o reductores en enzimas intracelulares o ácidos nucleicos; hay restricción del hierro u otros metales esenciales para *C. botulinum* por el nitrito, de este modo se interfiere con el metabolismo del organismo; o bien existe reacción del nitrito con membranas celulares para limitar intercambios metabólicos o el transporte de sustancias (Martin, 2012).

#### 1.3.1.3 Oxidación de lípidos

El efecto del nitrito en el retardamiento del desarrollo de rancidez es probablemente debido a la misma reacción que es responsable del desarrollo del color. Los compuestos hemo del músculo contienen iones hierro que catalizan las reacciones de oxidación lipídica. Cuando el nitrito reacciona para formar los pigmentos del curado, el hierro es retenido en el grupo hemo, usualmente en la forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ), haciéndolo indisponible como catalizador para la oxidación lipídica (Martin, 2012).

#### 1.3.1.4 Sabor

Se han hecho afirmaciones de que la sal es el factor principalmente responsable del sabor en la carne curada, aún más que los nitritos o la ausencia de la rancidez oxidativa, sin embargo se debe hacer notar que la carne de cerdo salada y el tocino tienen sabores completamente diferentes, sugiriendo un rol positivo del nitrito en la formación del sabor, sin embargo actualmente no existe un mecanismo que explique la influencia del nitrito en el desarrollo del sabor de la carne curada (Martin, 2012).

### 1.3.2 IMPORTANCIA DE LOS NITRITOS EN LA ACTUALIDAD

Aunque está establecido que el nitrito puede causar la anomalía llamada metahemoglobinemia, que es la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina y que se caracteriza por la disminución de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno (Martin, 2012); la restricción emergente de niveles de nitritos en carne está basada en la preocupación que se tiene en que los nitritos pueden formar nitrosaminas carcinogénicas por su reacción con aminas secundarias en carne curada cocida así como en los intestinos del cuerpo humano (Xiong, 2012)

Sin embargo, aunque se sabe que la formación de nitrosaminas a partir del nitrito ocurre tanto en los alimentos como en el organismo, es complicado evaluar el efecto adverso del nitrito como aditivo de alimentos ya que la población está expuesta a nitritos provenientes de varias fuentes; por ejemplo, el nitrito derivado del nitrato, ocurre naturalmente en vegetales como la remolacha, lechuga y espinaca. Los nitratos también pueden ser encontrados en agua potable, especialmente en aguas de pozos, como resultado de la presencia de fertilizante en éstas. Los nitratos presentes en la saliva son químicamente reducidos a nitrito por la microbiota. El nitrito también es formado a través de varias rutas metabólicas endógenas que involucran otros compuestos nitrogenados. De esta forma, la ingestión de nitrito proveniente de productos curados representa sólo un mínimo porcentaje comparando con la exposición total a la que se somete el ser humano (Kantor, 2000).

#### 1.3.2.1 Nitrosaminas

Las *N*-nitrosaminas son compuestos aromáticos o alifáticos, los cuales tienen un grupo funcional nitroso unido a un nitrógeno (Rath y Reyes, 2009).

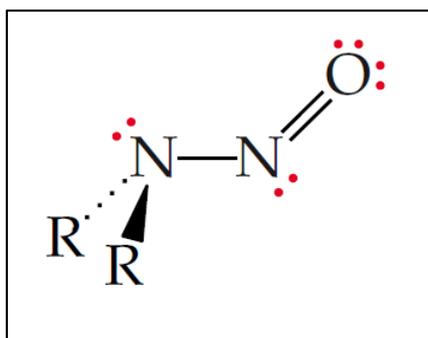


Figura 4. Estructura general de las nitrosaminas

En general, las nitrosaminas son compuestos estables en soluciones neutrales y fuertemente alcalinas, y son difíciles de destruir una vez formadas (Rath y Reyes, 2009).

Aunque se sabe que la formación de nitrosaminas en alimentos está generalmente relacionada a la nitración de aminas secundarias, algunos autores difieren en cuanto al principal agente de nitración, por ejemplo Rath y Reyes (2009); y WHO (2010) señalan que el principal agente de nitración es el anhídrido nitroso ( $N_2O_3$ ) producido del nitrito (Figura 5). En tanto Damodaran (2008) y Belitz *et al.* (2009); sugieren que el agente principal de nitración es el ácido nitroso (Figura 6).

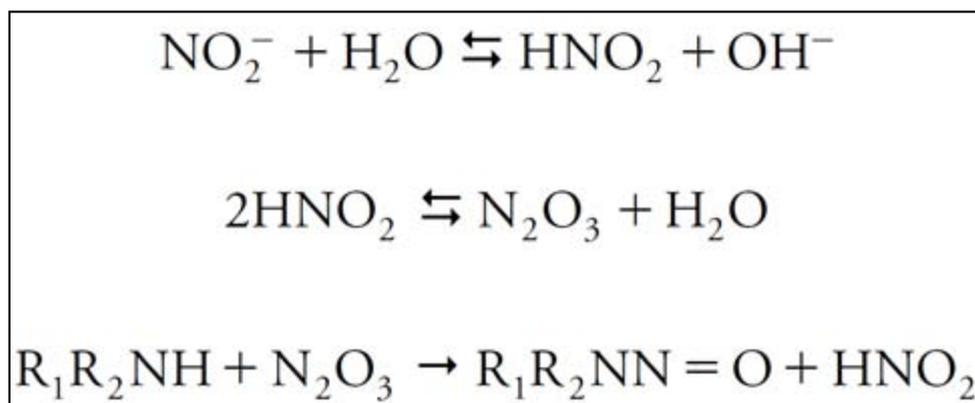


Figura 5. Reacción general para la formación de nitrosaminas. Tomado de Rath y Reyes (2009).

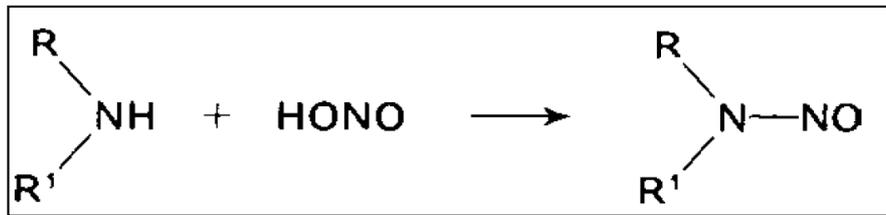


Figura 6. Reacción general para la formación de nitrosaminas. Tomado de Belitz *et al.* (2009).

Por otro lado, varios compuestos, tales como el ácido ascórbico, el ácido eritórbico y el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), han sido reconocidos como agentes *recolectores* de nitritos y en consecuencia actúan como inhibidores de la reacción de nitración (Rath y Reyes, 2009).

### 1.3.2.2 Carcinogenicidad de nitrosaminas

Las nitrosaminas son conocidas por ser carcinogénicas basadas en experimentos en animales, sin embargo su carcinogenicidad es completamente variable entre especies. Para un consumidor promedio de carne, la cantidad ingerida de nitrito proveniente de carne curada es extremadamente bajo y no debería ser de preocupación (Xiong, 2012).

Según estudios realizados por la World Health Organization (2010) sugieren que subgrupos específicos de una población que tienen altas exposiciones a precursores de nitración (nitrito en agua y aminos en la dieta) y baja exposición a inhibidores de la nitración (antioxidantes) están probablemente en mayor riesgo de desarrollar cáncer derivado de la formación de nitrosaminas. Sin embargo, también hacen mención que la relación entre el desarrollo de cáncer y el consumo de carne curada no debe ser directa ya que estos alimentos no representan la ingesta total de nitrito en la dieta (WHO, 2010).

Entre las conclusiones obtenidas en los estudios realizados por la WHO (2010) se encuentran las siguientes:

- Hay *evidencia inadecuada* en humanos para la carcinogenicidad de nitrato en alimentos. Es decir, los estudios disponibles son de calidad, consistencia o poder estadístico insuficiente para hacer una conclusión con respecto a la presencia o ausencia de una asociación causal entre una exposición y el desarrollo de cáncer, o bien no existen datos disponibles de desarrollo de cáncer en humanos.
- Hay *evidencia limitada* en humanos para la carcinogenicidad de nitrito en alimentos. Es decir, existe una asociación positiva observada entre la exposición al agente y el cáncer, por lo cual una interpretación causal es considerada por el grupo de trabajo como creíble, sin embargo, probabilidades, sesgos o confusiones no pueden ser descartadas con evidencia confiable.
- Hay *evidencia inadecuada* en experimentos con animales para la carcinogenicidad del nitrato. Es decir, los estudios no pueden ser interpretados mostrando la presencia o ausencia de un efecto carcinogénico debido a limitaciones mayores cualitativas o cuantitativas, o bien no hay datos disponibles acerca de cáncer en animales usados en experimentación.
- Hay *evidencia suficiente* en animales usados para experimentación, en cuanto a la carcinogenicidad del nitrito en combinación con aminos o amidas. Es decir, el grupo de trabajo consideró que existía una relación causal entre el agente y un incremento en la incidencia de neoplasmos malignos o de una combinación apropiada de neoplasmos benignos o malignos en (a) dos o más especies de animales o (b) dos o más estudios independientes en un especie llevada a cabo en diferentes tiempos, diferentes laboratorios o bajo diferentes protocolos. Un incremento en la incidencia de tumores en ambos sexos de una especie en un estudio bien manejado, idealmente llevado a cabo bajo buenas prácticas de laboratorio, también pueden proporcionar *evidencia suficiente*.

- Hay *evidencia limitada* en animales usados en experimentación para evaluar la carcinogenicidad del nitrito *per se*; es decir, los datos que sugieren un efecto carcinogénico son limitados para poder hacer una evaluación definitiva debido a: (a) la evidencia de carcinogenicidad es restringida a un solo experimento, (b) existen cuestiones sin resolver con respecto a la exactitud del diseño, conducta o interpretación de los estudios; (c) el agente incrementa la incidencia sólo de neoplasmos benignos o lesiones de potenciales neoplásticos inciertos; o (d) la evidencia de carcinogenicidad está restringida a estudios que demuestran solamente la actividad en un estrecho intervalo de tejidos u órganos.

## **1.4 ANÁLISIS DE NITRITOS Y NITRATOS EN CARNE**

Los aditivos en alimentos necesitan ser cuantificados para asegurar la calidad, el cumplimiento de las regulaciones legales y para minimizar el riesgo a la salud de los consumidores (Jiménez-Colmenero y Blazquez, 2009).

### **1.4.1 EXTRACCIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS**

La extracción de nitratos y nitritos en productos cárnicos es crítica en términos de la obtención de recobros adecuados y la reducción de posibles interferencias que puedan existir en la determinación. Cuando los nitritos son adicionados a un material biológico, tales como productos cárnicos, pueden reaccionar con varios componentes naturalmente presentes en la matriz, lo cual significa que los niveles de nitritos detectables analíticamente (conocidos como *residuales*) necesariamente varían, es decir, no reflejan la cantidad de aditivo adicionado inicialmente al producto (Ruiz-Capillas y Jiménez Colmenero, 2008; Ruiter y Scherpenisse, 2012).

Debido a que los productos cárnicos contienen compuestos que pueden interferir en la medición del nitrito y nitrato, varios procedimientos han llevado a cabo un paso de clarificación de los extractos antes de la determinación. En esta clarificación se usan diferentes compuestos o solventes tales como reactivos de Carrez o bórax, sulfato de zinc o ferrocianuro de potasio, acetonitrilo, entre otros (Jiménez-Colmenero y Blazquez, 2009). Sin embargo la mayoría de las metodologías en las que se realiza la extracción de nitritos en carne, sólo involucran el uso de agua caliente como extractante y, en ocasiones, también se hace uso de un baño de vapor en el cual es colocada la muestra por un tiempo hasta de 2 h (NOM-213-SSA1-2002; WHO, 2010; AOAC, 2012).

#### 1.4.1.1 Ultrasonidos focalizados como método de extracción

En años recientes se le ha dado mucha atención a la aplicación de ultrasonidos ya que es un método limpio que evita el uso de una gran cantidad de disolventes y además se logra una reducción en el tiempo de trabajo, por ejemplo, en la extracción de compuestos que típicamente necesitan horas o hasta días para una completa extracción mediante métodos convencionales, usando ultrasonidos, los procesos de extracción pueden ser completados en minutos con una alta reproducibilidad, reducción de consumo de disolventes, simplificación de la manipulación de muestra y trabajo del operario, mayor pureza al producto final y eliminación del tratamiento de residuos (Chemat *et al.*, 2011).

Aunado a lo mencionado anteriormente, el uso del ultrasonido como método complementario a técnicas clásicas ha demostrado un incremento en la eficiencia y reducción de tiempo en procesos de esterilización, congelamiento y filtración, además de la extracción (Mason *et al.*, 1996).

