



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Aplicación de microfluídica en la determinación de nitritos
en productos cárnicos utilizando microchips impresos en 3D**

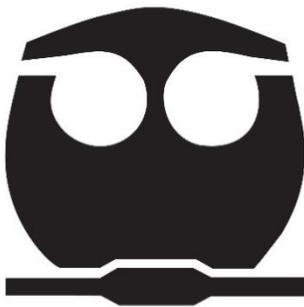
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

EMMANUEL SERRANO RIZO



Ciudad de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: CAÑIZARES MACÍAS MARÍA DEL PILAR

VOCAL: PROFESOR: GARCÍA ALATORRE ALEIDA

SECRETARIO: PROFESOR: MINA CETINA ALEIDA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA.

LABORATORIO 211, EDIFICIO F2, FACULTAD DE QUIMICA

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

SUSTENTANTE

EMMANUEL SERRANO RIZO

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo financiero en el programa PAPIIT con el proyecto: Diseño, construcción y evaluación de microdispositivos para aplicaciones químicas y biológicas. Número: IN218415.

INDICÉ

1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-OBJETIVO GENERAL.....	4
2.1.-OBJETIVOS PARTICULARES	4
3.-MARCO TEÓRICO.	5
3.1.-LA CARNE Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS.....	5
3.2.-NORMATIVIDAD DE CARNE PARA CONSUMO O INSUMOS.	8
3.3.-VALOR NUTRICIONAL DE LA CARNE.	11
3.4.-DEFECTOS DE LA CARNE.	13
3.4.1.-Defecto PSE (<i>Pálido, Suave y Exudativo</i>)	14
3.4.2.-Defecto DFD (<i>Dark, Firm and Dry</i>).....	15
3.5.-PRODUCTOS CÁRNICOS Y SU CLASIFICACIÓN.....	17
3.5.1.-Clasificación de productos cárnicos.....	18
3.5.2.-Salchicha tipo Frankfurt.....	19
3.5.3.-Chuleta ahumada.....	20
3.5.4.-Jamón.....	20
3.5.5.-Chorizo cantimpalo.....	21
3.6.-PROCESO DE CURADO DE PRODUCTOS CÁRNICOS.	21
3.6.1.-Métodos de curado.	22
3.6.1.1.-Salmuera.	22
3.6.1.2.-Marinado.....	22
3.6.1.3.-Frotación.....	23
3.6.1.4-Adición.....	23
3.7.-PROPIEDADES DE NITRITOS EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.....	23
3.7.1.-Sabor.	23
3.7.2.-Agente antimicrobiano	24
3.7.3.-Formación de complejo rosado (<i>oximioglobina</i>)	25
3.8.-CONSUMO DE CARNE EL MUNDO.....	28
3.9-CONSUMO DE CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS EN MÉXICO.....	29
3.10.-DETERMINACIÓN DE NITRITOS.	32
3.10.1-Determinación de nitritos en agua por método espectrofotométrico:.....	32
3.10.2.-Determinación de nitritos por medio de Cromatografía iónica	33
3.10.3.-Determinación por reactivo de Griess.....	33
3.11.-MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NITRITOS.	33
3.11.1.-Extracción por medio de suspensión.	34
3.11.2.-Extracción por ultrasonidos focalizados.....	34
3.12-MICROFLUIDICA.	35
3.13- COMPONENTES DEL DISPOSITIVO ANALÍTICO MICROFLUÍDICO.	36
3.13.1.-Bombas.....	37
3.13.2.-Mezcladores.....	37

3.13.3.- Válvulas.....	37
3.13.4.-Sistemas de detección.....	38
3.14.-FABRICACIÓN DE MICROCHIPS.....	38
3.14.1.-Forjado.....	39
3.14.2.-Litografía.....	39
3.14.3.-Litografía suave.....	40
3.15.-IMPRESIÓN EN 3D.....	40
3.15.1.-Tipos de impresión en 3D.....	41
3.15.2.-Estereolitografía (SLA).....	41
3.15.3.-Sintetizador selectivo por láser (SLS).....	44
3.16.- DISEÑO DE ESTRUCTURA 3D.....	45
3.17.-EFECTOS CARCINOGENÉTICOS DE LOS NITRITOS.....	46
4.-MÉTODOLÓGÍA.....	48
4.1.-IMPRESIÓN DE MICROCHIPS.....	48
4.2.- EXTRACCIÓN DE NITRITOS EN PRODUCTOS CÁRNICO.....	49
4.3.-FORMACIÓN DEL COMPLEJO COLORIDO.....	50
4.3.1.-Extracción de nitritos en productos cárnicos.....	51
4.4.-REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1. CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS.....	53
5.1.1.-DISEÑO DE PRIMERAS ESTRUCTURAS.....	53
5.2-IMPRESIÓN DEL PRIMER CHIP (CHIP 1).....	54
5.3.- CHIP D.....	57
5.3.1- <i>Caracterización de Chip D (Figura 18)</i>	57
5.3.2.- <i>Evaluación del caudal y tiempo de análisis</i>	58
5.3.3.- <i>Curva de calibración</i>	59
5.4.- MICROCHIP 3D DE DOS PARTES.....	61
5.4.1.- <i>Microchip A</i>	61
5.4.2.- <i>Microchip B</i>	62
5.4.2.1- <i>Caracterización de microchip B</i>	62
5.4.2.2.- <i>Curva de calibración</i>	63
5.4.3.- <i>Microchip C</i>	64
5.4.3.1- <i>Caracterización de Microchip C</i>	64
5.4.3.2- <i>Curva de calibración usando el microchip C (Figura 23)</i>	66
5.4.3.3.- <i>Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio</i>	67
5.4.3.4. <i>Volumen del microchip C</i>	69
5.5.- ANÁLISIS DE MUESTRAS CÁRNICAS.....	70
5.5.1.- <i>Salchicha tipo Frankfurt</i>	70
5.5.2.- <i>Chuleta ahumada</i>	72
5.5.3.- <i>Jamón tipo York</i>	73

5.5.4.-Chorizo cantimpalo	74
6.-CONCLUSIONES.....	77
7.-PERSPECTIVAS.....	79
REFERENCIAS.....	80
ANEXOS	85
1.-DISTRIBUCIÓN DE ESTABLECIMIENTOS TIF EN MÉXICO.....	85
2.-ELABORACIÓN DE SALCHICHA TIPO FRANKFURT; DIAGRAMA DE PROCESO, ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ACUERDO A LA NMX-F-065-1984, ASÍ COMO LA FORMULACIÓN ELABORADA EN EL LABORATORIO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS GRUPO 1.....	88
2.1.-FORMULACIÓN DE SALCHICHA FRANKFURT.....	88
2.2.-MATERIA PRIMA (CARACTERÍSTICAS).....	89
2.2.1.-Carne de cerdo (espaldilla) y de res (diezmillo):.....	89
2.2.2.-Hielo/Agua:	89
2.2.3.-Soya.....	89
2.2.4.-Especias	89
2.2.5.-Grasa	89
2.3.-MAQUINARIA Y EQUIPO	90
2.4.-DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DE SALCHICHA TIPO FRANKFURT.	91
2.5.-ESPECIFICACIONES FISCAS Y QUÍMICAS DE LA SALCHICHA TIPO FRANKFURT (NMX-F-065-1984)	92
3.-ELABORACIÓN DE CHULETA AHUMADA; DIAGRAMA DE PROCESO, ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ACUERDO A LAS NOM-122-SSA1-1994 Y NOM-213-SSA1-2002, ASÍ COMO LA FORMULACIÓN ELABORADA EN EL LABORATORIO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS GRUPO 1.....	93
3.1.-FORMULACIÓN DE CHULETA AHUMADA.	93
3.2.-MATERIAL Y EQUIPO.....	93
3.3.-DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DE CHULETA AHUMADA.....	94
3.4.-ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE CHULETA AHUMADA (NOM-122-SSA1-1994 Y NOM-213-SSA1-2002).	95
4.-ELABORACIÓN DE JAMÓN TIPO YORK; DIAGRAMA DE PROCESO, ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ACUERDO A LAS NOM-213-SSA1-2002, PROY NOM-158-SCFI-2003 Y NMX-F-123-S-1982-, ASÍ COMO LA	

FORMULACIÓN ELABORADA EN EL LABORATORIO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. 96

4.1.-FORMULACIÓN DE JAMÓN TIPO YORK.....	96
4.2.-TRATAMIENTO PREVIO DE LA MATERIA PRIMA.....	96
4.2.1.-Preparación de la pierna.....	96
4.2.2.-Preparación de la salmuera.....	97
4.2.3.-Masajeo.....	97
4.4.-MAQUINARIA Y EQUIPO.....	97
1. 1 M DE TELA DE ALGODÓN Ó MANTA DE CIELO 2. BALANZA GRANATARIA 3. CÁMARA DE REFRIGERACIÓN A 4° C 4. OLLA DE COCIMIENTO CON CAPACIDAD DE 20 A 40 L 5. CUCHILLO TIPO FILETERO 6. CHAROLA DE PLÁSTICO Ó METAL DE 30 X 40 X 20 CM 7. JERINGA DE PLÁSTICO DE 20 ML (JAMÓN POR INYECCIÓN) 8. MOLDES PARA JAMÓN CON CAPACIDAD DE 4 - 5 KG (FORJAS) 9. MOLINO PARA CARNES 10. PROBETA GRADUADA DE 500 ML 11. TERMÓMETRO PARA CARNES (EVITAR USAR EL TERMÓMETRO DE MERCURIO).....	97
4.5.-DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DE JAMÓN TIPO YORK.....	99
4.6.-ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE CHULETA AHUMADA (PROY NOM-158-SCFI-2003Y NOM-213-SSA1-2002).	100
4.7.-ESPECIFICACIONES SENSORIALES.....	101

5.-ELABORACIÓN DE CHORIZO CANTIMPALO; DIAGRAMA DE PROCESO, ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ACUERDO A LAS NOM-213-SSA1-2002 Y NOM-145-SSA1-1995, ASÍ COMO LA FORMULACIÓN ELABORADA EN EL LABORATORIO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. 102

5.1.-MAQUINARIA Y EQUIPO.....	103
5.2.-DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DE CHORIZO CANTIMPALO.....	104
5.3.-ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE CHORIZO CANTIMPALO (NOM-213-SSA1-2002 Y NOM-145-SSA1-1995).....	105

6. PRIMERAS IMPRESIONES DE CHIP. 106

6.1.- ELABORACIÓN DEL CHIP 1.	106
6.2.-CARACTERÍSTICA FÍSICA DEL CHIP A.....	107
6.3.-CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL CHIP B.....	109
6.4.-CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL CHIP C.	110

7.-PRIMER CHIP FUNCIONAL..... 112

7.1-CARACTERÍSTICAS DE IMPRESIÓN DEL CHIP D (FIGURA 18).....	112
--	-----

8.-MICROCHIP DE DOS FASES. 114

8.1-CARACTERÍSTICAS DE MICROCHIPS 3D EN DOS PARTES.....	114
8.2.-CARACTERÍSTICA FÍSICAS DEL MICROCHIP A.....	114
8.3.-CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL MICROCHIP B.	115

8.4.-CARACTERISTICAS FÍSICAS DEL MICROCHIP C	116
--	-----

1.-Introducción

La carne y productos cárnicos son alimentos altamente perecederos y susceptibles a contaminación microbiana ya que tienen un alto contenido de nutrientes y vitaminas que proporcionan un medio ideal para el crecimiento de bacterias. Al ser productos hechos a base de carne se debe tener especial cuidado en la selección de materia prima, ingredientes y estricto control en su elaboración.

Los ingredientes que se emplean para la elaboración de productos cárnicos son diversos y dependen tanto del tipo de producto cárnico a elaborar como de las características sensoriales y físicas deseadas, algunos de los ingredientes no son exclusivos del tipo de producto a elaborar pues pueden desempeñar diversas funciones ya sean químicas, físicas y/o sensoriales.

Uno de los ingredientes que desempeña dichas funciones y que además es agregado en todos los productos cárnicos son las sales de cura, las cuales son elaboradas a base de sales de nitratos y/o nitritos así como algún otro coadyuvante.

Las sales de cura tienen un papel fundamental en los productos cárnicos ya que actúan como inhibidor de microorganismos principalmente patógenos como lo es *Clostridium botulinum* teniendo influencia directa con la inocuidad de los productos; ayudan a la formación de hemocromóforos formando un complejo colorido rosado que al reaccionar con algunas aminas cambia la estructura de las mismas dando paso a la formación del complejo colorido y además aportan el sabor característico a los productos cárnicos.

La utilización de nitratos y nitritos en productos cárnicos es una práctica común llevada a cabo desde hace años, pero en los últimos 40 años el uso de este aditivo se ha puesto en duda ya que al formar hemocromos con las aminas ocasiona un efecto mutagénico en la estructura de estas y por ende un probable daño al ser humano, esto último ha sido hasta hoy en día un tema de gran relevancia pero que aún no tiene un estudio concluyente de si es causante o no de algún efecto adverso. (Zeilmaker et al. 2010; FAO, 2008).

Si bien actualmente no se sabe si esta causa o no un efecto negativo al organismo, este aditivo se encuentra regido por normatividades internacionales y nacionales las cuales de manera general permiten una concentración menor a 151 ppm aproximadamente, dentro de esta normatividad se menciona el método de cuantificación del analito el cual es sencillo pero muy tardado y genera una gran cantidad de residuos.

Por ello es importante crear metodologías de alta sensibilidad, de fácil manipulación de equipo y muestras, eficaces en reducción de tiempos de estudio, y rápidas en su cuantificación; cualidades que la microfluídica ofrece, ayudado de diversas herramientas como la creación de microdispositivos o microchips.

Cabe mencionar que el nacimiento de esta nueva tecnología en los últimos años ha tenido una gran relevancia por la diversidad de usos que se les pueden dar al tener una aplicación química, (funcionar como reactores) biológica (en modelos celulares) y de diseño (actuando como prototipos).

La implementación de microdispositivos es una excelente alternativa para la química verde ya que la generación de residuos, cantidad de reactivos y muestra son mínimos al compararse con las metodologías habituales.

Como se mencionó con anterioridad los nitritos en los productos cárnicos son un parámetro de calidad, por ello la cuantificación de este analito es importante. En este estudio se propone una metodología para la cuantificación del mismo utilizando microchips contruidos a través de una impresora 3D.

En este estudio se propone la extracción de nitritos de productos cárnicos usando energía de ultrasonidos focalizados. Para la cuantificación se desarrolló un microchip de resina a base de acrilato diseñado en el software de diseño SOLIDWORKS PREMIUM 2016 e impreso en 3D con la impresora de MiiCraft+3D printer, esta impresora funciona bajo el fundamento de estereolitografía (Aliaa I. Shallan et al 2014; Ho Nam Chan et al 2016; Chee Meng Benjamin Ho et al 2015, Lorrana N.N. et al 2013) y detección espectrofotométrica a 560 nm.

En este estudio se realizó la optimización del método evaluando microdispositivos con diferentes configuraciones, diseños, estructuras y serpentines, así como variando los

parámetros de flujo teniendo como idea principal encontrar el diseño con mayor eficiencia, evaluando los dispositivos con la cuantificación de los nitritos con N-1-Naftilendiamina/ sulfanilamida y Buffer de EDTA/NH₄Cl a pH 8.5 (Povey & Mason, 1998; Lorrana N.N. et al 2013).

Los productos cárnicos analizados fueron los siguientes: Salchicha tipo Frankfurt, jamón tipo York, chuleta ahumada y chorizo tanto fresco como madurado (una semana), elaborados en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos la Facultad de Química en Ciudad Universitaria.

Los resultados de los productos cárnicos analizados son expuestos en el capítulo cinco, en donde se muestran las estructuras analizadas y los parámetros evaluados en el estudio, concluyendo con la caracterización del microchip con mayor eficiencia y sensibilidad.

2.-Objetivo general

Diseñar e imprimir microchips con diferentes configuraciones estructurales y dimensiones a base de resina de polímeros de acrilato con la impresora MiiCraft+ 3D printer y el software SOLIDWORKS PREMIUM 2016 y evaluarlos para la determinación de nitritos en productos cárnicos.

2.1.-Objetivos particulares

- Diseñar diferentes dispositivos cambiando los diagramas de diseño (longitud del serpentín, diámetro de los canales y configuración).
- Evaluar diferentes caudales para establecer las mejores condiciones de reacción.
- Elaborar curvas de calibración de nitritos usando la reacción con N-1-Naftilendiamina/sulfanilamida para los microdispositivos diseñados.
- Aplicar ultrasonidos focalizados para extraer nitritos en productos cárnicos.
- Determinar la concentración de nitritos en productos cárnicos con los microchips seleccionados.
- Comparar los resultados obtenidos con respecto a las normas de cada producto analizado.
- Determinar la reproducibilidad y repetitividad intralaboratorio de la metodología propuesta, así como la caracterización de las estructuras.

3.-Marco teórico.

3.1.-La carne y sus productos derivados.

La carne es el producto obtenido por el sacrificio de animales destinados al consumo humano y que en algunos casos puede ser ocupada para el consumo animal, la cual tiene una estructura muscular estriada acompañada o no de tejido conectivo, hueso, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos las cuales no han sido sometidas a ningún proceso físico o químico que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas. Si bien la denominación de carne es un término que no aplica para los restos sobrantes de la canal como son viseras, hígado, riñones y demás órganos pero que en algunas culturas estos sí son consumidos.

El término canal será aplicado a diversas especies como cerdo, pescado y bovino los cuales llevarán un proceso natural de madurez llamado resolución del rigor de la canal el cual se da post-mortem y con ello poder ser denominado como carne. (NOM-194-SSA1-2004, FAO 2015).

Para entender el concepto de transformación de músculo a carne se deben de llevar a cabo dos procesos diferentes conocidos como pos mortem y resolución del rigor mortis denominados comúnmente como “madurez” ; durante este proceso ocurren una serie de cambios bioquímicos debido a las diferentes condiciones del músculo en donde el mecanismo de transporte aerobio habitual es intercambiado por una glucólisis anaerobia debido a la ausencia de oxígeno ya que no hay circulación, se lleva a cabo una síntesis de ATP menor a la requerida durante el proceso post-mortem dando paso a la síntesis de diferentes compuestos que ocasionan la disminución de pH debido al aumento de la acidez que provoca la activación de enzimas por el aumento de acidez adjudicado a la microbiota normal de la carne.(Fennema, 2002)

Durante la glucólisis anaerobia se realiza la síntesis de moléculas de ATP las cuales solo proporcionan 6 moléculas, cantidad insuficiente para que las células vivas generen una serie de compuestos como el lactato y otros subproductos de desecho, los cuales son acumulados por la falta de circulación haciendo que el músculo tenga una restructuración cambiando la composición de la carne hablando de manera específica de las proteínas quienes sufren una desnaturalización controlada debido a la acumulación de compuestos

como hipoxantinas e inosinas quienes son de gran relevancia en la calidad de la carne, dando origen a defectos que posteriormente serán explicados en este documento. (Badui, 2006)

Como se mencionó anteriormente después del sacrificio las células que están vivas requieren de energía por ello la cantidad de ATP sintetizado durante la glucolisis anaerobia es consumida por ATPasas pero la cantidad es insuficiente para las células aun presentes, causando agotamiento energético ocasionando la disminución de pH la cual será rápida o lenta dependiendo de la raza, sexo, edad del animal, alimentación, transporte y sacrificio afectando directamente sobre la calidad de la carne presentando o no defectos teniendo consecuencias directas en la capacidad de retención de agua, capacidad emulsificante y color, que definirán la utilización del producto cárnico.

En la etapa de pos mortem existen diversos cambios bioquímicos que favorecen la transformación de músculo a carne debido a que existe el descenso de pH y la producción de otros compuestos como son la inosina, hipoxantina, ADP, AMP, IMP que posteriormente y bajo ciertos procesos relacionados con las enzimas (Figura 1) dan paso a la generación de estos y que servirán como parámetro de calidad, dando una idea clara del proceso de maduración y frescura de la carne.

De todos los compuestos anteriormente mencionados existen dos que de manera específica seguiremos ya que son indicadores de la resolución de rigor estos son: la inosina (compuesto altamente deseable indicativo de que el corte analizado es fresco y que favorece la generación de compuestos de sabor y olor deseables en la carne) y la Hipoxantina (compuesto indicativo de que el corte de carne analizado empieza a presentar compuestos poco deseables e indica el estado de descomposición) los cuales darán un buen parámetro de calidad ayudando a denominar en cual etapa de resolución pos mortem se encuentra, este cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

$$K\% = \frac{[Inosina][Hipoxantina]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]+[IMP]+[Inosina]+[Hipoxantina]} * 100\%$$

Ecuación 1.-Valor K (Valoración de frescura).

En la Ecuación 1 se puede observar que se involucran todos los productos de cada una de las etapas de la conversión de ATP a Hipoxantina, por ello valores de entre 20% y

40% se puede considerar como un producto fresco en cambio valores por arriba del 40% indicaran que se llevó a cabo el proceso de maduración efectuándose condiciones de putrefacción cárnica, cabe mencionar que valores obtenidos por arriba del 20% indicaran que el proceso de resolución de post rigor ha concluido.(Fennema, 2002, Badui, 2006, Claus et al, 2013)

Durante la resolución del rigor mortis siguen ocurriendo cambios bioquímicos importantes permitiendo que los músculos se trasformen en carne debido a la actividad de diversas proteasas que ocasionan que las proteínas presentes sufran una desnaturalización controlada y gracias a diversos factores se tenga una posterior reestructuración adquiriendo textura blanda, olores y sabores deseables.

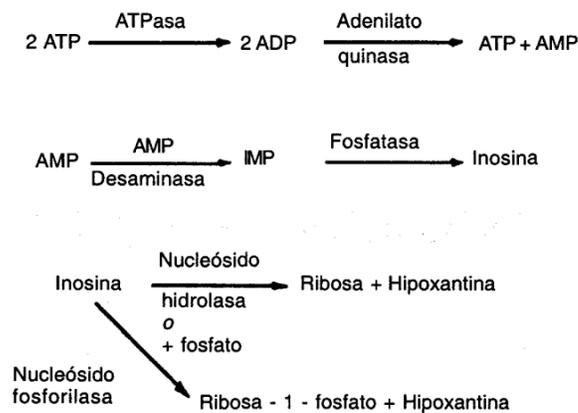


Figura 1.- Conversión de ATP en hipoxantina en el músculo post mortem

Como se ha mencionado la consecuencia del rigor mortis es el ablandamiento del tejido muscular el cual ahora puede ser llamado “carne” debido a la desnaturalización controlada que sufren las proteínas que se encuentran presentes en las fibras musculares ocasionada por diversas reacciones proteolíticas activadas por el descenso de pH (de entre 3 y 6), el aumento de acidez por el desgaste del ATP y la posterior producción de compuestos tales como glucógeno, condiciones ideales para la activación de enzimas endógenas llamadas calpaínas, catepsinas y calpastatinas que actúan directamente sobre las miofibrillas ocasionado una reestructuración de enlaces de las

mismas, adquiriendo nuevas propiedades aumentando la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad emulsificante (CE) las cuales son características aprovechables en la elaboración de productos cárnicos.(Fennema, 2002)

Cabe mencionar que los lípidos presentes en la carne durante el tiempo de maduración tienden a presentar oxidación lipídica debido a que en las condiciones de almacenamiento (4° C o menos) no hay reacciones competitivas de otros compuestos o microorganismos que ocasionen alteraciones que faciliten reacciones de rancidez lipídica, la cual dependerá directamente del tipo de raza, especie o concentración de lípidos.

La oxidación lipídica depende del tipo de animal, así como de la proliferación de diversos microorganismos que aumentan la velocidad de reacción, siendo estas más rápidas en pescados y mariscos debido a su contenido en grasas insaturadas haciéndolos mayormente susceptibles a oxidación en comparación con los ácidos grasos polinsaturados encontrados en carne de bovinos con alto contenido de lípidos.

Cabe mencionar que no todas las reacciones de oxidación lipídica son indeseables ya que durante la oxidación se sintetizan diversos compuestos que traen como consecuencias olores y sabores que en ciertas concentraciones aportan aromas y sabores deseables tanto en cortes de carne, así como productos cárnicos. (Fennema,2002)

3.2.-Normatividad de carne para consumo o insumos.

El proceso de transporte, sacrificio, limpieza y eviscerado de carne de cualquier especie y raza debe de seguir la siguiente normatividad vigente, algunas de las normas que se deben de tomar en cuenta son las siguientes:

- Sacrificio animal: NOM-033-ZOO-1995 , en esta norma se especifica cuáles son las medidas de seguridad para el transporte de cada una de las razas a sacrificar, así como el proceso de descarga y previa revisión de cada uno de los ejemplares a sacrificar supervisado por un Médico Veterinario Zootecnista así como un Químico en Alimentos siendo los encargados de supervisar que los animales

dispuestos a sacrificio estén libres de enfermedades o laceraciones visibles lo cual ponga en riesgo la salud del animal y el consumo humano de esa carne.

- Evisceración y limpieza de la canal: NOM-030-ZOO-1995, en esta norma se menciona como debe ser el proceso de la limpieza de la canal de las diferentes especies, así como especificaciones microbiológicas de control de calidad.
- Expendio y distribución de carne fresca: NOM-194-SSA1-2004, esta norma hace referencia a las medidas precautorias que se deben tomar con la limpieza de la canal (cuerpo del animal sacrificado) especificando el tipo de material a emplear, medidas de seguridad tanto del personal encargado del transporte como de los medios de transporte especificando el uso debido de maquinaria, uniforme, temperaturas de conservación, entre otras especificaciones sobre las instalaciones y áreas donde será expuesta la carne.
- Calidad microbiológica. La carne por la naturaleza de tener una gran cantidad de nutrientes se encuentra expuesta al contacto de una gran cantidad de microorganismos latentes, los cuales pueden significar un riesgo para la salud del ser humano, por ello la carne debe de seguir las siguientes normas: NOM-092-SSA1-1994, es un método general para la cuenta de bacterias anaerobia presentes en la carne después del sacrificio; NOM-112-SSA1-1994, se encuentra especialmente enfocada a la detección de coliformes, de manera específica bacterias patógenas como *E.coli* por contaminación en la mayoría de las ocasiones por contacto de ese fecales; y NOM-114-SSA1-1994 En el cual se especifica la metodología a emplear para la detección de *Salmonella* en los alimentos, bacteria patógena que debe de estar libre en cuando menos 25 gramos de muestra asegurando así su calidad microbiológica
- Calidad química: La carne proviene de animales de sacrificio los cuales estuvieron expuestos a diferentes contaminantes tóxicos y químicos, por ello antes de la comercialización de los productos se deben revisar los restos de despojo (hígado, riñón y vísceras) ya que estos indicarán la cantidad de niveles tóxicos presentes

en el animal cuyos valores máximos se definen en la Norma NOM-004-ZOO-1994 así como los métodos para la posterior comercialización de los restos de despojo y de carne.

Cabe resaltar que todos los productos cárnicos deben de cumplir con estas normas para la materia prima, pero para su elaboración se deben de cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura, NOM-120-SSA1-1994 uso de agua potable para la elaboración de productos de consumo humano, Mod-NOM-127-SSA1-1994 agua potable, NOM-201-SSA1-2015 agua purificada entre algunas otras, las cuales dependerán del producto cárnico que se quiera elaborar.

En México existen diversos organismos que realizan la supervisión del cumplimiento de estas normas como son: SAGARPA, SENASICA, COFEPRIS y SECRETARIA DE SALUD los cuales no solo son encargados de la supervisión sino también de la elaboración de manuales y acuerdos para la capacitación del personal con la finalidad de hacer valer el cumplimiento de las normas.

Toda esta serie de cumplimiento de normatividad y reglamentos sanitarios son regidos por SAGARPA institución encargada de realizar la supervisión a través de un organismo denominado ANETIF (Asociación Nacional de Establecimientos Tipo Inspección General), este departamento es el encargado de proporcionar el sello TIF (Tipo Inspección Federal) que es prácticamente un sistema encargado de minimizar el riesgo de los productos y subproductos cárnicos ya que pueden representar una fuente de zoonosis o diseminadores de enfermedades a otros animales o seres humanos, por ello con la finalidad de disminuir el riesgo de salud pública, salud animal, economía y el abasto nacional.

Esta certificación trae consigo una serie de beneficios a la industria cárnica permitiendo la movilización dentro y fuera del país, abriéndose al comercio internacional ya que los establecimientos TIF son los únicos elegibles para exportar ya que cumplen con las normas internacionales de la FDA (Food and Drugs Administration) así como en acuerdos acerca de la comercialización de carne y productos de acuerdo a estatutos de la Unión Europea.

De acuerdo al SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera) existen alrededor de 503 empresas autorizadas y certificadas con el registro de seguridad TIF los cuales cumplen con todas las normas anteriormente mencionadas, estas empresas se distribuyen de la siguiente manera en la República Mexicana (Anexo 1).

Como se puede observar la cantidad de empresas que cumplen con este sello de seguridad TIF son muy pocas debido a todos los controles de calidad los cuales requieren de una gran estructura, capacitación continua del personal entre otros factores importantes que se deben de cumplir para obtener este sello haciendo que el producto sea más caro a comparación de la carne obtenida en rastros municipales, rastros clandestinos e incluso rastros de traspatio.

Los rastros clandestinos y de traspatio no cuentan con ninguna de las medidas de higiene antes mencionadas y mucho menos con las normas anteriormente expuestas tanto del tipo de sacrificio, trato humanitario y personal capacitado en el manejo de estos lugares, de acuerdo a cifras no exactas se tiene un estimado de que son aproximadamente más de 100,000 lugares que no cuentan con ninguna de las medidas de seguridad e higiene. (SIAP, 2016)

La utilización de estos rastros se debe a diferentes características como el ahorro económico por el sacrificio de ganado para pequeños ganaderos y productores, la mínima cantidad de documentos requeridos, transporte inadecuado (en la mayoría de los casos), los animales no cumplen con las características necesarias estipuladas en las normas, y fundamentalmente la cercanía ya que los centros de sacrificio en algunas ocasiones se encuentra en lugares lejanos a los lugares autorizados, estos son algunos de los factores por los cuales siguen siendo vigentes los establecimientos que no cumplen con la normatividad.(SAGARPA, 2016)

3.3.-Valor nutricional de la carne.

Desde el punto de vista nutricional la carne es uno de los productos más ricos en cuanto a la calidad de proteínas ya que se encuentran en un porcentaje aproximado de 17-20% y en su mayoría se encuentran biodisponibles para ser aprovechados, además la carne es uno de los productos con un mayor contenido de humedad representando entre un 64-70% de agua en promedio; estos macrocomponentes dependerán de la especie,

época del año y otros factores principalmente asociados con la nutrición del ganado, en la Tabla 1 se muestra el contenido de algunos de los componentes en carne.

<i>Especies</i>	<i>Composición (%)</i>			
	<i>Agua</i>	<i>Proteína</i>	<i>Lípidos</i>	<i>Cenizas</i>
Vacuno	70-73	20-22	4-8	1
Cerdo	68-70	19-20	9-11	1,4
Pollos	73,7	20-23	4,7	1
Cordero	73	20	5-6	1,6
Bacalao	81,2	17,6	0,3	1,2
Salmón	64	20-22	13-15	1,3

Tabla 1.- Composición porcentual de macrocomponentes en diferentes

La calidad nutrimental de las proteínas contenidas en la carne es alta ya que la mayoría de sus componentes después de la cocción se encuentran ampliamente biodisponibles debido a que contienen los tipos y proporciones de aminoácidos muy cercanos a los necesarios para el mantenimiento y desarrollo de los tejidos pues del total de nitrógeno el 95% es de proteína, 5% restante son péptidos pequeños y aminoácidos entre otros. (Fennema, 2006)

Los lípidos son otro componente esencial de la carne y el contenido dependerá del tipo de especie, raza, edad e incluso época del año pudiendo ser mayor o menor; por ejemplo, en los productos marinos prevalecen lípidos de cadenas insaturadas que son susceptibles a la oxidación, generando compuestos tanto deseables como indeseables; a diferencia de la grasa que compone la carne de bovino en donde la estructura de esta es saturada lo que la hace menos sensible a la oxidación lipídica de estos compuestos.

La carne es una buena fuente de vitaminas y consta de una gran cantidad de complejo B, especialmente tiamina, rivotlamina, niscina, vitamina B6 y B12, además de algunas otras que se encuentran en menor cantidad como la vitamina D, E, K y en bajas cantidades ácido ascórbico el cual tendrá un papel fundamental más adelante en el mecanismo de reacción de en la formación de NO-hemoglobinas. (Song et al, 2015)

La carne es una muy buena fuente de hierro, fósforo, calcio y potasio, se calcula que por cada 100 gramos de carne se obtiene aproximadamente de 40 a 90 mg de sodio y 250 a 420 mg de potasio, representando una gran ventaja el hecho de que tanto las vitaminas

como los minerales se encuentran en la pieza cárnica después de ser cocinado. (Song et al, 2015)

Otro de los componentes de la carne son los carbohidratos lo cuales se encuentran presentes en muy bajas concentraciones (aprox. 1%) sin embargo tienen una mayor influencia en olor y sabor durante el proceso de cocción o fritura de la carne ya que al complementarse con la vasta cantidad de proteínas, compuestos aminados y temperatura, las reacciones de Maillard se ven favorecidas proporcionando colores caramelo u oscuros haciéndola mucho más atractiva para su consumo. (Badui, 2006)

Como se puede observar en la Tabla I el mayor componente de la carne de manera general es el agua representando aproximadamente más del 50% en peso total de la pieza cárnica haciéndola fácilmente susceptible a la contaminación microbiana ya que su alto contenido de nutrientes provoca el medio ideal para el crecimiento de microorganismos exógenos, principalmente aquellos que generan un gran número de productos de degradación como aldehídos, cetonas, sulfuros, mercaptanos y aminas de gran diversidad que en algunos caso son indicadores de descomposición como la putresina, cadaverina y en ocasiones la generación de histamina causante de intoxicación alimentaria comúnmente en pescados y mariscos. Por ello es importante tomar en cuenta que las piezas cárnicas deben de estar almacenadas en refrigeración o congelación cuidando las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura).

3.4.-Defectos de la carne.

La carne es una matriz alimentaria muy compleja debido a que después del sacrificio existe un proceso de maduración en el cual puede haber diferentes factores externos e internos que interfieren de manera directa en la calidad de la carne. De manera general la carne presenta dos tipos de defectos que diferirán del tipo de uso que se les dé, ya sea como corte o como materia prima para la elaboración de un producto cárnico debido a que se pueden aprovechar estos aparentes defectos como una virtud para la elaboración de estos. (Fennema, 2002)

3.4.1.-Defecto PSE (Pálido, Suave y Exudativo)

Este tipo de carne presenta una estructura muy blanda debido a que las proteínas contenidas fueron desnaturalizadas de manera “poco controlada” por el rápido aumento de acidez, comparada con aquella que no presenta ningún defecto así como la que tiene un descenso rápido de pH, por ejemplo para un corte de carne que no presenta ningún tipo de defecto el proceso de solución de rigor el tiempo aproximado es de 16 hasta 24 horas descendiendo de pH 7 hasta un 5.6-6.2, proceso que a diferencia de la que presenta defecto tipo PSE tarda aproximadamente de 6-12 horas bajando de pH 7 hasta un 5.3-5.7 existiendo una desnaturalización de estructuras proteicas y un arreglo poco favorable para las retención de agua y la capacidad de emulsificar.

Las causas probables de que el descenso de pH sea muy rápido se puede deber a que el animal sacrificado fue expuesto a mucho estrés ocasionado por maltrato, tiempo de viaje, duración en el transporte, así como el tipo de vehículo empleado para su traslado o bien el tiempo prolongado de recepción o revisión de los ejemplares, entre otras causas provocando cambios bioquímicos que afectarán directamente a la calidad de la carne. El animal antes de ser sacrificado debe de tener un periodo de ayuno de 12 a 24 horas, una prolongación de este tiempo ocasionaría que el organismo de este utilice reservas energéticas como son grasas y carbohidratos agotando glucosa , dando paso a la producción de glucógeno entre otros compuestos como ácido láctico y ácido úrico que son acumulados ya que no hay circulación, disminuyendo el pH de manera rápida ocasionando la desnaturalización de las proteínas de manera poco controlada provocando que la retención de agua dentro de las estructuras sea muy poca siendo carne muy seca o exudativa, además de presentar color rosa pálido en carne de res y cerdo comparadas con aquellas que no presentan algún defecto debida a la alteración de la hemoglobina aun presente en la pieza, dando coloraciones poco atractivos para el consumo como corte fino.

Las propiedades físico-químicas de la carne con defecto PSE (Figura 2) son muy favorables para la elaboración de productos cárnicos, entiéndase éste por cualquiera que sea elaborado con una base cárnica bajo diversas formulaciones, especificaciones o denominaciones que conllevan un nombre y una normatividad vigente; la carne que

presenta este tipo de defectos tiene características apropiadas para la elaboración de los siguientes productos cárnicos.

Cabe mencionar que para elaborar un producto con este tipo de defectos se deben de combinar con carne sin defectos:

- Chorizos
- Longaniza
- Salami

A estos productos anteriormente mencionados se les denomina: productos curados y madurados, debido a que el proceso de maduración o añejamiento se realiza por periodos de tiempo corto (días) y en algunos otros hasta meses. Durante el periodo de maduración los productos empiezan a tener diferentes cambios físicos y químicos como son la generación de compuestos de rancidez por la oxidación lipídica dando olores y sabores deseables, pérdida de agua ayudando a la concentración de sabores y olores característicos del producto, aunque la carne con defecto de tipo PSE tiene que combinarse con carne que no tiene la misma característica en cuanto a retención de agua debido a que la mayoría de los productos durante el proceso de elaboración tienen una presentación final de embutido que requiere de la emulsificación.



Figura 2.- Comparación de carne con defecto de tipo PSE y sin defecto. (Álvarez et al, 2018)

3.4.2.-Defecto DFD (Dark, Firm and Dry)

La carne con defecto DFD por sus siglas en inglés muestran una coloración más oscura a comparación de la carne que no presenta ningún defecto, tiene una textura dura y seca ya que durante el proceso de maduración el descenso del pH es lento y no hay desnaturalización de las proteínas que permitan un re arreglo suficiente para que la

textura del corte sea suave debido a que el proceso de rigor no ha terminado por no tener un descenso de pH requerido (5.6-6.2).

La disminución de pH no es posible por diversos factores, muy baja reserva de glucosa debido a tiempos prolongados de ayuno (mayor a 24 horas), actividad física antes del sacrificio causando que las reservas de glucógeno sean mínimas aunado a la producción de ácido láctico.

Estos factores ocasionan que el descenso de pH sea muy lento o bien que después del sacrificio la cantidad de ácido láctico no sea suficiente para llegar a un pH entre 5.6 y 6.2, condición ideal para la acción de enzimas como las calpainas, calpastatinas y catepsinas encargadas de realizar una reestructuración de proteínas de la carne con textura firme.

Las características que adquiere la carne con los defectos DFD tiene una mayor utilidad en la elaboración de productos cárnicos ya que al tener proteínas con una estructura “poco desnaturalizada” la capacidad de retención de agua es mayor, dicha propiedad es aprovechada ampliamente para la elaboración de los siguientes productos siempre y cuando esta se encuentre en combinación con carne sin defectos:

- Salchicha
- Jamón
- Pate
- Mortadela

En estos productos cárnicos la capacidad de retención de agua y la capacidad de emulsionar es ideal ya que ayuda a la formación de emulsiones agua en aceite deseables en la elaboración de productos embutidos como la salchicha y jamón, además de que en estos productos elaborados con carne con defecto DFD el color que adquiere la carne no afecta la calidad visual del producto ya que es combinada con carne sin defectos y conllevan a un proceso de cocción.



Figura 3.-Comparación de carne normal con carne con defecto tipo DFD. (Álvarez et al, 2018)

3.5.-Productos cárnicos y su clasificación.

Un producto cárnico es aquella pieza que se encuentra elaborada a base de 60% de carne, la cual puede ser o no cocida, contener o no aditivos, ser expuesta o no a un tiempo de maduración, forjada, marinada, etc., dependiendo del tipo de producto. Estos procesos son llevados a cabo con la finalidad de adquirir sabor, color, aroma y en la mayoría de los casos forma dependiendo de la denominación de origen el cual está regido bajo normas oficiales nacionales o internacionales que deben cumplir lineamientos en su elaboración, propiedades físicas y químicas así como calidad microbiológica, aditivos permisibles y límites de compuestos residuales.

Los productos cárnicos deben estar elaborados con carne libre de patógenos asegurándose de que el alimento sea seguro para su consumo y libre de componentes tóxicos. Los productos cárnicos deben de cumplir con la NOM-213-SSA1-2002 para la elaboración de productos cárnicos, que no menciona una cantidad específica de carne para que un producto cárnico sea denominado como tal ya que dependiendo de la denominación de origen el producto tiene un cantidad de carne específica, pero en general debe de tener una composición mayor del 60% de base en su formulación la cual no sólo puede ser elaborada con carne sino también con vísceras o mezclas que pueden estar o no incluidas, tejido graso, subproductos de carne y aditivos, estos últimos encuentran regulados y permitidos por la normatividad antes mencionada.

Los ingredientes serán definidos por el tipo de producto a elaborar de acuerdo a la denominación de origen, así como otras características como la forma física, proceso de

elaboración, propiedades químicas, físicas y microbiológicas entre otras, dependiendo de manera directa del producto cárnico.

3.5.1.-Clasificación de productos cárnicos.

Los productos cárnicos se clasifican de acuerdo al tipo de proceso de elaboración o a la denominación de origen, los cuales deben de cumplirse de acuerdo a normatividades de cada uno de los productos elaborados. A continuación, se muestra la clasificación que proporciona la NOM-213-SSA1-2002 de los productos cárnicos:

- **Productos cárnicos cocidos:** productos elaborados con carne, vísceras, sangre o sus mezclas, pueden ser curadas o no, que son sometidas a procesos térmicos que pueden presentarse enteros o en cortes.
- **Productos cárnicos crudos:** productos elaborados con carne, viseras o sus mezclas que pueden ser o no madurados o curados que son sometidos a algún tratamiento térmico.
- **Productos cárnicos desecados o salados:** son productos sometidos a la reducción de la humedad por medio del aire, calor o sal hasta llegar a un valor de humedad no mayor a 25%
- **Productos cárnicos rebozados:** son productos elaborados con carne picada o molida con adición o no de tejido graso, subproductos y aditivos que pueden recibir un tratamiento durante su elaboración pero que necesitan ser cocinados para ser consumidos.
- **Productos cárnicos madurados:** aquellos productos que son deshidratados de manera parcial pudiendo ser ahumados o no sometidos durante cierto tiempo a la acción de microorganismos o enzimas propias de la carne para que desempeñan acciones oxidativas en los lípidos presentes en el producto ayudando a la formación de olores y sabores deseables en el producto.
- **Productos cárnicos fritos:** productos elaborados a partir de carne o piel y que son sometidos a freído en aceite y grasa con o sin sal, curados o no.
- **Productos madurados marinados:** productos los cuales tiene un pre acondicionamiento con sal u otros aditivos por vía seca o húmeda, excepto nitratos o nitritos, pudiendo ser o no cocidos.

- **Productos cárnicos procesados:** productos elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas provenientes de mamíferos o aves que pueden ser sometidos a diferentes procesos como son el ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado entre otros. (NOM-213-SSA1-2002)



Figura 4.-Ejemplo de productos cárnicos ahumados, embutidos, curados y cocidos

La clasificación de los productos cárnicos es diversa porque depende en gran parte de los ingredientes, procesos y aditivos utilizados para su elaboración que se encuentran regulados en la NOM-213-SSA1-2002 relacionada con la elaboración de productos cárnicos procesados, especificaciones sanitarias y métodos de prueba, como son la cocción, el ahumado, procesos de curación o marinado donde se utilizan aditivos con la finalidad de mejorar y proporcionar atributos como resaltadores de sabor, adición de color, mejorar la textura, etc., sin encubrir defectos de calidad e inocuidad.

Para fines prácticos los productos cárnicos analizados en este estudio fueron los siguientes: Salchicha tipo Frankfurt, chuleta ahumada, jamón y chorizo tanto fresco como madurado (1 semana de maduración).

3.5.2.-Salchicha tipo Frankfurt.

De acuerdo a la NMX-F-065-1984 la salchicha Frankfurt debe estar elaborada con no menos de 60% de carne de res y cerdo; mezclado con grasa de cerdo y emulsificados, sometidos a curación con nitrato de sodio o nitrito de sodio donde la cantidad máxima

permitida no debe rebasar los 156mg/kg (156ppm), los cuales pueden ser ahumados o no y ser sometidos a cocción con una temperatura mínima de 343K (70°C) en el centro térmico de las salchichas a una presión de 760mm de mercurio para después ser enfriadas de manera rápida hasta llegar a la temperatura de almacenamiento (4°C), empacados en material adecuado e inocuo para su distribución y conservación en refrigeración. En esta norma no se estipula el diagrama de proceso referente a este tipo de salchicha por ello se elaboró la metodología y propiedades físicas y químicas del producto terminado. (Anexo 2)

3.5.3.-Chuleta ahumada.

En México la norma de referencia es NMX-F-138-1969 la cual define a la chuleta ahumada como el producto obtenido a partir de la porción del cerdo, después de remover la paleta, el pernil, la tocina y la grasa de la espalda, la cual contiene una cierta porción de las costillas, el lomo y el lomo de cerdo con la adición o no de condimentos y especias, sometidas a un proceso de curado, ahumado, cocción y envasado en un material inerte al producto aprobado.

Las normas mexicanas de referencia son la NMX-F-138-1969, NOM-122-SSA1-1994 y NOM-213-SSA1-2002 donde se mencionan las especificaciones sanitarias para productos cárnicos curados cocidos, curados emulsionados y cocidos abarcando productos como chuletas, entrecot, lomos, tocinos etc.

Para fines prácticos se desarrolló el diagrama de proceso de la elaboración de la chuleta ahumada de acuerdo a la metodología empleada en laboratorio, así como las especificaciones físicas y químicas de la chuleta ahumada. (Anexo 3).

3.5.4.-Jamón.

El jamón es uno de los productos que no tiene una norma de manera oficial solo existe un proyecto sobre la elaboración de jamón NOM-158-SCFI-2002, por ello la norma a seguir será la NOM-213-SSA1-2002; el jamón se define como un producto alimenticio elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras del cerdo o pernil de cerdo de raza *Suis scrofa domesticus* declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable. (Anexo 4).

3.5.5.-Chorizo cantimpalo.

El chorizo de tipo cantimpalo no tiene una norma particular mexicana por lo que de acuerdo a la NOM-213-SSA1-2002 y NOM-145-SSA1-1995 lo definen como un producto cárnico madurado troceado que es deshidratado de manera parcial pudiendo ser ahumado o no, sometido durante cierto tiempo a la acción de microorganismos o enzimas propias de la carne para que desempeñen cierta acción sobre azúcares añadidos o lípidos presentes en el producto ayudando a la formación de olores y sabores deseables aunque cabe mencionar que ésta es una definición muy general del producto, en cambio la Real Academia de la Lengua lo define “como un embutido curado o ahumado hecho con carne de cerdo picada y otros ingredientes, abundante pimentón y otras especias que se consume crudo, frito, asado o cocido.

Este producto cárnico será comparado con la NOM-213-SSA1-2002. El diagrama de proceso, así como las especificaciones y características físicas y químicas se muestran en el Anexo 5.

3.6.-Proceso de curado de productos cárnicos.

En la mayoría de los productos cárnicos existe un aditivo en común usado por sus diversas propiedades antimicrobianas, sabor y aporte en la estabilidad de color, este aditivo es el nitrito de sodio o sal de cura en donde el ion nitrito toma una mayor relevancia.

Las sales de cura son utilizadas en una amplia cantidad de productos cárnicos ya que este puede ser empleado tanto en masas cárnicas húmedas como secas teniendo una gran efectividad y relevancia en la mayoría de los productos cárnicos.

Se entiende como “curado” al proceso de sazonado o conservación de alimentos teniendo este una gran importancia en diversos productos, durante este proceso pueden ser utilizados azúcar, sal, humo o sal de cura simple o compuesta ya sea por nitratos, nitritos o ambas.

Las sales de cura son utilizadas como métodos de conservación, aunque el uso de estos no exime el proceso de cocción. (Song et al, 2015)

3.6.1.-Métodos de curado.

3.6.1.1.-Salmuera.

Se realiza con la preparación previa de una solución salina a base de agua purificada con una concentración determinada de nitratos o nitritos (sales de cura) y la cual dependerá de manera directa del producto cárnico y legislación vigente la cual estipula una cantidad máxima permisible.

La salmuera es un ingrediente esencial para la elaboración de productos cárnicos y se pueden utilizar dos métodos para su incorporación en el producto: inyección o marinado. (Fennema, 2002)

3.6.1.2.-Marinado.

El curado por marinado consiste en un reposo mínimo de 12 a 24 horas en una solución de salmuera, la pieza cárnica es pinchada con una aguja de acero inoxidable con la finalidad de hacer cavidades en el producto cárnico para obtener una mayor superficie de contacto con la salmuera y por ende fomentar el contacto de los nitratos y nitritos presentes en la salmuera.

Durante este proceso de marinado la carne es masajeadada con la finalidad de ayudar en la inmersión de la salmuera dentro de las cavidades y posteriormente es lavada con agua purificada para eliminar el exceso de salmuera presente en la masa cárnica. El principal inconveniente en este método es que no se tiene una buena superficie de contacto con el interior de la masa cárnica y solo es de manera superficial por lo que no se asegura que el producto tenga un curado uniforme haciéndolo mayormente susceptible a contaminación microbiana debido a que el masajeo es insuficiente para que las sales de cura estén en contacto con el interior del producto cárnico. (Honikel, 2008)

Cabe mencionar que, aunque es un método deficiente para el curado de productos cárnicos, es empelado para piezas cárnicas de corte fino o también llamado de consumo como una pieza cárnica ya que como se ha mencionado el nitrito forma un complejo con la hemoglobina dando coloraciones rojizas.

3.6.1.3.-Frotación.

Se realiza en seco, eso quiere decir que las sales de nitritos son agregadas de manera sólida por fricción con el producto teniendo contacto únicamente en la superficie del mismo, en la mayoría de las ocasiones el producto cárnico ya tuvo un tratamiento térmico con fines de adquisición de sabores. (Sebranek et al, 2007)

3.6.1.4-Adición.

Es la metodología mayormente empleada en la elaboración de productos cárnicos embutidos como salchichas, jamones, chorizo, entre otros productos cocidos y madurados; en esta metodología los nitritos son agregados en forma sólida durante el proceso de elaboración, de manera específica en la etapa de mezclado de ingredientes antes de ser embutido o forjado evitando que las pérdidas de nitritos sean mayores haciendo un proceso de cura ineficiente. (Sebranek et al, 2007)

Este método es mayormente empleado en productos cárnicos por la eficiencia en el proceso de cura y su conservación por la mayor superficie de contacto, facilitando así la formación de compuestos de oximiglonina hemocromóforos deseables en este tipo de productos (Honikel, 2008)

3.7.-Propiedades de nitritos en los productos cárnicos.

Los nitritos en las formulaciones son agregados en forma de sales compuestas ya que pueden contener nitratos de potasio y/o nitrito de sodio, acompañados de otra sal como cloruro de sodio, almidones modificados etc., actuando como excipientes. Se sabe que los nitritos son agregados para aportar sabor, pero, además de cumplir esta función tienen propiedades antimicrobianas y ayudan a la formación de color en los productos haciéndolos mucho más atractivos, estas funciones serán descritas en los puntos siguientes con mayor detalle.

3.7.1.-Sabor.

Los nitritos y nitratos son sales que ayudan a la palatabilidad del producto cárnico ya que aportan sabores específicos a productos curados junto con los ácidos grasos libres; se ha demostrado que los nitritos presentes en los productos curados cocidos dan sabores

salados propios del tipo producto cárnico, además de tener una mayor capacidad de retención de agua, condición favorable para la elaboración de productos como jamón y salchichas ya que ayuda a la extracción de proteínas globulares fomentando la formación de redes proteicas exponiendo así sus partes anfífilas actuando como un emulsificante.(Noel, 1989)

3.7.2.-Agente antimicrobiano

Los nitritos tienen un efecto benéfico como agente antimicrobiano actuando como un inhibidor de los citocromos de la cadena respiratoria de microorganismos anaerobios patógenos como lo es *C. botulinum*, microorganismo que puede estar presente en la carne o productos cárnicos por las características nutrimentales y condiciones viables de desarrollo; este es un bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio estricto que habita normalmente en el suelo, sus condiciones óptimas de crecimiento son a un pH entre 4.6 y 5.6.

El medio de transmisión de *C.botullinum* es por medio de su célula vegetativa, es decir, un microorganismo vivo que cuando se encuentra presente en el alimento no causa daño por su presencia ya que esa no es su forma patógena, pero si esta se encuentra expuesta a condiciones adversas como temperatura (por arriba de 48°C) la célula vegetativa forman una estructura de resistencia llamada espora protegiéndose de ambientes poco favorables para ellos, generando toxinas con la finalidad de eliminar el ambiente adverso así como competidores.

Al someter a cocción el producto cárnico, la espora produce toxinas las cuales son consumidas y una vez dentro del organismo del ser humano, busca las condiciones ideales para salir de su estructura de resistencia, pero las toxinas botulínicas son peligrosas ya que al ser de tipo neurotóxico afectan al sistema nervioso central, los efectos adversos se presentan hasta después de 12 a 36 horas después de su ingesta, los síntomas causados por la toxina son náuseas, vómitos, visión borrosa o doble, pupila fija, dificulta la función del habla, poca coordinación muscular, fatiga general y respiración alterada.

La toxina es responsable de la parálisis muscular debido a que esta se interna al sistema nervioso por medio de endocitosis llegando a las vesículas sinápticas llenas de

neurotransmisores especialmente de acetilcolina, molécula encargada de realizar funciones de contracción muscular, esta toxina proteolítica actúa en la inhibición de receptores de acetilcolina hidrolizando las terminales nerviosas ocasionando que no exista contracción hasta llegar a causar la muerte por medio de asfixia o anoxia al bloquear la función respiratoria. (Cammack *et al.*, 1999).

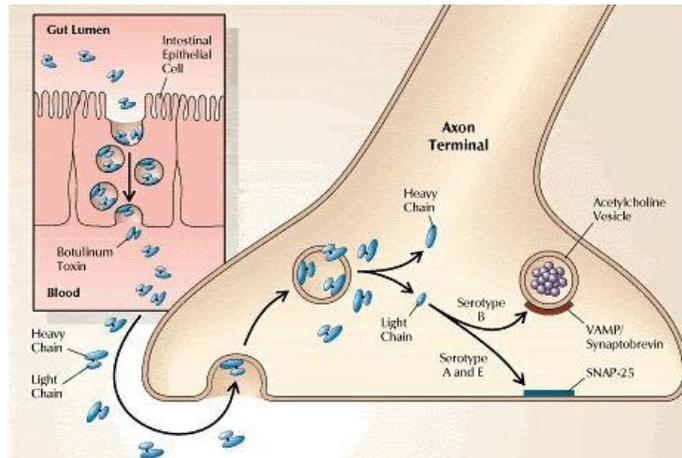


Figura 5.- Mecanismo de acción de la toxina botulínica. (Honkiel et al, 2008)

3.7.3.-Formación de complejo rosado (oximioglobina).