#### 1.4.1.1.1 Mecanismo de extracción

Los vacíos o huecos creados dentro de un medio por la aplicación de ultrasonidos focalizados son burbujas de cavitación que son capaces de crecer durante las fases de rarefacción y disminuir en tamaño durante los ciclos de compresión, cuando el tamaño de estas burbujas alcanzan un punto crítico colapsan durante un ciclo de compresión y liberan grandes cantidades de energía. La temperatura y presión en el momento del colapso han sido estimadas por encima de 5000 K y 2000 atmósferas. Cuando estas burbujas colapsan sobre la superficie de un material sólido, la alta presión y temperatura liberada genera microburbujas que son dirigidas hacia la superficie del sólido lo cual tiene como resultado la extracción de componentes de la matriz (Figura 7) (Chemat *et al.*, 2011).

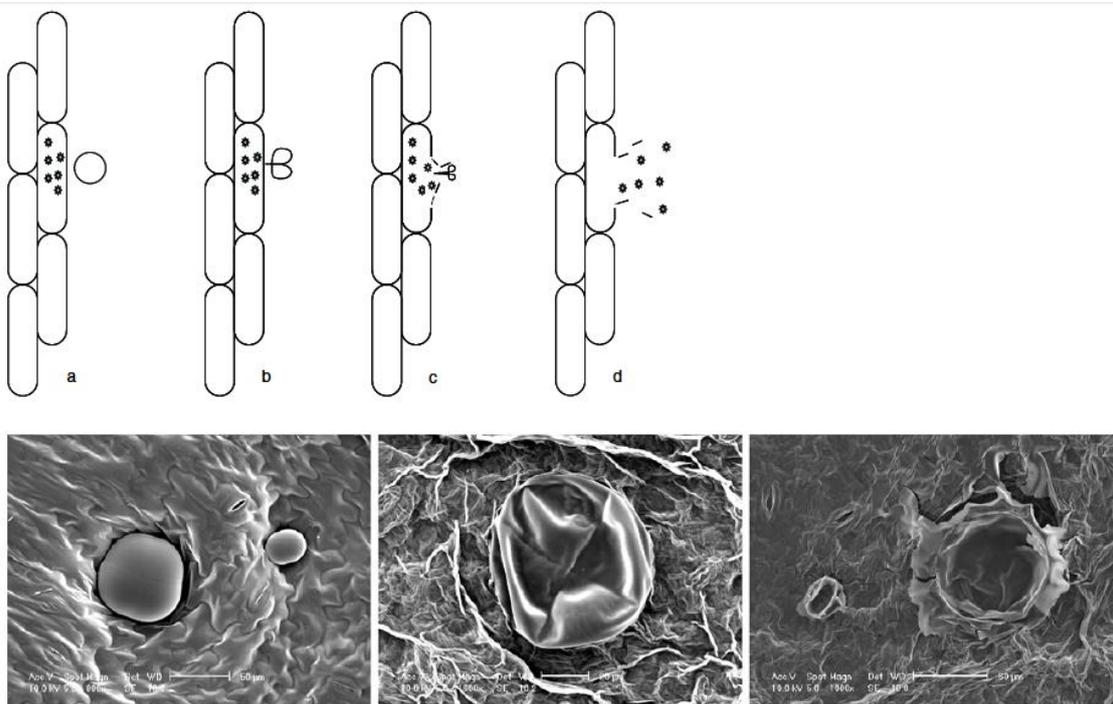


Figura 7. (a) Burbuja de cavitación generada cerca de la superficie del material, (b) colapso de la burbuja durante un ciclo de compresión, (b y c) microburbuja dirigida hacia la matriz de la muestra, (d) destrucción de las paredes celulares de la muestra y liberación del contenido debido a la alta presión y temperatura involucrada en el proceso. Adaptado de Chemat *et al.* (2011).

## 1.4.2 CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS EN CARNE

Varios métodos han sido reportados para la determinación cuantitativa de aditivos, incluyendo espectrofotometría, cromatografía, detección electroquímica (potenciometría, amperometría, polarografía), electroforesis capilar, HPLC, FIA, entre otros (Wood *et al*, 2004; Jiménez-Colmenero y Blazquez, 2009; Rüter y Scherpenisse, 2012).

Entre éstas, las metodologías basadas en el análisis por inyección en flujo (FIA) son de particular interés y han tomado un crecimiento significativo en años recientes debido a varias de sus ventajas. FIA es una técnica versátil, flexible y económica; idónea por su rapidez en el análisis de un gran número de muestras y alta precisión. Precio accesible y fácil de usar, mínima intervención del operador y se tiene un bajo consumo de muestra y reactivos. También, es compatible con una gran cantidad de detectores potenciométricos, amperométricos, espectrofotométricos, fluorométricos, entre otros (Ruiz-Capillas y Jiménez Colmenero, 2008).

### 1.4.2.1 Análisis por Inyección en Flujo

El análisis por inyección en flujo está basado en la inyección de una muestra líquida llevada dentro de un acarreador de flujo continuo no segmentado. La muestra inyectada forma un bolo que luego es transportado hacia un detector el cual continuamente registra cambios en parámetros físicos (tales como absorbancia o potencial del electrodo) cuando la muestra pasa a través de la celda. La curva respuesta de FIA (fiagrama) es el resultado de dos procesos cinéticos: el proceso físico de dispersión del bolo de muestra dentro del acarreador y el proceso químico de la formación de la especie química. Estos dos procesos ocurren simultáneamente y, junto con las características del detector, mejoran el rendimiento en la curva respuesta de FIA (Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero, 2008).

#### 1.4.2.1.1 Descripción de FIA

Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero (2008); mencionan que FIA consta de los siguientes elementos:

- Sistema de propulsión. Es generalmente una bomba peristáltica con un número variable de canales, dependiendo de la velocidad de flujo del reactivo o acarreador, los cuales intervienen en la reacción. Esto provee un flujo constante de los reactivos y muestra.
- Sistema de inyección. Consiste normalmente en una válvula que retiene o inyecta un pequeño volumen de muestra, usualmente medida en microlitros, que es insertada dentro del flujo de la solución acarreadora (o portadora). El uso de válvulas con varios puertos permite la determinación simultánea de varios analitos.
- Bobina de reacción (reactor) y componentes complementarios. La mayoría de los reactores usados son tubos hechos de varios materiales, tales como politetrafluoretileno o tubería de plástico de diferentes tamaños y diámetro interno, los cuales pueden estar enrollados, en nudo o en punto. La finalidad de esta formación geométrica es disminuir la zona de dispersión. Las bobinas pueden ser térmicas y en ocasiones el sistema puede tener otros elementos integrados en serie o en paralelo, tales como columnas (por ejemplo para causar reacciones químicas o para inmovilizar reactantes) o celdas de difusión de gas (por ejemplo para separar  $\text{SO}_2$  o  $\text{NO}_2$ ).
- Sistema de detección. Se puede utilizar una amplia variedad de detectores, incluyendo detectores potenciométricos, amperométricos, espectrofotométricos, fluorométricos, entre otros.
- Sistema de recolección de datos. Esto es normalmente realizado por una PC ligada al sistema o al detector mediante un software.

## II. METODOLOGÍA

### 2.1 FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

Para la determinación de nitritos se hizo uso de la reacción de Griess, en la cual el nitrito reacciona con la sulfanilamida para formar la sal de diazonio, ésta subsecuentemente reacciona con el clorhidrato de N-1-naftiletildiamina y forma el compuesto azoico cuya absorbancia se mide a 540 nm (Figura 8). Para la determinación de nitratos se realiza una reducción cuantitativa del nitrato a nitrito utilizando una columna de cadmio cuperizado y una vez formado el nitrito, el mecanismo de reacción mencionado anteriormente toma lugar.

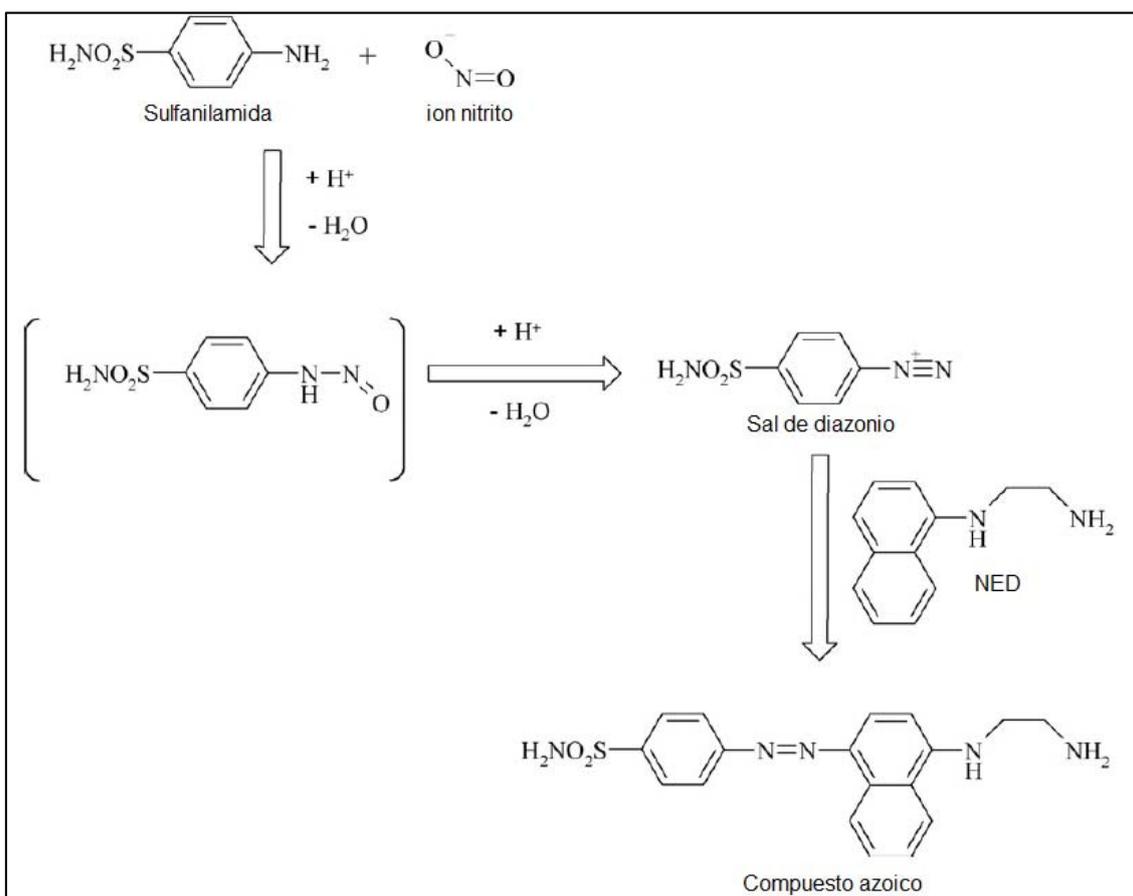


Figura 8. Mecanismo de la reacción de Griess. Adaptado de Tsikas (2007).

## 2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- ♦ WARING COMMERCIAL® Picadora/trituradora PRO PEP® modelo WCG75<sup>(1)</sup>.
- ♦ Sonicador BRANSON Digital Sonifier® Modelo 450 EDP 100-132-645. Potencia máxima: 400 Watts. Adaptado con un convertidor (CONVERTER) modelo 102 C (CE) EDP 101-135-066R y una sonda de disrupción (DISRUPTOR HORN) de 1/2”.
- ♦ Sonicador BRANSONIC® Ultrasonic cleaner Modelo 2510R-MT EDP CPN-952-216. Potencia máxima: 100 Watts.
- ♦ Bomba peristáltica ISMATEC® Modelo ISM834C.
- ♦ Balanza analítica EXPLORER OHAUS® Modelo E12140.
- ♦ Espectrofotómetro *UV/Vis spectrophotometer Varian Cary® 1*. Equipado con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico adaptada al sistema de flujo continuo.

## 2.3 REACTIVOS

A continuación se enlistan los reactivos utilizados en el desarrollo experimental de este trabajo:

- Acetato de Zinc  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . J. T. BAKER®. Pureza 100.1%
- Ácido acético glacial  $(\text{CH}_3\text{COOH})$ . J. T. BAKER®. Pureza 99.9%
- Ácido clorhídrico  $(\text{HCl})$ . J. T. BAKER®. Pureza 36.5-38.0%
- Ácido fosfórico  $(\text{H}_3\text{PO}_4)$ . SIGMA-ALDRICH®. Pureza  $\geq 85\%$
- Cadmio granulado  $(\text{Cd})$ . SIGMA-ALDRICH®
- Cloruro de amonio  $(\text{NH}_4\text{Cl})$ . J. T. BAKER®. Pureza 99.80%
- Clorhidrato de N-1-naftiletilendiamina  $(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\cdot 2\text{HCl})$ . SIGMA-ALDRICH®. Pureza  $>98\%$
- Etilendinitrilotetracetato disódico  $(\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\cdot 2\text{H}_2\text{O})$ . J. T. BAKER®. Pureza 99.5%

---

<sup>(1)</sup> El aparato se usó en el modo de trituradora (Grinder) para el tratamiento de la muestra.

- Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado ( $C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$ ). SIGMA-ALDRICH®. Pureza  $\geq 99\%$
- Hidróxido de sodio (NaOH). Fermont®. Pureza 98.0%
- Nitrato de potasio ( $KNO_3$ ). J. T. BAKER®. Pureza 99.5%
- Nitrito de sodio ( $NaNO_2$ ). SIGMA-ALDRICH®. Pureza  $\geq 97.0\%$
- Sulfanilamida ( $C_6H_8N_2O_2S$ ). SIGMA-ALDRICH®. Pureza  $\geq 99.0\%$
- Sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). SIGMA-ALDRICH®. Pureza  $\geq 98.0\%$

Asimismo, las concentraciones de los reactivos para la implementación del método FIA fueron las utilizadas por Cabrera (1999).

### 2.3.1 DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA (EDTA 0.0003 M/ $NH_4Cl$ 1.58 M pH 8.5)

En un vaso de precipitados de 600 mL se pesaron aproximadamente 42.4 g de  $NH_4Cl$ , los cuales fueron mezclados con aproximadamente 0.0562 g de EDTA, previamente pesados en un vaso de precipitados de 10 mL. La mezcla de reactivos fue completamente disuelta en 300 mL de agua destilada con ayuda de una parrilla de agitación y posteriormente se ajustó el pH a 8.5 con NaOH. La disolución resultante fue transferida a un matraz volumétrico de 500 mL y llevada a la marca de aforo con agua destilada. El buffer se almacenó en un frasco de plástico y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

### 2.3.2 REACTIVO PARA DESARROLLO DEL COLOR (NED 0.008 M/SULFANILAMIDA 0.023 M)

Se pesaron aproximadamente 0.5289 g de NED y 1.0001 g de sulfanilamida en vasos de precipitados de 50 mL. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 50 mL de agua destilada a la cual se le adicionó cuidadosamente 25 mL de  $H_3PO_4$ . Los reactivos de NED y sulfanilamida fueron adicionados y disueltos completamente en la disolución de  $H_3PO_4$ . Por último, la disolución resultante fue transferida a un matraz volumétrico de 250 mL y llevada a la marca de aforo con agua destilada. El reactivo se almacenó en un frasco color ámbar y colocado en refrigeración hasta su uso.

### 2.3.3 REACTIVO DE CARREZ I

En un vaso de precipitados de 100 mL se pesaron aproximadamente 21.9 g de acetato de zinc los cuales fueron disueltos en 50 mL de agua destilada. Una vez disuelto el acetato de zinc, a la disolución se le adicionó 3 mL de ácido acético glacial y finalmente, con agua destilada, se llevó a la marca de aforo de un matraz volumétrico de 100 mL.

### 2.3.4 REACTIVO DE CARREZ II

En un vaso de precipitados de 100 mL se pesaron aproximadamente 10.6 g de hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado los cuales fueron disueltos en 50 mL de agua destilada. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

### 2.3.5 DISOLUCIÓN CUPERIZANTE ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.008 M/EDTA 0.1 M)

Se pesaron aproximadamente 9.3 g de EDTA en un vaso de precipitados de 250 mL y se disolvieron perfectamente en 150 mL de agua destilada. Por otro lado, en un vaso de precipitados de 50 mL, se pesaron aproximadamente 0.5105 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y se adicionaron a la disolución de EDTA. Por último, cuando la disolución estuvo perfectamente homogenizada, se transfirió a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

## 2.4 ELABORACIÓN DE LA MINI COLUMNA DE CADMIO CUPERIZADO

### 2.4.1 CUPERIZACIÓN DE LOS GRÁNULOS DE CADMIO

En primer lugar se pesaron aproximadamente 10 g de cadmio granulado en un vaso de precipitados de 50 mL. Una vez pesados, los gránulos de cadmio se lavaron con ácido clorhídrico diluido (1:100) hasta que se observasen color gris plata. Ya que se obtuvo dicho color, el exceso de ácido fue removido con varios lavados con agua destilada. Para verificar que el exceso de ácido había sido removido, una tira de papel pH se sumergió en el agua del último lavado para comprobar que éste se encontraba en la neutralidad.

Posteriormente se adicionaron porciones de 25 mL de disolución cuperizante a los gránulos de cadmio y se mantuvo en agitación ligera hasta la desaparición del color azul; una vez incolora, la disolución se decantó. Este procedimiento se repitió hasta que los gránulos de cadmio se observaron de color café rojizo, lo cual indica que el cadmio ha quedado bien cuperizado. Para asegurar la total cuperización del cadmio se utilizaron 250 mL de la disolución cuperizante. Posteriormente se realizaron varios lavados con agua destilada para remover el precipitado de cobre de la disolución. El cadmio cuperizado se guardó en el buffer  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$  hasta el empacado de la columna.

#### 2.4.2 EMPACADO DE LA COLUMNA

La columna de cadmio se construyó empacando gránulos de cadmio cuperizados en un tubo de Tygon® de diámetro interno de 3 mm y una longitud de 10 cm, colocando algodón a los extremos del tubo para evitar la salida de los gránulos (Figura 9). La columna se guardó en el buffer  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$  hasta su acoplamiento en la configuración utilizada para la determinación de nitritos y nitratos. Al terminar el experimento, la columna se desmontó y se volvió a guardar en la disolución amortiguadora hasta su próximo uso.



Figura 9. Columna de cadmio cuperizado empacada en tubo de Tygon®

## 2.5 CONFIGURACIÓN

Se usó una bomba peristáltica marca ISMATEC® como sistema de propulsión, agua destilada como portador, buffer NH<sub>4</sub>Cl/EDTA a pH 8.5 y NED con sulfanilamida para el desarrollo del color. Las condiciones óptimas para el análisis de nitratos y nitritos propuestas en el trabajo de tesis de Cabrera (1999) se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones óptimas de análisis para la determinación de nitritos y nitratos (Cabrera, 1999).

Reactivo	Caudal (mL/min)
Buffer (NH <sub>4</sub> Cl/EDTA)	1.56
Portador (H <sub>2</sub> O destilada)	0.41
Reactivo para desarrollo de color (NED/Sulfanilamida)	0.56
Volumen de inyección de muestra	100 µL

Dado que se utilizó una bomba peristáltica a velocidad constante, se utilizaron tuberías de Tygon® de diferente diámetro interno para asemejar las condiciones óptimas de velocidad de flujo establecidos por Cabrera (1999). Las condiciones utilizadas para el análisis de nitratos y nitritos del presente trabajo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones utilizadas para la determinación de nitritos y nitratos

Parámetro	Diámetro interno de la tubería (mm)	Caudal (mL/min)
Caudal del buffer	1.02	1.56
Caudal del portador	0.51	0.50
Caudal del reactivo de desarrollo del color	0.51	0.50

Además de las condiciones mencionadas anteriormente, se utilizó un reactor (serpentín) de 100 cm de longitud para propiciar el desarrollo de la reacción y con ello generar el compuesto colorido. Finalmente el producto de reacción se midió a 540 nm en el espectrofotómetro.

Para la determinación de nitritos y nitratos se utilizó la misma configuración FIA (Figura 10) quitando la columna de cadmio para el análisis de  $\text{NO}_2^-$  y conservándola para el análisis de  $\text{NO}_3^-$ .

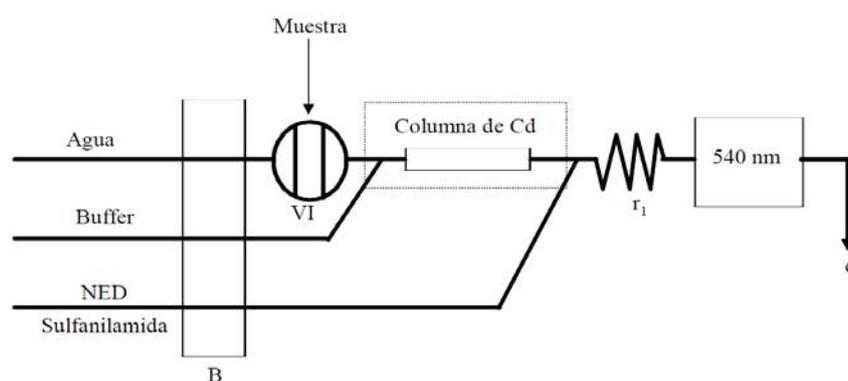


Figura 10. Representación de la configuración utilizada para determinar  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ . V.I., válvula de inyección;  $r_1$ , reactor; d, desecho; B, bomba peristáltica. Tomado de Cabrera *et al.* (2013).

## **2.6 DATOS DE LAS MUESTRAS**

Los datos referentes a las muestras utilizadas durante el desarrollo experimental del método se muestran en el anexo I.

Las muestras utilizadas para la optimización del método fueron salchichas elaboradas por el equipo número 35 del semestre 2016-II en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos. El producto utilizado como sal de curado fue el *SL-003 SAL FABPSA 107* del proveedor Fabpsa®. Cuyas especificaciones asentadas en la hoja de datos técnicos mencionan que el producto puede contener hasta un máximo de 5.5% de nitritos y un 3.5% de nitratos. Por lo tanto se determinó que la concentración de nitritos y nitratos puede ser de hasta 102.52 mg/kg y 65.24 mg/kg añadidos inicialmente al producto, respectivamente.

Por otro lado, para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método de extracción (subtema 3.2.5), se usó como muestra pechuga de pavo de la marca San Rafael®.

## **2.7 PROCEDIMIENTO**

### **2.7.1 PREPARACIÓN DE MUESTRA**

Para la molienda de las salchichas, se tomó una de éstas y se cortó en trozos de aproximadamente 2 cm de largo. Posteriormente se trituró hasta obtener una consistencia pastosa.

En cuanto a la molienda de productos tales como jamón, mortadela y pechuga de pavo, se tomaron cuatro rebanadas delgadas (aproximadamente 50 g) y se cortaron en trozos de aproximadamente 5 x 5 cm. Posteriormente la muestra fue triturada hasta obtener una consistencia granulosa.

## 2.7.2 EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDOS FOCALIZADOS

En un vaso de precipitados de 50 mL se pesó aproximadamente 1 g de muestra molida. La muestra se transfirió del vaso de precipitados de 50 mL a otro de 100 mL, se adicionaron 40 mL de agua destilada y, con la ayuda de una varilla de vidrio, se agitó tratando de romper los grumos de carne formados<sup>(2)</sup>. Se siguió adicionando agua destilada hasta llegar a un volumen aproximado de 60 mL.

El vaso de 100 mL que contenía la carne se colocó en el sonicador BRANSON Digital Sonifier® sumergiendo la sonda hasta aproximadamente 2 cm de distancia de la muestra asentada en el fondo del vaso de precipitados (Figura 11) y se irradió energía variando el tiempo de irradiación y la potencia total del sonicador (amplitud).



Figura 11. Sonda introducida en muestra en disolución

---

<sup>(2)</sup> Al vaso de 50 mL junto con la varilla de vidrio se le realizaron lavados con el fin de evitar pérdidas de analito.

Posteriormente se adicionaron los reactivos de Carrez para clarificar la muestra. El extracto resultante se filtró con papel de filtración rápida después de 10 minutos de realizada la clarificación. El filtrado se llevó a un volumen de 100 mL en un matraz volumétrico.

Por último, para la determinación de nitritos y nitratos en carne por FIA, se hizo uso de la configuración mostrada en la Figura 10.

### 2.7.3 EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO OFICIAL AOAC 973.31 NITRITES IN CURED MEAT (AOAC, 2012) MODIFICADO CON UN PASO DE CLARIFICACIÓN PREVIO AL ANÁLISIS DE MUESTRA

Se pesaron 5 g de muestra molida y se homogenizaron con 40 mL de agua destilada calentada a 80°C. Posteriormente se adicionaron 300 mL de agua destilada a 80°C y se colocó en un baño de vapor durante 2 h. La mezcla fue enfriada, clarificada adicionando 5 mL de cada reactivo de Carrez y filtrada transcurridos 10 minutos después de la clarificación. El extracto resultante se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL y se llevó a la marca de aforo.

Por último se procedió a la determinación de nitritos y nitratos en carne por FIA, usando la configuración de la Figura 10.

Cabe mencionar que antes de realizar el análisis por FIA, todos los reactivos y disoluciones que participan en el análisis (buffer, agua, reactivo para el desarrollo de color y muestra), fueron colocados en un baño de ultrasonido durante 15 min para eliminar la presencia de burbujas.

### 2.7.4 REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

#### 2.7.4.1 Repetibilidad

Se llevaron a cabo once extracciones (en un mismo día de análisis) con ultrasonidos focalizados y posteriormente se midió la concentración de nitritos por FIA. Las extracciones y tratamiento de muestra se realizaron como se describió en los puntos 2.7.1 y 2.7.2.

#### 2.7.4.2 Reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio

Se llevaron a cabo extracciones con ultrasonidos focalizados y posteriormente se midió la concentración de nitritos por FIA. Dichas extracciones se realizaron por duplicado (a su vez cada réplica fue realizada por triplicado) durante siete días. El tratamiento de la muestra y las extracciones se realizaron como se describió en los puntos 2.7.1 y 2.7.2.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

##### 3.1.1 NITRITOS

Se utilizaron estándares de  $\text{NaNO}_2$  cuyas concentraciones fueron desde 0.1 a 10.0 mg/L expresados como  $\text{NO}_2^-$ . En la Figura 12 y Figura 13 se muestra el diagrama y la curva de calibración de los estándares de nitritos, respectivamente. Así mismo, en la Ecuación 1 se muestra la ecuación de la recta obtenida.