Los nitritos ayudan al aporte de color rosado en los productos cárnicos por medio de un mecanismo de óxido reducción, el nitrato es oxidando parcialmente a nitrito en donde una parte del ion nitrito está unido a la mioglobina formando la NO-mioglobina reduciendo el Fe^{3+} a Fe^{2+} presente en la hemoglobina de los trozos de carne transformándola en oximioglobina dando coloraciones rosadas o rojizas deseables en los productos cárnicos (Figura 6); el complejo formado es estable a las condiciones de temperatura de almacenamiento ($4^{\circ}C$) y pH entre 3.5 y 5.5 además de una muy buena solubilidad de las sales de cura. En estas condiciones el porcentaje de disociación es entre 55% y 99%, y es estable al calor. (Folres, 2016, Honikel, 2007)

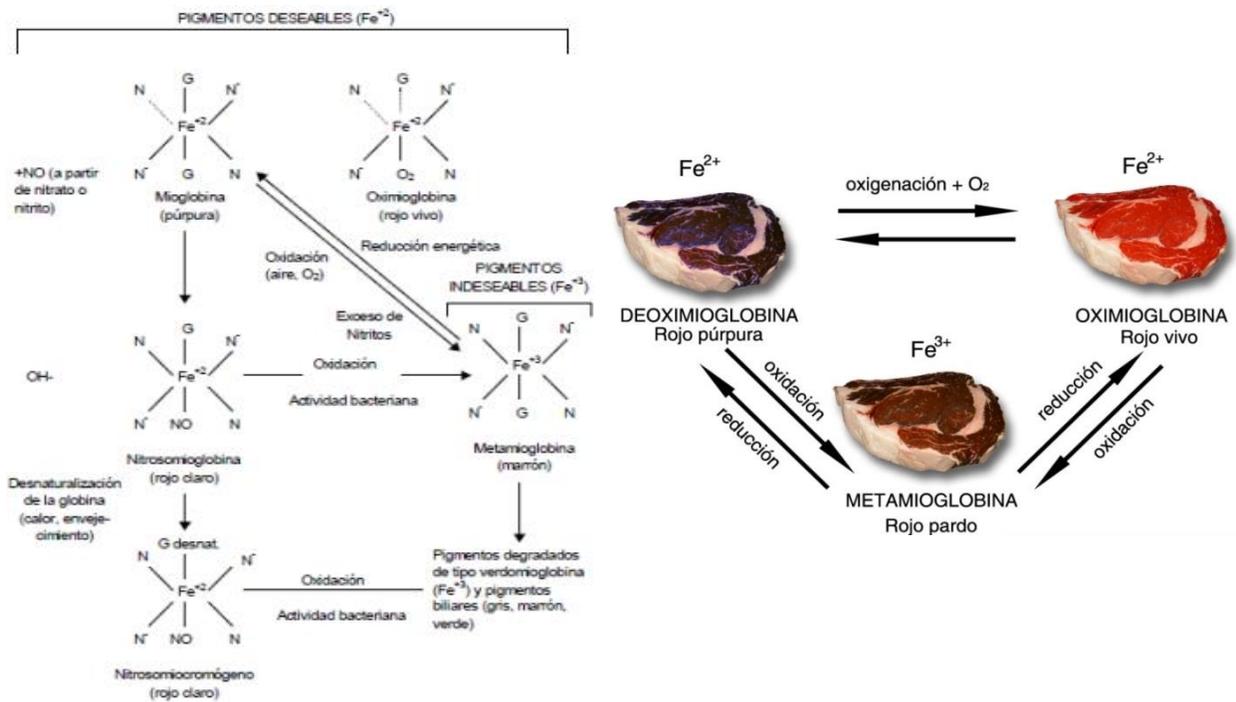


Figura 6.- Formación de oximioglobina por medio de la reducción de Fe³⁺. (Chammack *et al*,

El nitrato puede reducirse a nitrito en productos cárnicos crudos por acción de microorganismos o bien por el pH ya que existen reacciones de oxidación y reducción; los nitritos pueden sufrir diversos cambios pues pueden ser reducidos a ácido nitroso en un medio ácido creando un equilibrio con los óxidos NO y NO₂, el NO también reacciona con mioglobina o aminoácidos como la Cisteína o Glutatión dando paso al hemocromóforo llamado NO-mioglobina siendo un complejo rosado favorable para estos productos.

El ácido nitroso que no fue oxidado en un principio pierde agua transformándose en ácido nitroso anhídrido que posteriormente es disociado en dos moléculas NO y NO₂, las cuales siguen el mecanismo anteriormente mencionado, el NO se une a la mioglobina y el NO₂ es transformado en ácido nitroso siguiendo así un ciclo hasta que todos los componentes son completamente disociados o bien, se agote el sustrato de reacción.

Una de las especies químicas que tiene gran relevancia en el mecanismo de formación de ácido nitroso es el ácido ascórbico, pues tiene propiedades como agente antioxidante capturando las moléculas de oxígeno presente.

El ácido ascórbico oxidado se transforma a ácido deshidroascórbico y tiene la capacidad de unirse con el NO libre actuando como un antioxidante que captura los radicales libres o iones que no reaccionaron durante el mecanismo oxidación de nitratos y nitritos, por ello se ha observado que el ácido ascórbico reduce la formación de nitrosaminas. (Honikel *et. al*, 2007)

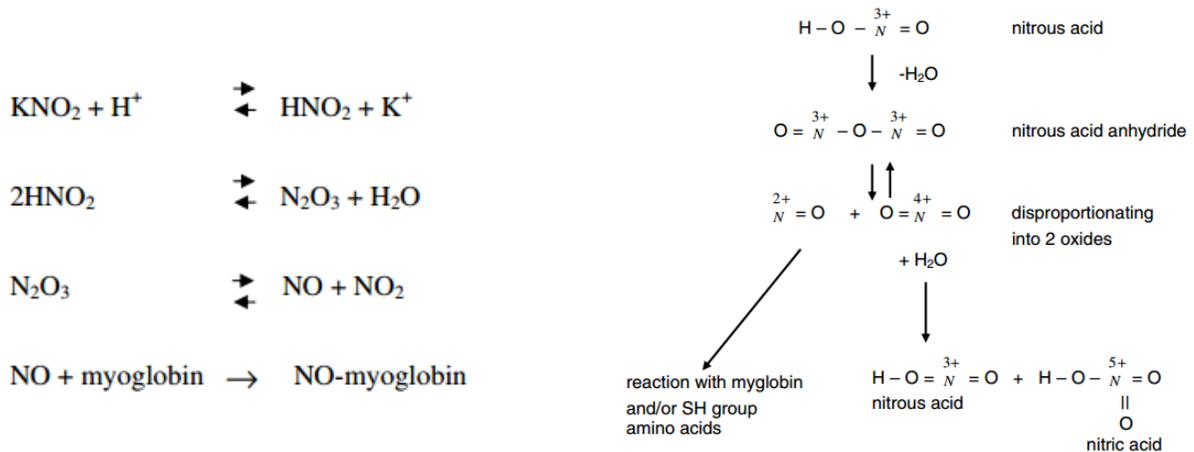


Figura 7.- Mecanismo de oxidación y reducción de nitritos en productos cárnicos. (Honikel *et. al*

Por ello los nitritos son un parámetro de calidad importante en los productos cárnicos resaltando el efecto antimicrobiano, así como el mecanismo de acción de nitritos para fomentar el color, además de reaccionar con el hierro y algunas aminos presentes en los productos ayudando a la estabilidad del complejo formado.

De acuerdo a las normatividades internacionales la cantidad agregada de nitritos de sodio no debe ser mayor a 156 ppm y una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0.07mg/kg.

La FAO/WHO y NOM-213-SSA1-2002 especifican los límites permisibles de este aditivo ya a que el exceso de nitritos puede ocasionar la formación de deoximioglobina presentando coloraciones verdes o azules por la formación de la mioglobina debido a que el nitrosopigmento se ve oxidado por el exceso nitritos teniendo una apariencia indeseable en los productos.

En el ser humano el exceso de nitritos puede ser reducido dentro del tracto digestivo reaccionando con aminos y formando compuestos N-nitroso asociados con precursores carcinogénicos.

3.8.-Consumo de carne el mundo.

La carne es uno de los productos con mayor consumo a nivel mundial por sus características nutricionales, sensoriales y diversidad de preparaciones, no solo hablando como corte de carne sino como producto cárnico ya que juega un papel importante el tipo de dietas habituales en el mundo; por ejemplo, en México el consumo de carne al año oscila entre los 14 a 20 kg, mientras que en Estados Unidos de Norteamérica es casi 3.5 veces mayor a nuestro país (SIAP,2016), esto adjudicado al precio, hábitos de consumo, entre otros factores.

De acuerdo a información difundida por la FDA en el año 2015 el consumo per cápita de carne de cualquier especie (ave, bovino, cerdo) a nivel mundial son los siguientes (Tabla 3):

Tabla 3.- Países con mayor consumo per cápita de carne. (SIAP, 2016)

Países	Kg de carne por año
1.-Australia	93
2.-E.U.A	91.1
3.-Israel	86
4.-Argentina	84.7
5.-Uruguay	82.9

Como se puede observar en la Tabla 3 hay tres países que se localizan en el continente americano (E.U.A, Argentina y Uruguay), ya que países como E.U.A y Argentina son dos de los principales exportadores e importadores de carne de bovino principalmente, países como E.UA los cuales ocupan el primer lugar en producción de carne de ave y bovino con un aproximado de 17,396,881 toneladas de carne de ave al año y 11,698,479 toneladas de carne de bovino al año representando aproximadamente el 18.1% y 18.2%, respectivamente, de la producción mundial en el año 2015.

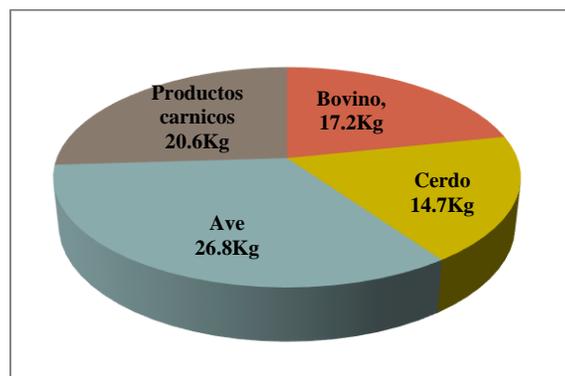
México tan solo exporta 2, 808,032 toneladas de carne de ave y 1, 806,758 toneladas de carne de bovino siendo el quinto productor a nivel mundial en ambos aspectos. (SIAP, 2016)

La carne de cerdo es uno de los productos con mayor cantidad de importación y consumo en el mundo, de manera específica en el continente asiático la base de su alimentación es el pescado, arroz y carne de cerdo, por ello el claro reflejo de este alto consumo es que China tiene la mayor producción de carne de cerdo con 52, 733,000 toneladas al año lo que representa el 46.7% de la producción mundial. México es un país poco productor de carne de cerdo con 1, 283,672 toneladas por año lo cual representa tan solo el 1.1% de la producción mundial. (SIAP, 2019)

3.9-Consumo de carne y productos cárnicos en México.

En México el consumo de carne y productos cárnicos procesados en los últimos años han aumentado ya que de acuerdo al Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera(SIAP) el consumo de carne per cápita en el año 2016 fue de 17.2Kg de carne de bovino, 14.7Kg de carne de cerdo y 26.8Kg de carne de pollo (Gráfica 1), siendo estas las tres especies de mayor consumo a nivel nacional como corte de carne o pieza; pero si hablamos del consumo de productos cárnicos procesados, el consumo se encuentra por debajo de la carne de pollo y por encima de la carne de bovino y cerdo con un consumo de 20.6 kg per cápita de productos cárnicos procesados, esta cifra representa actualmente uno de los productos de la canasta básica de preferencia de consumo dentro de los primeros cinco productos por debajo de productos como refrescos, tortilla, pan dulce y carne.

Gráfica 1.- Consumo per cápita de carne y productos cárnicos en México. (SIAP, 2016)



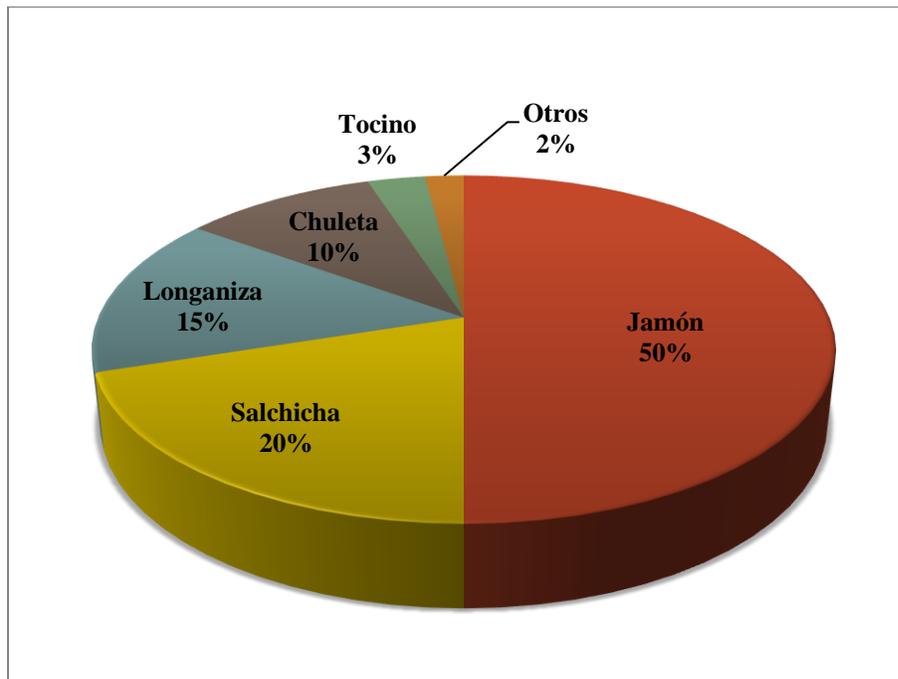
La Gráfica 1 muestra que la carne con mayor consumo en México es la carne de ave (en su mayoría pollo), ya que el precio promedio de kg de pollo entero es de \$30 pesos M/N siendo una cantidad accesible al ser comparado con el kilogramo de milanesa de cerdo con un costo promedio de \$80 pesos M/N y aún más accesible que un corte de carne de bovino que en promedio tiene un precio de \$140 M/N por kilogramo, por ende el pollo es uno de los productos cárnicos de mayor consumo.

En la Gráfica 2 se puede observar el porcentaje de consumo según la preferencia de consumo de productos cárnicos procesados a comparación de las piezas cárnicas, esto adjudicado a la facilidad de la preparación de estos, la accesibilidad de los productos y sobre todo a el precio ya que éste es uno de los principales factores por el cual se eligen productos cárnicos procesados.

De acuerdo a las estadísticas anteriormente mencionadas, en promedio al año se consumen alrededor de 20.6 kg de productos cárnicos procesados, esto significa que en la dieta promedio de un mexicano por día se consume en promedio 57 gramos mínimo de productos cárnicos procesados. A continuación, se muestran los productos cárnicos de mayor consumo en México:

- Jamón 10.3Kg per cápita
- Salchicha 4.13Kg per cápita
- Longaniza 3.09Kg per cápita
- Chuleta de cerdo 2.06Kg per cápita
- Tocino 0.618Kg per cápita
- Mortadela, salami y otros productos cárnicos 0.412Kg per cápita

Gráfica 2.-Preferencia de consumo de productos cárnicos en el año 2016. (SIAP,2019)



La Gráfica 2 muestra la preferencia de consumo de productos cárnicos, en donde el consumo de jamón representa el 50% del consumo diario de productos cárnicos procesados porque oscila en un precio accesible, variedad de marcas, precios, sabores, tamaños, formas y facilidad de compra, los precios de jamón en lugares como la central de abasto varia de los \$50 a \$60 pesos el kilogramo, hasta encontrar jamones tipo York con un contenido del 20% de pernil de cerdo con un precio por arriba de los \$300 pesos M/N.

Otros productos cárnicos de mayor consumo son la salchicha en sus diferentes tipos y variedades (Viena, pavo, adobadas, pollo, alemanas, tipo Frankfurt etc.), su precio está entre los \$60 a \$63 pesos hasta las de un precio de \$150 pesos el kilogramo, por ello los productos cárnicos ocupan el segundo lugar en preferencia de consumo a diferencia de la carne de bovino y de cerdo.

El resto de los productos cárnicos como la longaniza, chuleta, salami, mortadela, entre otros productos cárnicos, solo son consumidos de manera esporádica debido a que los precios de estos en ocasiones se encuentran a la par de cortes provenientes del cerdo (\$80 pesos M/N) además de que en su mayoría de los productos cárnicos anteriormente

mencionados son acompañantes de algunos otros platillo, por ende el consumo solo es por periodos o de manera ocasional si son comparados con productos cárnicos como salchichas y jamón que en repetidas veces es el desayuno o la merienda de muchos mexicanos.

3.10.-Determinación de nitritos.

Existen diferentes técnicas para la determinación de nitritos, la cual dependerá directamente de la fuente de nitritos que se quieren cuantificar ya sea en agua o como en nuestro caso en un producto cárnico, aunque mayoritariamente se cuantifican por medio de espectrofotometría UV debido a la formación de compuestos azo con coloraciones rojiza o magenta.

Algunos de los métodos que se emplean para la cuantificación de nitritos y que pueden ser aplicados en la detección de este ion en productos cárnicos son los siguientes:

3.10.1-Determinación de nitritos en agua por método espectrofotométrico:

Este tipo de metodología se encuentra fundamentada en que la espectrofotometría o radiación de luz excita a los átomos de las moléculas por medio de una radiación atómica siempre y cuando esta radiación se encuentre en la longitud de onda indicada y con ello obtener una lectura de la cantidad de absorción a esa longitud de onda. En el caso específico de la cuantificación de nitritos, el ion nitrito (NO_2) reacciona con la sulfanilamida en medio ácido generando una sal de diazonio que, a su vez, mediante una reacción de acoplamiento con clorhidrato de N-1-naftiletildiamina, es estabilizado por un buffer de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ a pH 8.5, generando un azoderivado color rojizo o magenta que es cuantificado por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

Este método colorimétrico se encuentra directamente relacionado con la Ley de Lambert-Beer, la cual explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que atraviesa la luz si se conoce esta la longitud de onda, en este caso la longitud de onda para realizar la cuantificación de este complejo colorido producido es de 540nm donde la concentración de las sustancias puede ser deducida por medio de la cantidad de luz utilizando una curva patrón con soluciones de nitritos conocidas.

Dentro de este mismo método existen diferencias entre los reactivos empleados como lo es el ácido sulfanílico y naftiletilendiamina para desarrollar una sal de diazonio generando el mismo color rojizo o magenta.

3.10.2.-Determinación de nitritos por medio de Cromatografía iónica

Es un método automatizado que utiliza software y columnas para lograr una amplia capacidad de análisis de muestras, múltiples fases móviles, inyección directa de mezclas complejas que muestran su eficacia en análisis de compuestos y/o iones comparado con los métodos convencionales y la detección de concentraciones bajas de diferentes iones realizándose bajo el principio de par iónico con columna de fase normal para su detección por medio de UV haciendo un análisis simultáneo de nitritos y nitratos en muestras.(Trujillo,2009).

Esta metodología en cuanto a la detección de nitritos en productos cárnicos no es eficiente debido a la compleja composición de la matriz alimenticia, pues se tienen serias dificultades en la preparación y separación de diversos componentes (Flores *et. al*, 2016)

3.10.3.-Determinación por reactivo de Griess.

Este método de cuantificación utiliza el mismo principio de formación del complejo de una sal de diazonio de color rojo o magenta empleando el reactivo de Griess que contiene 0,2% de diclorhidrato de naftiléndiamina y 2% de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5%. En este método se cuantifican nitritos orgánicos, anteriormente empleando en la medicina forense como prueba presuntiva de envenenamiento por nitroglicerina. (Trujillo, 2009)

3.11.-Método de extracción de nitritos.

Los nitritos son un parámetro de calidad del producto terminado por ello es importante la cuantificación de los mismos; cabe mencionar que por la naturaleza del producto y del proceso de elaboración la cuantificación de estos es compleja ya que durante el proceso hay pérdidas de nitritos debido a mermas o un inadecuado tratamiento de cura, entre otras cuestiones del proceso, así como reacción con aminas de las proteínas del producto cárnico.

El nitrito de sodio es una molécula que tiene un peso molecular de 69 gramos de los cuales el 66.67% pertenece a NO_2 y el 33.37% pertenece a Na^+ , es una sal que tiene una

buena solubilidad en agua con un valor aproximado de 82g/100 ml de agua por lo que la extracción de nitritos no representa un obstáculo, algunos de los métodos mayoritariamente empleados para la extracción de nitritos son los siguientes:

3.11.1.-Extracción por medio de suspensión.

De acuerdo a la NOM-231-SSA1-2002 el método oficial de extracción de nitritos en productos cárnicos es realizado por medio de la molienda del producto a analizar, pesando 2 gramos de producto cárnico y agregando agua a 80°C (libre de nitratos y nitritos) haciendo una suspensión en agitación continua con un tiempo aproximado de 2 horas para posteriormente ser filtrado y aforar con volumen final de 250mL. En la presente norma la extracción únicamente se realiza por medio de una suspensión con agua a temperatura de 80°C con la finalidad de ayudar a la solubilización de los nitritos para aumentar el porcentaje de extracción.

3.11.2.-Extracción por ultrasonidos focalizados.

Los ultrasonidos focalizados son una tecnología de innovación que se basa en la emisión de ondas sonoras de aproximadamente 20 kHz, las cuales dependerán del equipo a emplear y la muestra a analizar, la fuerza emitida ocasiona la ruptura de paredes celulares haciéndolas más permeables debido a la formación de poros en la pared celular afectando estructuras biológicas que debido a la fuerza de presión colapsan dejándolas expuestas al medio en donde se encuentran.

Cuando se aplican los ultrasonidos focalizados a las muestras cárnicas aumentan la suspensión de partículas y su permeabilidad debido a que a bajas frecuencias y altas intensidades generan el colapso de cavidades que son ocasionadas por la generación de burbujas simétricas en la interface dentro de la muestra a analizar teniendo un mayor contacto de superficie sobre el sólido vibrando las partículas del disolvente.

La muestra sólida a analizar debe de tener una preparación previa de molienda para tener mayor superficie de contacto para fomentar la disolución del analito a cuantificar, en este caso específico son los nitritos. Esta técnica es la más económica dentro de todas las técnicas de extracción ya que los requerimientos instrumentales son mínimos. (Cristobal, 2017)

De acuerdo a estudios recientes la extracción por ultrasonidos focalizados tiene una eficacia alrededor de 70 veces más que la ocupada por solventes, 11 veces mayor que la destilación y 35 veces mayor que el Soxhlet (Azuola, *et al* 2007, Farid *et al.*, 2016)

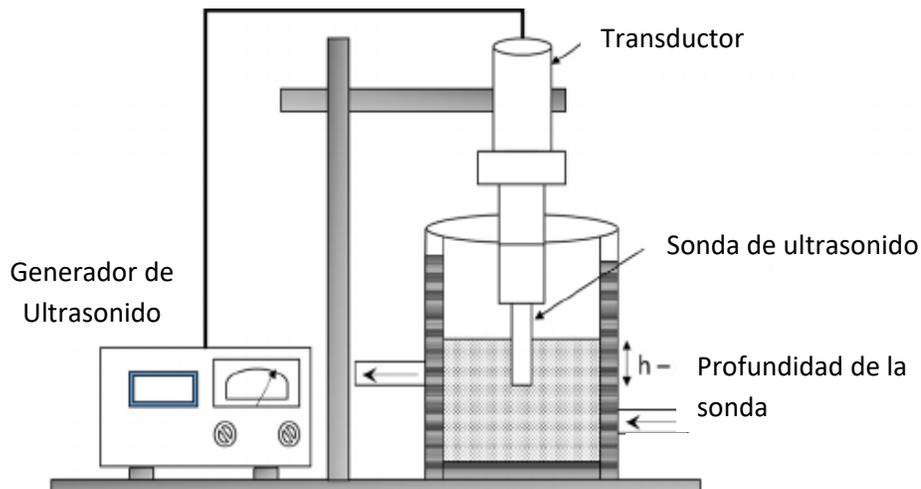


Figura 8.- Diagrama del instrumento de Ultrasonidos focalizados. (Cristobal, 2017)

3.12-Microfluidica.

La microfluídica es la ciencia y tecnología que utiliza sistemas miniaturizados con gran variedad de formas, estructuras y funcionalidades para procesar y manipular cantidades pequeñas de fluidos (entre 10^{-18} a 10^{-6} litros), usando canales cuyo tamaño está entre decenas y cientos de micras (Whitesides, 2006). El objetivo de los sistemas de microfluídica es automatizar los procesos bioquímicos de laboratorio para obtener análisis con la ventaja de poder realizar un mayor número de análisis en función del tiempo, disminuir el consumo de reactivos y muestra, obtener una metodología de bajo costo y una cuantificación de reacciones aceleradas.

Los microchips pueden ser contruidos con diferentes materiales como resinas, elastómeros, vidrio, etc. (Ríos *et al*, 2012), estos dependerán de manera directa con el tipo de reacción, así como el tipo de reactivos y características propias de la reacción.

La microfluídica es empleada como método de análisis de fluidos, sistemas de pequeñas dimensiones señalados como microchips los cuales pueden ir desde estructuras que miden tan solo unos milímetros hasta centímetros conformando una plataforma para la

integración de diferentes operaciones con el objetivo de desarrollar dispositivos analíticos microfluídicos.

De acuerdo a estudios realizados en los últimos años, al compararse este método con otras metodologías de análisis como cromatografía de gases o HPLC esta tecnología de innovación poco a poco supera a los sistemas robotizados de manipulación de fluidos ya que proporciona un alto rendimiento y un análisis mucho más rápido que facilita la integración de diferentes pasos en un solo dispositivo ayudando a que el análisis de datos sea más eficiente por la utilización de un solo equipo.

Estos dispositivos cumplen con los requerimientos y requisitos de la industria alimentaria sobre todo en el área de control de calidad ya que representa mayor eficacia y eficiencia en el análisis de alimentos englobando pasos importantes en el control de calidad de alimentos como son: detección de diversos analitos importantes en la recepción de la materia prima, detección de una sustancia con límites permisibles durante el proceso de elaboración y análisis final para obtener un producto de calidad. (Atalay *et al.*2011)

Existen algunas limitantes en el empleo de la microfluídica utilizando microestructuras o microchips ya que dicha metodología no se encuentra validada en cuanto al uso de los dispositivos como un sustituto del método oficial de cuantificación de algún analito, esto se debe a que es una tecnología aun en desarrollo y no se han estandarizado la elaboración de microchips así como las preparaciones de las muestras, medidas estándares de los dispositivos usados y metodologías empleadas para su elaboración, entre algunos otros parámetros importantes a considerar para que estos se encuentren estandarizados; aunque de manera formal este tipo de metodologías no son oficiales, sí pueden servir como una referencia de manera interna en las empresas como un método de comparación con los métodos oficiales por las normatividades vigentes teniendo como beneficio que los residuos son mínimos así como la rapidez del análisis y facilidad en el manejo de datos reduciendo el tiempo hasta un 50% comparándolos con los de referencia. (Atalay *et al.*2011)

3.13- Componentes del dispositivo analítico microfluídico.

De manera práctica se busca que los dispositivos empleados sean prácticamente automatizados o integrados a sistemas dependiendo de la capacidad para realizar

funciones estándar de laboratorio tales como operaciones de mezclado que llevan a cabo la reacción, separación y la detección del analíto de interés, por lo tanto el éxito de miniaturización y comercialización de los productos empleados dependen de la fiabilidad de sus componentes incluyendo bombas, válvulas y detector; sus características principales son las siguientes: (Chen, *et al*, 2010 Atalay *et al*.2011)

3.13.1.-Bombas.

Las bombas son la parte fundamental de la microfluídica ya que de estas dependerá el paso de los fluidos para que se lleve a cabo la reacción dentro de los dispositivos diseñados teniendo un control preciso del caudal. En microfluídica, las bombas mayoritariamente empleadas son las no mecánicas, esto quiere decir que son bombas de flujo continuo las cuales están basadas en el principio de capilaridad y tensión superficial. (Atalay *et al*.2011)

3.13.2.-Mezcladores.

Los dispositivos elaborados no contienen de manera física un sistema de mezclado como tal debido a los pequeños tamaños de las estructuras, pero estos mezcladores físicos no son necesarios debido a que el mezclado de las sustancia se realiza en las siguientes circunstancias: una de ellas es regulando el caudal en cuanto a la entrada de reactivos propiciando que estas confluyan dentro del dispositivo, y otra de ellas es la forma física de los canales empleados para llevar a cabo la reacción, ya que el flujo dentro de estos dispositivos tiene una características laminar, pues cuando las corrientes del fluido se mezclan dentro del microcanal la zona de difusión de las corrientes crece cubriendo todo el ancho del canal, lo cual dependerá de la longitud y forma física (recto, serpentín o curvo) fomentando la mezcla de los reactivos dentro de los canales tomando en cuenta la profundidad, difusividad de los reactivos, entre otros factores propios de las características físicas de las estructuras elaboradas. (Atalay *et al*.2011)

3.13.3.- Válvulas.

Las válvulas son a menudo los componentes más importantes en los sistemas microfluídicos integrados debido a que controlan el transporte de pequeños volúmenes

de los líquidos en los sistemas elaborados siendo estos una parte esencial para que se puedan llevar a cabo la cuantificación; el control de las válvulas se debe a una cuestión geométrica debido a que las intersecciones del canal distribuyen los flujos y el paso de los componentes, aunque en sistemas más grandes estas válvulas son físicas y en la mayoría de las ocasiones son ocupados en sistemas de flujo continuo controlando el paso de los reactivos y muestras mediante una “inyección” de la muestra para su posterior cuantificación en un sistema de detección o bien, dando paso al flujo y fomentar la reacción para formar el complejo colorido para la cuantificación del analito. (Chen, *et al*, 2010)

3.13.4.-Sistemas de detección.