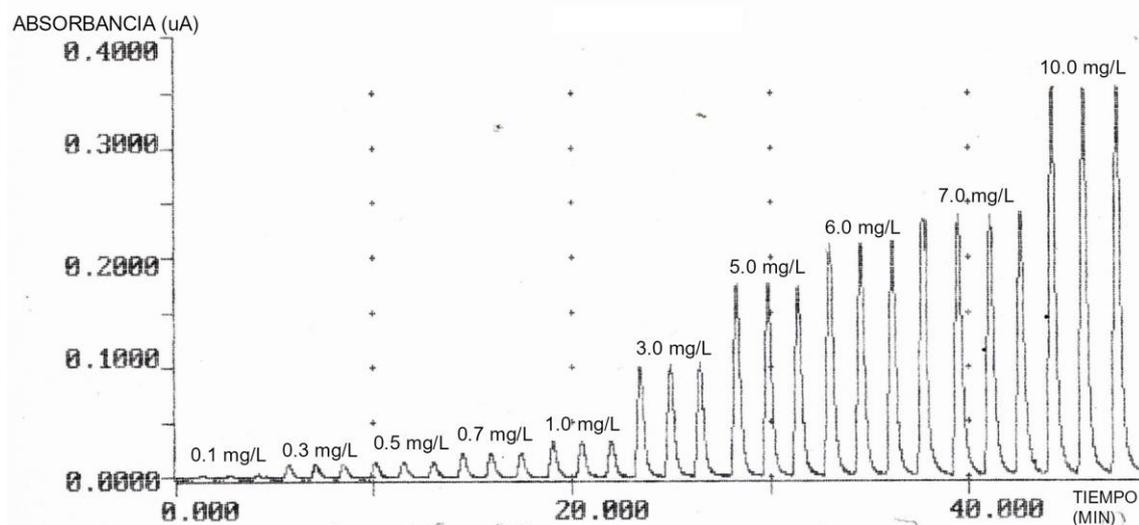


Figura 12. Diagrama correspondiente a la curva de calibración de nitritos

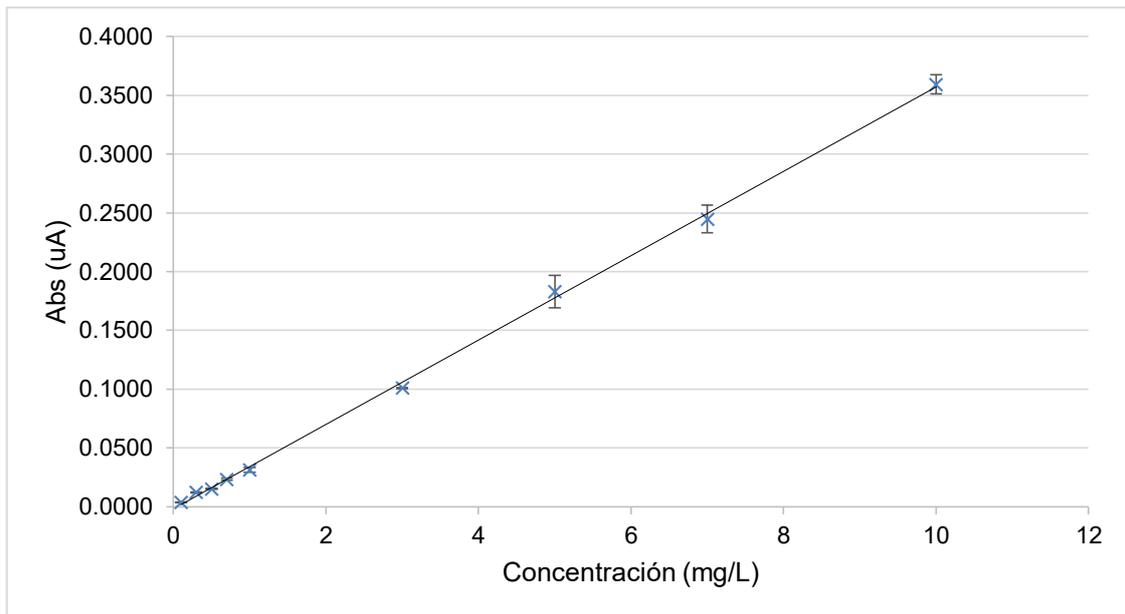


Figura 13. Curva de calibración de nitritos usando la configuración de la Figura 10 sin columna.

$$[\text{NO}_2^-] = \frac{\text{Abs nitritos} + 0.0019}{0.0361} ; R = 0.9996 \quad \text{Ec. 1}$$

### 3.1.1.1 Límite de detección de nitritos

Según la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), el límite de detección (LOD) de un analito se describe como la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito mas no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales en las que se labore.

Con base en la definición anterior, y debido a que el blanco utilizado en la experimentación no presentó señal analítica detectable, se decidió disminuir la concentración de  $\text{NaNO}_2$  hasta encontrar aquella que presentase señal analítica detectable diferente a cero (Figura 14).

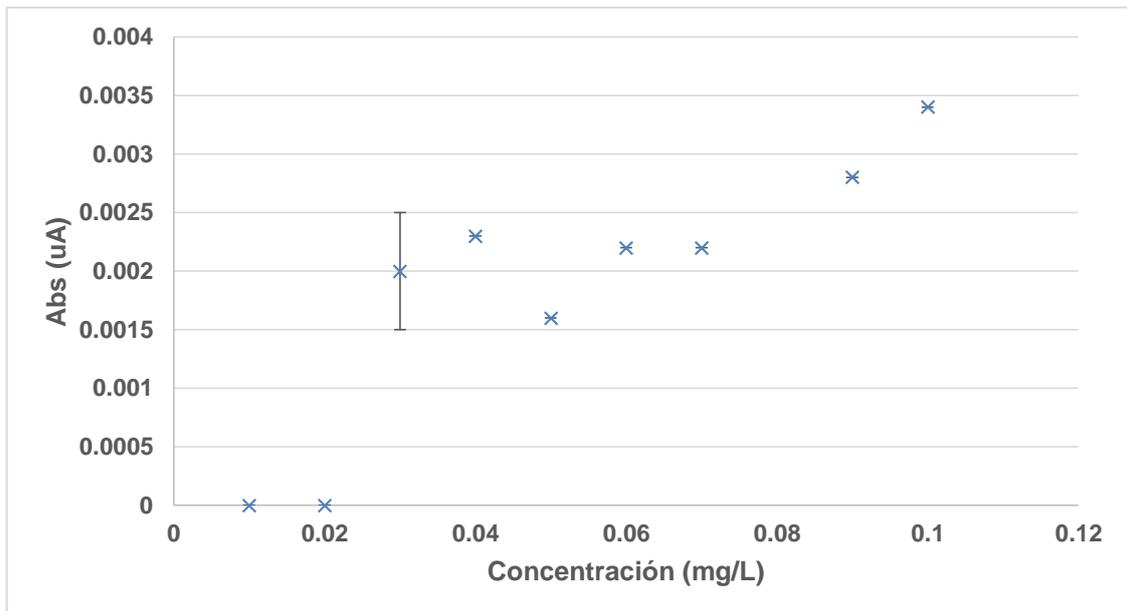


Figura 14. Límite de detección para la determinación de nitritos

Con base en los resultados mostrados en la Figura 14 se determinó que el *límite de detección* para la determinación de nitritos en el método fuese la concentración de 0.03 mg/L  $\text{NaNO}_2$ , ya que a concentraciones menores a ésta no existió señal analítica detectable. Asimismo, en dicha Figura se muestra la desviación estándar del límite de detección, obtenida mediante diez réplicas de la concentración del LOD.

### 3.1.2 NITRATOS

Se utilizaron estándares de  $\text{KNO}_3$  cuyas concentraciones fueron desde 0.1 a 20.0 mg/L expresados como  $\text{NO}_3^-$ . En la Figura 15 y Figura 16 se muestra el diagrama y la curva de calibración de los estándares de nitratos, respectivamente. De igual manera se muestra la ecuación de la recta obtenida (Ecuación 2).

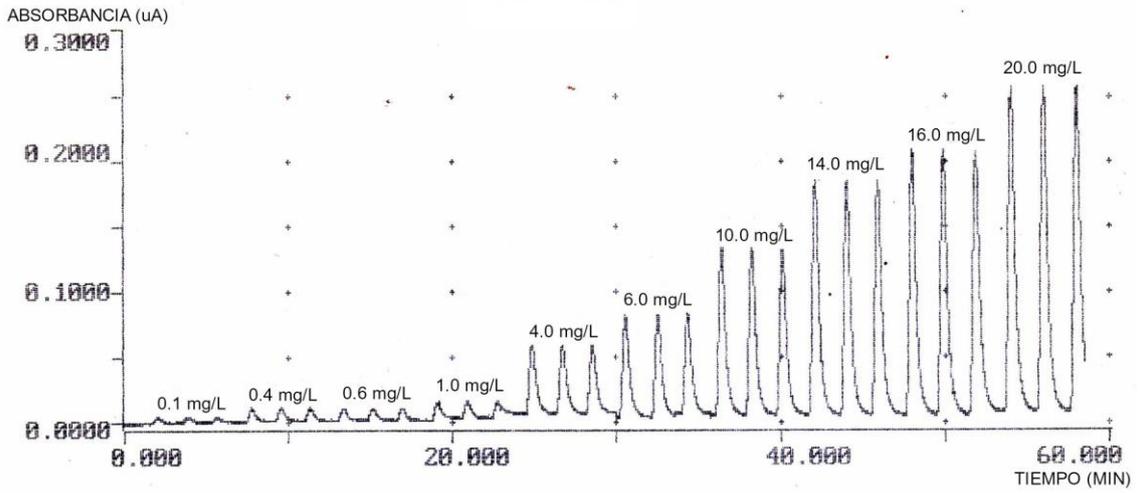


Figura 15. Diagrama correspondiente a la curva de calibración de nitratos

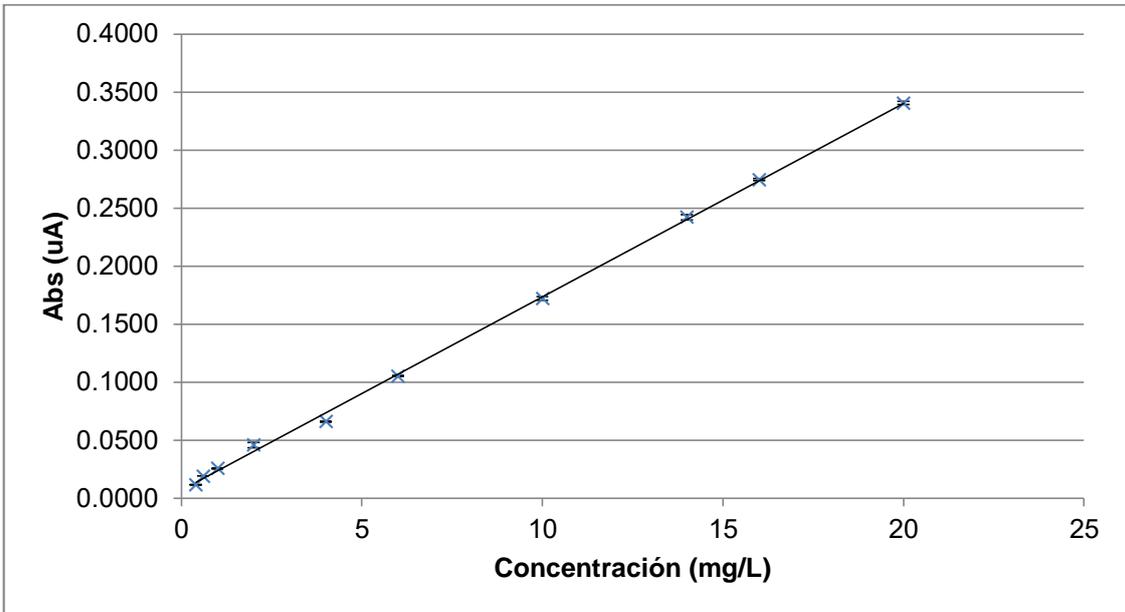


Figura 16. Curva de calibración de nitratos

$$[\text{NO}_3^-] = \frac{\text{Abs nitratos} + 0.0068}{0.0167} ; R = 0.9995$$

Ec. 2

### 3.1.2.1 Nitratos (0.1-0.6 mg/L)

Se realizó una curva de calibración para observar la linealidad de la curva de nitratos a valores menores de 0.6 mg/L ya que, al determinar  $\text{NO}_3^-$  en la primer muestra cárnica analizada, se observó que sus valores de absorbancia no entraban en la linealidad de la curva de calibración de nitratos (Figura 16). Las concentraciones de estándares para esta curva fueron de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/L (Figura 17).

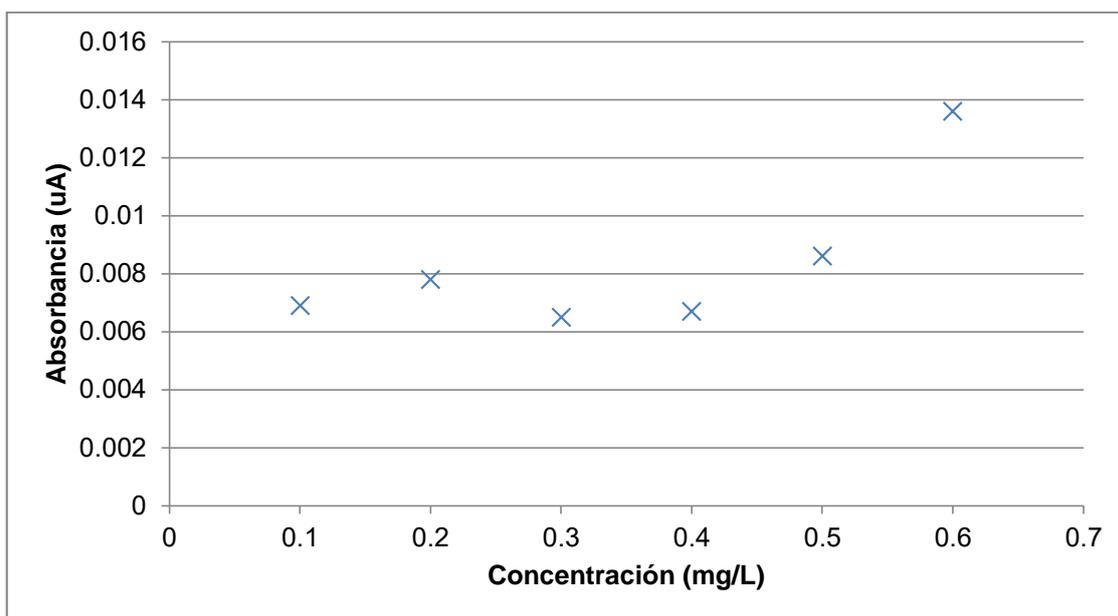


Figura 17. Curva de calibración de nitratos menores a 0.6 mg/L

Con base en los resultados representados en la Figura 16 se determinó que no es viable la cuantificación de nitratos a concentraciones menores a 0.6 mg/L; sin embargo no se debe malinterpretar con que no hay nitratos presentes en la muestra sino que las cantidades existentes no pueden ser cuantificados con este método. Por lo cual, en cuanto a nitratos, las muestras en las que se detecte una señal analítica diferente del blanco que no pueda ser cuantificable, se declarará que se tienen menos de 0.6 mg/L, es decir, aproximadamente menos de 60 mg/kg de  $\text{NO}_3^-$  en carne.

### 3.1.3 CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS CON LA COLUMNA DE CADMIO CUPERIZADO

Inicialmente se había propuesto que la absorbancia para la cuantificación de nitratos en productos cárnicos se obtuviera mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}(\text{NO}_3^-) = \text{Abs}(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-) - \text{Abs}(\text{NO}_2^-) \quad \text{Ec. 3}$$

Posteriormente, haciendo uso de la ecuación de la recta obtenida por la curva de calibración de nitratos (Ecuación 2), se calculase la concentración de nitratos en la muestra. Sin embargo se observó que la dispersión generada por la columna empacada, afectaba la determinación de nitratos; por esta razón se realizó una curva de calibración de  $\text{NaNO}_2$  con la columna empacada acoplada a la configuración FIA para de esta forma considerar la dispersión de nitritos y nitratos al pasar por la columna. En la Figura 18 y Figura 19 se muestran el fiagrama y la curva de calibración de los nitritos en las condiciones de análisis mencionadas. Aunado a lo anterior, se muestra la ecuación de la recta obtenida (Ecuación 4).

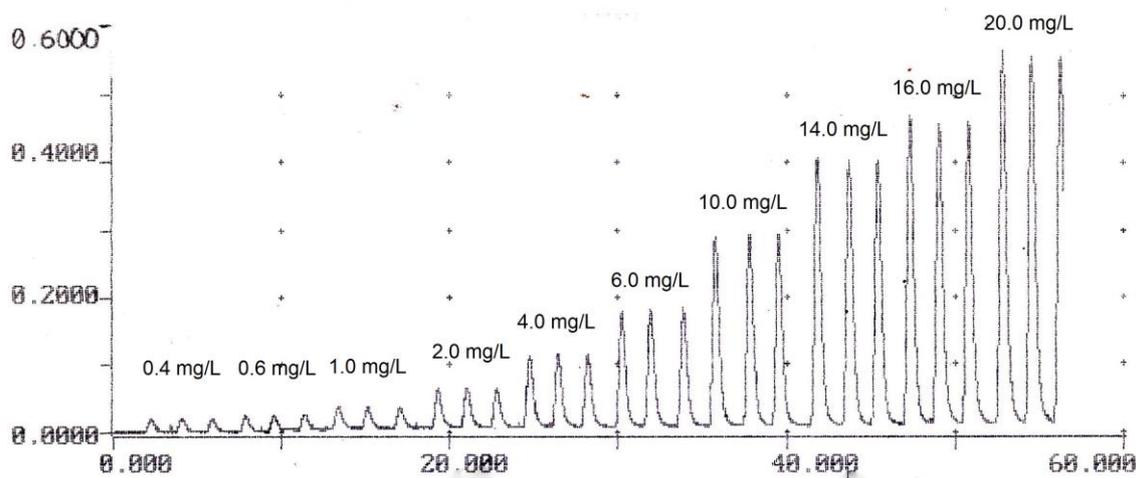


Figura 18. Fiagrama correspondiente a la curva de calibración de nitritos cuando pasan por la columna de cadmio cuperizado

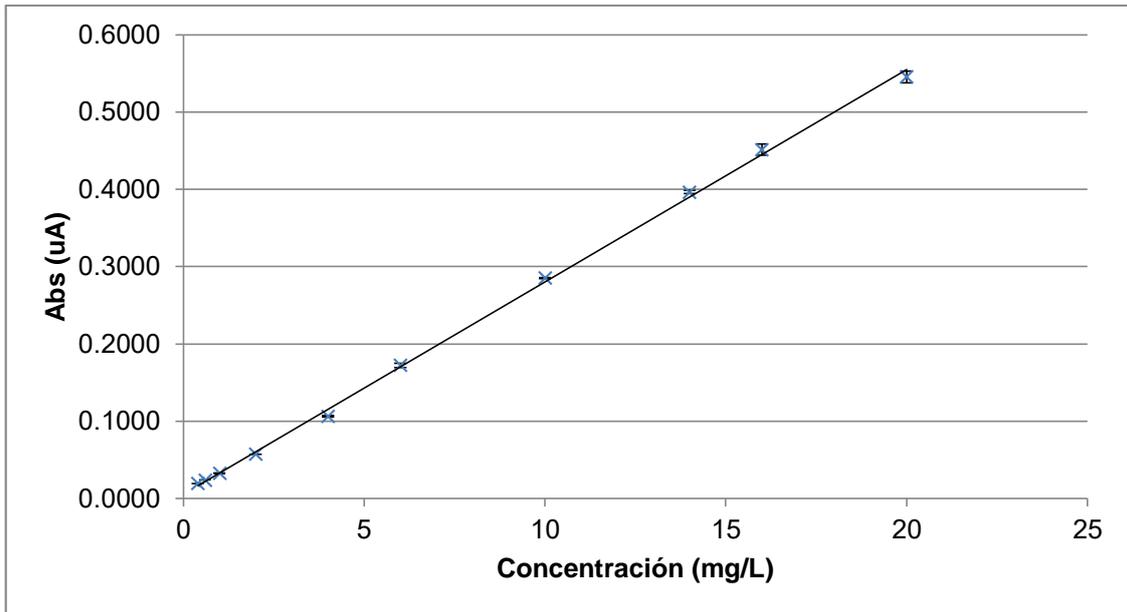


Figura 19. Curva de calibración de nitritos cuando los estándares pasan por la columna de cadmio cuperizado

$$[\text{NO}_2^-] = \frac{\text{Abs nitritos} - 0.0058}{0.0275} ; R = 0.9995 \quad \text{Ec. 4}$$

Para realizar el cálculo de nitratos en carne, se siguió el procedimiento descrito a continuación:

1. Calcular la concentración de NITRITOS haciendo uso de la ecuación de la recta obtenida por la curva de calibración de  $\text{NO}_2^-$  (Ecuación 1).
2. Sustituir la concentración de nitritos, obtenida con anterioridad, en la curva de calibración de NITRITOS CON COLUMNA (Ecuación 4) para obtener la absorbancia *ajustada* de  $\text{NO}_2^-$ , es decir, la absorbancia de nitritos tomando en cuenta la dispersión que la inyección tiene al pasar por la columna de cadmio cuperizado.

$$\text{Abs}_{\text{ajustada nitritos}} = 0.0275 * [\text{NO}_2^-] + 0.0058 \quad \text{Ec. 5}$$

3. Debido a que al determinar nitratos en carne no solamente se cuantifican éstos sino que también se cuantifican los nitritos sin reducir, a la absorbancia obtenida en la determinación de nitratos en carne ( $Abs\ NO_2^- + NO_3^-$ ) restarle la absorbancia *ajustada* de  $NO_2^-$  para obtener la absorbancia de NITRATOS.

$$Abs_{\text{nitratos}} = Abs(NO_2^- + NO_3^-) - Abs_{\text{ajustada nitritos}} \quad \text{Ec. 6}$$

4. Calcular la concentración de  $NO_3^-$  en la muestra mediante la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración de NITRATOS (Ecuación 2).

A continuación se muestra un ejemplo de cálculo para ilustrar la problemática mencionada anteriormente. En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$  utilizados, así como las absorbancias obtenidas. El estándar de  $NO_2^-$  se determinó sin hacer uso de la columna de cadmio mientras que, tanto el estándar de  $NO_3^-$  como el de  $NO_2^- + NO_3^-$ , fueron determinados haciendo uso de la columna empacada.

Tabla 5. Concentraciones de referencia para el cálculo de nitratos

Estándar	Concentración teórica (mg/L)	Absorbancia (Ua)
$NO_2^-$	2	0.0655
$NO_3^-$	2	0.0357
$NO_2^- + NO_3^-$	2 + 2	0.0902

De la Ecuación 1 se tiene:

$$[NO_2^-] = \frac{0.0655 + 0.0019}{0.0361} = 1.87 \text{ mg/L}$$

Sustituyendo en la Ecuación 5 y posteriormente en la Ecuación 6:

$$Abs_{\text{ajustada nitritos}} = 0.0275 * [1.8670] + 0.0058 = 0.0571$$

$$\text{Abs}_{\text{nitros}} = 0.0902 - 0.0571 = 0.0331$$

Finalmente al calcular la concentración de  $\text{NO}_3^-$  usando la Ecuación 2 se tiene:

$$[\text{NO}_3^-] = \frac{0.0331 + 0.0068}{0.0167} = 1.57 \text{ mg/L}$$

Por otro lado, si no se tomase en cuenta la dispersión generada por la columna, el cálculo sería el siguiente.

Partiendo de la Ecuación 3 se tiene:

$$\text{Abs}(\text{NO}_3^-) = 0.0902 - 0.0655 = 0.0247$$

Sustituyendo en la Ecuación 2:

$$[\text{NO}_3^-] = \frac{0.0247 + 0.0068}{0.0167} = 1.07 \text{ mg/L}$$

Adicionalmente en la tabla se muestra la absorbancia de nitratos usada como referencia para el cálculo anterior. Así pues la concentración del estándar de nitratos es:

$$[\text{NO}_3^-] = \frac{0.0357 + 0.0068}{0.0167} = 1.73 \text{ mg/L}$$

Para determinar las variaciones entre las formas de cálculo para la concentración de nitratos en carne, se calculó el porcentaje de error de las concentraciones experimentales con respecto a la concentración del estándar.

$$\frac{1.73 - 1.57}{1.73} \times 100 = 9.25\% \text{ error.}$$

$$\frac{1.73 - 1.07}{1.73} \times 100 = 38.15\% \text{ error.}$$

De esta forma se observa un mayor porcentaje de error si el cálculo se realizase sin tomar en cuenta la dispersión generada por la columna (38.15% error) que tomando en cuenta ésta (9.25% error).

## 3.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

### 3.2.1 CLARIFICACIÓN DEL EXTRACTO

Como se mencionó con anterioridad, para la extracción y cuantificación de nitratos y nitritos en productos cárnicos, fue necesario un paso de clarificación ya que se observó turbidez en los extractos ya filtrados. Por dicha razón se realizó una precipitación de proteínas para poder clarificar el extracto utilizando el reactivo de bórax y el reactivo de Carrez II pues, tomando como referencia el trabajo de Rincón *et al.* (2003); estos reactivos son útiles para clarificar el extracto y eliminar las interferencias (producidas por la turbidez) que puedan afectar el análisis. Sin embargo, aún con el uso de estos reactivos, la muestra siguió presentando turbidez (Figura 20). El extracto fue obtenido mediante la aplicación de ultrasonidos focalizados cuyas condiciones de extracción fueron: amplitud 66% (264 W), tiempo 30 segundos, ciclos de irradiación/no irradiación cada 5 segundos<sup>(3)</sup>.