Debido a la cantidad de volúmenes que se manejan en los sistemas microfluídicos se necesitan detectores con una alta sensibilidad para cuantificar los analitos presentes en las muestras y lograr determinar su concentración. De manera ideal estos sistemas (espectrofotométricos UV visible o sistemas HPLC) deben ir acoplados con la finalidad de tener métodos automatizados, aunque debido a características de los materiales empleados para la elaboración de las estructuras de microfluídica, la integración de sistemas de detección aún es complicados, por lo que los productos de reacción son recolectados y posteriormente cuantificados en algún sistema de detección que cuantifique el analito buscado.

Los microdispositivos y su funcionamiento son una tecnología de innovación ya que su elaboración es fácil y va de la mano con la nanotecnología, haciendo que la eficiencia de la cuantificación de compuestos analíticos ya sea farmacéuticos, biológicos y alimentarios sean más eficientes, rápidos, seguros y fáciles de usar, abriendo nuevos horizontes en los análisis en diferentes ramas científicas tomando en cuenta que estos dispositivos funcionan como un laboratorio miniatura.

3.14.-Fabricación de microchips.

Como se mencionó, la microfluídica es una nueva rama de la química analítica que hace uso de la nueva tecnología y ocupa como herramienta la creación de microdispositivos o microchips los cuales se valen de diferentes técnicas para su elaboración por la gran versatilidad de materiales con los que se pueden fabricar, tales son los polímeros de

acrilato, vidrio, celulosa, polidimetilsiloxano (PDM), resinas, entre otros compuestos que muestran capacidad de ser moldeables, seguros, no tóxicos, poco contaminantes y resistentes a la deformación posterior a la cura del dispositivo.

La elección del material a emplear dependerá de manera directa del análisis, buscando que este no interfiera con la cuantificación o cause interferencia después de que se lleve a cabo la reacción dentro del chip.

En años recientes el polímero mayoritariamente empleado en la elaboración de estos dispositivos es el PDMS por ser un polímero moldeable, de características hidrofóbicas y soluble en algunos disolventes orgánicos.

Para la elaboración de estructuras con diferentes materiales existen técnicas estandarizadas las cuales se mencionarán a continuación:

3.14.1.-Forjado.

Es el proceso de fabricación de objetos por deformación plástica que puede realizarse en caliente o en frío y en donde la deformación del material se produce por la aplicación de fuerzas de compresión. En esta metodología se moldea una oblea de acero inoxidable u otro material que no interaccione con los reactivos, muestra o análisis.

De manera común la placa compresora ya tiene litografiada la estructura del chip, la placa es puesta en una compresora que marcará la lámina de acero para posteriormente ser cortada, perfeccionada y pulida.

De manera habitual el chip es conformado por dos piezas con las mismas medidas a fin de hacer estructuras cerradas y que al ser unidas ambas ejerzan la presión necesaria en su interior para formar una tubería por donde pasarán los líquidos para su posterior recolección y cuantificación.

La desventaja que tienen estos chips es que el proceso es costoso por el material empleado, la maquinaria que se necesita para hacer el forjado, la precisión de la placa del diseño y la figura, ya que deben de ser prácticamente iguales para que embonen las dos partes. (Chen, *et al*, 2010)

3.14.2.-Litografía.

Es el método mayormente empleado para la elaboración de microchips debido a la facilidad de elaboración de los dispositivos y su inconveniente es el diseño previo de un molde impreso en una placa utilizando diferentes métodos de moldeo como lo es en pastilla e impresión láser en placa de vidrio o un polímero compatible con el material, utilizando programas de diseño como DraftSight, AutoCAD, Freehand.

La fabricación de microdispositivos tienen una enorme ventaja frente a métodos normalmente empleados ya que al tener una gran diversidad de materiales permiten la formación de diseños complejos, por ello se busca un elastómero que sea resistente, ampliamente moldeable, con propiedades hidrofóbicas y reactividad prácticamente nula, esta técnica es denominada como litografía suave. (Chen, *et al*, 2010)

3.14.3.-Litografía suave.

La litografía suave es el método mayormente empleado para la elaboración de microchips por los elastómeros maleables utilizados. La característica física del pre-polímero es que es semilíquido y con ello puede ser vertido sobre los moldes litografiados con el dispositivo dibujado.

El elastómero empleado es el PDMS, un gel fácilmente adherible a la superficie del sustrato sobre un área relativamente grande y se ajusta a la forma del molde (tipo adhesivo) sobre superficies no polares de la placa en la cual se encuentra el diseño; el molde es fácilmente desmontable para no romper la estructura elaborada, químicamente inerte, homogéneo, incoloro, prácticamente transparente y dependiendo de la reacción se puede reutilizar hasta 100 veces o más sin notar degradación de la estructura, aunque esto depende del tipo de solventes por ejemplo n-hexano presenta cierta solubilidad y con ello la degradación de los microchips elaborados. (Gaal *et al.*, 2016)

3.15.-Impresión en 3D.

Una de las tecnologías emergentes y de gran importancia dentro de la construcción de microchips es la impresión en tres dimensiones que ofrece una mayor diversidad de materiales como celulosa, vidrio, resinas y polímeros semilíquidos facilitando el manejo de los materiales mostrando una gran diversidad de los mismos en comparación con la litografía.

Una vez impresa la figura debe de tener un proceso de cura por medio de una luz UV con la finalidad de terminar de polimerizar la resina aun presente aportando mayor rigidez a la pieza impresa. La versatilidad de este tipo de impresión dependerá del tipo de elastómero empleado ofreciendo no solo diversos materiales sino propiedades estéticas que pueden ser aprovechables para la cuantificación de analitos fotosensibles, por ejemplo las resinas de color oscuro pueden ser ocupadas para la fabricación de estructuras que cuantifican compuestos sensibles a la luz y también que en la espectrofotometría UV no se vea interferida por la presencia de desviaciones de luz ya que un color oscuro permite la poca incidencia de luz externa.

La impresión de 3D tiene una gran versatilidad de formas para la elaborar de los microchips ya que la estructura puede tener dos usos: actuar como reactor o bien actuar como una placa litográfica para realizar el posterior moldeado y seguir los pasos subsecuentes como si se hiciera el procedimiento de litografía suave. (Gaal *et al.*, 2016)

3.15.1.-Tipos de impresión en 3D.

Como resultado de la gran versatilidad de usos y diseños por la basta cantidad de materiales utilizados para la elaboración de sus estructuras, existen diferentes técnicas y tipos de impresión 3D que serán descritas a continuación:

3.15.2.-Estereolitografía (SLA).

La esterolitografía también conocida como SLA (por sus siglas en inglés) es una técnica ocupada para la elaboración de piezas o dispositivos únicos, esto quiere decir que las figuras o dibujos formados se obtienen en una sola pieza dependiendo del programa de diseño y el tipo de impresora 3D, este proceso de fabricación se encuentra basado en la adición de una resina con características de polimerización por contacto con luz UV o también conocido como proceso de cura.

En dicho proceso la resina es colocada en un tanque o recipiente con una lámpara UV y un láser en su interior que realiza la construcción y guía de las estructuras a imprimir; los objetos tridimensionales son obtenidos mediante la adición de finas capas impresas una encima de otra, cada capa es una sección transversal del objeto que el láser traza en la

superficie de la resina; la resina líquida es curada y se solidifica mediante la exposición al láser de luz ultravioleta, quedando así la capa recién solidificada pegada a la capa previa que existía debajo de ella y así sucesivamente hasta obtener la estructura diseñada. (Chen, *et al*, 2010)

Una vez que la capa a imprimir ha sido creada, la plataforma de elevación del equipo desciende una distancia equivalente al grosor de una capa de resina solidificada (típicamente entre 0.05mm y 0.15 mm), una hoja barre la pieza dejando una nueva capa de resina líquida en la superficie de la cubeta, lista para la siguiente impresión del láser, de esta forma se va creando capa a capa una pieza tridimensional. Teniendo la pieza completa, se sumerge en un solvente orgánico (alcoholes en su mayoría) para solubilizar el exceso de resina y posteriormente curarla en un horno de luz ultravioleta. (Chen, *et al*, 2010)

La estereolitografía necesita de una estructura para soportar la pieza a la plataforma de elevación de forma que se evite la deflexión por gravedad y que sujete la sección transversal en el lugar correcto para que no se deslice cuando pasa la hoja de re-aplicación de resina.

Los soportes suelen ser generados automáticamente durante la preparación del modelo por el programa de diseño, aunque podrían requerir intervención manual, estos deben ser retirados una vez realizado el proceso final de cura. (Gaal *et al* 2017)

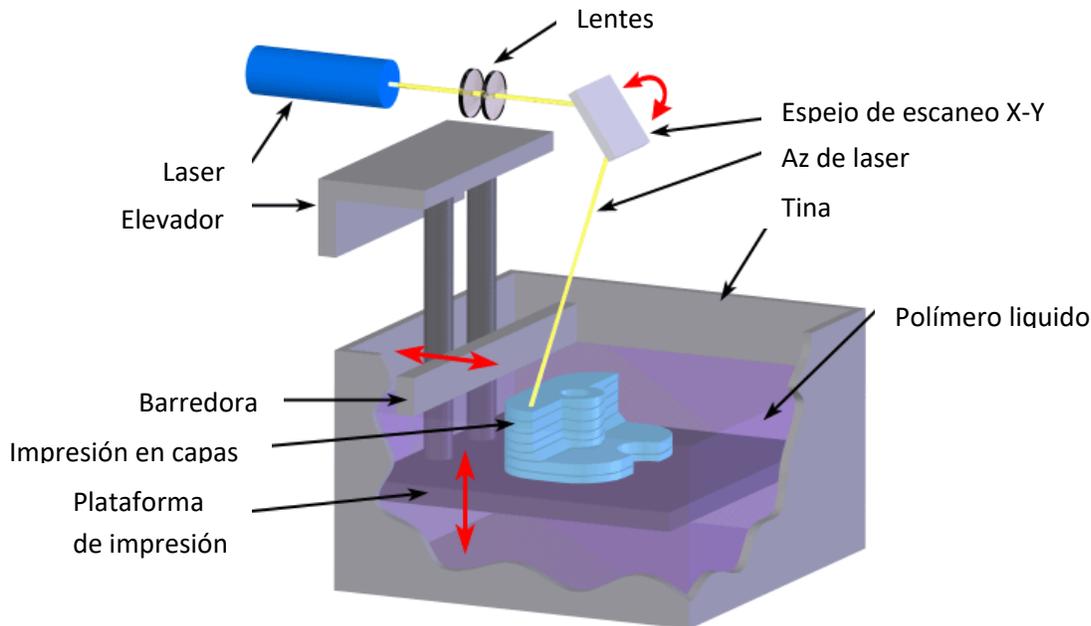


Figura 10.- Diagrama interno de la impresora estereolitográfica. (Chee et al, 2015)

Este tipo de impresión tiene una gran ventaja comparada con la litografía suave debido a la rapidez de su formación ya que los objetos impresos por este tipo de tecnologías pueden ser producidos en menos de un día tardando tan solo unas horas dependiendo del tamaño y complejidad de la pieza elaborada.

El acabado superficial de las piezas es muy bueno, normalmente mejor que el obtenido mediante la impresión de láser, además las piezas no salen con restos de polvo como pasa con las piezas producidas mediante impresión por láser selectivo; las estructuras elaboradas con esta impresión no son porosas lo que hace innecesario el tratamiento de sellado posterior para hacerlas impermeables al agua o aire. (Gaal *et al* 2017)

Una de las grandes desventajas de este tipo de impresoras es la sensibilidad para hacer estructuras con medidas por debajo de los 0.300mm y el éxito para que funcione la pieza impresa, pues la limpieza después la impresión es el factor determinante ya que si la resina contenida en su interior no es adecuadamente eliminada, o el exceso de la misma no es solubilizada, ésta al ser pasado por un proceso de post-cura, es polimerizado quedando una estructura rugosa o poco funcional.

Las piezas fabricadas por medio de este tipo de impresión pueden tener diversas funciones: como una estructura directa para la cuantificación actuando como chip ya que las resinas son prácticamente inertes a diversas soluciones siendo un buen medio para la cuantificación de analitos y evitando la degradación en soluciones, ácidas, básicas o con disolventes orgánicos, catalogándose como una estructura altamente funcional; o bien como un molde para realizar microchips utilizando materiales como el PDMS por su buena adherencia y la facilidad para desmontarlo del molde actuando como un sustituto de la oblea empleada de manera normal para la elaboración de microchips por litografía suave. (Chen, *et al*, 2010)

El costo de este tipo de impresión es bajo comparado con la impresión láser ya que una impresora de características estereolitográficas oscila entre \$60,000 hasta \$300,000 pesos mexicanos y las resinas de \$1500 hasta \$2000. (MiiCraft, 2016)

3.15.3.-Sintetizador selectivo por láser (SLS).

En la impresión por el método SLS se emplean polímeros en forma granular o en polvos fácilmente fundibles que tienen la capacidad de ser solidificados de nuevo por medio de un proceso de cura; estos son depositados dentro de una cuba que se calienta a una temperatura ligeramente inferior al punto de fusión del polvo y un láser de CO₂ de alta potencia que fusiona pequeñas partículas de plástico, metal, cerámica o cristal de manera granular. El láser es encargado de sinterizar el polvo en los puntos seleccionados causando que las partículas se fusionen y solidifiquen; a diferencia de los procesos de litografía y estereolitografía éste se lleva a cabo bajo un proceso continuo agilizando la elaboración de las piezas. (Gaal *et al* 2017)

La densidad de las piezas terminadas depende de la potencia pico del láser, de manera habitual el tipo de láser empleado en este tipo de impresiones es el de pulso siendo la fundición del polvo al paso esencial para que la fabricación de los microchips por lo que el precalentamiento del polvo base en la cubeta debe ser a una temperatura ligeramente inferior a la de fusión de dicho material, de esta forma hace que la fusión del material por calentamiento sea más sencilla. Este proceso químico de fundición puede conllevar a una fusión completa, parcial o en fase líquida, pero este dependerá del material. La mayoría de los equipos utilizan un polvo con dos componentes ya que típicamente polvo recubierto o una mezcla de polvos. (Chen, *et al*, 2010)

Una de las ventajas frente a otros métodos es la alta reproducibilidad de fabricación pues se pueden conseguir piezas con densidades iguales (piezas en serie).

Las ventajas que presenta la impresión de tipo SLS frente a procesos de fabricación por adición, como la estereolitografía (SLA) y deposición de hilo fundido (FDM), es que la sinterización selectiva por láser no necesita de soportes ya que la parte sinterizada está todo el tiempo rodeada de polvo sin sinterizar que actúa de soporte, puede producir piezas a partir de un rango relativamente amplio de materiales de polvo resultando fáciles para la fabricación de piezas de geometría muy compleja directamente de los modelos digitales CAD, considerándose un método de obtención de prototipos rápido. Se está usando cada vez más en la producción de tiradas cortas de piezas para uso final. (Gaal *et al* 2017)

Las desventajas que presenta este método son: la limpieza de las piezas, ya que en algunas ocasiones el polvo de las estructuras no sale de los canales ocasionando que la pieza no sea funcional, otra de ellas, es que las impresoras son costosas ya que su precio en el mercado es de más de \$800,000 pesos mexicanos y el precio de materia prima por arriba de los \$10,000 aunque sigue siendo un buen método para la elaboración de microchips. (MiiCraft, 2016)

3.16.- Diseño de estructura 3D

Existen diferentes programas de diseño, destacando de entre ellos SOLIDWORKS PREMIUM 2016 un software operativo tipo CAD (diseño asistido por computadora) que ayuda al dibujo y diseño de figuras mecánicas para moldeado en 3D en sistema operativo Microsoft Windows. El programa permite modelar piezas dibujando planos técnicos con la información necesaria para la producción de las piezas en las que se desee trabajar y con ello diseñar no solo piezas únicas sino armar sistemas complejos con movilidad haciendo planos lógicos reduciendo distancias lo mayor posible para la eficacia del sistema a emplear, aunque el sistema llega a limitar algunos diseños y trazos, errores propios del sistema operativo construyendo trazos más lógicos para el aprovechamiento de materiales.(SOLIDWORKS PREMIUM, 2016).

En el mercado existen diversos programas para el diseño de las estructuras como son AutoCAD, Logical BRICKS CARD, Swift 3D entre otros programas que ofrecen diferentes

características para elaborar los dibujos de los canales, pero SOLIDWORKS presentan una gran ventaja a comparación de estos ya que conforme se realiza el dibujo del sistema, se puede observar la figura en 3D en un solo plano o en dos facilitando la visualización de los sistemas dibujados.

Los microchips diseñados en este programa pueden ser impresos en diversos tipos de impresoras 3D ya que se pueden guardar en más de 50 formatos, y son versátiles en cuanto a materiales utilizando polímeros de acrilato, teflón etc., dicha selección del material dependerá del tipo de reacción y reactivos que se emplearán con la finalidad de que no exista una intervención en la reacción a cuantificar, una sobre estimación u otro tipo de interferencias en la cuantificación.

3.17.-Efectos carcinogénicos de los nitritos.

El consumo de productos cárnicos en México en los últimos 15 años ha ido en aumento, tendencia muy similar a la observada en diversos lugares de Latinoamérica, así como en el continente europeo, algunas de las causas a las cuales se le atribuyen dicho aumento se debe al ritmo acelerado de vida y el tiempo reducido para preparar comida casera. Algunas instituciones como la OMS y FDA han observado que esta alta en consumo de productos procesados coincide con el aumento de cáncer en el esófago, entre otros problemas relacionados, por ello en años recientes se ha estudiado si existe una relación directa el consumo de productos cárnicos con dicha enfermedad, estudiando cuál de los ingredientes en los productos cárnicos podría ser el causante; por ello instituciones internacionales y nacionales como la OMS, FDA, UE, COFEPRIS, SAGARPA (por mencionar algunas) han puesto en boga la calidad nutrimental y la cantidad de sus componentes con la finalidad de observar si alguno de estos tiene un efecto negativo o es precursor de alguna enfermedad. Se han hecho análisis exhaustivos acerca de todos los ingredientes de diferentes productos cárnicos, así como el método de preparación, encontrando que el ingrediente en común son las sales de cura; cabe mencionar que la discusión de si se tiene o no un efecto cancerígeno lleva más de 40 años y no se ha demostrado una evidencia fidedigna que compruebe dicha teoría. (FDA, 2016)

La OMS tras analizar diferentes productos cárnicos estipuló la teoría acerca mecanismo de reacción: se sabe que la funcionalidad de las sales de cura depende en gran parte de

las proteínas, pues estas se unen a grupos de aminoácidos alterando sus estructuras y provocando un cambio original que pueden tener o no una restructuración correcta, existiendo con ello el riesgo de que estas alteraciones no se hagan de manera correcta y causen problemas funcionales y posibles riesgos mutagénicos, además existe un cierto porcentaje de que los iones nitrito no se unan a los sustratos quedando así radicales libres y causen daños.(OMS,2015)

La probabilidad de la teoría anteriormente mencionada es baja, pues como se ha mencionado la carne y la mayoría de los productos cárnicos tienen un contenido de proteínas que oscila entre el 19% al 21% teniendo la cantidad suficiente de sustrato para que los nitritos puedan tener una adecuada interacción con las aminos presentes que lo conforman resultando una vasta cantidad de sustrato para que los nitritos se unan de manera completa. (Sakai *et al* 1981, Dutt, *et al*, 2002)

Dentro del presente informe se menciona la existencia de una cierta reestructuración de los nitritos en el interior del cuerpo humano ya que se cree que una vez que se degradan las proteínas, los restos de aminoácidos quedan libres como radicales causando alteraciones celulares que dan lugar a problemas gastrointestinales; si bien es cierto que los nitritos se encuentran libres en el estómago pero la cantidad de residuos es mínima ya que los nitritos agregados en los productos se encuentran en miligramos por kilogramo (ppm), además de que posiblemente los iones sean neutralizados con los protones H^+ existentes en el interior del estómago debido a la amplia cantidad de HCl. (Cassens *et al.*,1997)

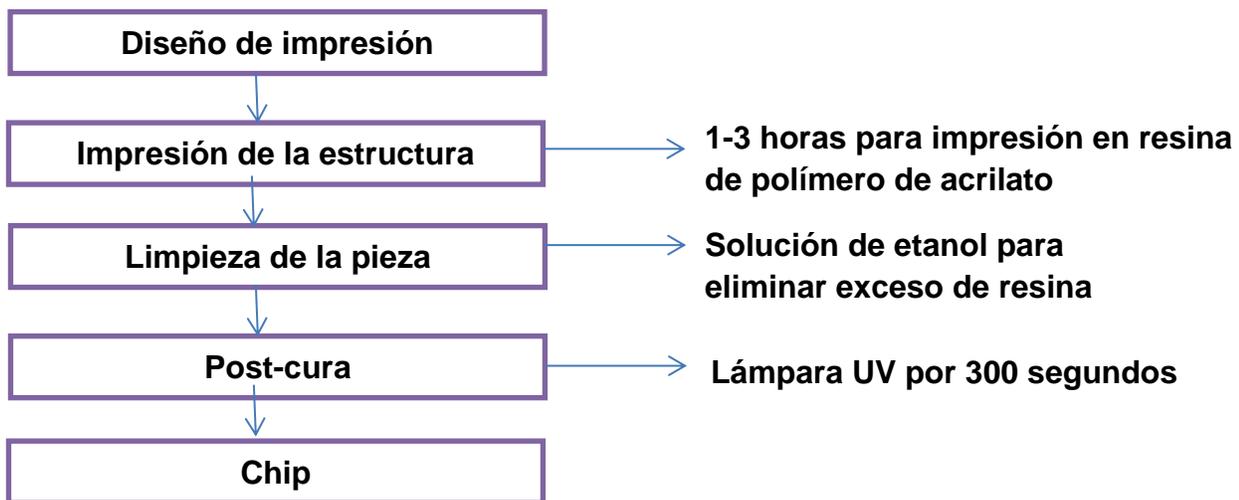
Aunque las propuestas de los mecanismos de reacción son diversas, no se ha llegado a una conclusión final de si los productos cárnicos (hablando en específico de los nitritos) tienen una involucración directa con efectos mutagénicos ya que estos productos no son la única fuente existente de dicho analíto.

4.-Metodología.

4.1.-Impresión de microchips.

Para el diseño de los microchips se empleó el software SOLIDWORKS PREMIUM 2016, el cual es un programa tipo CAD que ayuda al dibujo y diseño de tres dimensiones que permite observar cómo será de manera física el diseño ya que este programa trabaja con los parámetros de unidades en sistema métrico. Para fines prácticos las unidades manejadas en los diseños de los microchips son en centímetros.

A continuación, se muestra un diagrama de bloques general acerca de cómo es el proceso de las impresiones en tres dimensiones utilizando la impresora MiiCraft+ 3D printer:



Equipo

- Impresora MiiCraft+3D printer Modelo UM-130 RJ-45 Potencia máxima: 100-240V, 50/60 Hz, 2.0A.

Programa Informatico

- SOLIDWORKS 2016 EDITION PREMIUM, Version para Windows 7 de 64 bits intelligence CAD.

Reactivos

- UV Resin for 3D PRINTER BV-001 POLIMERO DE ACRILATO (Monómero de Acrilato 55-75%, Oligómero de Acrilato 35-45% Foto iniciador y aditivos 10-15%)
- Etanol Absoluto 99.5% pureza EMPLURA®

NOTA: Los lavados se realizan con etanol ya que la resina es soluble solamente en este disolvente orgánico, se debe de cuidar quitar perfectamente el exceso de resina ya que en el proceso de post-cura se solidifica.

4.2.- Extracción de nitritos en productos cárnicos

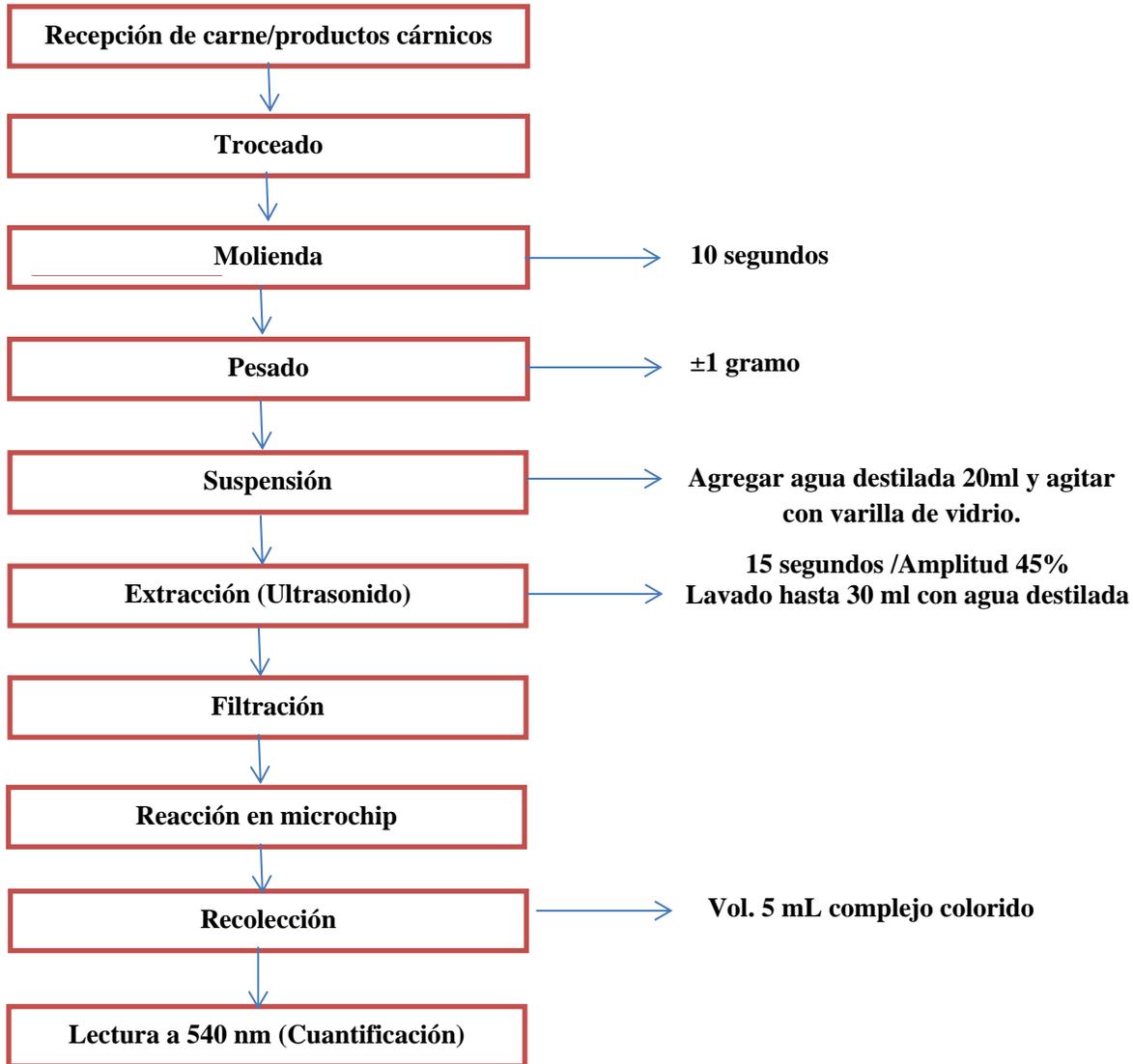


Figura 11.- Diagrama de extracción y cuantificación de nitritos en productos cárnicos.

Equipos

- ♦ WARING COMMERCIAL® Picadora/trituradora PRO PEP® modelo WCG75.
NOTA: el equipo se usó en el modo de trituradora (Grinder) para el tratamiento de la muestra.

- ♦ Balanza analítica EXPLORER OHAUS® Modelo E12140.
- ♦ 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".
- ♦ Espectrofotómetro *UV/Vis spectrophotometer Varian Cary® 1*.
- ♦ Bombas peristálticas ISMATEC® Modelo ISM834C.