El volumen de cada reactivo fue proporcional al usado por Rincón *et al.* (2003); en donde, para la clarificación de 10 g de muestra se utilizaron 10 mL de reactivo bórax y para la clarificación de 10 g y 20 g de muestra se utilizaron 5 mL de reactivo de Carrez II.



Figura 20. De izquierda a derecha: 9B, 9C, 6B, 6C. Muestras adicionadas con reactivo de bórax (6B, 9B) y con reactivo de Carrez II (6C, 9C)<sup>(4)</sup>.

<sup>(3)</sup> La irradiación era continua durante 5 segundos seguida por 5 segundos sin aplicar energía hasta completar 30 segundos de energía irradiada; es decir, debido a que el equipo sólo considera la energía *irradiada*, el tiempo total del experimento fue de 60 segundos.

<sup>(4)</sup> Se utilizó 1 g de muestra molida para cada determinación. 6B: 1 mL de reactivo de bórax; 9B: 2 mL de reactivo de bórax; 6C: 1 mL de reactivo de Carrez II; 9C: 0.5 mL de reactivo de Carrez II.

Con base en los experimentos anteriores, se decidió utilizar ambos reactivos de Carrez para la precipitación de proteínas y clarificación de los extractos (Figura 21). El volumen de cada reactivo de Carrez utilizado fue proporcional a la cantidad de muestra analizada, es decir, para clarificar el extracto de una muestra molida de 5 g se utilizaron 5 mL de cada reactivo de Carrez.



Figura 21. Clarificación de extractos usando los reactivos de Carrez

#### 3.2.1.1 Efecto del reactivo de Carrez en la determinación de nitritos

Para determinar si el reactivo de Carrez afectaba la cuantificación de nitritos debido a la adsorción de éstos en las proteínas precipitadas (Rincón *et al*, 2003), se realizaron experimentos adicionando un estándar de concentración conocida ( $1.11 \text{ mg/L NO}_2^-$ ) a una muestra de salchicha (elaborada en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos), antes de la extracción y clarificación de la muestra.

Las condiciones de extracción con ultrasonidos focalizados fueron: amplitud 66% (264 W), tiempo 30 s, ciclos de irradiación/no-irradiación 5 s cada uno. Cada determinación se realizó por triplicado (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del reactivo de Carrez en la determinación de nitritos en carne

Muestra sin adición de estándar (mg/L)	Muestra con adición de estándar (mg/L)	Recuperación (%)
0.63 ± 0.01	1.62 ± 0.05	89.49 ± 4.44

El porcentaje de recuperación se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Muestra con estándar (mg/L)} - \text{Muestra sin estándar (mg/L)}}{\text{Estándar (mg/L)}} \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

Con base en los resultados del experimento realizado, se observa que el valor del porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo de aceptación (80-110%) establecido por la CCAYAC-CR-03/0 (2014), es decir, el recobro es *acceptable*.

### 3.2.2 COMPARACIÓN ENTRE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO ULTRASONIDOS FOCALIZADOS Y EL MÉTODO OFICIAL AOAC 973.31

Se realizaron experimentos para comparar si la cuantificación de nitritos y nitratos, realizada por el método de extracción utilizando ultrasonidos focalizados, difería del procedimiento establecido en el método oficial AOAC 973.31 *Nitrites in cured meat*. Las condiciones utilizadas en la aplicación de ultrasonidos focalizados fueron: amplitud del 66% (264 W), ciclos de irradiación/no-irradiación 5 segundos cada uno hasta completar 60 segundos. Las extracciones fueron realizadas por triplicado en cada método de extracción (Tabla 7).

Tabla 7. Cuantificación de nitritos y nitratos en extractos clarificados

Método de extracción	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] en salchicha (mg/kg)	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] en salchicha (mg/kg)
Ultrasonidos focalizados	65.82 ± 3.29	<60
Método Oficial AOAC 973.31	66.86 ± 3.93	<60

Se realizó una prueba estadística t-student para observar si las medias obtenidas experimentalmente diferían entre sí, es decir, si existía diferencia significativa entre los métodos de extracción. Partiendo del supuesto de que las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, se calculó una estimación conjunta de la desviación estándar a partir de las dos desviaciones estándar individuales (Miller y Miller, 2002). Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde  $s$  se obtiene de:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Ec. 9}$$

y  $t$  tiene  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad

Así, sustituyendo los valores obtenidos en las ecuaciones 8 y 9, se tiene:

$$s^2 = \frac{(2)(3.29)^2 + (1)(3.93)^2}{(3)} = 13.16$$

$$s = \sqrt{13.16} = 3.63$$

$$t = \frac{66.86 - 65.82}{(3.63) \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = 0.35$$

Con base en los resultados obtenidos se determinó que no existía diferencia significativa a un nivel de 95% de confianza entre los métodos ya que el valor  $t$  de tablas fue de 2.78, el cual es mayor que el obtenido experimentalmente.

### 3.2.2.1 Evaluación de la temperatura en la extracción de nitritos utilizando ultrasonidos focalizados

Se realizó un experimento haciendo uso de ultrasonidos focalizados como método de extracción, utilizando agua destilada a temperatura ambiente y agua calentada a 80°C con el fin de determinar si la temperatura del agua mejoraba la extracción de nitritos en carne, esto debido a que en el método oficial por lote se lleva a cabo la extracción de nitritos con agua destilada calentada a 80°C. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Cada determinación fue realizada por triplicado.

Tabla 8. Efecto de la temperatura en la extracción de nitritos

Temperatura	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] salchicha (mg/kg)
Ambiente (20-23 °C)	59.14 ± 5.58
80 °C	59.22 ± 2.68

Mediante la prueba estadística t-student, se determinó que no existía diferencia significativa entre la temperatura utilizada para la extracción de nitritos en carne.

### 3.2.2.2 Evaluación del tiempo de agitación en la extracción de nitritos sin el uso de ultrasonidos focalizados<sup>(5)</sup>

Se evaluó el efecto que el tiempo de agitación pudiese tener en la extracción del analito de interés, esto debido a que en el método oficial la extracción debe realizarse durante un tiempo de 2 h.

---

<sup>(5)</sup> El uso de ultrasonidos focalizados fue omitido debido a que el interés de este experimento radicaba en conocer si el tiempo de agitación de la muestra influía en la extracción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Se realizaron experimentos manteniendo la muestra en agitación constante durante 30, 60, 90 y 120 minutos en agua a temperatura ambiente. Para ello se tomó aproximadamente 1 g de muestra molida y se le adicionó 60 mL de agua destilada a temperatura ambiente, posteriormente la muestra se colocó en una parrilla de agitación y se mantuvo en agitación hasta cumplir con los tiempos establecidos (Tabla 9). Cada determinación fue realizada por triplicado.

Tabla 9. Efecto del tiempo de agitación en la extracción de nitritos

Tiempo (min)	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] salchicha (mg/kg)
30	54.40 ± 0.85
60	58.67 ± 7.77
90	60.03 ± 4.95
120	58.48 ± 1.80

Para poder determinar si existía diferencia significativa entre los tiempos de agitación para la extracción de nitritos, se hizo uso de la prueba estadística *t*-student. En primer lugar fue necesario calcular el contraste *F* para la comparación de desviaciones estándar (Miller y Miller, 2002) y así conocer la ecuación idónea a aplicar para el cálculo del valor estadístico *t*. Para el cálculo del contraste *F* se usó la siguiente ecuación:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Ec. 10}$$

donde 1 y 2 se disponen en la ecuación de modo que *F* sea siempre  $\geq 1$ .

El número de grados de libertad del numerador y denominador son  $n_1 - 1$  y  $n_2 - 2$ , respectivamente. Éstos son utilizados para conocer el valor *F* de tablas.

A continuación se muestra un ejemplo de los cálculos realizados para la determinación del valor *F* y el posterior cálculo del estadístico *t*.

Los tratamientos experimentales a comparar fueron los tiempos de agitación de 30 minutos y 60 minutos. Al haber realizado cada determinación por triplicado el valor  $F$  de tablas fue  $F_{2/2} = 39.00$  ( $P=0.05$ ).

$$F = \frac{7.77^2}{0.85^2} = 84.40$$

Al ser mayor el valor  $F$  experimental que el obtenido en tablas, se concluyó que las varianzas son significativamente diferentes, por lo tanto el cálculo de la prueba t-student fue diferente al mostrado en las ecuaciones 8 y 9. La siguiente ecuación se obtuvo de Miller y Miller, 2002.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Ec. 11}$$

$$G. L. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)} \quad \text{Ec. 12}$$

Redondeándose el valor obtenido a un número entero.

Sustituyendo en las ecuaciones 11 y 12 se tiene:

$$t = \frac{58.67 - 54.40}{\sqrt{\frac{7.77^2}{3} + \frac{0.85^2}{3}}} = 0.95$$

$$G. L. = \frac{\left(\frac{7.77^2}{3} + \frac{0.85^2}{3}\right)^2}{\left(\frac{7.77^4}{3^2(3-1)} + \frac{0.85^4}{3^2(3-1)}\right)} = 2.05 \approx 2 \text{ grados de libertad}$$

El valor  $t$  de tablas fue de 4.30 ( $P = 0.05$ ), el cual es mayor que el obtenido experimentalmente por lo cual se determinó que no existe suficiente evidencia para asegurar que el efecto del tiempo de agitación sea significativamente diferente entre los tratamientos de 30 y 60 minutos para la extracción de nitritos en carne. De la misma forma fueron realizados los cálculos para observar si existía diferencia significativa entre los demás tiempos de agitación evaluados.

Con base en los resultados obtenidos al realizar el estadístico  $t$ , se determinó que no existía diferencia significativa entre los tiempos de agitación de la muestra para la extracción de nitritos.

### 3.2.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS CON EXTRACTOS CLARIFICADOS

A pesar de que con las condiciones anteriores la respuesta se consideraba aceptable ya que se asimilaba a la extracción obtenida por el Método Oficial AOAC 973.31; se realizó un diseño de experimentos con el objetivo de optimizar el método de extracción.

El número de experimentos y condiciones de los mismos, se obtuvieron haciendo uso del programa STATGRAPHICS Centurion XV. Versión 15.2.06. En dicho programa se variaron las condiciones de amplitud (20% - 70%) y tiempo de irradiación (20 – 30 s) para la extracción de nitritos en carne. Aunado a esto, se decidió que el tiempo propuesto se completara mediante el uso de ciclos de irradiación/no irradiación (5 segundos respectivamente) a la muestra con el fin de evitar el sobrecalentamiento de la sonda.

La absorbancia fue medida por triplicado para cada tratamiento y con el promedio de éstas se calculó la concentración de nitritos. Así mismo, la desviación estándar corresponde al valor, en concentración, obtenido por cada absorbancia (Tabla 10).

Tabla 10. Cuantificación de nitritos a diferentes condiciones de amplitud y tiempo de irradiación mediante el uso de ultrasonidos focalizados

Tratamiento	Tiempo (s)	Amplitud (%)	Salchicha (g)	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>salchicha</sub> (mg/kg)
1	20	60	1.0068	59.11 ± 1.53
2	32	45	1.0057	70.52 ± 0.27
3	25	45	1.0027	60.44 ± 0.63
4	30	30	1.0144	61.61 ± 0.82
5	18	45	1.0056	68.64 ± 1.35
6	30	61	1.0195	62.37 ± 1.08
7	25	24	1.0079	61.47 ± 1.48
8	20	30	1.0150	55.95 ± 0.94
9	25	66	1.0028	55.55 ± 0.41
10	25	45	1.0231	59.50 ± 0.77
11	25	45	1.0112	60.20 ± 0.62

Haciendo uso del programa STATGRAPHICS Centurion XV. Versión 15.2.06, se obtuvo el análisis de varianza mostrado en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño de experimentos

Parámetros	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor <i>F</i>	Valor <i>P</i>
A: Amplitud	2.4855	1	2.4855	0.21	0.6688
B: Tiempo	17.1938	1	17.1938	1.43	0.2860
AA	18.9103	1	18.9103	1.57	0.2658
AB	1.4364	1	1.4364	0.12	0.7440
BB	76.4459	1	76.4459	6.34	0.0533
Error total	60.2841	5	12.0568		
Total	210.27	10			

Con base en el ANOVA se determinó que no existía diferencia significativa entre las condiciones utilizadas ya que valores de porcentaje (*P-Value*) mayores a 0.05 no son significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto, para la determinación de nitritos en alimentos es posible usar cualquiera de las condiciones de ultrasonido propuestas en el diseño de experimentos ya que no son significativamente diferentes entre sí.

Con base en los resultados del diseño de experimentos, se decidió utilizar las condiciones que permitieran un menor tiempo de extracción: amplitud 45% (180 W) y tiempo de 18 segundos de irradiación con ciclos de irradiación-no irradiación cada 5 segundos, es decir, el tiempo total del experimento será de 33 segundos.

### 3.2.4 REPETIBILIDAD DE LA EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDOS FOCALIZADOS

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la repetibilidad del método de extracción haciendo uso de ultrasonidos focalizados. Así mismo en la Figura 22 se muestra el diagrama obtenido.

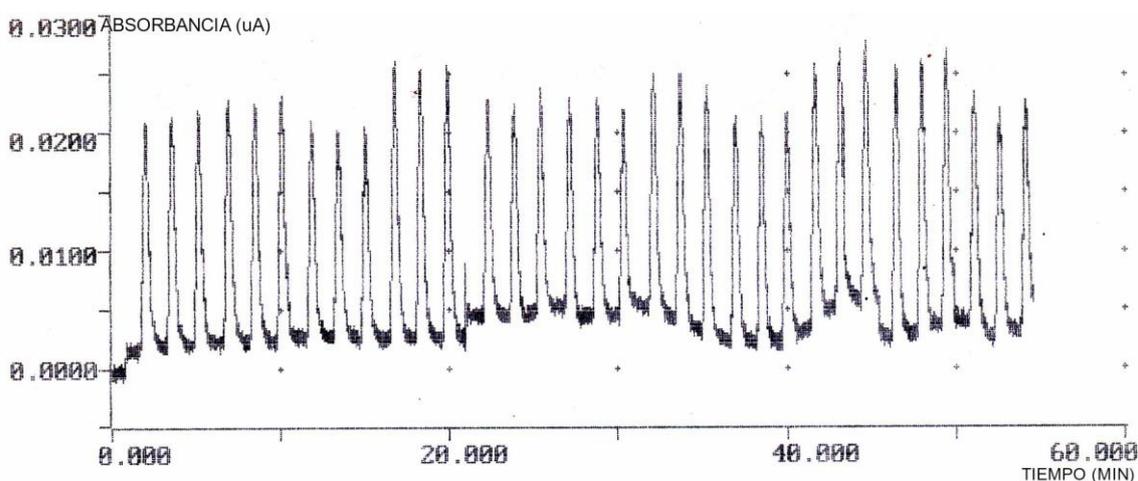


Figura 22. Diagrama correspondiente a la repetibilidad del método

Tabla 12. Repetibilidad del método

Réplica	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] salchicha (mg/kg)
1	56.27
2	62.62
3	59.58
4	66.91
5	69.51
6	58.81
7	59.24
8	62.08
9	55.03
10	68.76
11	56.25
Media	61.37
Desviación estándar	5.10
Coefficiente de Variación (%)	8.32

El coeficiente de variación obtenido (<10%) indica que la repetibilidad del método es *aceptable* (CCAYAC-CR-03/0, 2014).

### 3.2.5 REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD INTRALABORATORIO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NITRITOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS CON ULTRASONIDOS FOCALIZADOS

Los resultados de la repetibilidad y reproducibilidad de la extracción, en la muestra de pechuga de pavo, se muestran en la Tabla 13. A manera de ejemplo se muestran algunos de los diagramas obtenidos (Figura 23 y Figura 24).

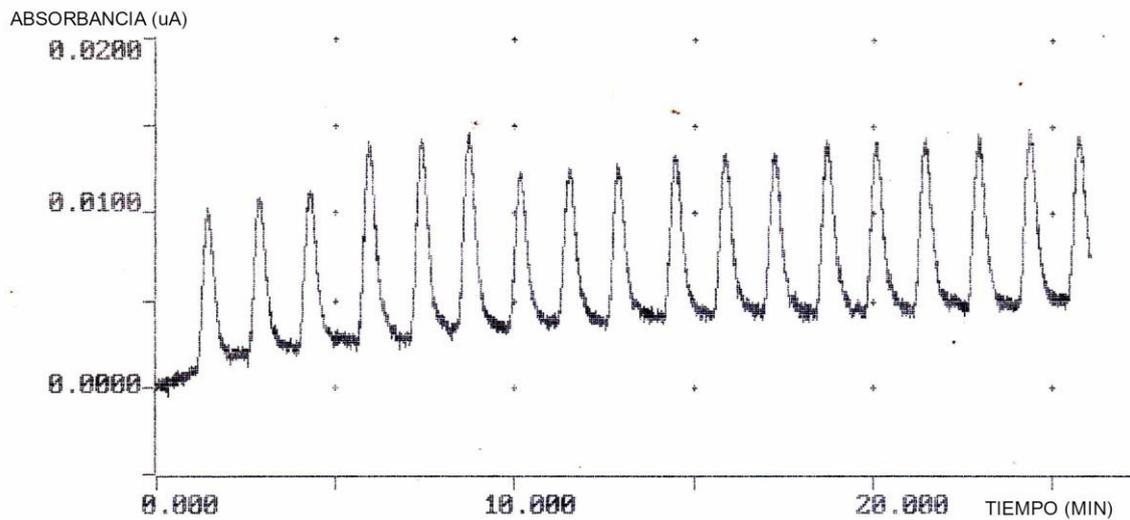


Figura 23. Diagrama correspondiente al día 4 de reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio.

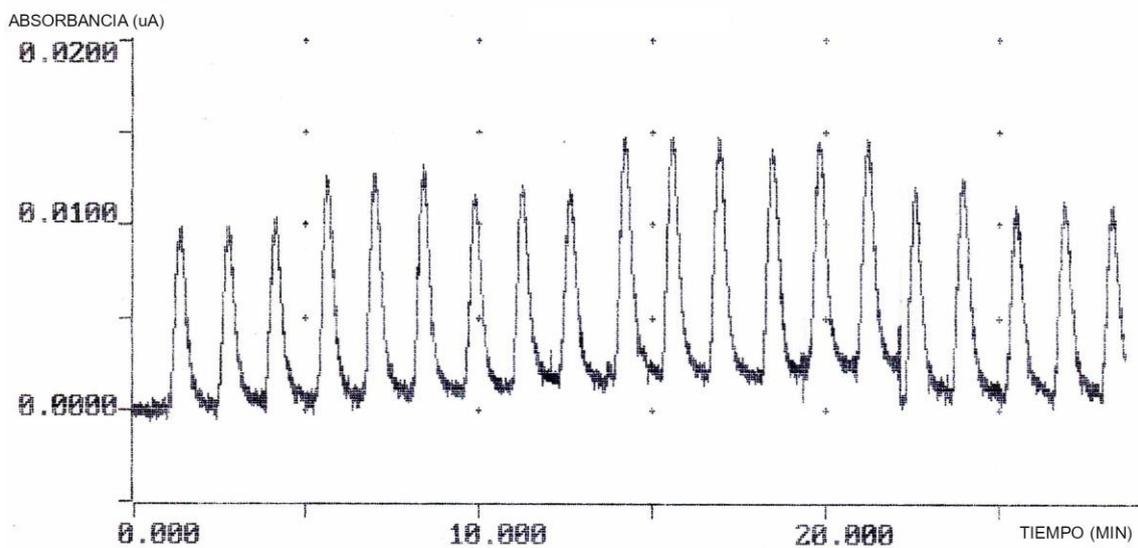


Figura 24. Diagrama correspondiente al día 5 de reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio

Tabla 13. Reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio

Día	Réplica 1 [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (mg/kg)	Réplica 2 [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (mg/kg)
1	35.41	39.56
2	37.80	34.87
3	33.91	33.03
4	32.74	32.51
5	35.86	38.23
6	34.92	40.27
7	32.81	40.27
Promedio general	35.89	

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad, se realizó un análisis de varianza de un factor en el cual el factor variante fueron los días de análisis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. ANOVA para determinar la reproducibilidad y repetibilidad del método

Origen de variaciones	Suma cuadrados	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	Valor crítico F
Entre días	48.1533	6	8.0255	0.9359	0.5241	3.8659
Dentro de los días	60.0255	7	8.5750			
Total	108.1788	13				

G.L.: Grados de libertad; C.M.: Media de los cuadrados

Como se muestra en el ANOVA, el valor *F* obtenido es menor que el *Valor de F crítica*, por lo tanto no existe suficiente evidencia para asegurar que hay diferencia significativa entre los días de análisis.

Posteriormente se calculó el coeficiente de variación de la repetibilidad haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$S_r = \sqrt{CM_{\text{dentro de los días}}} \quad \text{Ec. 13}$$

$$CV_{\text{repetibilidad}} (\%) = \frac{S_r}{\bar{X}_{\text{general}}} \times 100 \quad \text{Ec. 14}$$

Para la determinación del coeficiente de variación de la reproducibilidad intralaboratorio el cálculo fue el siguiente:

$$S^2_{\text{entre días}} = \frac{CM_{\text{entre días}} - CM_{\text{dentro de los días}}}{n_j} \quad \text{Ec. 15}$$

En donde  $n_j$  es el número de réplicas realizados por día.

$$S^2_{WR} = S^2_r + S^2_{\text{entre días}} \quad \text{Ec. 16}$$

$$CV_{\text{reproducibilidad}} (\%) = \frac{S_{wr}}{\bar{X}_{\text{general}}} \times 100 \quad \text{Ec. 17}$$

Los coeficientes de variación de la repetibilidad y reproducibilidad fueron 8.16% y 8.03% respectivamente. Valores que están dentro de los límites establecidos por la CCAYAC para ser considerados *acceptables*.

### 3.2.6 EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS CONTINUOS

Por último, para reducir aún más el tiempo de extracción por ultrasonidos, se aplicaron condiciones de ultrasonido continuos, es decir, sin utilizar ciclos de no irradiación (Tabla 15). Los tiempos propuestos tuvieron como finalidad evitar el sobrecalentamiento que la sonda pudiese tener y como consecuencia afectase el equipo, además de analizar un mayor número de muestras. Cada determinación fue realizada por triplicado.

Tabla 15. Efecto de las condiciones continuas de ultrasonido en la extracción de nitritos en carne

Tiempo (s)	Amplitud (%)	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] salchicha (mg/kg)
5	45 (180 W)	56.71 ± 2.78
10	45 (180 W)	60.78 ± 0.33
15	45 (180 W)	65.13 ± 2.12

Con la prueba estadística t-student se observó que no existió diferencia significativa entre tiempos de extracción de 5 y 10 segundos ni en tiempos de extracción de 10 y 15 segundos, sin embargo sí existió diferencia significativa entre los tiempos de extracción de 5 y 15 segundos. Por lo tanto, para lograr una mayor extracción de nitritos en carne, se decidió utilizar 15 s de irradiación continua sobre la muestra.

Así pues, para el uso de ultrasonidos focalizados como método de extracción y con base en los resultados obtenidos, las condiciones de extracción elegidas fueron 15 segundos de irradiación continua a una amplitud del 45% (180 W), utilizando agua destilada a temperatura ambiente.

### **3.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS**

#### **3.3.1 DETERMINACIÓN DE $\text{NO}_2^-$ Y $\text{NO}_3^-$ EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

Se realizó la extracción y cuantificación de nitritos y nitratos de los siguientes productos cárnicos: Salchichas Alys<sup>®</sup>, Pechuga de Pavo San Rafael<sup>®</sup>, Salchichas Duby<sup>®</sup>, Jamón Virginia Zwan<sup>®</sup>, Mortadela Natural Kir<sup>®</sup> y Salchichas Fud<sup>®</sup> (Tabla 16). Cada determinación fue realizada por triplicado.

A manera de ejemplo se muestran los diagramas de las salchichas Alys<sup>®</sup> (Figura 25) y las salchichas FUD<sup>®</sup> (Figura 26) como comparativo al ser las de menor y mayor contenido de nitritos, respectivamente.