Reactivos

- ♦ Buffer NH₄Cl/EDTA a pH 8.5 (Reactive J.T Baker® ACS)
- ♦ Sulfanilamida/Clorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (SIGMA-ALDRICH® ASC)
- ♦ Reactivo de Carrez I: Hexacianoferrato de potasio trihidratado (SIGMA-ALDRICH® ASC)
- ♦ Reactivo de Carrez II: Acetato de zinc (Reactive J.T Baker® ACS)
- ♦ Agua destilada

4.3.-Formación del complejo colorido

Los nitritos se encuentran en forma de anión en los extractos clarificados de los productos cárnicos, reaccionando con sulfanilamida en medio ácido generando una sal de diazonio que, a su vez, mediante una reacción de acoplamiento con clorhidrato de N-1-naftiletilendiamina en un medio amortiguado de NH₄Cl/EDTA a pH 8.5, genera un azoderivado color rojizo o magenta que es cuantificado por medio de un espectrofotómetro UV-Vis (*Varian Cary® 1*) a una longitud de onda de 540 nm. Los reactivos y muestras son inyectados a través de una bomba peristáltica conectada a la entrada del microchip, estos son mezclados dentro de la estructura para posteriormente ser extraídos por otra bomba peristáltica de salida y ser recolectados y cuantificados por medio del espectrofotómetro.

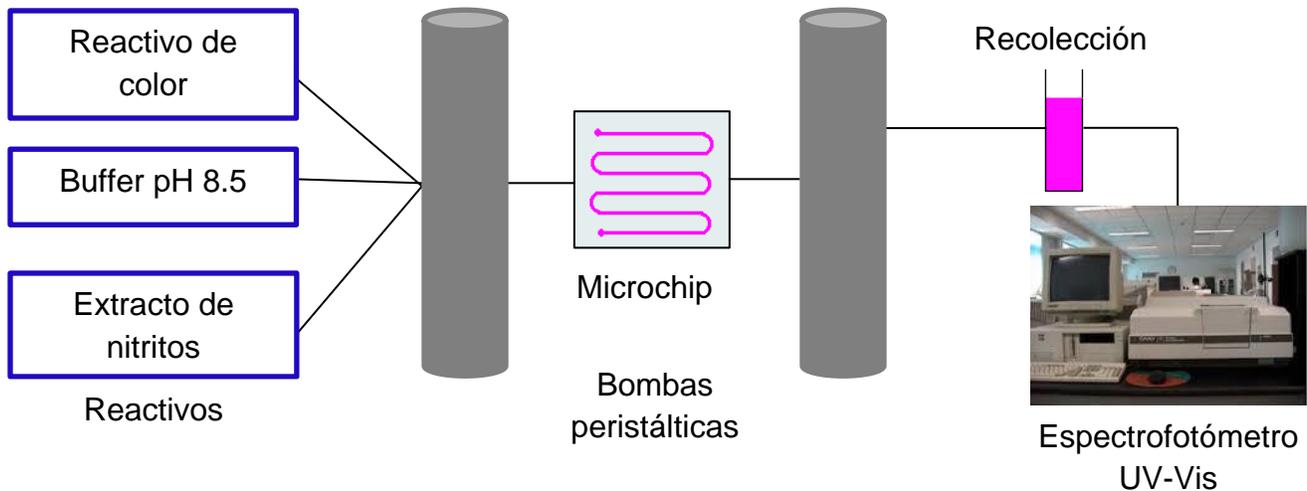


Figura 12.-Configuración de análisis para determinación de nitritos en productos

4.3.1.-Extracción de nitritos en productos cárnicos.

La preparación de las muestras se realizará a temperatura ambiente para facilitar la molienda o trituración de la muestra.

- 1.-Pesar aproximadamente 5 gramos de muestra cárnica y triturarla en la picadora o trituradora por un periodo aproximado de 10 segundos.
- 2.- Recolectar la muestra triturada y pesar aproximadamente 1 gramo de muestra por triplicado.
- 3.-Agregar 20 mL de agua destilada para una suspensión, esta se debe agitar con ayuda de una varilla de vidrio y se agregará agua hasta llegar a un volumen de 30mL.
- 4.- Introducir la sonda de ultrasonidos en la suspensión y aplicar ultrasonidos a 45% de amplitud por un periodo de 15 segundos.
- 5.- Agregar a cada uno de los vasos 1mL de reactivo de Carrez I y 1mL de reactivo de Carrez II, dejar reposar por un periodo de 10-12 minutos.
- 6.- Filtrar las muestras y recolectarlas para su posterior cuantificación.

NOTA: Los reactivos de Carrez son agregados como clarificantes ya que ayudan a la precipitación de masa orgánica obteniendo un extracto incoloro.

4.4-Repetibilidad y Reproducibilidad.

Con la finalidad de evaluar la precisión del método de cuantificación de nitritos se debe llevar a cabo su medición y validación, esto con la medición de una o más

concentraciones de manera intralaboratorio y los resultados obtenidos son analizados un Análisis de Varianza de un solo factor (ANOVA).

La respetabilidad se define como la capacidad de un instrumento a dar un mismo resultado, en el caso de este estudio este se realiza midiendo uno o más puntos de una concentración conocida tres o cuatro veces al día durante un periodo de 7 a 11 días. La finalidad de este es medir si los datos obtenidos durante este periodo de tiempo y el mismo día se tienen un coeficiente de varianza suficientemente amplio.

La reproducibilidad se realiza midiendo uno o más concentraciones conocidas de manera diaria por un periodo de 7 a 11 días, en donde el coeficiente de variación no debe de ser mayor a 10 para así tener una metodología y un método aceptable.

Los resultados son analizados mediante una ANOVA de un factor y el resultado esperado es que no exista una diferencia significativa entre los días siendo un método viable.

5. Resultados

5.1. Caracterización de microchips

5.1.1.-Diseño de primeras estructuras.

Se realizaron diferentes diseños de chips con el programa SOLIDWORKS PREMIUM 2016 teniendo como principal objetivo el diseño de microchips que ayuden a la cuantificación de los nitritos en productos cárnicos; para fines prácticos todas las medidas de las figuras diseñadas se encontraran en centímetros y milímetros.

Estos diseños fueron impresos en el equipo en MiiCraft+ 3D printer, esta impresora realiza la construcción de las piezas basado en el principio de estereolitografía ocupando una resina de polímero de acrilato, dicho polímero lineal y aniónico está compuesto por el monómero ácido acrílico ($\text{CH}_2=\text{CHCOOH}^+$)

Los grupos de ácido acrílico están espaciados uniformemente a lo largo de la cadena permitiendo que la resina sea maleable y semilíquida, el polímero de ácido acrílico neutralizado con NaOH formando el poliacrilato de sodio, siendo este el compuesto que se ocupa como resina para la impresión en tres dimensiones.

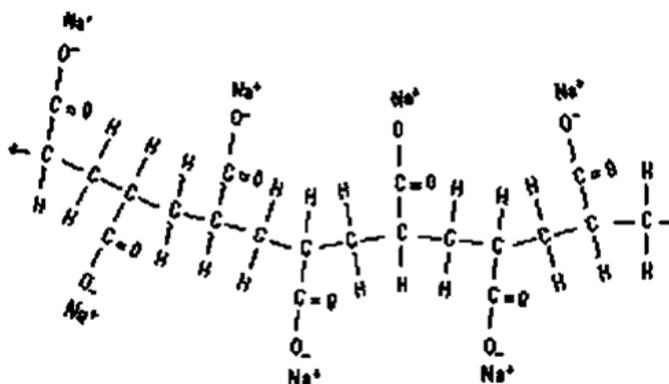


Figura 13.-Estructura del polímero del acrilato de sodio. (Che et al, 2010)

Las características de este polímero de acrilato son las siguientes:

- ✓ **Capacidad de solidificación:** ante alguna fuente de irradiación que de manera común es la luz ultravioleta o alguna fuente de irradiación como láser de CO_2

diseño del chip incluyendo medidas y dimensiones de la estructura las cuales quedan mayor explicadas en el Anexo 6.

En la Figura 14D se muestra el chip 1 impreso con las dimensiones establecidas en los planos elaborados (14A y 14B), esta estructura impresa está basada en uno de los artículos con mayor relevancia en cuanto a la cuantificación de nitritos e impresión de microchip; en esta estructura se esperaba que la cuantificación de nitritos se llevará a cabo ya que de acuerdo al artículo, Aurethane-acrylate microflow-analyzer with an integrand. (Lorrana N. et al., 2013.) la dimensión del canal interno, así como la estructura son las suficientes para llevar a cabo la cuantificación de la reacción.

El tiempo de impresión de este dispositivo tomó aproximadamente 3.5 horas, además de un proceso de post-cura de 6 minutos; una vez impresa la estructura se debe de realizar el lavado con la finalidad de quitar el exceso de resina, este último paso es fundamental para que la estructura tenga o no funcionalidad.

El primer problema presentado después de la impresión del chip fue la eliminación de la resina no polimerizada que se encontraba en el interior de los canales del diseño pues impedía que la pieza fuera funcional, por ello se intentó realizar el lavado sumergiendo en un molde con etanol absoluto e inyectando esta misma solución dentro de los canales, sin embargo el problema persistió en dicha estructura atribuido a la presión aplicada, pues esta no fue la suficiente para eliminar el exceso de la resina en el interior.

Por ello se buscaron diferentes alternativas haciendo uso de bombas y buscando diversos disolventes que eliminaran dicha resina. Se utilizaron inyecciones de etanol a temperatura ambiente, etanol a 70 °C (por debajo de su punto de ebullición), agua destilada (a temperatura ambiente así como a 80°C) y acetonitrilo, pero ninguna de estas permitió eliminar el exceso de resina del interior de los canales.

Este problema se debe a que la resina del polímero de acrilato en el interior del chip se solidifica aplicando o no el proceso post-cura con lámpara UV quedando un “tapón” en la parte media de la estructura haciéndola inservible. Algunos autores

han reportado estos problemas en la construcción de microchips 3D a causa de dos razones: una de ellas es por el tipo de impresión y la segunda es como resultado de la impresora empleada por la baja sensibilidad que tiene este modelo de impresión, también cabe mencionar que la resina empleada presenta una solubilidad mayor a 70% y menor a 90% utilizando como disolvente etanol, la poca cantidad que no se alcanza a disolver se solidifica quedando figuras irregulares y por ende estructuras poco funcionales o bien, errores estéticos en ellos. (Aliaa I. Shallan *et al.* 2014).

Por lo anterior se realizaron impresiones de chips diferentes respetando la estructura expuesta en la Figura 14 pero cambiando el tamaño de los diámetros internos y externos para facilitar la eliminación de la resina excedente en el interior de los canales, distancias entre canales, tamaño de serpentines y grosor externo de las tuberías, este último cambió ya que se partían con gran facilidad resultando una estructura endeble y frágil.

La posterior impresión de estructuras fueron basadas en la Figura 14 cambiando el etanol por otros disolventes como acetona y hexano (por mencionar algunos) con la finalidad de observar si estos ayudaban a aumentar la solubilidad de la resina para la limpieza de las impresiones así como cambiaron los tiempos de impresión ya que el programa permite regular el tiempo de impresión de cada una de las capas que conforman la estructura final, por ello se evaluaron varios tiempos ya que por programación automática la formación de cada capa laminar se de cada 5 segundos por ello se decidió probar alargar o acortara los tiempos de formación de cada capa para evitar que la resina líquida se endurezca formando un tapón modificando así el tiempo de impresión reduciendo de 3.5h a 1:23 h, sin embargo los resultados arrojaron a lo mismo obteniendo piezas no funcionales persistiendo resina en el interior de los canales.

Una de las alternativas buscadas para eliminar el exceso de la resina en la impresión fue detener la impresión a la mitad de la fabricación, pero el programa no permite hacer esta función ya que en automático se cancela todo el proceso y como resultado se tienen figuras impresas a la mitad.

La eliminación del polímero en el interior de los microchips en las estructuras fabricadas por medio de estereolitografía es común ya que las capas se van imprimiendo en un tanque lleno de resina o polímero, por lo que todo el tiempo se encuentran sumergidas dentro del material líquido teniendo como consecuencia que las estructuras huecas se llenen de resina.

En el caso del chip 1 (Figura 14) el polímero de acrilato quedó en el interior de los canales y aunque se intentaron varias formas de limpieza no se pudo eliminar, pudiendo ser por la poca solubilidad del polímero con diferentes disolventes o bien por tratarse de canales tan pequeños que la presión interna es mayor a la externa ocasionando que la fuerza aplicada no sea la suficiente para extraer la resina resultado una pieza inservible.

Las siguientes estructuras elaboradas, visualizadas en el Anexo 6 (Figuras 15 a Figura 17) muestran otros diseños que presentaron el mismo problema de limpieza para eliminar el exceso de polímero en su interior, los resultados de diversas pruebas con diseños diferentes dieron como resultado la primera estructura funcional denominada Chip D.

5.3.- Chip D

Este es el primer chip en el que se pudo eliminar el exceso de resina quedando una estructura completamente hueca y funcional; el diseño de la pieza, así como sus características se muestran en el Anexo 7, la estructura impresa se muestra en la Figura 18.



Figura 18.-Impresión del chip C. (Diámetro interno 0.15cm, grosor externo 0.30cm, longitud 3.5cm, rectas 1.5cm, curva 0.25cm)

Para evaluar si con esta estructura se podía llevar a cabo la reacción, se prepararon soluciones estándar de 1, 5, y 7 ppm con la finalidad de observar si la formación del

complejo colorido rosado característico para la determinación de nitritos era posible. (Cabrera *et al.*, 2003).

Se utilizó un caudal de reacción de 0.053 mL/min, haciendo pasar en continuo tanto reactivos como las soluciones estándar de nitritos. Los resultados se muestran en la Figura 19 donde se puede observar la diferencia de las tres concentraciones evaluadas y el blanco.



Figura 19.- Producto de reacción formado para nitritos utilizando el diseño de la Figura 18 (Chip D).

Esta prueba es fundamental ya que, aunque se reporta que el polímero de acrilato no tiene interacción con soluciones a base agua como disolvente principal, este podría presentar una cierta interferencia con el complejo colorido. Observando los extractos estos son translucidos lo cual permite concluir que no hay interferencia alguna para su lectura en espectrofotómetro UV- visible además de tener resistencia a los reactivos.

Con esta estructura se puede llevar a cabo la reacción para la determinar nitritos, pero no se sabe cuáles son las características específicas de esta, por lo que se decidió caracterizarla a fin de conocer las características del Chip D (Figura 18) y así evaluar los volúmenes y caudales de los reactivos para elaborar diferentes curvas patrón de nitritos y los límites de detección, entre otros parámetros estadísticos importantes.

5.3.2.- Evaluación del caudal y tiempo de análisis.

Una de las principales características para evaluar este chip fue probar si la reacción era posible en esta estructura, así como optimizar la velocidad del caudal regulado el paso de reactivos y muestra.

Por lo tanto, se evaluó el caudal para la cuantificación de nitritos en el Chip D (Figura 18), utilizando mangueras de Tygon incorporadas a una bomba peristáltica.

Para realizar la determinación del caudal óptimo se probaron diferentes caudales utilizando una solución patrón de nitritos de 1.0 ppm, eligiendo aquel caudal que tuviera la mayor absorbancia en el menor tiempo posible de reacción. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3.- Evaluación del caudal y el tiempo de reacción para nitritos utilizando el diseño Chip D (Figura 18)

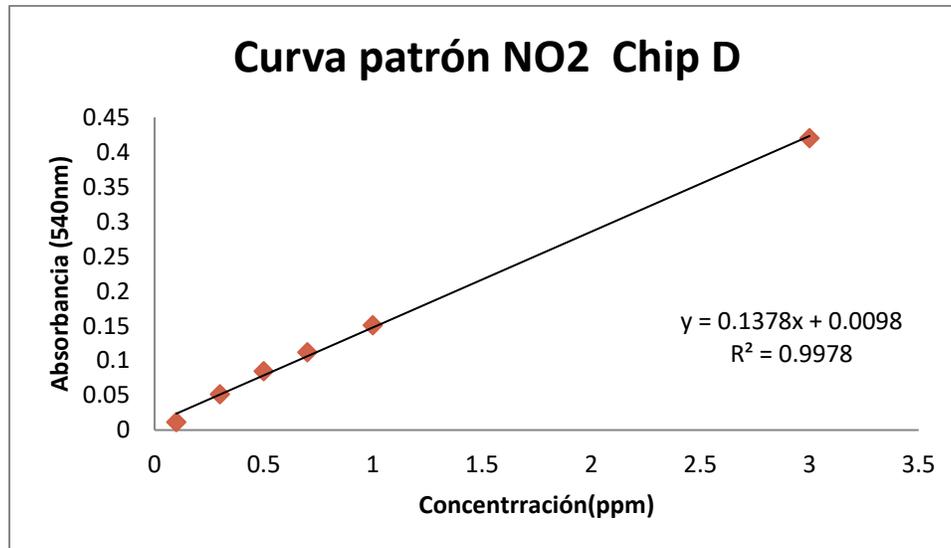
Caudal mL/min.	t (min.)	ABS
0.05	16:00	0.2004
0.13	12:00	0.2003
0.16	10:00	0.2005
0.24	7:00	0.2004
0.29	6:37	0.2005
0.35	5:30	0.2003
0.41	5:15	0.2004
0.44	4:40	0.2005
0.51	4:36	0.2005
0.52	4:36	0.2006

En la Tabla 3 se observa una absorbancia constante, por ello se decidió optar por un caudal 0.52 mL/min ya que es el tiempo más corto en el cual la determinación es más rápida, y con él se hizo la curva de calibración.

5.3.3.- Curva de calibración.

La curva patrón comprendió las concentraciones desde 0.1 a 3 ppm de nitrito. Los resultados obtenidos son mostrados en la Gráfica 3.

Gráfica 3.- Curva de calibración de nitritos con el Chip D mostrado en la Figura 18 a un caudal de 0.52 mL/min.



Los resultados obtenidos con este microchip arrojaron una buena sensibilidad y un intervalo lineal amplio de cuantificación, el volumen utilizado es mayor al esperado para un microchip teniendo un volumen aproximado de 1.36 mL/min ya que el diámetro del serpentín es muy grande y por ende el volumen necesario es alto, por lo tanto se decidió buscar alternativas para disminuir el consumo de reactivos haciendo que los canales sean más pequeños o probar otros diseños tomando en cuenta las adversidades de quitar el exceso de resina.

Tomando en cuenta estas limitantes se buscó diseñar microchips en dos fases, esto se refiere a la construcción del serpentín en una base y la cerradura de los canales con una capa externa del mismo o diferente material que no interfiriera en la reacción, con la finalidad de que la presión interna fuese suficiente para la entrada y salida de reactivos, así como para protegerla de agentes físicos tales como polvo, pelusas etc.

Una de las ventajas que ofrece la impresión en dos partes, es que la limpieza de las piezas no es un problema ya que las estructuras se encuentran expuestas y son fácilmente lavables, de hecho, este tipo de metodología es usado en la impresión con láser ya que las piezas dibujadas se realizan en bloques del material a imprimir y con ello las estructuras impresas pueden ser ocupadas como molde para la fabricación de microchips de litografía suave. Los resultados de la adaptación de las

metodologías de una estructura cerrada a una abierta se describen en el siguiente punto:

5.4.- Microchip 3D de dos partes.

5.4.1.-Microchip A.

El primer microchip elaborado con estas características de canales abiertos consta de un cuadro impreso con la resina de polímero de acrilato, canales impresos en una sola cara de profundidad 0.3 cm y 0.15 cm, además de orificios de entrada de 0.11 mm de diámetro.

Las características de diseño del microchip A se encuentran en el Anexo 8.

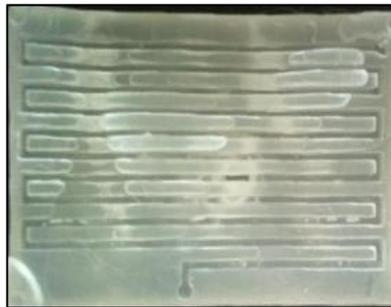


Figura 20.- Microchip A (Profundidad de 0.3 cm y 0.15 cm orificios de entrada de 0.11 mm de diámetro, dimensiones de la caja 3 cm x 2 cm x 0.5cm). (Anexo

Este microchip no tuvo problemas para la eliminación del exceso de resina, de hecho, fue mucho más fácil ya que los canales se encuentran expuestos. El defecto que presentó esta primera pieza fue que debido a las dimensiones de la pieza (3 cm de largo, 2 cm por cada lado y 0.5 cm de ancho) la impresión no tuvo un buen acabado, presentando deformaciones en la impresión con bultos disparejos como se puede apreciar en la Figura 20.

La estructura fue probada con la finalidad de observar si existía el paso de flujo en el interior de los canales y se observó que existe un pequeño orificio en la mitad de la pieza impresa, haciendo un pequeño asentamiento de líquido; lo sucedido con esta pieza es que la impresora MiiCraft +3D Printer tiene una cierta restricción con

las piezas que tienen una altura mayor a los 4 cm, por lo que se buscó escalar este diseño dando como resultado el Microchip B:

5.4.2.-Microchip B.

El segundo microchip fue de menor tamaño que el microchip A (Figura 20), por la limitante en la impresión de estas piezas; las medidas de la caja o base de este microchip B fueron 1.80cm x 2.10m x 0.5cm con profundidad de 0.5cm y dos orificios de entrada de un diámetro de 0.11cm. Las características físicas de este diseño se encuentran explicadas en el Anexo 8 y la Figura 21 muestra el molde final.

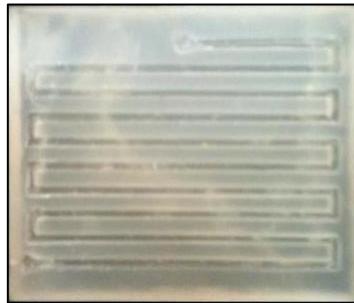


Figura 21.- Microchip B (cuadro base 2.20cmmX2cmX0.5, orificios de entrada 0.11cm, 0.30cm de profundidad, 0.15cm ancho de canal)

El microchip B (Figura 21) no presentó problemas para eliminar el exceso del polímero ni errores de diseño, resultando una estructura de buen acabado, por lo que se decidió probar si la estructura diseñada era capaz de llevar a cabo la cuantificación de nitritos con una solución de 5 ppm nitritos, los resultados obtenidos en esta prueba se discuten a continuación:

5.4.2.1-Characterización de microchip B

El microchip fue cubierto en la parte superior con una capa de parafilm que ayudó a que la presión interna del microchip permitiera el paso de reactivos por los canales evitando que se salieran y además sirviera de protección al medio externo. El producto de la reacción a un caudal de 0.168 mL/min se muestra en la Figura 22.

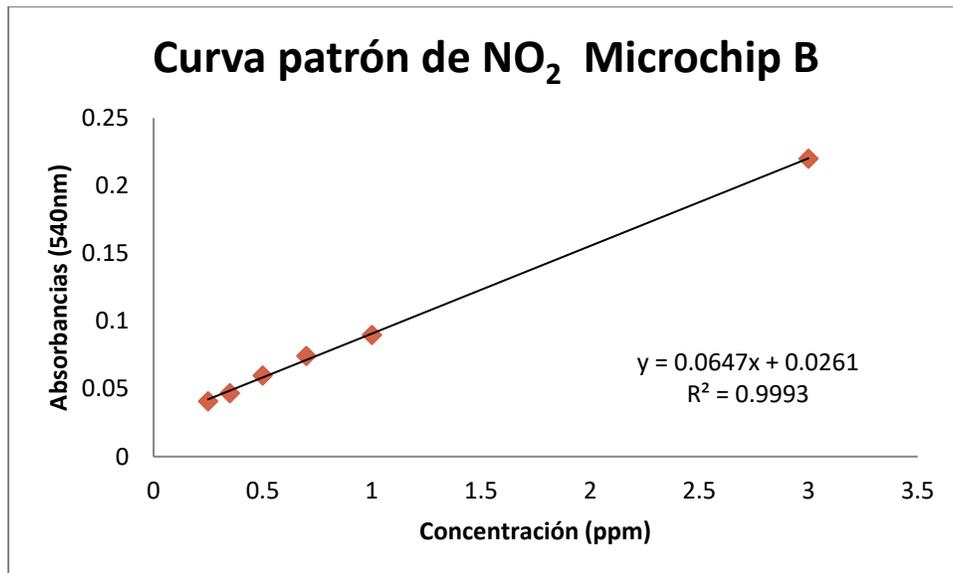
Es por ello entonces que se decidió hacer la curva de calibración para nitritos usando este microchip.



Figura 22.- Producto de reacción formado para nitritos utilizando el diseño de la Figura 21.

5.4.2.2.-Curva de calibración.

Se elaboró una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 0.1 ppm a 5 ppm (Figura 22).



Gráfica 4.-Curva de calibración del microchip B (Figura 22) utilizando un caudal de 0.16mL/.

La linealidad fue entre 0.25 ppm y 3 ppm de nitritos, con un valor $R^2=0.9993$ muy cercano a uno lo que resulta confiable y con buena sensibilidad ya que la ordenada se encuentra muy cercana al origen.

Los resultados obtenidos de esta estructura fueron muy buenos al considerar que la cantidad de reactivos en la repetición de la curva patrón por triplicado y la de residuos son menores comparados con los del método oficial de la normativa

mexicana (NOM-122-SSA1-1994) hasta un 73.33%. El único problema que se puede observar con este microchip B es que el flujo es intermitente, esto quiere decir que el flujo no es correctamente distribuido y se ve interrumpido e incluso si se aumenta el caudal ocasiona la salida de los reactivos por los canales, por ello se decidió hacer un diseño en el que las esquinas fueran curvas y no rectas resultando la fabricación del siguiente microchip:

5.4.3.-Microchip C

Diseño del Microchip C (Figura 23) con ángulos curvos conservando las medidas del tamaño de las rectas, profundidad de 0.3 mm y anchura de canales de 0.05cm, con una estructura general de 1.80cm x 2.10cm x 0.5cm y dos orificios de entrada con diámetro de 0.11cm.

Las características físicas de este diseño se encuentran en el Anexo 8.



Figura 23.- Microchip C (Profundidad de 0.3 cm y 0.15 cm ancho de canales, orificios de entrada de 0.11 mm de diámetro, dimensiones de la caja 1.80cm x 2.10m x 0.5cm). (Anexo 8)

En este diseño se cambiaron las esquinas con ángulos rectos por esquinas curvas con un radio de 0.10cm y un ancho de 0.15cm, evitando el flujo intermitente.

Al igual que en las piezas anteriores se realizó una prueba cualitativa para observar si el diseño elaborado y el tamaño eran suficientes para llevar a cabo la cuantificación, esta prueba se realizó con una solución estándar de 5 ppm de nitrito.

5.4.3.1-Characterización de Microchip C.

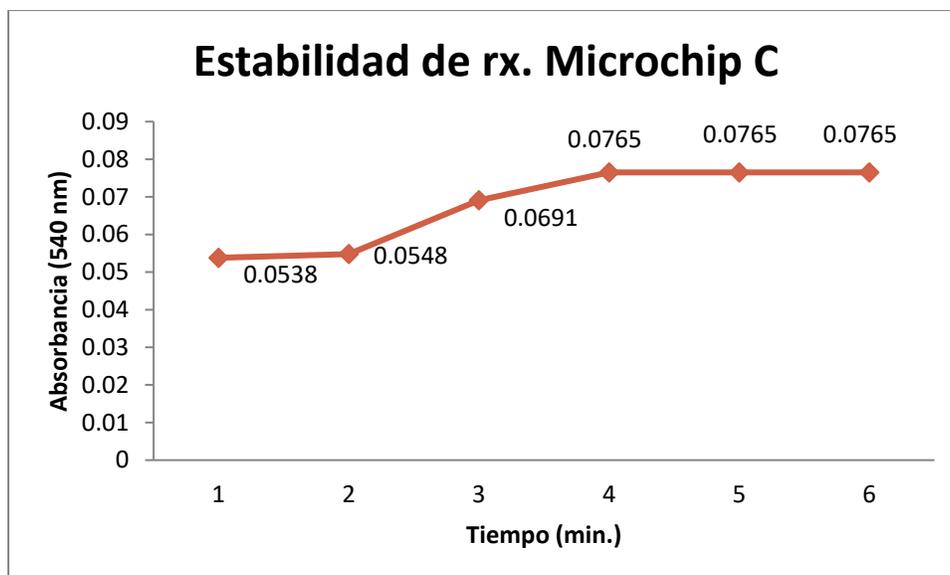
El microchip fue recubierto en la parte superior con una capa de parafilm con la finalidad de evitar que se salieran las soluciones y que el producto de reacción se

contaminara por agentes externos. La reacción se llevó a cabo a un caudal de 0.13 mL/min. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.



Figura 24.- Producto de reacción formado para nitritos utilizando el Microchip C

Con los resultados positivos se procedió a caracterizar el Microchip C midiendo el tiempo que tardó en reaccionar todo el analito con los reactivos, esto se realizó dejando fluir el compuesto colorido por un tiempo determinado para posteriormente ser recolectado y medido, en la Gráfica 5 se muestra el tiempo de estabilización de la reacción en donde se puede observar que tarda entre 4 y 6 minutos en estabilizarse, por ello se decidió que el tiempo de reacción dentro del Microchip C fuera de 5 minutos.