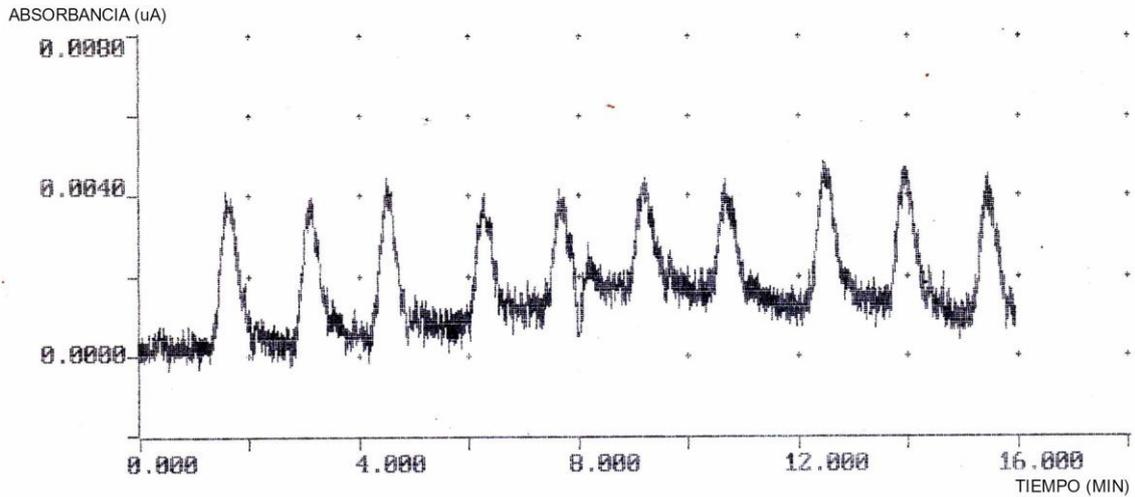


Figura 25. Diagrama correspondiente al análisis de nitritos en salchichas Alys®

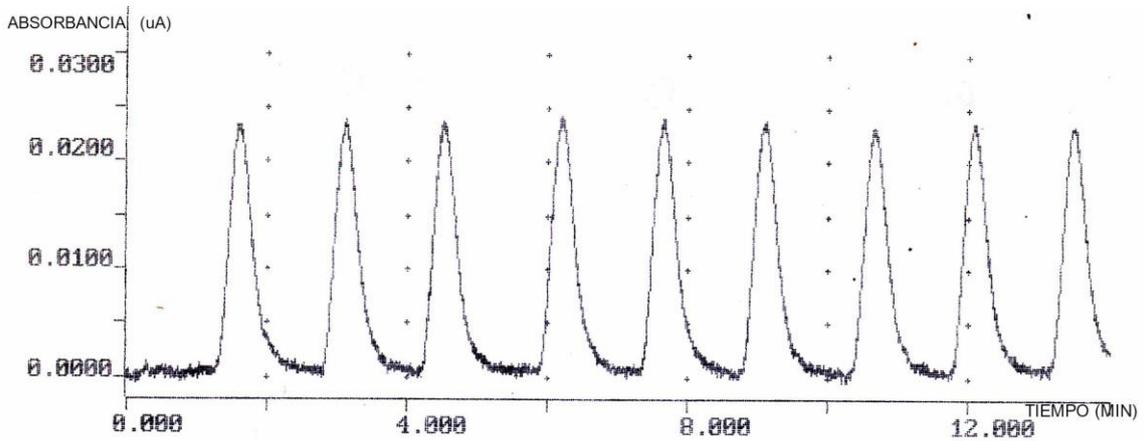


Figura 26. Diagrama correspondiente al análisis de nitritos en salchichas FUD®

Tabla 16. Cuantificación de nitritos y nitratos en productos cárnicos

Producto	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (mg/kg)	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mg/kg)
Salchichas Alys®	15.75 ± 1.13	<60
Pechuga de Pavo San Rafael®	45.83 ± 1.92	<60
Salchichas Duby®	18.72 ± 0.42	<60
Jamón Virginia Zwan®	41.62 ± 1.79	<60
Mortadela Natural Kir®	48.82 ± 3.12	<60
Salchichas Fud®	70.75 ± 0.90	<60

La cantidad de nitritos cuantificados no rebasan los límites establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, la cual menciona que se permiten hasta 156 mg/kg de nitritos o nitratos en productos cárnicos cocidos, curados crudos o curados madurados, sin embargo la norma no marca como tal un límite máximo de nitritos *residuales*. Por dicha razón se decidió comparar estos resultados con las normas internacionales CODEX STAN 192-1995 y DIRECTIVA 2006/52/CE.

Al comparar los valores obtenidos experimentalmente con los reportados en las normas internacionales<sup>(6)</sup>, se llegó a la conclusión que ningún producto comercial rebasa dichos límites, sin embargo es importante realizar la determinación de nitritos y nitratos en carne lo más rápido posible, ya que las concentraciones de estos aditivos varían dependiendo de diversos factores, por ejemplo, durante el procesamiento del producto, consumo o incluso durante el almacenamiento del producto cárnico curado (Cassens 1979; Cassens, 1997; y EFSA, 2003 citados en Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero, 2008).

### 3.3.2 RECOBROS DE NITRITOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Para evaluar la exactitud del método, se realizaron experimentos adicionando estándares de concentración conocida a los productos cárnicos con la finalidad de determinar la cantidad de analito recuperado (Tabla 17). Cada determinación se realizó por triplicado.

---

<sup>(6)</sup> 100 mg/kg según DIRECTIVA 2006/52/CE ya que se determinó que los productos analizados eran similares al jamón curado y 80 mg/kg según el CODEX ALIMENTARIUS

Tabla 17. Recobro de nitritos en productos cárnicos

Producto	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>estándar</sub> (mg/L)	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>muestra</sub> (mg/L)	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>final</sub> (mg/L)	Recobro (%)
Salchichas Alys®	4.38	0.16 ± 0.02	3.84 ± 0.07	85.27 ± 2.49
Pechuga de Pavo San Rafael®	4.90	0.36 ± 0.02	4.28 ± 0.14	80.03 ± 3.15
Salchichas Duby®	4.70	<0.1	3.92 ± 0.03	83.37 ± 0.68
Jamón Virginia Zwan®	4.75	0.42 ± 0.02	4.66 ± 0.14	89.14 ± 2.65
Mortadela Natural Kir®	4.45	0.49 ± 0.03	4.47 ± 0.12	89.24 ± 2.61
Salchichas Fud®	4.40	0.69 ± 0.02	4.58 ± 0.03	88.40 ± 0.66

[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>estándar</sub>= Concentración del estándar añadida; [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>muestra</sub>= Concentración de la muestra sin adición de estándar; [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>final</sub>= Concentración de la muestra adicionada con el estándar.

Al igual que en la determinación de nitratos, en el análisis de salchichas Duby® no fue posible cuantificar la cantidad de nitritos presentes en la muestra debido a que sus valores de absorbancia no entraban en la linealidad de la curva de calibración, sin embargo existió una señal analítica diferente del blanco por lo cual se declaró que, en la determinación, la salchicha tuvo menos de 0.1 mg [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]/L.

Se hizo uso de la Ecuación 9 para determinar el porcentaje de recuperación de analito en las muestras, sin embargo para el cálculo de recobros en las salchichas Duby®, la ecuación utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Muestra con estándar (mg/L)}}{\text{Estándar (mg/L)}} \times 100 \quad \text{Ec. 18}$$

Como se observa en la tabla 17, los valores de las recuperaciones están dentro de los límites establecidos por la CCAYAC, por lo cual se determina que el método es aceptable en cuanto a su exactitud.

#### **IV. CONCLUSIONES**

- La aplicación de ultrasonidos focalizados en conjunto con el sistema de análisis por inyección en flujo provee reproducibilidad, repetibilidad, recobros y análisis de muestras *aceptables*.
- Las condiciones óptimas de extracción de nitritos, haciendo uso de ultrasonidos focalizados fueron 1 g de muestra, agua destilada a temperatura ambiente como extractante y 15 s de energía irradiada constantemente a una amplitud del 45% (180 W) del equipo sonicador.
- El uso de ultrasonidos focalizados redujo el tiempo de extracción de nitritos de 2 h (método oficial AOAC 973.31 *Nitrites in cured meat*) a 15 s, es decir, el análisis se realizó 480 veces más rápido.
- El uso del reactivo de Carrez es eficaz en la clarificación de muestras de matrices complejas tales como la carne.
- Las muestras comerciales analizadas no rebasan los límites permisibles de nitritos asentados en la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002; ni de las normas internacionales CODEX STAN 192-1995 y DIRECTIVA 2006/52/CE.
- Los nitratos no pudieron ser cuantificados por FIA, sin embargo sí pudieron ser extraídos ya que se detectó señal analítica diferente del blanco.

## REFERENCIAS

- Andrade, R., Viana, C., Guadagnin, S., Reyes, F., & Rath, S. (2003). A flow injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. *Food Chemistry*, 80, 597–602.
- AOAC (2012). Association of Official Analytical Chemists. Methods of Analysis. 973.31 Nitrites in cured meat. Colorimetric method.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4a edición. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cabrera Molina, E. (1999). *Desarrollo de un método automatizado para la determinación de nitratos y nitritos en aguas, por análisis por inyección en flujo* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Cabrera, E., Hernández, L., Gómez, H., Cañizares, M. (2013). Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 47 (1), 88-92.
- Castigliego, L., Armani, A., Guidi, A. (2012). Meat Color. En Hui, Y. H. *Handbook of Meat and Meat Processing*. 2a edición. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Chemat, F., Huma, Z., Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 813-835.
- Consejo Mexicano de la Carne y Fondo PYME. Contenidos de Información para la Integración del Sector Cárnico y la Toma de Decisiones de sus Participantes. *Compendio estadístico 2015 de la industria cárnica mexicana*. [En línea]  
Disponible en:  
<http://infocarne.comecarne.org/compendio>  
[Último acceso el 12 de febrero de 2017]
- Damodaran, S. (2008). Amino Acids, Peptides, and Proteins. En S. Damodaran, K. L. Parkin, y O. R. Fennema. *Fennema's Food Chemistry* (pp. 219-323). Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group.

- Davidson, P. M., Juneja, V. K., Branen, J. K. (2002). Antimicrobial Agents. En Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., Thorngate III, J. H. *Food Additives* (pp. 563-621). New York: Marcel Dekker Inc.
- DIRECTIVA 2006/52/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 5 de julio de 2006 por la que se modifica la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes y la Directiva 94/35/CE relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios.
- FAO/OMS (2015). CODEX ALIMENTARIUS: NORMAS INTERNACIONALES DE LOS ALIMENTOS. Norma general para los aditivos alimentarios. CODEX STAN 192-1995.
- Food and Agriculture Organization (FAO). Agriculture and Consumer Protection Department. Animal Production and Health. *Meat & Meat Products*. [En línea] (Actualizado al 26 de abril de 2016).  
Disponible en:  
<http://www.fao.org/Ag/againfo/themes/en/meat/home.html>  
[Último acceso el 21 de agosto de 2016]
- Food and Agriculture Organization (FAO). Agriculture and Consumer Protection Department. Animal Production and Health. *Meat & Meat Products: Meat Consumption*. [En línea] (Actualizado al 25 de noviembre de 2014).  
Disponible en:  
<http://www.fao.org/Ag/againfo/themes/en/meat/background.html>  
[Último acceso el 13 de noviembre de 2016]
- Jiménez-Colmenero, F., Blazquez, J. (2009). Additives: Preservatives. En: Nollet L, Toldrá F, editors. Handbook of processed meats and poultry analysis. Ch. 5. Boca Raton, FL: Taylor and Francis.
- Kantor, M. A. (2000). Adverse reactions to food additives. En Watson, D. H. *Food chemical safety. Volume 2: Additives*. Cambridge: CRC Press.
- Martin, J. M. (2012). Meat-Curing Technology. En Hui, Y. H. *Handbook of Meat and Meat Processing*. 2a edición. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Mason, T., Paniwnyk, L., Lorimer, J. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, S253–S260.

- Miller, N., Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta edición. Madrid. Pearson Educación. S. A.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-213-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. MÉTODOS DE PRUEBA.
- Rath, S., Reyes, G. (2009). Nitrosamines. En: Nollet L, Toldrá F, editors. Handbook of processed meats and poultry analysis, Ch. 32. Boca Raton, FL: Taylor and Francis.
- Rincón, F., Martínez, B., Delgado, J. M. (2003). Detection of factors influencing nitrite determination in meat. *Meat Science*, 65, 1421-1427.
- Ruitter, A., Scherpenisse, P. (2012). Analysis of chemical preservatives in foods. En: Ötles S, editor. Methods of analysis of food components and additives, Ch. 16. 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. (2008). Review: Determination of preservatives in meat products by flow injection analysis (FIA). *Food Additives and Contaminants*, 25 (10), 1167-1178.
- Secretaría de Salud. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC). Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos. Clave: CCAYAC-CR-03/0. Vigente a partir de 17 de febrero de 2014.
- Strasburg, G., Xiong, Y. L. y Chiang, W. (2008). Physiology and Chemistry of Edible Muscle Tissues. En S. Damodaran, K. L. Parkin, y O. R. Fennema. *Fennema's Food Chemistry* (pp. 924-968). Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Tsikas, D. (2007). Review: Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851, 51-70.
- Wood, R., Foster, L., Damant, A., Key, P. (2004). Analytical methods for food additives. Cambridge, UK: Woodhead. p. 258.

- World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. (2010). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Volume 94 Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. Lyon, France.
- Xiong, Y. L. (2012). Nonmeat Ingredients and Additives. En Hui, Y. H. *Handbook of Meat and Meat Processing*. 2a edición. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group.

## ANEXO I

Tabla 1. Muestra utilizada para la optimización del método de extracción de nitritos y nitratos en carne por medio de ultrasonidos focalizados (Subtemas 3.2.1; 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4 y 3.2.6)

Lugar de elaboración	Facultad de Química, UNAM, CU.
Productor	Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Equipo No. 35. Semestre 2016-II
Producto elaborado	Salchichas
Ingredientes	Carne de cerdo (espaldilla), hielo picado, lardo o papada de cerdo, carne magra de res (diezmillo), harina de trigo, sal, consomé de pollo, cebolla en polvo, azúcar, nuez moscada en polvo, mezcla de fosfatos (Accoline), pimienta blanca en polvo, sal de cura, ajo en polvo, glutamato monosódico, eritorbato de sodio, saborizante a humo, solución acuosa al 0.5% de colorante rojo 40 o rojo cereza

Tabla 2. Muestras comerciales analizadas

Producto	Marca	Declaración de uso de nitritos
Salchichas de pavo	Alys®	Sí
** Pechuga de pavo	San Rafael Delicatessen Balance®	Sí
Salchicha tipo viena	Duby®	Sí
Salchicha tipo Viena	FUD®	Sí
Jamón Virginia a granel	Zwan®	-
Mortadela Natural a granel	Kir®	-

\*\*Producto utilizado para la evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio del método de extracción de nitritos y nitratos en carne por medio de ultrasonidos focalizados (Subtema 3.2.5)