Gráfica 5.- Evaluación del tiempo de estabilización de la reacción de nitritos con el reactivo de color usando el Microchip C de la Figura 23.

Una vez determinadas las condiciones en las cuales la reacción se llevaría a cabo de manera completa, se realizó una curva patrón a fin de observar la linealidad y sensibilidad en la determinación de nitritos usando este microchip.

5.4.3.2- Curva de calibración usando el microchip C (Figura 23).

Se elaboró una curva patrón con soluciones estándar de nitritos probando diversas concentraciones para determinar la concentración mínima y máxima detectable, probando concentraciones desde 0.01ppm hasta 10ppm. La curva patrón se repitió cuatro veces ejecutando la reproducibilidad de los puntos y con ello se determinó el intervalo de concentraciones en el cual la linealidad persistía siendo de 0.25ppm a 7ppm de nitritos.

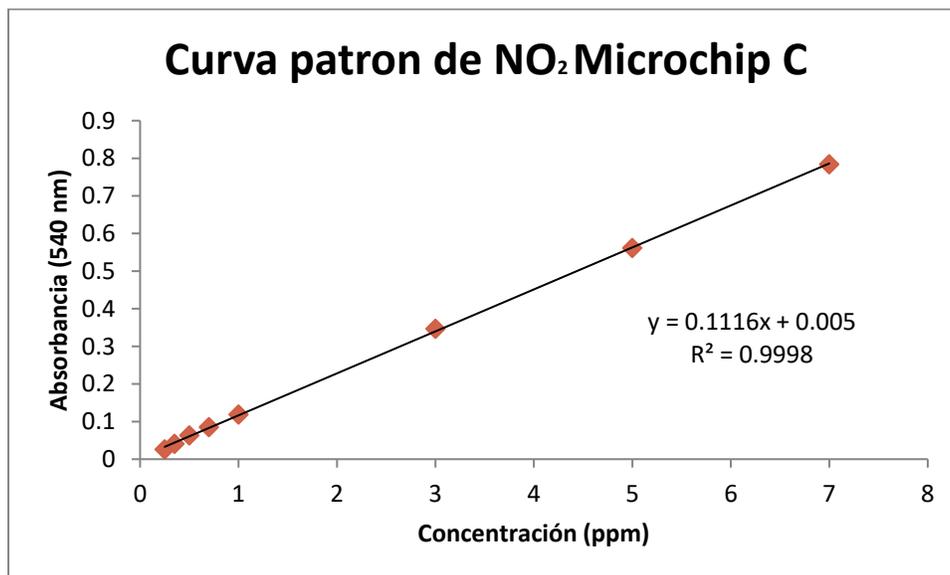


Figura 26.-Curva patrón de NO₂ a un caudal de entrada de reactivos caudal de salida del azoderibado de 0.51 mL/min para un intervalo de concentraciones de 0.25 a 7 ppm de nitritos



Figura 27.-Matraces de curva patrón con el Microchip C.

La regresión lineal de la curva patrón de Microchip C (Figura 26) fue de 0.9998, obteniendo un valor excelente y una ordenada muy cercana al origen, además de observarse la repetibilidad en los valores de absorbancias para cada uno de los estándares al realizarse por triplicado, repitiendo la curva en tres ocasiones consiguiendo valores similares. Una vez concluida la curva patrón se ejecutaron las pruebas de reproducibilidad, repetitividad intralaboratorio y capacidad de volumen del Microchip C.

5.4.3.3.- Repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio.

Para evaluar la precisión del método de cuantificación de nitritos se utilizó una muestra de salchicha FUD y un Análisis de Varianza de un sólo factor (ANOVA). Los datos obtenidos se reportan en la Tabla 4.

Tabla 4.- Resultados de concentración de nitritos para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad usando el microchip C.

Día	Replica 1	Replica 2	Replica 3
1	44.34	43.93	44.56
2	44.48	43.17	43.82
3	44.98	41.34	44.92
4	42.55	43.79	42.89
5	41.78	41.65	42.02
Des. Estándar	1.3818	1.2088	1.1941
Media	43.626	42.776	43.642

Tabla 5.- Análisis de varianza de un factor para la medición de los extractos de nitritos de salchicha FUD.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Probabilidad	Valor F crítico
Entre días	6.1327	4	1.5332	1.05	0.4656	5.19
Dentro de días	7.2914	5	1.4583			
Total	13.4241	9				

Resultando una hipótesis nula, H0: no existe una diferencia significativa entre los resultados cuantificados entre días y dentro de días.

El valor obtenido de F calculado es de 1.05 no siendo mayor al valor F4, 5 P=0.05 crítico de 5.19 por lo tanto se concluye que no existe evidencia estadística para que exista diferencia significativa entre los resultados experimentales dentro y entre días, por lo que se acepta la hipótesis nula, H0.

En cuanto a repetitividad y reproducibilidad, los valores obtenidos son los siguientes: 2.79% y 2.81% respectivamente, considerándose valores muy similares indicando que la variación de la metodología, así como los puntos cuantificados tienen una mínima y poco significativa variación; estos valores fueron calculados de la siguiente manera:

Repetitividad (Sr)

$$Sr^2 = 1.4583$$

$$Sr = 1.2076$$

Reproducibilidad (SWR²)

$$SWR^2 = Sr^2 + Sr^2 \text{ entre días}$$

$$Sr^2 \text{ entre días} = \frac{(MC_{entre} - MC_{dentro})}{nj} \text{ Donde nj es el número de columnas, 3}$$

$$S_r^2 \text{entre días} = \frac{(1.5332 - 1.4583)}{3} = 0.0249$$

$$S_{wr}^2 = 1.4583 + 0.0249 = 1.4832$$

Repetitividad

$$\%DER = \left(\frac{S_r}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$\%DER = \left(\frac{1.2076}{43.209} \right) \times 100 = 2.79\%$$

Reproducibilidad

$$\%DER = \left(\frac{S_{wr}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$\%DER = \left(\frac{1.2178}{43.209} \right) \times 100 = 2.81\%$$

5.4.3.4. Volumen del microchip C

También se determinó la capacidad de volumen en el Microchip C; para esto se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se pesó el Microchip C completamente seco sin la capa de parafilm, se procedió a llenarlo con una concentración de nitritos conocida y se pesó en una balanza analítica y con base en la diferencia de peso se determinó el volumen del microchip, este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6:

Microchip C	Peso(g)
Vacío	2.2674g
1.- Peso del Microchip C con solución	2.4510g
2.- Peso del Microchip C con solución	2.4513g
3.- Peso del Microchip C con solución	2.4507g
Diferencia promedio	0.1836g

Tabla 6.- Determinación del peso en el Microchip C (Figura 23).

Los datos obtenidos arrojan a un valor aproximado de 183.6 μ L en la estructura cuando el valor aproximado de almacenamiento de acuerdo al programa de diseño SOLIDWORDS PREMIUM 2016 debía ser de 241 μ L, esto quiere decir que la capacidad de almacenamiento en la figura impresa es del 76.68% con respecto a los valores que da el programa de dibujo. Esto se puede deber a las pequeñas partículas que quedan en la estructura, deformaciones propias de la fabricación.

Teniendo estos puntos caracterizados en el microchip C (Figura 23) se decidió analizar muestras de productos cárnicos con concentraciones conocidas de nitritos.

5.5.- Análisis de muestras cárnicas

A partir de la curva patrón (Figura 23) obtenida para el Microchip C se determinó la concentración de nitritos en diferentes muestras de productos cárnicos donadas por el grupo 1 del Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Los productos proporcionados fueron los siguientes: jamón tipo York, chuleta ahumada, chorizo fresco y madurado tipo cantimpalo, salchicha estilo Frankfurt. La extracción de nitritos se llevó a cabo por el método de ultrasonidos focalizados descrito en la metodología (Capítulo 4).

5.5.1.-Salchicha tipo Frankfurt.

La salchicha es un producto cárnico clasificado como un producto embutido cocido, el cual puede o no ser ahumado, hecho con res, cerdo o actualmente hasta con pollo, cumpliendo con la especificación de ser elaborado con no menos de 60% de carne en su contenido neto; el proceso de elaboración del producto así como las especificaciones de este, son mencionados en el Anexo 2 en donde se especifican las cuatro formulaciones realizadas, en las cuales solo se modificó la cantidad de algunos de los ingredientes a fin de observar el efecto que estos tenían sobre el producto terminado; el análisis de importancia en las cuatro formulaciones tenía la misma concentración (132 ppm) y se realizó la extracción por ultrasonidos focalizados obteniendo los siguientes resultados expuestos en la Tabla 7:

Tabla 7.- Determinación de nitritos en salchicha tipo Frankfurt con el microchip

Equipo	F1/mg/kg salchicha	F2/mg/kg salchicha	F3/mg/kg salchicha	F4/ mg / kg salchicha
1	99.74	101.84	111.27	106.73
2	100.86	101.52	111.39	107.05
3	100.22	101.25	111.79	107.08
4	100.66	101.58	110.97	106.44
5	100.39	101.47	111.58	107.09
6	100.82	101.72	111.2	107.63
7	101.48	101.33	111.26	106.02
8 y 9	101.23	100.49	111.43	107.62
Media	100.67	101.4	111.36	106.96
Des. Estándar	0.5572	0.4161	0.2481	0.5517
%CV	0.55	0.41	0.22	0.51

La cantidad esperada de nitritos de sodio en las cuatro formulaciones era 132 ppm pero los resultados mostraron cantidades menores debido a varias causas posibles:

- 1) **Proceso de picado:** durante este proceso se agregan todos los ingredientes que conforman la salchicha incluyendo las sales de cura. Esta pasta formada es recolectada de manera manual y con ello hay pérdida de materia prima la cual llega a quedar retenida en las aspas y palas.
- 2) **Proceso de embutido:** éste se realiza de manera manual ya que se llena la manga en la parte superior y por medio de un forjado, ésta pasa a través de la “tripa” y se hace el embutido. Por lo tanto existen pérdidas en el llenado de la manga, restos en la pala de llenado, así como también en el molde en donde se vacía la pasta.
- 3) **Deficiencia de pesado:** pesado insuficiente de las sales de cura, resultando una baja cantidad de nitritos presentes en el producto final del alimento.

Los resultados de la Tabla 7 permiten concluir que estos productos cárnicos comparados con la NOM-122-SSA1-1994 y NMX-F-065-1984 están dentro de la normatividad la cual no debe de ser mayor a 103 ppm de nitritos.

5.5.2.- Chuleta ahumada.

La chuleta es el producto obtenido del corte del cerdo después de remover la paleta, el pernil, la tocineta y la grasa de la espalda, sometidas a un proceso de curado, ahumado, cocción y envasado en un material inerte aprobado. Se clasifica como un producto curado ahumado el cual debe de cumplir con la NOM-122-SSA1-1994 y NOM-213-SSA1-2002 que establecen especificaciones físicas, microbiológicas y químicas, así como cantidades permisibles de algunos aditivos, estas especificaciones, así como el diagrama de proceso de la elaboración de chuleta ahumada se encuentran en el Anexo 3.

La chuleta cruda fue sometida a 4 tipos de preparaciones en donde la variante era el grosor del corte de la chuleta, así como la adición de otros ingredientes en la formulación, se conservó la misma cantidad de nitritos en las cuatro formulaciones (66 ppm), el cambio en la preparación de la salmuera fue solamente en el método de cura.

En las formulaciones F1 y F2 el tratamiento de cura se llevó a cabo mediante inyección para posteriormente realizar el ahumado de las piezas; en el caso de las formulaciones F3 y F4 el tratamiento de cura fue por medio de marinado en la solución de salmuera durante dos horas con un posterior masajeo y ahumado.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de nitritos en la chuleta ahumada por los cuatro diferentes métodos de preparación se presentan en la Tabla 8, donde se puede observar que la concentración de nitritos es diferente dependiendo del tipo de curado.

La mayor asimilación de nitritos en el producto cárnico fue para el método de inyección ya que existe una mayor interacción con el producto cárnico tanto de manera interna como externa, por ello la los resultados son mayores en comparación con el método de masajeo donde solo se hace de manera exterior mediante absorción capilar obteniendo bajos rendimientos de cuantificación con valores entre 3.61-13.84 ppm de los 66 ppm de nitritos totales agregados en las

formulaciones. Con estos resultados preliminares se puede decir que el mejor método de cura en chuleta es la inyección.

Tabla 8.- Determinación de nitritos en chuleta ahumada con el Microchip C

Equipo	F1/mg/k g chuleta	F2/mg/k g chuleta	F3/mg/k g chuleta	F4/ mg / kg chuleta
1	62.90	56.73	13.79	3.55
2	62.80	57.14	13.89	3.76
3	62.80	56.98	13.68	3.65
4 y 5	62.99	56.66	13.89	3.44
6	62.77	56.88	13.84	3.55
7	62.97	57.08	13.90	3.76
8	63.07	56.99	13.72	3.65
9	62.94	56.78	14.01	3.55
Media	62.91	56.91	13.84	3.61
Des. Estándar	0.1066	0.1720	0.1066	0.1118
%CV	0.16	0.30	0.77	3.09

De acuerdo a los datos obtenidos en la Tabla 8 las chuletas ahumadas elaboradas con las cuatro formulaciones se encuentran dentro de los parámetros establecidos en la NOM-122-SSA1-1994 que establece que la cantidad de nitrito debe de ser menor a 103 ppm obteniendo como máximo en esta cuantificación 62.91 ppm, esto justificado a los nitritos agregados a las formulaciones pues ninguna de ellas excedería el valor permisible.

5.5.3.-Jamón tipo York.

El siguiente producto analizado fue jamón tipo York, elaborado con pernil de cerdo de acuerdo a lo establecido en la NOM-158-SCFI-2003 y NOM-213-SSA1-2002. Para su producción se manejaron cuatro formulaciones (F1, F2, F3 y F4) en las cuales se modificó la cantidad de ingredientes además de variar la forma de elaboración e incorporación de la salmuera y las sales de nitrito. Aunque se hicieron estas variaciones no cambió la cantidad de nitrito presente en las formulaciones F1, F3 y F4, siendo de 132 ppm, y el procedimiento de inyección.

En el caso de la formulación F2 la forma de preparación del jamón fue mediante un masaje manual cambiando la concentración de nitrito añadida a 66 ppm. Los resultados de nitritos son expuestos en la Tabla 9.

Tabla 9.- Determinación de nitritos en jamón tipo York con el microchip C

Equipo	F1/mg/kg jamón	F2/mg/kg jamón	F3/mg/kg jamón	F4/ mg / kg jamón
1	128.69	66.45	105.86	119.11
2	128.69	66.38	106.18	118.16
3	128.22	66.52	105.90	118.43
4	128.71	66.55	105.69	118.17
5	128.42	66.62	105.75	118.34
6 y 8	128.54	66.60	105.93	118.32
7	129.18	66.53	105.85	118.24
9	128.85	66.58	105.61	118.62
Media	128.66	66.52	105.84	118.42
Des. Estándar	0.2869	0.0800	0.1736	0.3150
%CV	0.223	0.120	0.16	0.26

La concentración de nitritos en las formulaciones F1, F3 y F4 son cercanas a la concentración añadida de nitritos en el proceso de elaboración, siendo de 128.66 ppm (97.61%), 105.84 ppm (80%) y 118.42 ppm (89.86%), respectivamente. Esto se debe a la diferencia en el método de cura que permite una mayor interacción con las proteínas del producto cárnico, obteniendo una menor pérdida de nitritos, considerándose un mejor método de cura.

De acuerdo a los valores de cuantificación expuestos en la Tabla 9, todas las formulaciones exceden la cantidad de nitritos permisible, especificándose no ser mayor a 103 ppm (NOM-158-SCFI-2003 y NOM-213-SSA1-2002); con excepción en la formulación F2, sin embargo, es importante destacar que en las formulaciones F1, F3 y F4 hubo exceso de nitritos (123 ppm) durante la elaboración.

5.5.4.-Chorizo cantimpalo

El chorizo es clasificado como un producto cárnico madurado curado y troceado el cual puede ser o no sometido durante cierto tiempo a la acción de microorganismos o enzimas propias de la carne para que desempeñen cierta acción sobre azúcares

añadidos o lípidos presentes en el producto, ayudando a la formación de olores y sabores deseables.

Los resultados obtenidos para chorizo fresco y madurado se presentan en las Tabla

Tabla 10.- Determinación de nitritos en chorizo cantimpalo tanto fresco como madurado con el Microchip C de la Figura 23.

Equipo	mg/kg chorizo fresco	mg/kg chorizo madurado
1	63.38	99.33
2	64.69	100.56
3	64.05	100.56
4	64.05	99.09
5	63.78	100.07
6	63.98	99.98
7	63.75	100.89
8	64.85	100.65
9	63.45	100.53
Media	64	99.90
Des. Estándar	0.4951	0.4951
%CV	0.77	0.49

El chorizo fue adicionado con sales de cura al 6% de nitrito de sodio para obtenerse una concentración final de 66 ppm; los resultados en la determinación de nitritos en chorizo fresco tienen un promedio cercano a 64 ppm, representando un porcentaje de extracción del 96.96%.

Con lo anterior se obtuvo un buen rendimiento de extracción por el método de ultrasonidos focalizados en el chorizo fresco. En el caso del chorizo madurado la sobre cuantificación de nitritos se adjudica a que durante el proceso de maduración este pierde humedad y con ello un aumento en la cantidad de sólidos presentes por kilogramo de producto, obteniendo rendimientos mayores al 100% de la concentración de nitritos comparativa con el producto en fresco.

De acuerdo a la NOM-122-SSA1-1994 no se excede la cantidad máxima de nitritos de sodio permisible (156 ppm): en el chorizo fresco la cantidad estimada como nitrito de sodio presente es aproximadamente 96.96 ppm y en el chorizo madurado es de 151.36 ppm, estos productos se encuentran dentro de los límites establecidos por la norma competente a este tipo de productos cárnicos.

6.-Conclusiones.

La microfluídica es una técnica de la química analítica que ayuda a disminuir la cantidad de reactivos y muestras, ya que durante la experimentación hubo una reducción en la cantidad de residuos de aproximadamente 75% al ser comparado con la metodología expuesta en la NOM-122-SSA1-19944 cumpliendo con uno de los objetivos planteados en esta tesis.

El programa de impresión seleccionado SOLIDWORKS PREMIUM 2016 cumple con las características que se requieren para el diseño de microchips ya que se pudieron fabricar diferentes modelos en 3D; las herramientas que ofrece este programa de diseño son diversas tales como: simulación de las impresiones elaboradas, la fabricación de los planos en dos dimensiones, variaciones en los modelos dibujados e impresos ayudando con ello a variar las estructuras del diseño, tamaño del orificio de entrada y salida, tamaño de canales, largo de los canales, profundidades, variación en la geometría de las figuras, entre otros parámetros.

Se elaboraron microchips o microdispositivos en la impresora MiiCraft 3D + printer presentando dificultades tanto por el tamaño de la pieza dibujada como por el tipo de impresión, ya que algunos de los diseños no fueron piezas funcionales debido al problema de limpieza en las estructuras ya que la extracción de resina en el interior de los canales fue insuficiente por el tipo de polímero de acrilato empleado, así como las características de los diseños.

Dentro de estos problemas de impresión se concluyó que este tipo de impresoras no tienen la suficiente sensibilidad para imprimir figuras por debajo de 300 micras, ya que, al ser fabricadas por medio de capas de resina, el grosor de cada una de ellas tiene un ancho aproximado de 150 micras.

Se elaboraron diversos diseños de impresión variando el tamaño y profundidad de los canales, formas geométricas, entre otras características, imprimiendo figuras que oscilan de 6 a 2 cm de longitud, con canales con anchos de 0.14cm a 0.25cm, variando las formas de la estructura con serpentines de diferente longitud, ancho de las tuberías, entre otras características de diseño de las estructuras.

La resina de polímero de acrilato no interfiere en la reacción de nitritos, considerándose un buen material para la cuantificación de los mismos en productos cárnicos y posiblemente en otros productos naturales que los contengan.

El método de extracción de nitritos por medio de ultrasonidos focalizados fue el adecuado para la determinación de este analito en productos cárnicos, ya que los valores cuantificados en estos son muy cercanos a los esperados, además de que comparado con el método oficial para la extracción de nitritos en cuanto a eficacia y porcentaje de recuperación se encuentra entre un 90% a 95% de la concentración esperada ya que al hacerlo por este método el contacto de superficie aumenta en la muestra cárnica y con ello se obtiene un buen porcentaje de extracción, además esta metodología disminuye la cantidad de muestra necesaria para la determinación al 50% (1g), disminuyendo también la cantidad de volumen del extracto de nitritos al 75% y el tiempo de extracción comparado con la NOM-122-SSA1-1994.

Dentro de este estudio se seleccionaron tres estructuras de chips los cuales se pueden adaptar a las necesidades de cada análisis, en este caso los microchips de dos partes representan una buena estrategia para eliminar el exceso de resina no polimerizada cuando se utiliza las MiiCraft 3D+printer o bien impresoras con fundamento de impresión por medio de estereolitografía facilitando el lavado de la estructura antes de ser curada y después de su uso, facilidades de manejo al colocar la película de parafilm la cual puede ser cambiada después de aproximadamente 100 mediciones o más.

El microchip C (Figura 23) es el que tiene una mayor eficiencia disminuyendo el uso de reactivos, cumpliendo con el concepto de microfluídica y logrando la cuantificación de nitritos a partir de la extracción por ultrasonidos focalizados, además de que la desviación estándar de las muestras analizadas fue menor a 0.5 ppm, teniendo una reproducibilidad de 2.81 % y una repetibilidad de 2.79%.

Los productos cárnicos seleccionados en este estudio abarcaron varias clasificaciones en tipos de productos cárnicos procesados, alimentos cocidos y embutidos (salchichas tipo Frankfurt y jamón tipo York), productos ahumados (chuletas de cerdo ahumadas), productos troceados madurados y frescos.

7.-Perspectivas.

Posteriormente, se buscará otro tipo de diseños en 3D con la finalidad de mejorar las estructuras buscando alternativas que faciliten la detección para acoplarlo en un detector de UV-visible a través de fibras ópticas, convirtiéndolo en un método automatizado y con ello disminuir la cantidad de reactivos y no hacer necesaria la recolección de los mismos en matraces como se realizó en el presente estudio.

Buscar otro tipo de alternativas en cuanto a materiales para la impresión de los dispositivos facilitando la extracción de las resinas en estructuras con canales pequeños o buscar opciones para la limpieza de las piezas impresas.

Buscar otras formas de medición para las estructuras elaboradas con la finalidad de verificar las medidas diseñadas en el programa de diseño SOLIDWORDS PREMIUM 2016 ya que, al ser estructuras rígidas, el corte de las estructuras no es fácil pues se rompen y no se puede verificar por métodos tradicionales de verificación las medidas (cámara phantom, cuadrillas de pixeles). Además, por el color de los microchips impresos y espesor de las figuras la luz de los microscopios no se tiene la capacidad suficiente para atravesarlas y ser medibles.

A futuro se pretende crear una tapa para cada uno de los diseños en dos fases con la finalidad de eliminar la capa de parafilm externa a la estructura, buscando con ello que la capa de la estructura no sea recambiable ni fácilmente perforada, dando paso a una alternativa viable de reacciones con solventes orgánicos, ya que, al ser cubiertas las estructuras con dicha capa, los solventes orgánicos la desbaratan, suceso que no pasaría con las tapas del mismo material.

Referencias.

- Aliaa I.S, Smejkal P, Corban M, Guijt R. M. y Breadmore, M.C. (2014) Cost-Effective Three-Dimensional Printing of Visibly Transparent Microchips within Minutes. *Analytical Chemical Society*, 2014(86), Pág.3124-3130.
- Alvaréz, Jacobo, Romero David (2018), Evaluación en línea de capacidad de retención de agua. Artículo científico. Publicado el :17 de Diciembre del 2018.
- Badui Dergal Salvador,(2006) Química de alimentos . 4ª edición, Editorial Pearson Educación, Capitulo Proteína, Pág.:480-4093
- 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), Pág.88-92.
- Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Torres, Martinez C., Maraj, S. R., & Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1411, 475–488.
- Chee M.B.H., Sum H.N., King Ho H.L., Yong-Jin L., (2015) 3D printed microfluidics for biological applications. *Royal Society Of Chemistry*, 2015(15), Pág.3627-3637.
- Che Zhi, Yu Zhengyin, Chen Gang, (2010) Low cost fabricación of PDMS microchips using disponsable gelatin gel templates. *Talanta*,2010(81),Pág.1325-1320
- Clasu, James R., Du Chen,(2013) Nitrate.embebed packing film effects on fresh and frozen beef color developed and stability as influenced by meat and muscle type, *Meat Science*,2013(95), Pág.526-535.
- Cristóbal Hernández, Jorge de Jesús,(2017) Aplicación de ultrasonidos focalizados para la extracción de nitritos en productos cárnicos.
- Dutt J.,Davis J.,Current (2017) Strategies in nitrite detection and their application to fields analysis. *Analytica Chimica Acta* , 2015(886), Pág.56-62
- FAO/WHO (2007a). Expert Committee of Food Additives: potassium nitrite/sodium nitrite. Available: www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_1702.htm. Accessed: 27 June 2007

- Farid Chemat , Natacha Rombaut, Anne-Gaëlle Sicaire, Alice Meullemiestre, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert-Vian (2016) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. Ultrasonic Sonochemistry, 2016(34), Pág.540-560.
- Fennema, Ownner R., (2002), Química de Alimentos, 2ª edición, Editorial McGrawHill, Capítulo Características de los tejidos muscular comestibles. Pág.1042-1110.
- Flores, Gonzales Arturo, Azuola Rocio y Vargas Pedro., (2016) Extracción de sustancias asistida por ultrasonidos (EUA), Tecnología en Marc, 2007(20), Pág.30-40.
- Gaal Gabriel, Mendes Melissa, Almeida P. Tiago, H.O Maria, Angelo L. Piazzetta, Riul Jr. Antonio y Rodrigues Varlei, (2017), Simplified fabrication of integrated microfluidic devices using fused deposition modeling 3D printing, 2016 (B 424), Sensors and Actuators, Pág.35-40.
- Himmelblaud M.D y Bischoff K.B. (2004). Process analysis and simulation. New York, John Wiley and sons, Inc. Pág. 664-667.
- Honikel, Karl-Otto, (2007), The use and control of nitrate and nitrite for processing of meat products. Meat Science, 2008(7), Pág.68-76.
- Ho Nam C., Yiwei S, Bin X, Yangfan C, Yin C, Qian T, Sean A. M, Bo S, y Hongkai W. Simple, Cost-Effective 3D Printed Microfluidic Components for Disposable, Point-of-Care Colorimetric Analysis. Analytical Chemical Society, 2016(1), Pág.227-234.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-030-ZOO-1995, Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoonosanitaria.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, Grasa, hígado, músculo y riñones en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994, Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
- NORMA Oficial Mexicana Modificación a la NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Norma oficial mexicana NOM-145-SSA1-1995, Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias
- Norma Mexicana NMX-F-065-1984 Especificaciones para la elaboración de salchichas.
- Lorrana N.N, Laiz de O, Alexandre Fonseca (2013), "Aurethane-acrylate microflow-analyzer with an integrand." *Microchemical Journal*, 2013(110), Pág.553-557.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Food and Drugs Organization. (2016) [En línea] (Actualizado al 02 de mayo de 2008).

- Disponible en ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFL/ccfl36/fl36_05s.pdf(Ultimo acceso 21 de septiembre 2016)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Food and Drugs Organization. (2016) [En línea] (Actualizado al 05 de marzo de 2015). Disponible en http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html (Ultimo acceso 21 de septiembre 2016)
 - Povey, J., Mason, T. (1998). Ultrasound in food processing. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic & Professional.
 - Ríos, A., Zougagh, M., Ávila, M. (2012). Miniaturization through lab-on-a-chip: utopia or reality for routine laboratories? A review, *Analytica Chimica Acta* 740, Pág.1-11.
 - Sakai Ayako, Yoshikawa Kunie, Tanimura Akio y Tomita Isao, (2017) Mutagenicity of reaction products of sulphydryl with nitrite, *Mutation Research*, 1981(90), Pág. 57-65.
 - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Atlas agroalimentario, México Siembra Éxito 2016, 1ª Edición. Capítulo Subsector Pecuario Pág. 176-187.
 - Sebarnek, Joseph G., Bacus, James N., (2007) Cured meat products without direct addition of nitrite or nitrate what are the issues?, *Meat Science*, 2007(77), Pág. 136-147
 - SOLIDWORKS 2016 EDITION PREMIUM, Version para Windows 7 de 64 bits intelligence CAD.
 - Song Xiao, Conforth Dick, Whittier Dick, Lou Xin, (2015) Nitrate spray treatment to promote red color stability of vacuum packaged beef. *Meat Science*, 2015(99), Pág.: 8-17.
 - Unión Europea UE/2015-826. Parametros de evaluación de productos cárnicos.
 - United States Department of Agriculture USDA-9-CRA-424 Determination of nitrites in meat products. Parameters of limit detection.
 - Whitesides, G. M. (2006). The origin and the future of microfluidics., *Nature* 442, Pág.368-373.

- Zeilmaker, M., Bakker, M., Schothorst, R., Slob, W. (2010). Risk assessment of N-nitrosodimethylamine formed endogenously after fish-with-vegetable meals. *Toxicological Science*, 116, Pág.323–335.

Anexos

1.-Distribución de establecimientos TIF en México.

La finalidad de la supervisión de los establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF), es verificar que, durante las actividades de sacrificio, corte, deshuese, almacenamiento y distribución de los productos de origen animal sea el correcto y cumplan con cada una de las normas establecidas para que los procesos se realicen con apego a la normatividad vigente en la materia, con la finalidad de mantener la calidad e inocuidad alimentaria. Garantizando de esta manera la salud del consumidor nacional, así como la de aquellos países que tienen relaciones comerciales con México; en beneficio de la estabilidad y crecimiento de la industria pecuaria en México.

Durante las visitas el supervisor identifica y documenta los incumplimientos que presenta el establecimiento TIF, le indica al gerente que deberá realizar acciones correctivas y el establecimiento acuerda las fechas de corrección. Posteriormente el supervisor verifica que los incumplimientos fueron corregidos en tiempo y forma, los documenta y a continuación le requiere a la gerencia un programa preventivo para evitar recurrencias en desviaciones o incumplimientos. De acuerdo a la última actualización del SIAP (Sistema de Información Agroalimentario y Pesquero) en México existen aproximadamente 515 establecimientos TIF, los cuales 503 se dedican al sacrificio, refrigeración, transporte, elaboración y distribución de carne y productos cárnicos.

Tabla 1.-Desgloce de establecimientos TIF de acuerdo a los tipos de clasificación y estados.

Estados de la República	Rastro de Sacrificio	Pza. de carne/Productos cárnicos	Almacén	Establecimientos totales
Aguascalientes	4	4	3	11
Baja california	11	12	8	31
Chiapas	25	42	15	82
Estado de México	11	26	29	66
Guanajuato	6	19	5	30
Guerrero	2	8	4	14
Jalisco	11	17	16	44
Michoacán	3	4	1	8
Nayarit	1	1	1	3
Nuevo León	24	65	39	128
Sinaloa	25	27	14	66
Yucatán	7	8	5	20
Total	130	233	140	503

En la Tabla 1 se puede observar que la cobertura de los establecimientos TIF es del 37.5% en la República mexicana, esto se debe a varias razones una de las más importantes es que no todos los estados son productores ganaderos, por ello los establecimientos son muy pocos, aunque como se puede observar en la tabla 1 que el estado de Nuevo León cuenta con la mayor cantidad de establecimientos con sello TIF esto se debe a que es un estado ganadero y con una buena cantidad de empresas que se dedican al sacrificio fabricación y refrigeración de productos cárnicos ya sea en piezas o cortes así como productos cárnicos procesados siendo este el estado con mayor producción; cabe mencionar que la mayoría de estos productos son de calidad de exportación.

La cantidad de establecimientos TIF son muy pocos si es comparado con los rastros clandestinos, rastros municipales entre otros debido a que el precio por sacrificar un animal es alto además de seguir una serie de protocolos y certificaciones antes de que estos sean sacrificados siendo mucho más barato el sacrificio en estos tipos de establecimientos, además se debe tomar en cuenta que en los establecimientos en donde

no se tiene este tipo de certificación cuentan con personal poco capacitado en cuanto a buenas prácticas de manufactura así como la adaptación de estos establecimientos, entre otros parámetros estipulados en los manuales creados por instituciones como SAGRAPA y SENASICA.

2.-Elaboración de salchicha tipo Frankfurt; diagrama de proceso, especificaciones físicas y químicas de acuerdo a la NMX-F-065-1984, así como la formulación elaborada en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos Grupo 1.

2.1.-Formulación de salchicha Frankfurt.

A continuación, se muestra la formulación utilizada para la elaboración de las salchichas cambiando la cantidad de proteína y la cantidad de lardo.

Ingredientes	F1 (g)	F2 (g)	F3 (g)	F4 (g)
Carne magra de res	100	100	100	100
Carne de cerdo	400	400	400	400
Lardo o papada de cerdo	175	350	450	175
Hielo picado	300	300	300	300
Harina de trigo	65	65	100	65
Sal fina	12	12	12	12
Azúcar	5	5	5	5
Consomé de pollo	12	12	12	12
Cebolla en polvo	8	8	8	8
Accoline	3.5	3.5	3.5	3.5
Nuez moscada en polvo	4	4	4	4
Pimienta blanca en polvo	3	3	3	3
Ajo en polvo	2	2	2	2
Glutamato monosódico	1	1	1	1
Eritorbato de sodio	0.5	0.5	0.5	0.5
Sabor humo	1	1	1	1
Sal de cura (6% de Nitritos de sodio)	1.67	1.67	1.67	1.67
Total	1093.67	1268.67	1403.67	1093.67

2.2.-Materia prima (Características).

2.2.1.-Carne de cerdo (espaldilla) y de res (diezmillo): la carne de ambas especies deberá tener un pH de 5.4 a 6.6 y una temperatura de 0°C. La grasa de cerdo se corta en tiras y se coloca en un congelador para evitar su enranciamiento o que se funda durante el proceso. Si la carne sólo llega refrigerada o a temperatura ambiente y no se cuenta con un congelador, se puede recurrir a la curación con salmuera seca, que consiste en incorporar la sal a toda la carne, así como el nitrito de sodio que se van a emplear en la formulación

2.2.2.-Hielo/Agua: El hielo debe ser de buena calidad microbiológica y estar finamente picado. No es recomendable usar piezas de hielo grandes en la picadora ya que disminuyen el filo de las cuchillas

2.2.3.-Soya: Para hidratar la soya texturizada, se coloca en agua en ebullición durante 30 min, en una proporción de 1: 4 soya-agua, posteriormente se deja reposando 24 horas antes y dejarla en refrigeración Cuando se va adicionar a la emulsión, previamente se tiene que comprimir sobre una coladera para extraer el agua que no quedo bien embebida.

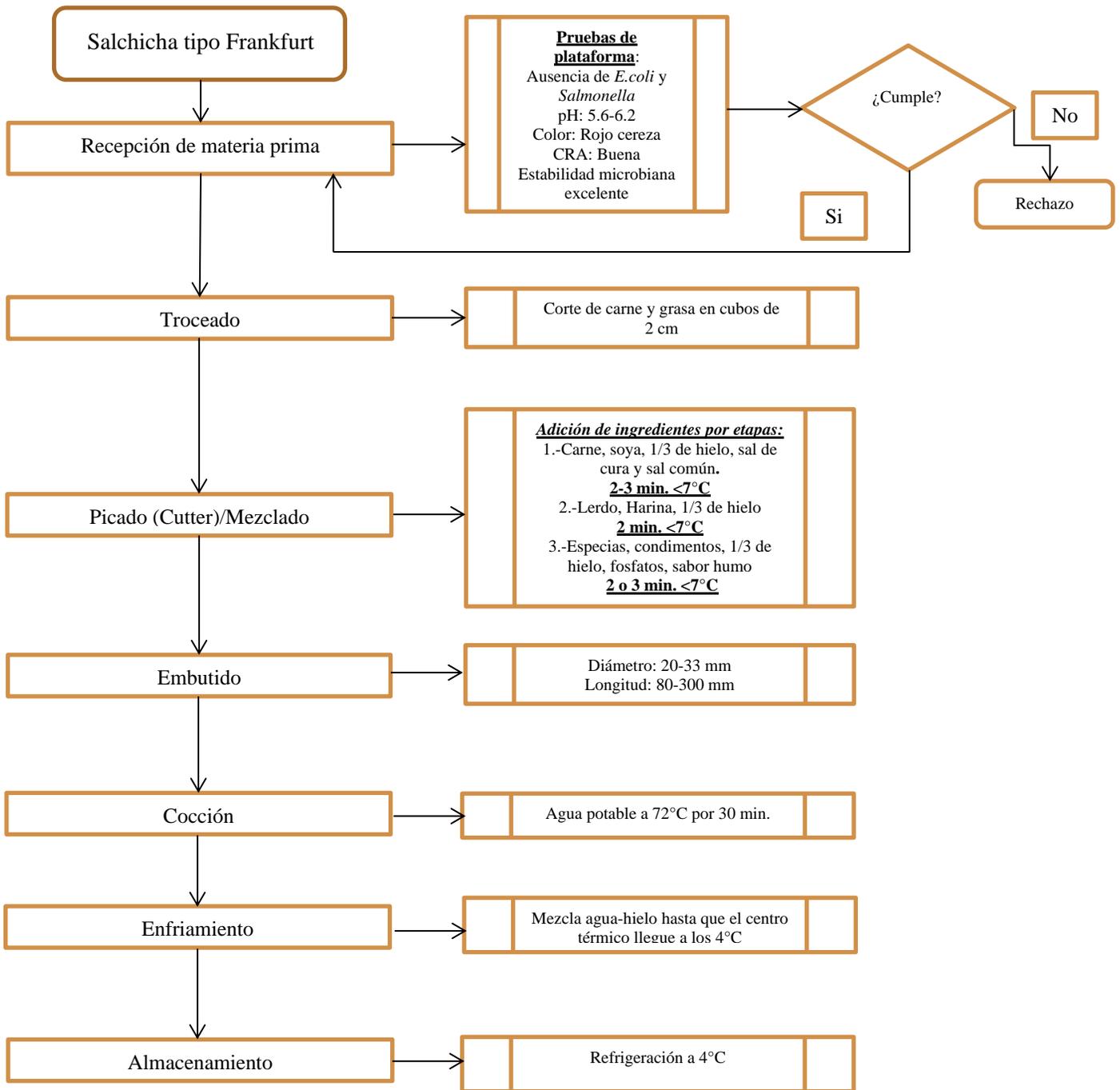
2.2.4.-Especias: Las especias deben ser de preferencia de molienda reciente, estar bien molidas y ser de buena calidad microbiológica se guardan en recipientes cerrados para conservar sus características

2.2.5.-Grasa: Lardo o papada de cerdo, ambas grasas tienen un punto de fusión mayor a los 40°C.El lardo es de color blanco, con una textura firme y no debe presentar olores rancios o a excremento. Debe conservarse en refrigeración

2.3.-Maquinaria y equipo.

- 1.-Antiadherente grado alimentario (marca comercial PAM)
2. Picadora de carne (Cutter).
3. Embutidora con boquillas de 1, 2 y 3 cm de diámetro
4. Recipiente para el cocimiento de las salchichas, con capacidad de 4 a 6 litros
5. Balanza analítica y balanza granataria.
6. Termómetros de 0 a 100°C
7. Termómetro para carne
8. Cámara de refrigeración a 4 °C
9. Cámara de congelación a -10 a -20°C
10. Hilo de cáñamo
11. Tijeras
12. Molde para panqué
13. Bolsas de plástico.
14. Fundas para salchicha Viena y Frankfur

2.4.-Diagrama de elaboración de salchicha tipo Frankfurt.



2.5.-Especificaciones físicas y químicas de la salchicha tipo Frankfurt (NMX-F-065-1984).

- ✓ Humedad, <70%
- ✓ Grasa, <30%
- ✓ Proteína, >9.5
- ✓ 156 ppm de Nitrato o Nitrito de sodio.
- ✓ Ascorbato y/o eritorbato de sodio, mínimo 0.5% (Antioxidantes)
- ✓ Polifosfato de sodio y/o potasio máximo agregado 0.5% (Emulsificante)
- ✓ Staphylococcus aureus 5000Col/g máx.
- ✓ Salmonella negativa en 25g.
- ✓ CTMA:500,000UFC/g

3.-Elaboración de chuleta ahumada; diagrama de proceso, especificaciones físicas y químicas de acuerdo a las NOM-122-SSA1-1994 y NOM-213-SSA1-2002, así como la formulación elaborada en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos Grupo 1.

3.1.-Formulación de chuleta ahumada.

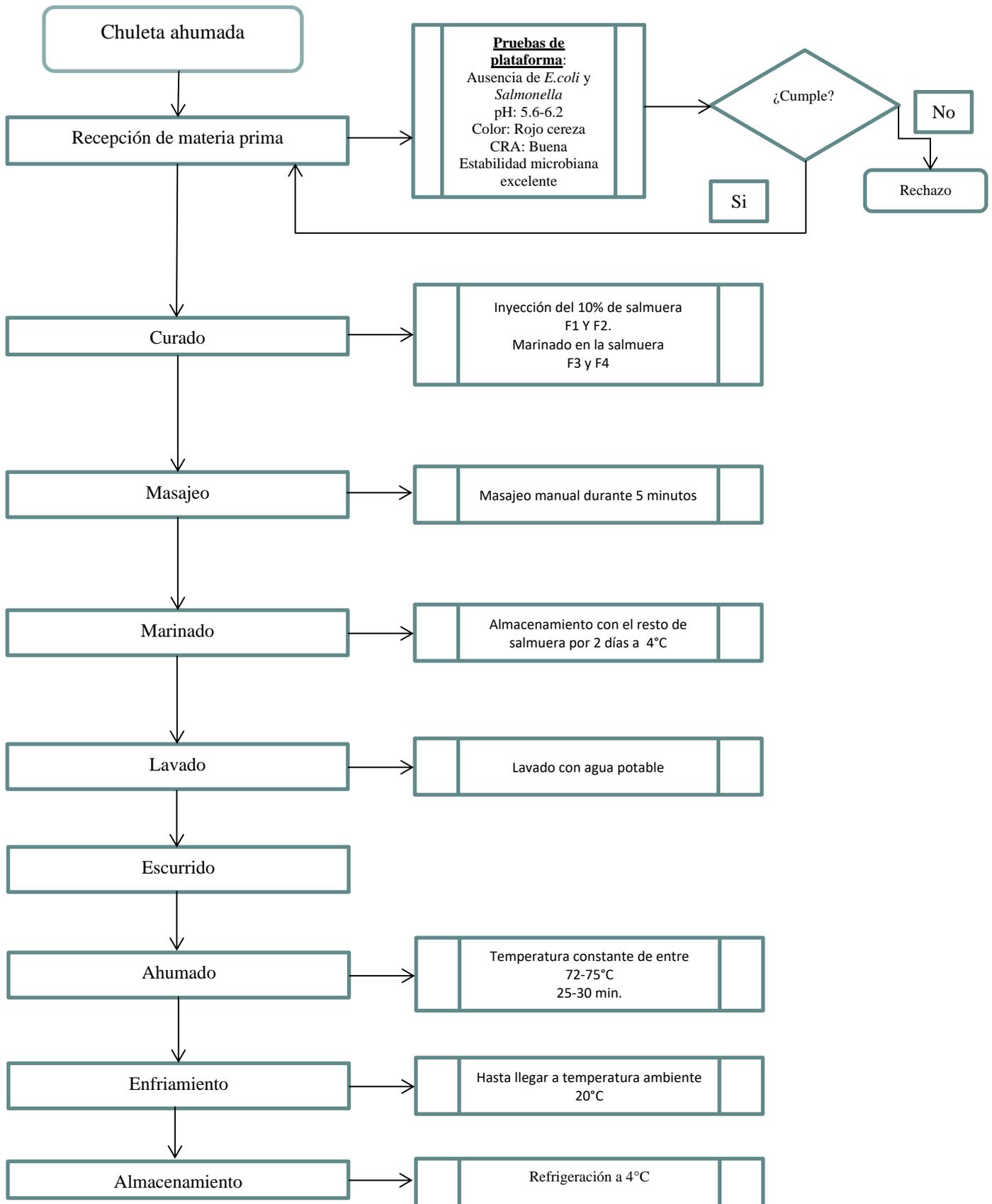
Se muestra la formulación utilizada para la elaboración de las chuletas ahumadas analizadas.

Ingredientes	F1, F2, F3 y F4 (g)
Chuleta de cerdo con hueso	1500
Sal fina	26
Azúcar	12
Eritorbato de sodio	8
Sal de cura(6% de Nitritos de sodio)	1.67
Agua	400
Total	1947.67

3.2.-Material y equipo

1. Azúcar
2. Sal cura (Premier)
3. Eritorbato de sodio
4. Sal común (Cloruro de Sodio)
5. Cuchillo
6. Charola de plástico
7. Balanza granataria
8. Refrigerador o cámara de refrigeración
9. Jeringa de plástico de 20 mL
10. Ahumador
11. Viruta de madera o serrín de madera no resinosa

3.3.-Diagrama de elaboración de chuleta ahumada.



3.4.-Especificaciones físicas y químicas de chuleta ahumada (NOM-122-SSA1-1994 y NOM-213-SSA1-2002).

Tabla 2.-Especificaciones microbiológicas.

Microorganismos	Límites máximos permisibles
Mesofilos aerobios	100,000 UFC/g
<i>E. coli</i>	Negativos
<i>S. aureus</i>	<10 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Negativo en 25 g

Tabla 3.- Límites permisibles de aditivos alimenticios para chuleta ahumada (mg/kg).

	Cocidos
Acido algínico y sus sales de sodio, potasio y propilenglicol	4000
Acido eritórbito y sus sales de sodio	500
Acido fosfórico	3100
Acido L (+) tartárico y sus sales de sodio y potasio	2400
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio	1000
Alfa tocoferol	3000
Butil hidroxianisol	100
Butilhidroxiquinona terciaria	100
Butilhidroxitolueno	100
Fosfato disódico	3100
Hexametáfosfato de sodio	3100
Mezcla de tocoferoles concentrados	50
Nitratos o nitritos de sodio o potasio	156
Propil-p-hidroxibenzoato	1000
Pirofosfato ácido de potasio	3100
Pirofosfato ácido de sodio	3100
Pirofosfato disódico	3100
Pirofosfato tetra-sódico	3100
Polifosfato de sodio	3100
Propionato de sodio	1000
Rojo allura	100
Trifosfato pentasódico	3100

4.-Elaboración de jamón tipo York; diagrama de proceso, especificaciones físicas y químicas de acuerdo a las NOM-213-SSA1-2002, NOM-158-SCFI-2003 y NMX-F-123-S-1982-, así como la formulación elaborada en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos.

4.1.-Formulación de jamón tipo York.

A continuación, se muestra la formulación utilizada para la elaboración de jamón tipo York analizadas.

Ingredientes	Jamón por masaje mecánico F1(g)	Jamón por masaje manual F2(g)	Jamón por inyección F3(g)	Jamón por masaje mecánico F4(g)
Carne	1000	1000	1000	1000
Agua	170	170	170	170
Sal fina	11	11	11	11
Azúcar	6	6	6	6
Sal cura	1.67	1.67	1.67	1.67
Eritorbato de sodio	2	2	2	2
Fosfatos Hamine	3	3	3	3
Carragenina	6	-----	-----	-----
Aislado de soya	-----	-----	0.5	-----
Condimento para Jamón	7	7	7	7
Glutamato monosodico	0.3	0.3	0.3	0.3
Hielo	60	60	60	60

4.2.-Tratamiento previo de la materia prima.

4.2.1.-Preparación de la pierna.

La pierna de cerdo o pernil, se deshuesa, es recomendable que esta operación la lleve a cabo una persona con experiencia para evitar que se hagan cortes innecesarios, a la pierna sin hueso se le quita el exceso de grasa, los tendones, los ligamentos y los coágulos de sangre.

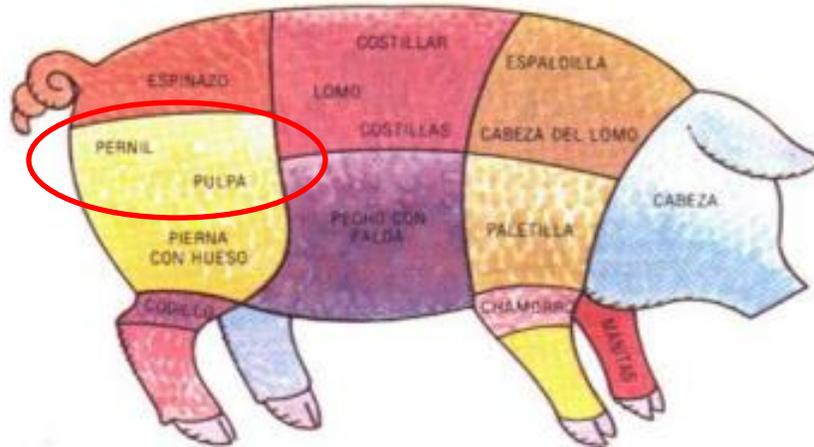


Figura 1.- Pernil de cerdo para elaboración de jamón.

4.2.2.-Preparación de la salmuera.

Es importante disolver completamente todos los ingredientes de la salmuera, los fosfatos se deben disolver por separado en una parte del agua y después adicionarlos al resto de la salmuera, con agitación para evitar su precipitación. En el caso de la formulación que lleva carragenina se deberá adicionar en segundo lugar después de los fosfatos, para que se hidrate sin ningún problema, o disolver los fosfatos de manera independiente a la carragenina y posteriormente integrarlos a la salmuera.

4.2.3.-Masajeo

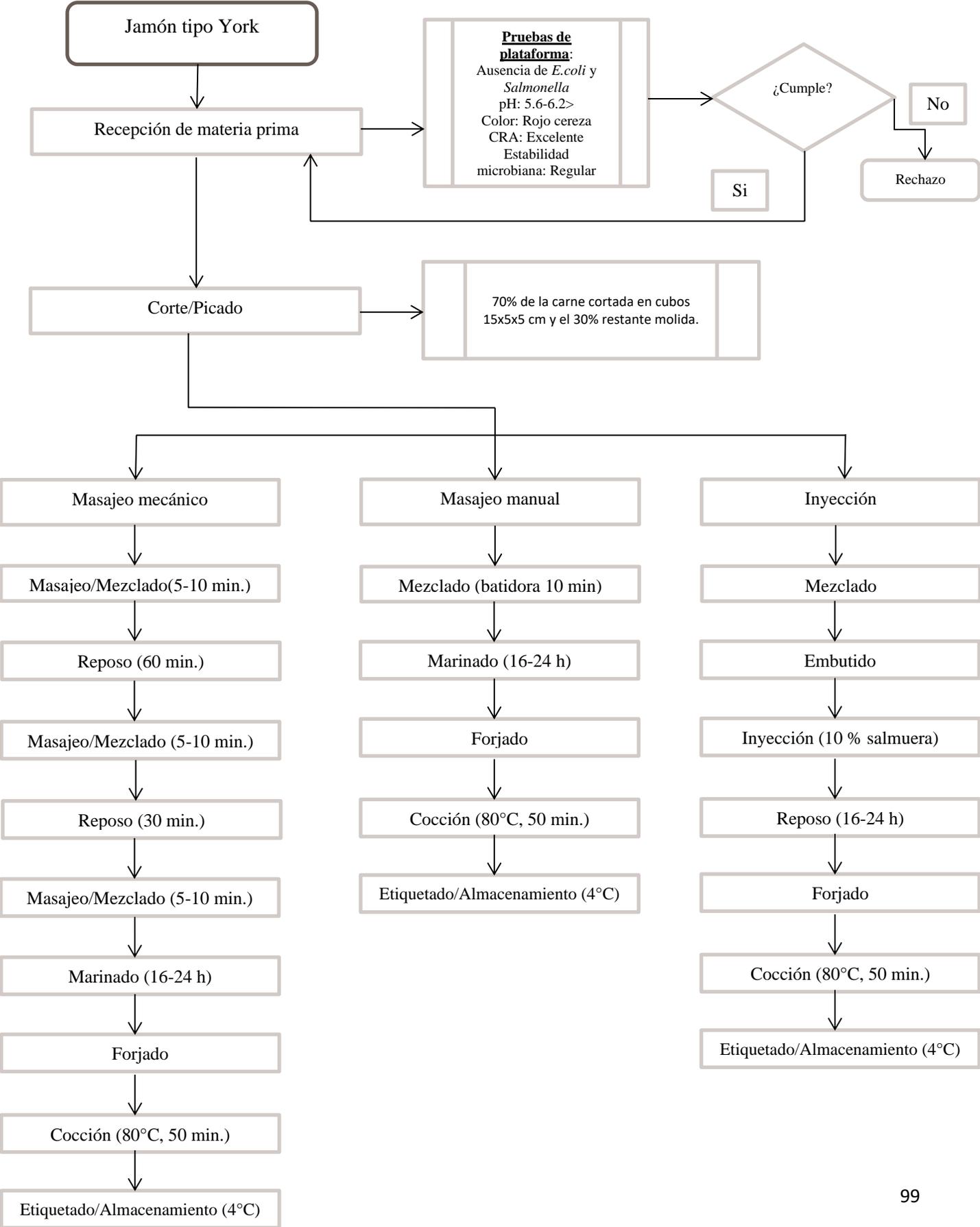
Si no se cuenta con una máquina, se hace manual, se debe presionar vigorosamente, de otra forma la salmuera no penetra en la carne y el curado es deficiente. Cabe mencionar que por motivos de denominación de origen la Norma Proy NOM-158-SCFI-2003, los productos derivados exclusivamente de las especies *Suis scrofa domesticus* y *Meliagridis* gallo-pavo, tanto de origen nacional como de importación, que se expendan al público consumidor dentro del territorio nacional bajo la denominación genérica Jamón.

4.4.-Maquinaria y equipo.

1. 1 m de tela de algodón ó manta de cielo
2. Balanza granataria
3. Cámara de refrigeración a 4° C
4. Olla de cocimiento con capacidad de 20 a 40 L
5. Cuchillo tipo filetero

- 6. Charola de plástico ó metal de 30 x 40 x 20 cm**
- 7. Jeringa de plástico de 20 mL (Jamón por inyección)**
- 8. Moldes para jamón con capacidad de 4 - 5 Kg (Forjas)**
- 9. Molino para carnes**
- 10. Probeta graduada de 500 mL**
- 11. Termómetro para carnes (evitar usar el termómetro de mercurio).**

4.5.-Diagrama de elaboración de jamón tipo York.



4.6.-Especificaciones físicas y químicas de chuleta ahumada (NOM-158-SCFI-2003y NOM-213-SSA1-2002).

Tabla 4.-Especificaciones microbiológicas.

Microorganismos	Límites máximos permisibles
Mesofilos aerobios	100,000 UFC/g
<i>E. coli</i>	Negativos
<i>S. aureus</i>	<10 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Negativo en 25 g

Tabla 5.- Límites permisibles de aditivos alimenticios para chuleta ahumada (mg/kg).

	Cocidos
Acido algínico y sus sales de sodio, potasio y propilenglicol	4000
Acido eritórbito y sus sales de sodio	500
Acido fosfórico	3100
Acido L (+) tartárico y sus sales de sodio y potasio	2400
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio	1000
Alfa tocoferol	3000
Butil hidroxianisol	100
Butilhidroxiquinona terciaria	100
Butilhidroxitolueno	100
Fosfato disódico	3100
Hexametáfosfato de sodio	3100
Mezcla de tocoferoles concentrados	50
Nitratos o nitritos de sodio o potasio	156
Propil-p-hidroxibenzoato	1000
Pirofosfato ácido de potasio	3100
Pirofosfato ácido de sodio	3100
Pirofosfato disódico	3100
Pirofosfato tetra-sódico	3100
Polifosfato de sodio	3100
Propionato de sodio	1000
Rojo allura	100
Trifosfato pentasódico	3100

Para los efectos de asegurar la correcta comercialización de los productos objeto de la presente Norma, y de acuerdo con los distintos grados de calidad de los productos alimenticios denominados Jamón que existen en el mercado, los mismos deben cumplir las especificaciones de la tabla 6, así como las especificaciones organolépticas y microbiológicas, de conformidad con lo establecido en la presente Norma Oficial Mexicana:

Tabla 6.-Especificaciones técnicas de jamón de pierna o tipo York.

Clasificación comercial	% PLG* Mínimo	% Grasa Máximo	%Humedad Máx.	% Proteína adicionada	%Carragenina Máximo	% Fécula Máximo
Extrafino	18	6	75	0	1,5	0
Fino	16	6	76	2	1,5	0
Preferente	14	8	76	2	1,5	5
Comercial	12	10	76	2	1,5	10
Económico	10	10	76	2	1,5	10

4.7.-Especificaciones sensoriales

Color: Rosado característico.

Olor: Agradable, característico, exento de olores extraños.

Sabor: Agradable, característico, exento de sabores extraños.

Consistencia: Firme, compacta y el aspecto del producto debe ser terso.

5.-Elaboración de chorizo cantimpalo; diagrama de proceso, especificaciones físicas y químicas de acuerdo a las NOM-213-SSA1-2002 y NOM-145-SSA1-1995, así como la formulación elaborada en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos.

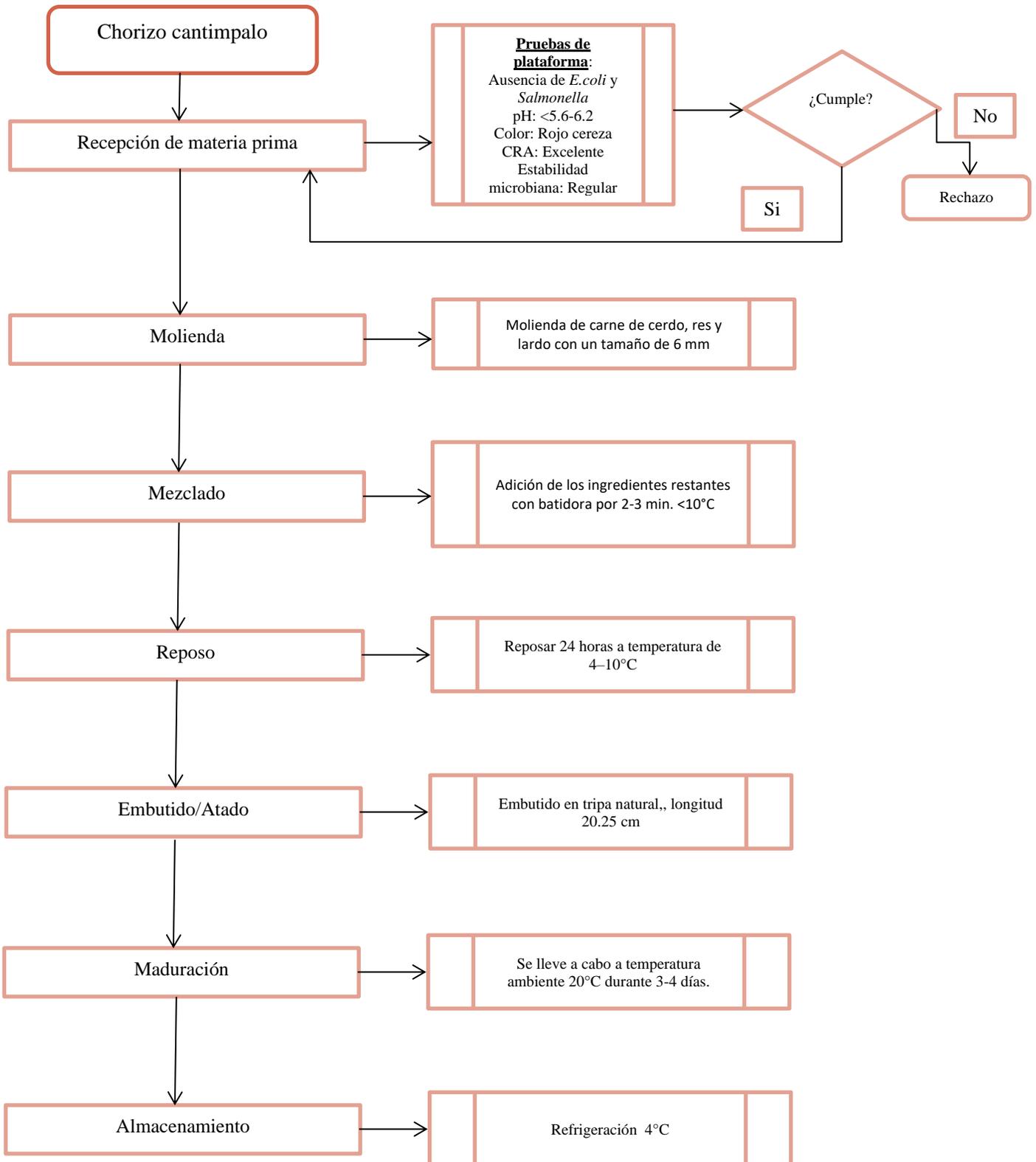
A continuación, se muestra la formulación utilizada para la elaboración de chorizo cantimpalo analizada.

Ingredientes	F1,F2,F3 y F4 (g)
Lomo de cerdo	400.0
Lomo de res	200.0
Lardo	300.0
Sal	15.0
Sal de cura (6% de nitritos de sodio)	1.67
Fosfatos	3.0
Glutamato	1.0
Ajo en polvo	1.0
Condimento de chorizo	10.0
Pimentón dulce	30.0
Pimentón picante	15.0
Pimienta blanca	0.25
Azúcar	5.0
Eritorbato de sodio	1.0
Vino blanco seco	60 mL
Cultivo láctico	20 mL
Total	1,602.92

5.1.-Maquinaria y equipo

- 1.- Balanza granataria
2. -Balanza analítica
3. -Cámara de refrigeración a 4 - 10°C
- 4.- Cámara de maduración a 30°C
- 5.- Cuchillo fileteador
- 6.- Embutidora con boquilla de 2 cm de diámetro
- 7.-Hilo de cáñamo
- 8.- Mezcladora eléctrica
- 9.-Molino para carnes con placa de 6 mm de abertura
- 10.-Probetas graduadas de 100 ml
- 11.-Tabla de madera
- 12.-Tripa natural y/o artificial (aproximadamente 2 m por kg de producto).

5.2.-Diagrama de elaboración de chorizo cantimpalo.



5.3.-Especificaciones físicas y químicas de chorizo cantimpalo (NOM-213-SSA1-2002 y NOM-145-SSA1-1995).

Tabla 7.-Especificaciones microbiológicas.

Microorganismos	Límites máximos permisibles
Mesofilos aerobios	No aplica
Coliformes fecales	<3 UFC/g
<i>E. coli</i>	Negativos
<i>Trichinella spiralis</i>	No aplica
<i>Salmonella spp</i>	Negativo en 25 g

Tabla 8.- Límites permisibles de aditivos alimenticios para chuleta ahumada (mg/kg).

	Curados Madurados
Acido algínico y sus sales de sodio, potasio y propilenglicol	4000
Acido eritórbito y sus sales de sodio	500
Acido fosfórico	3100
Acido L (+) tartárico y sus sales de sodio y potasio	2400
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio	1000
Alfa tocoferol	3000
Butil hidroxianisol	100
Butilhidroxiquinona terciaria	100
Butilhidroxitolueno	100
Fosfato disódico	3100
Hexametáfosfato de sodio	3100
Mezcla de tocoferoles concentrados	50
Nitratos o nitritos de sodio o potasio	156
Propil-p-hidroxibenzoato	1000
Pirofosfato ácido de potasio	3100
Pirofosfato ácido de sodio	3100
Pirofosfato disódico	3100
Pirofosfato tetra-sódico	3100
Polifosfato de sodio	3100
Propionato de sodio	1000
Rojo allura	100
Trifosfato pentasódico	3100

6. Primeras impresiones de Chip.

6.1.- Elaboración del Chip 1.

La Figura 14 muestra la cronología de elaboración de los chips mostrando los diagramas que ejemplifican cada uno de los pasos de elaboración de los diseños, mostrando las medidas y las características de las piezas incluyendo las fotografías de las impresiones en 3D.

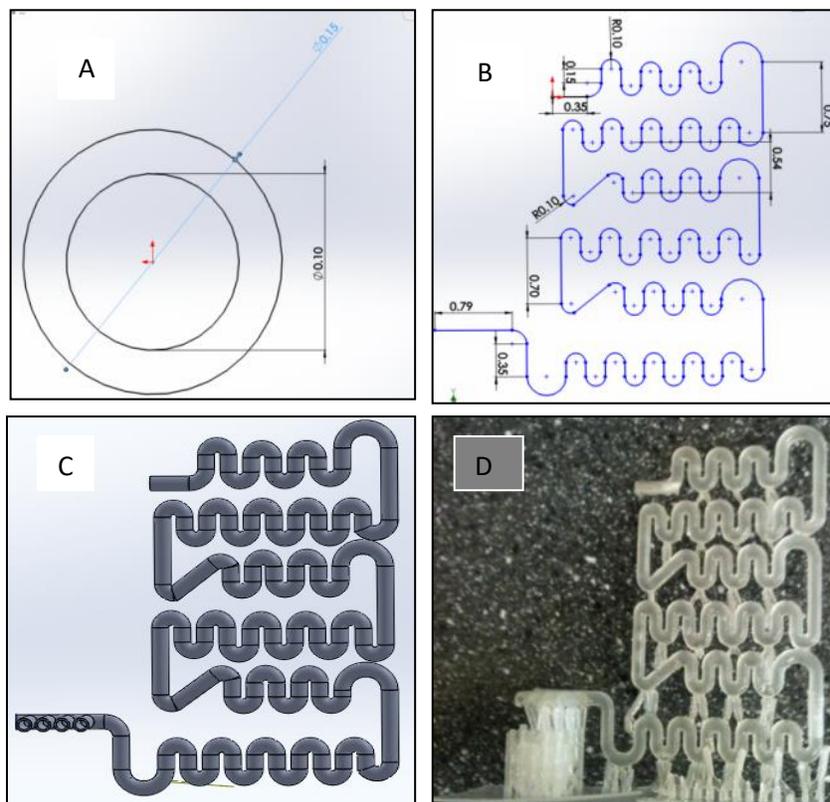


Figura 14.- Impresión y planos del Chip 1 de polímero de acrilato color crema.

En la Figura 14(A) muestra las medidas de los cuatro canales principal de entrada de los reactivos (Agua destilada, buffer $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ a pH 8.5, Sulfanilamida/Clorhidrato de N-1-naftiletildiamina) y estándar o muestra de nitritos, así como el canal de salida. Las medidas de los canales fueron: 0.1cm diámetro x 0.15cm diámetro interno.

La Figuras 14(B) muestra el plano de una sola dimensión de la estructura principal del Chip 1 en el cual se muestran todas las medidas de cada una de las secciones

que conforman la estructura; todas las medidas que se encuentran marcadas en el plano están en centímetros; en el caso de la Figura 14(C) se muestra el plano en tres dimensiones del Chip 1, ésta es una simulación de la estructura ya impresa. Es una de las opciones que ofrece este programa de diseño ya que mientras se diseña la estructura en una sola dimensión se puede revisar el diseño en tres dimensiones dando una referencia de como la pieza elaborada quedaría una vez que esta se imprime.

Una vez que se siguieron los pasos de las Figuras 14(A, B, C) respectivamente se procede realizar la impresión del diseño en tres dimensiones utilizando la impresora MiiCraft+ 3D printer a base de polímero de acrilato color crema; cómo se puede observar la Figura 14(D) la impresión mantiene las dimensiones y estructuras capturadas en los planos de diseño. Esta pieza tardo aproximadamente tres horas y media en imprimirse con un tiempo de lavado aproximado de diez minutos. El Chip 1 (Figura 14) no fue una pieza funcional ya la resina que se encontraba en el interior de los canales no fue posible eliminarla ya que la presión ejercida de manera exterior no es suficiente para provocar que la resina salga del interior de la estructura quedando un “tapón”.

Debido a los problemas de impresión presentando se decidió hacer otro microchip conservando las características de la estructura de la Figura 14 pero variando el ancho de los canales con la finalidad de aumentar el paso del flujo del disolvente para la eliminar el exceso de resina.

6.2.-Característica física del Chip A

La Figura 15 muestras las características del diseño en el orden cronológico de elaboración, en ellas se muestran las medidas de la estructura en centímetros.

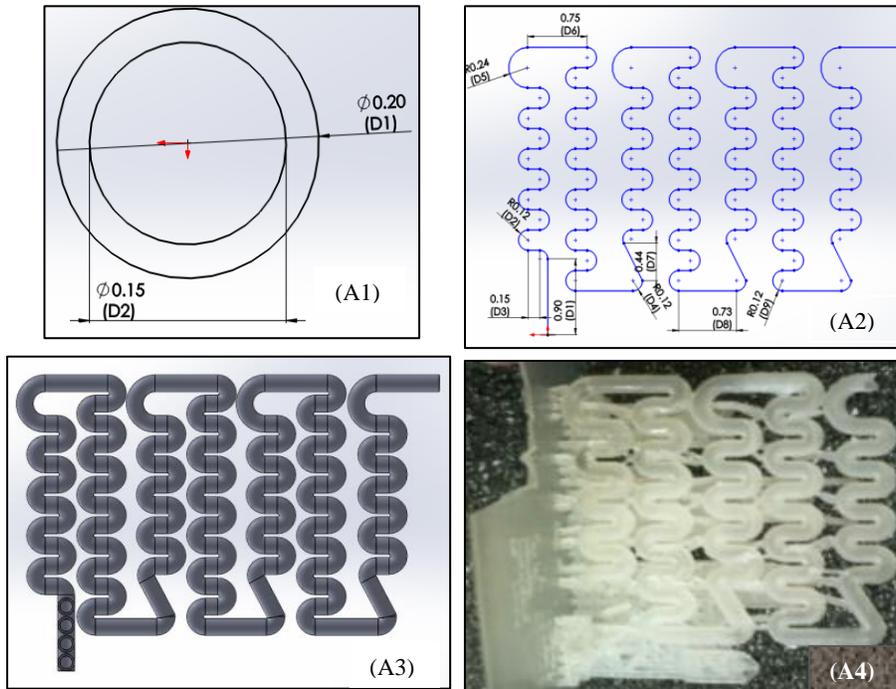


Figura 15.- Impresión y planos del chip A de polímero de acrilato color crema. El Chip A (Figura 15) tiene las siguientes dimensiones; un diámetro 0.15 cm y grosor de tubería 0.20 cm (Figura 15 A1) este cambio del grosor es por la fácil ruptura de las piezas además de aumentar el ancho por las mangueras de flujo. En la Figuras 15 (A2) se especifican las dimensiones de cada una de las partes que conforman las piezas, cambiando la estructura realizando adaptaciones en las medidas cambiando algunas dimensiones con relación al Chip1 (Figura 14).

La Figura 15(A3) muestra el diseño en tres dimensiones siendo un bosquejo, en el caso de la Figura 15(A4) muestra la impresión en tres dimensiones a base de polímero de acrilato color crema. Esta pieza presento el mismo problema de limpieza de la pieza de hecho si se observa con detalle existe una ruptura.

6.3.-Características físicas del Chip B

Debido a los problemas persistentes se optó por reducir el tamaño de la estructura a la mitad partiendo como referencia la Figura 15 cambiando la estructura por un par de serpentines eliminando las cuatro entradas, realizando la incorporación de reactivos y extractos de nitritos por una cruz de paso de flujo eliminando así la entrada del agua destilada ya que no tiene una interferencia directa en la cuantificación de nitritos.

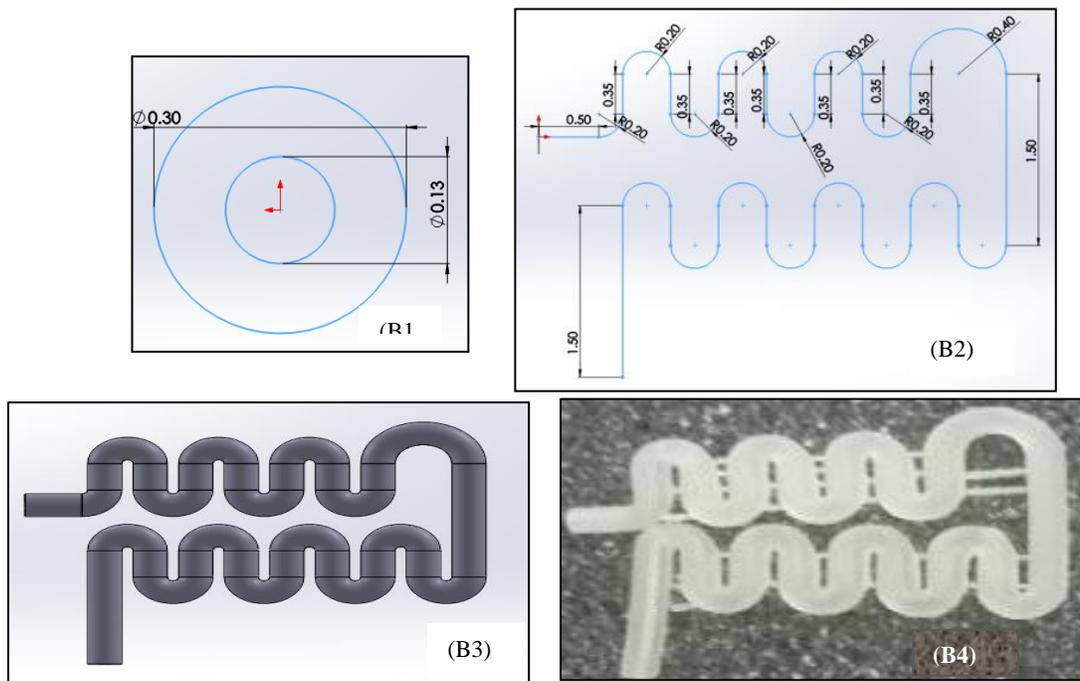


Figura 16.- Impresión y planos del Chip B de polímero de acrilato color crema.

El Chip B (Figura 16) tuvo un cambio de grosor del diámetro externo teniendo las dimensiones descritas en la Figura 16 (B1) aumentando el grosor de 0.20 cm hasta 0.30 cm presentando la pieza una mayor rigidez. Las siguientes Figuras 16 (B2) y Figura 16(B3) muestran las medidas y estructura, así como la simulación de la impresión de la misma en tres dimensiones.

La Figura 16(B4) muestra la impresión de la resina de polímero de acrilato a base de color crema, aunque la pieza es en proporciones similares a la del Chip

A (Figura 15) se hizo una pieza más simple teniendo el mismo problema de la eliminación de resina en el interior de las estructuras.

Por ello se decidió que la siguiente estructura del chip solo lo conformarían un serpentín agregando un par de curvas más alargando las rectas de conexión entre cada uno de las curvas, estos cambios quedarán especificados en los siguientes diagramas.

6.4.-Características físicas del Chip C.

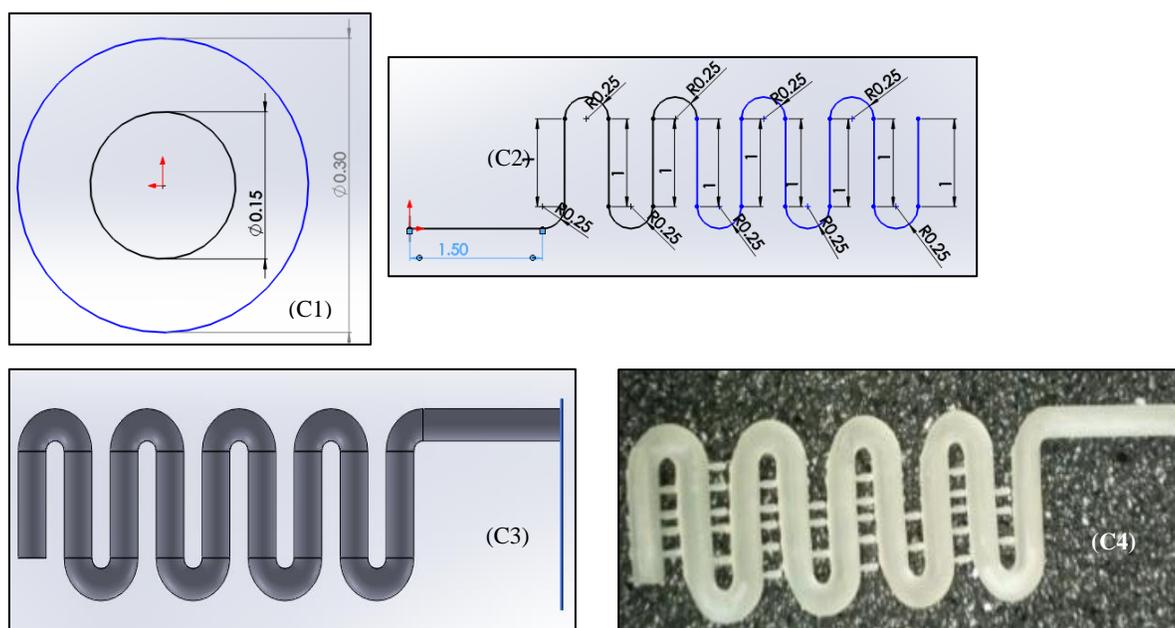


Figura 17 -Impresión y planos del chip A de polímero de acrilato color crema.

El Chip C (Figura 17) conservo el mismo tamaño de los canales de entrada mostrado en la Figura 17 (C1) con un diámetro de entrada de 0.15 cm y un grosor de 0.30cm; la Figura 17 (C2) muestra el plano de una sola dimensión del diseño con las características de la pieza que consta de una columna de serpentín de una sola entrada para los reactivos y otra para la recolección del producto.

Las Figuras 17(C3 y C4) muestran la simulación del diseño de tres dimensiones y la impresión del Chip C, a pesar de que se cambiaron varios parámetros con relación a los chips anteriores el problema de limpieza de las piezas.

Pero está mostro un avance diferente a las antes elaboradas ya que la extracción de la resina en la estructura fue más fácil quedando limpia la pieza hasta la mitad, este avance fue muy importante por ello se decidió que el siguiente chip tendría las mismas características de diseño recortando la estructura de una longitud de 6 cm hasta una de 3.5 cm, siendo la medida en la cual se puede quitar la resina interna.

La estructura del Chip D (Figura 18 D1) muestra las dimensiones de la estructura con un grosor de 0.30cm, esta pieza no presento el problema de limpieza eliminando la resina en el interior de los canales.

La Figura 18(D2) muestra las medidas del Chip D representando la figura en un solo plano. En las Figura 18 (D3 y D4) se muestra el plano en tres dimensiones, así como la pieza impresa a base de polímero de acrilato color crema.

Estos cambios ayudaron a que la estructura se hueca para posteriormente ser caracterizada en el Capítulo 5 de Discusiones y resultados sección 5.3.1- Caracterización de Chip D (Figura 18)

8.-Microchip de dos fases.

8.1-Características de microchips 3D en dos partes

El diseño de estos microchips es diferente con relación a los anteriormente mencionados ya que los canales se encuentran expuestos, por ello solo se mostrarán la simulación de la pieza en tres dimensiones, así como la impresión de la pieza por medio de la impresora MiiCraft +3D printer a base de polímero de acrilato color crema.

8.2.-Característica físicas del Microchip A

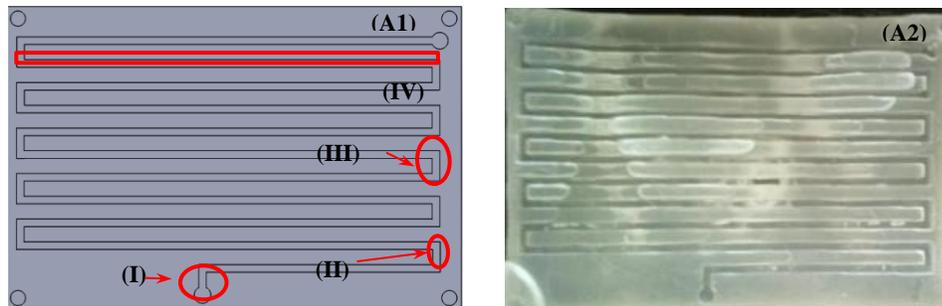


Figura 20.-Planos 3D e impresión del Microchip A de polímero de acrilato color

El primer Microchip A (Figura 19 A.1 y A.2) tiene una estructura física de 3 cm x 2 cm x 0.5cm, la estructura está conformada por dos entradas que tienen un diámetro (I) de 0.11cm con una profundidad de 0.30 cm las cuales se encuentran comunicadas con canales de un ancho (II) de 0.15 cm con profundidad de 0.30 cm, el canal de intersección de las rectas tiene un largo (III) de 0.20 cm con profundidad de 0.30 cm; largo de los canales (IV) de 2.74 cm. Este Microchip A tiene la facilidad de eliminar la resina del interior de los canales, pero el defecto de que en el centro de la pieza impresa existe un agujero que no hace funcional la pieza, siendo el tamaño de la impresión el principal problema en el modelo MiiCrfat+3D printer.

El Microchip B tiene la misma estructura del Microchip A (Figura 19) con la diferencia de que solo se escalaron algunas medidas debido a la limitante por el tamaño de la impresión.

8.3.-Características físicas del Microchip B.

Las características del Microchip B son similares a la Figura 20 con la diferencia de que se disminuyeron las dimensiones de la caja base, debido a que la pieza impresa excede los límites de impresión; el resultado obtenido de la nueva pieza se presenta a continuación:

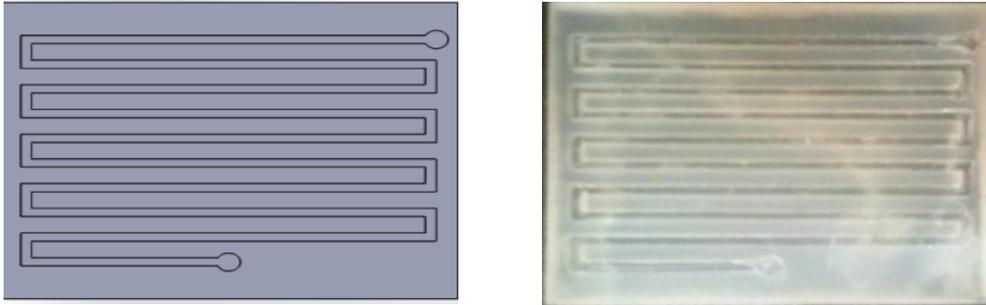


Figura 21.-Planos 3D e impresión del Microchip B de polímero de acrilato color

El Microchip B (Figura 20 B.1 y B.2) tiene una estructura física de 2.20 cm x 2 cm x 0.5cm, está conformada por dos entradas que tienen un diámetro (I) de 0.11cm con una profundidad de 0.30cm, las cuales se encuentran comunicadas con canales de un ancho (II) de 0.15 cm rectas que tienen un largo (III) de 0.20 cm con una profundidad de 0.3 cm; el largo total (III) de los canales es de 1.54 cm. El Microchip B tiene la facilidad de eliminar la resina del interior de los canales, a diferencia del Microchip A (Figura 19) no presentó el problema del agujero en la parte media de la estructura, siendo prácticamente una pieza funcional. De esta estructura se realizaron pruebas de curva patrón las cuales se encuentran especificados en el Capítulo 5 sección 5.4.2.1-Characterización de Microchip B.2.

8.4.-Características físicas del Microchip C

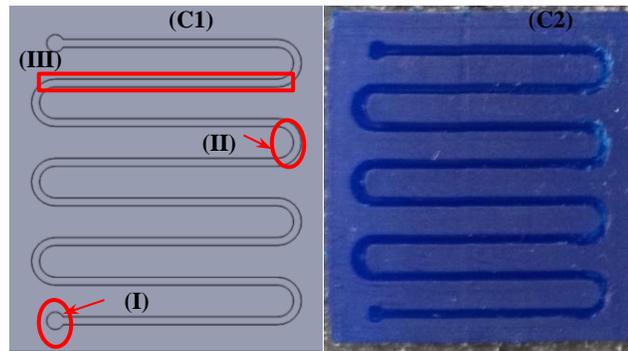


Figura 23.-Planos 3D e impresión del Microchip C de polímero de acrilato color

La estructura del Microchip C (Figura 23 C.1 y C.2) presenta una geometría diferente en las esquinas ya que se cambiaron las rectas por curvas ya que el flujo era intermitente en el diseño anterior, esta estructura presenta una superficie de 1.80cm x 2.10m x 0.5cm, la estructura superficial se encuentra conformada por dos entradas diámetro (I) de 0.11cm con una profundidad de 0.3 cm, las cuales se encuentran comunicadas con canales de un ancho (II) de 0.15 cm con una profundidad de 0.3 cm, el canal de intersección de las curvas tienen un largo (III) de 0.10 cm con una profundidad de 0.3 cm; la estructura tiene canales de un largo (I11) de 1.54 cm. Esta estructura, a diferencia de la anterior, no presentó un flujo intermitente en las esquinas curvas, además de no presentar algún derrame o fuga del producto de reacción ni en los bordes todos los parámetros evaluados acerca de esta estructura se encuentran señalados en el Capítulo 5, 5.4.3.1-Microchip C.